

厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業  
難治性炎症性腸管障害に関する調査研究  
分担研究報告書

大腸上皮および単球細胞における amphiregulin-regulating protein (ARP) 36 による TNF $\alpha$  放出制御機構

研究協力者 城 卓志 名古屋市立大学大学院医学研究科 消化器・代謝内科学 教授

研究要旨：炎症性腸疾患治療において TNF $\alpha$  抗体療法は、有効であるが十分ではない。TNF $\alpha$  は、膜結合型メタロプロテアーゼ (ADAM17) により細胞膜から切断・放出される。詳細なメカニズムは不明である。今回、TNF $\alpha$  放出のメカニズムを明らかにし、新規治療ターゲットを探索した。ADAM17 結合蛋白を網羅的に質量分析し ADAM17 結合膜蛋白 ARP 36 同定した。大腸上皮および単球細胞株での TNF $\alpha$  放出は、ARP36 siRNA により抑制されたことより ARP36 は TNF $\alpha$  放出を制御していることが明らかになった。ARP36 は、炎症性腸疾患の新規治療ターゲットとなりうると考えられる。

共同研究者

塚本宏延、谷田諭史 (名古屋市立大学大学院医学研究科消化器・代謝内科学)  
東山繁樹 (愛媛大学大学院生化学分子遺伝分野2)

A. 研究目的

Tumor necrotic factor (TNF)  $\alpha$  は炎症性腸疾患の進展・増悪に重要な役割を果たしている重要な炎症性サイトカインであり、その制御が炎症性腸疾患治療の中心となっている。抗 TNF  $\alpha$  療法は、抗 TNF  $\alpha$  抗体での TNF  $\alpha$  作用抑制が中心である。有効性は確立されているが、無効例や効果減弱による2次無効症例が問題となっている。

細胞膜上の膜結合型 TNF  $\alpha$  は、ADAM17 により可溶性 TNF  $\alpha$  に切断・遊離 (shedding) される。ADAM17 の標的蛋白は2型膜タンパク (細胞質内にN末端が存在する) TNF- $\alpha$  のほか、1型膜タンパク (細胞質内にC末端が存在する) の Amphiregulin、HB-EGF など多様である。

ADAM17 がもつ標的膜蛋白切断の多様性を解明するために、ADAM17 に関連する介在タンパクが存在するのではないかと仮説をたてた。ADAM17 と相互作用するタンパクを網羅的に同定することで、TNF  $\alpha$  shedding のメカニズムを明らかにし、新規治療ターゲットを探索した。

B. 研究方法

大腸上皮細胞株 (HCT116) および単球細胞株 (U937) を使用した。ADAM17 による TNF  $\alpha$  shedding に関連する介在タンパクを同定するため、抗 Amphiregulin 抗体で共免疫沈降後 electrophoresis にて分離し、候補蛋白を MALDI/TOFMS にて網羅的に同定した。TNF  $\alpha$  shedding 測定系を確立するため、IL-1  $\beta$  (20ng/mL)、フォルボールエステル (TPA) (100nM)、Lipopolysaccharide (LPS) (100ng/mL) で刺激し、培養液中の TNF  $\alpha$  レベルを経時的に ELISA 測定した。ADAM17 抑制のため、ADAM 阻害剤 (KB-R7785) (10  $\mu$ mol/L) の使用、siRNA により ADAM17 蛋白を欠失させた。さらに、MALDI/TOFMS にて同定された ADAM17 関連候補蛋白を siRNA で欠失させたあと、TNF  $\alpha$  shedding を ELISA 法で解析した。

(倫理面への配慮)

該当しない。

C. 研究結果

MALDI/TOFMS 解析にて、10 種類のタンパクが同定された。大腸上皮細胞、単球細胞で多く発現がみられる amphiregulin-regulating protein (ARP) 36 に着目した。大腸上皮細胞株を IL-1  $\beta$  刺激すると、培養液中の TNF  $\alpha$  濃度が経時的に増加

したが TPA、LPS では、増加はみられなかった。一方、単球細胞株を TPA 刺激すると、培養液中の TNF  $\alpha$  濃度が増加し、IL-1  $\beta$ 、TPA による刺激では、増加はみられなかった。さらに、KB-R7785、siRNA により ADAM17 を欠失すると、大腸上皮細胞、単球細胞での IL-1  $\beta$ 、TPA 刺激時 TNF  $\alpha$  shedding による濃度上昇が、有意に抑制された。さらに、siRNA により ARP36 を欠失しても、同様に IL-1  $\beta$ 、TPA 刺激時 TNF  $\alpha$  shedding による濃度上昇が、有意に抑制された。

#### D. 考察

大腸細胞株では IL-1  $\beta$ 、単球細胞株では TPA による刺激で TNF  $\alpha$  shedding が起こることが確認された。さらに、ADAM17 阻害剤、ADAM17 欠失の結果から TNF  $\alpha$  の shedding は、ADAM17 より惹起されることも分かった。これらは、これまでの報告と一致するものだった。

質量分析から得られた ARP36 を欠失させても IL-1  $\beta$ 、および TPA 刺激で惹起された TNF  $\alpha$  shedding は抑制されることから、単球細胞、大腸上皮細胞において、ARP36 は、ADAM17 により誘導される TNF  $\alpha$  shedding に重要な役割を果たしていると考えられる。さらに、ARP36 は、1 型膜タンパクの Amphyregulin や HB-EGF の shedding を抑制せず、ARP36 は、ADAM17 による 2 種類の構造の違った 1 型および 2 型膜タンパクの切断を制御する重要な分子と考えられた。ARP36 の機能を特異的に抑制することができれば、2 型膜タンパクである TNF  $\alpha$  の shedding のみを制御することが可能となる。

#### E. 結論

ARP36 は、TNF  $\alpha$  shedding を制御する炎症性腸疾患新規治療ターゲットになりうると思われた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Tanida S, Mizoshita T, Mizushima T, Shimura T, Kamiya T, Kataoka H, Joh T. Involvement of cell proliferation induced by dual intracellular signaling of HB-EGF in the development of colitis-associated cancer during ulcerative colitis. *Ulcers volume* 2011 6 pages, 2011
- 2) Tanida S, Mizoshita T, Mizushima T, Sasaki M, Shimura T, Kamiya T, Kataoka H, Joh T. Involvement of oxidative stress and mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) in inflammatory bowel disease. *J Clin Biochem Nutr.* Mar;48(2):112-6, 2011
- 3) Mizushima T, Tanida S, Mizoshita T, Hirata Y, Murakami K, Shimura T, Kataoka H, Kamiya T, Joh T. A Complicated Case of Tacrolimus-Induced Rapid Remission after Cesarean Section in the Early Third Trimester for Refractory Severe Ulcerative Colitis Flaring in the Initial Period of Gestation. *Case Rep Gastroenterol.* 5, 144-151, 2011

##### 2. 学会発表

塚本宏延, 谷田諭史, 尾関啓司, 平田慶和, 片岡洋望, 城卓志 大腸上皮および単球細胞における amphyregulin-regulating protein (ARP) 36 による TNF  $\alpha$  放出制御 第 39 回日本潰瘍学会 筑波 2011. 11. 18

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

##### 1. 特許取得

なし。

##### 2. 実用新案登録

なし。

##### 3. その他

なし。

クローン病腸管線維化における Heat shock protein 47 を分子標的とした治療の可能性

研究分担者 千葉 勉 京都大学医学部消化器内科 教授

研究要旨：生物学的製剤を始めとした薬物治療の進歩により、Crohn's disease (以下 CD) 患者の quality of life (QOL) は向上してきた。しかしながら、抗炎症治療を継続しているにもかかわらず、CD 患者においては腸管狭窄を生じる場合が少なくない。従って、CD における腸管線維化の機序解明とそれに基づいた治療開発は患者 QOL 向上に貢献をするものと考えられる。Heat shock protein 47 (以下: HSP47) は小胞体に局在するストレス蛋白質であり、コラーゲンの蓄積を特徴とする線維化疾患で極めて強く誘導されている。今回、我々は CD 腸管線維化における HSP47 の関与についての検討を行った。結果として CD では潰瘍性大腸炎 (以下: UC) や健常人と比較して有意に血清 HSP47 値が高く、腸管組織での HSP47 陽性細胞数も CD で有意に増加していた。これらの結果より、HSP47 の制御は腸管線維化治療において重要な因子の一つであると考えられた。

共同研究者

仲瀬裕志、松浦 稔、本澤有介

(京都大学医学部消化器内科 内視鏡部)

A. 研究目的

近年、生物学的製剤を始めとした薬物治療の進歩により、CD 患者の quality of life (QOL) は向上してきた。しかしながら、抗炎症治療を継続しているにもかかわらず、CD 患者においては腸管狭窄を生じる場合が少なくない。その結果、外科的に腸管切除あるいは腸管狭窄形成が余儀なくされる。また、頻回の手術を伴うことにより術後に短腸症候群をきたす場合もある。従って、CD における腸管線維化の機序解明とそれに基づいた治療開発は CD 患者 QOL 向上に多大な貢献をするものと考えられる。以前より腸管線維化に関わる分子としては TGF- $\beta$ -1 が注目されてきた。各種腸炎モデルを用いた TGF- $\beta$ -1 の検討では腸管局所における発現制御が腸管線維化抑制につながるとの報告がなされている。一方、TGF- $\beta$ -1 は強い抗炎症作用および上皮細胞の再構成にも関与している点から腸管炎症の制御に必須の分子といえる。従って、我々は TGF- $\beta$ -1 以外の線維化に直接関与する分子の制御に着目し、その制御がクローン病の腸管狭窄の治療において重要であると考えてきた。HSP47 は小胞体に局在するストレス蛋白質であり、I-V 型の各種コラーゲンに結合し、正常なコラーゲンの産生に必須の分子である(4)。HSP47 は TGF- $\beta$ -1 によ

り誘導されていることから、その下流に存在する。さらに HSP47 はコラーゲンの蓄積を特徴とする各種線維化疾患で極めて強く誘導され、その病態に関与していると考えられている。今回、我々は CD 患者腸管線維化における HSP47 の関与についての検討を行った。

B. 研究方法

1. 対象

対象は CD 患者 40 例、UC 患者 46 例、健常人 17 例。(1) 血清 HSP47 濃度を ELISA 法で測定。(2) CD 患者ではその血清 HSP47 値と Crohn's Disease Activity Index (CDAI)、病変部位、病型分類との関連を検討した。(3) CD および UC においては手術検体を用いて組織の HSP47 陽性細胞数を蛍光免疫染色法で比較し、さらに同組織における HSP47 及び TGF- $\beta$ -1 の遺伝子発現を半定量 RT-PCR 法により解析した。

C. 研究結果

1. 血清 HSP47 値

CD 患者における血清 HSP47 濃度は UC 患者、健常人に比し有意に高いことが示された (CD;  $0.802 \pm 0.150$  ng/ml, UC;  $0.382 \pm 0.103$  ng/ml, 健常人;  $0.190 \pm 0.076$  ng/ml)。血清 HSP47 値と CDAI 及び病変部位との相関関係は認められなかった。しかしながら、病型分類において血清 HSP47 値は狭窄型が穿通型に比較し

て有意に高いことが示された。血清 CRP 値や白血球数と HSP47 値の相関についても検討したが明らかな相関関係は認められず、炎症反応との相関関係は有していなかった。

## 2. 組織における HSP47 の遺伝子発現

腸炎組織中の TGF- $\beta$ 1 及び HSP47 の遺伝子発現はいずれも有意に CD 患者において UC 患者に比べて有意に高いことが示された。

## 3. 免疫染色を用いた HSP47 の組織発現

各疾患の手術検体を用いて HSP47 の発現を蛍光免疫染色法により検討した。結果として HSP47 陽性細胞数は CD 患者において UC 患者に比較して CD 症例で有意に増加していることが示された。

## D. 考察

CD や UC をはじめとする炎症性腸疾患は腸管特異的に炎症が生じ、生涯治療の継続が必要とされる難治性疾患である。近年、本邦において疾患患者数の増加に伴い治療抵抗例や重症例が増加しつつある。その原因についてはいまだ解明されておらず、根本的治療についても確立されていない。内科的治療抵抗性の CD 患者においては、腸管局所の慢性炎症に伴う線維化が生じ、その結果として小腸および大腸の狭窄が引き起こされる。HSP47 は小胞体に局在するストレス蛋白質として発見されたコラーゲン特異的分子シャペロンである。この HSP47 の特徴は基質特異性をもつという点であり、I-V 型の各種コラーゲンに結合し、特にコラーゲンの三本鎖領域、Gly-X-Y リピートの代表的ペプチドモデルである Gly-Pro-Pro に結合する。コラーゲンは Gly-X-Y の Y 位のプロリンが水酸化されて成熟するが、HSP47 はこの成熟したペプチドからは解離する。HSP47 をノックアウトしたマウスは胎生 11.5 日目で致死となり、発生には必須の遺伝子であることが報告されている。このノックアウトマウスではコラーゲン分子に異常がみられ、I 型コラーゲンの三本鎖形成が不十分で、分泌されたコラーゲンはプロテアーゼによって分解されやすい。このように HSP47 は正常なコラーゲンの産生に必須の分子とされている。HSP47 の発現増強に関与する因子としては、ストレスおよび TGF- $\beta$ 1 が報告されて

おり、その発現は常にコラーゲン産生細胞に認められ、コラーゲンの発現と共役しているとされる。疾患との関連としては肝硬変をはじめとする線維化疾患での HSP47 の発現が強く誘導されているとの報告がある。しかしながら、腸管線維化を特徴とする CD の病態における HSP47 の関与は未だに検討されてはいない。まず、我々は CD、UC、健常人の血清 HSP47 濃度を測定した。その結果、CD 患者では UC 患者及び健常人に比較して有意に高いことが示された。また、同様に組織中の HSP47 及び TGF- $\beta$ 1 における発現も CD で有意に高かった。さらに血清における検討では CD の血清 HSP47 値は CDAI とは相関を認めなかったが、CD の病型別に検討を加えた結果、狭窄合併例で有意に高いことが証明された。一般に CD の腸管における瘻孔は狭窄の口側に生じることが多いとされており、CD の自然経過上、病型により血清 HSP47 が高くなる。CD 患者で血清および組織の HSP47 の発現が UC 患者に比して高い理由には以下の 2 つが推測される。(1) CD は UC に比し Th1 免疫反応が強く、counter partner としての TGF- $\beta$ 1 の発現が CD においてより高くなり、HSP47 の発現の差に反映された。(2) 2009 年 Glocker らによると小腸炎・腸管皮膚瘻・肛門周囲炎・腹腔内膿瘍を合併する小児の IBD 症例において IL-10 受容体の mutation を有する傾向が多いとのことであった。日本人 CD 症例における同様の報告はないものの従って、同様の機序が存在する可能性がある。従って、CD 患者では IL-10 による抗炎症性効果が十分に発揮できないため、TGF- $\beta$ 1 の発現増強が生じた。上記の 2 点の解明については、現在追加実験を進めている。

## E. 結論

CD における血清及び組織中の HSP47 は UC に比し有意な上昇が認められた。HSP47 は CD に対する抗線維化療法としての分子標的をなりうるものと考えられた。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Nakase H, Tamaki H, Matsuura M, Chiba T, Okazaki K. Involvement of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis with TNF- $\alpha$  production from macrophage-possible link between MAP and immune response in Crohn's disease *Inflamm Bowel Dis* 17:E140-E142:2011.
2. Nakase H, Uza N, Matsuura M, Chiba T. Importance of CXCL16 as a biomarker for granulocytapheresis in patients with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 17:2211-2212: 2011.
3. Yamamoto S, Nakase H, Matsuura M, Masuda S, Inui K, Chiba T: Tacrolimus therapy as an alternative to thiopurines for maintaining remission in patients with refractory ulcerative colitis. *J Clin Gastroenterol* 45:526-530:2011.
4. Nakase H Yoshino T, Matsumura K, Honzawa Y, Yamamoto S, Matsuura M, Chiba T. Positive finding of Colonic PCR for CMV-DNA is not false positive but warning for treating patients with UC refractory to immunosuppressive therapies *Inflammatory Bowel Disease* 17:E13-4:2011.
5. Yoshino T, Nakase H, Matsuura M, Matsumura K, Honzawa Y, Fukuchi T, Watanabe K, Murano M, Tsujikawa T, Fukunaga K, Matsumoto T, Chiba T. Effect and Safety of Granulocyte-Monocyte Adsorption Apheresis for UC Patients Positive for Cytomegalovirus in Comparison with Immunosuppressants. *Digestion* 84:3-9:2011.
6. Nakase H, Matsuura M, Chiba T. Potential role of granulocyte/monocyte adsorptive apheresis for ulcerative colitis with concomitant CMV infection. *Aliment Pharmacol Ther* 33:497-498:2011.
7. Kitamura H; Yamamoto S; Nakase H, Matsuura M, Honzawa Y, Matsumura K; Takeda Y, Uza N, Nagata K, Chiba T. Role of heat shock protein 47 in intestinal fibrosis of experimental colitis. *Biochem Biophys Res Commun* 404:599-604: 2011.
8. Uza N, Nakase H, Yamamoto S, Yoshino T, Takeda Y, Ueno S, Inoue S, Chiba T: SR-PSOX/CXCL16 plays a critical role in the progression of

colonic inflammation. *Gut* 60:1494-1505: 2011.

9. Honzawa Y, Nakase H, Matsuura M, Chiba T. Clinical significance of serum diamine oxidase activity in inflammatory bowel disease. - importance of evaluation of small intestinal permeability- *Inflammatory Bowel Disease* 17: E23-5: 2011.
10. Nakase H, Uza N, Matsuura M, Chiba T. Tacrolimus suppresses IL-12/IL-23p40 in Crohn's disease and heals fistulae refractory to anti-TNF- $\alpha$  therapy. *Aliment Pharmacol Ther* 33:979-980:2011.
11. Nakase H, Yamamoto S, Matsuura M, Chiba T. Tacrolimus : rescue therapy or experimental drugs for severe ulcerative colitis? *Aliment Pharmacol Ther* 33:413-414:2011.

### 2. 学会発表

1. Yusuke Honzawa, Hiroshi Nakase, Kayoko Matsuura, Shuji Yamamoto, Norimitsu Uza, Minoru Matsuura, Tsutomu Chiba: IL-17 promotes HSP47 expression and intestinal fibrosis in Crohn's disease. KYOTO UNIVERSITY Grorbal COE "Center for frontier medicine" International symposium/retreat 2011, Hyogo, 2011.9.9.
2. Minoru Matsuura, Hiroshi Nakase, Yusuke Honzawa, Shuji Yamamoto, Kayoko Matsumura, Norimitsu Uza, Tsutomu Chiba: Characteristics of colonoscopic features in patients with ulcerative colitis concomitant with cytomegalovirus reactivation. 2011 DDW • poster sessions, Chicago, USA, 2011. 5. 9.
3. Yusuke Honzawa, Hiroshi Nakase, Kayoko Matsumura, Shuji Yamamoto, Norimitsu Uza, Minoru Matsuura, Tsutomu Chiba: IL-17 promotes HSP47 expression and intestinal fibrosis in Crohn's disease. 2011 DDW • poster sessions, Chicago, USA, 2011. 5. 8.
4. 松浦 稔、仲瀬裕志、千葉 勉、R. Balfour Sator: 腸内細菌の観点からみた炎症性腸疾患の病態における鉄の関与. 第49回小腸研究会・シンポジウム, 東京, 2011. 11. 12.
5. 松浦 稔、仲瀬裕志、千葉 勉: 難治性潰瘍性大腸炎に対するタクロリムスの粘膜治癒効果に関する検討-免疫調節剤は生物学的製剤による

粘膜治癒を上回るか？ー. JDDW2011 第82回日本消化器内視鏡学会大会・パネルディスカッション, 福岡, 2011. 10. 23.

6. 本澤有介、仲瀬裕志、千葉 勉: クロウン病に対する内視鏡的拡張術と薬物療法による手術回避の可能性. JDDW2011 第82回日本消化器内視鏡学会大会・ワークショップ, 福岡, 2011. 10. 22.
7. 本澤有介、仲瀬裕志、千葉 勉: IL-17はHSP47の発現を介してクロウン病腸管線維化に関与している. JDDW2011 第53回日本消化器病学会大会・シンポジウム, 福岡, 2011. 10. 21.
8. 松浦 稔、仲瀬裕志、千葉 勉: 難治性潰瘍性大腸炎に対するタクロリムス治療の手術回避効果とその背景因子に関する検討. JDDW2011 第53回日本消化器病学会大会・シンポジウム, 福岡, 2011. 10. 21.
9. 松浦 稔、本澤有介、仲瀬裕志: 潰瘍性大腸炎における腸管局所サイトメガロウイルス再活性化を伴った大腸内視鏡所見に関する検討. 第81回日本消化器内視鏡学会総会・ワークショップ, 名古屋, 2011. 8. 18.
10. 宇座徳光、仲瀬裕志、千葉 勉: 炎症性腸疾患病態におけるCXCL16の意義. 第48回日本消化器免疫学会総会・シンポジウム, 金沢, 2011. 7. 21.
11. 仲瀬裕志、松浦 稔、千葉 勉: 潰瘍性大腸炎に対するタクロリムスの寛解導入および維持効果の検討. 第97回日本消化器病学会総会・ワークショップ, 東京, 2011. 5. 15.
12. 仲瀬裕志、松浦 稔、千葉 勉: 炎症性腸疾患におけるタクロリムス治療の今後の展望. 第97回日本消化器病学会総会・シンポジウム, 東京, 2011. 5. 14.
13. 松浦 稔、仲瀬裕志、R. Balfour Sartor: 炎症性腸疾患の病態における鉄の関与-腸内細菌からの解析-. 第97回日本消化器病学会総会・パネルディスカッション, 東京, 2011. 5. 13.
14. 渡邊智裕、千葉 勉: NOD2の活性化によるI型IFN経路の抑制とその腸炎発症における役割. 第97回日本消化器病学会総会・パネルディスカッション, 東京, 2011. 5. 13.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

該当なし

厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業  
難治性炎症性腸管障害に関する調査研究  
分担研究報告書

腸炎惹起性メモリーCD4<sup>+</sup>T細胞を標的とした炎症性腸疾患根治療法の開発

研究代表者 渡辺 守 東京医科歯科大学大学院消化器病態学分野 教授

研究要旨：これまでの研究において我々は、炎症性腸疾患（IBD）難治性の要因として、疾患を“記憶”し、長期生存可能である腸炎惹起性メモリーCD4<sup>+</sup>T細胞に注目し、その維持因子である IL-7/IL-7R シグナルおよび、IL-7 高産生臓器である骨髄の重要性を証明してきた。我々は腸炎惹起性メモリーT細胞を標的とした、いわば疾患記憶の“リセット”をコンセプトとした IBD の画期的根治療法開発のために以下の検討を行っている。1) IL-7/IL-7R シグナルをターゲットとした腸炎惹起性メモリーT細胞のアポトーシス誘導、2) 腸炎惹起性メモリーT細胞の循環制御療法の開発。今回特に1)の検討において知見が得られたので報告する。

我々は炎症性腸疾患難治性の病因として、腸炎惹起性メモリーT細胞の永続的潜在が重要と考え、その維持因子である IL-7 および主たる産生臓器である骨髄に着目してきた。本検討において1)骨髄特異的 IL-7 発現マウスを作製し、腸炎の発症における骨髄 IL-7 の十分性を証明し、2)骨髄中の IL-7 高産生細胞を同定し、in vitro, in vivoにおける腸炎惹起性メモリーT細胞維持能を証明した。骨髄 IL-7 高産生細胞をターゲットとした疾患記憶のリセットという画期的な IBD 治療戦略の可能性が示唆された。

共同研究者

根本泰宏<sup>1</sup>、金井隆典<sup>2</sup>、渡辺 守<sup>1</sup>

<sup>1</sup>東京医科歯科大学大学院消化器病態学分野

<sup>2</sup>慶応義塾大学医学部消化器内科

A. 研究目的

〈背景〉

炎症性腸疾患（Inflammatory Bowel Disease 以下 IBD）は、再燃と緩解を繰り返し生涯にわたり治療の継続を余儀なくされる難病である。IBD は従来から消化管に限局した疾患として捉えられ、内科的な治療の継続が困難な症例に対しては外科的局所切除が必要とされてきた。しかし、IBD の病態は術後緩解状態にリセットされる一方で、ほぼ100%の患者で術後に手術以前と同様な病変を再燃することが知られている。このような背景に我々は本疾患を単なる消化管の炎症としてとらえるのではなく、疾患を“記憶”した、腸内細菌抗原に過剰に反応する病原性メモリーT細胞が全身に播種された“良性白血病”ともいべき全身性疾患と捉える概念を提唱してきた。炎症局所を切除しても全身に潜在する病原性メモリーT細胞が残存する限

り、疾患の“記憶”は失われることはなく再燃することとなる。我々の研究の最終目的は炎症性腸疾患における全身性病原性メモリーT細胞をターゲットとした、疾患の“記憶”を“リセットする”究極のIBD根治療法の開発である。我々は今までに主に炎症性腸疾患における病原性メモリーT細胞の維持機構について以下の点を解明してきた。①CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup>T細胞移入大腸炎モデルにおいて炎症の主座である腸管粘膜内にCD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>IL-7R $\alpha$ <sup>high</sup>メモリータイプT細胞が多数浸潤し、本細胞を新たなSCIDマウスに移入することにより同様の大腸炎が再現される。②上記腸炎惹起性メモリーT細胞の維持にはin vitro, in vivoにおいてIL-7の存在が必要であり、IL-7<sup>-/-</sup> x RAG-2<sup>-/-</sup>マウスではCD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup>T細胞移入大腸炎が発症しない。③骨髄はIL-7を高産生し、腸炎惹起性メモリーT細胞のリザーバー能を有する。

以上の結果を元に今回我々は腸炎惹起性メモリーT細胞維持機構における骨髄IL-7の重要性をより検討するために、1)腸炎惹起性メモリーT細胞維持機構における骨髄IL-7による十分性の検討、2)骨髄IL-7高産生細胞の同定を行い、

骨髄 IL-7 高産生細胞をターゲットとした疾患記憶のリセットという画期的な IBD 治療ストラテジーの可能性を考察した。

#### 〈方法と結果〉

1) 腸炎惹起性メモリーT 細胞維持機構における骨髄 IL-7 による十分性の検討

1-1、骨髄特異的 IL-7 産生マウスモデルの作成

骨髄特異的 IL-7 産生マウスを作製し、 $CD4^+CD45RB^{high}T$  細胞移入大腸炎モデルに使用する目的で、我々はまず、 $IL-7^{+/+} \times RAG-1^{-/-}$ マウスおよび  $IL-7^{-/-} \times RAG-1^{-/-}$ マウス骨髄細胞を採取し、放射線照射した  $IL-7^{-/-} \times RAG-1^{-/-}$ マウスに骨髄移植する実験を行った。移植後の各臓器 mRNA RT-PCR の検討において、 $IL-7^{+/+} \times RAG-1^{-/-}$ 骨髄移植群では骨髄に IL-7 発現を認める一方で腸管には IL-7 の発現を認めなかった。

1-2、骨髄特異的 IL-7 産生マウスは IBD を発症する

次に上記  $IL-7^{+/+} \times RAG1^{-/-}$ 骨髄移植マウスおよび  $IL-7^{-/-} \times RAG1^{-/-}$ 骨髄移植マウスに正常マウス脾臓由来の  $CD4^+CD45RB^{high}T$  細胞を移入し、骨髄 IL-7 発現マウスが IBD を発症するか検討した。移植 20 週間後においても  $IL-7^{-/-} \times RAG-1^{-/-}$ 骨髄移植マウスでは腸炎を発症しなかったのに対して、 $IL-7^{+/+} \times RAG-1^{-/-}$ 骨髄移植マウスでは下痢、体重減少、腸管壁の肥厚を伴う腸炎が発症し、臨床スコア、病理スコアでも有意差をもって腸炎の発症を確認した。

1-3、骨髄特異的 IL-7 産生マウスは腸炎惹起性メモリーT 細胞維持能を有する。

$IL-7^{+/+} \times RAG-1^{-/-}$ 骨髄移植マウスの各臓器の細胞数の検討では骨髄および腸管に多数の  $CD4^+CD44^+CD62L^-IL-7R\alpha^{high}$ メモリータイプ T 細胞の浸潤を認め、免疫染色による検討では多数の  $CD4^+$  T 細胞が骨髄 IL-7 産生細胞に近接して存在することが確認された。以上の結果から骨髄 IL-7 が腸炎の発症と、腸炎惹起性メモリー  $CD4^+$  T 細胞の維持機構における十分条件である

ことが証明された。

2) 骨髄 IL-7 高産生細胞の同定

次に我々は骨髄細胞のうちどの細胞が IL-7 を高産生するのかを検討した。骨髄には多様な造血系細胞と間葉系細胞が存在するが、このうち既報では特に間葉系細胞が IL-7 を産生すると報告されており、我々は *in vitro* における培養系が確立している骨髄間葉系幹細胞に着目した。

2-1、骨髄間葉系幹細胞は IL-7 を高産生する

骨髄間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem Cell 以下 MSC) はマウス骨髄細胞を単離後、Stem Cell テクノロジー社の MSC complete medium で 5% $CO_2$ 、37°C 環境下にて培養、継代を繰り返し純化した。このように純化された細胞は 7 継代以降血球系マーカーを発現せず、また Stem cell マーカーである Sca-1 を高発現することが確認された。

次に我々は  $IL-7^{+/+} \times RAG-1^{-/-}$  および  $IL-7^{-/-} \times RAG-1^{-/-}$  マウスから MSC を培養、純化した。MSC による IL-7 発現の有無に関してはこれまで controversial であったが、今回このように得られた MSC は mRNA の RT-PCR において、primary の骨髄細胞よりも IL-7 を高発現した。また、免疫染色、フローサイトメトリーでも  $IL-7^{+/+} \times RAG-1^{-/-}$  MSC の IL-7 蛋白発現が確認された。

2-2、骨髄間葉系幹細胞移植マウスは IBD を発症する

次にこれらの IL-7 産生 MSC が腸炎の発症と腸炎惹起性メモリーT 細胞の維持において十分条件であるかを検討する目的で以下の実験を行った。 $IL-7^{+/+} \times RAG-1^{-/-}$  および  $IL-7^{-/-} \times RAG-1^{-/-}$  マウスから得られた MSC をそれぞれ  $IL-7^{-/-} \times RAG-1^{-/-}$  マウスに静脈注射し、3 週間後に同数の  $CD4^+CD45RB^{high}T$  細胞を移入し、腸炎が発症するかを検討した。結果  $IL-7^{+/+} \times RAG-1^{-/-}$  MSC 移植群において、腸管壁肥厚と細胞浸潤をともなう著明な腸炎の発症が見られ、臨床スコア、病理スコアでも有意差をもって腸炎の発症を確認した。

2-3 骨髄間葉系幹細胞移植マウスは腸炎惹起



性メモリーT細胞維持能を有する

IL-7<sup>+/+</sup> x RAG-1<sup>-/-</sup>MSC 移植マウスの各臓器の細胞数の検討では骨髄および腸管に多数のCD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>IL-7R $\alpha$ <sup>high</sup>メモリータイプT細胞の浸潤を認め、免疫染色による検討では多数のCD4<sup>+</sup>T細胞が骨髄IL-7産生細胞に近接して存在することが確認された。以上の結果から骨髄間葉系幹細胞はIL-7を高発現し、IL-7高産生骨髄間葉系幹細胞は腸炎の発症と、腸炎惹起性メモリーCD4<sup>+</sup>T細胞の維持機構における十分因子であることが証明された。

<結語>

炎症性腸疾患病原性メモリーT細胞の増殖、維持機構における骨髄IL-7産生細胞の十分性が証明された。本細胞をターゲットとしたIBDの新たな治療戦略の可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

- 1) Yui S, Nakamura T, Sato T, Nemoto Y, Mizutani T, Zheng X, Ichinose S, Nagaishi T, Okamoto R, Tsuchiya , Clevers H, Watanabe M : Functional engraftment of colon epithelium expanded in vitro from a single adult Lgr5<sup>+</sup>stem cell. Nat Med. in press 2012
- 2) Yamaji O, Nagaishi T, Totsuka T, Onizawa M, Suzuki M, Tsuge N, Hasegawa A, Okamoto R, Tsuchiya K, Nakamura T, Arase H, Kanai T, Watanabe M: The development of colitogenic CD4<sup>+</sup>T cells is regulated by IL-7 in collaboration with natural killer cell function in a murine model of colitis. J Immunol. in press 2012
- 3) Mizutani T, Nakamura T, Morikawa R, Fukuda M, Mochizuki W, Yamauchi Y, Nozaki K, Nemoto Y, Nagaishi T, Okamoto R, Tsuchiya K, Watanabe M: Real-time analysis of P-glycoprotein drug transport across primary intestinal epithelium three-dimensionally cultured in vitro. Biochem Biophys Res Commun. in press 2012
- 4) Hibi T, Sakuraba A, Watanabe M, Motoya S, Ito H, Motegi K, Kinouchi Y, Takazoe M, Suzuki Y, Matsumoto T, Kawakami K, Matsumoto T, Hirata I, Tanaka S, Ashida T, Matsui T: Retrieval of serum infliximab level by shortening the maintenance infusion interval is correlated with clinical efficacy in Crohn's disease. Inflamm Bowel Dis. [Epub ahead of print] 2011
- 5) Watanabe M, Hibi T, Lomax KG, Paulson SK, Chao J, Alam M. S, Camez AC: Adalimumab for the Induction and Maintenance of Clinical Remission in Japanese Patients With Crohn's Disease. J Crohns Colitis. 6: 160-173, 2012
- 6) D'Haens GR, Panaccione R, Higgins PD, Vermeire S, Gassull M, Chowers Y, Hanauer SB, Herfarth H, Hommes DW, Kamm M, Löfberg R, Quary A, Sands B, Sood A, Watermayer G, Lashner B, Lémann M, Plevy S, Reinisch W, Schreiber S, Siegel C, Targan S, Watanabe M, Feagan B, Sandborn WJ, Colombel JF, Travis S: The London Position Statement of the World Congress of Gastroenterology on Biological Therapy for IBD With the European Crohn's and Colitis Organization: When to Start, When to Stop, Which Drug to Choose, and How to Predict Response? Am J Gastroenterol. 106(2): 199-212, 2011
- 7) Hyun SB, Kitazume Y, Nagahori M, Toriihara A, Fujii T, Tsuchiya K, Suzuki S, Okada E, Araki A, Naganuma M, Watanabe

- M: MR enterocolonography is useful for simultaneous evaluation of small and large intestinal lesions in Crohn's disease. *Inflam Bowel Dis.* 17: 1063-1072, 2011
- 8) Iwasaki M, Tsuchiya K, Okamoto R, Zheng X, Kano Y, Okamoto E, Okada E, Araki A, Suzuki S, Sakamoto N, Kitagaki K, Akashi T, Eishi Y, Nakamura T, Watanabe M: Longitudinal cell formation in the entire human small intestine is correlated with the localization of *Hath1* and *Klf4*. *J Gastroenterol.* 46(2): 191-202, 2011
- 9) Naganuma M, Watanabe M, Hibi T: Safety and usefulness of balloon endoscopy in Crohn's disease patients with postoperative ileal lesions. *J Crohns Colitis.* 5(1): 73-74, 2011
- 10) Naganuma M, Watanabe M, Hibi T: The use of traditional and newer calcineurin inhibitors in inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol.* 46: 129-137, 2011
- 11) Naganuma M, Kunisaki R, Yoshimura N, Nagahori M, Yamamoto H, Kimura H, Sako M, Kawaguchi T, Takazoe M, Yamamoto S, Matsui T, Hibi T, Watanabe M: Conception and pregnancy outcome in women with inflammatory bowel disease: A multicentre study from Japan. *Journal of Crohn's and Colitis.* 5: 317-323, 2011
- 12) Nemoto Y, Kanai T, Shinohara T, Ito T, Nakamura T, Okamoto R, Tsuchiya K, Lipp M, Eishi Y, Watanabe M: Luminal CD4+ T cells penetrate gut epithelial monolayers and egress from lamina propria to blood circulation. *Gastroenterology.* 141(6): 2130-2139, 2011
- 13) Shinohara T, Nemoto Y, Kanai T, Kameyama K, Okamoto R, Tsuchiya K, Nakamura T, Totsuka T, Ikuta K, Watanabe M: Upregulated IL-7R  $\alpha$  expression on colitogenic memory CD4+ T cells may participate in the development and persistence of chronic colitis. *J Immunol.* 186(4): 2623-2632, 2011
- 14) Watanabe T, Ajioka Y, Matsumoto T, Tomotsugu N, Takebayashi T, Inoue E, Iizuka B, Igarashi M, Iwao Y, Ohtsuka K, Kudo SE, Kobayashi K, Sada M, Matsumoto T, Hirata I, Murakami K, Nagahori M, Watanabe K, Hida N, Ueno F, Tanaka S, Watanabe M, Hibi T: Target biopsy or step biopsy? Optimal surveillance for ulcerative colitis: a Japanese nationwide randomized controlled trial. *J Gastroenterol.* 46: 11-16, 2011
- 15) Watanabe T, Kobunai T, Yamamoto Y, Ikeuchi H, Matsuda K, Ishihara S, Nozawa K, Iinuma H, Kanazawa T, Tanaka T, Yokoyama T, Konishi T, Eshima K, Ajioka Y, Hibi T, Watanabe M, Muto T, Nagawa H: Predicting ulcerative colitis-associated colorectal cancer using reverse-transcription polymerase chain reaction analysis. *Clin Colorectal Cancer.* 10: 134-141, 2011
- 16) Watanabe T, Kobunai T, Ikeuchi H, Yamamoto Y, Matsuda K, Ishihara S, Nozawa K, Iinuma H, Kanazawa T, Tanaka T, Yokoyama T, Konishi T, Eshima K, Ajioka Y, Hibi T, Watanabe M, Muto T, Nagawa H: RUNX3 copy number predicts the development of UC-associated colorectal cancer. *International Journal of Oncology.* 38: 201-207, 2011
- 17) Watanabe T, Sasaki I, Sugita A, Fukushima K, Futami K, Hibi T, Watanabe M: Interval of less than 5 years between the first and second operation is a risk factor for a

third operation for Crohn's disease.  
Inflamm Bowel Dis. 18(1): 17-24, 2011

- 18) Zheng X, Tsuchiya K, Okamoto R, Iwasaki M, Kano Y, Sakamoto N, Nakamura T, Watanabe M: Suppression of hath1 gene expression directly regulated by hes1 via notch signaling is associated with goblet cell depletion in ulcerative colitis. Inflamm Bowel Dis. 11: 2251-2260, 2011

#### 学会発表

- 1) Tsuchiya K, Zheng X, Kano Y, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M: Flagellin via TLR5 on basolateral membrane of primary intestinal epithelial cells(IEC) shows the role of IEC in the response to bacteria. UEGW2011. Stockholm. 2011年10月26日
- 2) Naganuma M, Nagahori M, Fujii T, Akiyama J, Saito E, Watanabe M: Serological test and vaccinations for Measles, Mumps, Rubella, and Varicella Zoster deserve considerations as early as possible after diagnosis of Inflammatory Bowel Disease. UEGW2011. Stockholm. 2011年10月25日
- 3) Tsuchiya K, Kano Y, Watanabe M: The stabilization of Atoh1 protein in colorectal cancer mimics mucinous adenocarcinoma. 第70回日本癌学会学術総会. Nagoya. 2011年10月4日
- 4) Yui S, Nemoto Y, Mizutani T, Zheng X, Nagaishi T, Tsuchiya K, Watanabe M, Nakamura T, Okamoto R, Ichinose S, Sato T, Clevers H: Regeneration of damaged colonic tissue by transplanted colonic epithelial stem cells maintained and expanded in vitro. GI Research Academy 2011. Kyoto. 2011年6月17日
- 5) Yui S, Nakamura T, Nemoto Y, Mizutani T, Zheng X, Ichinose S, Nagaishi T, Okamoto R, Tsuchiya K, Sato T, Clevers H, Watanabe M: Regeneration of Damaged Colonic Tissue by Transplantation of Colonic Epithelial Stem Cells Maintained and Expanded In Vitro. DDW2011. Chicago. 2011年5月7日
- 6) 渡辺 守: 生物製剤が炎症性腸疾患研究に与えたインパクト. 第6回 Tokyo Circulation Seminar. 東京. 2012年2月2日
- 7) 加納嘉人、土屋輝一郎、鄭 秀、堀田伸勝、岡本隆一、中村哲也、渡辺 守: 新たな「分化度」スケーリングを用いた大腸がん形質抑制と個別化医療への可能性. 第19回 浜名湖シンポジウム. 浜松. 2011年12月23日
- 8) 渡辺 守: 大腸上皮幹細胞一培養系の確立と移植への応用. 第8回 定例基礎棟セミナー. 東京. 2011年12月14日
- 9) 渡辺 守: 生物製剤が炎症性腸疾患に与えたインパクト. 第54回 日本消化器内視鏡学会東海地方会. 浜松. 2011年12月10日
- 10) 渡辺 守: 新しい時代に入ったクローン病治療を考える. 第2回 神奈川 Influximab IBD Strategy Seminar. 横浜. 2011年12月8日
- 11) 渡辺 守: 新しい時代に入ったクローン病治療を考え直す. 第29回 北海道クローン病検討会. 札幌. 2011年12月2日
- 12) 渡辺 守: 炎症性腸疾患治療の新展開. 第39回 内科学の展望/第108回 日本内科学会講演会. 横浜. 2011年11月13日
- 13) 渡辺 守: 新しい時代に入った IBD 治療を考え直す. 第19回 日本消化器病学会関東支部教育講演. 東京. 2011年11月13日
- 14) 土屋輝一郎、鄭 秀、加納嘉人、水谷知裕、油井史郎、岡本隆一、中村哲也、渡辺 守: 小腸上皮細胞初代培養による生理的フラジェリン応答解析. 第49回 小腸研究会. 東京. 2011年11月12日

- 15) 渡辺 守: 新しい時代に入った炎症性腸疾患を考える. 第 105 回 みなとセミナー. 横浜. 2011 年 10 月 27 日
- 16) 藤井俊光、長沼 誠、渡辺 守: 重症潰瘍性大腸炎に対する Hybrid Tacrolimus 療法の試み. JDDW2011. 福岡. 2011 年 10 月 23 日
- 17) 加納嘉人、土屋輝一郎、渡辺 守: Atoh1 発現大腸癌における悪性形質獲得機構解析. JDDW2011. 福岡. 2011 年 10 月 23 日
- 18) 鈴木伸治、荒木昭博、渡辺 守: 原因不明消化管出血 (OGIB) 症例におけるカプセル内視鏡に対するダブルバルーン内視鏡の有有用性の検討. JDDW2011. 福岡. 2011 年 10 月 22 日
- 19) 根本泰宏、金井隆典、渡辺 守: 炎症性腸疾患病原性メモリーCD4+T 細胞は腸管粘膜から全身血流に再循環する. JDDW2011. 福岡. 2011 年 10 月 21 日
- 20) 鄭 秀、土屋輝一郎、岩寄美智子、加納嘉人、水谷知裕、油井史郎、岡本隆一、中村哲也、渡辺 守: 初代培養小腸上皮細胞による生理的フラジェリン応答解析. JDDW2011. 福岡. 2011 年 10 月 20 日
- 21) 山地 統、戸塚輝治、鬼澤道夫、柘植直人、鈴木雅博、永石宇司、金井隆典、渡辺 守: マウス腸炎モデルにおける腸炎惹起性 CD4+T 細胞の増殖は IL-7 と NK 細胞により制御される. JDDW2011. 福岡. 2011 年 10 月 20 日
- 22) 長沼 誠、長堀正和、藤井俊光、秋山純子、齋藤詠子、渡辺 守: IBD 患者における風疹・麻疹・水痘・ムンプスに対する抗体価測定の意義. JDDW2011. 福岡. 2011 年 10 月 20 日
- 23) 土屋輝一郎、岡本隆一、中村哲也、渡辺 守: IBD における消化管上皮の分化制御と免疫応答. 第 39 回 日本臨床免疫学会総会. 東京. 2011 年 9 月 17 日
- 24) 渡辺 守: 炎症性腸疾患における内視鏡を考え直す. 山梨 IBD 講演会 2011. 甲府市. 2011 年 9 月 8 日
- 25) 鈴木康平、秋山純子、藤井俊光、櫻井 幸、福田将義、吉野耕平、竹中健人、東 正新、鈴木伸治、長堀正和、長沼 誠、坂本直哉、渡辺 守、小林宏寿、杉原健一、伊藤栄作、三浦圭子: 術後に判明した空腸異所性膵炎の一例. 第 16 回 お茶の水消化器セミナー. 東京. 2011 年 8 月 27 日
- 26) 渡辺 守: 治りにくい炎症性腸疾患 新しい視点で繙く. 第 9 回 三重 IBD 研究会. 津. 2011 年 8 月 4 日
- 27) 渡辺 守: 新しい時代に入ったクローン病治療を考える. 第 5 回 多摩 GI-Endoscopy 研究会. 東京. 2011 年 6 月 30 日
- 28) 渡辺 守: 抗 TNF 製剤が炎症性腸疾患治療に与えたインパクト. 第 15 回 日本適応医学会学術集会. 浜松. 2011 年 6 月 25 日
- 29) 渡辺 守: 炎症性腸疾患における腸上皮自然炎症調節機構の破綻. 新学術領域: 平成 23 年度第 2 回領域班会議. 東京. 2011 年 6 月 24 日
- 30) 渡辺 守: 炎症性腸疾患の病態を新しい側面から繙く. 第 2 回 炎症性腸疾患と免疫を語る会. 横浜. 2011 年 6 月 22 日
- 31) 渡辺 守: 新しい時代に入った炎症性腸疾患を考える. 第 7 回 静岡県 IBD 研究会. 静岡. 2011 年 6 月 17 日
- 32) 渡辺 守: クローン病. 第 140 回 日本医学会シンポジウム. 東京. 2011 年 6 月 9 日
- 33) 渡辺 守: 生物製剤がクローン病治療に与えたインパクト. 第 32 回 日本炎症・再生医学会. 京都. 2011 年 6 月 2 日
- 34) 渡辺 守: 炎症性腸疾患の分子標的治療. フォーラム富山「創薬」第 33 回 研究会. 富山. 2011 年 5 月 20 日
- 35) 藤井俊光、長沼 誠、渡辺 守: 免疫調整剤/分子生物製剤を用いた難治性潰瘍性大腸炎に対する治療戦略. 第 97 回 日本消化器病学会総会. 東京. 2011 年 5 月 15 日
- 36) 渡辺 守: クローン病に生物学的製剤をどのように使っていくのか—いつ? 誰に? 何

- を?どのように?へ. 第 97 回 日本消化器病学会総会. 東京. 2011 年 5 月 15 日
- 37) 秋山純子、長沼 誠、藤井俊光、玄 世鋒、長堀正和、渡辺 守: チオプリン、タクロリムス不応例潰瘍性大腸炎に対するインフリキシマブ (IFX) の検討. 第 97 回 日本消化器病学会総会. 東京. 2011 年 5 月 15 日
- 38) 渡辺 守: 生物学的製剤がもたらした新しい時代の炎症性腸疾患治療. 第 97 回 日本消化器病学会総会. 東京. 2011 年 5 月 14 日
- 39) 中村哲也、渡辺 守: 再生医療へ向けた腸管上皮研究へ幹細胞体外培養と細胞移植へ. 第 97 回 日本消化器病学会総会. 東京. 2011 年 5 月 14 日
- 40) 渡邊聡明、渡辺 守、日比紀文: 潰瘍性大腸炎合併癌に対する診断および治療に関する現状および今後の展望. 第 97 回 日本消化器病学会総会. 東京. 2011 年 5 月 14 日
- 41) 長沼 誠、長堀正和、国崎玲子、木村英明、吉村直樹、酒匂美奈子、河口貴昭、高添正和、山本正二郎、松井敏幸、日比紀文、渡辺 守: 本邦における IBD 患者の妊娠・出産の転帰に関する検討. 第 97 回 日本消化器病学会総会. 東京. 2011 年 5 月 14 日
- 42) 渡辺 守: 炎症性腸疾患における免疫異常と腸上皮分化・修復・再生障害の接点. 第 97 回 日本消化器病学会総会. 東京. 2011 年 5 月 13 日
- 43) 玄 世鋒、長沼 誠、渡辺 守: MR エンテロコロノグラフィ (MREC) によるクローン病の小腸大腸病変の同時評価の検討. 第 97 回 日本消化器病学会総会. 東京. 2011 年 5 月 13 日
- 44) 根本泰宏、金井隆典、渡辺 守: CD4+CD45RB<sup>high</sup>T 細胞移入大腸炎マウスの病態における腸内細菌の役割. 第 97 回 日本消化器病学会総会. 東京. 2011 年 5 月 13 日
- 45) 長沼 誠、藤井俊光、国崎玲子、山本慧恵、吉村直樹、高添正和、竹内義明、渡辺 守: 免疫調節薬・抗体製剤使用 IBD 患者におけるインフルエンザ感染症の現状. 第 97 回 日本消化器病学会総会. 東京. 2011 年 5 月 13 日
- 46) 渡辺 守、本谷 聡: クローン病治療 新時代の幕開け. 第 97 回 日本消化器病学会総会. 東京. 2011 年 5 月 13 日
7. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む。)
- 1) 特許取得  
渡辺 守、中村哲也: 「大腸上皮幹細胞の単離・培養技術と、これを用いた大腸上皮移植技術」特願 2011-236469
- 2) 実用新案登録  
なし
- 3) その他  
なし

厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業  
難治性炎症性腸管障害に関する調査研究  
分担研究報告書

DSS 誘発性モデルマウスにおける病態制御性樹状細胞の検討

研究分担者 岡崎 和一 関西医科大学内科学第三講座（消化器肝臓内科） 教授

研究要旨：潰瘍性大腸炎やクローン病などの炎症性腸疾患は難病特定疾患であり、病態解明が望まれている。当科では既に、クローン病モデルマウスである TNBS 小腸炎の腸炎回復に関わる制御性樹状細胞（PIR-A/B<sup>med</sup> conventional DCs）を同定しており、潰瘍性大腸炎に代表される大腸炎の粘膜固有層においても、同樹状細胞サブセットが免疫制御に関わっている可能性があると考えられた。本研究の目的は大腸炎モデルマウスを用いて大腸粘膜固有層で免疫を制御する PIR-A/B 発現樹状細胞を同定することであり、それによって炎症性腸疾患の病態の更なる解析や臨床への応用が期待できると考えられる。

共同研究者

栗島亜希子<sup>1)</sup>、星野勝一<sup>1)</sup>、稲葉宗夫<sup>2)</sup>

関西医科大学内科学第三講座<sup>1)</sup>

関西医科大学病理学第一講座<sup>2)</sup>

A. 研究目的

DSS 誘発性大腸炎モデルマウスを作成し、大腸粘膜から樹状細胞（以下 DC）に富んだ細胞群を採取。Paired immunoglobulin-like receptors（以下 PIR）の発現と病態制御機能との相関について解析する。

B. 研究方法

1. DSS 誘発性大腸炎モデルマウスを作成し、経時的に病理学的検討（光学顕微鏡観察や共焦点顕微鏡を用いた蛍光免疫染色）を行う。

2. 大腸炎マウスを屠殺して、大腸粘膜上皮および粘膜固有層から樹状細胞に富んだ細胞群を採取する。

3. フローサイトメトリーにて、炎症の経過に伴う樹状細胞の動態を解析する。また PIRs（paired immunoglobulin-like receptors）発現 DC サブセットを同定し、同サブセットの発現割合を経時的に解析する。また共刺激分子やその他の表面マーカーの発現についても解析し、既知の小腸由来 DC

と比較する。

4. 同細胞を単離し、T 細胞に対する抗原提示能を調べるために Mixed leukocyte reaction（MLR）を行う。

5. サイトカイン産生能を評価するために、単離した細胞から RNA を抽出し、Real-time RT-PCR を行う。また同細胞の培養上清のサイトカイン濃度を測定する。

（倫理面への配慮）

プロジェクトの遂行に当たっては、動物実験に関しては、動物実験倫理委員会の承認を得て、実験動物の飼育は、空調設備、照明の時間制御の整った SPF 環境化で週に 1 回の床敷交換、餌水分補給を行っている。また、毎年秋に動物慰霊祭を行っている。また実験に当たっては、麻酔操作を行い、極力苦痛の軽減を行うよう配慮している。

C. 研究結果

1. 大腸粘膜固有層由来 conventional DC を 2 つのサブセットに区分することができた（PIR-A/B<sup>high</sup>、PIR-A/B<sup>low</sup>）。PIR-A/B<sup>high</sup> cDCs は大腸炎の治癒過程で増加するサブセットであった。

2. MLR において、PIR-A/B<sup>high</sup> cDCs は脾臓や PIR-A/B<sup>low</sup> cDC と比較し抗原提示活性が低かった。また、PIR-A/B<sup>high</sup> cDC を添加するとコントロール

として用いた脾臓の cDC の抗原提示活性が低下した。

3. PIR-A/B<sup>high</sup> cDCs は PIR-A/B<sup>low</sup> と比較し、TGF- $\beta$  や IL-10 が高く、IFN $\gamma$  は低値であった。

#### D. 考察

炎症性腸疾患の発症機構はこれまで T 細胞をはじめとしたリンパ球を中心に解析が行われてきた。その結果 Th1/Th2 細胞の応答性のバランスの重要性、制御性 T 細胞の関与などが明らかになっている。しかし、自然免疫系がこれら T 細胞の機能をも制御していることが明らかになった。今回炎症性腸疾患の発症においても自然免疫系の機構の解明が待たれている。今回 DC サブセットを検討する上で指標にした分子 PIR は細胞外に Ig 様ドメインをもつ膜貫通蛋白で、活性型の PIR-A と抑制型の PIR-B がありその発現の imbalance が host defense 制御機構に関わっており、恐らく PIR を介した T cells と DCs の interaction が免疫反応を制御しようと考えられている。本研究で、DSS 誘発性大腸炎における腸管由来の DC を PIR-A/B の発現に基づいて 2 つのサブセットに区分することができた。そのうち、PIR-A/B<sup>high</sup> cDC は大腸炎の治癒過程で増加するサブセットであり、MLR において抗原提示活性がコントロールに比較し低いことが示された。また、PIR-A/B<sup>high</sup> cDC を添加するとコントロールとして用いた脾臓の cDC の抗原提示活性は低下したため免疫抑制的な機能を有すると考えられた。その機序としては RT-PCR において TGF- $\beta$  や IL-10 の産生が目立つ一方で、IFN $\gamma$  の産生は減少している点に関与していると考えられた。

#### E. 結論

PIR-A/B<sup>high</sup> cDCs は DSS 誘発性大腸炎において病態制御性の機能を有すると考えられた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Nakase H, Tamaki H, Matsuura M, Chiba T, Okazaki K. Involvement of mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in TNF- $\alpha$  production from macrophage: Possible link between MAP and immune response in Crohn's disease. *Inflammatory bowel diseases*. 17(11): e140-e142, 2011
- 2) Hoshino S, Kurishima A, Inaba M, Ando Y, Fukui T, Uchida K, Nishio A, Iwai H, Yokoi T, Ito T, Hasegawa-Ishii S, Shimada A, Li M, Okazaki K, Ikehara S. Amelioration of 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in mice by immunoregulatory dendritic cells. *J Gastroenterol*.
- 3) Fukata N, Uchida K, Kusuda T, Koyabu M, Miyoshi H, Fukui T, Matsushita M, Nishio A, Tabata Y, Okazaki K. The effective therapy of cyclosporine A with drug delivery system in experimental colitis. *Journal of Drug Targeting*. 19(6): 458-467, 2011
- 4) Matsushita M, Tanaka T, Fukui Y, Fukata N, Wakamatsu T, Okazaki K. Peri-Appendiceal Red Patch and Pathogenesis of the Appendix in Ulcerative Colitis. *Dig Dis Sci*. 56(7):2207, 2011
- 5) Fukui T, Kishimoto M, Nakajima A, Yamashina M, Nakayama S, Kusuda T, Sakaguchi Y, Yoshida K, Uchida K, Nishio A, Matsuzaki K, Okazaki K. The specific linker phosphorylation of Smad2/3 indicates epithelial stem cells in stomach; particularly increasing in mucosae of Helicobacter-associated gastritis. *J Gastroenterol*. 46(4): 456-468, 2011
- 6) Kawamata S, Matsuzaki K, Murata M, Seki T, Matsuoka K, Iwao Y, Hibi T, Okazaki K. Oncogenic Smad3 signaling induced by

chronic inflammation is an early event in  
ulcerative colitis-associated  
carcinogenesis. Inflamm Bowel Dis. 17(3):  
683-695, 2011

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし



厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業  
難治性炎症性腸管障害に関する調査研究  
分担研究報告書

マウス DSS 腸炎モデルを用いた smad2/3 リン酸化蛋白発現による幹細胞マーカーの探索

研究分担者 岡崎 和一 関西医科大学内科学第三講座（消化器肝臓内科） 教授

研究要旨：上皮幹細胞が数的に増加、または増殖亢進状態にあると予想される粘膜再生期の DSS 腸炎マウスモデルを足がかりにして、細胞周期の観点から anti-pSmad2/3L-Thr 抗体にて認識される細胞を同定し、幹細胞マーカーの可能性を検討する。

共同研究者

星野勝一<sup>1)</sup>、栗島亜希子<sup>1)</sup>、稲葉宗夫<sup>2)</sup>

関西医科大学内科学第三講座<sup>1)</sup>

関西医科大学病理学第一講座<sup>2)</sup>

A. 研究目的

幹細胞は、通常の状態ではその細胞分裂は強く抑制され、細胞周期上の G0 期にあり免疫組織学的に Ki67 陰性となる。細胞周期は CDK(cyclin-dependent kinase)-cyclin 複合体、CDK に結合してその活性を抑制する CDKI (CDK inhibitor) の組み合わせやバランスによって各位相への移行が正確に制御されている。CDK4・cyclinD 複合体は Rb 蛋白以外に Smad(2, 3) 蛋白などもリン酸化し、G1(G0)期から S 期への進行に関与していることも分かっている。anti-pSmad2/3L-Thr 抗体は、Smad(2, 3) 蛋白の linker 部の Thr がリン酸化された Smad(2, 3) 蛋白のみに特異的に結合する。anti-pSmad2/3L-Thr 抗体にて認識されるリン酸化 Smad(2, 3) 蛋白のリン酸化部位(Thr<sup>220</sup>, Thr<sup>179</sup>)は CDK4 にてリン酸化される部位と一致する。この細胞周期の観点から anti-pSmad2/3L-Thr 抗体にて認識される細胞を同定し、幹細胞マーカーの可能性を検討する。

B. 研究方法

1) 正常マウス大腸切片において、Ki67 陰性かつ pSmad2/3L-Thr 強陽性細胞の細胞を検出する。2)

この細胞を anti-pSmad2/3L-Thr 抗体と Cytokeratin8, CDK4, Chromogranin A, DCAMKL-1 で二重染色を施行する。3) DSS 腸炎モデルマウスにおいても同様の細胞を検索し、anti-pSmad2/3L-Thr 陽性細胞数の比較検討をする。4) 蛍光免疫染色にて同定した当該細胞を、同切片を HE 染色することにより明視野顕微鏡観察し特徴を解析する。

(倫理面への配慮)

プロジェクトの遂行に当たっては、動物実験に関しては、動物実験倫理委員会の承認を得て、実験動物の飼育は、空調設備、照明の時間制御の整った SPF 環境化で週に 1 回の床敷交換、餌水分補給を行っている。また、毎年秋に動物慰霊祭を行っている。また実験に当たっては、麻酔操作を行い、極力苦痛の軽減を行うよう配慮している。

C. 研究結果

1) 大腸粘膜で陰窩の crypt base に pSmad2/3L-Thr 陽性細胞を認めた。2) pSmad2/3L-Thr 陽性細胞は、Ki67 陰性であった。3) pSmad2/3L-Thr 陽性細胞は、Cytokeratin8 陽性であり、上皮細胞であることが確認された。また、CDK4 陽性であった。4) pSmad2/3L-Thr 陽性細胞は、Chromogranin A 陰性であり、内分泌細胞でないことが確認された。5) pSmad2/3L-Thr 陽性細胞は、これまでに提唱されている幹細胞マーカーである DCAMKL-1 陽性細

胞と同様に descending colon では crypt base に存在したが、共陽性細胞は認めなかった。6) DSS 腸炎 モデルマウスでは、大腸粘膜の過形成、Ki67 陽性細胞の増加とともに pSmad2/3L-Thr 陽性細胞が有意に増加していた。

#### D. 考察

大腸粘膜の恒常性は上皮細胞の脱落(アポトーシス)と再生のバランスにより保たれているが、腸炎により上皮細胞の増殖は亢進し、Ki67 により標識される増殖細胞出現率が有意に高くなる。この増殖亢進状態においては、上皮幹細胞は細胞分裂を起こす頻度が高くなると考えられる。

#### E. 結論

anti-pSmad2/3L-Thr 抗体にて認識される細胞は、幹細胞マーカーの可能性が示唆された。現在、分裂速度が極めて遅いとされる BrdU 長期陽性細胞との二重染色を施行中である。また、小腸における幹細胞マーカーの可能性も探索している。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Nakase H, Tamaki H, Matsuura M, Chiba T, Okazaki K. Involvement of mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in TNF- $\alpha$  production from macrophage: Possible link between MAP and immune response in Crohn's disease. *Inflammatory bowel diseases*. 17(11): e140-e142, 2011
- 2) Hoshino S, Kurishima A, Inaba M, Ando Y, Fukui T, Uchida K, Nishio A, Iwai H, Yokoi T, Ito T, Hasegawa-Ishii S, Shimada A, Li M, Okazaki K, Ikehara S. Amelioration of 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in mice by immunoregulatory dendritic cells. *J Gastroenterol*.

- 3) Fukata N, Uchida K, Kusuda T, Koyabu M, Miyoshi H, Fukui T, Matsushita M, Nishio A, Tabata Y, Okazaki K. The effective therapy of cyclosporine A with drug delivery system in experimental colitis. *Journal of Drug Targeting*. 19(6): 458-467, 2011
- 4) Matsushita M, Tanaka T, Fukui Y, Fukata N, Wakamatsu T, Okazaki K. Peri-Appendiceal Red Patch and Pathogenesis of the Appendix in Ulcerative Colitis. *Dig Dis Sci*. 56(7):2207, 2011
- 5) Fukui T, Kishimoto M, Nakajima A, Yamashina M, Nakayama S, Kusuda T, Sakaguchi Y, Yoshida K, Uchida K, Nishio A, Matsuzaki K, Okazaki K. The specific linker phosphorylation of Smad2/3 indicates epithelial stem cells in stomach; particularly increasing in mucosae of Helicobacter-associated gastritis. *J Gastroenterol*. 46(4): 456-468, 2011
- 6) Kawamata S, Matsuzaki K, Murata M, Seki T, Matsuoka K, Iwao Y, Hibi T, Okazaki K. Oncogenic Smad3 signaling induced by chronic inflammation is an early event in ulcerative colitis-associated carcinogenesis. *Inflamm Bowel Dis*. 17(3): 683-695, 2011

##### 2. 学会発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業  
難治性炎症性腸管障害に関する調査研究  
分担研究報告書

炎症性腸疾患における糖鎖関連バイオマーカーの開発

研究協力者 飯島 英樹 大阪大学消化器内科 講師

研究要旨：炎症性腸疾患において、診断および治療効果予測に寄与するバイオマーカーの開発が急務である。我々は、Leucin-rich  $\alpha 2$  glycoprotein (LRG) や免疫グロブリン糖鎖変化について、炎症性腸疾患における汎用検査法として用いるための基礎的検討を行った。

A. 研究目的

炎症性腸疾患 (IBD) の診断・治療効果予測のバイオマーカーとして、LRG および血清 IgG 糖鎖解析の有用性を確認し、臨床応用に向けた簡易検査法の開発を行う。

B. 研究方法

IBD 患者、健常者および IBD 以外の腸炎患者の血清を収集し、LRG および IgG 糖鎖を抗体およびレクチンを用いた ELISA 法にて解析した。

(倫理面への配慮)

大阪大学倫理委員会での審査の上、個人情報の匿名化の上、試料の収集を行った。

C. 研究結果

血清 LRG 濃度は IBD 患者で高値であり、CRP でとらえられない疾患活動性の検出にすぐれていた。また、LRG は疾患活動性と相関するとともに、生物学的製剤による治療効果と相関していた。IgG 糖鎖の検出のため、ABA と GSL-II の 2 種類のレクチンを用いた Dual-lectin ELISA アッセイ法を開発し、臨床検体にて検査感度、特異度の確認を行ったところ、本邦の試料だけでなく、米国人の試料においても良好な検出力が確認された。

D. 考察

LRG, IgG 糖鎖両検査法とも臨床的に利用に向けてアッセイ法のさらなる改善および検査データの集積が必要である。

E. 結論

IBD のバイオマーカーとして LRG および免疫グロブリン糖鎖による診断法が有用であることが確認された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Terabe F, Fujimoto M, Serada S, Shinzaki S, Iijima H, Tsujii M, et al. Comparative analysis of the effects of anti-IL-6 receptor mAb and anti-TNF mAb treatment on CD4(+) T-cell responses in murine colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 17(2):491-502, 2011.
- 2) Nakajima S, Iijima H, Shinzaki S, Egawa S, Inoue T, Mukai A, et al. Functional analysis of agalactosyl IgG in inflammatory bowel disease patients. *Inflamm Bowel Dis.* 17(4):927-36, 2011.
- 3) Nakajima S, Iijima H, Egawa S, Shinzaki S, Kondo J, Inoue T, et al. Association of vitamin K deficiency with bone metabolism and clinical disease activity in inflammatory bowel disease. *Nutrition.* 8(27):1023-8, 2011.
- 4) Inoue T, Iijima H, Tajiri M, Shinzaki S,

- Shiraishi E, Hiyama S, Mukai A, Nakajima S, et al. Inflamm Bowel Dis. In press.
2. 学会発表
- 1) Shinzaki S, Iijima H, Tatsunaka N, Kuroki E, Mukai A, Inoue T, et al. Galectin-Polylectosamine Interaction Between B Cells and Macrophages Contributes to Protect Murine Colitis Defective in Beta-1,4-Galactosyltransferase I. Digestive Disease Week Chicago 2011年5月8日
- 2) Mukai A, Iijima H, Egawa S, Shiraishi E, Hiyama S, Inoue T, et al. The Low Grail Expression Is Associated with Mouse Models of Colitis and Crohn's Disease. Digestive Disease Week Chicago 2011年5月8日
- 3) 新崎信一郎, 飯島英樹, 竜中法佳, 黒木絵莉, 向井章, 井上隆弘, 他 インフリキシマブによるIgG糖鎖やB細胞における糖鎖関連酵素の制御 第7回日本消化管学会総会学術集会 京都 2011年2月18日
- 4) 向井章, 飯島英樹, 日山智史, 白石衣里, 井上隆弘, 中島佐知子, 他 炎症性腸疾患の病態形成におけるGRAIL、Otu-1の関与 第97回日本消化器病学会総会 東京 2011年5月13日-15日
- 5) 井上隆弘, 飯島英樹, 白石衣里, 日山智史, 向井章, 林義人, 他 炎症性腸疾患におけるIgA O結合型糖鎖異常の機序について 第97回日本消化器病学会総会 東京 2011年5月13日-15日
- 6) 井上隆弘, 飯島英樹, 白石衣里, 日山智史, 向井章, 中島佐知子, 他 IgA糖鎖構造に基づく炎症性腸疾患の診断と予後予測 第53回日本消化器病学会大会 福岡 2011年10月20日
- 7) 藤井宏修, 新崎信一郎, 飯島英樹, 向井章, 井上隆弘, 中島佐知子, 他 ポリラクトサミンを介したB細胞とマクロファージにおける腸炎保護作用 第53回日本消化器病学会大会 福岡 2011年10月20日

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他