

アダカラムに接触させることで、活性化した顆粒球を除去し、潰瘍性大腸炎やクローン病の腸管炎症を抑制することであった。しかし、アダカラムの顆粒球除去率は40%程度と比較的低値であることが明らかとなっている。したがって、以前から他のメカニズム、特にアダカラムに接触した細胞の機能変化によって炎症が抑性される可能性が想定されていた。私共は、アダカラム内のG-1ビーズに接触した細胞の表面マーカーが、L-selectin^{low}、Mac-1^{high}に変化すること、これらの変化を来たした細胞には活性酸素依存的にアポトーシスが誘導されていることに着目した。また、これまでの検討で、LPS刺激したヒトの活性化顆粒球をG-1ビーズに接触させると、アポトーシスが誘導されることが実験的に証明されている。すなわち、G-1ビーズに接触して吸着されない顆粒球は、アポトーシス細胞となって体内に流入することが考えられる。以上の点に基づいて今回の研究を遂行した。

G-1ビーズに接触した場合と同様の変化を誘発するために、マウス骨髄細胞をH₂O₂処理した。すると、処理細胞の表面マーカーはL-selectin^{low}、Mac-1^{high}に変化し、これらの細胞には高率にアポトーシスが誘導されていることが明らかとなった。この結果に基づいて、H₂O₂でアポトーシスを誘導した細胞をアダカラム通過細胞と想定し、①の実験系と同様に、マウスDSS腸炎モデルに対して尾静脈投与をおこなった。その結果、腸管短縮、組織学的な炎症スコア、IL-1b産生のいずれも有意に抑制された。

E. 結論

アポトーシス細胞移入が腸管炎症を抑制すること(生体でのアポトーシス処理)、この機序が既存の治療法であるGMAの有効機序の一つである可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① Kawashima K, Ishihara S, Yamamoto A, Ohno Y, Fukuda K, Onishi K, Kinoshita Y: Development of diffuse alopecia with psoriasis-like eruption during the administration of infliximab for

Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* (2012 Apr 16. doi: 10.1002/ibd.22922.)

- ② Ishihara S, Tada Y, Fukuba N, Oka A, Kusunoki R, Oshima N, Moriyama I, Yuki T, Kawashima K, Kinoshita Y: Pathogenesis of irritable bowel syndrome - review regarding associated infection and immune activation. *Digestion.* (*in press*)
- ③ Kawashima K, Ishihara S, Doi K, Uemura Y, Ohno Y, Fukuda K, Onishi K, Tada Y, Oka A, Kusunoki R, Fukuba N, Yuki T, Kinoshita Y: Ulcerative colitis associated with isolated unilateral hypoglossal nerve palsy. *Intern Med.* 51:3135-7, 2012.
- ④ Kusunoki R, Ishihara S, Aziz M, Oka A, Tada Y, Kinoshita Y: Roles of milk fat globule-epidermal growth factor 8 in intestinal inflammation. *Digestion.* 85:103-7, 2012.
- ⑤ Otani A, Ishihara S, Aziz MM, Oshima N, Mishima Y, Moriyama I, Yuki T, Amano Y, Ansary MM, Kinoshita Y: Intrarectal administration of milk fat globule epidermal growth factor-8 protein ameliorates murine experimental colitis. *Int J Mol Med.* 29:349-56, 2012.
- ⑥ 岡 明彦, 石原俊治, 木下芳一: 炎症性腸疾患における制御性B細胞の役割. *G. I. Research* 20:479-485. 2012
2. 学会発表
- ① Tada Y, Ishihara S, Kinoshita Y: Down-regulation of serotonin reuptake transporter gene expression in colonic mucosa during inflammation and healing phases of inflammatory bowel disease. *United European Gastroenterology Week (UEGW).* Amsterdam 2012. 10. 23.
- ② Kusunoki R, Ishihara S, Sonoyama H, Tada Y, M. U. Ansary, Oka A, Fukuba N, Moriyama I, Yuki T, Kawashima K, Kinoshita Y: Role of milk fat globule-epidermal growth factor 8 in intestinal inflammation and carcinogenesis. *United European Gastroenterology Week (UEGW).* Amsterdam 2012. 10. 23.

- ③ Oka A, Ishihara S, Sonoyama H, Tada Y, A. U. Mesbah, Fukuba N, Moriyama I, Yuki T, Kawashima K, Kinoshita Y: Regulatory role of CD19^{high}CD1d^{high} B cells in intestinal inflammation: association with pathogenesis of Crohn's disease. United European Gastroenterology Week (UEGW). Amsterdam 2012. 10. 22.
- ④ Yuki T, Ishihara S, Sonoyama H, Tada Y, M. U. Ansary, Oka A, Kusunoki R, Fukuba N, Moriyama I, Kawashima K, Kinoshita Y: Expression profiles of angiogenesis- and inflammation-related genes in colonic mucosa of ulcerative colitis in remission - comparison with narrow-band imaging magnifying colonoscopy findings. United European Gastroenterology Week (UEGW). Amsterdam 2012. 10. 24.
- ⑤ Kawashima K, Ishihara S, Oka A, Fukuba N, Ryusaku K, Tada Y, Tamagawa Y, Yuki T, Moriyama I, Yuki T, Kinoshita Y: Effects of pH-dependent release formulation of mesalazine on active ulcerative colitis resistant to time-dependent release formulation of mesalazine. United European Gastroenterology Week (UEGW). Amsterdam 2012. 10. 23.
- ⑥ 川島耕作, 石原俊治, 結城崇史, 岡 明彦, 楠 龍策, 福庭暢彦, 玉川祐司, 森山一郎, 宮岡洋一, 藤代浩史, 大西浩二, 串山義則, 谷村隆志, 結城美佳, 駒澤慶憲, 濱本直治, 吉野生季三, 橋本朋之, 木下芳一: 活動期潰瘍性大腸炎に対するpH依存性メサラジン製剤の治療効果. 第98回日本消化器病学会総会, 東京, 2012. 4. 21.
- ⑦ 結城崇史, 石原俊治, 多田育賢, 楠 龍策, 岡 明彦, 福庭暢彦, 川島耕作, 天野祐二, 木下芳一: 緩解期潰瘍性大腸炎粘膜におけるNBI拡大所見と局所炎症所見および血管新生因子の対比. 第98回日本消化器病学会総会, 東京, 2012. 4. 20.
- ⑧ 福庭暢彦, 石原俊治, 多田育賢, 岡 明彦, 楠 龍策, 森山一郎, 結城崇史, 川島耕作, 天野祐二, 木下芳一, 数森秀章, 串山義則, 藤代浩史, 駒澤慶憲. 寛解期潰瘍性大腸炎患者 IBS 様症状と内視鏡像についての多施設共同研究. 第98回日本消化器病学会総会, 東京, 2012. 4. 20.
- ⑨ 多田育賢, 石原俊治, 楠 龍策, 岡 明彦, 福庭暢彦, 森山一郎, 結城崇史, 川島耕作, 天野祐二, 木下芳一: 潰瘍性大腸炎の大腸粘膜におけるセロトニン取り込みトランスポーターの発現に関する検討. 第98回日本消化器病学会総会, 東京, 2012. 4. 19.
- ⑩ 楠 龍策, 石原俊治, 多田育賢, 岡 明彦, 福庭暢彦, 森山一郎, 結城崇史, 川島耕作, 天野祐二, 木下芳一: MFG-E8 の大腸炎症および発癌への関与. 第54回日本消化器病学会大会, 神戸, 2012. 10. 10.
- ⑪ 結城崇史, 石原俊治, 多田育賢, 深澤康輔, 岡 明彦, 楠 龍策, 相見正史, 宇野吾一, 福庭暢彦, 森山一郎, 川島耕作, 石村典久, 古田賢司, 木下芳一: 難治性潰瘍性大腸炎に対するタクロリムスによる寛解導入治療症例の経過. 第54回日本消化器病学会大会, 神戸, 2012. 10. 10.
- ⑫ 岡 明彦, 石原俊治, 多田育賢, 楠 龍策, 福庭暢彦, 森山一郎, 結城崇史, 川島耕作, 木下芳一: 制御性B細胞による腸炎抑制効果 制御性T細胞非依存的な抑制機構の検討. 第54回日本消化器病学会大会, 神戸, 2012. 10. 10.
- ⑬ 多田育賢, 石原俊治, 木下芳一: シンポジウム14 腸管炎症における serotonin reuptake transporter の遺伝子発現と機能性消化管障害の病態への関与. 54回日本消化器病学会大会, 神戸, 2012. 10. 12.

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

サイトメガロウイルス感染合併潰瘍性大腸炎マウスモデルの確立

研究分担者 千葉 勉 京都大学大学院医学研究科消化器内科学講座 教授

研究要旨：潰瘍性大腸炎においてサイトメガロウイルス（CMV）感染は一増悪因子とされてきたが、その詳細な病態機序は明らかでない。我々はT cell receptor (TCR) α KO マウスにmurine CMV (MCMV)を感染させ病態を解析した。TCR α KO 感染マウスでは非感染マウスより腸炎が高度で、腸管炎症部位のみでMCMV の増殖を認めた。我々は初めてHCMV 感染合併潰瘍性大腸炎動物モデルを確立した。今後、このモデル動物を用いてHCMV 感染合併潰瘍性大腸炎患者の更なる病態解明や治療法の確立が可能になると思われる。

A. 研究目的

炎症性腸疾患（IBD）、特に潰瘍性大腸炎（UC）においてサイトメガロウイルス（CMV）感染は増悪因子の一つとされている(1)。現在まで適切な動物モデルがまだ確立されておらず、CMV 感染がIBDの病態に与える詳細な影響は明らかではない。今回我々はCMV 感染合併IBDの動物モデルの確立とその病態解析を目的とした。

B. 研究方法

C57BL/6、TCR α KO マウス新生児にマウスCMV (MCMV)を腹腔内接種した。感染1、4週後の腸管、脾臓、肝臓におけるウイルスの力価やゲノムコピー数、ウイルス抗原の発現を調べた。12、24週齢の感染マウスでの腸炎評価のため、腸管組織所見、腸管に浸潤する炎症担当細胞の数やフェノタイプ、腸管組織中のサイトカインの遺伝子発現を解析した。次に、MCMVの腸炎への関与を免疫染色、PCR、*in situ* hybridizationにて検討し、蛍光免疫染色にてMCMV感染細胞の同定を行った。（倫理面への配慮）

本研究は京都大学動物実験委員会の承認のもと、「動物の保護および管理に関する法律」、「実験動物の飼育および保管に関する基準」を踏まえ、動物実験が可能な限り愛護的かつ適切に行われるように配慮した。

C. 研究結果

1. MCMV 感染マウスでは各臓器で、感染1週間には高値だったウイルス力価、ゲノムコピー数は4週間には

感度以下となった。また感染1週間には各臓器にウイルス抗原陽性細胞を認めたが、4週間には消失した。

2. MCMV 感染 TCR α KO マウスは同週齢の非感染マウスに比し、腸炎が高度で、浸潤する好中球やM1型のマクロファージの数が増加していた。MCMV 感染 TCR α KO マウスの炎症腸管部位ではTh2型のみならず、Th1, Th17型サイトカイン遺伝子発現が亢進していた。C57BL/6 マウスでは感染非感染マウスともに腸炎を認めなかった。
3. 感染 TCR α KO マウスでは免疫染色にて腸管優位にウイルス抗原陽性細胞を認め、PCRでは他の臓器に比し腸管においてウイルスゲノムの増幅が高度であった。また *in situ* hybridizationにてMCMV-DNA 陽性細胞を認めた。
4. 蛍光免疫染色による検討では、MCMV 陽性細胞の多くが内皮細胞近傍のPDGFR- β 、CXCL12を発現するperivascular細胞で、一部はCD146、NG2陽性の周皮細胞であった。

D. 考察

今回我々はMCMV 感染UCモデル動物を初めて確立した。MCMVを一旦潜伏感染させたTCR α KOマウスを腸炎発症期まで観察したところ、非感染マウスに比し腸炎が組織学的に高度であった。また、これまでの*in vitro*での報告に類似するように、感染TCR α KOマウスの腸管組織ではTNF α やIFN γ などのTh1型サイトカインの遺伝子発現の上昇を認めた。感染マウスでは、IL-6や

TGF- β の上昇によって IL-17 の遺伝子発現が誘導されたと考えられた。MCMV 感染 TCR α KO マウスでは Th2 型以外に Th1/Th17 型免疫応答を呈し、腸炎増悪を引き起こすことが示唆された。

腸炎発症後の MCMV 感染 TCR α KO マウスでは、潜伏期に一旦消失した MCMV 抗原陽性細胞が炎症腸管部位に再出現し、PCR や *in situ* hybridization にても MCMV-DNA の増幅が確認された。これらは、HCMV 感染合併 UC 患者での最初の HCMV 検出部位は腸管炎症粘膜であるという臨床データに合致するものであった。以上より、MCMV 感染 TCR α KO マウスでは腸管炎症にて MCMV の増殖が促進され、腸炎増悪につながるものと考えられた。

また我々は MCMV 感染 TCR α KO マウスでの MCMV 感染細胞の同定を行った。主な感染細胞は、従来報告されてきた内皮細胞や上皮細胞ではなく、内皮細胞周囲の perivascular 細胞であった。この結果はこのモデルマウスと臨床検体の病勢の差を反映するのではないかと推測している。つまり、過去の報告は免疫不全患者の解剖検体や UC 患者の大腸全摘術検体での感染細胞の検討であり、今回のマウスの腸炎に比べ重症度が非常に高い。おそらく、HCMV の腸管局所の潜伏部位は perivascular cell であり、再活性化早期には perivascular 細胞などの間質細胞でのみ観察され、病勢の進行とともに内皮細胞や上皮細胞に感染し潰瘍形成や全身血行感染を引き起こすものと考えられた。また本実験において MCMV 感染細胞で発現が増強していた PDGFR β や CXCL12 は、共に炎症細胞の遊走に関与しており、腸管炎症部位への更なる炎症細胞浸潤に寄与したと思われた。

E. 結論

今回我々は HCMV 感染によって増悪する UC 動物モデルを初めて確立した。今後この新しいモデルマウスを使用することにより、HCMV 感染を合併した潰瘍性大腸炎患者の病態の解明および治療方法の確立が可能になるものと思われた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Honzawa Y, Nakase H, Matsuura M, Higuchi H, Toyonaga T, Matsumura K, Yoshino T, Okazaki K, Chiba T: Preceded use of immunomodulative drugs improve the clinical outcome of endoscopic balloon dilation procedure for intestinal stricture in patients with Crohn's disease. Dig Endosc 2012(in press).
- 2) Arasawa S, Nakase H, Ozaki Y, Uza N, Matsuura M, Chiba T: Mediterranean mimicker. Lancet 380:2052:2012.

2. 学会発表

- 1) Yusuke Honzawa, Hiroshi Nakase, Minoru Matsuura, Tsutomu Chiba: Concomitant use of immunosuppressive drugs improves clinical outcome of endoscopic balloon dilation therapy for intestinal stricture of Crohn's disease. DDW2012, San Diego Convention Center, U.S.A., 2012. 5. 19.
- 2) Takuya Yoshino, Hiroshi Nakase, Minoru Matsuura, Tsutomu Chiba: Mucosal healing with tacrolimus improved long-term clinical outcome in refractory UC. DDW2012, San Diego Convention Center, U.S.A., 2012. 5. 19.
- 3) Hiroshi Nakase, Minoru Matsuura, Tsutomu Chiba: Osteopontin prevents onset of immune-mediated colitis by inducing tolerogenic dendritic cells. DDW2012, San Diego Convention Center, U.S.A., 2012. 5. 22.
- 4) 松村佳代子, 仲瀬裕志, 千葉 勉: サイトメガロウイルス感染合併炎症性腸疾患マウスモデルを用いた病態解析. 第 49 回日本消化器免疫学会総会・シンポジウム, 城山観光ホテル, 2012. 7. 6.
- 5) 本澤有介, 仲瀬裕志, 松浦 稔, 千葉 勉: クローン病に対する Thiopurine 製剤早期導入による寛解維持効果の検討. JDDW2012 第 54 回日本消化器病学会大会, 神戸国際会議場, 2012. 10. 11.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

該当なし

dnTGF-bRII マウス大腸炎における IL-23, IL-17 による制御機構

研究分担者 岡崎 和一 関西医科大学内科学第三講座 教授

研究要旨：本研究では、dominant negative TGF-b RII (dnTGF-b) mouse を用いて炎症性腸疾患 (IBD) における、IL-17 および p19IL-23 の役割について解析を行った。

dnTGF-b mouse は、生後 8 週前後から colitis を発症し、病理組織学的に Inflammatory bowel disease (IBD) としての特徴を認める。2009 年 Yoshida らは、dnTGF-b mouse と p40IL-12/IL-23knock out (KO) mouse を backcross することにより、このモデルマウスにおける p40 の役割を解析した。その結果、p40KO マウスでは colitis が顕著に改善していたことから、IBD において p40 は非常に重要な役割を果たしていることが示唆された。しかし、p40 は IL-12 の subunit であると共に IL-23 の subunit でもあるため、Th1 もしくは Th17、あるいは両方の population を抑制することにより、炎症が抑制されたかについては、不明のままであった。今回、我々はこの問題点を解決すべく、p35IL-12KO mouse および p19IL-23KO mouse を用いて、dnTGF-b mouse における Th1 および Th17 の役割について解析を行った。

2012 年 Tsuda らは、dnTGF-b mouse と p35IL-12knock out (KO) mouse を backcross することにより、このモデルマウスにおける p35 の役割を解析したが、colitis に変化は見られなかった。次に、p19IL-23KO mouse を用いて dnTGF-b mouse における Th17 の役割について解析を行ったところ、colitis は著明な改善が見られた。更に、Th17 から産生される IL-17 の働きについても IL-17KO マウスを用いて解析した。その結果、IL-17KO だけでは、colitis の改善は見られなかった。

以上の結果より、このモデルマウスにおける colitis は、IL-17KO 単独では変化が見られなかったものの、Th17 の分化維持に必須の IL-23 が非常に重要な役割を果たしていることが示唆された。

共同研究者

安藤祐吾¹、吉田勝紀¹、常山幸一^{2, 3}、深田憲将¹、松下光伸¹、福井寿朗¹、M. Eric Gershwin²

(関西医科大学第三内科学講座¹、

Division of Rheumatology, Allergy and Clinical Immunology, University of California at Davis²、富山大学大学院医学薬学研究部病理診断学講座³)

p40IL-12/IL-23, IL-17A, IFN-g) を交配することにより、dnTGF-b マウス大腸炎における Th1, Th17 の役割を解析する。

(倫理面への配慮)

今回実施された実験プロトコールは University of California Animal Care and Use Committee によって、実験開始前に承認された。

A. 研究目的

炎症性腸疾患の病態形成における p19IL-23 の役割

B. 研究方法

dominant negative TGF-b RII (dnTGF-b) mice と各種ノックアウトマウス (p19IL-23, p35IL-12,

C. 研究結果

p40^{-/-}dnTGF-b mouse において、著明な colitis の改善を認めたものの、p35^{-/-}dnTGF-b mouse では colitis の改善は見られず、さらに TH1 サイトカインである IFN-g のみ欠損させ IFN-g^{-/-}dnTGF-b mouse でも colitis

の改善は見られなかった。p19^{-/-}dnTGF-β mouse では colitis の改善を認めたが、IL-17 のみ欠損させた IL-17^{-/-}dnTGF-β mouse では、colitis の改善は見られなかった。

D. 考察

既に他の IBD model mouse において、IL-23 が腸炎の原因として重要な役割を果たしていることが報告されている。IL-17 については腸炎の病態悪化に関与するといった報告と、抑制的に作用するといった報告がみられ、現時点ではまだ最終的な結論は出ていないが、IL-17 が腸炎に対して抑制的に作用するといった内容の報告が過半数を占めている。今回、我々が用いた dnTGF-β mouse は、大腸のみに特異的な炎症を来すモデルマウスではないものの、病理組織学的に IBD (特に UC) と類似しており、今回我々が報告した結果も、その他の IBD モデルマウスの結果とも矛盾しない。

以上より、dnTGF-β mouse は新たな IBD mouse model として病態解明および新規治療薬の開発に有用と思われる。

E. 結論

dnTGF-βR2 マウスにおける colitis は、IL-17KO 単独では変化が見られなかったものの、Th17 の分化維持に必須の IL-23 が非常に重要な役割を果たしていることが示唆された。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Matsushita M, Fukata N, Omiya M, Okazaki K. Absence of Large Ulcers Indicate That Viral Therapy is Not Necessary in Cytomegalovirus Infection in Ulcerative Colitis. J Clin Gastroenterol. 2013 Jan;47(1):90-1.
2. Ando Y, Yang GX, Tsuda M, Kawata K, Zhang W, Nakajima T, Tsuneyama K, Leung P, Lian ZX, Okazaki K, Ridgway WM, Norman GL, Ansari AA, He XS, Coppel RL, Gershwin ME. The immunobiology of colitis and cholangitis in

interleukin-23p19 and interleukin-17A deleted dominant negative form of transforming growth factor beta receptor type II mice. Hepatology. 2012 ;56(4):1418-26.

3. Nakajima A, Fukui T, Takahashi Y, Kishimoto M, Yamashina M, Nakayama S, Sakaguchi Y, Yoshida K, Uchida K, Nishio A, Yodoi J, Okazaki K. Attenuation of indomethacin-induced gastric mucosal injury by prophylactic administration of sake yeast-derived thioredoxin. J Gastroenterol. 2012 ;47(9):978-87
4. 岡崎和一、深田憲将、大宮美香、岡崎 敬、栗島 亜希子、松下光伸 IBDとリンパ増殖性疾患 IBD Research 2012 : 6212-219
5. Yamashina M, Nishio A, Nakayama S, Okazaki T, Uchida K, Fukui T, Okazaki K. Comparative Study on Experimental Autoimmune Pancreatitis and Its Extrapancreatic Involvement in Mice. Pancreas. 2012;41:1255-62.

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
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし

リンカー部スレオニンリン酸化 smad2/3 蛋白発現による腸管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 教授

研究要旨：正常マウスの小腸と大腸にて anti-pSmad2/3L-Thr 抗体にて認識される細胞を同定し、この細胞が上皮由来の組織幹細胞であることを確認する。DSS 腸炎マウスモデルを用いて、びらん部と再生部においてこの抗体にて認識される細胞を同定し、細胞周期の観点から幹細胞マーカーの可能性を検討する。

共同研究者

岸本真房、鈴木 亮、高橋 悠、福井寿朗、坂口雄沢、内田一茂、西尾彰功（関西医科大学第三内科学講座）

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(Thr²²⁰, Thr¹⁷⁹)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) 正常マウスの小腸切片と大腸切片において、二重染色を行い、Ki67 陰性かつ Smad 陽性細胞を検出する。
- 2) 正常マウスの小腸切片と大腸切片において、anti-pSmad2/3L-Thr 抗体と腸管粘膜構成細胞マーカー (Cytokeratin8, Chromogranin A), 細胞周期マーカー

(CDK4), これまでに提唱されている消化管上皮幹細胞マーカー (MSI-1) で二重染色を施行する。3) 消化管上皮幹細胞のマーカーとされる Lgr5 遺伝子を発現した細胞が GFP にて発色するよう改変されたマウス (Lgr5 GFP Knock in mouse) の小腸切片と大腸切片を免疫染色し、Smad 陽性細胞との相違を確認する。4) 正常マウスに BrdU 腹腔内投与を施行し、Label retaining assay を行い、Smad 陽性細胞における BrdU の残存を確認する。5) DSS 腸炎モデルマウスにおいても同様の細胞を検索し、びらん部と再生部の Smad 陽性細胞を検討する。

(倫理面への配慮)

この研究は、関西医科大学遺伝子組換え実験安全委員会、動物実験委員会において承認されている。承認番号：12-036(01)

C. 研究結果

正常マウスの小腸では +4 position 付近と一部の CBC 細胞に Ki67 陰性の smad 陽性細胞を認め、大腸では crypt base に Ki67 陰性の smad 陽性細胞を認めた。小腸と大腸で smad 陽性細胞は、cytokeratine 8 陽性、Chromogranin A 陰性であり、CDK4 が強く発現していた。小腸で smad 陽性細胞は、MSI-1 陽性細胞領域に発現していた。Lgr5 GFP Knock in mouse では、小腸で +4 position 付近の smad 陽性細胞は Lgr5 陰性、CBC 細胞領域の smad 陽性細胞は Lgr5 陽性であり、大腸で smad 陽性細胞は Lgr5 陽性であった。BrdU 腹腔内投与を行ったマウスの小腸と大腸で、BrdU 投与後 15 日目まで

smad 陽性細胞に BrdU の残存を認めた。DSS 腸炎モデルマウスの大腸では、びらん部は Ki67 と smad 陽性細胞は認めず、再生部は Ki67 陽性細胞と smad 陽性細胞の有意な増加を認めた。

D. 考察

smad 陽性細胞が上皮由来の組織幹細胞である可能性を確認した。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

今回、我々が観察したリン酸化 smad 蛋白陽性細胞は、CDK4 によりリン酸化され、Ki67 陰性の休止期から G1 期に入る時期に発現していると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
 1. Toshiro Fukui ・ The specific linker phosphorylation of Smad2/3 indicates epithelial stem cells in colon; particularly increasing in the regeneration phase of murine model of dextran sulfate sodium-induced colitis ・ GI Research Academy 2012 ・ Keidanren Kaikan, Tokyo, Japan ・ June 15, 2012
 2. 高橋 悠・消化管上皮における pSmad2/3L-Thr 陽性細胞の検討・第 98 回日本消化器病学会総会・京王プラザホテル・2012 年 4 月 19 日
 3. Masanobu Kishimoto ・ Overexpression of Smad2/3, phosphorylated at specific linker threonine residues, in the murine model of Dextran Sodium Sulfate-Induced Colitis ・ The 6th Korea-Japan IBD Symposium. ・ Keio Plaza Hotel, Tokyo, japan

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

炎症性腸疾患モデルにおけるリコンビナントトロンボモジュリン（rTM）の効果

研究分担者 三浦 総一郎 防衛医科大学校 学校長

研究要旨：マウス腸炎モデルを用い、粘膜の high mobility group box 1 protein (HMGB1) の発現について評価した。またリコンビナントトロンボモジュリン(rTM)投与し、HMGB1 シグナル MGB1 の阻害が腸炎を改善するか検討した。rTM 投与により、粘膜内 TNF- α 産生低下に伴い腸炎が改善した。rTM が炎症性腸疾患の新規治療薬の新たな候補になる可能性が示唆された。

共同研究者：上田俊秀、穂苅量太

A. 研究目的

トロンボモジュリン(TM)は抗凝固作用だけではなく抗炎症作用を有することが報告されている。近年敗血症の遅発性メディエーターとして注目されている high mobility group box 1 protein (HMGB1)は様々な病態での炎症に関与するが、TMはHMGB1と結合することでも抗炎症に働く。リコンビナントTM(rTM)はLPS腸炎など種々の疾患モデルで抗炎症作用を示すことが報告されているが、炎症性腸疾患での検討はなされていない。そこで今回我々はマウスDSS大腸炎モデルにおいてrTMが腸炎の改善効果を有するか検討し、その際のHMGB1の発現についても評価した。

B. 研究方法

8-10週令のC57BL/6マウスに5%DSSを5日間自由飲水させ大腸炎モデルを作成した。DSS投与期間中rTMを2回/日腹腔内注射し、7日目に大腸を採取した。評価項目として体重、腸管長、組織学的スコア、TNF- α のmRNAのRT-PCR法、HMGB1の免疫染色を実施した。

C. 研究結果

DSS単独群に比較しrTM投与群で有意な体重減少と腸管長の短縮の抑制が観察された。rTMにより組織学的スコアの改善と、TNF- α のmRNAの発現上昇の抑制が見られた。また、DSS単独群では浸潤細胞と血管内皮細胞でのHMGB1の発現の亢進が認められたが、rTM投与により抑制された。

D. 考察

腸炎粘膜ではHMGB1シグナルが炎症着起性に働いて

と考えられる。

E. 結論

炎症性腸疾患の新規治療薬として、リコンビナントトロンボモジュリンが新たな候補になる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. Kurihara C, Hokari R, Ueda T, Sato S, Hozumi H, Sato H, Narimatsu K, Okada Y, Watanabe C, Tomita K, Komoto S, Kawaguchi A, Nagao S, Miura S. Macrophages pre-exposed to heat-killed feces show hyporesponsiveness to mRNA expression of inflammatory cytokines induced by fatty acids exposure. In: The 6th Korea-Japan Inflammatory Bowel Disease Symposium 2012. 01. 28, Tokyo
2. Kurihara C, Hokari R, Ueda T, Sato S, Hozumi H, Sato H, Narimatsu K, Okada Y, Watanabe C, Komoto S, Tomita K, Kawaguchi A, Nagao S, Miura S. Modulation of cytokine mRNA expression in intestinal macrophages through liver X receptor-alpha. Digestive DiseaseWeek 2012 San Diego, 2012. 05. 19-22.
3. Narimatsu K, Hokari R, Ueda, T, Sato S, Hozumi H, Sato H, Kurihara C, Okada Y, Watanabe C, Komoto S, Tomita K, Kawaguchi A, Nagao S, Miura S. Amelioration of NSAID-induced small intestinal

lesions by Toll-like receptor 2 agonist through decreasing leukocytes migration to intestinal mucosa. Digestive Disease Week 2012 San Diego, 2012. 05. 19-22.

4. Sato H, Narimatsu K, Hokari R, Ueda T, Sato S, Hozumi H, Kurihara C, Okada Y, Watanabe C, Komoto S, Tomita K, Kawaguchi A, Nagao S, Miura S. Increased expression of lymphangiogenesis-related molecules in intestinal mucosa of patients with inflammatory bowel diseases Digestive Disease Week 2012 San Diego, 2012. 05. 19-22.

5. Ueda T, Hokari R, Kurihara C, Sato S, Hozumi H, Sato H, Narimatsu K, Okada Y, Watanabe C, Komoto S, Tomita K, Kawaguchi A, Nagao S, Miura S. Recombinant thrombomodulin modulates murine colitis via inhibition of HMGB1. Digestive Disease Week 2012 San Diego, 2012. 05. 19-22.

6. Sato S, Hokari R, Kurihara C, Ueda T, Hozumi H, Sato H, Narimatsu K, Okada Y, Watanabe C, Komoto S, Tomita K, Kawaguchi A, Nagao S, Miura S. Dietary lipid and sweetener regulate secretion of glucagon-like peptide-2 (GLP-2) from intestine in a different manner. Digestive Disease Week 2012 San Diego, 2012. 05. 19-22.

7. Watanabe C, Hokari R, Kurihara C, Ueda T, Hozumi H, Sato H, Narimatsu K, Okada Y, Sato S, Komoto S, Tomita K, Kawaguchi A, Nagao S, Miura S. Prevalence of celiac disease in patients with inflammatory bowel disease: A study from Japan Digestive Disease Week 2012 San Diego, 2012. 05. 19-22.

8. Okada Y, Tsuzuki Y, Hokari R, Watanabe C, Kurihara C, Ueda T, Hozumi H, Sato H, Narimatsu K, Sato S, Komoto S, Tomita K, Kawaguchi A, Nagao S, Miura S. A novel vegetable-derived probiotics (VDP) exerts a therapeutic effect on DSS induced colitis possibly mediated by IL-27 producing CD11c+ dendritic cells. Digestive Disease Week 2012 San Diego, 2012. 05. 19-22.

9. Okada Y, Tsuzuki Y, Hokari R, Watanabe C, Kurihara C, Ueda T, Hozumi H, Sato H, Narimatsu K, Sato S, Komoto S, Tomita K, Kawaguchi A, Nagao S, Miura S. Trans fatty acids exposure induced expression of proinflammatory cytokines and NK-1R in colonic

epithelial cells by phosphorylation of p38.

Digestive Disease Week 2012 San Diego, 2012. 05. 19-22.

10. Hokari R, Miura S. Effect of dietary fat on intestinal disorders. In: Symposium: Nutritional Factors (Nutritional aspect) in GI disorders. JSDE-APAGE Joint Conference. The 3rd Asian-Pacific Topic Conference, Nutritional Related Disorders and Digestive System. Tokyo, 2012. 11. 2-3.

11. Ueda T, Hokari R, Miura S. Dietary fat exacerbates NSAID-induced mucosal damage in murine small intestine. JSDE-APAGE Joint Conference. The 3rd Asian-Pacific Topic Conference, Nutritional Related Disorders and Digestive System. Tokyo, 2012. 11. 2-3.

12. Okada Y, Tsuzuki Yoshikazu, Ueda Toshihide, Hozumi Hideaki, Sato Shingo, Hokari Ryota, Kurihara Chie, Watanabe C, Tomita K, Komoto S, Kawaguchi A, Nagao S, Miura S. Trans fatty acids in diet act as precipitating factor of DSS-induced colitis by the up-regulation of macrophage-derived proinflammatory cytokines. JSDE-APAGE Joint Conference. The 3rd Asian-Pacific Topic Conference, Nutritional Related Disorders and Digestive System. Tokyo, 2012. 11. 2-3.

13. Kurihara C, Hokari R, Matsunaga H, Higashiyama M, Ueda T, Sato H, Narimatsu K, Okada Y, Watanabe C, Tomita K, Komoto S, Kawaguchi A, Nagao S, Miura S. Exposure to fatty acid modifies IL-6 mRNA expression in macrophages from small intestine of IBD-mice model. Asian IBD Symposium Seoul 2012, Seoul, 2012, 11, 2-3.

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

腸管の慢性炎症における aberrant lymphocyte migration に対する
Autotaxin/Lisophospholipase D の関与と阻害効果

研究分担者 三浦 総一郎 防衛医科大学校 学校長

研究要旨： Crohn 病および潰瘍性大腸炎(UC)にて当科受診中の患者で病変部粘膜のオートタキシン (ATX) の発現を非病変部と比較した。ATX の発現量は、病変部で増加し、Crohn 病およびUC との関連が示唆された。マウス腸炎モデルを用い、オートタキシン (ATX) 阻害剤の有無による腸炎活動性への効果を検討した。ATX 阻害剤の投与により、リンパ球浸潤が有意に抑制され腸炎が改善した。以上より、ATX が UC・Crohn 病の病態に関与する可能性が示唆された。

共同研究者：八月朔日秀明、穂苅量太

参加してもらうこととし、患者のプライバシー擁護には万全を期する。

A. 研究目的

脂質メディエーターのひとつであるリンフォスファチジン酸、およびその産生酵素であるオートタキシン (ATX) は、リンパ球の2次リンパ組織への migration への関与が報告されている。

一方、aberrant lymphocyte migration は炎症性腸疾患の主要な病態のひとつであり、その病変粘膜では静脈が HEV-like vessel に変化し、MAdCAM-1 などの接着分子が異所性に発現することが明らかになっている。以前我々は、UC・Crohn 病患者の病変粘膜において HEV-like vessel が形成され、ATX の発現が見られること、を当班会議にて報告しているが、今回はこれらに続き、動物モデルを用い、ATX の HEV-like vessel における migration への作用につき検討を行った。

B. 研究方法

Crohn 病もしくは UC にて当科受診中の患者さんで、通常内視鏡検査の際に活動性および非活動性の部位から生検採取し、ATX の組織中 mRNA 発現を Real Time PCR を用いて定量解析し病変部、非病変部で比較した。動物実験としてリンパ球移入モデルを用い、ATX 阻害剤の投与による腸炎活動性の変化につき解析を行った。

(倫理面への配慮)

十分なインフォームドコンセントを得た上で本研究に

C. 研究結果

ATX の発現量は、病変部粘膜で増加した。リンパ球移入モデルで ATX 発現が増加した。ATX 阻害剤の投与によりリンパ球浸潤は抑制され、腸炎は改善した。

D. 考察

慢性炎症の環境下にある粘膜では、静脈が HEV-like vessel に変化し、MAdCAM-1 などの接着分子が異所性に発現するが、ここに ATX が発現しリンパ球 migration に関与するものと考えられる。

E. 結論

Crohn 病および UC における異常なリンパ球 migration に ATX 発現が関連しており、新たな治療ターゲットとなる可能性があると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. Hozumi H, Hokari R, Kurihara C, Ueda T, Sato S, Sato H, Narimatsu K, Okada Y, Watanabe C, Komoto S, Tomita K, Kawaguchi A, Nagao S, Miura S. Spontaneous hemorrhage observed in endoscopic findings

suggests increased expression of tumor necrosis factor- α in colonic mucosa of ulcerative colitis. Digestive Disease Week 2012 San Diego, 2012. 05. 19-22.

2. Hozumi H, Hokari R, Kurihara C, Ueda T, Sato S, Sato H, Narimatsu K, Okada Y, Watanabe C, Komoto S, Tomita K, Kawaguchi A, Nagao S, Miura S. Inhibition of autotaxin-lysophosphatidic acid axis significantly ameliorates chronic intestinal damage by modulating lymphocytes migration to intestinal mucosa. Digestive Disease Week 2012 San Diego, 2012. 05. 19-22.

3. 八月朔日秀明、穂苺量太、栗原千枝、佐藤宏和、成松和幸、佐藤伸悟、上田俊秀、東山正明、岡田義清、渡辺知佳子、高本俊介、富田謙吾、川口 淳、永尾重昭、三浦総一郎 : Expression of autotaxin/lysophospholipase D in high endothelial venule-like vessel and its role on aberrant lymphocyte migration in inflamed intestinal mucosa. (腸管炎症時における異所性のリンパ球マイグレーションにおける高内皮細静脈様血管での autotaxin/lysophospholipase D 発現に関して) . 第37回日本微小循環学会総会、2012. 03. 16-17、盛岡

4. 佐藤宏和、穂苺量太、三浦総一郎 : 炎症性腸疾患におけるリンパ管新生因子の検討. 第35回日本リンパ学会総会、2012. 06. 29-30, 東京

5. 成松和幸、佐藤宏和、東山正明、上田俊秀、渡辺知佳子、高本俊介、富田謙吾、穂苺量太、三浦総一郎 : NSAIDs 起因性小腸潰瘍に対する Toll-like receptor 2 agonist の抑制効果. 第49回日本消化器免疫学会総会、2012. 07. 5-6, 鹿児島

6. 成松和幸、東山正明、佐藤宏和、八月朔日秀明、上田俊秀、佐藤伸悟、渡辺知佳子、栗原千枝、岡田義清、高本俊介、富田謙吾、穂苺量太、川口 淳、永尾重昭、三浦総一郎 : Toll-like receptor 2 agonist によるインドメタシン起因性小腸潰瘍の抑制効果. シンポジウム : 粘膜上皮修復機轉の最前線、第40回日本潰瘍学会総会、2012. 07. 12-14, 東京

7. 佐藤宏和、穂苺量太、成松和幸、上田俊秀、東山正明、渡辺知佳子、高本俊介、富田謙吾、栗原千枝、岡田義

清、川口 淳、永尾重昭、三浦総一郎 : 炎症性腸疾患におけるリンパ管新生における検討、シンポジウム : IBD 診療・治療への更なる挑戦、第30回日本大腸検査学会総会、2012. 09. 1. 東京

8. 穂苺量太、上田俊秀、東山正明、富田謙吾、岡田義清、栗原千枝、成松和幸、佐藤宏和、渡辺知佳子、高本俊介、川口 淳、永尾重昭、三浦総一郎 : 腸管炎症における脂肪摂取の影響- ω 3系多価不飽和脂肪酸の2面性、第9回日本在宅静脈経腸栄養研究会学術集会、2012. 10. 20, 名古屋、

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（難治性疾患等克服研究事業（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 ROR γ t 非依存的 Classical Th1 細胞の発達分化

研究分担者 日比 紀文 慶應義塾大学医学部内科学 教授

研究要旨：近年、炎症性腸疾患 (IBD: inflammatory bowel disease) の病態形成において、Th1, Th2 細胞に加え、Th17 細胞の関与が報告されている。これまで我々はマウスを用いた CD4⁺CD45RB^{high} T 細胞移入慢性大腸炎モデルにおいて、腸炎状態には ROR γ t⁺ Th17 細胞を介して分化する腸炎惹起性 ROR γ t 依存的 alternative Th1 細胞 (aTh1 細胞) が出現することを報告した。今回我々は Naive T 細胞から直接分化する ROR γ t 非依存的 classical Th1 細胞 (cTh1 細胞) について検討を行ない、ROR γ t⁺細胞共存下では cTh1 細胞も腸炎惹起性を有することを明らかにした。aTh1 細胞の分化、cTh1 細胞の腸炎惹起性獲得にいずれにも ROR γ t⁺細胞が必須であることから今後炎症性腸疾患への新たな治療ターゲットとして応用が期待される。

共同研究者

三枝慶一郎、金井隆典、筋野智久、三上洋平、水野慎大、木村佳代子、松岡克善、佐藤俊朗、久松理一
(慶應義塾大学消化器内科)

A. 研究目的

これまで我々はマウスを用いた CD4⁺CD45RB^{high}T 細胞移入慢性大腸炎モデルを用い腸炎状態には Naive T 細胞から直接分化する classical Th1 細胞 (cTh1 細胞) 細胞とは別に ROR γ t⁺細胞である Th17 細胞を介し分化する ROR γ t 依存的腸炎惹起性 Th1 細胞が存在するというを明らかにし、その細胞集団を alternative Th1 細胞 (aTh1 細胞)、分化経路を alternative pathway と名付けた。この報告では腸炎を形成する最終的エフェクター細胞は Th1 細胞である事を示唆したが、腸炎惹起性 Th1 細胞はあたかも Th17 細胞を介して腸炎炎症後期に出現するように考えられている。本研究は ROR γ t 非依存的環境下で誘導される cTh1 細胞の腸炎への関与について検討し、腸炎の治療ターゲット細胞を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

1. Th1 細胞の腸炎惹起性の有無。

ROR γ t KO マウス脾臓細胞より抽出した CD4⁺CD45RB^{high}T

細胞 (Naive T 細胞)、Naive T 細胞を Th1 分化条件下で培養し、Th1 細胞に誘導した細胞それぞれを RAG2 KO マウスに移入し腸炎発症の有無を検討する。

2. ROR γ t⁺細胞共存下での cTh1 細胞分化。

Ly5.2⁺ROR γ t KO と Ly5.1⁺WT マウス脾臓より抽出した Naive T 細胞を RAG2 KO マウスに共移入し腸炎発症の有無、Ly5.2⁺ROR γ t KO マウス由来の Naive T 細胞の分化経路について検討する。比較のために単独移入群も用意する。

3. ROR γ t⁺細胞共存下で誘導された cTh1 細胞の腸炎惹起性の有無。

Ly5.2⁺ROR γ t KO と Ly5.1⁺WT マウス脾臓より抽出した Naive T 細胞を RAG2 KO マウスに共移入し腸炎を発症した腸管粘膜より粘膜固有層単核細胞 (LPMC: lamina propria mononuclear) を抽出する。その後 LPMC より Ly5.1⁺CD4 (Ly5.1⁺LPCD4⁺) 細胞、Ly5.2⁺CD4⁺ (Ly5.2⁺LPCD4⁺) 細胞を単離しそれぞれを RAG2 KO マウスに再移入し腸炎発症の有無を検討する。

C. 研究結果

1. Th1 細胞は腸炎を惹起することが出来る。

ROR γ t KO マウス脾臓由来の Naive T 細胞を移入した群では腸炎発症を認めなかったが、*in vitro* で誘導した Th1 細胞を移入した群においては腸炎発症を認め、腸管粘膜の LPCD4⁺細胞について fluorescence activated cell sorting (FACS) にて解析したところ、腸管粘膜には IFN- γ シングルポジティブ分画の著明な増加を認めた。

2. ROR γ t⁺細胞共存下では cTh1 細胞分化が誘導される。

共移入群と、Ly5.1^{WT} マウス由来脾臓の Naive T 細胞単独移入群で腸炎発症を認めた。腸炎を発症した腸管粘膜の Ly5.2⁺LPCD4⁺細胞について FACS にて解析を行ったところ、Ly5.2⁺ROR γ t KO マウス由来脾臓 Naive T 細胞を RAG2 KO マウスに単独移入した群では IFN- γ シングルポジティブ分画が 20%後半であったのに対し、Ly5.1^{WT} マウス由来脾臓の Naive T 細胞と共移入した群では 40%程度まで明らかな増加を認めた。

3. ROR γ t⁺細胞共存下で誘導された cTh1 細胞は腸炎惹起性を有する。

Ly5.1⁺LPCD4⁺細胞、Ly5.2⁺LPCD4⁺細胞移入群両群で腸炎の発症を認めた。Ly5.2⁺LPCD4⁺細胞移入群では FACS 解析にて腸管粘膜の LPCD4⁺細胞中に IFN- γ シングルポジティブ分画の増加を伴っていた。

D. 考察

これまで、ROR γ t KO マウス脾臓由来の Naive T 細胞を RAG-2 KO マウスに移入しても腸炎の発症が認められないことから、cTh1 細胞は腸炎惹起性を有さない事が予想されていたが、今回我々の検討により ROR γ t⁺細胞の存在下では、腸炎惹起性 cTh1 細胞が誘導されることが明らかとなった。腸炎状態には、Naive T 細胞から直接分化する cTh1 細胞、ROR γ t⁺ Th17 細胞を介して分化する aTh1 の 2 種類のエフェクター細胞が存在し、いずれも腸炎惹起性を有すること、いずれの Th1 細胞分化にも ROR γ t⁺細胞が必須であることから、今後、ROR γ t⁺細胞の腸炎への寄与をさらに検討することで新たな治療戦略につながると思われる。

E. 結語

ROR γ t⁺細胞共存下では cTh1 細胞も腸炎惹起性を有することを見出した。腸炎惹起性 ROR γ t 依存的 aTh1 細胞、ROR γ t 非依存的 cTh1 細胞の分化にはいずれも ROR γ t⁺細胞が必須であることから ROR γ t⁺細胞の腸炎惹起、維持機構の解明は新たな治療戦略となり得る。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
未発表
2. 学会発表
未発表

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

腸炎惹起性メモリーCD4⁺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：我々はこれまでに炎症性腸疾患（Inflammatory Bowel Disease: IBD）の真の治療標的として、生体内に長期生存可能な腸炎惹起性メモリーT細胞に注目し、その維持機構の解析を行ってきた。結果、本細胞の維持には IL-7/IL-7R シグナルが必須であり、IL-7 が恒常的に存在する骨髄は本細胞の重要なリザーバーとして機能する事を発見した。今回我々は 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) 骨髄中の間葉系幹細胞（Mesenchymal Stem Cells; MSC）が IL-7 を恒常的に産生することを同定し、3) IL-7 高産生性 MSC の存在が *in vitro*, *in vivo*において、腸炎惹起性メモリーT細胞維持機構の十分条件であることを証明した。骨髄 MSC 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¹、金井隆典²、渡辺 守¹

¹東京医科歯科大学大学院消化器病態学分野

²慶応義塾大学医学部消化器内科

ける全身性病源性メモリー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⁺CD45RB^{hi}CD4⁺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⁺CD44⁺CD62L⁻IL-7R α ^{high}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^{-/-} x RAG-2^{-/-}マウスでは CD4⁺CD45RB^{hi}CD4⁺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。

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

B. C、研究方法と研究結果

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 $IL-7^{+/+} \times RAG-1^{-/-}$ 骨髄移植マウスおよび $IL-7^{-/-} \times RAG-1^{-/-}$ 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、我々は複

数の間葉系組織に分化可能であり、*in vitro*における培養系が確立している骨髄間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem Cell 以下 MSC) に着目した。骨髄 MSC を培養/純化し、*in vitro*において脂肪組織、骨組織、軟骨組織に分化誘導を行い、IL-7 mRNA の発現を検討したところ、全ての間葉系組織で IL-7 mRNA が発現していたが驚いたことに分化前の間葉系幹細胞において非常に高いレベルの IL-7 mRNA が検出された。MSC は 40 継代以上に渡り IL-7 mRNA を発現し、免疫染色によって蛋白レベルの IL-7 発現も確認した。

3) IL-7 高産生性 MSC が *in vitro*, *in vivo*において、腸炎惹起性メモリーT 細胞維持機能の十分条件である

3-1、骨髄間葉系幹細胞は *in vitro* において腸炎惹起性メモリーT 細胞を維持した。

そこで $IL-7^{-/-} \times RAG-1^{-/-}$ マウス骨髄由来 MSC ($IL-7^{-/-}MSC$) および $IL-7^{-/-} \times RAG-1^{-/-}$ マウス骨髄由来 MSC ($IL-7^{-/-}MSC$) を CFSE ラベルした腸炎惹起性メモリーT 細胞と共培養したところ、 $IL-7^{+/+}MSC$ 群では腸炎惹起性メモリーT 細胞が 4 週間にわたり維持、分裂していた。 $IL-7^{+/+}MSC$ と共培養した腸炎惹起性メモリー $CD4^+T$ 細胞は $IL-7^{-/-}MSC$ と共培養した群に比して抗アポトーシス分子である Bcl-2 の発現が亢進していた。このような $IL-7^{+/+}MSC$ による *in vitro* での腸炎惹起性メモリーT 細胞維持機構は IL-7 中和抗体によってブロックされたため、IL-7 分泌を介する機構であることが分かった。

3-2、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。

3-3、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^{+/+} x RAG-1^{-/-}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⁺CD44⁺CD62L⁻IL-7R α ^{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⁺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。

D. E、考察と結論

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) Kano Y, Tsuchiya K, Zheng X, Horita N, Fukushima K, Hibiya S, Yamauchi Y, Nishimura T, Hinohara K, Gotoh N, Suzuki S, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M: The acquisition of malignant potential in colon cancer is regulated by the stabilization of Atonal homolog 1 protein. *Biochem Biophys Res Commun.* (Epub ahead of print), 2013.
- 2) Naganuma M, Nagahori M, Fujii T, Morio J, Saito E, Watanabe M: Poor recall of prior exposure to varicella zoster, rubella, measles, or mumps in patients with IBD. *Inflamm Bowel Dis.* 19:418-422, 2013.
- 3) Ueno F, Matsui T, Matsumoto T, Matsuoka K, Watanabe M, Hibi T, on behalf of the guideline project group of intractable Inflammatory Bowel Disease granted by the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan and the Guidelines Committee of the Japanese: Evidence-based clinical practice guidelines for Crohn's disease, integrated with formal consensus of experts in Japan. *J Gastroenterol.* 48(1):31-72, 2013
- 4) Ohyagi M, Ohkubo T, Yagi Y, Ishibashi S, Akiyama J, Nagahori M, Watanabe M, Yokota T, Mizusawa H: Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy in a patient with Crohn's disease. *Intern Med.* 52:125-128, 2013.
- 5) Araki A, Suzuki S, Tsuchiya K, Oshima S, Okada E, Watanabe M: Modified single-operator method for double-balloon endoscopy. *Dig Endosc.* 24(6):470-474, 2012
- 6) Araki A, Tsuchiya K, Oshima S, Okada E, Suzuki S, Morio-Akiyama J, Fujii T, Okamoto R, Watanabe M: Endoscopic ultrasound with double-balloon endoscopy for the diagnosis of inverted Meckel's diverticulum: a case report. *J Med Case Rep.* 6(1):328, 2012.
- 7) Fujita K, Naganuma M, Saito E, Suzuki S, Araki A, Negi M, Kawachi H, Watanabe M: Histologically confirmed IgG4-related small intestinal lesions diagnosed via double balloon enteroscopy. *Dig Dis Sci.* 57(12):3303-3308, 2012.
- 8) 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.* 18: 1480- 1487, 2012.
- 9) Kuwahara E, Asakura K, Nishiwaki Y, Inoue N, Watanabe M, Hibi T, Takebayashi T: Effects of family history on inflammatory bowel disease characteristics in Japanese patients. *J Gastroenterol.* 47:961-968, 2012.

- 10) Mizutani T, Nakamura T, Morikawa R, Fukuda M, Mochizuki W, Yamauchi Y, Nozaki K, Yui S, Nemoto Y, Nagaishi T, Okamoto R, Tsuchiya K, Watanabe M: Real-time analysis of P-glycoprotein-mediated drug transport across primary intestinal epithelium three-dimensionally cultured in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* . 419:238-243, 2012.
- 11) Naganuma M, Fujii T, Kunisaki R, Yoshimura N, Takazoe M, Takeuchi Y, Saito E, Nagahori M, Asakura K, Takebayashi T, Watanabe M: Incidence and characteristics of the 2009 influenza (H1N1) infections in inflammatory bowel disease patients. *J Crohns Colitis*. (Epub ahead of print), 2012.
- 12) Naganuma M, Kunisaki R, Yoshimura N, Takeuchi Y, Watanabe M: A prospective analysis of the incidence and risk factors for opportunistic infections in patients with inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol*. (Epub ahead of print) ,2012.
- 13) Nemoto Y, Kanai T, Takahara M, Oshima S, Nakamura T, Okamoto R, Tsuchiya K, Watanabe M: Bone marrow-mesenchymal stem cells are a major source of interleukin-7 and sustain colitis by forming the niche for colitogenic CD4+ memory T cells. *Gut*. (Epub ahead of print) 2012.
- 14) Okada E, Araki A, Suzuki S, Watanabe H, Ikeda T, Watanabe T, Kurata M, Eishi M, Watanabe M: Histological diagnosis of follicular lymphoma by biopsy of small intestinal normal mucosa. *Dig Endosc*. (Epub ahead of print) 2012.
- 15) Ono Y, Kanai T, Sujino T, Nemoto Y, Kanai Y, Mikami Y, Hayashi A, Matsumoto A, Takaishi H, Ogata H, Matsuoka K, Hisamatsu T, Watanabe M, Hibi T: T-helper 17 and interleukin-17-producing lymphoid tissue inducer-like cells make different contributions to colitis in mice . *Gastroenterology*. 143(5):1288-1297, 2012
- 16) Watanabe M, Hanai H, Nishino H, Yokoyama T, Terada T, Suzuki Y: Comparison of QD and TID oral mesalazine for maintenance of remission in quiescent ulcerative colitis: a double-blind, double-dummy, randomized multicenter study. (in press) *Inflamm Bowel Dis*. 2012
- 17) Watanabe M, Hibi T, Lomax KG, Paulson SK, Chao J, Alam SS, Camez A: Adalimumab for the Induction and Maintenance of Clinical Remission in Japanese Patients With Crohn's Disease. *J Crohns Colitis*. 6:160-173, 2012.
- 18) 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: 17- 24, 2012.
- 19) Watanabe T, Sasaki I, Sugita A, Fukushima K, Futami K, Hibi T, Watanabe M: Time trend and risk factors for reoperation in Crohn's disease in Japan. *Hepatogastroenterology*. 59: 1081- 1086, 2012.
- 20) Yui S, Nakamura T, Sato T, Nemoto Y, Mizutani T, Zheng X, Ichinose S, Nagaishi T, Okamoto R, Tsuchiya K, Clevers H, Watanabe M: Functional engraftment of colon epithelium expanded in vitro from a single adult Lgr5+ stem cell. *Nat Med*. 18:618-623, 2012.
- 21) 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+ T cells is regulated by IL-7 in collaboration with NK cell function in a murine model of colitis. *J Immunol*. 188(6):2524-2536, 2012.

学会発表

- 1) Kano Y, Tsuchiya K, Watanabe M: The acquirement of cancer stemness in colon cancer by the Atoh1 protein stabilization. 第71回日本癌学会学術総会. Sapporo, 2012年9月20日
- 2) Tsuchiya K, Kano Y, Watanabe M: The stabilization of Atoh1 protein in colitic cancer induces cancer stemness and chemoresistance. 第71回日本癌学会学術総会. Sapporo, 2012年9月19日
- 3) Kano Y, Tsuchiya K, Watanabe M: New classification based on Atoh1 expression in colon cancer might be useful as Biomarker. 第10回日本臨床腫瘍学会. Osaka, 2012年7月27日
- 4) Watanabe M: Adult Stem Cell Therapy for Gastrointestinal Diseases. International Ulcer Week 2012. Tokyo, 2012年7月12日
- 5) Kano Y, Tsuchiya K, Horita N, Zheng X, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M: The acquisition of cancer stemness in colon cancer by the Atoh1 protein stabilization. ISSCR2012. Yokohama, 2012年6月14日
- 6) Yui S, Nakamura T, Nemoto Y, Mizutani T, Fukuda M, Nozaki K, Yamauchi Y, Mochiduki W, Zheng X, Nagaishi T, Okamoto R, Tsuchiya K, Watanabe M: Regeneration of damaged colon epithelium by transplanted colon Lgr5+ stem cells maintained and expanded in vitro. 第10回幹細胞シンポジウム. 淡路島, 2012年6月1日
- 7) Tsuchiya K, Kano Y, Mizutani T, Yui S, Nakamura T, Watanabe M: The stabilization of Atoh1 protein in colon cancer acquires cancer stemness and chemoresistance. 第10回幹細胞シンポジウム. 淡路島, 2012年6月1日
- 8) Watanabe M: Stem Cells. DDW. San Diego, 2012年5月22日
- 9) Nemoto Y, Kanai T, Okamoto R, Tsuchiya K, Nakamura T, Matsumoto S, Watanabe M: Colitogenic effector memory CD4+ T cells develop TH1/TH17 mediated interstitial pneumonia independent to intestinal bacterial antigens. AGA. San Diego, 2012年5月22日
- 10) Tsuchiya K, Zheng X, Kano Y, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M: Flagellin response via TLR5 on basolateral membrane of primary intestinal epithelial cells is regulated by Notch signaling. DDW2012. San Diego, 2012年5月22日
- 11) Nemoto Y, Kanai T, Matsumoto T, Watanabe M: Colitogenic effector memory CD4+ T cells develop Th1/Th17 mediated interstitial pneumonia independent to intestinal bacterial antigens. DDW2012. San Diego, 2012年5月22日
- 12) Mizutani T, Nakamura T, Morikawa R, Fukuda M, Mochizuki W, Yamauchi Y, Nozaki K, Yui S, Okamoto R, Tsuchiya K, Watanabe M: Real-time analysis of p-glycoprotein-mediated drug transport across primary intestinal epithelial cells three-dimensionally cultured in vitro. DDW2012. San Diego, 2012年5月21日
- 13) Okamoto R, Murano T, Shimizu H, Ito G, Tsuchiya K, Nakamura T, Watanabe M: Notch signaling regulates expression of Gelsolin superfamily genes, Gelsolin and Scinderin, and promotes re-assembly of actin cytoskelton in human intestinal epithelial cells. DDW2012. San Diego, 2012年5月21日
- 14) Kano Y, Tsuchiya K, Horita N, Zheng X, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M: The acquisition of cancer stemness in colon cancer by the Atoh1 protein stabilization. DDW2012. San Diego, 2012年5月19日
- 15) Fujii T, Naganuma M, Saito E, Nagahori M, Watanabe M: Intravenous tacrolimus therapy

- can rapidly induce remission in refractory ulcerative colitis. DDW2012. San Diego, 2012年5月19日
- 16) Murano T, Okamoto R, Shimizu H, Ito G, Tsuchiya K, Nakamura T, Watanabe M: Hes1 promotes IL-22-Mediated epithelial regeneration through enhancement of STAT3-Dependent transcription in human intestinal epithelial cells. AGA. San Diego, 2012年5月19日
- 17) 渡辺 守: IBD 診療の進歩と近未来像-治る時代へ- 第11回市民公開講座プログラム 炎症性腸疾患の治療をめぐる. 名古屋, 2012年12月16日
- 18) 油井史郎、中村哲也、渡辺 守: マウスおよびヒトの正常な腸管上皮初代培養法の確立. 第3回 Japan Gut Forum. 東京, 2012年11月24日
- 19) 渡辺 守: 腸管幹細胞を用いた消化管上皮再生. 第14回北関東・甲信越「GUT フォーラム」. 東京, 2012年11月24日
- 20) 渡辺 守: 腸管幹細胞を用いた消化管上皮再生. 第50回小腸研究会. 京都, 2012年11月10日
- 21) 渡辺 守: ~はじめに~治療における医師と患者のギャップ調査. JDDW2012. 神戸, 2012年10月13日
- 22) 渡辺 守: 「消化器疾患治療の最新のトピックス」大腸: 炎症性腸疾患-最近の進歩-. JDDW2012. 神戸, 2012年10月13日
- 23) 藤井俊光、長堀正和、渡辺 守: クロウン病小腸大腸病変の評価および再燃予測におけるMRエンテロコロノグラフィー (MREC) の有用性. JDDW2012. 神戸, 2012年10月12日
- 24) 渡辺 守: 消化器病学会特別企画 1: 日本消化器病学会ガイドライン (大腸ポリープ、機能性消化管障害、NAFLD/NASH) 中間報告. JDDW2012. 神戸, 2012年10月12日
- 25) 加納嘉人、土屋輝一郎、渡辺 守: 新たな「分化度」スケーリングを用いた大腸癌形質制御と個別化医療への可能性. JDDW2012. 神戸, 2012年10月11日
- 26) 渡辺 守: Go beyond usual standard care in Crohn's disease management. JDDW2012. 神戸, 2012年10月11日
- 27) 渡辺 守: IBD 治療において免疫調節薬を実際はどう使うか. JDDW2012. 神戸, 2012年10月11日
- 28) 渡辺 守: 新しい消化管再生医療-難病克服に向けて-. 医科学術研究会. 千葉, 2012年10月4日
- 29) 土屋輝一郎、加納嘉人、中村哲也、渡辺 守: 大腸における幹細胞維持とがん幹細胞発現機構. 第44回日本臨床分子形態学会総会・学術集会. 高知, 2012年9月28日
- 30) 渡辺 守: 腸管幹細胞を用いた消化管上皮再生. 平成24年度第1回クリニカルサミット. 東京, 2012年9月28日
- 31) 渡辺 守: 炎症性腸疾患における内視鏡を考え直す. OMC Gastroenterology & Hepatology Research Group カンファレンス. 大阪, 2012年9月27日
- 32) 渡辺 守: 大腸上皮幹細胞-培養系の確立と移植への応用-. がん若手研究者ワークショップ. 蓼科, 2012年9月6日
- 33) 藤井俊光、齊藤詠子、長堀正和、長沼 誠、大塚和朗、渡辺 守: MR enterocolonography (MREC) の実際とクローン病小腸大腸病変の評価における有用性. 第30回日本大腸検査学会総会. 東京, 2012年9月1日
- 34) 長堀正和、藤井俊光、齊藤詠子、渡辺 守、大塚和朗: クロウン病診療における当院でのMREC (MR enterocolonography) の試み-モニタリングとしての有用性. 第30回日本大腸検査学会総会. 東京, 2012年9月1日
- 35) 加納嘉人、土屋輝一郎、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制御とバイオマーカーとしての可能性. 第10回日本臨床腫瘍学会学術集会. 大阪, 2012年7月27日
- 36) 根本泰宏、金井隆典、渡辺 守: 炎症性腸疾患難治性の要因としての腸炎惹起性メモリーCD4+T細胞