

- 胞維持機構の解析. 第 49 回 日本消化器免疫学会総会. 鹿児島, 2012 年 7 月 6 日
- 37) 永石宇司、山地 統、戸塚輝治、鬼澤道夫、柘植直人、鈴木雅博、金井隆典、渡辺 守: 慢性大腸炎モデルにおける腸炎惹起性 T 細胞の増殖は IL-7 と NK 細胞により制御される. 第 49 回 日本消化器免疫学会総会. 鹿児島, 2012 年 7 月 6 日
- 38) 渡辺 守: 新しい時代に入った IBD~考えておくべきこと~. 名古屋 IBD セミナー. 名古屋, 2012 年 6 月 29 日
- 39) 長堀正和、藤井俊光、齊藤詠子、森尾純子、長沼誠、渡辺 守: 炎症性腸疾患患者における抗 TNF α 受容体拮抗薬の選択に関する研究. 第 98 回 日本消化器病学会総会. 東京, 2012 年 4 月 21 日
- 40) 藤井俊光、齊藤詠子、森尾純子、長堀正和、長沼誠、渡辺 守: 難治性潰瘍性大腸炎に対する Tacrolimus 静注療法の有用性と安全性の検討. 第 98 回 日本消化器病学会総会. 東京, 2012 年 4 月 21 日
- 41) 水谷知裕、中村哲也、渡辺 守: 正常小腸上皮培養細胞を用いた MDRI 依存性薬剤排出機構の解析. 第 98 回 日本消化器病学会総会. 東京, 2012 年 4 月 20 日
- 42) 渡辺 守: 日本消化器病学会大腸ポリープ診療ガイドラインを目指して. 第 98 回 日本消化器病学会総会. 東京, 2012 年 4 月 20 日
- 43) 本谷 聡、渡辺 守、日比紀文: 日本人クローン病患者に対するアダリムマブ長期継続投与による 3 年間の寛解維持効果. 第 98 回 日本消化器病学会総会. 東京, 2012 年 4 月 19 日
- 44) 藤井俊光、長沼 誠、渡辺 守: 抗体製剤使用炎症性腸疾患患者における血中濃度測定と中和抗体測定の意義. 第 98 回 日本消化器病学会総会. 東京, 2012 年 4 月 19 日
- 45) 中村哲也、渡辺 守: 単一幹細胞からの大腸上皮大量培養と細胞移植による大腸上皮再生. 第 98 回 日本消化器病学会総会. 東京, 2012 年 4 月 19 日
- H. 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

潰瘍性大腸炎における末梢血および大腸粘膜内 NKG2A+ T 細胞の減少

研究協力者 桂田 武彦 北海道大学大学院医学研究科内科学講座消化器内科学分野 助教

研究要旨：潰瘍性大腸炎患者および DSS 腸炎マウスにおいて末梢血および大腸粘膜内 NKG2A+ T 細胞の検討を行い、①DSS 腸炎マウスで末梢血 T 細胞中の NKG2A+細胞の割合が減少し、大腸粘膜固有層 T 細胞中の NKG2A+細胞の割合が増加していること、②潰瘍性大腸炎患者において末梢血 T 細胞、大腸粘膜固有層 T 細胞中の NKG2A+細胞の割合が減少していることが示され、NKG2A+ T 細胞の減少が UC の病因のひとつである可能性が示唆された。本細胞の抑制機能については更なる検討を加える必要があるが、UC、CD を鑑別する新しい診断マーカーとして、UC に対する新しい治療法として、臨床応用の発展に期待したい。

A. 研究目的

NK 細胞は自然免疫の主要因子として働く細胞傷害性リンパ球の一種でサイトカインやケモカインを産生し細胞傷害機能を持つ。NK 細胞の自己寛容性は MHC クラス I 分子と抑制性 NK レセプター (inhibitory natural killer receptors、以下 iNKR) の結合で誘導されるが、iNKR は一部の T 細胞にも発現しており、T 細胞上に発現した iNKR は T 細胞の細胞傷害活性や免疫反応を調整していると考えられている。IBD の病態と iNKR 発現 T 細胞の関連を検討した報告はなく、本研究では、iNKR の 1 つである NKG2A 発現 T 細胞に関して、Dextran sulfate sodium (以下 DSS) 腸炎マウス及び UC 患者の末梢血、腸管内単核球を用いた解析を行った。

B. 研究方法

8~10 週齢のオスの Balb/C マウスに、3~5% の DSS 水溶液を自由飲水させ DSS 腸炎マウスを作成した。末梢血単核球および大腸粘膜固有層内単核球を採取し NKG2A+ T 細胞についてフローサイトメトリーで検討した。また、NKG2A が腸炎抑制に働いているか確認するため、抗 NKG2A 抗体を腹腔内投与し腸管の組織学的検討を行った。一方ヒトでは UC 患者、CD 患者、および健康ボランティアより末梢血を採取しフローサイトメトリーで検討した。また、UC、CD の手術検体、正常腸管組織として大腸癌患者の手術検体の正常部分を用い

免疫染色による検討を行った。

(倫理面への配慮)

全ての研究は北海道大学大学院医学研究科の倫理規定に則り、また全例より研究についての文書による説明と同意を得た。全ての動物実験は北海道大学大学院の実験動物の使用および飼育の指針に則って行われた。

C. 研究結果

DSS 腸炎マウスでは、末梢血中の NKG2A+ T 細胞は減少し、反対に腸管では増加していた。また、抗 NKG2A 抗体でブロッキングした DSS 腸炎マウスは腸管の炎症巣が増加した。ヒトでの検討では、UC 患者では CD 患者や健康ボランティアに比べて末梢血中のみならず、腸管でも NKG2A+ T 細胞が減少していた。UC 患者におけるこの細胞減少は UC の疾患活動性や治療、病型、大腸切除の有無などで差がなかった。

D. 考察

NKG2A+ T 細胞は、TCR 刺激の閾値の上昇、サイトカイン産生の抑制、細胞傷害活性の減弱により T 細胞の免疫反応を調整すると考えられている。本研究で DSS 腸炎マウスでは炎症期で腸管内 NKG2A+ T 細胞の割合は増加し、炎症改善後には正常近くまで減少するという腸管局所で顕著な変化を示していたこと、また、DSS 腸炎マウスに抗 NKG2A 抗体を投与することで腸管粘膜の炎症巣が増加する傾向が認められたことから、NKG2A+

T細胞は腸管の炎症部位に集積し、炎症を抑制している可能性が示唆された。ヒトでは過去の報告から NKG2A+ T細胞が低下することが炎症過剰状態の要因の1つであると推定される。本研究での興味深い点は、UC患者ではNKG2A+ T細胞が末梢血のみならず炎症局所の腸管粘膜固有層でも減少していたことである。これはDSS腸炎マウスでNKG2A+ T細胞が炎症期に腸管に集積していた現象と相反している。これらの結果からNKG2A+ T細胞は過剰な炎症反応を抑制する作用を有しており、UC患者ではNKG2A+ T細胞が減少しているために適切な免疫応答の調節が行えず、慢性・持続性の腸炎を発症している可能性が考えられた。

E. 結論

DSS腸炎マウスでは炎症期に末梢血中のNKG2A+ T細胞の割合が減少し大腸粘膜固有層中のNKG2A+ T細胞の割合が増加していること、NKG2A+ T細胞は腸炎の炎症抑制作用を有すると推定されること、UC患者では末梢血、大腸粘膜固有層両方のNKG2A+ T細胞の割合が減少していることが示された。NKG2A+ T細胞の炎症抑制機能について検討を深め、更にNKG2A+ T細胞を量的・質的にコントロールすることができれば、新たな治療戦略につながる可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Takehiko Katsurada, Waka Kobayashi, Utano Tomaru, Tomohisa Baba, Shigeru Furukawa, Akihiro Ishizu, Kazuyoshi Takeda, Naoya Sakamoto, Masahiro Asaka, Hiroshi Takeda, Masanori Kasahara. Decrease of Peripheral and Intestinal NKG2A-Positive T Cells in Patients with Ulcerative Colitis. PLOS ONE 7(9): e44113, 2012.

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

胃型形質発現（MUC5AC）と疾患活動性との関連

-Tacrolimusを導入した中等症・重症潰瘍性大腸炎症例での検討-

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：IBDの疾患活動性の把握に有用な因子は、CRP以外にない。潰瘍性大腸炎において疾患活動性と関連性が報告されている胃の粘液形質 MUC5AC に着目した。治療開始前と治療経過中での罹患大腸粘膜部の MUC5AC 発現を検討した。治療前・3ヶ月後で検討できた18例では、MUC5AC 発現の減少は、内視鏡的粘膜所見の改善と相関した。潰瘍性大腸炎罹患部位大腸粘膜上皮での MUC5AC 発現は、潰瘍性大腸炎の疾患活動性の指標として有用であると考えられる。

共同研究者

溝下 勤、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）

A. 研究目的

炎症性腸疾患（IBD）の治療は、近年様々な新規治療薬の登場により疾患治癒が目指せるようになった。これら新規薬剤を適切に使用するため IBD の疾患活動性を把握する因子の検討が重要であるが、CRP 以外に有用なものはない。潰瘍性大腸炎において疾患活動性と関連性が報告されている胃粘液形質 MUC5AC に着目した。治療開始前と治療経過中での罹患大腸粘膜部の MUC5AC 発現と疾患活動性の関連性を明らかにしようとした。

B. 研究方法

当院で Tacrolimus 治療を行った中等症・重症潰瘍性大腸炎患者 26 名中、治療前・治療 3 ヶ月後で生検が得られた 18 名において MUC5AC の発現を免疫組織化学的に検討した。

（倫理面への配慮）

本件等における個人情報、情報管理者（実験責任者溝下 勤）によって厳重な管理のもと、守秘義務を厳守した。解析・検討結果を公表するにあたり、個人名の漏洩の防止を徹底し、プライバシーの保護に努めた。なお、試料の保管には、患者を特定できる情報を削除し、番号を割り振って管理した。

C. 研究結果

治療前・3ヶ月後で検討できた18例では、MUC5AC 発現の減少は、内視鏡的粘膜所見の改善と相関した（Fischer exact probability; $p=0.043$ ）。

D. 考察

MUC5AC は、正常大腸上皮に発現は観察されない。今回 MUC5AC 発現の減少が内視鏡的著明改善および寛解症例に有意に多くの症例に見られたことは、これまでに報告されている IBD において、傷害粘膜の修復時に出現し、修復過程に関与している結果と一致していると考えられる。

E. 結論

潰瘍性大腸炎罹患部位大腸粘膜上皮での MUC5AC 異所性発現は、潰瘍性大腸炎の疾患活動性の指標として有用であると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Ozeki K, Tanida S, Mizoshita T, Tsukamoto H, Ebi M, Mori Y, Kataoka H, Kamiya T, Joh T.

Combination Therapy with Intensive Granulocyte and Monocyte Adsorptive Apheresis plus Adalimumab: Therapeutic Outcomes in 5 Cases with Refractory Crohn's Disease. Case Rep Gastroenterol;6:765-771, 2012.

- 2) Mizoshita T, Tanida S, Kusumoto S, Kataoka H, Kamiya T, Joh T. Adalimumab therapy following granulocyte and monocyte adsorptive apheresis in a patient with Crohn's disease accompanied by chronic myeloid leukemia. Clin J Gastroenterol ;5:302-306, 2012.
- 3) Ozeki K, Tanida S, Mizushima T, Mizoshita T, Tsukamoto H, Hirata Y, Murakami K, Shimura T, Kataoka H, Kamiya T, Joh T. Combination therapy with adalimumab plus intensive granulocyte and monocyte adsorptive apheresis induced clinical remission in a Crohn's disease patient with the loss of response to scheduled adalimumab maintenance therapy: a case report. Intern Med. ;51(6):595-599, 2012.

2. 学会発表

- 1) 溝下 勤、谷田諭史、塚本宏延、尾関啓司、水島隆史、城 卓志、Biologic naïve Crohn's disease に対する adalimumab 治療 -名古屋市立大学病院での検討-第8回日本消化管学会総会学術集会、仙台、2012. 2. 10
- 2) 尾関啓司、谷田諭史、溝下 勤、塚本宏延、城 卓志 アダリムマブ 2 次無効クローン病に対して再寛解導入療法+ intensive GMA 併用療法が有効であった一例. 第8回消化管学会総会、仙台 2012. 2. 11
- 3) 溝下 勤、谷田諭史、尾関啓司、塚本宏延、城 卓志 Tacrolimus・顆粒球単球吸着 (GMA) 併用療法による中等症・重症潰瘍性大腸炎症例への寛解導入の試み -当院での検討-、第20回 日本消化器関連学会週間 横浜 2012. 10. 11

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得
特願 2012-247963 炎症性疾患治療薬のスクリーニング方法、並びに炎症性疾患の治療及び検査 出願日 2012. 11. 11
2. 実用新案登録
なし。
3. その他
なし。

CAP 治療効果予測因子としての温感の意義とメカニズムについての研究

研究協力者 飯塚 政弘 秋田赤十字病院附属あきた健康管理センター 所長

研究要旨：潰瘍性大腸炎(UC)難治例を対象に、血球成分除去療法(CAP)治療効果予測因子として温感の有用性について検討した。その結果、CAP 施行中に温感が認められた場合の寛解率は 86.4%で温感が認められない場合の寛解率(44.4%)に比べて有意に高値で($p<0.01$)、CAP 施行時の温感の有無は CAP 治療効果予測因子として有用と考えられた。CAP 有効例では CAP 施行後皮膚温とともに皮膚灌流圧が上昇しており、温感・皮膚温の上昇に局所の血流量の増加が関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

潰瘍性大腸炎(UC)難治例に対する血球成分除去療法(CAP)の有用性が評価されているが、治療効果予測因子については十分な検討はされていない。昨年に続き、UCにおけるCAP治療効果予測因子として温感の有用性およびそのメカニズムについて検討した。

B. 研究方法

2002年6月～2012年12月にCAP治療を施行したUC難治例(42例, 70回)のうち34例(55回)においてCAP施行時の温感(手、足、腹部など)の有無による寛解率を検討した。また、15は赤外線体温計で皮膚温を測定、4例はレーザー血流計(SensiLase(TM) PAD3000, カネカメディックス)で足背部の皮膚灌流圧を測定した。

(倫理面への配慮)

皮膚温、皮膚灌流圧の測定はインフォームドコンセントの下に行った。

C. 研究結果

①CAP施行中、手、腹部、足などに温感が認められた症例の寛解率は86.4%で、温感が認められなかった症例の寛解率(44.4%)に比べて有意に高値を示した($p<0.01$)。

②CAP有効例ではCAP開始後30分、終了時の手掌皮膚温はCAP開始前に比べて有意に上昇が認められ($p<0.0001$, $p=0.0107$)、足底皮膚温も同様の傾向を示した($p<0.001$, $p=0.015$)。

③足背皮膚灌流圧は、CAP施行前(64.4mmHg)に比べCAP開始後上昇を示し、特に終了時に顕著な上昇(76.8mmHg)を示した。

D. 考察

CAP施行時に温感を認めた症例のCAP治療効果は、

温感を認めなかった症例に比べて有意に優れており、実際に皮膚温の上昇も確認された。皮膚灌流圧は糖尿病や末梢血管障害患者の微小循環の指標に用いられており、今回CAP治療時の皮膚血流量の評価も皮膚灌流圧で行った。CAP施行後皮膚灌流圧が上昇を示したことより、CAP施行時の温感や皮膚温上昇が生じる機序として局所の血流量増加が関与している可能性が示唆された。

E. 結論

CAP施行時の温感の有無は治療効果予測因子として有用と考えられた。温感・皮膚温の上昇が生じる機序として局所の血流量増加が関与してい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

なし。

2. 学会発表

飯塚政弘、相良志穂、衛藤 武、堀江泰夫、潰瘍性大腸炎に対するCAP治療効果予測因子とLong-Interval CAPの治療効果に関する検討。

第98回日本消化器病学会総会、東京、平成24年4月21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

なし。

炎症性腸疾患における免疫寛容関連 E3 ユビキチン・リガーゼ GRAIL の関与

研究協力者 飯島 英樹 大阪大学消化器内科 講師

研究要旨：炎症性腸疾患の発症・増悪に免疫寛容の破綻の関与が報告されている。GRAIL は T 細胞アナジの誘導に必須の E3 ユビキチン・リガーゼであるが、クローン病末梢血において GRAIL mRNA および蛋白発現が低下していた。一方、腸管局所において GRAIL 蛋白発現は逆に増加していた。マウス腸炎モデルの解析によりマイクロ RNA が腸管での GRAIL 発現制御に関わっていることが明らかとなった。

A. 研究目的

腸管免疫系の恒常性の維持には免疫寛容が重要な役割を果たしている。GRAIL (Gene Related to Anergy In Lymphocyte) は、CD4 陽性 T 細胞の不応答化に必須の因子として同定されたユビキチン E3 リガーゼである。これまで、種々の自己免疫性疾患との関与が報告されているが、炎症性腸疾患との関与は未だ明らかでない。そこで、クローン病における GRAIL 発現とその役割を明らかにすることを目的として本研究を行った。

B. 研究方法

当院通院中のクローン病患者の末梢血、及び腸管手術標本での GRAIL mRNA および蛋白発現を評価した。慢性腸炎モデルマウスとして、IL-10 ノックアウトマウス、DSS 腸炎マウスを用いて同様の検討を行った。miRNA microarray によりマウス腸炎における GRAIL 制御 miRNA を解析した。

(倫理面への配慮)

ヒト検体の採取については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

クローン病及び、慢性腸炎モデルマウスでは、末梢血 CD4 陽性 T 細胞において非腸炎群と比して GRAIL mRNA および蛋白発現の低下を認めた。一方、腸炎を発症した粘膜固有層においては GRAIL 蛋白発現の増加を認め

た。miRNA microarray により GRAIL を制御する miR290-5p を同定したが、健常マウス腸管局所にて高発現しており、炎症腸管での発現は低下していた。miR290 の precursor と GRAIL の 3' -UTR を組み込んだコンストラクトによるレポーターアッセイでは、miR290 によるルシフェラーゼ活性の低下が確認された。

D. 考察

クローン病の末梢血 CD4 陽性 T 細胞において GRAIL 発現の低下を認め、免疫寛容が破綻していることが示唆された。健常腸管の GRAIL 蛋白発現は miRNA により抑制されているが、腸管の炎症局所では miRNA による GRAIL 発現抑制が解除されていると考えられた。

E. 結論

クローン病において全身免疫系の免疫寛容が破綻しているが、腸管局所では逆に免疫寛容の維持機構が存在す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. Shinzaki S, Iijima H, Fujii H, Kuroki E, Tatsunaka N, Inoue T, et al. Altered Oligosaccharide Structures Reduce Colitis

- Induction in Mice Defective in beta-1,4-Galactosyltransferase. *Gastroenterology* 11;142(5):1172-82, 2012.
2. Shinzaki S, Kuroki E, Iijima H, Tatsunaka N, Ishii M, Fujii H, et al. Lectin-based immunoassay for aberrant IgG glycosylation as the biomarker for Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. In press.
 3. Serada S, Fujimoto M, Terabe F, Iijima H, Shinzaki S, Matsuzaki S, et al. Serum leucine-rich alpha-2 glycoprotein is a disease activity biomarker in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 18(11):2169-79, 2012.
 4. Kurashima Y, Amiya T, Nochi T, Fujisawa K, Haraguchi T, Iba H, Iijima H, et al. Extracellular ATP mediates mast cell-dependent intestinal inflammation through P2X7 purinoceptors. *Nat Commun* 3:1034, 2012.
- ESD study group. *Gut*. 2012 Aug 21.
5. Iwatani H, Inoue T, Wada Y, Nagasawa Y, Yamamoto R, Iijima H, et al. Quantitative change of IgA hinge O-glycan composition is a novel marker of therapeutic responses of IgA nephropathy. *Biochem Biophys Res Commun* 23;428(3):339-42, 2012.
 6. Inoue T, Iijima H, Tajiri M, Shinzaki S, Shiraishi E, Hiyama S, et al. Deficiency of N-acetylgalactosamine in O-linked oligosaccharides of IgA is a novel biologic marker for Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 18(9):1723-34, 2012.
 7. Iijima H, Shinzaki S, Takehara T. The importance of vitamins D and K for the bone health and immune function in inflammatory bowel disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 15(6):635-40, 2012.
2. 学会発表
1. Shinzaki S, Iijima H, Tatsunaka N, Kobayashi T, Inoue T, Tsujii M, et al. Lectin-Based Immunoassay for Aberrant IgG Glycosylation As the Biomarker for Crohn's Disease. *Digestive Disease Week 2012, San Diego, 2012* 2012/5/21.
 2. Ishii M, Shinzaki S, Fujii H, Tatsunaka N, Kamada Y, Iijima H, et al. Overexpression of N-Acetylglucosaminyltransferase V (GnT-V) Exacerbates Murine Colitis With Dysfunction of Macrophages. *Digestive Disease Week 2012, San Diego, 2012/5/21*.
 3. Hiyama S, Iijima H, Shinzaki S, Mukai A, Nakajima S, Inoue T, et al. Narrow Band Imaging With Magnifying Endoscopy for Peyer's Patches in Patients With Inflammatory Bowel Disease. *Digestive Disease Week, San Diego, 2012/5/19*.
 4. Iijima H. The role of oligosaccharide alterations in immunoglobulins of inflammatory bowel diseases. 6th Korea-Japan IBD Symposium, Tokyo, 2012/1/28.
 5. Shinzaki S, Tatsunaka N, Fujii H, Ishii M, Yamada T, Nakajima S, Iijima H, et al. Regulation of Oligosaccharide-Associated Enzymes by TNF-Alpha in B Cells of Crohn's Disease. *Digestive Disease Week 2012, San Diego, 2012/5/22*.
 6. Mukai A, Iijima H, Shiraishi E, Hiyama S, Inoue T, Nakajima S, et al. Regulation of Anergy-Related E3 Ubiquitin Ligase GRAIL by Mir-290-5p in Inflammatory Bowel Diseases. *Digestive Disease Week 2012, San Diego, 2012/5/22*.
 7. Inoue T, Iijima H, Yamaguchi S, Egawa S, Arimoto Y, Tominaga K, et al. Efficacy of balloon dilation using double-balloon enteroscopy for small-bowel strictures in patients with symptomatic Crohn's disease. *UEGW; Amsterdam, Netherland, 2012/10/20-24*.
 8. Hiyama S, Iijima H, Shinzaki S, Mukai A, Inoue T, Kawai S, et al. ALTERNATION OF PEYER'S PATCH IN PATIENTS WITH INFLAMMATORY BOWEL DISEASE: OBSERVATION USING NARROW BAND IMAGING WITH MAGNIFYING ENDOSCOPY. *UEGW; Amsterdam, Netherland, 2012/10/20-24*.
 9. Inoue T, Iijima H, Takehara T. Efficacy of balloon dilation using double-balloon enteroscopy for small-bowel strictures in patients with

symptomatic Crohn's disease. ASIBD 2012, Seoul, Korea 2012/11/2-3.

10. 向井章, 飯島英樹, 竹原徹郎. マウス炎症性腸疾患モデルを用いた GRAIL 発現効果に対する検討. 第 98 回日本消化器病学会総会、東京、2012/04/19.

11. 井上隆弘, 飯島英樹, 山口真二郎, 柄川悟志, 有本雄貴, 富永恒平, 他. クロウン病小腸狭窄に対するバルーン拡張術の治療成績—多施設 (OGF) 共同研究一. 第 54 回日本消化器病学会大会、神戸、2012/10/10-12.

12. 須見遼子, 中島清一, 飯島英樹, 新崎信一郎, 中島佐知子, 水島恒和, 他. 炎症性腸疾患の栄養管理 栄養状態が infliximab の治療効果に及ぼす影響. 静脈経腸栄養学会、神戸、2012/10/22.

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

クローン病の腸内細菌叢プロファイル解析：多施設共同研究

— validation study —

研究分担者 藤山 佳秀 滋賀医科大学内科学講座消化器内科 教授

研究要旨：我々は、これまで炎症性腸疾患の腸内細菌叢プロファイルの解析を、tRFLP 法を用いて多施設共同研究を行い、クローン病便中細菌叢プロファイルは活動期・寛解期にかかわらず、健常人腸内細菌叢プロファイルとは異なることをクラスター解析にて明らかにしている。今回の検討では、これまでの解析とは地域性の異なる症例についての解析を行いその妥当性の検証を行った。また、ABI 3130x1 で得られる各制限酵素断片（OTU）について、活動性(CDAI)と強い相関を有する 10 断片を抽出し、腸内細菌叢プロファイルに基づくクローン病の活動性識別予測式をロジスティック回帰にて作成した（活動性識別率：75.8%）。

共同研究者

松本譽之（兵庫医科大学下部消化管科）

松井敏幸（福岡大筑紫病院消化器内科）

鈴木康夫（東邦大医療センター佐倉病院）

本谷 聡（札幌厚生病院 IBD センター）

安藤 朗（滋賀医大大学院消化器免疫分野）

CDAI と強い相関を示すピークを抽出し、ロジスティック回帰による活動性識別予測式を作成した。

（倫理面への配慮）

研究代表者施設の倫理審査委員会にて平成19年4月24日に承認を得ている。

A. 研究目的

クローン病腸内細菌叢の特異性について、これまで解析を行ってきた症例の地域性（関東・関西・九州）を考慮して、北海道地域の症例について解析し、これまで得られてきた知見の検証を行うことを目的とした。また、便中細菌叢プロファイルからクローン病の活動性を識別できるかについての検討も併せ行った。

B. 研究方法

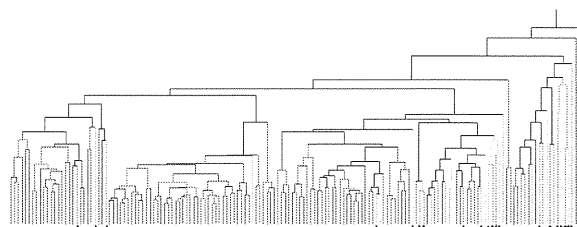
札幌厚生病院 IBD センターの活動期クローン病症例 21 例がエントリーされ、tRFLP による便中細菌叢プロファイルのクラスター解析を行った。また、同一症例の寛解導入時についても検討を行った。

クローン病活動期（CDAI \geq 150）67 検体、寛解導入期ならびに寛解維持期（CDAI $<$ 150）94 検体の ABI 3130x1 を用いた tRFLP 解析データについて、制限酵素 *MspI* および *HhaI* で得られる各 fragment の OTU 解析で、

C. 研究結果

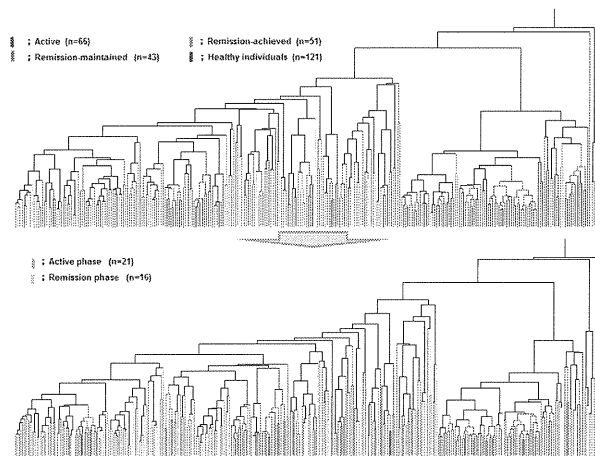
図 1 に、札幌厚生病院の解析結果を示した。健常対照は既報の通りの関東、関西、北九州地域の健常者データを用いた。図 2 は、既報の解析（ABI3101x1）結果に札幌厚生病院の結果を挿入したデンドログラムを示した。地域的背景を異にしたクローン病症例においても、便中細菌叢プロファイルは健常者と異なるクラスターに集簇することが示された。

図 1 tRFLP Dendrogram（札幌厚生病院）



図中、▲（上段）は活動期（21 例）、●（下段）は経過を追えた寛解期（16 例）症例で、無印は健常対照 121 例を示す。

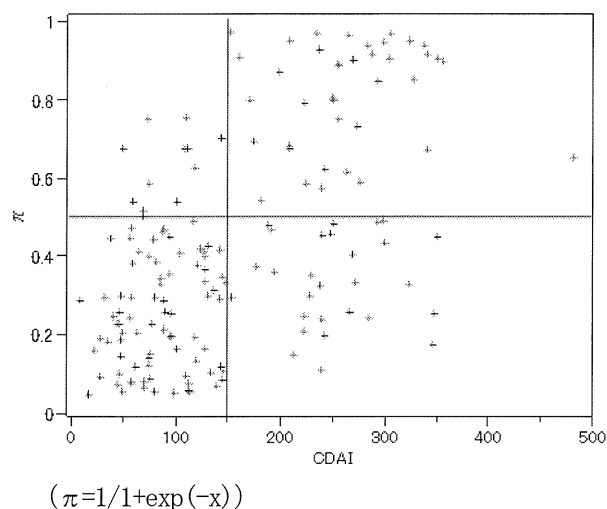
図2 tRFLP Dendrogram



次に、これまでに得られている tRFLP データ (ABI 310) から CDAI と強い相関を示す 10 個の OTUs を抽出した (*HhaI* fragments ; H101, H214, H392, H548, H810, *MspI* fragments ; M64, M456, M489, M499, M503, p 値 ; 0.0002~0.0259)。ロジスティック回帰にて以下の CDAI 予測式を得た。

$$\begin{aligned} x = & -3.9392 + 0.0701 \times H101 + 0.0664 \times H214 + 0.4678 \times H392 \\ & + 0.4648 \times H548 - 0.5136 \times H810 + 0.2739 \times M64 \\ & - 0.3959 \times M456 + 0.3373 \times M489 + 0.0568 \times M499 \\ & + 1.4219 \times M503 \end{aligned}$$

予測確立と観測データの一致割合 : 82.6%、識別率は 75.8%であった。



D. 考察

これまでの検討で、クローン病に特異的な便中細菌叢プロファイルが明らかとなったが、今後、クローン病識別 OTUs、クローン病活動性識別 OTUs 構成菌群に

についての検討が必要と考えられる。実際、本検討で明らかとなった *Clostridium* Cluster IV の主要構成菌である *Clostridium prausnitzii*

について RT-PCR で検討すると、健常人に比してクローン病では有意に 16S ribosomal RNA 量に対する相対比率が減少している (p=0.0004)。また、健常人の相対比率の下限を cut-off 値としてクローン病において相対比率の高値群と低地群に分けて検討すると、低値群では有意に CDAI (p=0.01)、CRP (p=0.002)、ESR (p=0.03) は高値を示し、アルブミン値 (p=0.001) は低値を示した。今後、これまで得られたデータを基にした検討を重ねたい。

E. 結論

これまでに多施設共同研究で得られたクローン病の便中細菌叢プロファイルの特異性について、地域的背景の異なる症例での検証的解析を行い、妥当性が示された。

クローン病の活動性指標としての便中細菌叢プロファイルの可能性について示した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fujimoto T, Imaeda H, Takahashi K, Kasumi E, Bamba S, Fujiyama Y, Andoh A. Decreased abundance of *Faecalibacterium prausnitzii* in the gut microbiota of Crohn's disease. *J Gastroenterol Hepatol*. 2012 Dec 6. [Epub ahead of print]
- 2) Andoh A, Kuzuoka H, Tsujikawa T, Nakamura S, Hirai F, Suzuki Y, Matsui T, Fujiyama Y, Matsumoto T. Multicenter analysis of fecal microbiota profiles in Japanese patients with Crohn's disease. *J Gastroenterol*. 47(12):1298-307. 2012
- 3) Aomatsu T, Imaeda H, Fujimoto T, Takahashi K, Yoden A, Tamai H, Fujiyama Y, Andoh A. Terminal

restriction fragment length polymorphism
analysis of the gut microbiota profiles of
pediatric patients with inflammatory bowel
disease. Digestion. 86(2):129-35. 2012

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

新規乳酸菌由来の活性物質による新規腸炎治療の開発

研究分担者 高後 裕 旭川医科大学内科学講座消化器・血液腫瘍制御内科学分野 教授

研究要旨：麦芽乳酸菌SBL88由来の活性物質ポリリン酸を用いた新規腸炎治療法を開発する目的で、本年度は(1)マウス慢性炎症モデルの腸管線維化に対するポリリン酸の治療効果，(2)上皮細胞によるポリリン酸の認識と作用メカニズムの解明，(3)腹部症状を有する症例に対する麦芽乳酸菌SBL88の安全性と治療効果、に関する研究を行った。その結果、(1)ポリリン酸は慢性腸炎におけるCTGF、コラーゲンIVなどの線維化促進分子の過剰発現を抑制し、肉眼的、組織学的な腸管障害および線維化を改善すること、(2)ポリリン酸は上皮細胞膜のintegrin $\beta 1$ と結合し、引き続いてlipid raftを介したendocytosisによって上皮細胞内に取り込まれ作用を発揮すること、(3)腹部症状のある症例に対して麦芽乳酸菌SBL88死菌を投与した結果、有害事象の発生はなく、腹痛や便秘異常の改善が認められた。以上から、ポリリン酸は、慢性腸炎モデルにおける腸管障害や線維化を改善し、その作用機序には上皮細胞膜のintegrin $\beta 1$ を介したendocytosisが関与していることが明らかとなった。また、ヒト臨床試験によって麦芽乳酸菌SBL88の安全性が確認され、腹部症状の改善効果が期待された。今後は、炎症性腸疾患患者を対象とした麦芽乳酸菌SB88および菌由来活性物質ポリリン酸を用いた治療効果の検討を行っていくことで、新規炎症性腸疾患治療の開発を目指す。

共同研究者

藤谷幹浩¹、上野伸展¹、稲場勇平¹、盛一健太郎¹、田邊裕貴¹、前本篤男^{2,3}、蘆田知史^{2,3}、高後 裕¹（旭川医科大学内科学講座消化器・血液腫瘍制御内科学分野¹、旭川医科大学消化管再生修復医学講座²、札幌東徳州会病院 IBD センター³）

A. 研究目的

プロバイオティクスは、感染性腸炎、抗生剤起因性腸炎、小児壊死性腸炎、炎症性腸疾患などへの治療応用が試みられているが、その効果は報告によって異なり一定の見解は得られていない。これは、個々のプロバイオティクスの腸管保護作用や抗炎症作用のメカニズムについて不明な点が多いため、各疾患の病態や個々の宿主の腸内環境に適したプロバイオティクスを選択することが困難であることに起因すると考えられる。

我々は、プロバイオティクスであるバシラス菌

の培養上清から腸管保護活性物質である、competence and sporulation factor (CSF)の同定に成功し、炎症性腸疾患に対する新規治療開発への応用を試みてきた。その成果として、急性腸炎モデルにおけるCSFの治療効果について明らかにしてきた(Fujiya, Kohgo, *Cell H&M*, 2007) (Fujiya, Kohgo, *IBD*, 2011) (Okamoto, Fujiya, Kohgo, *Int J Colorectal Dis*, 2012)。さらに、新規乳酸菌SB88にも強い腸管障害改善作用があることを明らかにし(Ueno, Fujiya, Kohgo, *IBD*, 2011)、その作用は本菌が分泌するポリリン酸 (poly P) によって仲介されることを示した(Segawa, Fujiya, Kohgo, *PLoS One*, 2011)。

本年度の研究目的は、(1)マウス慢性炎症モデルの腸管線維化に対するポリリン酸の治療効果，(2)上皮細胞によるポリリン酸の認識と作用メカニズムの解明，(3)腹部症状を有する症例に対する麦芽乳酸菌SBL88の安全性と治療効果を明らかにすることである。

B. 研究方法

1. マウス慢性炎症モデルの腸管線維化に対するポリリン酸(poly P)の治療効果

6週齢のC57Bl/6マウス(Sankyo Labo service Co, Japan)に3% DSSをday 1から5まで自由飲水させた後, day 6以降は蒸留水を自由飲水させ, 慢性腸炎モデルマウスを作成した。慢性腸炎モデルマウスを、①day 1より蒸留水のみを飲水させたcontrol群, ②day 25から34までの10日間連日PBSを注腸投与するPBS注腸群, ③day25から34までの10日間連日100 μ g/mlのpoly Pを注腸投与するpoly P注腸群の3群(各群n=5)に分け, day 35にマウス大腸を摘出後, 腸管粘膜を回収し, 一部をホルマリン固定後, 残りのサンプルからタンパク・RNAを抽出した。検討項目は腸管長, 組織学的所見, 炎症および線維化関連メディエーターの発現(TNF- α , IFN- γ , TGF β 1, IL-1 β , IL-4, IL-10, CTGF, Smad4)とした。

2. 上皮細胞によるポリリン酸の認識と作用メカニズムの解明

32 Pにてアイソトープ標識したpoly Pをintegrin β 1および β 3と反応させ, それぞれの抗体で免疫沈降し, アイソトープの測定を行い, poly Pとの結合能を調べた。

Caco2/bbe細胞に標識poly Pを添加し, poly Pの動態を調べた。Integrin β 1のshRNAをcaco2/bbe細胞に導入し, poly Pの動態の変化を調べた。また, Endocytosisの影響を調べる目的で, clathrinおよびcaveolinのinhibitorを用いて, poly Pの作用の変化を調べた。細胞のバリア機能については, トランスウエルに単層培養したcaco2/bbe細胞に 3 H標識マンニトール添加し, モノアミンによる酸化ストレスを加え60分, 120分, 180分後に透過した 3 H標識マンニトール量を計測して算出した。

3. 腹部症状を有する症例に対する麦芽乳酸菌SBL88の安全性と治療効果

何らかの腹部症状を持つ患者で本試験を理解され書面にて同意が得られた20人を無作為に2群に分け, 100 μ gの麦芽乳酸菌およびプラセボを

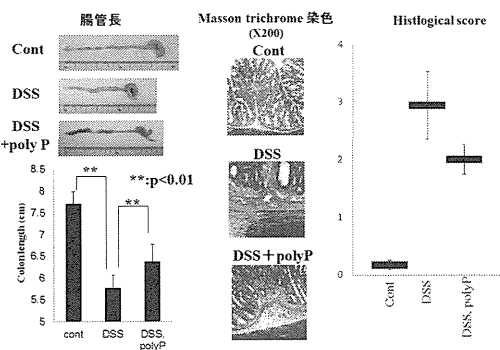
30日間投与して, 有害事象の発現および腹部症状の変化を調べた。

C. 研究結果

1. マウス慢性炎症モデルの腸管線維化に対するポリリン酸(poly P)の治療効果

慢性腸炎モデルにおいて, 腸管長は短縮していた。この腸管長の短縮は, ポリリン酸の投与によって有意に改善した(図1)。組織学的な炎症の程度および線維化の程度はpoly P投与群で有意に改善していた。

図1 慢性腸炎モデルにおける腸管短縮はpoly Pの注腸投与によって改善した。



また, DSS腸炎により過剰に発現していた炎症関連メディエーターのうち, IL-1 β , TNF α , IFN γ , pNF κ Bはpoly P投与によって抑制された(図2)。同様に過剰発現していた線維化関連メディエーターのうち, TGF- β 1, Smad4, CTGFの発現が抑制された(図3)。

図2 poly P投与により炎症関連メディエーターの発現が低下した。

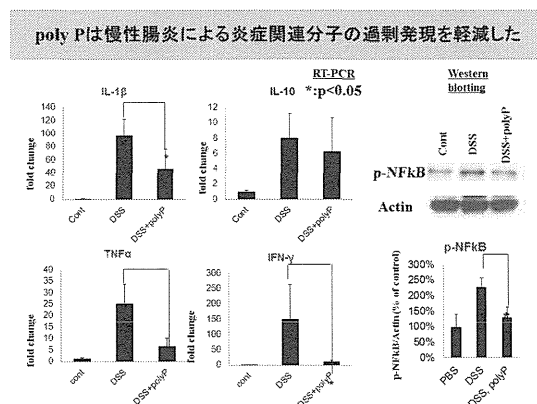
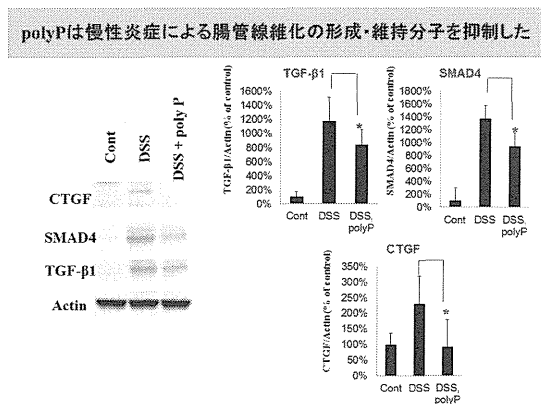


図3 poly P投与により線維化関連メディエーターの発現が低下した。



2. 上皮細胞によるポリリン酸の認識と作用メカニズムの解明

poly Pは integrin $\beta 1$ と結合するが $\beta 3$ とは結合しなかった (図 4)。標識 poly P は添加後 1 時間で caco2/bbe 細胞に取り込まれた、この取り込みは、integrin $\beta 1$ に対する shRNA で抑制された (図 5)。同様に、poly P による細胞バリア機能の増強作用は integrin $\beta 1$ に対する shRNA で減弱した (図 6)。

図4 poly Pはintegrin $\beta 1$ と結合する。

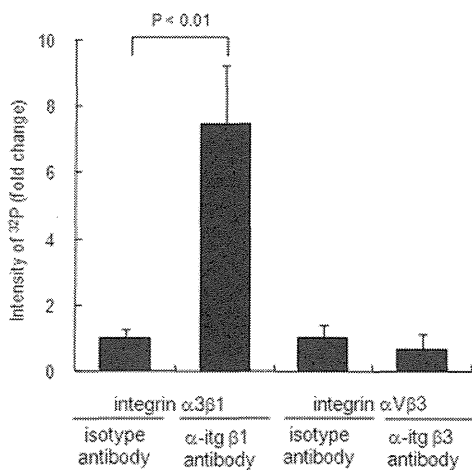


図5 poly Pはintegrin $\beta 1$ と結合する。

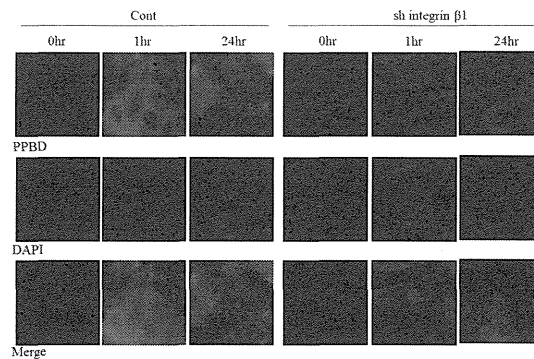
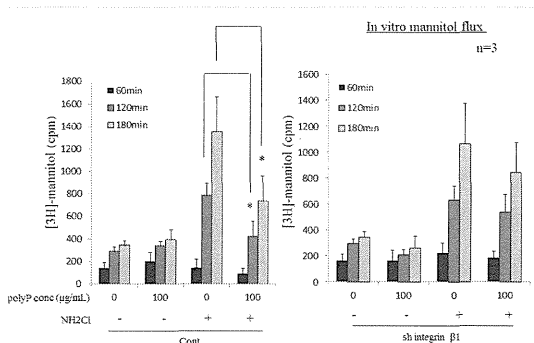
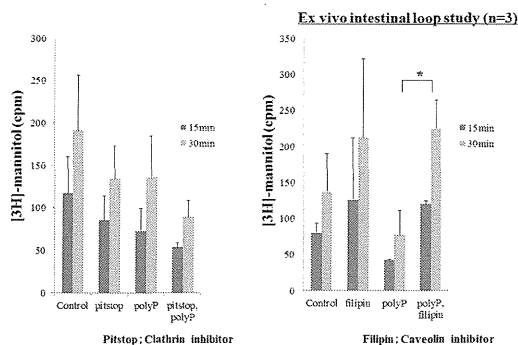


図6 integrin $\beta 1$ のshRNAはpoly Pの細胞バリア機能増強作用を減弱する。



さらに poly P の細胞バリア増強作用は、clathrin の inhibitor (pitstop) では変化が無かったが caveolin の inhibitor (Filipin) で著しく抑制された (図 7)。

図7 poly Pの細胞バリア増強作用はcaveolinのinhibitorで抑制された。

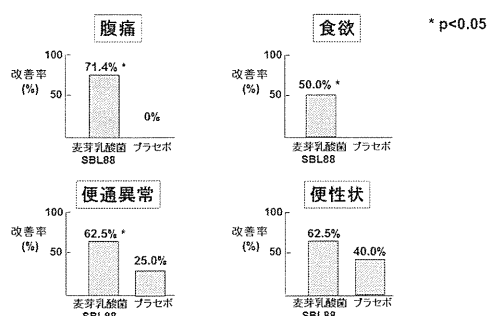


3. 腹部症状を有する症例に対する麦芽乳酸菌 SBL88 の安全性と治療効果

本試験にエントリーした腹部症状を有する 20 人の患者に有害事象の発生は無かった。麦芽乳酸菌 SBL88 を投与された群では、プラセボ群に比べ、

腹痛が有意に軽減し、便性状も改善した。また、腸内細菌叢をT-RFLP法にて解析した結果、麦芽乳酸菌SBL88を投与された群ではLactobacillusおよびBifidobacteriumが増加する傾向にあった。

図8 麦芽乳酸菌SBL88投与による腹部症状の変化



D. 考察

今回の検討の結果から、新規乳酸菌 SBL88 由来の活性物質 poly P は、TGF β 1、smad4、CTGF の発現を抑制し、腸管長の短縮および組織学的な線維化を改善することが明らかになった。現在、クローン病などで起こる過剰な線維化に伴う腸管狭窄の治療は、内視鏡的バルーン拡張術や手術によるものが主であり、効果が証明された薬物療法はほとんどない。Poly P 投与はこのような腸管狭窄に対する新規治療として有用である可能性が示された。

また、本検討により poly P の作用は、腸管上皮 integrin β 1 との結合を起点とし、lipid raft を介した endocytosis (caveolin 依存性 endocytosis) によって上皮内に取り込まれることによって発揮されることが明らかになった。これは、toll-like receptors などのパターン認識受容体を介した経路とは異なる、新しい宿主 - 細菌相互作用メカニズムと考えられる。今後、細胞内に取り込まれた poly P の動態を解析し、作用メカニズムの詳細を明らかにしていく予定である。

腹部症状のある症例を対象に二重盲検試験を行い、麦芽乳酸菌 SBL88 の安全性および効果を検証した。その結果、対象症例に有害事象をきたし

た例はなく、麦芽乳酸菌 SBL88 投与群で腹痛や便性状の改善を認めた。今後は、炎症性腸疾患患者を対象とした臨床試験により本菌の有効性を明らかにし、新規炎症性腸疾患治療の開発を目指したい。

E. 結論

麦芽乳酸菌 SBL88 由来の活性物質ポリリン酸は慢性腸炎モデルの腸管線維化を改善する効果を持つ。poly P の作用は、腸管上皮 integrin β 1 との結合とそれに引き続く endocytosis による細胞内への取り込みを介して発揮される。麦芽乳酸菌 SBL88 は安全にヒトへの投与が可能であり、腹痛や便通異常などの腹部症状の改善に有用であると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Okamoto K, Fujiya M, Nata T, Ueno N, Inaba Y, Ishikawa C, Ito T, Moriichi K, Tanabe H, Mizukami Y, Chang EB, Kohgo Y. Competence and sporulation factor derived from Bacillus subtilis improves epithelial cell injury in intestinal inflammation via immunomodulation and cytoprotection. *Int J Colorectal Diseases* 27(8):1039-46, 2012.
- 2) Takahashi N, Yoshizaki T, Hiranaka N, Suzuki T, Yui T, Akanuma M, Kanazawa K, Yoshida M, Naito S, Fujiya M, Kohgo Y, Ieko M. Endoplasmic reticulum stress suppresses lipin-1 expression in 3T3-L1 adipocytes. BBRC (in press)
- 3) Tanabe H, Fujiya M, Kohgo Y. Trypsin acts as an activating enzyme in gut innate immunity, *Trypsin: Structure, Biosynthesis and Functions*, edited by

- Kirk Weaver and Clayton Kelly. Hauppauge (NY): Nova Science Publishers Inc., 2012, 133-139. (ISBN 978-1-61942-319-0)
- 4) Wakita Y, Shimizu C, Nakakita Y, Kaneda H, Kanda H, Segawa S, Shigyou T, Ohtake T, Fujiya M, Kohgo Y. Effect of Lactobacillus brevis SBC8803 on Gamma-Glutamyl Transferase in Japanese Habitual Drinkers: A Double-Blind, Placebo-Controlled Study. *Food and Nutrition Sciences* 3(5):678-684, 2012.
 - 5) Konno Y, Ashida T, Inaba Y, Ito T, Tanabe H, Maemoto A, Ayabe T, Mizukami Y, Fujiya M, Kohgo Y. Isoleucine, an essential amino acid, induces the expression of human β defensin 2 through the activation of the G-protein coupled receptor-ERK pathway in the intestinal epithelia. *Food and Nutrition Sciences* 3(4):548-555, 2012.
 - 6) Tanaka H, Li Z, Ikuta K, Addo L, Akutsu H, Nakamura M, Sasaki K, Ohtake T, Fujiya M, Torimoto Y, Glass J, Kohgo Y. Iron Uptake Facilitator LS081 Induces The Degradation of Hypoxia Inducible Factor-1 and Functions as Anti-Cancer Agent in Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Science* 103(4):767-74, 2012.
 - 7) Ito T, Ayabe T, Ishikawa C, Inaba Y, Tanabe H, Maemoto A, Kono T, Ashida T, Fujiya M, Kohgo Y. Paneth cell regulate gut inflammation, thereby inducing chemotaxis of dendritic cells and cytokine production from epithelial cells. *Tohoku Journal of Experimental Medicine* 227(1):39-48, 2012.
 - 8) Watari J, Moriichi K, Tanabe H, Kashima S, Nomura Y, Fujiya M, Tomita T, Oshima T, Fukui H, Miwa H, Das KM, Kohgo Y. Biomarkers predicting development of metachronous after endoscopic resection: an analysis of molecular pathology of Helicobacter pylori eradication. *Int J Cancer* 130(10):2349-58, 2012.
 - 9) 藤谷幹浩、高後 裕. プロバイオティクス由来活性物質の同定とその作用メカニズム. *BIO INDUSTRY* 29 (4): 57-65, 2012.
 - 10) 安藤勝祥、上野伸展、藤谷幹浩、瀬川修一、稲場勇平、盛一健太郎、高後 裕. 麦芽乳酸菌(Lactobacillus brevis)SBC8803死菌はDSS慢性腸炎モデルマウスを改善する. *消化器と免疫* 48: 120-123, 2012.
2. 学会発表
 - 1) Fujiya M, Segawa S, Ueno N, Inaba Y, Moriichi K, Tanabe H, Kohgo Y. Polyphosphate derived from Lactobacillus contributes to the maintenance of intestinal homeostasis and the improvement of intestinal injury in experimental colitis. 10th Asian IBD Symposium, Seoul, 2012. 11. 03.
 - 2) Fujiya M, Ueno N, Sakatani A, Dokoshi T, Ando K, Nomura Y, Kashima S, Tominaga M, Inaba Y, Ito T, Moriichi K, Kikuchi Y, Okamoto K, Tanabe H, Segawa S, Kobayashi N, Shigyo T, Kohgo Y. Polyphosphate is a novel active molecule derived from Lactobacillus brevis that contributes to the maintenance of intestinal homeostasis and the improvement of intestinal injury in acute and chronic experimental colitis. DDW 2012 (AGA), DDW 2012 (AGA), 2012. 05. 20.
 - 3) 藤谷幹浩、小西弘晃、嘉島 伸、瀬川修一、上野伸展、稲場勇平、岡本耕太郎、高後 裕. 乳酸菌由来長鎖ポリリン酸による慢性腸炎および腸管線維化の改善効果. 第50回小腸研究会、京都、2012. 11. 10.
 - 4) 藤谷幹浩、高後 裕. 腸内細菌由来物質を用いた新規治療薬の開発. H24年度旭川大腸肛門

病疾患 学術講演会、旭川、2012. 10. 30.

- 5) 稲場勇平、藤谷幹浩、高後 裕. 腸管オートファジー誘導による抗酸化作用、腸管バリア増強作用を応用した過敏性腸症候群の新規治療開発. 第54回日本消化器病学会大会、神戸、2012. 10. 12.
- 6) 藤谷幹浩、小西弘晃、田邊裕貴、笹島順平、生田克哉、高後 裕. 癌関連蛋白 hnRNPA1 を標的としたmiR18aの抗腫瘍作用に関する検討. 第71回日本癌学会学術総会、札幌、2012. 09. 20.
- 7) 稲場勇平、藤谷幹浩、高後 裕. IL-10欠損マウスの腸炎成立過程におけるパネート細胞由来抗菌ペプチドの役割. 第49回日本消化器免疫学会総会、鹿児島、2012. 07. 06.
- 8) 小西弘晃、藤谷幹浩、高後 裕. 乳酸菌由来長鎖ポリリン酸は慢性腸炎による腸管障害や線維化を改善する. 第49回日本消化器免疫学会総会、鹿児島、2012. 07. 07.
- 9) 小西弘晃、藤谷幹浩、カメルマハモード、高後 裕. microRNA-18aは癌関連蛋白 hnRNPA1の機能を阻害し大腸癌細胞にアポトーシスを誘導する. 第16回日本がん分子標的治療学会学術集会、北九州、2012. 06. 28.
- 10) 稲場勇平、藤谷幹浩、高後 裕. プロバイオティクスによる腸管オートファジーの活性化がもたらす生体防御機能について. 第98回日本消化器病学会総会、東京、2012. 04. 20.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

特願 2010-089469、PCT/JP2011/057689「腸管保護剤」(公開予定)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

腸管上皮のオートファジーによる *Citrobacter rodentium* 感染の制御

研究協力者 吉田 優 神戸大学大学院医学研究科内科学講座消化器内科学分野 准教授

研究要旨：近年、クローン病の感受性遺伝子としてオートファジー関連遺伝子が同定され、オートファジーは腸管免疫において重要な働きを担っている可能性が示唆されている。我々はマウスにおける *Citrobacter rodentium* (*C. rodentium*) 腸炎制御において、オートファジーの役割を検討した。腸管上皮特異的オートファジー欠損マウスにおいて、LPS に対する炎症性サイトカインの発現の亢進や *C. rodentium* による感染性腸炎の増悪を認め、腸管上皮のオートファジーが腸管上皮での炎症を制御し、さらに病原性大腸菌などの非共生細菌の排除において重要な役割を担っている可能性が示唆された。

A. 研究目的

オートファジーとは細胞内のタンパクやオルガネラなどの大分解機構である。近年、遺伝子の網羅的解析において、オートファジー関連遺伝子である IRGM1、NOD2、ATG16L1 がクローン病の感受性遺伝子として同定され、腸管の炎症制御においてオートファジーが重要である可能性が示された。我々はこれまでに、腸管上皮特異的オートファジー欠損マウスに対する LPS 刺激によって、腸管における TNF- α 、IL-1 β の mRNA 発現が NF- κ B の活性化を介して亢進することを明らかにした。このことにより、腸管のオートファジーは腸管内のバクテリアなどに対する免疫的な反応を制御している可能性が示唆された。そこでマウス病原性大腸菌モデルである *C. rodentium* を腸管上皮特異的オートファジー欠損マウスに感染させることで、細菌感染に対する防御機構において腸管上皮のオートファジーが果たす役割を解析した。

B. 研究方法

Atg7 Flox/Flox マウスと Villin-cre マウスを交配させ、Cre/loxP システムによって腸管上皮特異的オートファジー欠損マウスを作製した。*C. rodentium* を経口ゾンデを用いて 4 週齢のマウスに経口感染させ、体重の変化、および、便中の菌量を経時的に測定した。感染後 7、14、21 日目で直腸を取り出し、10%ホルムアルデヒドで固定し切

片を作製した。作製した切片の H/E 染色を行い、腸炎の程度を病理学的スコアにて評価した。また、感染後 14 日目で取り出した大腸の粘膜上皮を採取し、抽出した RNA を、real-time PCR によって TNF- α 、IL-1 β 、IFN- γ の mRNA レベルの発現量を解析した。また、感染後 7、14、21 日目で血液を採取し、血中抗 *C. rodentium* IgG 抗体濃度を ELISA 法にて解析した。

C. 研究結果

腸管上皮特異的オートファジー欠損マウスとコントロールマウスに *C. rodentium* を経口感染させた。その結果、感染後の腸管上皮特異的オートファジー欠損マウスで、コントロールマウスと比べ有意な体重の減少を認めた。また、病理学的にも腸管上皮特異的オートファジー欠損マウスで有意に炎症の増悪を認めた。さらに、*C. rodentium* 感染後の腸管上皮特異的オートファジー欠損マウスの腸管上皮において TNF- α 、IL-1 β 、IFN- γ の mRNA レベルの発現亢進を認めた。

次に、*C. rodentium* 感染後の腸管上皮特異的オートファジー欠損マウスの血清中抗 *C. rodentium* IgG 濃度を ELISA 法によって解析した。その結果、感染 21 日後の腸管上皮特異的オートファジー欠損マウスにおいて、有意に血清中の抗 *C. rodentium* IgG 抗体の産生が亢進して

いることが観察された。さらに、腸管上皮特異的オートファジー欠損マウスにおいて、感染後14日目の糞便中の菌量が有意に多かった。

D. 考察

近年、臓器特異的オートファジー欠損マウスを用いた研究が広く実施され、オートファジーの機能異常がさまざまな疾患と関連することが明らかとなってきた。本研究では、腸管のオートファジーが細菌感染に対する防御機構に影響を与えているのか否かを検討するため、腸管上皮特異的オートファジー欠損マウスに*C. rodentium*を感染させ解析を実施した。腸管上皮特異的オートファジー欠損マウスにおいて、*C. rodentium*感染による腸炎が病理学的に悪化し、TNF- α 、IL-1 β 、IFN- γ などの炎症性サイトカインの発現がmRNAレベルで亢進することが明らかとなった。これらのことから、*C. rodentium*に対する炎症反応は腸管上皮のオートファジーによって制御されている可能性が示された。我々のこれまでの研究で、この腸管上皮特異的オートファジー欠損マウスに対してLPS刺激を行うと、mRNAレベルで腸管のTNF- α 、IL-1 β の発現がNF- κ Bの活性化を介して亢進することが確かめられており、オートファジーは、NF- κ Bを負に制御することで、*C. rodentium*などの病原体に対する炎症反応を軽減している可能性が示唆されている。

また、腸管上皮特異的オートファジー欠損マウスにおいて、糞便中の*C. rodentium*の菌量が多く、血中の抗*C. rodentium* IgG抗体濃度が上昇していることが明らかとなった。これらのことから、腸管のオートファジーは*C. rodentium*のクリアランスにおいても重要な役割を演じている可能性が示唆された。*C. rodentium*の排除のメカニズムは様々な報告がなされているものの、いまだ解明されていない。*C. rodentium*の排除に重要とされるTリンパ球の動員、INF- γ やTNF- α などの発現上昇は、本研究における*C. rodentium*に感染した腸管上皮特異的オートファジー欠損マウスでも観察された。オートファジー阻害剤の腹腔内投与によって、*C. rodentium*の排除能が低下したという報告もあるものの、臓器特異的

なオートファジー欠損マウスでの報告はこれまでになく、腸管のオートファジーの役割を理解する上で我々の示した結果は非常に重要であると考えられた。

E. 結論

我々の結果は、腸管上皮のオートファジーが*C. rodentium*感染に対する防御機構において重要な役割を担い、また、*C. rodentium*感染による腸管の炎症制御においてもオートファジーが重要であることを示した。細菌性腸炎に対する宿主の防御機構における腸管のオートファジーの役割を理解することは、感染性腸炎を含む腸管炎症の病態の解明や治療法の開発において意義のあることであると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Inoue J, Nishiumi S, Fujishima Y, Masuda A, Shiomi H, Yamamoto K, Nishida M, Azuma T, Yoshida M. Autophagy in the intestinal epithelium regulates *Citrobacter rodentium* infection. *Arch Biochem Biophys*. 521(1-2):95-101. 2012.

2. 学会発表

Jun Inoue1, Masaru Yoshida. Autophagy in the intestinal epithelium regulates *Citrobacter rodentium* infectious colitis. 日本免疫学会. 神戸国際会議場. 2012/10/10.

井上 潤, 西海 信, 藤島佳未, 増田充弘, 塩見英之, 吉田 優, 東 健. 腸管のオートファジーによる*Citrobacter rodentium*感染の制御. 腸内細菌学会. 神戸市産業振興センター. 2012/6/14.