

炎症性腸疾患患者の妊娠出産における現状とその対策

研究分担者 三浦 総一郎 防衛医科大学校 学校長

研究要旨：炎症性腸疾患患者の妊娠転帰における免疫調整剤や生物学的製剤の与える影響を retrospective に調査し 11 施設 65 名の患者から返信を受理した。そのうち 52 妊娠について解析を行った。妊娠転帰は炎症性腸疾患患者では、低体重 17%、早産 6%、先天奇形 2%、自然流産 12%であった。いずれの転帰も免疫調整剤や生物学的製剤の使用群と非使用群で有意な差を認めなかった。

A. 研究目的

潰瘍性大腸炎・クローン病の多くは若年で発症し、女性は経過中に妊娠・出産を経験する年齢となる。したがって、病気の影響と治療薬の影響を懸念し、妊娠への希望に少なからず影響を与えている可能性が考えられる。また、妊娠した際、治療の選択に影響を与える可能性もある。欧米のデータでは炎症性腸疾患と妊娠経過について影響を与える最大因子は疾患活動性であり、ほとんどの治療薬に関しては妊娠経過に影響しないとする報告がある。炎症性腸疾患で用いられる生物学的製剤や免疫調整剤の副作用は人種差を考慮すべきであるが、本邦での実態調査は殆どおこなわれておらず、患者から妊娠に関する質問を受けた場合は欧米のデータをもとに説明が行われているのが現状である。女性の炎症性腸疾患患者を調査し、生物学的製剤や免疫調整剤の使用群と非使用群において妊娠転機に差異があるか本邦で検証することを目的とした。

B. 研究方法

Retrospective 研究は、症例は妊娠期間中、生物学的製剤や免疫調整剤のいずれか、または併用された患者とし、対照は、炎症性腸疾患患者で妊娠推定日 6ヶ月前～妊娠期間中に生物学的製剤や免疫調整剤のいずれも使用されなかった患者とした。症例・対照比は 1：1 とし後ろ向きに

調査することとした。妊娠期間中の疾患活動性を医師記入用調査票にて調査し、妊娠転帰につき自記式質問票にて患者さんに記入を依頼した。

（倫理面への配慮）

当校の倫理委員会に申請し、許可を得た。多施設共同研究に関しては各施設でインフォームドコンセントを得て行う。個人情報への扱いには充分配慮し、本研究への参加が自由意志で行われ、参加しなくても不利益を得ない点を明確にする。患者アンケートは第三者への郵送を行い、主治医へ情報が伝わらないよう配慮した。

C. 研究結果

11 施設 65 名の患者から返信を受理した。そのうち 52 妊娠について解析を行った。自然流産は免疫調整剤や生物学的製剤を使用している患者群では、妊娠時の CRP が未使用群に比較して高い傾向にあったが有意ではなかった。Mayo score や HBI score は両群間に差を認めなかった。妊娠転帰は炎症性腸疾患患者では、低体重 17%、早産 6%、先天奇形 2%、自然流産 12%であった。自然流産は免疫調整剤や生物学的製剤を使用している患者群でやや高い傾向だった。免疫調整剤や生物学的製剤の使用群と未使用群で、奇形、低体重に統計学的差を認めなかった。1年後の子供に対する影響は感染症を含め、両群とも差を認めなかった。

D. 考察

免疫調整剤や生物学的製剤を使用している患者群では、未使用群に比較してCRPがやや高く、妊娠時に重症な群に免疫調整剤や生物学的製剤を使用している実態が考えられた。妊娠転帰では妊娠時の疾患活動性が最も影響するとの海外からの報告があるが、本研究では疾患活動性は妊娠期間中調査し、両群に差を認めなかった。生物学的製剤や免疫調整剤の危険性を示すデータは認めなかったが、結論付けるには症例の数が十分とはいえないと考えられる。一方で、活動性の高い患者では免疫調整剤や生物学的製剤を使用している実態も明らかになった。

E. 結論

妊娠患者の生物学的製剤や免疫調整剤で加療された患者の妊娠転帰を明らかにする本邦初の臨床研究を実施した。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1: Hokari R, Matsunaga H, Miura S. Effect of dietary fat on intestinal inflammatory diseases. *J Gastroenterol Hepatol.* 2013 Dec;28 Suppl 4:33-6.

2: Hozumi H, Hokari R, Kurihara C, Narimatsu K, Sato H, Sato S, Ueda T,

Higashiyama M, Okada Y, Watanabe C, Komoto S, Tomita K, Kawaguchi A, Nagao S, Miura S. Involvement of autotaxin/lysophospholipase D expression in intestinal vessels in aggravation of intestinal damage through lymphocyte migration. *Lab Invest.* 2013 May;93(5):508-19.

3. Hozumi H, Hokari R, Kurihara C, Narimatsu K, Sato H, Sato S, Ueda T, Higashiyama M, Okada Y, Watanabe C, Komoto S, Tomita K, Kawaguchi A, Nagao S, Miura S. Endoscopic finding of spontaneous hemorrhage correlates with tumor necrosis factor alpha expression in colonic mucosa of patients with ulcerative colitis. *Int J Colorectal Dis.* 2013 Aug;28(8):1049-55.

4. 三浦総一郎、小林大晋：消化器系-下剤・浣腸薬、高久史磨監修、治療薬ハンドブック2013、p525-529、全1524頁、じほう、2012. 12

5. 三浦総一郎：クローン病、山口 徹、北原光夫、福井次矢編、2013今日の治療指針-私はこう治療している、医学書院、東京、p452-454、全1955頁、2013. 1

6. 三浦総一郎：病態栄養の基礎知識-腸管機能と栄養、病態栄養専門師のための病態栄養ガイドブック改訂第4版、日本病態栄養学会編、メディカルレビュー社、p26-30、全366頁、2013. 4

2. 学会発表

1. Watanabe, C., Komoto, S., Kurihara, C., Okada, Y., Narimatsu, K., Sato, H., Hozumi, H., Hokari, R., Miura, S. Increased prevalence of celiac specific antibody in Japanese IBD patients and the effect of gluten intake. *Digestive Disease Week 2013 Orlando*, 2013.5.

2. Okada, Y., Tsuzuki, Y., Sato, H., Narimatsu, K., Hokari, R., Tomita, K., Kurihara, C., Kawaguchi, A., Nagao, S., Miura, S. Bone marrow dendritic cells exposed to trans-fatty acids exacerbate DSS-induced colitis through promotion of TH17 differentiation and up-regulation of proinflammatory cytokines. *Digestive Disease Week 2013 Orlando*, 2013

3. Narimatsu, K., Hokari, R., Yasutake, Y., Sato, H., Hozumi, H., Sato, S., Kurihara, C., Okada, Y., Watanabe, C., Komoto, S., Tomita, K., Kawaguchi, A., Nagao, S., Miura, S. Lipoarabinomannan, toll-like receptor 2 agonist, attenuates indomethacin-induced intestinal lesions through modulating leukocyte migration and TNFalpha production. *Digestive Disease Week 2013 Orlando*, 2013

4. Sato, S., Yang, Q., Kohan, A.B., Wang, F., Miura, S., Tso, P. Lipid absorption stimulates both GLP-1 and GLP-2 secretion into lymph. *Digestive Disease Week 2013 Orlando*, 2013

5. Kurihara, C., Hokari, R., Sato, S., Hozumi, H., Sato, H., Narimatsu, K., Yasutake, Y., Okada, Y., Watanabe, C., Komoto, S., Tomita, K., Kawaguchi, A., Nagao, S., Miura, S. Fatty acids exposure modifies mRNA expression of inflammatory cytokines in macrophages induced by enterobacteria. *Digestive Disease Week 2013 Orlando*, 2013

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

高齢者炎症性腸疾患診療の現状把握

—前向き多施設共同研究の計画—

研究分担者 三浦 総一郎 防衛医科大学校 学校長

研究要旨：高齢者炎症性腸疾患患者治療の現状を把握し、予後に直結するリスク因子の発見、制御のためのデータ収集を目的とする。臨床個人調査票を用いた記述疫学研究、入院患者を対象とした多施設共同の後向き研究では得られない、より詳細なリスク因子につき検討するため、多施設共同前向き研究を計画した。

共同研究者 高本俊介、穂苅量太、渡辺知佳子¹、田中浩紀、本谷聡²、松本史弘³、長堀正和、渡辺守⁴、松岡克善、金井隆典⁵、小林拓、日比紀文⁶、横山薫、小林清典⁷、谷田諭史⁸、瀬戸山仁、藤田浩、坪内博仁⁹、高橋晴彦、松井敏幸¹⁰、加藤真吾¹¹（順不同）
1 防衛医科大学校内科 2 札幌厚生病院IBDセンター 3 自治医科大学附属さいたま医療センター消化器科 4 東京医科歯科大学消化器内科 5 慶應義塾大学医学部消化器内科 6 北里大学北里研究所病院 炎症性腸疾患先進治療センター 7 北里大学東病院消化器内科 8 名古屋市立大学病院 消化器内科 9 鹿児島大学医学部附属病院消化器内科 10 福岡大学筑紫病院消化器内科 11 埼玉医科大学総合医療センター消化器内科

B. 研究方法

(1) 患者登録方法

最近1年以内に発症あるいは診断された潰瘍性大腸炎（UC）・クローン病（CD）の患者を、60歳以上の「高齢者群」と16歳以上40歳未満の「非高齢者群」に分類する（いずれも発症時あるいは診断時の年齢）。高齢者1人に対応して、同時期に発症し、なるべく重症度や病型の近い非高齢者1人を対照者として登録、参加医療機関より研究事務局へ登録票をFAXする。その際、登録票にあらかじめ決められたルールに従って連結可能にコード化された「コード番号」、年齢、性別が記載され、事務局ではこのコード番号により臨床情報を管理する。患者の個人情報には各医療機関でコード番号と連結して管理する。

登録された患者は1年後、2年後に追跡調査を行う。なお、治療内容には介入しない。

(2) 調査項目（UC・CDとも）

- ①年齢・性別
- ②臨床症状、重症度、病型、罹患範囲
- ③発症から診断までの期間、鑑別に苦慮した疾患
- ④合併症の有無（腸管・腸管外）
- ⑤併存疾患、投薬の有無（特にNSAID、抗凝固薬、

A. 研究目的

高齢者炎症性腸疾患患者治療の現状を把握し、予後に直結するリスク因子を発見、制御することを目的とする。

これまでに、臨床個人調査票を用いた記述疫学研究、過去3年間の入院患者を対象とした後ろ向き多施設共同研究を行ってきたが、より詳細なリスク因子につき検討する目的で、前向きの多施設共同研究を計画した。

抗血小板薬)

⑥治療方法、薬剤投与による副作用の有無 (特に免疫調節薬や生物学的製剤)

⑦手術の有無、あれば手術理由、術式

⑧入院の有無、あれば入院理由、期間、転帰

⑨血液データ (白血球数、赤血球数、ヘモグロビン、総蛋白、アルブミン、総コレステロール、CRP)

D. 考察

これまでの臨床個人調査票および多施設共同後ろ向き研究から、高齢者 IBD での経過および治療の傾向が少しずつ明らかとなった。また高齢者 IBD に関する報告も内外で増えているが、予後に直結する因子についてはいまだ不明な点が多く、多施設共同の前向き研究が不可欠であると考え、今回計画した。特に併存疾患やそれに対する投薬の有無 (特に NSAID、抗凝固薬など)、治療内容と治療による副作用、術後合併症の有無に重点を置く。なお、この前向き研究は 2011 年 12 月に防衛医科大学校倫理委員会で承認されており、現在各参加施設の倫理委員会で承認され次第、順次患者登録を開始する。

E. 結論

高齢者炎症性腸疾患の特性につき、多施設共同研究の結果を報告した。また、予後に直結する因子を解析するため、前向きが多施設共同研究を計画した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Hozumi, H., Hokari, R., Kurihara, C., Narimatsu, K., Sato, H., Sato, S., Ueda, T., Higashiyama, M., Okada, Y., Watanabe, C., Komoto, S., Tomita, K., Kawaguchi, A., Nagao, S., Miura, S. Endoscopic finding of spontaneous hemorrhage correlates with tumor necrosis factor alpha expression in colonic mucosa of patients with ulcerative colitis. *Int. J. Colorectal. Dis.* 28(8). 1049-55. 2013.

2. Sato, S., Hokari, R., Kurihara, C., Sato, H., Narimatsu, K., Hozumi, H., Ueda, T., Higashiyama, M., Okada, Y., Watanabe, C., Komoto, S., Tomita, K., Kawaguchi, A., Nagao, S., Miura, S. Dietary lipids and sweeteners

regulate glucagon-like peptide-2 secretion. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 304(8).G708-714. 2013.

3. Hozumi, H., Hokari, R., Kurihara, C., Narimatsu, K., Sato, H., Sato, S., Ueda, T., Higashiyama, M., Okada, Y., Watanabe, C., Komoto, S., Tomita, K., Kawaguchi, A., Nagao, S., Miura, S. Involvement of autotaxin/lysophospholipase D expression in intestinal vessels in aggravation of intestinal damage through lymphocyte migration. *Lab. Invest.* 93(5).508-519. 2013.

4. Murakami, K., Kurihara, C., Oka, T., Shimoike, T., Fujii, Y., Takai-Todaka, R., Park, Y.B., Wakita, T., Matsuda, T., Hokari, R., Miura, S., Katayama, K. Norovirus binding to intestinal epithelial cells is independent of histo-blood group antigens. *PLoS One.* 8(6).e66534. 2013.

5. Okada, Y., Tsuzuki, Y., Narimatsu, K., Sato, H., Ueda, T., Hozumi, H., Sato, S., Hokari, R., Kurihara, C., Komoto, S., Watanabe, C., Tomita, K., Kawaguchi, A., Nagao, S., Miura, S. 1,4-Dihydroxy-2-naphthoic acid from *Propionibacterium freudenreichii* reduces inflammation in interleukin-10-deficient mice with colitis by suppressing macrophage-derived proinflammatory cytokines. *J. Leukoc. Biol.* 94(3).473-480. 2013.

6. Watanabe, C., Komoto, S., Hokari, R., Kurihara, C., Okada, Y., Hozumi, H., Higashiyama, M., Sakuraba, A., Tomita, K., Tsuzuki, Y., Kawaguchi, A., Nagao, S., Ogata, S., Miura, S. Prevalence of serum celiac antibody in patients with IBD in Japan. *J. Gastroenterol.* 2013 Jun 12. [Epub ahead of print]

7. Okada, Y., Tsuzuki, Y., Sato, H., Narimatsu, K., Hokari, R., Kurihara, C., Watanabe, C., Tomita, K., Komoto, S., Kawaguchi, A., Nagao, S., Miura, S. Trans fatty acids exacerbate dextran sodium sulphate-induced colitis by promoting the up-regulation of macrophage-derived proinflammatory cytokines involved in T helper 17 cell polarization. *Clin. Exp. Immunol.* 2013 Sep 9. [Epub ahead of print]

8. Hokari, R., Matsunaga, H., Miura, S. Effect of dietary fat on intestinal inflammatory diseases. *J Gastroenterol Hepatol. Suppl* 4. 33-36. 2013.

9. Okada, Y., Tsuzuki, Y., Ueda, T., Hozumi, H., Sato S., Hokari, R., Kurihara, C., Watanabe, C., Tomita, K., Komoto, S., Kawaguchi, A., Nagao, S., Miura, S. Trans fatty acids in diets act as a precipitating factor for gut inflammation? *J Gastroenterol Hepatol. Suppl* 4.29-32. 2013.

10. Hozumi, H., Hokari, R., Shimizu, M., Maruta, K., Narimatsu, K., Sato, H., Sato, S., Ueda, T., Higashiyama, M., Watanabe, C., Komoto, S., Tomita, K., Kawaguchi, A., Nagao, S., Miura, S. Phlebosclerotic colitis that was difficult to distinguish from collagenous colitis. *Dig. Endosc.* 2013 Jul 31. [Epub ahead of print]

11. 渡辺知佳子、高本俊介、佐藤宏和、穂苺量太、三浦総一郎. 吸収不良症候群・蛋白漏出性胃腸症. *臨床消化器内科.* 28. 1045-53. 2013.

12. 三浦総一郎. 吸収不良症候群. 今日の処方改訂第5版. 南江堂. 295-298. 2013.
13. 三浦総一郎. クローン病. 2013 今日の治療指針-私はこう治療している. 医学書院. 452+454. 2013.
14. 高本俊介, 三浦総一郎. 高齢者の便通異常-憩室症や虚血性大腸炎との関連も含め. *Medicina*. 49. 286-289. 2012.
15. 穂苺量太, 三浦総一郎. 蛋白漏出性胃腸症, 吸収不良症候群. *日本医師会雑誌*. 141 (特別号) 188-190. 2012.
16. 高本俊介, 三浦総一郎. 炎症性腸疾患患者の管理の実際 高齢者. *炎症性腸疾患を究める. メディカルビュー*. 277-279. 2011.

2. 学会発表

1. Watanabe, C., Komoto, S., Kurihara, C., Okada, Y., Narimatsu, K., Sato, H., Hozumi, H., Hokari, R., Miura, S. Increased prevalence of celiac specific antibody in Japanese IBD patients and the effect of gluten intake. *Digestive Disease Week 2013*. Orlando USA
2. Okada, Y., Tsuzuki, Y., Sato, H., Narimatsu, K., Hokari, R., Tomita, K., Kurihara, C., Kawaguchi, A., Nagao, S., Miura, S. Bone marrow dendritic cells exposed to trans-fatty acids exacerbate DSS-induced colitis through promotion of TH17 differentiation and up-regulation of proinflammatory cytokines. *Digestive Disease Week 2013*. Orlando USA
3. Narimatsu, K., Hokari, R., Yasutake, Y., Sato, H., Hozumi, H., Sato, S., Kurihara, C., Okada, Y., Watanabe, C., Komoto, S., Tomita, K., Kawaguchi, A., Nagao, S., Miura, S. Lipoarabinomannan, toll-like receptor 2 agonist, attenuates indomethacin-induced intestinal lesions through modulating leukocyte migration and TNFalpha production. *Digestive Disease Week 2013*. Orlando USA
4. Sato, S., Yang, Q., Kohan, A.B., Wang, F., Miura, S., Tso, P. Lipid absorption stimulates both GLP-1 and GLP-2 secretion into lymph. *Digestive Disease Week 2013*. Orlando USA
5. Kurihara, C., Hokari, R., Sato, S., Hozumi, H., Sato, H., Narimatsu, K., Yasutake, Y., Okada, Y., Watanabe, C., Komoto, S., Tomita, K., Kawaguchi, A., Nagao, S., Miura, S. Fatty acids exposure modifies mRNA expression of inflammatory cytokines in macrophages induced by enterobacteria. *Digestive Disease Week 2013*.

Orlando USA

6. 三浦総一郎. 教育講演: 炎症性腸疾患の栄養指導 第16回日本病態栄養学会年次学術集会 京都 2013. 1.
7. 高本俊介, 穂苺量太, 富田謙吾, 渡辺知佳子, 佐藤伸悟, 八月朔日秀明, 佐藤宏和, 成松和幸, 安武優一, 高城 健, 清水基規, 山下允孝, 井上悌仁, 尾崎隼人, 古橋廣崇, 山寺勝人, 長谷和生, 永尾重昭, 三浦総一郎. 小腸穿孔により緊急手術を要した高齢者クローン病の2例 第16回日本高齢消化器病学会 名古屋 2013. 7.
8. 渡辺知佳子, 穂苺量太, 高本俊介, 三浦総一郎. Cronkhite-Canada 症候群の本邦における現状調査 第51回小腸研究会 名古屋 2013. 11.
9. 佐藤宏和, 穂苺量太, 安江千尋, 堀内和樹, 吉松亜希子, 尾崎隼人, 井上悌仁, 古橋廣崇, 山下允孝, 安武優一, 成松和幸, 佐藤伸悟, 八月朔日秀明, 碓井真吾, 渡辺知佳子, 高本俊介, 富田謙吾, 永尾重昭, 三浦総一郎. クローン病における内視鏡検査とMR enterographyの有用性に関する比較 第97回日本消化器内視鏡学会関東地方会 東京 2013. 12.
10. 渡辺知佳子, 穂苺量太, 高本俊介, 富田謙吾, 三浦総一郎. 本邦におけるセリアック病の実態の臨床調査~炎症性腸疾患患者における合併の可能性について~ 第98回日本消化器病学会総会 東京 2012. 4.
11. 三浦総一郎. 教育講演: 炎症性腸疾患診療の進歩 第20回日本消化器病学会関東支部教育講演会 大宮 2012. 6.
12. 渡辺知佳子, 穂苺量太, 三浦総一郎. 我が国における炎症性腸疾患とセリアック病の関連について 第54回日本消化器病学会大会, JDDW2012 神戸 2012. 10.
13. 渡辺知佳子, 穂苺量太, 高本俊介, 三浦総一郎. 当科におけるセリアック病の実態調査: 疾患特異的血清抗体と炎症性腸疾患の関連について 第50回小腸研究会 京都 2012. 11.

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

小児 IBD 最新治療の実施状況に関する全国調査

研究協力者 清水 俊明 順天堂大学医学部小児科 教授

研究要旨：17歳未満の小児期発症のクローン病、潰瘍性大腸炎、腸管ベーチェット、および分類不能型腸炎を対象とし、近年その使用が急増している生物学的製剤や免疫調節薬の使用状況や有効性につき検討を行うことを目的に全国 683 の小児科、小児外科、内科、外科施設にアンケート調査を行った。クローン病に対する 2 次調査の結果から、小児のクローン病に対しても生物学的製剤、特にインフリキシマブが良く使用されており、一定の有効性を示していた。しかしながら無効例や副作用にも注意が必要と思われた。

A. 研究目的

小児期発症の IBD は、成人発症例と比較し、より罹患部位が広く、ステロイドの使用量が必然的に増えるような重症例が多いことが報告されている。他方、免疫調整薬のひとつであるチオプリン製剤と生物学的製剤には、リンパ増殖性疾患や重症感染症の発生リスクが上昇することが知られており、タクロリムスやシクロスポリンに関しては、特に小児期発症 IBD における使用効果や副作用などに関する実態調査は行われていない。そこで、小児期発症 IBD で行われている最新治療の実施状況を踏まえた実態調査を行い、投与方法、合併症の有無、手術後の経過などを評価することで、それらの治療法が安全でかつ十分な効果が得られているかを検証し、小児期発症 IBD の適切な治療法の普及に努めることを目的に本研究を行っていく。

B. 研究方法

小児期発症のクローン病、潰瘍性大腸炎、腸管ベーチェットおよび分類不能型腸炎などの炎症性腸疾患を対象とし、近年、その使用が急増している生物学的製剤（インフリキシマブ、アダリムマブ）や免疫調節薬（タクロリムス、シクロスポリン）の効果および副作用、瘻炎合併例、手術症

例の経過などについてアンケート調査を行っていく。

対象者は、2000 年以降に全国の研修指定病院で主科として治療された 17 歳未満の IBD 患者とし、全国の小児科専門医研修指定病院（512 施設）、全国の小児外科研修指定病院（91 施設）、「難治性炎症性腸管障害に関する調査研究班」関連施設（79 施設）を対象施設とする。

研究機関は、倫理委員会承認後から 2014 年 3 月 31 日までとし、アンケート調査を 1 次と 2 次調査に分けて行う。

（倫理面への配慮）

順天堂大学医学部倫理委員会の承認を得たうえで、倫理的問題に十分配慮しながら研究を行っていく。

C. 研究結果

現時点での「小児クローン病における生物学的製剤による治療」の 2 次調査結果では、113（男 77、女 36）例の集計があった。インフリキシマブは 6 歳から 12 歳にかけ徐々に使用数が増え、12 歳から 16 歳では使用数の増加はみられず、3 歳以下の使用も 7 例で報告された。インフリキシマブの使用目的は寛解導入が 17 名、寛解導入および維持が 85 名であった。診断からインフリキシマブ使用までの期間は 3 か月以内が 39 名、3 か月～

1年以内が26名、1年～2年が21名、2年～3年以内が12名、3年以上たってからの使用も17名で認められた。インフリキシマブ使用によるPCDAIの低下は10週間後から明らかであり、有効が認められなかった症例およびステロイド減量ができなかった症例が約1/4の症例で見られた。副作用を認めた症例は多くなかったが、infusion reactionおよび紅斑がそれぞれ7名と5名にみられた。投与中止が32名で認められ、効果不十分や副作用などがその主な理由であった。

D. 考察

1次調査が終了し、CD842名、UC1515名と多数の17歳未満のIBD小児例が報告された。特にCDでは842例中284名と30%近くでインフリキシマブによる治療が行われていた。現在、1次調査の結果から、より詳細な実態調査を行うために2次調査を施行中であり、小児のCDおよびUC症例に対する生物学的製剤や免疫調節剤の使用法や効果、副作用および手術例や瘻管発症例についても詳細を検討中である。

小児のCDに対するインフリキシマブによる治療についての2次調査では、未だ回収率は高くないものの一定の有効性およびステロイド減量効果は認められており、また副作用についてもそれほど多くなく、その有効性について今後検討を行っていく予定である。

E. 結論

小児のIBD患者の治療について全国調査を行い、現在1次調査が終了し2次調査を行っているところである。1次調査では、多数のCDおよびUC患者が報告されており、今後の2次調査による詳細な検討により小児IBDに対する最も効果的な治療方法が検討できるものと思われる。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

・ Jimbo K, Arai K, Kobayashi I, Matsuoka K,

Shimizu H, Yanagi T, Kubota M, Ohtsuka Y, Shimizu T, Nakazawa A. A Case of isolated autoimmune enteropathy associated with autoantibodies to a novel 28 kilodalton duodenal antigen. J Pediatr Gastroenterol Nutr, in press.

- ・ Fujitake Y, Ohstuka Y, Ikuse T, Ohtani K, Aoyagi Y, Fujii T, Kudo T, Ishii M, Shimizu T. The analysis of inflammatory signals in Japanese children with Crohn's disease. Pediatr Int 55:753-6. 2013
- ・ 稲毛英介, 蒔苗剛, 米沢俊一, 鈴木是光, 高橋明雄, 高砂子祐平, 清水俊明. 成分栄養療法とメサラジン注腸で寛解を得た乳児クローン病の1例. 日本小児科学会雑誌 117:129-34. 2013

2. 学会発表

- ・ Fujii T, Hosoi K, Matumura S, Ohbayashi N, Jimbo K, Ikuse T, Aoyagi Y, Kudo T, Ohtsuka Y, Kanegane H, Shimizu T. A case of X-linked lymphoproliferative syndrome type2 (XLP2) diagnosed by X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) mutation with Crohn's disease (CD). Joint Meeting for 13th APPSPGHAN and the 40th JSPGHAN, Tokyo. 2013. 11. 2
- ・ Ohtsuka Y, Shimizu T, Tomomasa T, Tajiri H, Kunisaki R, Ishige T, Yamada H, Arai K, Yoden A, Ushijima K, Aomatsu T, Nagata S, Uchida K, Takeuchi K. Variation of treatment with biologics and immunomodulators for pediatric inflammatory bowel disease in Japan. Joint Meeting for 13th APPSPGHAN and the 40th JSPGHAN, Tokyo. 2013. 11. 1
- ・ 神保圭佑, 細井賢二, 大林奈穂, 幾瀬圭, 青柳陽, 藤井徹, 工藤孝広, 大塚宜一, 清水俊明. 小児炎症性腸疾患治療指針案の検証と当科におけるその治療成績. 第116回日本小

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

自然免疫系による慢性炎症性腸疾患の制御機構に関する研究

研究分担者 竹田 潔 大阪大学大学院医学系研究科免疫制御学 教授

研究要旨：ヒト大腸がんの手術検体を用いて、大腸粘膜固有層に Th17 細胞を誘導するミエロイド細胞 (CD163^{low} CD14⁺ CD11c⁺サブセット) を同定した。この細胞は、クローン病患者の、炎症部位、健常部位にも存在しているが、Th17 細胞の誘導活性が高くなっていることも明らかになった。この細胞の異常活性化が、クローン病の病態と関与していることが示唆された。

A. 研究目的

クローン病や潰瘍性大腸炎に代表される慢性炎症性腸疾患は、現在その病因・病態が明らかにされておらず、有効な治療法も確立されていない難治性の疾患であり、その病因・病態の解明、さらにその治療法の確立が待ち望まれている。

これまでの解析から、自然免疫系をはじめとした免疫細胞が遺伝的に恒常的活性化状況に陥ると、腸内細菌などの腸内環境因子に過剰応答し腸管炎症が発症することが明らかになっている。そこで、炎症性腸疾患の発症機序を、自然免疫系を標的として解析し、さらにその活性制御機構を解析し、その病態解明、自然免疫系を標的とした新たな治療法開発の基盤を提供することを目的とする。

B. 研究方法

これまでに、マウスを用いた解析により、腸管炎症の誘導に深く関与する Th17 細胞の分化を誘導する腸管特異的な CD70^{high}CD11b⁺CD11c⁺樹状細胞を同定している。Th17 誘導性樹状細胞が、ヒト腸管にも存在するのか、するとすればクローン病患者でその活性化はどのようなになっているのかを解析した。

(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

会での審査のうえ、個人情報の匿名化のもと、検体の採取を行っている。

C. 研究結果

ヒト大腸（大腸がんや炎症性腸疾患患者）より自然免疫（ミエロイド）細胞を単離する方法を確立した。ヒト腸管ミエロイド細胞は、マウスと同じマーカーでのサブセット選別が困難で、まず HLA-DR^{high}, lineage⁻でゲートし、さらに CD14, CD11c, CD163 で染色し、4つの分画 (CD14⁻ CD11c^{low}, CD14⁻ CD11c^{high}, CD163^{low} CD14⁺ CD11c⁺ および CD163^{high} CD14⁺ CD11c⁺) を得た。これら分画の遺伝子発現を DNA microarray で解析したところ、CD163^{high} CD14⁺ CD11c⁺サブセットで、マウス制御性ミエロイド細胞と同様に IL-10 誘導性遺伝子の発現が高いことが明らかになった。一方、CD163^{low} CD14⁺ CD11c⁺サブセットは、LPS 刺激により IL-6, IL-1b, TNF-a 産生が増加した。次に、これらサブセットによる in vitro T細胞分化誘導を解析した。その結果、CD163^{low} CD14⁺ CD11c⁺サブセットが強く Th17 細胞の分化を誘導することを見出した。このサブセットは先にマウスで同定していた Th17 細胞を誘導する CD70^{high}CD11b⁺CD11c⁺樹状細胞のヒトカウンターパートと考えられる。そこで、このサブセットのクローン病患者における機能を解析した。クローン病患者の炎症部位および非炎症部位より単離した CD163^{low} CD14⁺ CD11c⁺サブセットは、大腸がん患者の正常部位の細胞に比べ

て、強く Th17 細胞の分化を誘導することが明らかになった。

D. 考察

ヒト腸管組織にも、マウス同様に Th17 細胞分化を誘導する樹状細胞が存在し、この機能がクローン病患者で亢進していることが明らかになった。この樹状細胞の異常活性化が、クローン病の病態に関与していることが示唆された。

E. 結論

ヒト腸管組織で、Th17 細胞を誘導する樹状細胞を同定した。クローン病患者においては、この樹状細胞の活性が亢進していた。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1 Shimada, Y., Kinoshita, M., Harada, K., Mizutani, M., Masahata, K., Kayama, H. and Takeda, K.: Commensal bacteria-dependent indole production enhances epithelial barrier function in the colon. *PLoS One* 8(11): e80604 (2013).
- 2 Kayama, H., Nishimura, J. and Takeda, K.: Regulation of Intestinal Homeostasis by Innate Immune Cells. *Immune Netw.* 13, 227-234 (2013).
- 3 Ogino, T., Nishimura, J., Barman, S., Kayama, H., Uematsu, S., Haraguchi, N., Uemura, M., Hata, T., Takemasa, I., Mizushima, T., Yamamoto, H., Takeda, K., Doki, Y., and Mori, M.: Increased Th17-inducing activity of CD14(+) CD163(low) myeloid cells in intestinal lamina propria of patients with Crohn's disease. *Gastroenterol.* 145, 1380-1391 (2013).
- 4 Kimura, T., Katoh, H., Kayama, H., Saiga, H., Okuyama, M., Okamoto, T., Umemoto, E., Matsuura, Y., Yamamoto, M. and Takeda, K.: Ifit1 inhibits JEV replication through binding to 5' capped 2'-O unmethylated RNA. *J. Virol.* 87, 9997-10003 (2013).

- 5 Ishii, H., Tanabe, S., Ueno, M., Kubo, T., Kayama, H., Serada, S., Fujimoto, M., Takeda, K., Naka, T., and Yamashita, T.: Ifn-g-dependent secretion of IL-10 from Th1 cells and microglia/macrophages contributes to functional recovery after spinal cord injury. *Cell Death Dis.* 4, e710 (2013).
- 6 Kunisawa, J., Gohda, M., Hashimoto, E., Ishikawa, I., Higuchi, M., Suzuki, Y., Goto, Y., Panea, C., Ivanov, I. I., Sumiya, R., Aayam, L., Wake, T., Tajiri, S., Kurashima, Y., Shikata, S., Akira, S., Takeda, K., and Kiyono, H.: Microbe-dependent CD11b+ IgA+ plasma cells in early-phase robust intestinal IgA responses in mice. *Nat. Commun.* 23, 1772 (2013).

2. 学会発表

- 1 Kiyoshi Takeda, Regulation of gut homeostasis by innate immunity, The 2013 Fall Conference of the Korean Association of Immunologists 2013. 11. 7-8, Seoul, Korea
- 2 Kiyoshi Takeda, Regulation of gut homeostasis by innate immunity, FIMSA International Symposium on Autoimmune Diseases, 2013.10-17-20, Beijing, China
- 3 Kiyoshi Takeda, Innate immune responses and gut homeostasis, The 33rd Korean College of Rheumatology Annual Scientific Meeting, May 10-11, 2013, Seoul, Korea
- 4 Kiyoshi Takeda, Regulation of gut homeostasis by innate immunity, Immunology 2013, May3-7, 2013, Hawaii, USA
- 5 Kiyoshi Takeda, Host-microbial interplay, 42nd JSI Annual Meeting 12. 11-13, 2013, Chiba
- 6 Kiyoshi Takeda, Regulation of gut homeostasis by innate immunity and lymphoid tissues in the appendix. Germany-Japan Immunology Seminar 2013. 12.5-8, 2013 Shizuoka Japan
- 7 竹田潔、慢性疼痛の病態理解のための免疫・炎症メカニズム、第6回日本運動器疼痛学会、2013年12月7-8日、神戸
- 8 竹田潔、腸管免疫の謎を解く、日本消化器病学会 2013、2013年10月11日、東京
- 9 竹田潔、腸内環境因子と炎症性腸疾患—基礎

研究の立場から一、第50回日本消化器免疫学会総会、2013年8月1-2日、東京

- 10 竹田潔、免疫系と腸管環境相互作用による腸管炎症の制御機構、第34回日本炎症・再生医学会、2013年7月2-3日、京都
- 11 竹田潔、自然免疫系による腸管炎症の制御機構、第19回日本ヘリコバクター学会学術集会、2013年6月28-29日、長崎

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

難治性潰瘍性大腸炎における CXCR3 阻害剤の可能性

研究協力者 石黒 陽 国立病院機構弘前病院消化器血液内科 部長

研究要旨：難治性潰瘍性大腸炎患者における Th1 型反応を司る候補遺伝子 CXCL-9 と、その ligand である CXCR3 発現細胞に対する CXCR3 阻害剤は遊走抑制、活性化抑制の二つの機序を介して効果を発現しており、新たな治療標的となり得る。第 I 相試験がこのほど報告されてことを踏まえて、当該疾患に対する効果と安全性の確認、容量曲線作成を目的に第 II 相臨床試験を計画するものである。

共同研究者：蓮井 桂介、櫻庭 裕丈、
平賀 寛人、福田眞作
(弘前大学消化器血液内科)

A. 研究目的

難治性潰瘍性大腸炎における粘膜障害機序解明と新規治療開発を目的とした。ステロイド抵抗性難治性潰瘍性大腸炎組織における網羅的解析から明らかとなったTh-1型反応を司る候補遺伝子CXCL-9と、そのligandであるCXCR3発現細胞を標的としたAMG487の効果を検証する。GWASの結果および本研究者の検討から、Th1型反応は潰瘍性大腸炎の病態に関与していることが解っている。本研究は難治性潰瘍性大腸炎におけるGenechip[®]による解析からpathwayを同定し、モデル動物において効果を確認し、新たな分子標的治療への応用可能と考え、第II相臨床試験を計画した。

B. 研究方法

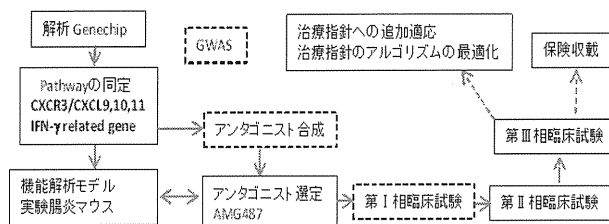
Healthy volunteer に対する第 I 相試験が報告されていることを踏まえて、当該疾患に対する効果と安全性の確認、容量曲線作成を目的に第 II 相臨床試験を計画するものである。厚生労働省科学研究補助金難治性疾患克服対策研究事業「難治

性炎症性腸管障害に関する調査研究班」平成 20 年度改定案のなかで第一選択薬にメサラジン製剤が、反応が得られない場合にはステロイドが推奨される。

これまでのミネソタにおける大規模コホート試験では、ステロイドの寛解導入効果は60%程度、1年後には全体で40%程度がステロイド依存となることが示されている。厚生労働省科学研究補助金難治性疾患克服対策研究事業「難治性炎症性腸管障害に関する調査研究班」平成 20 年度改定案のなかで難治例とは①ステロイド抵抗例：1mg/kg 投与で 7 日間で反応が得られないもの、②依存例：ステロイド漸減にともなって悪化するものと定義されている。難治例の場合、免疫調節剤、血球成分除去療法、シクロスポリン（保険適応外）、レミケード、アダリムマブを用いてもよいとされているが、難治例における寛解導入効果はシクロスポリンで 60%程度であり、他の薬剤においては寛解導入率において層別化した上での検討、また各薬剤の併用やswitchした場合の成績は大規模・多施設での検討はなされておらず、いずれも 50%を超えるものではない。厚生労働省科学研究補助金難治性疾患克服対策研究事業「難治性炎症性腸管障害に関する調査研究班」による受給者を対象とした調査では本邦では年間の手術率は新規・継続登録例において10-20%前後である。このような状況を踏まえて、本試験ではメサラジ

ンに加え、ステロイド投与がなされている患者に対し、他の薬剤が投与され、かつ無効、忍容性が得られない場合、もしくはステロイド依存例に対して本被験薬を投与するものである。研究期間内には第II相試験を行う。組み入れに要する期間を3年とした。安全性と効果、容量の解析を行う。結果によって第III相試験を計画する。

C. 結果



デザイン決定

試験デザイン

中等度～重度の潰瘍性大腸炎を有する被験者を対象として、安全性および有効性を検討する無作為化、二重盲検、プラセボ対照、並行群間比較、25mg、100mgまたはプラセボ群の3群のうち1群に割り付ける。サンプル数およびその算出根拠 [サンプル数] プラセボ群 45例、実薬群 90例、合計135例 [算出根拠] プラセボ群の有効率を40%、実薬群の有効率を70%と仮定すると、各群45例が必要となる (検出力 80%、 α エラー 5%)。2重盲検治療期間は8週間とする。組み入れはMayoスコアが6ポイント以上、内視鏡検査によるMayoサブスコアが2ポイント以上と定義された中等度、重度の潰瘍性大腸炎患者。ベースライン前および治療薬投与期間に2週間以上経口5-ASAまたはスルファサラジンの一定容量投与を受けている、2週間以上1日最大30mgのコルチコステロイド剤の一定容量投与をうけている患者を対象とする。

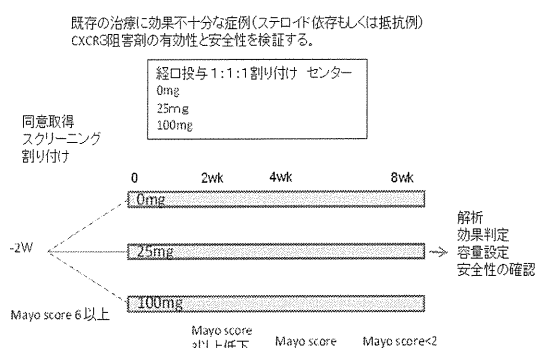
- ベースライン前2週間以内にAZA, 6MP, MTXを服用した患者
- ベースライン前8週間以内に抗TNF- α 療法を受けた患者

- ベースライン前4週間以内のシクロスポリン、タクロリムス投与を受けた患者
- 過去1年以内の抗接着分子療法もしくはリンパ球除去療法をうけた患者
- ベースライン前3か月以内のその他市販されている免疫抑制剤、あるいは免疫調節作用を有する生物製剤の投与を受けた患者は除外する。

主要評価項目は8週時での臨床反応 (直腸出血サブスコアが1ポイント以上の減少あるいは0または1の直腸出血絶対サブスコアを伴う Mayoスコアのベースライン時からの3ポイント以上の減少と定義) である。容量反応モデルを構築する。プラシーボ群との差が20%以上とするPOC基準を満たす容量を決定する (90%信頼区間の下限値が $>0\%$)

副次評価項目は臨床的寛解 (Mayoスコアの合計が2ポイント以下で各サブスコアが2) 内視鏡検査による寛解 (内視鏡検査によるMayoサブスコアが0) および内視鏡検査による臨床効果 (内視鏡検査によるMayoサブスコアがベースライン時から1ポイント以上減少) の被験者の割合を求める。また、当院倫理委員会ならびに当該施設においても倫理委員会申請を経て行うものとする。臨床試験に関わる保険契約後に行うこととする。Amgenより試験薬AMG487の無償提供を受けている。

D. 考察



新規薬剤に関しては本邦でも海外との共同臨床試験 (global) 試験が執り行われており、標的は接着因子、およびそのリガンドで、抗体製

剤が主で、効果も難治例に関しては不明である。一方小分子化合物に関してはJAK Stat系の阻害剤であるトファシチニブが現在第Ⅲ相試験中である。本試験では経口投与可能な小分子阻害剤による走化因子阻害剤であり、初の試みでこれまでに類を見ない。

E. 結論

潰瘍性大腸炎患者のQOL低下の最大の要因である入院から回避できる可能性においても有益であることが推察される。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kawaguchi S, Ishiguro Y, Imaizumi T, Mori F, Matsumiya T, Yoshida H, Ota K, Sakuraba H, Yamagata K, Sato Y, Tanji K, Haga T, Wakabayashi K, Fukuda S, Satoh K. Retinoic acid-inducible gene-1 is constitutively expressed and involved in IFN-gamma-stimulated CXCL9-11 production in intestinal epithelial cells. Immunol Lett.

2009 24;123(1). :9-13.

2. 学会発表

石黒 陽, 蓮井 桂介, 櫻庭 裕丈, 平賀 寛人
福田 眞作 S-2: 難治性潰瘍性大腸炎における CXCR3 阻害剤の可能性。第 50 回消化器免疫学会総会 2013 年 8 月 2 日 (東京)

蓮井 桂介, 石黒 陽, 櫻庭 裕丈, 平賀 寛人, 福田 眞作. IL-10-deficient (IL-10^{-/-}) cell transfer model of colitis における CXCR3 の役割について

第 54 回 日本消化器病学会大会 2012 年 10 月 11 日 (神戸)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
該当なし

2. 実用新案登録
該当なし

3. その他
該当なし

炎症発癌における MFG-E8 の役割

研究協力者 石原 俊治 島根大学医学部内科学講座第二 准教授

研究要旨： 大腸炎症発癌の病態における MFG-E8 の役割を検討するため、慢性腸炎における MFG-E8 発現、MFG-E8 ノックアウト (KO) マウスを用いた炎症発癌モデルの作成、培養細胞増殖における MFG-E8 の役割について検討した。潰瘍性大腸炎ならびに慢性腸炎モデルマウスの腸管粘膜では、炎症によって MFG-E8 の発現は増加していた。MFG-E8 は浸潤するマクロファージに発現していた。マウス炎症発癌モデルにおいて MFG-E8 KO マウスでは野生型マウスよりも形成される腫瘍の数が有意に減少していた。培養細胞を用いた実験では、MFG-E8 はインテグリン依存性に細胞増殖を促進した。以上のことから、MFG-E8 は大腸慢性炎症で増加し、炎症発癌に促進的に働いている可能性が示唆された。

共同研究者 楠 龍策、園山浩紀、多田育賢、岡明彦、福庭暢彦、川島 耕作、森山一郎、結城崇史、木下芳一

所属 島根大学医学部内科学講座第二

A. 研究目的

クローン病と潰瘍性大腸炎 (UC) などの炎症性腸疾患 (IBD) において、慢性炎症が持続した場合には colitic cancer と呼ばれる腸管腫瘍の発生が問題となる。Milk fat globule-EGF-factor 8 (MFG-E8) は、生体内でアポトーシス細胞の処理を担う蛋白として同定されたが、私共の検討で、本蛋白が抗炎症作用を有し腸炎を劇的に改善させることが実験的に明らかとなった。一方で、MFG-E8 は様々な疾患の病態において多様な機能を有することが報告されており、なかでも細胞増殖や血管新生に対して促進的にはたらき、一部の癌組織において MFG-E8 が高度に発現していることがわずかではあるが報告されている。今回の研究では、腸管慢性炎症における MFG-E8 の発現と、炎症発癌への関与とその詳細を明らかにし、炎症発癌の抑制に働く合理的な治療法開発を目指す。

B. C. 研究方法と結果

① 潰瘍性大腸炎 (UC) ならびに慢性腸炎モデルマウスの腸管粘膜における MFG-E8 の発現に関する検討

UC 患者 (n=21) に下部消化管内視鏡検査を行い、通常光観察で活動性粘膜、非活動性粘膜（寛解期粘膜）よりそれぞれ生検を行った。それぞれの検体を免疫染色と Real time PCR にて MFG-E8 の発現を評価した。MFG-E8 は間質に浸潤するマクロファージに発現し、活動性粘膜は非活動性粘膜と比較し有意に MFG-E8 の発現は増加していた。続いて慢性腸炎マウスにおける検討を行った。C57/BL6 マウスに DSS を反復投与して慢性大腸炎モデルを作成し MFG-E8 の発現を real time PCR で測定した。UC での結果と同様に炎症の持続に伴って MFG-E8 は徐々に増加を認めた。

また、慢性炎症の回復期における上皮の増殖について PCNA 染色で検討をおこなった。MFG-E8 ノックアウトマウスでは野生型マウスと比較して上皮増殖が抑制されていた。

② マウス炎症発癌モデルにおける MFG-E8 の関与についての検討

MFG-E8 ノックアウト (KO) マウスを用いて、アゾキシメタン (AOM) とデキストラン硫酸ナトリウム

(DSS)の投与により炎症性大腸癌モデルを作成し野生型マウス(WT)と比較した。KOマウスから樹立した骨髓キメラマウスにおいても同様の検討をおこなった。KOマウスではWTマウスよりも形成される腫瘍数が有意に減少した。キメラマウスでも同様の結果であった。

③ 培養大腸癌細胞の増殖におけるMFG-E8の関与についての検討

大腸癌細胞Colon26にMFG-E8を投与し細胞増殖能を検討した。さらにMFG-E8が結合するインテグリン $\alpha_5\beta_3$ の機能を中和抗体やsiRNAで阻害し細胞増殖におけるインテグリンの特異性を評価した。精製MFG-E8はインテグリンを介してColon26細胞の増殖を促進した。

(倫理面への配慮)

動物実験およびヒト生検組織を用いた実験のプロトコールについては、島根大学の実験動物委員会のおよび倫理委員会の承認を得た。

D. 考察

ヒトおよびマウスの慢性大腸炎においてMFG-E8の発現が増加しており、MFG-E8欠損マウスで炎症発癌が抑制されたことから、MFG-E8は炎症発癌に促進的に作用していることが示唆された。培養細胞を用いた実験においてMFG-E8はインテグリン依存性に細胞増殖を促進し、これが発癌促進のメカニズムのひとつと考えられた。

MFG-E8の制御は炎症発癌治療に有効である可能性が示唆された。一方でMFG-E8は生理的にアポトーシス細胞の除去に関与し免疫系の恒常性を保つ役割も担っており、今後治療およびその副作用についての検討が必要と考える。

E. 結論

MFG-E8は慢性大腸炎で発現が増加し、炎症発癌を促進する。

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.* 19:E33-4, 2013.

- 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.* 87:204-11, 2013.

- ③ Mishiro T, Kusunoki R, Otani A, Ansary MM, Tongu M, Harashima N, Yamada T, Sato S, Amano Y, Itoh K, Ishihara S, Kinoshita Y. *Lab Invest.* 93:834-43, 2013.

- ④ Tada Y, Ishihara S, Ito T, Matsui K, Sonoyama H, Oka A, Kusunoki R, Fukuba N, Mishima Y, Oshima N, Moriyama I, Yuki T, Kawashima K, Sato S, Adachi K, Ikeuchi H, Kinoshita Y. 52:1899-902, 2013.

- ⑤ Oka A, Ishihara S, Mishima Y, Tada Y, Kusunoki R, Fukuba N, Yuki T, Kawashima K, Matsumoto S, Kinoshita Y. *Inflamm Bowel Dis.* 2014 Jan 2. [Epub ahead of print]

2. 学会発表

- ① Sonoyama H, Kawashima K, Ishihara S, Tada Y, Oka A, Kusunoki R, Fukuba N, Oshima N, Moriyama I, Yuki T, Kinoshita Y: Elevated serum pancreatic enzymes in inflammatory bowel disease associated with clinical parameters. The 1st Annual Meeting of Asian Organization for Crohn's & Colitis. Tokyo 2013. 06. 13.

- ② Tada Y, Ishihara S, Kusunoki R, Fukuba N, Sonoyama H, Oka A, Moriyama I, Yuki T, Kawashima K, Ansary MM, Kinoshita Y: Milk fat globule-epidermal growth factor 8 accelerates angiogenesis-related gene expression in colonic mucosa during

- regenerating phase of colitis. United European Gastroenterology Week (UEGW). Berlin 2013. 10. 14.
- ③ Kawashima K, Ishihara S, Sonoyama H, Tada Y, Oka A, Kusunoki R, Fukuba N, Oshima N, Moriyama I, Yuki T, Kinoshita Y: Televated matrix metalloproteinase-3 Levels in serum correlated with Crohn' s disease severity: efficacy as clinical biomarker. United European Gastroenterology Week (UEGW). Berlin 2013. 10. 15.
- ④ Fukuba N, Ishihara S Tada Y, Sonoyama H, Oka A, Kusunoki R, Oshima N, Moriyama I, Yuki T, Kawashima K, Kushiyama Y, Fujishiro H, Kinoshita Y: Prevalence of irritable bowel syndrome-like symptoms in ulcerative colitis patients with clinical and endoscopic evidence of remission: prospective multicenter study. United European Gastroenterology Week (UEGW). Berlin 2013. 10. 16.
- ⑤ Oshima N, Ishihara S, Sonoyama H, Tada Y, Oka A, Kusunoki R, Fukuba N, Moriyama I, Yuki T, Kawashima K, Ansary MM, Kinoshita Y: Role of milk fat globule-epidermal growth factor 8 during *Citrobacter rodentium*-induced colitis in mice. United European Gastroenterology Week (UEGW). Berlin 2013. 10. 15.
- ⑥ Ishihara S Tada Y, Fukuba N, Sonoyama H, Oka A, Kusunoki R, Oshima N, Moriyama I, Yuki T, Kawashima K, Kushiyama Y, Fujishiro H, Kinoshita Y: Susceptibility for colitis-associated cancer development in SAMP1/Yit mice. United European Gastroenterology Week (UEGW). Berlin 2013. 10. 16.
- ⑦ 福庭暢彦, 石原俊治, 園山浩紀, 多田育賢, 岡 明彦, 楠 龍策, 大嶋直樹, 森山一郎, 結城崇史, 川島耕作, 松本 敏, 木下芳一: SAMP1 マウスを用いた大腸炎症性発癌モデルの作成とその意義. 第 99 回日本消化器病学会総会, 鹿児島, 2013. 3. 21.
- ⑧ 大嶋直樹, 石原俊治, 木下芳一: *Citrobacter rodentium* 腸炎における TL1A の役割. 第 99 回日本消化器病学会総会, 鹿児島, 2013. 3. 23.
- ⑨ 川島耕作, 石原俊治, 園山浩紀, 多田育賢, 岡 明彦, 楠 龍策, 福庭暢彦, 大嶋直樹, 結城崇史, 木下芳一: クロウン病患者における血清マトリックスメタロプロテアーゼ-3 (MMP-3) の臨床的意義. 第 99 回日本消化器病学会総会, 鹿児島, 2013. 3. 22.
- ⑩ 多田育賢, 石原俊治, 園山浩紀, 楠 龍策, 岡 明彦, 森山一郎, 福庭暢彦, 大嶋直樹, 結城崇史, 川嶋耕作, 木下芳一: 腸炎回復期における MFG-E8 による血管新生促進因子の発現制御に関する検討. 第 99 回日本消化器病学会総会, 鹿児島, 2013. 3. 21.
- ⑪ 川島耕作, 石原俊治, 園山浩紀, 多田育賢, 岡 明彦, 楠 龍策, 福庭暢彦, 大嶋直樹, 結城崇史, 木下芳一: 潰瘍性大腸炎患者における血清マトリックスメタロプロテイナーゼ-3 の疾患活動性マーカーとしての有用性の検討. 第 21 回日本消化器関連学会週間 JDD 2013, 東京, 2013. 10. 10.
- ⑫ 園山浩紀, 川島耕作, 石原俊治, 多田育賢, 岡 明彦, 楠 龍策, 福庭暢彦, 大嶋直樹, 森山一郎, 結城崇史, 木下芳一: 炎症性腸疾患の臍酵素異常についての臨床的検討. 第 21 回日本消化器関連学会週間 (JDD 2013), 東京, 2013. 10. 10.

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

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

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は、サイトメガロウイルス(CMV)感染がその病態に大きく影響する。しかしながら炎症性腸疾患における CMV 感染の意義を検討する適切な動物モデルは存在しない。そこで今回、CMV 感染合併 IBD マウスモデルの開発をおこなった。TCR α ノックアウト新生児マウスにマウス CMV を感染させることによって、CMV 感染 IBD マウスモデルの確立に成功した。本マウスでは、CMV 感染によって腸炎が悪化した。感染マウスでは免疫染色で、腸管粘膜に CMV 抗原陽性細胞を認めた。さらに詳細な検討によって、腸管粘膜の CMV は主として血管内皮細胞近傍の perivascular 細胞に存在していた。以上より腸管局所の CMV が血管内皮を障害して、腸炎を増強している可能性が示唆された。

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い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)

動物実験にあたっては、動物愛護及び管理に関する法律、実験動物の飼養

及び保管等に関する基準に従い、研究計画の妥当性を評価している。さらに、動物実験倫理に関し高い意識を持った研究者のみが実験を遂行している。

C. 研究結果

1. MCMV 感染マウスでは各臓器で、感染 1 週間後には高値だったウイルス力価、ゲノムコピー数は 4 週間後には感度以下となった。また感染 1 週間後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 (図 2)、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

これまでHCMVによるIBD増悪の病態機序に関する報告はほとんどない。今回我々はIBDの病態に及ぼすHCMV感染の影響について検討するためMCMV感染UCモデル動物をはじめて確立した。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*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。よって、IBD患者においてHCMVは再活性化早期にはperivascular細胞などの間質細胞に存在しており、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

我々はCMV感染によって増悪するUC動物モデルを初めて確立した。このマウスモデルを利用することで、UC患者におけるCMV局所再活性化の機序解明ならびに難治性UC患者の治療開発が可能にな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. Matsumura K, Nakase H, Kosugi I, Honzawa Y, Yoshino T, Matsuura M, Kawasaki H, Arai Y, Iwashita T, Nagasawa T, Chiba T: Establishment of a novel mouse model of ulcerative colitis with concomitant cytomegalovirus infection - *in vivo* identification of cytomegalovirus persistent infected cells-. *Inflamm Bowel Dis* 19:1951-1963:2013.
2. Yamamoto S, Nakase H, et al. Heparan Sulfate on intestinal epithelial cells plays a critical role in intestinal crypt homeostasis via Wnt/ β -catenin signaling. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 305:G241-G249:2013.
3. Honzawa Y, Nakase H, Matsuura M, Higuchi H, Toyonaga T, Matsumura K, Yoshino T, Okazaki K, Chiba T: Prior use of immunomodulatory drugs improves the clinical outcome of endoscopic balloon dilation for intestinal stricture in patients with Crohn's disease. *Dig Endosc* 25:535-543:2013.

2. 学会発表

1. Matsuura M, Yoshino T, Nakase H. Characteristics of colonoscopic