

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

小野陽平、上村修司、田中啓仁、牧野智礼、小田耕平、沼田政嗣、船川慶太、藤田浩、宇都浩文、井戸章雄、坪内博仁. 一般演題「RANTESは潰瘍性大腸炎に対する血球成分除去療法の効果予測マーカーである」第50回日本消化器免疫学会 2013年8月(東京)

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

疾患活動性バイオマーカーとしての MUC5AC の有効性

-アダリムマブ治療を開始した biologic naive Crohn's disease 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：粘膜修復マーカーである MUC5AC の小腸・大腸粘膜上皮での異所性発現が、クローン病の疾患活動性の指標として有用である可能性がある。

A. 研究目的

炎症性腸疾患（IBD）の疾患活動性を予測あるいは把握する因子の解析が重要であるが、まだまだ不明な点が多い。平成 24 年度第 2 回斑会議で、我々はタクロリムスを導入したステロイド依存性・抵抗性潰瘍性大腸炎患者の治療前後の内視鏡生検組織で胃型粘液形質でありかつ粘膜修復マーカーでもある MUC5AC を検索し疾患活動性との関連性を解析した。今回は、adalimumab（以下 ADA）を投与した biologic naive クローン病 15 症例に対して同様の解析を行った。

B. 研究方法

2010 年 12 月から 2013 年 6 月までに名古屋市立大学病院で ADA を投与し 12 か月以上経過を追えた biologic naive クローン病患者（infliximab 未使用例）15 例について臨床的（Crohn's Disease Activity Index 以下 CDAI、CRP など）および病理学的（内視鏡生検組織での MUC5AC の免疫染色）に検討した。

C. 研究結果

ADA 投与により CDAI 値は、治療前 250 ± 20 (average \pm SE) \rightarrow 3 か月後 $101 \pm 12 \rightarrow$ 12 か月後 84 ± 13 となり、有意差を持って低下した ($P < 0.001$)。CRP 値も、治療前 2.00 ± 0.70 (average \pm SE) \rightarrow 3 か月後 $0.32 \pm 0.12 \rightarrow$ 12 か月後 0.36 ± 0.14 となり、有意差を持って低下した ($P < 0.05$)。腸管での

MUC5AC 異所性発現は、治療前 60.0% (9/15)、3 か月後 33.3% (5/15)、12 か月後 20.0% (3/15) であった。MUC5AC 陰性群（治療前から MUC5AC 陰性の 6 例）では、ADA 治療により 12 か月後に全例が臨床的寛解 (CDAI < 150) を示した。MUC5AC 陽性群 (9 例) では、MUC5AC 発現の減少および消失を示した症例 (6 例) は、12 か月後に臨床的寛解を示したが、MUC5AC 異所性発現が持続した症例 (3 例) は、臨床症状などが改善せず (CRP 再上昇、痔瘻の悪化など)、再燃を呈した。また、ADA 投与の中止を要するような副作用は確認されなかった。

D. 考察

粘膜修復マーカーである MUC5AC の小腸・大腸粘膜上皮での異所性発現が、潰瘍性大腸炎だけでなくクローン病でも疾患活動性の指標として有用である可能性がある。

E. 結論

粘膜修復マーカーである MUC5AC の小腸・大腸粘膜上皮での異所性発現が、潰瘍性大腸炎だけでなくクローン病でも疾患活動性の指標として有用である可能性がある。

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

- 論文発表
1. Annexin A2 regulates a disintegrin and metalloproteinase 17-mediated ectodomain

shedding of pro-tumor necrosis factor- α in monocytes and colon epithelial cells.

Tsukamoto H, Tanida S, Ozeki K, Ebi M, Mizoshita T, Shimura T, Mori Y, Kataoka H, Kamiya T, Fukuda S, Higashiyama S, Joh T., *Inflamm Bowel Dis.*, 19:1365-73, 2013.

2. Colon Mucosa Exhibits Loss of Ectopic MUC5AC Expression in Patients with Ulcerative Colitis Treated with Oral Tacrolimus. Mizoshita T, Tanida S, Tsukamoto H, Ozeki K, Katano T, Ebi M, Mori Y, Kataoka H, Kamiya T, Joh T. *ISRN Gastroenterol.*, 2013:304894, 2013.

3. Maintenance of the remission stage of Crohn's disease with adalimumab therapy during pregnancy. Mizoshita T, Tanida S, Tsukamoto H, Ozeki K, Katano T, Ebi M, Mori Y, Kataoka H, Kamiya T, Joh T. *Intern Med.*, 52:1049-53, 2013.

4. Telmisartan inhibits cell proliferation by blocking nuclear translocation of ProHB-EGF C-terminal fragment in colon cancer cells.

Ozeki K, Tanida S, Morimoto C, Inoue Y, Mizoshita T, Tsukamoto H, Shimura T, Kataoka H, Kamiya T, Nishiwaki E, Ishiguro H, Higashiyama S, Joh T. *PLoS One.* 8:e56770, 2013.

5. Infliximab salvage therapy for patients with ulcerative colitis who failed to respond to tacrolimus. Tsukamoto H, Tanida S, Mizoshita T, Ozeki K, Ebi M, Shimura T, Mori Y, Kataoka H, Kamiya T, Joh T. *Eur J Gastroenterol Hepatol.*, 25:714-8, 2013.

2. 学会発表

1. Hironobu Tsukamoto, Satoshi Tanida, Keiji Ozeki, Tsutomu Mizoshita, Takashi Joh, Efficacy and safety of infliximab salvage therapy for patients with ulcerative colitis who failed to tacrolimus, United

European Gastroenterology Week (UEGW) 2013, Berlin (The Internationales Congress Centrum Berlin (ICC Berlin)), 2013. 10. 15

2. 溝下 勤、谷田諭史、尾関啓司、塚本宏延、片野敬仁、林 則之、田中 守、濱野真吾、西脇裕高、海老 正秀、森 義徳、久保田英嗣、片岡洋望、城 卓志、ムチンコア蛋白 MUC5AC は潰瘍性大腸炎の疾患活動性マーカーとして有用である -Tacrolimus を導入した中等症・重症例での検討-、第 55 回 日本消化器病学会大会 (第 21 回 日本消化器関連学会週間)、東京 (品川プリンスホテル)、2013. 10. 10

3. 尾関啓司、谷田諭史、溝下 勤、塚本宏延、城 卓志、クローン病に対する intensive GMA と adalimumab 併用治療における寛解導入効果の検討、第 55 回 日本消化器病学会大会 (第 21 回 日本消化器関連学会週間)、東京 (品川プリンスホテル)、2013. 10. 11

4. 谷田諭史、尾関啓司、塚本宏延、片岡洋望、神谷 武、城 卓志、活動性クローン病に対して高い有効性を示す adalimumab + intensive GMA 併用療法、第 41 回日本潰瘍学会、大阪 (ホテル阪急エキスポパーク) 2013. 12. 6

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

腸炎における Serum-derived Hyaluronan-Associated Proteins 発現

研究協力者 佐々木 誠人 愛知医科大学消化器内科（消化管部門） 教授

研究要旨：腸炎時には大腸局所に Serum-derived Hyaluronan-Associated Proteins (SHAP) の発現をみとめ、血中の SHAP 濃度と大腸の組織学的炎症の程度が正の相関をしめしことから、SHAP は腸炎の新たなバイオマーカーとなり得る。

A. 研究目的

Hyaluronan acid (HA) と唯一、共有結合する分子として発見された Serum-derived Hyaluronan-Associated Proteins (SHAP) の生理的役割に関しては不明な点が多い。近年、炎症局所と炎症細胞の相互作用への関与が示唆されている。そこで、腸炎における SHAP の発現、役割につき検討した。

B. 研究方法

C57BL/6 マウスに DSS を自由飲水させ、大腸炎を惹起した。大腸における SHAP の発現を免疫組織学的手法により解析した。血中の SHAP 濃度と大腸の組織学的炎症の程度との関連を検討した。

C. 研究結果

正常の大腸においては SHAP の発現はほとんど見られなかったが、腸炎の程度に応じ、粘膜下の線維芽細胞を中心に発現していた。血中の SHAP 濃度と大腸の組織学的炎症との間には正の相関を認めた。

D. 考察

大腸炎の程度と局所での SHAP の発現との関連が示唆され、腸炎への生理的役割つき更なる検討

を要すると思われる。血中の SHAP 濃度が大腸の組織学的炎症の程度を相関することから、SHAP は大腸炎における新たなバイオマーカーとなる可能性を有しており、ヒトにおいての検証が望まれる。

E. 結論

SHAP は腸炎の新たなバイオマーカーとしての可能性秘めている。

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

山口純治, 佐々木誠人, 舟木康, 小笠原尚高, 飯田章人, 増井竜太, 野田久嗣, 岡庭紀子, 春日井邦夫. 腸炎における新規バイオマーカー Serum-derived Hyaluronan-Associated Proteins . 第 41 回日本潰瘍学会：大阪, 2013/12/6.

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

CAP 治療効果予測因子としての温感と皮膚灌流圧に関する研究

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の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 84.8%で温感が認められない場合の寛解率(47.4%)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。また、皮膚灌流圧の上昇は CAP の新たな可能性を示唆するものと考えられた。

A. 研究目的

われわれは潰瘍性大腸炎(UC)難治例に対する血球成分除去療法(CAP)の治療効果予測因子として CAP 治療時の温感の有用性を報告し、温感の生じるメカニズムとして皮膚血流量の増加の関与を報告した。本年度は症例をさらに追加して検討を行った。

B. 研究方法

2002年6月～2013年12月にCAP治療を施行したUC難治例(46例,81回)のうち38例(66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、このうち11例(15回)にレーザー血流量计(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。また、対照として透析患者11例に対しても同様に皮膚灌流圧を測定した。

(倫理面への配慮)

皮膚灌流圧の測定は当院倫理委員会で承認され、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84.8%で、温感が認められなかった症例の寛解率(47.4%)に比べて有意に高値を示した($p<0.01$)。

②足背皮膚灌流圧は、CAP施行前(54.3mmHg)に比

べCAP開始後上昇を示し、終了時には有意な上昇(73.5mmHg)を示した($p<0.01$)。また、CAP有効例は無効例に比べ、灌流圧は上昇傾向を示した。一方、透析患者では透析開始前に比べて透析後足背皮膚灌流圧は低下を示した($p<0.01$)。

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、これまでの検討にて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。症例を追加した今回の検討でも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。また、CAPによる皮膚灌流圧(血流量)の上昇は、動脈硬化性疾患への治療応用など、CAPの新たな可能性を示唆するものとも考えられた。

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
1. 飯塚 政弘、相良 志穂、衛藤 武. 潰瘍性大腸炎に対する血球成分除去療法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検討. 第 55 回日本消化器病学会田大会. 東京 (品川プリンスホテル). 平成 25 年 10 月 10 日.

2. 飯塚 政弘、衛藤 武、相良 志穂. 潰瘍性大腸炎ステロイド依存難治例に対する Long-Interval CAP の治療効果に関する検討. 第 99 回日本消化器病学会総会. 鹿児島 (鹿児島県民交流センター). 平成 25 年 3 月 22 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。

IBD バイオマーカーLRG の臨床応用に向けて

研究協力者 飯島英樹 大阪大学大学院・医学系研究科・消化器内科学 講師

研究要旨：炎症性腸疾患の診断および治療効果予測のため、バイオマーカーの開発が急務である。我々は、網羅的蛋白解析により見出された Leucin-rich a2 glycoprotein (LRG) の炎症性腸疾患における汎用検査法としての有用性を検討した。

が有用であることが確認された。

A. 研究目的

炎症性腸疾患 (IBD) の診断・治療効果予測のバイオマーカーとして、LRG の臨床検査法としての有用性を検討する。

B. 研究方法

IBD 患者、健常者および IBD 以外の腸炎患者の血清を収集し、LRG 値を ELISA 法にて解析した。
(倫理面への配慮)

大阪大学倫理委員会での審査の上、個人情報の匿名化の上、試料の収集を行った。

C. 研究結果

血清 LRG 濃度は IBD 患者で高値であり、CRP でとらえられない疾患活動性の検出にすぐれていた。また、LRG は疾患活動性と相関するとともに、生物学的製剤による治療効果と相関していた。LRG の免疫染色により、炎症腸管局所での LRG 産生が亢進していることが確認された。

D. 考察

LRG は炎症性腸疾患の活動性を反映し、生物学的製剤の治療効果を予測しうる新たなバイオマーカーとなることが確認された。今後も症例数を蓄積し、汎用的臨床検査法としての収載を目指す。

E. 結論

IBD のバイオマーカーとして LRG による診断法

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Shinzaki S, Kuroki E, Iijima H, Tatsunaka N, Ishii M, Fujii H, Kamada Y, Kobayashi T, Shibukawa N, Inoue T, Tsujii M, Takeishi S, Mizushima T, Ogata A, Naka T, Plevy SE, Takehara T, Miyoshi E. Lectin-based Immunoassay for Aberrant IgG Glycosylation as the Biomarker for Crohn's Disease. *Inflamm Bowel Dis* 19(2): 321-31, 2013

2. Mukai A, Iijima H, Hiyama S, Fujii H, Shinzaki S, Inoue T, Shiraishi E, Kawai S, Araki M, Hayashi Y, Kondo J, Mizushima T, Kanto T, Egawa S, Nishida T, Tsujii M, Takehara T. Regulation of anergy-related ubiquitin E3 ligase, GRAIL, in murine models of colitis and patients with Crohn's disease. *J Gastroenterol* In press.

3. Inoue T, Iijima H, Arimitsu J, Keisuke H, Kawai S, Shiraishi E, Hiyama S, Mukai A, Shinzaki S, Nishida T, Ogata A, Tsujii M, Takehara T. Amelioration of small bowel injury by switching from nonselective nonsteroidal anti-inflammatory drugs to celecoxib in rheumatoid arthritis patients. *Digestion* In press.

4. Hiyama S, Iijima H, Shinzaki S, Mukai A, Inoue T, Shiraishi E, Kawai S, Yamada T, Nishida T, Tsujii M, Takehara T. Narrow Band Imaging with Magnifying Endoscopy for Peyer's Patches in Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Digestion* 87(4):269-80, 2013

2. 学会発表

1. Shinzaki S, Iijima H, Inoue T, Tsujii M,

- Miyoshi E, Takehara T. Altered oligosaccharide structures reduce colitis induction in mice defective in glycosyltransferases. 8th Congress of ECCO Vienna, Austria 2013/2/14-16
2. Mukai A, Iijima H, Shinzaki S, Inoue T, Shiraishi E, Hiyama S, Kawai S, Tsujii M, Takehara T. Regulation of Gene Related to T Cell Anergy in Lymphocyte (GRAIL) in Patients With Crohn's Disease and Murine Models of Colitis. 米国 DDW Orlando, USA 2013 年 5 月 18 日
 3. Shiraishi E, Iijima H, Kawai S, Hiyama S, Mukai A, Inoue T, Shinzaki S, Tsujii M, Takehara T. Administration of Vitamin K Suppresses Inflammatory Response in Murine DSS Colitis. 米国 DDW Orlando, USA. 2013 年 5 月 20 日
 4. Shinzaki S, Iijima H, Mizushima T, Nakajima K, Kawai S, Shiraishi E, Hiyama S, Mukai A, Inoue T, Yamada T, Nishida T, Tsujii M, Takehara T. Postoperative Combination of Nutritional Therapy and Infliximab for Sustained Remission of Adult Crohn's Disease. 米国 DDW Orlando, USA. 2013 年 5 月 20 日
 5. Hiyama S, Iijima H, Kawai S, Shiraishi E, Mukai A, Inoue T, Shinzaki S, Tsujii M, Takehara T. Peyer's Patches Play a Protective Role in NSAIDs-Induced Enteropathy. 米国 DDW Orlando, USA 2013 年 5 月 18 日
 6. Fujii H, Shinzaki S, Ishii M, Kamada Y, Iijima H, Tsujii M, Takehara T, Miyoshi E. Deficiency of Fucosylation As a Protective Role for Intestinal Inflammation. 米国 DDW Orlando, USA 2013 年 5 月 18 日
 7. Maekawa A, Komori M, Egawa S, Yamaguchi S, Suzuki K, Nakajima S, Ogawa H, Ueda T, Hiyama S, Inoue T, Yamada T, Shinzaki S, Nishida T, Iijima H, Tsujii M, Takehara T. Effectiveness of Double Balloon Enteroscopy for Obscure Gastrointestinal Bleeding : a Multicenter Retrospective Cohort Study by Osaka Gut Forum. 米国 DDW Orlando, USA 2013 年 5 月 18 日
 8. Inoue T, Kawai S, Iijima H, Mukai A, Shiraishi E, Hiyama S, Shinzaki S, Nishida T, Tsujii M, Miyoshi E, Takehara T. Oligosaccharide Alterations of IgA in Crohn's Disease Induce Inflammatory-Type Immune Responses 米国 DDW Orlando, USA 2013 年 5 月 18 日
 9. Shinzaki S, Iijima H, Kawai S, Shiraishi E, Hiyama S, Mukai A, Inoue T, Nishida T, Plevy SE, Tsujii M, Miyoshi E, Takehara T. Lectin-based immunoassay for Agalactosyl IgG as the biomarker for Crohn's disease. 1st annual meeting of Asian Organization for Crohn's & colitis Tokyo 2013 年 6 月 13 日
 10. Shinzaki S, Iijima H, Fujii H, Kawai S, Shiraishi E, Hiyama S, Mukai A, Inoue T, Tsujii M, Miyoshi E, Takehara T. Altered oligosaccharide structures reduce colitis induction in mice defective in beta-1,4-Galactosyltransferase. 1st annual meeting of Asian Organization for Crohn's & colitis Tokyo 2013 年 6 月 13 日
 11. Hiyama S, Iijima H, Shinzaki S, Inoue T, Shiraishi E, Kawai S, Araki M, Nishida T, Tsujii M, Takehara T. Observation of Peyer's patch using narrow band imaging with magnifying endoscopy is useful in predicting the recurrence in ulcerative colitis patients. UEGW Berlin, Germany. 2013 年 10 月 15 日
 12. 飯島英樹, 辻井正彦, 竹原徹郎. クロウン病の生物学的製剤使用における内視鏡的粘膜治療評価法の検討. 第 85 回日本消化器内視鏡学会総会 京都 2013/5/11
 13. 白石衣里, 飯島英樹, 川井翔一郎, 日山智史, 向井章, 井上隆弘, 新崎信一郎, 辻井正彦, 竹原徹郎. Vitamin K が消化管粘膜炎症に与える影響について 第 99 回日本消化器病学会総会 鹿児島 2013/3/21
 14. 白石衣里, 飯島英樹, 川井翔一郎, 日山智史, 向井章, 井上隆弘, 新崎信一郎, 辻井正彦, 竹原徹郎. 炎症性腸疾患患者における骨粗鬆症治療薬の効果の検討 第 9 回日本消化管学会総会 東京 2013/1/25
 15. 日山智史, 飯島英樹, 川井翔一郎, 白石衣里, 向井章, 井上隆弘, 新崎信一郎, 辻井正彦, 竹原徹郎. クロウン病患者に対する適切なバルーン内視鏡検査間隔の検討. JDDW2013 東京 2013/10/9-12.
 16. 新崎信一郎, 飯島英樹, 竹原徹郎. クロウン病術後の栄養療法・生物学的製剤併用の有用性 JDDW2013 東京 2013/10/9-12.
 17. 新崎信一郎, 飯島英樹, 水島恒和, 西田勉, 辻井正彦. クロウン病術後の栄養療法・生物学的製剤併用の有用性. 第 68 回日本大腸肛門病学会学術集会 東京 2013/11/14
 18. 向井章, 飯島英樹, 竹原徹郎. Gene Related to T cell Anergy in Lymphocyte (GRAIL)陽性 T 細胞は腸炎に対して保護的に作用する. 第 99 回日本消化器病学会総会 鹿児島 2013/3/21
 19. 井上隆弘, 飯島英樹, 竹原徹郎. クロウン病小腸狭窄に対するバルーン拡張術の現況. 日本消化器内視鏡学会 第 91 回支部例会 大阪 2013/11/16
 20. 井上隆弘, 飯島英樹, 竹原徹郎. IgA 糖鎖欠損に基づく炎症性腸疾患の病態解明. 第 50 回消化器免疫学会 東京 2013/8/2
 21. Hiyama S, Iijima H, Shinzaki S, Shibata N, Sato S, Tsujii M, Kiyono H, Takehara T. Peyer's patches play a protective role in NSAIDs-induced small bowel injury. 第 42 回日本免疫学会 千葉 2013/12/11
 22. Fujii H, Shinzaki S, Iijima H, Hiyama S, Tsujii M, Takehara T, Miyoshi E. Altered

oligosaccharide structures reduce colitis
induction in mice defective in
b-1,4-galactosyltransferase I. 第42回日
本免疫学会総会 千葉 2013/12/12.

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

腸内細菌関連炎症性腸疾患バイオマーカーの開発

Data Mining 手法によるクローン病の腸内細菌関連バイオマーカーの検討

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：クローン病腸内細菌叢プロファイルの細菌由来 16S ribosomal 遺伝子を標的とした tRFLP 法によるクラスター解析の検討にて蓄積された restriction fragment OTUs data について、Data Mining 手法により検討することにより、健常人とクローン病さらにはクローン病の活動性の識別に寄与する制限酵素断片を同定した。さらに、16S ribosomal 遺伝子 data base からその候補となる細菌群、すなわち *Desulfovibrio*, *Lawsonia*, *Coprococcus*, *Dorea*, *Roseburia*, *Barautia*, *Faecalibacterium* がクローン病に関連し、*Faecalibacterium*, *Bacteroides*, *Subdoligranulum*, *Peptostreptococcus* がクローン病活動性に関連することを明らかにした。また、pyrosequence 解析を preliminary に実施し、*Faecalibacterium prausnitzii* をはじめとする *Clostriales* がクローン病において菌種レベルで減少していることを明らかにした。

A. 研究目的

クローン病の腸内細菌関連バイオマーカーの開発を目的として、これまでの細菌由来 16S ribosomal 遺伝子の制限酵素断片長プロファイル (tRFLP) 解析で蓄積された断片 OTUs データについて Data Mining 手法により、健常人とクローン病さらにはクローン病の活動性に寄与する制限酵素断片を検討するとともに、16S ribosomal 遺伝子 data base より候補細菌群の同定を行った。

B. 研究方法

共同研究者

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）

故松本譽之・中村志郎（兵庫医大下部消化管科）

小林登志夫（宮城大学）

対象は 4 施設のクローン病 66 症例の活動期 66 検体とその寛解導入期 51 検体、寛解維持期 43 検体、ならびに居住地・性別・年齢をマッチさせた健常対照 121 検体の既報の tRFLP 解析から得ら

れた各断片長ピーク値データであり、Data Mining 解析は共同研究者の小林登志夫氏の作成した解析ソフトを用いた。

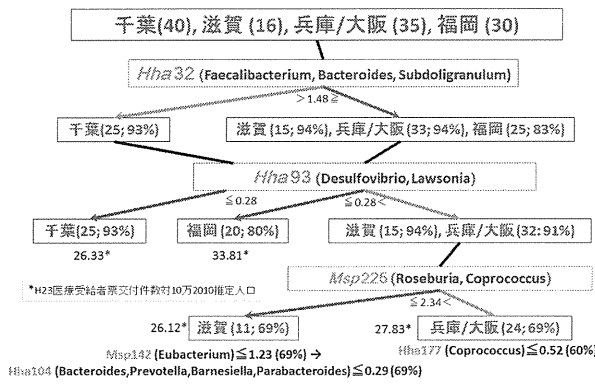
（倫理面への配慮）

本研究は、参加各施設の倫理委員会の承認の下に実施した。分担研究者施設では平成 19 年 4 月 24 日に承認を得ている。（なお、本研究はイーエヌ大塚製薬株式会社と参加各施設との共同研究契約締結の下で行われたことを付記する。）

C. 研究結果

< 健常人腸内細菌叢の地域差の検討 >

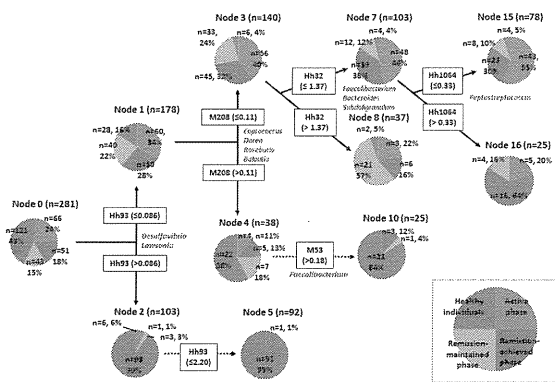
本 Data Mining 解析を用いることにより、健常人腸内細菌叢に地域差の存在が明らかにされた。



図中、各 OUT の 16S rDNA data base から想定される菌群を呈示した。

＜クローン病ならびにその活動性の検討＞

本 Data Mining 解析にてクローン病と健常人を識別する OTU は制限酵素 *HhaI*-93 断片であり、上記 data base からは *Desulfovibrio* と *Lawsonia* に合致した。*Desulfovibrio* は真正細菌で硫酸還元酵素有するとともに有機酸代謝系を持つ。一方、*Lawsonia* はウマの増殖性腸症の原因菌とされる。クローン病検体では健常人検体に比して減少するが、minor population として増加する群が存在する。減少する群においては *MspI*-208 (酪酸産生菌 *Coprococcus*, *Clostridium* cluster XIVa に属する *Dorea*, *Roseburia*, ならびに *Balautia*) の減少群にクローン病とくに活動期検体が集簇する。一方で *MspI*-208 増加群には健常人検体が含まれ、これはさらに *MspI*-53 (*Faecalibacterium*) 増加例でその比率は高くなるとともに、活動期クローン病検体がみられなくなる。



MspI-208 減少群では *HhaI*-32 (*Faecalibacterium*, *Bacteroides*, *Subdoligranulum*) 増加例で寛解維持クローン病検体が、減少例で活動期クローン

病検体の比率が高くなる。そして *HhaI*-1064

(*Peptostreptococcus*) 減少例にクローン病活動期検体の多くが集約される。

以上の結果から、クローン病では硫酸還元菌等の減少例と著増例に大別される可能性、酪酸産生菌等がその活動性に寄与する可能性が示唆される。

D. 考察

Faecalibacterium prausnitzii はクローン病術後再発に関与することが報告されており、我々の検討でも同菌種の便中 RT-PCR 産物量がクローン病の活動性に関与することを明らかにしている。また、pyrosequence 法による preliminary な解析でもクローン病便検体で減少を示した菌種・菌株の多くは *Clostridiales* に属していた。

一方で、*Desulfovibrio* といった硫酸還元菌のクローン病病態への関与については未知な部分が多く今後の検討課題である。

E. 結論

Data Mining 手法による便中 tRFLP 法断片の解析により、健常人腸内細菌の地域差、そしてクローン病さらにはその活動性に寄与する候補腸内細菌群の存在が明らかとなった。

F. 健康危険情報なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Andoh A, Kobayashi T, Kuzuoka H, Suzuki Y, Matsui T, Nakamura S, Matsumoto T, Fujiyama Y, Bamba T. Data mining analysis of terminal restriction fragment length polymorphism shows geographical differences in the human gut microbiota. *Biomedical Reports* 1(4):559-562, 2013

2) Takahashi K, Imaeda H, Fujimoto T, Ban H, Bamba S, Tsujikawa T, Sasaki M, Fujiyama Y, Andoh A. Regulation of eotaxin-3/CCL26 expression by Th2 cytokines in human colonic myofibroblasts. *Clin Exp Immunol.* 173(2):323-31, 2013

3) Imaeda H, Takahashi K, Fujimoto T, Kasumi E, Ban H, Bamba S, Sonoda H, Shimizu T, Fujiyama Y, Andoh A. Epithelial expression of interleukin-37b in inflammatory bowel

disease. Clin Exp Immunol. 172(3):410-6, 2013

4) Imaeda H, Bamba S, Takahashi K, Fujimoto T, Ban H, Tsujikawa T, Sasaki M, Fujiyama Y, Andoh A. Relationship between serum infliximab trough levels and endoscopic activities in patients with Crohn's disease under scheduled maintenance treatment. J Gastroenterol. 2013 May 11. [Epub ahead of print]

5) Imaeda H, Takahashi K, Fujimoto T, Bamba S, Tsujikawa T, Sasaki M, Fujiyama Y, Andoh A. Clinical utility of newly developed immunoassays for serum concentrations of adalimumab and anti-adalimumab antibodies in patients with Crohn's disease. J Gastroenterol. 2013 Apr 11. [Epub ahead of print]

6) Okuyama Y, Andoh A, Nishishita M, Fukunaga K, Kamikozuru K, Yokoyama Y, Ueno Y, Tanaka S, Kuge H, Yoshikawa S, Sugahara A, Anami E, Munetomo Y, Watanabe C, Fujiyama Y, Matsumoto T. Multicenter prospective study for clinical and endoscopic efficacies of leukocytapheresis therapy in patients with ulcerative colitis. Scand J Gastroenterol. 48(4):412-8. 2013

7) 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. 28(4):613-9, 2013

2) Fujimoto T, Imaeda H, Iakahashi K, Kanda T, Fujiyama Y, Andoh A. Evaluation of and quantification of Faecalibacterium prausnitzii in the gut microbiota of Crohn's disease. 16th International Congress of Mucosal Immunology. Vancouver, 2013年6月18日

3) Takahashi K, Imaeda H, Fujimoto T, Knada T, Fujiyama Y, Andoh A. Counter-regulation of eotaxin-3/CCL26 expression by Th1 and Th2 cytokines in human colonic myofibroblast. 16th International Congress of Mucosal Immunology. Vancouver, 2013年6月18日

4) Ban H, Imaeda H, Takahashi K, Fujimoto T, Kanda T, Osaki R, Bamba S, Sasaki M, Tsujikawa T, Fujiyama Y, Andoh A. The ATP-cassette binding protein 4 (ABCC4)/ multidrug resistance protein 4 (MRP4) polymorphism is a new factor accounting for thiopurine sensitivity in Japanese patients with inflammatory bowel disease. The 1st Annual Meeting of Asian Organization for Crohn's & Colitis. Tokyo, 2013年6月13日

5) Imaeda H, Takahashi K, Fujimoto T, Bamba S, Sasaki M, Tsujikawa T, Fujiyama Y, Andoh A. Accurate determination of serum adalimumab and anti-adalimumab antibodies levels during maintenance therapy for Crohn's disease. Digestive Disease Week 2013 (The Annual Meeting of American Gastroenterology Association). Orland, 2013年5月19日

2. 学会発表

1) Bamba S, Tsujikawa T, Ban H, Imaeda H, Mochizuki Y, Inatomi O, Sasaki M, Saitoh Y, Andoh A, Fujiyama Y. Predicting mucosal healing in Crohn's disease using practical indices with regard to the location of active disease. United European Gastroenterology Week 2013. Berlin, 2013年10月15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

新規乳酸菌由来の活性物質による新規腸炎治療の開発

分担研究者 高後 裕 旭川医科大学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 b1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 b1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C57B1/6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100mg/mlのポリリン酸を注腸投与するポリリン酸注腸群の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ポリリン酸を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, ポリリン酸との結合能を調べた。

Caco2/bbe細胞に標識ポリリン酸を添加し, ポリリン酸の動態を調べた。Integrin β 1のshRNAをcaco2/bbe細胞に導入し, ポリリン酸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, ポリリン酸の作用の変化を調べた。細胞のバリア機能については, トランスウェルに単層培養したcaco2/bbe細胞に ^3H 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 ^3H 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 μg の麦芽乳酸菌およびプラセボを

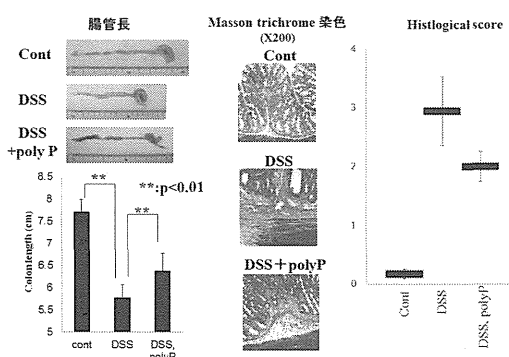
30日間投与して, 有害事象の発現および腹部症状の変化を調べた。

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(ポリリン酸)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ポリリン酸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ポリリン酸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はポリリン酸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 ポリリン酸投与により炎症関連メディエーターの発現が低下した。

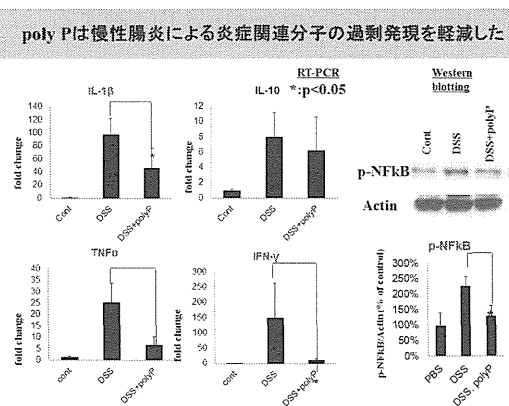
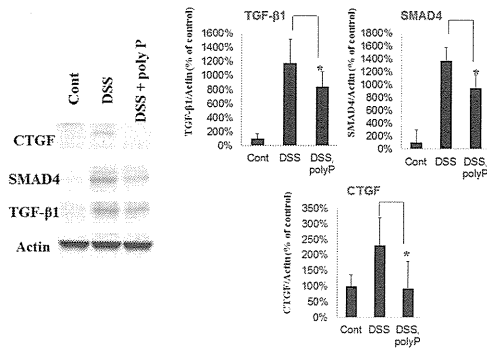


図3 ポリリン酸投与により線維化関連メディエーターの発現が低下した。

polyPは慢性炎症による腸管線維化の形成・維持分子を抑制した



さらに、ポリリン酸が腸管上皮細胞、マクロファージ、線維芽細胞に対してそれぞれどのような作用を及ぼすかについて検討した。リポポリサッカライド(LPS)で刺激した腸管上皮由来caco2/bbe細胞では、各種炎症性サイトカインや線維化関連分子TGF- β 1の発現が増強されたが、ポリリン酸はIL-1 β およびTGF- β 1の過剰発現を有意に抑制した。また、マクロファージに分化させたTHP-1細胞を用いて同様の実験を行った結果、ポリリン酸はTNF α およびTGF- β 1の過剰発現を有意に抑制した。一方、ポリリン酸は線維芽細胞由来CCD-18に対して特に作用を示さなかった。

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

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

図4 ポリリン酸はintegrin β 1と結合する。

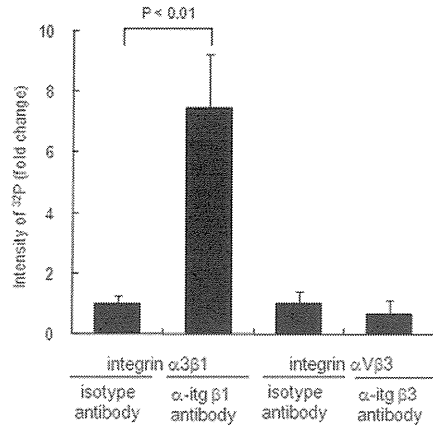


図5 ポリリン酸はintegrin β 1と結合する。

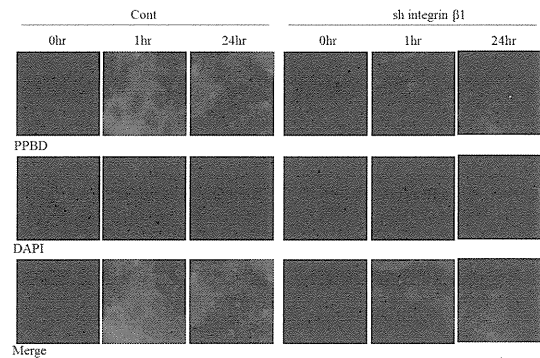
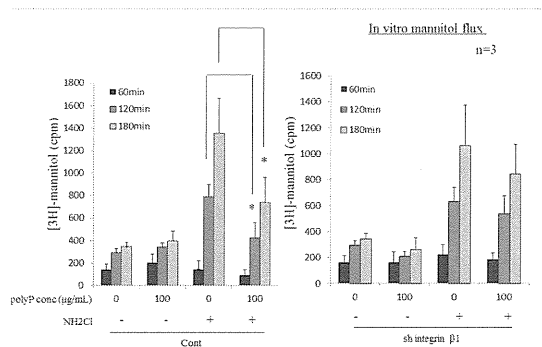
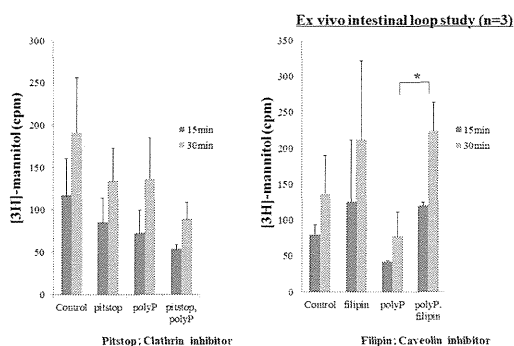


図6 integrin β 1のshRNAはポリリン酸の細胞バリア機能増強作用を減弱する。



さらにポリリン酸の細胞バリア増強作用は、clathrinのinhibitor (pitstop)では変化がなかったが caveolinのinhibitor (Filipin)で著しく抑制された(図7)。

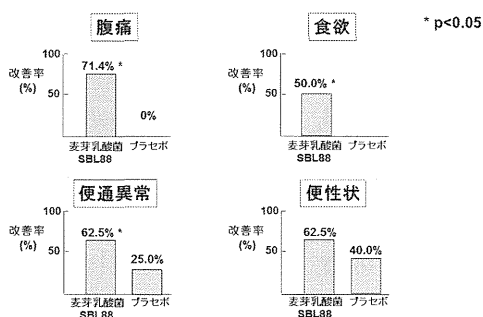
図7 ポリリン酸の細胞バリア増強作用は caveolinのinhibitorで抑制された。



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 由来の活性物質ポリリン酸は、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。ポリリン酸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、本検討によりポリリン酸の作用は、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ポリリン酸の動態を解析し、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。ポリリン酸の作用は、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. Fujiya M, Ueno N, Kohgo Y. Probiotic treatments for induction and maintenance of remission in inflammatory bowel diseases: A meta-analysis of randomized controlled trials. Clin J Gastroenterol. (in press)

2. Fujiya M, Konishi H, Kamel M.K.M, Ueno N, Inaba Y, Moriichi K, Tanabe H, Ikuta K, Ohtake T, Kohgo Y. microRNA-18a induces apoptosis in colon cancer cells via the autophagolysosomal degradation of oncogenic heterogeneous nuclear. *Oncogene*. (in press)
 3. Ichiki K, Ikuta K, Addo L, Tanaka H, Sasaki Y, Shimonaka Y, Sasaki K, Ito S, Shindo M, Ohtake T, Fujiya M, Torimoto Y, Kohgo Y. Up-regulation of iron regulatory hormone hepcidin by interferon α . *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. (in press)
 4. Sawada K, Ohtake T, Hasebe T, Abe M, Tanaka H, Ikuta K, Suzuki Y, Fujiya M, Hasebe C, Kohgo Y. Augmented hepatic Toll-like receptors by fatty acids trigger the pro-inflammatory state of nonalcoholic fatty liver disease in mice. *Hepatology Research*. (in press)
 5. Kawamoto T, Sasajima J, Sugiyama Y, Nakamura K, Tanabe H, Fujiya M, Nata T, Iuchi Y, Ashida T, Torimoto Y, Mizukami Y, Kohgo Y. Ex vivo activation of angiogenic property in human peripheral blood-derived monocytes by thrombopoietin. *Int J Hematol*. 98(4):417-29, 2013.
 6. Nomura Y, Tanabe H, Moriichi K, Igawa S, Ando K, Ueno N, Kashima S, Tominaga M, Goto T, Inaba Y, Ito T, Ishida-Yamamoto A, Fujiya M, Kohgo Y. Reduction of E-cadherin by Human Defensin-5 in Esophageal Squamous Cells. *Biochem Bioph Res Co*. 439(1):71-7, 2013.
 7. Nata T, Fujiya M, Ueno N, Moriichi K, Konishi H, Tanabe H, Ohtake T, Ikuta K, Kohgo Y. microRNA-146b improves intestinal injury in mouse colitis by activating NF- κ B and improving epithelial barrier function. *Journal of Gene Medicine*. 15(6-7):249-60, 2013
 8. 藤谷幹浩、高後 裕. 潰瘍性大腸炎と粘膜治癒. *日本消化器病学会雑誌*. 110(11):1900-8, 2013.
 9. 藤谷幹浩、高後 裕. 妊娠中の炎症性腸疾患患者における抗 TNF- α 抗体製剤の胎盤通過. *Review of Gastroenterology & Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 8(2): 22-25, 2013.
2. 学会発表
 1. Inaba Y, Fujiya M, Kohgo Y. The novel probiotic function through activation of intestinal epithelial autophagy. 16th International Congress of Mucosal Immunology (ICMI 2013). Vancouver.
 2. Fujiya M, Segawa S, Ueno N, Inaba Y, Moriichi K, Kohgo Y. A probiotic-derived polyphosphate improves chronic inflammation and fibrosis via caveolin-dependent endocytosis. GI Research Academy 2013. Kyoto.
 3. Ueno N, Fujiya M, Segawa S, Dokoshi T, Ando K, Inaba Y, Moriichi K, Tanabe H, Kobayashi N, Shigyo T, Kohgo Y. Treatment with the heat-killed body of *Lactobacillus brevis* SBC8803 ameliorates intestinal injury in a dextran sulfate sodium-induced chronic colitis model by enhancing the intestinal barrier function. AOCC2013. Tokyo.
 4. Konishi H, Fujiya M, Segawa S, Kashima S, Ueno N, Tanaka K, Sakatani A, Dokoshi T, Ando K, Tominaga M, Inaba Y, Ito T, Tanabe H, Moriichi K, Kohgo Y. A probiotic-derived polyphosphate improves chronic inflammation and fibrosis via caveolin-dependent endocytosis. DDW 2013 (AGA). Orland.
 5. Sakatani A, Fujiya M, Konishi H, Segawa S, Kashima S, Ueno N, Tanaka K, Dokoshi T, Ando

K, Tominaga M, Inaba Y, Ito T, Tanabe H, Moriichi K, Kohgo Y. Probiotic-derived polyphosphate inhibits colon cancer progression through the inactivation of the ERK pathway and the induction of cancer cell apoptosis. DDW 2013 (AGA). Orland.

6. Fujiya M, Konishi H, Ueno N, Inaba Y, Ito T, Moriichi K, Tanabe H, Segawa S, Shigyo T, Kohgo Y. A polyphosphate derived from *Lactobacillus brevis* improves the intestinal barrier function and injury in acute and chronic experimental colitis. Kyoto.

7. 藤谷幹浩、上野伸展、後藤拓磨、笹島順平、稲場勇平、伊藤貴博、盛一健太郎、高後 裕. microRNA-18a による癌関連蛋白 hnRNP A1 の機能抑制を介した大腸癌細胞のアポトーシス誘導. 第 108 回北海道癌談話会例会. 旭川.

8. 藤谷幹浩、嘉島 伸、高後 裕. 乳酸菌由来長鎖ポリリン酸を用いた新しい腸炎治療の開発. 第 50 回消化器免疫学会. 東京.

9. 藤谷幹浩、小西弘晃、高後 裕. 菌由来物質の腸上皮内輸送を介した新しい宿主-細菌相互作用機構の解明. 第 50 回消化器免疫学会. 東京.

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

腸炎における Claudin-2 の役割について

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：炎症性腸疾患において、Tight junction(TJ)の構成成分である claudin の発現が疾患に関与していることが報告されている。しかし、複数ある claudin の中で、炎症性腸疾患における claudin-2 の役割についてはその詳細は未だ不明である。本研究では、claudin-2 ノックアウトマウスを用い、腸炎における claudin-2 の役割を検討した。更に、腸管上皮の細胞株である Caco-2 細胞で claudin-2 の発現を siRNA で低下させ検討したところ、claudin-2 は TJ の透過性に関与する myosin light chain kinase (MLCK) の発現を制御することで腸管の炎症を修飾する機能があることが示唆された。

A. 研究目的

近年、TJ の構成成分である claudin の発現変動が様々な疾患に関与することが報告されており、炎症性腸疾患でも claudin の関与が明らかにされた。炎症性腸疾患において claudin-2 発現が変動することが報告されたが、腸管の炎症における claudin-2 の役割については、まだよくわかっていない。本研究では claudin-2 ノックアウトマウスを用いて、大腸の炎症における claudin-2 の役割について検討した。

B. 研究方法

claudin-2 ノックアウトマウスに TNF- α を腹腔内投与し、大腸の炎症反応の変化について検討した。また、DSS(デキストラン硫酸ナトリウム)をマウスに摂取させることで、腸炎における claudin-2 の役割について評価した。さらに、Caco-2 細胞を用いて、claudin-2 の siRNA を導入することで、TNF- α 誘導性の炎症反応における claudin-2 の役割について検討した。

(倫理面への配慮)

神戸大学動物実験委員会の規約に沿い、動物への倫理的配慮を行った。

C. 研究結果

Claudin-2 ノックアウトマウスに TNF- α を投与した結果、ノックアウトマウスにおいて腸管での IL-6、TNF- α 、IL-1 β などの発現が上昇するなど、炎症反応が野生株に比べ増強されることが分かった。更に、ノックアウトマウスの大腸組織の NF κ B のシグナル伝達への影響を調べた結果、ノックアウトマウスでは NF- κ B シグナル伝達が増強されていた。また、TJ の透過性に関与する myosin light chain kinase (MLCK) の発現もノックアウトマウスで増加していた。MLCK の発現増強は上皮細胞の透過性を上昇させることが知られており、claudin-2 ノックアウトマウスでの TNF- α に対する炎症反応の増強が MLCK を介している可能性が考えられた。そこで、Caco-2 細胞において siRNA にて claudin-2 の発現を抑制し TNF- α 誘導性の炎症反応を誘導したところ、*in vivo* の結果と同様に、IL-6、IL-1 β の発現がコントロールに比べ増強していた。この炎症反応の増強は、Caco-2 細胞に MLCK の阻害剤を投与し細胞を刺激すると消失したことから、炎症反応の増強は MLCK を介していることが示唆された。また Caco-2 細胞を MLCK 阻害剤の存在下と非存在下に TNF- α で刺激し上皮細胞の透過性を調べたところ、非存在下では透

過性が亢進したのに対し、存在下では透過性亢進は認められなかった。したがって、腸管で炎症が惹起された際、claudin-2 の発現が MLCK の発現を抑制し、過剰な透過性亢進が抑制され炎症反応が増強しない防御機構が存在する可能性が考えられた。その機能を更に検討するため、炎症性腸疾患のモデルとしてノックアウトマウスへ DSS 腸炎を誘導し腸炎の形質を調べたところ、予測された通り Claudin-2 ノックマウスでは腸炎の増悪が認められた。

D. 考察

Claudin-2 ノックアウトマウスでは TNF- α 誘導性の炎症反応による NF- κ B シグナル伝達と MLCK 発現が増強されることが示唆された。更に MLCK は上皮細胞の透過性を亢進させることが示唆され、MLCK を介し、Claudin-2 が腸管上皮における透過性を制御する機能があることが示唆された。

E. 結論

claudin-2 は MLCK 依存的に上皮の透過性を修飾することにより、大腸の炎症を制御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

Nishida M, Yoshida M, Nishiumi S, Furuse M, Azuma T. Claudin-2 regulates colorectal inflammation via myosin light chain kinase-dependent signaling. *Dis Dis Sci*, 58(6):1546-59, (2013)

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし