

IL-10, IL-27 のサブユニット Ebi3, IL-27p28 の発現が上昇した。そこで、IL-10 ノックアウトマウス由来の CD103 陽性樹状細胞を *B. breve* で刺激し、野生型マウスのナイーブ T 細胞と共培養したところ、T 細胞からの IL-10 産生は誘導されなかった。また、野生型マウスの CD103 陽性樹状細胞を *B. breve* で刺激し、IL-27 receptor ノックアウトマウスのナイーブ T 細胞と共培養すると T 細胞からの IL-10 産生は誘導されなかった。この結果から、腸管の CD103 陽性樹状細胞が *B. breve* 刺激により IL-10, IL-27 を産生し、Tr1 細胞の分化を誘導することが明らかになった。次に、CD103 陽性樹状細胞が *B. breve* により活性化される機構について解析した。TLR2 欠損マウス由来の CD103 陽性樹状細胞を *B. breve* で刺激し、野生型マウスのナイーブ T 細胞と共培養したところ、T 細胞からの IL-10 産生は誘導されなかった。このことから、CD103 陽性樹状細胞は、TLR2 依存性に *B. breve* を認識し Tr1 細胞分化を誘導することが明らかになった。次に、*B. breve* による Tr1 細胞分化誘導の腸管炎症制御における意義を解析した。SCID マウスにナイーブ T 細胞を移入すると大腸炎が発症する。しかし、ナイーブ T 細胞移入後、*B. breve* を連日投与すると腸管炎症は優位に抑制された。しかし、移入するナイーブ T 細胞を IL-10 ノックアウトマウス由来にすると、*B. breve* 投与による腸管炎症の改善は認められなかった。

BALB/c 妊娠雌マウスにコントロール食、葉酸欠損食を投与し、6 週令になった産仔では、大腸における葉酸の濃度が著明に減少していた。これらのマウスから、脾臓、腸管膜リンパ節、小腸、大腸粘膜固有層を単離し、CD4 陽性 T 細胞における IFN- γ , IL-17, IL-10 の産生および Foxp3 の発現を細胞内染色法で flow cytometry により解析した。その結果、大腸粘膜固有層において CD4 陽性 Foxp3 陽性細胞の数が有意に減少した。大腸粘膜固有層以外の臓器、そして他のサイトカイン産生には優位な変化はないことから、葉酸欠乏により大腸粘膜固有層の Foxp3 陽性制御性 T 細胞 (Treg) の数が特異的に減少することが明らかになった。

脾臓などの組織での Foxp3 陽性 Treg は、葉酸受容体である folate receptor 4 (FR4) を発現している。大腸粘膜固有層の Foxp3 陽性 Treg も FR4 を同じように発現しており、葉酸欠乏食により FR4 陽性 Foxp3 陽性 CD4 T 細胞の数が減少した。そこで、FR4 を介したシグナルの関与を、FR4 中和抗体 (Fab fragment) のマウスへの投与により解析した。その結果、FR4 中和抗体 Fab の投与により、葉酸欠乏食と同じように、大腸粘膜固有層においてのみ、Foxp3 陽性 Treg の数が有意に減少した。以上の結果から、大腸粘膜固有層においてのみ、葉酸受容体を介して Foxp3 陽性 Treg の数が維持されていることが示唆された。これまで、Foxp3 陽性 Treg の維持には IL-2 が重要であることが示されている。実際、IL-2 中和抗体をマウスに投与すると脾臓での Foxp3 陽性 Treg が減少する。大腸粘膜固有層では、IL-2 中和抗体の投与により Foxp3 陽性 Treg の数がやや減少し、さらに葉酸欠乏食にするとその数が著明に減少した。このことから、大腸粘膜固有層では IL-2 により維持される末梢の Foxp3 陽性 Treg と異なり、IL-2 および葉酸によりその数が維持されていることが明らかになった。脾臓と大腸粘膜固有層では Foxp3 陽性 Treg のどのような相違点があるのかをさらに解析した。その結果、大腸粘膜固有層の Foxp3 陽性 Treg では、脾臓の Foxp3 陽性 Treg と比べて、CD62L の発現が低く、Foxp3 陽性 Treg の活性化マーカーである CTLA-4, GITR の発現が亢進していた。さらに、Ki67 抗体で強く染まる増殖活性の高い細胞数の割合が多くなっていた。また、大腸粘膜固有層の Foxp3 陽性 Treg は脾臓の細胞に比べて試験管内で培養するとアポトーシスに対する感受性が高く、さらに葉酸欠乏培養液にするとアポトーシスの割合が著明に増加することが明らかになった。これらの結果から、大腸粘膜固有層の Foxp3 陽性 Treg は、脾臓の Foxp3 陽性 Treg に比べて活性化状態にあり、その結果、細胞死に対する感受性が高いことが明らかになった。次に、葉酸欠乏による Foxp3 陽性 Treg の数の減少の腸管炎症におよぼす影響を解析した。

コントロール食および葉酸欠損食を投与しているマウスに、2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) を注腸投与すると、コントロール食マウスに比べて、葉酸欠乏食マウスでは腸管炎症が顕著に悪化した。葉酸欠乏食マウスにおける TNBS 腸炎高感受性が Treg 減少によるものかを解析するため、葉酸欠乏食マウスにあらかじめ Treg を投与し、TNBS 腸炎を誘導した。すると、Treg 投与により TNBS 腸炎が改善した。これらの結果から、葉酸欠乏による Treg 減少が腸管炎症の感受性を高めることが明らかになった。

D. 考察

腸管粘膜固有層に特有の自然免疫細胞として、新たに CX3CR1^{high}CD11b⁺CD11c⁺サブセットを同定した。この細胞は、腸管粘膜固有層で T 細胞増殖を抑制し、腸管炎症を制御していることから制御性ミエロイド細胞と命名したい。このように、腸管には種々の自然免疫細胞が存在し、腸管免疫系を制御していることが明らかになった。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。プロバイオティクス細菌 *B. breve* が、腸管 CD103 陽性樹状細胞に作用し、TLR2 依存的な IL-10、IL-27 の産生誘導を介して、IL-10 産生性 Tr1 細胞の分化を大腸で誘導することが明らかになった。さらに、この IL-10 産生性 T 細胞の誘導は腸管炎症の抑制において重要な役割を担っていることも明らかになった。

緑黄色野菜に含まれるビタミン B9 (葉酸) が、大腸粘膜固有層の制御性 T 細胞の数の維持に関わっていることが明らかになった。

E. 結論

マウス大腸粘膜固有層に、T 細胞増殖を抑制する制御性ミエロイド細胞を見出した。ヒト大腸粘膜固有層に、Th17 細胞を誘導する樹状細胞を見出した。さらに、クローン病患者では Th17 細胞の誘導活性が高くなっていた。*B. breve* が、大腸で

IL-10 産生性 Tr1 細胞の分化を誘導することにより腸管炎症を制御することを見出した。緑黄色野菜に含まれるビタミン B9 (葉酸) が、大腸粘膜固有層の制御性 T 細胞の数の維持に関わっていることを明らかにした。

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., Umamoto, 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).
- 7) Shigekawa, M., Hikita, H., Kodama, T., Shimizu, S., Li, W., Uemura, A., Miyagi, T., Hosui, A., Kanto, T., Hiramatsu, N., Tatsumi, T., Takeda, K., Akira, S., and Takehara, T.: Pancreatic STAT3 protects mice against caerulein-induced pancreatitis via PAP1 induction. *Am. J. Pathol.* 181, 2105-2113 (2012).
- 8) Saiga, H., Kitada, S., Shimada, Y., Kamiyama, N., Okuyama, M., Makino, M., Yamamoto, M. and Takeda, K.: Critical role of AIM2 in Mycobacterium tuberculosis infection. *Int. Immunol.* 24, 637-644 (2012).
- 9) Kinoshita, M., Kayama, H., Kusu, T., Yamaguchi, T., Kunisawa, J., Kiyono, H., Sakaguchi, S. and Takeda, K.: Dietary folic acid promotes survival of Foxp3⁺ regulatory T cells in the colon. *J. Immunol.* 189, 2869-2878 (2012).
- 10) Kayama, H., and Takeda, K.: Regulation of gut homeostasis by innate immunity. *Int. Immunol.* 24, 673-680 (2012).
- 11) Yamamoto, M., Okuyama, M., Ma, J. S., Kimura, T., Kamiyama, N., Saiga, H., Ohshima, J., Kayama, H., Okamoto, T., Huang, D. C. S., Soldati-Farve, D., Horie, K., Takeda, J. and Takeda, K.: A cluster of IFN- γ -inducible p65 GTPases plays a critical role in host defense against *Toxoplasma gondii*. *Immunity* 37, 302-313 (2012).
- 12) Vandenbon, A., Teraguchi, S., Akira, S., Takeda, K. and Standley, D.: Toll-like receptor signaling. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* 4, 497-507 (2012).
- 13) Jeon, S. G., Kayama, H., Ueda, Y., Takahashi, T., Asahara, T., Tsuji, H., Tsuji, N. M., Kiyono, H., Ma, J. S., Kusu, T., Okumura, R., Hara, H., Yoshida, H., Yamamoto, M., Nomoto, K. and Takeda, K.: Probiotic *Bifidobacterium breve* induces IL-10-producing Tr1 cells in the colon. *PLoS Pathogens* 8, e1002714 (2012).
- 14) Kayama, H., Ueda, Y., Sawa, Y., Jeon, S. G., Ma, J. S., Okumura, R., Kubo, A., Ishii, M., Okazaki, T., Murakami, M., Yamamoto, M., Yagita, H. and Takeda, K.: Intestinal CX₃C chemokine receptor 1^{high} (CX₃CR1^{high}) myeloid cells prevent T cell-dependent colitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 109, 5010-5015 (2012).
- 15) Takata, K., Kinoshita, M., Okuno, T., Moriya, M., Kohda, T. Honorat. J.A., Sugimoto, T., Kumanogoh, A., Kayama, H., Takeda, K., Sakoda, S. and Nakatsuji, Y.: The lactic acid bacterium *Pediococcus acidilactici* suppresses autoimmune encephalomyelitis by inducing IL-10-producing regulatory T Cells. *PLoS One* 6, e27644, (2011).
- 16) Matsuda, A., Ogawa, M., Yanai, H., Naka, D., Goto, A., Ao, T., Tanno, Y., Takeda, K., Watanabe, Y., Honda, K., and Taniguchi, T.: Generation of mice deficient in RNA-binding motif protein 3 and characterization of its role in innate immune responses and cell growth. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 411, 7-13 (2011)
- 17) Yamamoto, M., Ma, J. S., Mueller, C., Kamiyama, N., Saiga, H., Kubo, E., Kimura, T., Okamoto, T., Okuyama, M., Kayama, H., Nagamune, K., Takashima, S., Matsuura, Y., Soldati-Farve, D. and Takeda, K.: ATF6b is a host cellular target of the *Toxoplasma gondii* virulence factor ROP18. *J. Exp. Med.* 208, 1533-1546 (2011).
- 18) Saiga, H., Shimada, Y. and Takeda, K.: Innate immune effectors in mycobacterial infection. *Clin. Dev. Immunol.* 2011, 347594 (2011).
- 19) Iwata-Kajihara, T., Sumimoto, H., Kawamura, N., Ueda, R., Takahashi, T., Mizuguchi, H., Miyagishi, M., Takeda, K. and Kawakami, Y.: Enhanced cancer immunotherapy using STAT3-depleted dendritic cells with high Th1-inducing ability and resistance to cancer cell-derived inhibitory factors. *J.*

Immunol. 187, 27-36 (2011).

- 20) Atarashi, K., Tanoue, T., Shima, T., Imaoka, A., Kuwahara, T., Momose, Y., Cheng, G., Yamasaki, S., Saito, T., Ohba, Y., Taniguchi, T., Takeda, K., Hori, S., Ivanov, I. I., Umesaki, Y., Itoh, K., Honda, K.: Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species. *Science* 331, 337-341 (2011).
 - 21) Ueda, Y., Kayama, H., Jeon, S.-G., Kusu, T., Isaka, Y., Rakugi, H., Yamamoto, M. and Takeda, K.: Commensal microbiota induce LPS hyporesponsiveness in colonic macrophages via the production of IL-10. *Int. Immunol.* 22, 953-962 (2010).
 - 22) Yamamoto, M. and Takeda, K.: Current views of Toll-like receptor signaling pathways. *Toll-Like Receptor Signaling in Liver Diseases*. 2010, 240365 (2010).
 - 23) Okuyama, M., Kayama, H., Atarashi, K., Saiga, H., Kimura, T., Waisman, A., Yamamoto, M., and Takeda, K.: A novel inducible dendritic cell ablation model in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 397, 559-563 (2010).
 - 24) Obana, M., Maeda, M., Takeda, K., Hayama, A., Mohri, T., Yamashita, T., Nakaoka, Y., Komuro, I., Takeda, K., Matsumiya, G., Azuma, J. and Fujio, Y.: Therapeutic activation of STAT3 by interleukin-11 ameliorates cardiac fibrosis after myocardial infarction. *Circulation* 121, 684-691 (2010).
 - 25) Kayama, H. and Takeda, K.: The innate immune response to *Trypanosoma cruzi* infection. *Microbes Infect.* 12, 511-517 (2010).
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—、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
 - 12) Kiyoshi Takeda Regulation of intestinal homeostasis by innate immunity The 4th AsiaHORCs Joint Symposium, Buyeo, Korea, November 11-14, 2012
 - 13) Kiyoshi Takeda, Hisako Kayama, Seong Gyu Jeon Probiotics and innate immunity: Implication for chronic disease prevention 5th India Probiotics Symposium, December 15-16, 2012, Bangalore, India
 - 14) Kiyoshi Takeda Regulation of intestinal inflammation by innate immunity The 6th Nagasaki Symposium on Tropical and Emerging Infectious Diseases, The 11th Nagasaki-Singapore Medical Symposium, December 10-12, 2012, Nagasaki
 - 15) Kiyoshi Takeda Regulation of gut homeostasis by innate immunity International Endotoxin & Innate Immunity Society Meeting 2012, October 23-26, 2012, Tokyo

- 16) Kiyoshi Takeda Regulation of gut homeostasis by innate immunity The 34th Naito Conference, October 16-18, 2012, Sapporo, Japan
- 17) 竹田潔 腸管免疫と炎症制御 第44回日本動脈硬化学会総会・学術集会、2012年7月20日、福岡
- 18) 竹田潔 プロバイオティクス細菌による腸管免疫制御機構 第12回日本抗加齢医学会総会、2012年6月24日、横浜
- 19) Kiyoshi Takeda Regulation of gut homeostasis by innate immunity The 7th RCAI International Summer Program, June 22-27, 2012, Yokohama
- 20) Kiyoshi Takeda Regulation of gut homeostasis by innate immunity Macrophage Molecular and Cellular Biology 2012, June 15-16, 2012, Tokyo
- 21) 竹田潔 自然免疫と消化管疾患 第24回日本アレルギー学会春季臨床大会、2012年5月12日、大阪
- 22) Kiyoshi Takeda Regulation of gut homeostasis by innate immunity ICAD Forum, April 18-19, 2012, Tokyo
- 23) 竹田潔 自然免疫系による慢性炎症性腸疾患の制御 第49回日本臨床分子医学会学術総会、2012年4月13-14日、京都
- 24) Kiyoshi Takeda, Hisako Kayama. Regulatory Mechanisms of Immune Responses to Intestinal Bacteria. Keystone Symposium 2012年3月4-8日, Key Stone, USA
- 25) Kiyoshi Takeda Regulation of gut homeostasis by innate immunity. The 4th Symposium of Immunological Self. 2012年1月27-28日、京都
- 26) Kiyoshi Takeda, Hisako Kayama, A unique subset of intestinal myeloid cells suppress T cell-dependent intestinal inflammation. 第40回日本免疫学会学術集会(国際シンポジウム) 2011年11月27-29日、千葉
- 27) Kiyoshi Takeda, Hisako Kayama. Regulation of intestinal homeostasis by innate immunity. 日本食品免疫学会第7回学術大会、2011年10月18-19日、東京
- 28) Kiyoshi Takeda. Regulation of intestinal homeostasis by innate immunity. The New Zealand Australian Society for Immunology Branch Meeting 2011, June 30-July1, 2011. Wellington, New Zealand
- 29) 竹田潔, 自然免疫と炎症性疾患. 第48回日本眼感染症学会、2011年7月8-10日、京都
- 30) 竹田潔, 自然免疫による腸管免疫の制御. 第28回日本医学会総会、2011年4月8-10日、東京
- 31) Kiyoshi Takeda Regulation of intestinal homeostasis by innate immunity. CSI-IFReC Joint Symposium, November 3-4, 2010, Hangzhou, China
- 32) Kiyoshi Takeda Innate immune responses at the intestinal mucosa. Annual Meeting of The Society for Leukocyte Biology & The International Endotoxin and Innate Immunity Society, October 7-9, 2010, Vancouver, Canada
- 33) Kiyoshi Takeda Innate immune responses at the intestinal mucosa. 8th German-Japanese Symposium, September 26-29, 2010, Cuxhaven, Germany
- 34) Kiyoshi Takeda Regulation of innate immune responses at the intestinal mucosa. Host-Pathogen interactions in generalized bacterial infection. May 31-June 3, 2010, Greifswald, Germany
- 35) 竹田潔, 自然免疫系の活性制御と腸管炎症. 第22回微生物シンポジウム(特別講演)、2010年9月3-4日、大阪
- 36) Kiyoshi Takeda, Hisako Kayama. Regulation of innate immune responses at the intestinal mucosa. 14th International Congress of Immunology, August 22-27, 2010, Kobe, Japan
- 37) 竹田潔、自然免疫系の活性制御と炎症性腸疾患、第7回病理学会カンファレンス、2010年8月9-10日、岡山
- 38) Kiyoshi Takeda Regulation of intestinal homeostasis by innate immunity. International Symposium on Organelle Network: Microbiology, Immunology, and Cell Biology, July 12-13, 2010, Osaka, Japan
- 39) 竹田潔, マウス炎症性腸疾患モデルを用いた腸管粘膜免疫機構の解析、第57回日本実験動物学会総会、2010.5.11-12、京都

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録

- なし
3. その他
なし

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

IL-10^{-/-} 移入腸炎を用いた CXCR3 阻害剤の役割

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。

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の効果を検証した。

B. 研究方法

Th1・Th17 型の腸炎モデルである IL-10^{-/-}移入腸炎を用いた。既報の如く、IL-10^{-/-}C57BL/6 マウスの脾臓・腸管膜リンパ節細胞を分離、1.0x10⁷ 個 / body を 8-12 週齢 雌 SCID マウスへ腹腔投与し腸炎を誘発した。移入 14 日目より CXCR3 拮抗薬である AMG487 10mg/kg/日または vehicle を投与し、体重変化、cytokine profile (腸管組織、ELISA)、病理組織学的な評価を行った。

(倫理面への配慮) 弘前大学動物実験施設指針に準拠した。

C. 研究結果

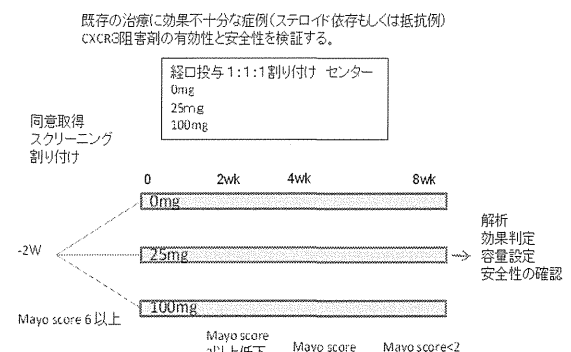
IL-10^{-/-}移入腸炎モデルにおいて、AMG487 投与群では Vehicle 群に比し、体重減少は有意に抑制され(P=0.0159)、組織学的にも炎症性変化は有意に抑制された (P=0.0043)。さらに CXCR3 に対する免疫組織学的検討では、AMG487 投与群で大腸組織で陽性細胞の減少が見られ、また、Vehicle 群に比し AMG487 で腸管組織における TNF- α は有意に抑制されたが、IL-17 では有意差が認められなかった。

D. 考察

TNF- α 、IFN- γ で上皮細胞株である HT-29 を刺激すると、RIG-I の発現が増強する。また HT-29 に

おいて RIG-I に対する siRNA を transfect すると、IFN- γ で誘導される CXCL-9, 10, 11 の産生が有意に低下する (1)。これらのケモカインは CXCR3 陽性 T 細胞を走化させることが報告されている。前回までにヒト潰瘍性大腸炎患者において CD8b 細胞は、ステロイド抵抗例において CXCR3、CD38、P 糖蛋白を発現しており、また granzyme B を発現していることを報告した。これを踏まえて、CXCR3 阻害剤の効果と機序について検討した。

AMG487 (Amgen) は CXCR3 に対する小分子 antagonist で 0.008 M で CXCR3 のリガンドである CXCL10 の活性を 50%抑制する。また、RA 滑膜細胞における Ca の流入を抑制することが報告されている (Chem Med Chem 2008, 3, 861-872)。今回の検討で、IL-10^{-/-}移入腸炎に対して AMG487 は体重、肉眼所見、組織学的所見、TNF- α 量において有意な改善を認めた。



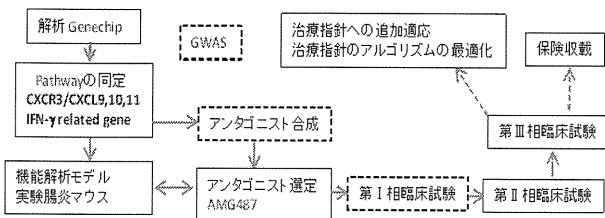
移入脾細胞 (IL-10^{-/-}) における intra cellular staining による検討では、CXCR3+CD8 細胞は TNF- α 、IFN- γ 、Granzyme B を発現していたが、IL-17 の発現は明らかでなかった。AMG487 投与 72 時間後では CXCR3+CD8 細胞における TNF- α 、IFN- γ 、Granzyme B の発現が消失しており、機序として活性化抑制の関与が考えられた。さらに TNF- α 、IFN- γ 陽性細胞はほぼ一致しており病態への関与が考えられた。

また、免疫組織学的検討では AMG487 投与で CXCR3 陽性細胞の減少を認め、遊走低下と考えられた。

さらに Vehicle 投与群では時間依存的に TNF- α

量が増加したが、AMG487 投与群では day28 で TNF-a の有意な産生低下が認められ、TNF-a が最終的な標的 mediator と考えられた。

これまでの本研究の流れを下記図内実線で示した。Healthy volunteer に対しての第 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予定である。



E. 結論

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、治療応用の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

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-I 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

- ① クロウン病の病態における制御性B細胞の機能解析
- ② 炎症性腸疾患におけるセロトニン関連遺伝子発現の検討
- ③ アポトーシス細胞の移入による腸炎抑制の試み
- ④ 炎症性発癌における 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: (H22年度) 制御性B細胞(Breg)が腸管の炎症を抑制すること、クロウン病モデルマウス(SAMP1/Yit)およびクロウン病患者ではBregの機能異常が病態に関わることを明らかにした。(H23年度) 炎症性腸疾患(IBD)の大腸粘膜では、炎症粘膜でセロトニン再取り込みトランスポーター(serotonin reuptake transporter :SERT)の発現が低下しており、さらに寛解期粘膜あるいは腸炎の回復過程においてもセロトニン機能障害が遅延することを明らかにした。(H24年度) 体外で調整したアポトーシス細胞の移入によって腸炎の抑制が可能か否かを実験マウスDSS腸炎モデルで検証し、調整アポトーシス細胞を静脈内投与で腸管炎症が抑制されることを明らかにした。また、本機序が顆粒球除去療法(GMA)の有効機序の一つである可能性が示唆された。(H25年度) アポトーシス細胞の貪食を促進するタンパクであるMFG-E8(Milk-fat globuluer epidermal growth factor 8)は、慢性腸炎モデルおよびIBD患者の腸管粘膜で発現が上昇しており、本来の機能とは別に腸管上皮に対して増殖作用を有することを明らかにした。さらにマウス炎症性発癌モデルにおいて、本分子が腫瘍発生を促進することを明らかにした。

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

所属 島根大学医学部内科学講座第二

●平成25年度

炎症性発癌におけるMFG-E8の役割

A. 研究目的

クロウ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髄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 Colon 26 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: Elevated 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, 川島耕作, 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

患の膵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。)

●平成 24 年度

アポトーシス細胞の移入による腸炎抑制の試み

A. 研究目的

生体内で不要あるいは有害と認識された細胞にはアポトーシスが誘導され、マクロファージなどの食細胞が、これらのアポトーシス細胞を速やかに貪食することによって免疫寛容を維持している。このプロセスには様々な分子機構が関与しているが、私共は milk fat globule-EGF factor 8 (MFG-E8) に着目し、MFG-E8 が生理的環境のみならず、腸管炎症時にも過剰免疫反応を抑制し腸炎を抑制することを報告していた。生理的あるいは炎症時にアポトーシス細胞処理することは生体の恒常性維持にきわめて重要だが、体外からアポトーシス細胞を移入した場合の腸管免疫制御については不明である。私共は今回の研究で、体外で誘導したアポトーシス細胞を腸炎モデルに移入することで炎症の抑制が可能か否かを検証した。また、アポトーシス細胞の処理機構が顆粒球除去療法 (GMA) の有効機序に関連していると想定し、この点についても実験的に確認した。

B. C. 研究方法と結果

①アポトーシス細胞の移入によるマウス DSS 腸炎の抑制

C57BL/6N マウスの胸腺細胞を分離・培養し、デキサメサゾンによってアポトーシスを誘導した。アポトーシスの誘導効率 は Annexin-V と

propidium iodide (PI) で判定し、90%以上の細胞にアポトーシスが誘導されていることを確認した。1×10⁷ 個のアポトーシス細胞を、DSS 腸炎誘発前

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他

のマウスに尾静脈から 2 度注入し (8 日前、5 日前)、その後 2.0%DSS の自由飲水によって急性腸炎を誘発した。コントロールとしてアポトーシスを誘導していない生細胞を同様の時期に移入した。9 日目に腸炎マウスから大腸を摘出し、腸炎の程度を腸管長、病理組織、サイトカイン産生 (IL-1b) で評価した。さらに、同様の実験内容を、アポトーシス細胞の貪食能が低下した MFG-E8 マウス KO マウスを用いておこなった。

DSS 腸炎を用いた上記の実験系において、アポトーシス細胞を移入することで、腸管短縮、組織学的な炎症スコア、IL-1b 産生のいずれも有意に抑制された。また、MFG-E8KO マウスを用いた系では、アポトーシス細胞移入による腸炎抑制効果が消失した。

② GMA の有効性に関する検討

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

回の研究を遂行した。

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

E. 結論

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

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ⑥ Kawashima K, Ishihara S, Doi K, Uemura Y, Ohno Y, Fukuda K, Onishi K, Tada Y, Oka A, Kusunoki R, Fukuba N, Yuki T, Kinoshita Y: Ulcerative colitis associated with isolated unilateral hypoglossal nerve palsy. Intern Med. 51:3135-7, 2012.
- ⑦ Kusunoki R, Ishihara S, Aziz M, Oka A, Tada Y, Kinoshita Y: Roles of milk fat globule-epidermal growth factor 8 in intestinal inflammation. Digestion. 85:103-7, 2012.
- ⑧ Otani A, Ishihara S, Aziz MM, Oshima N, Mishima Y, Moriyama I, Yuki T, Amano Y, Ansary MM, Kinoshita Y: Intrarectal administration of milk fat globule epidermal growth factor-8 protein ameliorates murine experimental colitis. Int J Mol Med. 29:349-56, 2012.
- ⑨ 岡 明彦、石原俊治、木下芳一：炎症性腸疾患における制御性 B 細胞の役割。G. I. Research 20:479-485. 2012
2. 学会発表
- ⑬ Tada Y, Ishihara S, Kinoshita Y: Down-regulation of serotonin reuptake transporter gene expression in colonic mucosa during inflammation and healing phases of inflammatory bowel disease. United European Gastroenterology Week (UEGW). Amsterdam 2012. 10. 23.
- ⑭ Kusunoki R, Ishihara S, Sonoyama H, Tada Y, M. U. Ansary, Oka A, Fukuba N, Moriyama I, Yuki T, Kawashima K, Kinoshita Y: Role of milk fat globule-epidermal growth factor 8 in intestinal inflammation and carcinogenesis. United European Gastroenterology Week (UEGW). Amsterdam 2012. 10. 23.
- ⑮ Oka A, Ishihara S, Sonoyama H, Tada Y, A. U. Mesbah, Fukuba N, Moriyama I, Yuki T, Kawashima K, Kinoshita Y: Regulatory role of CD19^{high}CD1d^{high} B cells in intestinal inflammation: association with pathogenesis of Crohn's disease. United European Gastroenterology Week (UEGW). Amsterdam 2012. 10. 22.
- ⑯ Yuki T, Ishihara S, Sonoyama H, Tada Y, M. U. Ansary, Oka A, Kusunoki R, Fukuba N, Moriyama I, Kawashima K, Kinoshita Y: Expression profiles of angiogenesis- and inflammation-related genes in colonic mucosa of ulcerative colitis in remission - comparison with narrow-band imaging magnifying colonoscopy findings. United European Gastroenterology Week (UEGW). Amsterdam 2012. 10. 24.
- ⑰ Kawashima K, Ishihara S, Oka A, Fukuba N, Ryusaku K, Tada Y, Tamagawa Y, Yuki T, Moriyama I, Yuki T, Kinoshita Y: Effects

of pH-dependent release formulation of mesalazine on active ulcerative colitis resistant to time-dependent release formulation of mesalazine. United European Gastroenterology Week (UEGW). Amsterdam 2012. 10. 23.

- ⑱ 川島耕作, 石原俊治, 結城崇史, 岡 明彦, 楠 龍策, 福庭暢彦, 玉川祐司, 森山一郎, 宮岡洋一, 藤代浩史, 大西浩二, 串山義則, 谷村隆志, 結城美佳, 駒澤慶憲, 濱本直治, 吉野生季三, 橋本朋之, 木下芳一: 活動期潰瘍性大腸炎に対する pH 依存性メサラジン製剤の治療効果. 第 98 回日本消化器病学会総会, 東京, 2012. 4. 21.
- ⑲ 結城崇史, 石原俊治, 多田育賢, 楠 龍策, 岡 明彦, 福庭暢彦, 川島耕作, 天野祐二, 木下芳一: 緩解期潰瘍性大腸炎粘膜における NBI 拡大所見と局所炎症所見および血管新生因子の対比. 第 98 回日本消化器病学会総会, 東京, 2012. 4. 20.
- ⑳ 福庭暢彦, 石原俊治, 多田育賢, 岡 明彦, 楠 龍策, 森山一郎, 結城崇史, 川島耕作, 天野祐二, 木下芳一, 数森秀章, 串山義則, 藤代浩史, 駒澤慶憲. 寛解期潰瘍性大腸炎患者 IBS 様症状と内視鏡像についての多施設共同研究. 第 98 回日本消化器病学会総会, 東京, 2012. 4. 20.
- 21 多田育賢, 石原俊治, 楠 龍策, 岡 明彦, 福庭暢彦, 森山一郎, 結城崇史, 川島耕作, 天野祐二, 木下芳一: 潰瘍性大腸炎の大腸粘膜におけるセロトニン取り込みトランスポーターの発現に関する検討. 第 98 回日本消化器病学会総会, 東京, 2012. 4. 19.
- 22 楠 龍策, 石原俊治, 多田育賢, 岡 明彦, 福庭暢彦, 森山一郎, 結城崇史, 川島耕作, 天野祐二, 木下芳一: MFG-E8 の大腸炎症および発癌への関与. 第 54 回日本消化器病学会大会, 神戸, 2012. 10. 10.
- 23 結城崇史, 石原俊治, 多田育賢, 深澤康輔, 岡 明彦, 楠 龍策, 相見正史, 宇野吾一,

福庭暢彦, 森山一郎, 川島耕作, 石村典久, 古田賢司, 木下芳一: 難治性潰瘍性大腸炎に対するタクロリムスによる寛解導入治療症例の経過. 第 54 回日本消化器病学会大会, 神戸, 2012. 10. 10.

- 24 岡 明彦, 石原俊治, 多田育賢, 楠 龍策, 福庭暢彦, 森山一郎, 結城崇史, 川島耕作, 木下芳一: 制御性 B 細胞による腸炎抑制効果 制御性 T 細胞非依存的な抑制機構の検討. 第 54 回日本消化器病学会大会, 神戸, 2012. 10. 10.
- 25 多田育賢, 石原俊治, 木下芳一: シンポジウム 14 腸管炎症における serotonin reuptake transporter の遺伝子発現と機能性消化管障害の病態への関与. 54 回日本消化器病学会大会, 神戸, 2012. 10. 12.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他

●平成 23 年度

A. 研究目的

寛解期の炎症性腸疾患 (IBD) において過敏性腸症候群 (IBS) 様症状を呈することが近年報告されている。神経伝達物質であるセロトニンの代謝異常が IBS の病態に関与することが一般的に知られているが、IBD の病態におけるセロトニンの関与に関しては未だ不明な点が多く、一定の見解が得られていない。そこで我々は、IBD におけるセロトニン代謝異常について検討した。

セロトニンは腸クロム親和性細胞の一つである EC 細胞にて、トリプトファン水酸化酵素 (tryptophan hydroxylase: TPH-1) を律速酵素として合成される。主な除去機構として、セロトニン再取り込みトランスポーター (serotonin reuptake transporter :SERT) を介して腸粘膜細

胞に取り込まれる。腸管粘膜局所のセロトニン代謝にはこの2つの遺伝子の発現が強く影響するものと考えられており、腸管の炎症存在下におけるそれらの変化を、潰瘍性大腸炎(UC)患者の大腸粘膜組織ならびに腸炎モデルマウスの腸管組織を用いて解析した。また、寛解期粘膜および腸炎の回復過程における SERT/TPH-1 の発現に関する検討も行った。

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 SERT/TPH-1 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。コントロール群として大腸癌切除症例の摘出標本における非病変部位を用いた(n=6)。それぞれの検体を Real time PCR にて SERT、TPH-1 ならびに IL-8 を定量した。なお、内在性コントロール遺伝子は cytokeratin20 を用いた。

活動性粘膜は非活動性粘膜およびコントロール群と比較し、優位に SERT の発現は低下していた。逆に TPH-1 は活動性粘膜と比較し、高い傾向を認めた。SERT と IL-8 は負の相関を示した(R=-0.41)。

続いて慢性腸炎マウスにおける検討を行った。クローン病モデルマウスの SAMPl/Yit の腸管膜リンパ節(MLN)から CD4 陽性 T 細胞を分離し SCID マウスの腹腔内へ移入することで腸炎モデルを作製した。(Burns RC et al, *Gastroenterology*. 2001)。T 細胞移入直後と 4 週後に回腸末端部を摘出し、Real time PCR にて SERT、TPH-1 ならびに MIP-2 を定量した。

4 週間後の小腸粘膜において MIP-2 が高発現しており、腸炎が発症していた。腸炎発症後の小腸粘膜において優位に SERT の発現は優位に低下し、TPH-1 の発現は亢進していた。

② 寛解期 UC 粘膜における SERT/TPH-1 の発現に関する検討

非活動性粘膜(寛解期粘膜)の NBI 拡大観察を行い、腺管周囲を規則正しい血管が走行している部位を Regular、それ以外の不規則な血管走行と

乱れた腺管構造を呈する部位を Irregular と定義した。これは、不規則な血管構造を呈する部位は、局所の血管新生や炎症に違いがあると想定したためであった。病理学的な炎症を Matts 分類にて評価したが、Regular、Irregular とともに差は認めなかった。しかし、Irregular において IL-8 が高発現しており、炎症の残存を認めた。両者の SERT と TPH-1 の発現を Real time PCR にて定量したところ、TPH-1 の発現に差は見られなかったが、Irregular において SERT の発現は優位に低下していた。

③ デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)腸炎モデルの大腸粘膜における SERT の発現推移に関する検討。

C57BL/6N マウスに 2.0%DSS を 7 日間経口投与した後、Day14、Day21、Day28 の大腸を摘出し、Real time PCR にて SERT、TPH-1 ならびに MIP-2 を定量した。DSS 投与前と比較し、DSS 投与後の SERT の発現は優位に低下した。Day28 まで MIP-2 の発現は徐々に改善したにもかかわらず、SERT の発現は低下を続け、改善を認めなかった。

(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

UC ならびに慢性腸炎モデルの腸管粘膜では、炎症によって SERT の発現は低下していた。このことから、炎症存在下ではセロトニンの排除機能が障害されている可能性が示唆され、過去の報告に合致する結果であった。(Coates MD et al, *Gastroenterology*. 2004)。一方、TPH-1 の発現が亢進しており、セロトニン産生が増加している可能性も否定できないが、優位な差は認めなかった。

UC の大腸粘膜において、通常光では寛解している粘膜であっても、NBI 拡大観察で Irregular と定義した部位では炎症が残存しており、SERT の発現は低下していた。この結果から、粘膜治癒が得られたと思われる粘膜においても SERT 機能障害が遷延する可能性が示唆された。DSS 腸炎モデルマウスを用いた検討においても、炎症が改善する

過程で SERT の発現低下が遷延することが示された。

今回の検討では、SERT 機能障害と臨床像との対比ができておらず、今後の検討課題と考えられる。また、炎症が SERT 機能障害を引き起こすのか、もしくは SERT 自体が炎症を促進するものかは controversial な状態であり、更なる機能解析が必要と考えられた。

E. 結論

IBD の大腸粘膜では、炎症存在下では SERT の発現が低下しており、さらに寛解期粘膜あるいは腸炎回復期においてもセロトニン機能障害が遷延する可能性が示唆された。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

① Kusunoki R, Ishihara S, Sato M, Sumita Y, Mishima Y, Okada M, Tada Y, Oka A, Fukuba N, Oshima N, Moriyama I, Yuki T, Sato S, Amano Y, Murakawa Y, Kinoshita Y: Rare case of Takayasu's arteritis associated with Crohn's disease. Intern Med. 50:1581-5, 2011.

② Li YY, Ishihara S, Aziz MM, Oka A, Kusunoki R, Tada Y, Yuki T, Amano Y, Ansary MU, Kinoshita Y: Autophagy is required for toll-like receptor-mediated interleukin-8 production in intestinal epithelial cells. Int J Mol Med. 27:337-44, 2011.

③ 岡 明彦、石原俊治、木下芳一：制御性 B 細胞からみた IBD 治療へのアプローチ. IBD Research 5:259-64, 2011.

2. 学会発表

① 多田育賢、石原俊治、楠 龍策、岡 明彦、福庭暢彦、森山一郎、結城崇史、天野祐二、木下芳一

ミニシンポジウム：大腸 IBD 病態 5

炎症性腸疾患の血清中 MFG-E8 蛋白の測定と臨床的意義の検討

第 97 回日本消化器学会総会，東京，
2011. 05. 14

② 結城崇史，石原俊治，多田育賢，楠 龍策，岡 明彦，福庭暢彦，天野祐二，木下芳一
ミニシンポジウム：大腸 総合 2

緩解期潰瘍性大腸炎粘膜における NBI 拡大所見と局所炎症所見の対比

第 97 回日本消化器学会総会，東京，
2011. 05. 15

③ 岡 明彦，石原俊治，木下芳一
シンポジウム：消化器疾患と免疫
制御性 B 細胞による腸管免疫抑制機構とその破綻による腸炎発症機序の解明 - クロウン病モデルマウスの病態解析からの知見とその応用 -

JDDW2011，福岡，2011. 10. 21

④ 楠 龍策，石原俊治，木下芳一
シンポジウム：炎症と消化器癌
MFG-8 の消化管炎症および炎症発癌への関与 - ノックアウトマウスを用いた解析 -

JDDW2011，福岡，2011. 10. 21

⑤ 岡 明彦，石原俊治，多田育賢，楠 龍策，福庭暢彦，森山一郎，結城崇史，天野祐二，木下芳一

クロウン病モデルマウスの T 細胞に対する制御性 B 細胞の影響

第 53 回日本消化器病学会大会，福岡，
2011. 10. 20

⑥ 結城崇史，石原俊治，多田育賢，岡 明彦，楠 龍策，福庭暢彦，森山一郎，川島耕作，天野祐二，木下芳一

当院における難治性潰瘍性大腸炎に対するタクロリムスの使用経験

第 53 回日本消化器病学会大会，福岡，
2011. 10. 20

⑦ 多田育賢，石原俊治，楠 龍策，岡 明彦，福庭暢彦，結城崇史，川島耕作，天野祐二，木下芳一

クロウン病モデルマウスの腸管局所における SERT および TPH-1 の発現に関する検討

第 53 回日本消化器病学会大会, 福岡,
2011. 10. 20

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

●平成 22 年度

A. 研究目的

H21 年度におこなった腸管自然免疫機構の研究
成果に引き続いて、制御性 B 細胞の自然免疫応答
に着目し、炎症性腸疾患 (IBD) の病態との関連
を検討した。

H21 年度までおこなってきたクローン病モデル
マウス SAMP1/Yit における制御性 B 細胞 (Breg)
の解析については、H22 年度前半にまとめた最終
結果を *Immunology* 誌に報告した。本検討では、
マウス腸管の B 細胞には、CpG DNA に反応して
interleukin (IL)-10 を産生する CD19^{high}CD1d^{high}
の Breg サブセットが存在すること、SAMP1/Yit マ
ウスの腸管 B 細胞は CpG 刺激に対して低応答性で
あり、IL-10 産生量がコントロールマウス (AKR/J)
の B 細胞に比べて有意に低値であることが明らか
となった。さらに *in vitro* では、CpG DNA 刺激下
で B 細胞とマクロファージおよび T 細胞を共培養
した実験では、SAMP1/Yit マウスの腸管 B 細胞と
の共培養時の IL-1b および IFN γ 産生量がそれぞ
れ有意に高値であることが示された。

H22 年度は IBD 患者の末梢血 B 細胞を用いた実
験によって、IBD の病態における Breg の関与を検
討するとともに、SAMP1/Yit マウスの腸管 CD4 陽
性 T 細胞と B 細胞を SCID マウスに移入した実験
腸炎モデルを作製し、腸炎の発症と増悪における
Breg の機能解析をおこなった。

B. C. 研究方法と結果

① IBD 患者の末梢血 B 細胞の CpG DNA 刺激による IL-10 産生に関する検討

マウスの実験結果を踏まえ、ヒト IBD 患者の末
梢血 B 細胞の CpG DNA 刺激時の IL-10 産生能を健
常人と比較した。クローン病 30 人、潰瘍性大腸
炎 30 人、健常人 45 人を対象とした。CD19 抗体磁
気ビーズを用いて末梢血単核球から B 細胞を分離
し、CpG DNA 刺激後 72 時間で IL-10 を EIA で測定
した。測定した IL-10 値はクローン病と潰瘍性大
腸炎患者のいずれの群も健常人に比べて低値で
あったが、特にクローン病では顕著な結果であっ
た。対象とした IBD 患者の臨床重症度、血液検査、
治療内容などを考慮して、多変量解析もおこなっ
たが、IL-10 産生が低値になる最も有意な因子は
クローン病の存在であった。

② SCID マウス実験腸炎モデルを用いた腸発症に おける制御性 B 細胞の機能解析

1. SCID マウスを用いた adoptive transfer 腸炎 モデルの作製

SAMP1/Yit の腸管膜リンパ節 (MLN) から単核球
を調整し、CD4 の抗体磁気ビーズを用いて CD4 陽
性 T 細胞を分離し SCID マウスの腹腔内へ移入す
ることで腸炎モデルを作製した。(5 x 10⁵/mouse)
(Burns, *Gastroenterology*. 2001)。T 細胞移入
後は経時的に体重変化を観察し、8 週後に摘出し
た回腸および大腸の病理組織によって腸炎発症
を評価した。SAMP1/Yit から移入した CD4 陽性 T
細胞によって小腸および大腸に著明な炎症が誘
発されていたが、本モデルでは特に大腸に炎症が
強く認められた。

2. SCID 腸炎モデルへの B 細胞の co-transfer による 制御性 B 細胞サブセットの機能解析

上記モデルに B 細胞を co-transfer することによ
って腸炎の発症や増悪の程度を検討した。移入
B 細胞は SAMP1/Yit およびコントロールの AKR/J
の腸管膜リンパ節 (MLN) から分離した。CD19 の
抗体磁気ビーズによって高純度の B 細胞ポピュ
レーションを分離した。さらに Breg 分画
(CD1d^{high}CD19^{high}) と Breg 除去分画についても
各々調整した。B 細胞 (5 x 10⁶/mouse) は CD4⁺T
細胞の移入と同時期に尾静脈から投与し、8 週後
に回腸および大腸を摘出し、病理組織、サイトカ
イン産生によって腸炎の重症度を評価した。

Total B 細胞を co-transfer したモデルでは、
SAMP1/Yit マウス由来の B 細胞移入が明らかに腸

炎を増悪させた。さらに、Breg 分画と Breg 除去分画についても各々移入したモデルにおいては Breg 除去分画移入によって腸炎は明らかに重症となった(病理組織学的検討および IL-1b、MIP-2 産生による評価)。

(倫理面への配慮)

動物実験およびヒト末梢血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

マウス腸管の粘膜固有層や腸間膜リンパ節に IL-10 を産生する Breg が存在することが示された。CD1d^{high}CD19^{high} のポピュレーション中に Breg が存在する可能性が示唆されたが、本マーカーが Breg を規定する絶対的な細胞表面とは言えず、今後のさらなる検討が必要と考えられた。

クローン病モデルマウスである SAMP1/Yit マウスの腸間膜 B 細胞が CpG DNA 刺激に対して、IL-10 産生能が低いという新規の知見が得られ、この現象は、ヒトのクローン病の末梢血 B 細胞を用いた検討からも明らかとなった。SAMP1/Yit マウスの腸管 CD4 陽性 T 細胞と B 細胞を SCID マウスに移入した実験腸炎モデルにおいて、Breg が腸炎抑制に関わる可能性を示唆する結果が得られたことも合わせると、Breg の機能がクローン病の病態に関与していることが示唆された。しかし、何故、クローン病において Breg の機能低下がみられるのかという点は明らかにされておらず、Breg の分化や体内動態、さらに自然免疫応答に関わる細胞内シグナルなどについて今後検討する必要があると考えられた。

E. 結論

腸管(マウス)に IL-10 を産生する Breg が存在し、Breg の自然免疫応答の異常(低応答性)がクローン病の病態に関与する可能性が示唆された。

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① Kadota C, Ishihara S, Aziz MM, Rumi MA, Oshima N, Mishima Y, Moriyama I, Yuki T, Amano Y, Kinoshita Y: Down-regulation of single immunoglobulin interleukin-1R-related molecule (SIGIRR)/TIR8 expression in intestinal epithelial cells during inflammation. Clin Exp Immunol. 162:348-61, 2010.
 - ② Mishima Y, Ishihara S, Aziz MM, Oka A, Kusunoki R, Otani A, Tada Y, Li YY, Moriyama I, Oshima N, Yuki T, Amano Y, Matsumoto S, Kinoshita Y: Decreased production of interleukin-10 and transforming growth factor- β in Toll-like receptor-activated intestinal B cells in SAMP1/Yit mice. Immunology. 131:473-87, 2010.
 - ③ Oshima N, Ishihara S, Rumi MA, Aziz MM, Mishima Y, Kadota C, Moriyama I, Ishimura N, Amano Y, Kinoshita Y: A20 is an early responding negative regulator of Toll-like receptor 5 signalling in intestinal epithelial cells during inflammation. Clin Exp Immunol 159: 185-98, 2010.
- #### 2. 学会発表
- ① Oka A, Ishihara S, Mishima Y, Oshima N, Kusunoki R, Tada Y, Moriyama I, Yuki T, Kinoshita Y: Decreased production of IL-10 in TLR9-activated peripheral blood B cells in inflammatory bowel disease. Digestive Disease Week. New Orleans, USA, 2010.5.
 - ② Kadota C, Ishihara S, Mishima Y, Oshima N, Oka A, Kusunoki R, Tada Y, Moriyama I, Yuki T, Kinoshita Y: Intestinal inflammation down-regulates SIGIRR/TIR8 expression in epithelial cells by inhibiting SP1-mediated pathway. Digestive Disease Week. New Orleans, USA, 2010.5.
 - ③ Yuki T, Ishihara S, Aziz MM, Mishima Y,

Oshima N, Otani A, Oka A, Kusunoki R, Tada Y, Moriyama I, Yoshikazu K: Crosstalk between TLR5 and Notch1 signaling in epithelial cells during intestinal inflammation. *igestive Disease Week, New Orleans, USA, 2010. 5.*

- ④ 多田育賢, 石原俊治, 楠 龍策, 大谷 文, 三島義之, 大嶋直樹, 森山一郎, 結城崇史, 天野祐二, 木下芳一: 炎症性腸疾患の腸管粘膜局所における MFG-E8 の発現に関する検討. 第 52 回日本消化器病学会大会, 横浜, 2010.
- ⑤ 岡 明彦, 石原俊治, 三島義之, 多田育賢, 楠 龍策, 大谷 文, 森山一郎, 結城崇史, 天野祐二, 木下芳一: Chron 病モデルマウスの病態における腸管 B 細胞の機能異常に関する検討. 第 52 回日本消化器病学会大会, 横浜, 2010.
- ⑥ 石原俊治, 結城崇史, 天野祐二: パネルディスカッション: 炎症性腸疾患の経過観察における内視鏡検査 潰瘍性大腸炎の内視鏡的重症度分類における内視鏡医間の診断格差と問題点. 第 79 回日本消化器内視鏡学

会総会, 東京, 2010.

- ⑦ 岡 明彦, 石原俊治, 三島義之, 多田育賢, 楠 龍策, 大谷 文, 森山一郎, 結城崇史, 天野祐二, 木下芳一: 炎症性腸疾患患者の末梢血 B 細胞における IL-10 産生能に関する検討. 第 96 回日本消化器病学会総会, 新潟, 2010.
- ⑧ 結城崇史, 石原俊治, 多田育賢, 楠 龍策, 大谷 文, 三島義之, 天野祐二, 木下芳一: 腸管炎症における Notch-1 と TLR5 シグナルの相互作用に関する検討. 第 96 回日本消化器病学会総会, 新潟, 2010.

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

炎症性腸疾患の新しい治療法開発の試み

—CXCR4 阻害とサイトメガロウイルス感染制御の重要性—

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：炎症性腸疾患の治療法の開発に向けて、1) ケモカイン制御の重要性、2) サイトメガロウイルス感染制御の重要性、について検討した。その結果、CXCL12-CXCR4 系が、末梢血 T 細胞活性化に重要な役割を果たしていることから、CXCR4 拮抗薬が、炎症性腸疾患治療に有用である可能性が示唆された。さらに潰瘍性大腸炎の難治化に局所のサイトメガロウイルスの再活性化が深く関与しており、その制御が重要であることが示された。また、サイトメガロウイルス感染の炎症性腸疾患の病態への関与について、世界で初めてのマウスモデルの開発に成功した。

(A) 2010-2011 年 炎症性腸疾患病態におけるケ

モカイン制御の重要性

A. 研究目的

ケモカインとは免疫担当細胞の遊走と活性化に関与しているサイトカインである。ケモカインはそのシステイン配列の違いにより CC、CXC、C、CX3C の 4 種類に分類される。(C の位置がシステイン→CX3C はシステインの間に 3 つのアミノ酸があるということ)。ケモカインファミリーは現在のところ 50 種以上、その受容体は 20 種類同定されている。古典的走化因子と異なり、比較的特定の血球に作用するため、浸潤細胞のサブセットにも関与している。一部のケモカインは組織に構築的に発現しているが、多くは炎症性刺激また免疫学的刺激に応じ、転写因子を経て産生が誘導される特徴がある。ケモカインは病的な炎症において、血液中から腸管粘膜への異常な白血球の動員に関わる重要なメディエーターであると考えられている。今回は我々が注目してきたケモカイン CXCL12/CXCR4 系の炎症性腸疾患における病態への関与と今後の治療標的としての可能性について報告する。

B. 研究方法および結果

実験腸炎モデルにおける CXCL12-CXCR4 系の役割：まず我々は、CXCL12 が正常腸管においてどの細胞に主として発現しているかを検討するため、CXCL12/GFPknockin マウスを用いて検討した。その結果、CXCL12 陽性細胞は主として間質に存在し、血管内皮細胞を裏打ちする状況で存在する pericyte であると考えられた。2.5%のデキストラン硫酸（以下 DSS）を 10 日間投与し腸炎モデルを作成したところ、大腸における CXCL12 の発現が、正常腸管に比して有意に増強することが示された。また、腸炎誘導後の末梢血での CXCR4 の発現を検討した結果、Gr-1 陽性細胞、CD4 陽性、CD8 陽性 T 細胞における CXCR4 の発現が増強していることが明らかとなった。このことから、大腸炎モデルにおいて CXCL12-CXCR4 系が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。さらに、DSS 腸炎モデルに対して、CXCR4 antagonist である TF14016 (100 μ g) を投与することにより、その治療効果を検討した。TF14016 治療群は無治療群に比べ腸炎は明らかに改善してい