

た。TF14016 治療にて、腸間膜リンパ節における FOXP3 陽性細胞の割合に変化は認められなかった。

ヒト IBD 患者における CXCR4 の発現の検討：上記の結果をふまえて、我々はヒト IBD 患者末梢血液における CXCR4 発現と疾患活動性との関係を検討した。方法は末梢 T 細胞における CXCR4 の発現の検討対象全例に対し、末梢血を採取し、抗 CD3 抗体および、抗 CXCR4 抗体による染色を行い、Flow cytometry で T 細胞上の CXCR4 発現の強度を検討した。さらに、CXCR4 の発現と疾患活動性の相関関係を検討した。その結果、潰瘍性大腸炎では、活動期潰瘍性大腸炎患者末梢 T 細胞における CXCR4 の発現は寛解期に比し有意に高いことが示された。これらの結果から、CXCR4 発現は主として潰瘍性大腸炎の疾患活動性に有意に関連していることが示唆された。

(上記研究における倫理面への配慮)

患者末梢血の解析を行う場合には、各患者に対して informed consent を行った。(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. 考察

DSS 腸炎マウスに CXCR4 拮抗剤である TF14016 を投与することで、腸炎改善効果を検討した。さらに、人炎症性腸疾患における CXCL12・CXCR4 系の関与を検討した結果、末梢 T 細胞における CXCR4 の発現強度は潰瘍性大腸炎患者の臨床的活動性と相関した。今回、我々が検討した CXCL12・CXCR4 系の制御は炎症性腸疾患患者の新しい治療法の 1 つになりうる可能性が示唆された。

D. 結論

我々は、人炎症性腸疾患における末梢 T 細胞 CXCR4 の発現の重要性を示し、さらに CXCR4 拮抗剤を用いた CXCL12・CXCR4 系制御が炎症性腸疾患治療に有用であることを示した。現

在までこのような報告はなされておらず、人炎症性疾患患者に対する新しい治療開発にきわめて有用なものであると思われる。

(B) 2012-2013 年 難治性炎症性腸疾患におけるサイトメガロウイルス感染の関与

A. 研究目的

難治性潰瘍性大腸炎 (以下 UC) の増悪にサイトメガロウイルス (cytomegalovirus; CMV) 感染の関与が注目されている。UC 患者における CMV 感染の診断は、主として血中 CMV 抗原測定、および生検材料を用いた病理学的診断 (核内封入体の有無) により行われてきた。しかし、大腸内視鏡検査にて CMV 感染の合併が疑われるにも関わらず、上記検査結果が陰性のため治療方針の決定に難渋する症例がしばしば存在する。まず我々は、UC 患者における CMV 感染の早期診断に real-time PCR 法を応用した腸管粘膜内の CMV-DNA を検出する方法に着目し、その臨床的有用性を検討した。さらに、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行い、CMV 感染が IBD の病態に与える影響を検討した。

B. 研究方法および結果

大腸生検組織 PCR 法を用いたサイトメガロウイルス感染症の早期診断：

CMV 感染の早期に診断を目的として、IE 遺伝子を特異的に検出する PCR プライマーを設定した。大腸粘膜から生検を行い、CMV-DNA の存在を検討した。その結果、我々が開発した大腸粘膜生検を用いた PCR 法は CMV antigenemia 法、生検標本を用いた診断法に比べ、早期に CMV 感染の診断が可能となることが示唆された。

新規 CMV 感染 IBD モデルマウスの作製：

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。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 にて検討した。

1) MCMV 感染 TCR α KO マウスは同週齢の非感染マウスに比し、腸炎が高度で、浸潤する好中

球やM1型のマクロファージの数が増加していた。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。

- 2) 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。

(上記研究における倫理面への配慮)

2010-2011年と同様である。

C. 考察

今回、我々が開発した大腸粘膜生検を用いたPCR (Mucosal PCR)法により、難治性UC患者においてCMV感染の診断に有用であることが示唆された。さらに、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。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。

D. 結論

我々はCMV感染診断におけるMucosal PCR法の確立と、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。これらのmodalityを使用することで、UC患者における難治性UC患者の治療開発ならびにCMV局所再活性化の機序解明が可能になるものと考えられた。

E. 健康危険情報

なし

F. 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.
4. Takai A, Marusawa H, Minaki Y, Watanabe T, Nakase H, Kinoshita K, Tsujimoto G, Chiba T. Targeting activation-induced cytidine deaminase prevents colon cancer development despite persistent colonic inflammation. *Oncogene* 31:1733-1742:2012.
5. Arasawa S, Nakase H, Ozaki Y, Uza N, Matsuura M, Chiba T: Mediterranean mimicker. *Lancet* 380:2052:2012.
6. Nakase H, Matsuura M, Mikami S, Uza N, Chiba T. Role of the CXCL12-CXCR4 axis and CXCL16 in inflammatory bowel disease. *Intest Res* 10:125-133:2012.
7. Nakase H, Yoshino T, Matsumura K, Honzawa Y, Yamamoto S, Matsuura M, Chiba T. Positive finding of colonic PCR for CMV-DNA is not false positive but warning for treating patients with UC refractory to immunosuppressive

- therapies Inflammatory Bowel Disease 17:E13-4:2011
8. Yoshino T, Nakase H, Matsuura M, Matsumura K, Honzawa Y, Fukuchi T, Watanabe K, Murano M, Tsujikawa T, Fukunaga K, Matsumoto T, Chiba T. Effect and Safety of Granulocyte-Monocyte adsorption apheresis for UC patients positive for cytomegalovirus in comparison with immunosuppressants. *Digestion* 84:3-9:2011.
 9. Kitamura H, Yamamoto S, Nakase H, Matsuura M, Honzawa Y, Matsumura K, Takeda Y, Uza N, Nagata K, Chiba T. Role of heat shock protein 47 in intestinal fibrosis of experimental colitis. *Biochem Biophys Res Commun* 404:599-604:2011.
 10. Uza N, Nakase H, Yamamoto S, Yoshino T, Takeda Y, Ueno S, Inoue S, Mikami S, Matsuura M, Shimaoka T, Kume N, Minami M, Yonehara S, Ikeuchi H, Chiba T. SR-PSOX/CXCL16 plays a critical role in the progression of colonic inflammation. *Gut* 60:1494-1505:2011.
 11. Yamamoto S, Nakase H, Matsuura M, Masuda S, Inui K, Chiba T. Tacrolimus therapy as an alternative to thiopurines for maintaining remission in patients with refractory ulcerative colitis. *J Clin Gastroenterol* 45:526-530:2011.
 12. Honzawa Y, Nakase H, Matsuura M, Chiba T. Clinical significance of serum diamine oxidase activity in inflammatory bowel disease. - importance of evaluation of small intestinal permeability- *Inflamm Bowel Dis* 17:E23-E25:2011.
 13. Fukui H, Sekikawa A, Tanaka H, Fujimori Y, Katake Y, Fujii S, Ichikawa K, Tomita S, Imura J, Chiba T, Fujimori T. DMBT1 is a novel gene induced by IL-22 in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 17:1177-1188:2011.
 14. Tanaka H, Fukui H, Fujii S, Sekikawa A, Yamagishi H, Ichikawa K, Tomita S, Imura J, Yasuda Y, Chiba T, Fujimori T. Immunohistochemical analysis of REG I α expression in ulcerative colitis-associated neoplastic lesions. *Digestion* 83:204-209:2011.
 15. Nakase H, Matsuura M, Sakae Mikami, Chiba T. CXCL12-CXCR4 axis in Ulcerative Colitis Chapter 5. *Ulcerative colitis, Epidermology, Pathogenesis, and Complications.* 71-78:2011.
 16. Matsumura K, Nakase H, Chiba T. Efficacy of Oral Tacrolimus on Inetestinal Behcet's Disease. *Inflamm Bowel Disease* 16:188-189:2010.
 17. Nakase H, Chiba T: TNF α is an important pathogenic factor contributing to reactivation of cytomegalovirus in inflamed mucosa of colon in patients with ulcerative colitis: Lesson from clinical experience. *Inflamm Bowel Dis* 16:550-551:2010.
 18. Akitake R, Nakase H, Tamaoki M, Ueno S, Mikami S, Chiba T. Modulation of Th1/Th2 balance by Infliximab Rescues Postoperative Occurrence of Small-Intestinal Inflammation Associated with Ulcerative Colitis. *Dig Dis Sci* 55:1781-1784:2010.
 19. Yamamoto S, Nakase H, Matsuura M, Honzawa Y, Masuda S, Inui K, Chiba T: Efficacy and safty of infliximab as rescue therapy for ulcerative colitis refractory to tacrolimus. *J Gastroenterol Hepatol* 25:886-891:2010.
 20. Nakase H, Fujiyama Y, Oshitani N, Oga T, Nonomura K, Matsuoka T, Murayama T, Teramukai S, Chiba T, Narumiya S. Effect of EP4 agonist (ONO-4819CD) for patients with mild to moderate

- ulcerative colitis refractory to 5-aminosalicylates: A randomized phase 2, placebo-controlled trial. *Inflamm Bowel Dis* 16:731-733:2010.
21. Honzawa Y, Nakase H, Takeda Y, Nagata K, Chiba T: Heat shock protein 47 can be a new target molecule for intestinal fibrosis related to inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 16:2004-2006:2010.
 22. Honzawa Y, Kondo M, Hayakumo T, Matsuura M, Nakase H. Successful Endoscopic Dilation Treatment of Small Intestinal Stricture that occurred during Chemotherapy for Malignant Lymphoma. Case report in *Gastroenterol* 4:323-329:2010.
 23. Yoshino T, Nakase H, Honzawa Y, Matsumura K, Yamamoto S, Takeda Y, Ueno S, Uza N, Masuda S, Inui K, Chiba T: Immunosuppressive effects of tacrolimus on macrophages ameliorate experimental colitis. *Inflamm Bowel Dis* 16:2022-2033:2010.
2. 学会発表
1. Matsuura M, Yoshino T, Nakase H. Characteristics of colonoscopic features in patients with ulcerative colitis concomitant cytomegalovirus infection. The 1st annual meeting of Asian organization for Crohn's & Colitis • Panel Discussion. Tokyo. 2013. 6. 13-6. 14. 2013. 6. 13
 2. Nakase H, Matsuura M, Chiba T. The critical role of heparan sulfate in intestinal crypt regeneration of small intestine via Wnt/ β catenin signaling after radiation injury. DDW2013 • Lecture session. Orlando, USA. 2013. 5. 18-5. 21. 2013. 5. 19.
 3. Yoshino T, Nakase H, Matsuura M, Chiba T. Effect of early induction with thiopurine immunomodulator treatment on long-term clinical remission on patients with Crohn's disease. DDW2013 • Poster session. Orlando, USA. 2013. 5. 18-5. 21. 2013. 5. 19.
 4. Yoshino T. The role of ral in colitis-associated cancer in mice. The 8th JSGE AGA Joint Meeting • The 2nd JSGE International Topic Conference. Kagoshima. 2013. 3. 22.
 5. Honzawa Y, Nakase H, Matsuura K, Uza N, Matsuura M, Chiba T. The involvement of IL-17-induced heat shock protein 47 in intestinal fibrosis of Crohn's disease. The 6th Japan and US Collaboration Conference in Gastroenterology Program. Tokyo. 2012. 11. 15
 6. Honzawa Y, Nakase H, Matsumura K, Yoshino T, Matsuura M, Chiba T. The involvement of IL-17A in intestinal fibrosis of Crohn's disease via up-regulation of HSP47. The 20th United European Gastroenterology Week (UEGW). Amsterdam, Netherlands. 2012. 10. 24
 7. Nakase H, Matsuura M, Chiba T. Osteopontin prevents onset of immune-mediated colitis by inducing tolerogenic dendritic cells. DDW2012 • Poster sessions. San Diego, USA. 2012. 5. 22
 8. Yoshino T, Nakase H, Matsuura M, Chiba T. Mucosal healing with tacrolimus improved long-term clinical outcome in refractory UC. DDW2012 • Poster sessions. San Diego, USA. 2012. 5. 19
 9. Honzawa Y, Nakase H, Matsuura M, Chiba T. Concomitant use of immunosuppressive drugs improves clinical outcome of endoscopic balloon dilation therapy for intestinal stricture of Crohn's disease. DDW2012 • Poster sessions. San Diego, USA. 2012. 5. 19
 10. Matsuura M, Nakase H, Honzawa Y, Yamamoto S, Matsumura K, Uza N, Chiba

- T. Characteristics of colonoscopic features in patients with ulcerative colitis concomitant with cytomegalovirus reactivation 2011 DDW • poster sessions Chicago, USA 2011.5.7-5.10 2011.5.9
11. Honzawa Y, Nakase H, Matsumura K, Yamamoto S, Uza N, Matsuura M, Chiba

T. IL-17 promotes HSP47 expression and intestinal fibrosis in Crohn's disease. 2011 DDW • poster sessions Chicago, USA 2011.5.7-5.10 2011.5.8

- G. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む)
該当なし

DSS 誘発性モデルマウスにおける病態制御性樹状細胞の検討

研究分担者 岡崎 和一 関西医科大学内科学第三講座 教授

研究要旨：潰瘍性大腸炎やクローン病などの炎症性腸疾患は難病特定疾患であり、病態解明が望まれている。当科では既に、クローン病モデルマウスである TNBS 小腸炎の腸炎回復に関わる制御性樹状細胞（PIR-A/B^{med} conventional DCs）を同定しており、潰瘍性大腸炎に代表される大腸炎の粘膜固有層においても、同樹状細胞サブセットが免疫制御に関わっている可能性があると考えられた。本研究の目的は大腸炎モデルマウスを用いて大腸粘膜固有層で免疫を制御する PIR-A/B 発現樹状細胞を同定することであり、それによって炎症性腸疾患の病態の更なる解析や臨床への応用が期待できると考えられる。

共同研究者

栗島亜希子¹⁾、星野勝一¹⁾、稲葉宗夫²⁾
関西医科大学内科学第三講座¹⁾
関西医科大学病理学第一講座²⁾

A. 研究目的

DSS 誘発性大腸炎モデルマウスを作成し、大腸粘膜から樹状細胞（以下 DC）に富んだ細胞群を採取。Paired immunoglobulin-like receptors（以下 PIR）の発現と病態制御機能との相関について解析する。

B. 研究方法

1. DSS 誘発性大腸炎モデルマウスを作成し、経時的に病理学的検討（光学顕微鏡観察や共焦点顕微鏡を用いた蛍光免疫染色）を行う。

2. 大腸炎マウスを屠殺して、大腸粘膜上皮および粘膜固有層から樹状細胞に富んだ細胞群を採取する。

3. フローサイトメトリーにて、炎症の経過に伴う樹状細胞の動態を解析する。また PIRs

(paired immunoglobulin-like receptors) 発現 DC サブセットを同定し、同サブセットの発現割合を経時的に解析する。また共刺激分子やその他の表面マーカーの発現についても解析し、既知の小腸由来 DC と比較する。

4. 同細胞を単離し、T 細胞に対する抗原提示能を調べるために Mixed leukocyte reaction (MLR) を行う。

5. サイトカイン産生能を評価するために、単離した細胞から RNA を抽出し、Real-time RT-PCR を行う。また同細胞の培養上清のサイトカイン濃度を測定する。

（倫理面への配慮）

プロジェクトの遂行に当たっては、動物実験に関しては、動物実験倫理委員会の承認を得て、実験動物の飼育は、空調設備、照明の時間制御の整

った SPF 環境化で週に 1 回の床敷交換、餌水分補給を行っている。また、毎年秋に動物慰霊祭を行っている。また実験に当たっては、麻酔操作を行い、極力苦痛の軽減を行うよう配慮している。

C. 研究結果

1. 大腸粘膜固有層由来 conventional DC を 2 つのサブセットに区分することができた

(PIR-A/B^{high}, PIR-A/B^{low})。PIR-A/B^{high} cDCs は大腸炎の治癒過程で増加するサブセットであった。

2. MLR において、PIR-A/B^{high} cDCs は脾臓や PIR-A/B^{low} cDC と比較し抗原提示活性が低かった。また、PIR-A/B^{high} cDC を添加するとコントロールとして用いた脾臓の cDC の抗原提示活性が低下した。

3. PIR-A/B^{high} cDCs は PIR-A/B^{low} と比較し、TGF- β や IL-10 が高く、IFN γ は低値であった。

D. 考察

炎症性腸疾患の発症機構はこれまで T 細胞をはじめとしたリンパ球を中心に解析が行われてきた。その結果 Th1/Th2 細胞の応答性のバランスの重要性、制御性 T 細胞の関与などが明らかになっている。しかし、自然免疫系がこれら T 細胞の機能をも制御していることが明らかになった。昨今炎症性腸疾患の発症においても自然免疫系の機構の解明が待たれている。今回 DC サブセットを検討する上で指標にした分子 PIR は細胞外に Ig 様ドメインをもつ膜貫通蛋白で、活性型の PIR-A と抑制型の PIR-B がおりその発現の imbalance が host defense 制御機構に関わっており、恐らく PIR を介した T cells と DCs の interaction が免疫反応を制御しうると考えられている。本研究で、DSS 誘発性大腸炎における腸管由来の DC を PIR-A/B の発現に基づいて 2 つのサブセットに区分することができた。そのうち、PIR-A/B^{high} cDC は大腸炎の治癒過程で増加するサブセットであ

り、MLRにおいて抗原提示活性がコントロールと比較して低いことが示された。また、PIR-A/B^{high} cDCを添加するとコントロールとして用いた脾臓のcDCの抗原提示活性は低下したため免疫抑制的な機能を有すると考えられた。その機序としてはRT-PCRにおいてTGF-βやIL-10の産生が目立つ一方で、IFNγの産生は減少している点に関与していると考えられた。

E. 結論

PIR-A/B^{high} cDCsはDSS誘発性大腸炎において病態制御性の機能を有すると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Fukata N, Okazaki K, Omiya M, Matsushita M, Watanabe M; The Members of the Ministry of Health and Welfare of Japan's Inflammatory Bowel Diseases Study Group. Hematologic malignancies in the Japanese patients with inflammatory bowel disease. J Gastroenterol. 2013 Aug 19. [Epub ahead of print]
2. Kurishima A, Inaba M, Sakaguchi Y, Fukui T, Uchida K, Nishio A, Nomura S, Okazaki K. Immunoregulatory function of PIR-A/B₊ DCs in the inflammatory responses of dextran sodium sulfate-induced colitis. J Gastroenterol. 2013 Sep 29. [Epub ahead of print]
3. Toyonaga T, Nakase H, Matsuura M, Minami N, Yamada S, Honzawa Y, Hukata N, Yoshino T, Chiba T, Okazaki K. Refractoriness of Intestinal Behçet's Disease with Myelodysplastic Syndrome Involving Trisomy 8 to Medical Therapies - Our Case Experience and Review of the Literature. Digestion. 2013 Nov 16;88(4):217-221.
4. Matsushita M, Fukata N, Omiya M, Okazaki K. Absence of Large Ulcers Indicate That Viral Therapy is Not Necessary in Cytomegalovirus Infection in Ulcerative Colitis. J Clin Gastroenterol. 2013 Jan;47(1):90-1.
5. Nakajima A, Fukui T, Takahashi Y, Kishimoto M, Yamashina M, Nakayama S, Sakaguchi Y, Yoshida K, Uchida K, Nishio A, Yodoi J, Okazaki K. Attenuation of indomethacin-induced gastric mucosal injury by prophylactic administration of sake yeast-derived thioredoxin. J Gastroenterol. 2012 Sep;47(9):978-87
6. Hoshino S, Kurishima A, Inaba M, Ando Y, Fukui T, Uchida K, Nishio A, Iwai H, Yokoi T, Ito T, Hasegawa-Ishii S, Shimada A, Li M, Okazaki K, Ikehara S. Amelioration of 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in mice by immunoregulatory dendritic cells. J Gastroenterol. 2011;46(12):1368-81
7. Kawamata S, Matsuzaki K, Murata M, Seki T, Matsuoka K, Iwao Y, Hibi T, Okazaki K. Oncogenic Smad3 signaling induced by chronic inflammation is an early event in ulcerative colitis-associated carcinogenesis. Inflamm Bowel Dis. 17(3):683-95, 2011
8. Fukata N, Uchida K, Kusuda T, Koyabu M, Miyoshi H, Fukui T, Matsushita M, Nishio A, Tabata Y, Okazaki K. The effective therapy of cyclosporine A with drug delivery system in experimental colitis. J Drug Target. 19(6):458-67, 2011.
9. Nakase H, Tamaki H, Matsuura M, Chiba T, Okazaki K. Involvement of mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in TNF-α production from macrophage: possible link between MAP and immune response in Crohn's disease. Inflamm Bowel Dis. 17(11):E140-2, 2011
10. Matsushita M, Tanaka T, Fukata N, Omiya M, Okazaki K. No large ulcer: a predictor of latent cytomegalovirus infection in ulcerative colitis. Inflamm Bowel Dis. 17(6):E27-8, 2011
11. Fukui T, Kishimoto M, Nakajima A, Yamashina M, Nakayama S, Kusuda T, Sakaguchi Y, Yoshida K, Uchida K, Nishio A, Matsuzaki K, Okazaki K. The specific linker phosphorylation of Smad2/3 indicates epithelial stem cells in stomach; particularly increasing in mucosae of Helicobacter-associated gastritis. J Gastroenterol. 46(4):456-468, 2011
12. Hoshino S, Kurishima A, Inaba M, Ando Y, Fukui T, Uchida K, Nishio A, Iwai H, Yokoi T, Ito T, Hasegawa-Ishii S, Shimada A, Li M, Okazaki K, Ikehara S. Amelioration of 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in mice by immunoregulatory dendritic cells. J Gastroenterol. 2011;46(12):1368-81

13. Kawamata S, Matsuzaki K, Murata M, Seki T, Matsuoka K, Iwao Y, Hibi T, Okazaki K. Oncogenic Smad3 signaling induced by chronic inflammation is an early event in ulcerative colitis-associated carcinogenesis. *Inflamm Bowel Dis.* 17(3):683-95, 2011
14. Fukata N, Uchida K, Kusuda T, Koyabu M, Miyoshi H, Fukui T, Matsushita M, Nishio A, Tabata Y, Okazaki K. The effective therapy of cyclosporine A with drug delivery system in experimental colitis. *J Drug Target.* 19(6):458-67, 2011.
15. Nakase H, Tamaki H, Matsuura M, Chiba T, Okazaki K. Involvement of mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in TNF- α production from macrophage: possible link between MAP and immune response in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 17(11):E140-2, 2011
16. Matsushita M, Tanaka T, Fukata N, Omiya M, Okazaki K. No large ulcer: a predictor of latent cytomegalovirus infection in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 17(6):E27-8, 2011
17. Hoshino S, Inaba M, Iwai H, Ito T, Li M, Eric Gershwin M, Okazaki K, Ikehara S. The role of dendritic cell subsets in 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced ileitis. *J Autoimmun.* 34(4):380-9, 2010.
18. Omiya M, Matsushita M, Tanaka T, Kawamata S, Okazaki K. The absence of large ulcer predicts latent cytomegalovirus infection in ulcerative colitis with positive mucosal viral assay. *Intern Med.* 49(21):2277-82, 2010.

和文

1. 岡崎 和一, 深田 憲将, 安藤 祐吾, 大宮 美香, 岡崎 敬, 栗島 亜希子, 松下 光伸 炎症性腸疾患におけるリンパ増殖性疾患 胃と腸 2013 ; 48:763-769
2. 岡崎和一, 深田憲將, 大宮美香, 岡崎 敬, 栗島亜希子, 松下光伸 IBDとリンパ増殖性疾患 IBD Research 2012 : 6212-219
3. 田中 篤, 田妻 進, 岡崎 和一, 坪内 博仁, 乾 和郎, 滝川 一 硬化性胆管炎の全国調査 胆道 2013 ; 27 : 176-187
4. 岡崎 和一, 福井 由里, 住本 貴美, 岡崎 敬, 栗島 亜希子 【難治性 Crohn 病の特徴と治療戦略】 全身性合併症の特徴 膵炎 胃と腸 2012 ; 47:1559-1565
5. 若松 隆宏, 島谷 昌明, 諏訪 兼彦, 堀 雄一, 谷村 雄志, 津久田 諭, 松本 泰司, 吉井 將哲, 宮本 早知, 福井 由理, 三好 秀明, 深田 憲将, 松下 光伸, 岡崎 和一 【小腸潰瘍性病変の的確な診断と概念の確立】 小腸潰瘍性病変における内視鏡と放射線学的検査の比較を通じた診断アルゴリズム 消化器内科 2012 ; 54:534-539
6. 岡崎 和一, 栗島 亜希子, 岡崎 敬, 安藤 祐吾 【クローン病の Therapeutic Strategy-mucosal healing は治療のゴールか】 クローン病治療戦略 どのような患者に用いるか 今後の新規治療 Intestine 2012 ; 16:275-281
7. 岡崎 和一, 深田 憲将, 大宮 美香, 松下 光伸 スペシャルシチュエーションにおける IBD 診療】 IBD 患者における血液増殖性疾患の現状 2012 ; 6:28-33
8. 星野 勝一, 岡崎 和一 【免疫統御からみた新しい IBD 治療】 免疫制御性樹状細胞からみた IBD 治療へのアプローチ IBD Research 2011 ; 5:239-244
9. 岡崎 和一, 栗島 亜希子, 岡崎 敬, 松下 光伸 【炎症性腸疾患-病因解明と診断・治療の最新知見-】 炎症性腸疾患の内科的治療 炎症性腸疾患の内科的治療戦略 潰瘍性大腸炎の内科的治療戦略 日本臨床、70 巻増刊 1 炎症性腸疾患 Page273-279 2012 年
10. 岡崎 和一, 松下 光伸, 池浦 司, 高岡 亮 炎症性腸疾患と膵炎 日本臨床 別冊膵臓症候群 Page214-219、2011 年
2. 学会発表
1. Takashi Okazaki, Akiyoshi Nishio, Yutaku Sakaguchi, Toshiro Fukui, Kazushige Uchida, Kazuichi Okazaki. Endoplasmic Reticulum Stress Inhibitor Salubrinal protects against Murine Experimental Colitis via the PERK-eIF2 α signaling pathway. DDW2013 Orland County Convention Center (Orland/Florida) 2013年5月18-21日
2. Yu Takahashi, Toshiro Fukui, Ryo Suzuki, Masanobu Kishimoto, Kazushige Uchida, Koichi Matsuzaki, Akiyoshi Nishio, Kazuichi Okazaki Phosphorylation of Smad2/3 in Stem Cells of Small Intestine. 21th United European Gastroenterology Week Internationales Congress Centrum Berlin, Berlin, Germany 2013/10/12-16
3. Okazaki K. Lymphoproliferative disorder

s in the Japanese patients with inflammatory bowel disease. 6th Korea-Japan IBD symposium, Tokyo, 2012/1/28

4. Takashi Okazaki, Akiyoshi Nishio, Yutaku Sakaguchi, Toshiro Fukui, Kazushige Uchida, Kazuichi Okazaki. Amelioration of endoplasmic reticulum stress through enhanced PERK signaling attenuates murine experimental colitis. UEGW2012 (United European Gastroenterology Week) Amsterdam RAI Exhibition & Convention Centre [Amsterdam, The Netherland) 2012年10月24日

国内学会

1. Okazaki T, Nishio A, MTakeo M, Inoue T, Sakaguchi Y, Fukui T, Uchida K, Okazaki K. Endoplasmic Reticulum Stress Inhibitor Salubrinal protects against Murine Experimental Colitis via the PERK-eIF2 α signaling pathway. The 1st Annual Meeting of Asian Organization for Crohn's & Colitis (AOCC) ホテルラフォーレ東京 (品川) 2013年6月13日
2. 岸本真房 鈴木亮 高橋悠 福井寿朗 坂口雄沢 内田一茂 西尾彰功 岡崎 和ーリンカー部スレオニンリン酸化smad2/3蛋白発現による腸管幹細胞マーカーの探索 第50回日本臨床分子医学会学術集会 東京 2013/4/12-13
3. 高橋 悠 福井寿朗 岡崎和ー pSmad2/3L-Thrの消化管幹細胞マーカーとしての検討とその応用 第99回日本消化器病学会総会 東京 2013/3/21-23

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

PERK シグナル増強を介した ER ストレス軽減による実験的大腸炎の改善効果の検討

研究分担者 岡崎 和一 関西医科大学内科学第三講座 教授

研究要旨：炎症性腸疾患において抗菌ペプチドを産生する小腸パネート細胞や粘液産生を行う大腸胚細胞で小胞体ストレスの亢進が報告されている。実験的大腸炎モデルを用いて薬剤投与により小胞体ストレスを軽減させ、炎症の改善がみられるか検討する。

共同研究者

岡崎敬、西尾彰功、松下光伸、大宮美香、
安藤祐吾（関西医科大学内科学第三講座）

A. 研究目的

炎症性腸疾患では抗菌ペプチドを産生する小腸パネート細胞や粘液産生を行う大腸杯細胞で小胞体ストレスの亢進が報告されている。また、潰瘍性大腸炎では炎症の増強に伴い大腸杯細胞の減少が認められる。潰瘍性大腸炎の健常部大腸粘膜では健常人と比較して小胞体ストレス亢進がみられ、小胞体ストレス関連遺伝子の発現増加が報告されている。小胞体ストレスのセンサーとして activating transcription factor 6 (ATF6), inositol-requiring transmembrane enzyme 1 (IRE1), protein RNA-like ER kinase (PERK) が知られている。これまで炎症性腸疾患における小胞体ストレスの影響については主に IRE1、ATF6 を介する経路が検討されてきたが、PERK シグナルの役割については十分な解析は行われていない。eukaryotic initiation factor 2a (eIF2a) の脱リン酸化の抑制により PERK を介するシグナルを増強して小胞体のストレスを軽減させて大腸炎の治療効果がみられるか検討した。

B. 研究方法

1. DSS を投与しないコントロール群、DSS 誘発性大腸炎群、DSS 誘発性大腸炎群に Salubrinal

を投与した 3 群を作成し、経時的に体重変化、

便の性状を観察した。

2. DSS 投与開始 10 日後に、大腸炎マウスを屠殺し、腸管長の測定を行った。
3. 腸管の炎症程度を病理学組織学的にスコアリングシステムで評価を行った。
4. 遠位腸管の小胞体ストレス関連蛋白の発現を Western Blotting で検討した。
5. 遠位腸管の炎症性サイトカイン産生について RT-PCR で検討した。

(倫理面への配慮)

この研究は、関西医科大学遺伝子組換え実験安全委員会、動物実験委員会において承認されている。(承認番号：13-092)

C. 研究結果

1. Salubrinal 投与群では対照群と比較して DSS 投与 8 日目から有意に体重減少の改善を認めた。
2. Salubrinal 投与群では対照群と比較して有意に腸管長の短縮が改善した。(Salubrinal 投与群：7.7 cm、対照群：6.8 cm)
3. Salubrinal 投与群では腸炎の重症度、炎症深達度、腺窩損傷について対照群と比較して有意に軽減を認めた。
4. 遠位腸管において GRP78 とリン酸化 eIF2a は発現の増加がみられ、リン酸化 eIF2a/eIF2a

比は対照群と比較して Salubrinal 投与群で高値であった。Heat shock protein (HSP70)およびリン酸化 eIF2 α の下流シグナルである ATF4 は Salubrinal 投与群で高値であった。

5. 炎症性サイトカイン (TNF- α 、IFN- γ) は Salubrinal 投与群で有意に改善を認めた。

D. 考察

Salubrinal 投与により eIF2 α のリン酸化状態が維持されて unfolded protein response (UPR) が持続し UPR stress element (UPRSE) が活性化され、ATF4、GRP78 等の小胞体ストレス関連蛋白を誘導したと考えられた。増加した GRP78 は蛋白の糖鎖付加、folding 機能向上、misfolding protein 分解促進に関与して小胞体機能の維持に関与していると推測された。さらに、HSP70 に代表される HSP の誘導も細胞障害からの保護や組織修復に関与していると考えられた。

E. 結論

PERK シグナル経路を介して小胞体ストレスを軽減することにより大腸炎の改善を認めたことより、潰瘍性大腸炎やクローン病における治療の選択肢となる可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Fukata N, Okazaki K, Omiya M, Matsushita M, Watanabe M; The Members of the Ministry of Health and Welfare of Japan's Inflammatory Bowel Diseases Study Group. Hematologic malignancies in the Japanese patients with inflammatory bowel disease. J Gastroenterol. 2013 Aug 19. [Epub ahead of print]
2. Kurishima A, Inaba M, Sakaguchi Y, Fukui T, Uchida K, Nishio A, Nomura S, Okazaki K. Immunoregulatory function of PIR-A/B \pm DCs in the inflammatory responses of dextran sodium sulfate-induced colitis. J Gastroenterol. 2013 Sep 29. [Epub ahead of print]
3. Toyonaga T, Nakase H, Matsuura M, Minami N, Yamada S, Honzawa Y, Hukata N, Yoshino T, Chiba T, Okazaki K. Refractoriness of

Intestinal Behçet's Disease with Myelodysplastic Syndrome Involving Trisomy 8 to Medical Therapies - Our Case Experience and Review of the Literature. Digestion. 2013 Nov 16;88(4):217-221.

4. Matsushita M, Fukata N, Omiya M, Okazaki K. Absence of Large Ulcers Indicate That Viral Therapy is Not Necessary in Cytomegalovirus Infection in Ulcerative Colitis. J Clin Gastroenterol. 2013 Jan;47(1):90-1.

和文

1. 岡崎 和一, 深田 憲将, 安藤 祐吾, 大宮 美香, 岡崎 敬, 栗島 亜希子, 松下 光伸 炎症性腸疾患におけるリンパ増殖性疾患 胃と腸 2013 ; 48:763-769
2. 岡崎和一、深田憲將、大宮美香、岡崎 敬、栗島亜希子、松下光伸 IBDとリンパ増殖性疾患 IBD Research 2012 : 6212-219
3. 田中 篤, 田妻 進, 岡崎 和一, 坪内 博仁, 乾 和郎, 滝川 一 硬化性胆管炎の全国調査 胆道 2013 ; 27 : 176-187
2. 学会発表
1. Takashi Okazaki, Akiyoshi Nishio, Yutaku Sakaguchi, Toshiro Fukui, Kazushige Uchida, Kazuichi Okazaki. Endoplasmic Reticulum Stress Inhibitor Salubrinal protects against Murine Experimental Colitis via the PERK-eIF2 α signaling pathway. DDW2013 Orland County Convention Center (Orland/Florida) 2013年5月18-21日
2. Yu Takahashi, Toshiro Fukui, Ryo Suzuki, Masanobu Kishimoto, Kazushige Uchida, Koichi Matsuzaki, Akiyoshi Nishio, Kazuichi Okazaki Phosphorylation of Smad2/3 in Stem Cells of Small Intestine. 21th United European Gastroenterology Week Internationales Congress Centrum Berlin, Berlin, Germany 2013/10/12-16

国内学会

1. Okazaki T, Nishio A, MTakeo M, Inoue T, Sakaguchi Y, Fukui T, Uchida K, Okazaki K. Endoplasmic Reticulum Stress Inhibitor Salubrinal protects against Murine Experimental Colitis via the PERK-eIF2 α signaling pathway. The 1st An

nual Meeting of Asian Organization for Crohn's & Colitis (AOCC) ホテルラフォーレ東京 (品川) 2013年6月13日

2. 岸本真房 鈴木亮 高橋悠 福井寿朗 坂口雄沢 内田一茂 西尾彰功 岡崎 和一
リンカー部スレオニンリン酸化smad2/3蛋白発現による腸管幹細胞マーカーの探索
第50回日本臨床分子医学会学術集会 東京
2013/4/12-13
3. 高橋 悠 福井寿朗 岡崎和一 pSmad2/3L-Thrの消化管幹細胞マーカーとしての検討とその応用 第99回日本消化器病学会総会 東京
2013/3/21-23

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

日本人クローン病患者のバイオマーカーの確立

研究協力者 光山 慶一 久留米大学内科学講座消化器内科部門 教授

研究要旨：ファージディスプレイ法の技術を用いて、日本人クローン病患者血清と特異的かつ高率に反応する抗原（ペプチド）の探索を行なった。その結果、TCP353 に対する抗体である ACP353 が CD に特異的かつ有用なバイオマーカーとなることが示唆されるとともに、その対応抗原は CD の病態にも深く関与し、病因の追求、新規治療法の開発の面からも重要な因子と考えられた。

A. 研究目的

近年、特定の疾病に相関して変化するバイオマーカーの臨床、病態上の意義が注目されている。炎症性腸疾患においても、主として欧米人患者において腸内細菌や食物抗原に対する抗 Flagellin 抗体、抗 OmpC 抗体、抗 I2 抗体、ASCA や、自己細胞に対する PCNA などがバイオマーカーとして報告されている。しかし、これらのマーカーの日本人患者での陽性率や特異性は必ずしも満足できるものでなく、日本人に有用なバイオマーカーの確立が急務である。本研究では、近年開発されたファージディスプレイ法の技術を用いて、日本人クローン病 (CD) 患者血清と特異的かつ高率に反応する抗原（ペプチド）の探索を行なった。

B. 研究方法

(1) 大腸癌 cDNA を用いて作製した T7 ファージディスプレイライブラリーを、多数の CD 患者血清中の IgG を用いてスクリーニングした。CD 患者血清と特異的に結合するファージを選別し、発現ペプチド (TCP353) のアミノ酸配列を決定した。(2) CD、潰瘍性大腸炎 (UC)、健常人より末梢血単核球 (PBMC) を分離し、合成した抗原ペプチド (TCP353) の刺激下で 24 時間培養し、上清中の各種サイトカイン濃度を測定した。(3) TCP353 を用いて ELISA を構築し、多施設共同研究で CD 196

例、UC 210 例、急性腸炎 98 例、膠原病 132 例、健常人 183 例での血清抗体価を測定した。さらに ASCA の血清抗体価との関連を検討した。

(倫理面への配慮)

倫理委員会の承認を受けた上で検討を行った。

C. 研究結果

(1) 本新規抗原ペプチドのホモロジー検索では、既存のバイオマーカーを含む如何なる蛋白抗原とも相同性を認めなかった。(2) TCP353 で PBMC を刺激すると、CD の PBMC では UC や健常人の PBMC と異なり、炎症性サイトカインの産生亢進がみられた。(3) TCP353 に対する抗体 (ACP353) の血清抗体価は、CD 63.3%、UC 12.4%、急性腸炎 12.2%、健常人 3.3% で陽性であった。ROC カーブでは、ACP353 の方が ASCA よりも有用であった。

D. 考察

ACP353 は CD の有用なバイオマーカーとなることが示唆されるとともに、その対応抗原は CD の病態にも深く関与し、病因の追求、新規治療法の開発の面からも重要な因子と考えられた。今後、全国レベルでの検討を行って臨床的有用性を評価するとともに、外国人症例（欧米、アジア）での測定を行なう予定である。研究面では、抗原蛋白の同定や、トランスジェニックマウスの作製などにより、クローン病の病因、病態との関連を追及中である。また、潰瘍性大腸炎患者についても、

同様の方法により特異的抗原（ペプチド）の探索を行う予定である。

E. 結論

TCP353 に対する抗体 (ACP353) は CD に特異的で、日本人 CD の有用なバイオマーカーとなることが示唆された。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Mitsuyama K, Niwa M, Masuda J, Yamasaki H, Kuwaki K, Takedatsu H, Kobayashi T, Kinjo F, Kishimoto K, Matsui T, Hirai F, Makiyama K, Ohba K, Abe H, Tsubouchi H, Fujita H, Maekawa R, Yoshida H, Sata M; The Kyushu ACP Study Group. Possible diagnostic role of antibodies to Crohn's disease peptide (ACP): results of a multicenter study in a Japanese cohort. J Gastroenterol. (2013 Dec 3. [Epub ahead of print])

2) Mitsuyama K, Niwa M, Masuda J, Kuwaki K, Yamasaki H, Takedatsu H, Kobayashi T, Sata M. Isolation and characterization of a novel

short peptide associated with Crohn's disease. Clin Exp Immunol. 166:72-9, 2011

3) 光山慶一, 佐田通夫. 炎症性腸疾患とバイオマーカー: 血清抗体の意義. IBD Research 4: 274-9, 2010

2. 学会発表

光山慶一、増田淳也、山崎 博、桑木光太郎、竹田津英稔、吉岡慎一郎、小林哲平、鶴田 修、佐田通夫. クロウン病の新規バイオマーカーの検討. 第96回日本消化器病学会総会. 新潟. 2010/4/22

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

クローン病抗体エピトープペプチドおよびクローン病の検査試薬. 日本 (2010/10/1), 米国 (2011/07/26), ドイツ (2009/06/17), イギリス (2009/06/17), フランス (2009/06/17), イタリア (2009/06/17), スペイン (2009/06/17), 中国 (審査中), 韓国 (審査中)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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

研究協力者 三浦 総一郎 防衛医科大学校 学校長

研究要旨：Crohn 病および潰瘍性大腸炎 (UC) にて当科受診中の患者で病変部粘膜のオートタキシン (ATX) の発現を非病変部と比較した。ATX の発現量は、病変部で増加し、Crohn 病および UC との関連が示唆された。ATX は炎症粘膜に発現する高内皮円柱様静脈に発現し、その血管から炎症細胞の浸潤像が観察された。マウス腸炎モデルを用い、オートタキシン (ATX) 阻害剤の有無による腸炎活動性への効果を検討した。ATX 阻害剤の投与により、リンパ球浸潤が有意に抑制され腸炎が改善した。血管内非細胞を高内皮円柱様静脈に *in vitro* で分化させると ATX が発現しリンパ球 transmigration が亢進したが、リゾフォスファチジン酸の阻害でその効果はキャンセルされた。ATX の阻害でも同様の阻害効果を認めた。以上より、ATX が UC・Crohn 病の病態に関与する可能性が示唆された。

A. 研究目的

脂質メディエーターのひとつであるリゾフォスファチジン酸、およびその産生酵素であるオートタキシン (ATX) は、リンパ球の 2 次リンパ組織への migration への関与が報告されているが、Crohn 病および潰瘍性大腸炎 (UC) の病変粘膜における migration の関与は報告されていない。第一の目的としては、Crohn 病および UC 患者における ATX 発現を評価し、その病態との関連を検討した。第二の目的としては動物モデルを用い、ATX の HEV-like vessel における migration への作用につき検討を行った。第三の目的としては血管内皮細胞を HEV-like vessel 化させ、ATX を発現するモデルを作成し、リンパ球 migration のメカニズムを追求した。

B. 研究方法

Crohn 病もしくは UC にて当科受診中の患者様で、通常内視鏡検査の際に活動性および非活動性の部位から生検採取し、ATX の組織中 mRNA 発現を Real Time PCR を用いて定量解析した。動物実験

としてリンパ球移入モデルを用い、ATX 阻害剤の投与による腸炎活動性の変化につき解析を行った。b.End 3 細胞に TNF-alpha を投与し、high endothelial cell を誘導した。Transwell assay に b.End 3 細胞を confluent に培養し、リンパ球を上層に添加し、transmigration を計測した。リゾフォスファチジン酸の競合阻害剤として Br-LFA、ATX の阻害剤としてピチオノールを使用した。

(倫理面への配慮)

当院倫理委員会の承認を受けて実施した。

C. 研究結果

ATX の発現量は、非活動部の組織と比較して有意に高値を示した。同一患者内の比較においても、活動部の ATX 発現は非活動部より有意に高値を示した。また、UC においては、内視鏡的 Matts' grade の増加に伴い、ATX の発現量も増加傾向を示した。リンパ球移入モデルで ATX 発現が増加した。ATX 阻害剤の投与によりリンパ球浸潤は抑制され、腸

炎は改善した。b. End 3 細胞に TNF- α を投与し、high endothelial cell になることを形態的に確認した。その際、MAdCAM-1 の発現が増加した。Transwell assay で high endothelial cell はリンパ球 migration が亢進することを確認した。この細胞は ATX 発現が亢進していた。リンゴ酸の競合阻害剤でリンパ球 migration の亢進は抑制された。ATX の阻害剤でリンパ球 migration の亢進は抑制された。この際、MAdCAM-1 の発現やケモカイン CCR7 の発現には変化がなかった。また ATX 阻害剤処理は血管内皮の形態に変化を与えなかった。

D. 考察

慢性炎症の環境下にある粘膜では、静脈が HEV-like vessel に変化し、MAdCAM-1 などの接着分子が異所性に発現するが、ここに ATX が発現しリンパ球 migration に関与するものと考えられる。ATX はリンゴ酸産生を介して効果を発現すると考えられるが、その機序は接着分子やケモカインなどとは独立したものと考えられる。

E. 結論

Crohn 病および UC における異常なリンパ球 migration に ATX 発現が関連しており、新たな炎症細胞マイグレーション阻害治療のターゲットとなる可能性があると考えられる。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 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 α expression in colonic mucosa of patients with ulcerative colitis. *Int. J. Colorectal. Dis.* 1049-1055, 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. G708-G714, 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.* 508-519, 2013
4. 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.* 2013 Dec;28 Suppl 4:29-3

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 TNF α 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
6. Hozumi H, Hokari R, Kurihara C, Ueda T, Sato S, Sato H, Narimatsu K, Okada Y, Watanabe C, Komoto S, Tomita K, Kawaguchi A, Nagao S, Miura S. Spontaneous hemorrhage observed in endoscopic findings suggests increased expression of tumor necrosis factor- α in colonic mucosa of ulcerative colitis.

- Digestive Disease Week 2012 San Diego, 2012. 05. 19-22.
7. Hozumi H, Hokari R, Kurihara C, Ueda T, Sato S, Sato H, Narimatsu K, Okada Y, Watanabe C, Komoto S, Tomita K, Kawaguchi A, Nagao S, Miura S. Inhibition of autotaxin-lysophosphatidic acid axis significantly ameliorates chronic intestinal damage by modulating lymphocytes migration to intestinal mucosa. Digestive Disease Week 2012 San Diego, 2012. 05. 19-22.
8. 八月朔日秀明、穂苺量太、栗原千枝、佐藤宏和、成松和幸、佐藤伸悟、上田俊秀、東山正明、岡田義清、渡辺知佳子、高本俊介、富田謙吾、川口 淳、永尾重昭、三浦総一郎：Expression of autotaxin/lysophospholipase D in high endothelial venule-like vessel and its role on aberrant lymphocyte migration in inflamed intestinal mucosa. (腸管炎症時における異所性のリンパ球マイグレーションにおける高内皮細静脈様血管での autotaxin/lysophospholipase D 発現に関して) . 第 37 回日本微小循環学会総会、2012.
9. 佐藤宏和、穂苺量太、三浦総一郎：炎症性腸疾患におけるリンパ管新生因子の検討. 第 35 回日本リンパ学会総会、2012. 06. 29-30, 東京
10. 成松和幸、佐藤宏和、東山正明、上田俊秀、渡辺知佳子、高本俊介、富田謙吾、穂苺量太、三浦総一郎：NSAIDs 起因性小腸潰瘍に対する Toll-like receptor 2 agonist の抑制効果。第 49 回日本消化器免疫学会総会、2012. 07. 5-6, 鹿児島
11. 成松和幸、東山正明、佐藤宏和、八月朔日秀明、上田俊秀、佐藤伸悟、渡辺知佳子、栗原千枝、岡田義清、高本俊介、富田謙吾、穂苺量太、川口淳、永尾重昭、三浦総一郎：Toll-like receptor 2 agonist によるインドメタシン起因性小腸潰瘍の抑制効果。シンポジウム：粘膜上皮修復機転の最前線、第 40 回日本潰瘍学会総会、2012. 07.
12. 佐藤宏和、穂苺量太、成松和幸、上田俊秀、東山正明、渡辺知佳子、高本俊介、富田謙吾、栗原千枝、岡田義清、川口淳、永尾重昭、三浦総一郎：炎症性腸疾患におけるリンパ管新生における検討、シンポジウム：IBD 診療・治療への更なる挑戦、第 30 回日本大腸検査学会総会、2012. 09. 1. 東京
13. 穂苺量太、上田俊秀、東山正明、富田謙吾、岡田義清、栗原千枝、成松和幸、佐藤宏和、渡辺知佳子、高本俊介、川口 淳、永尾重昭、三浦総一郎：腸管炎症における脂肪摂取の影響- ω 3 系多価不飽和脂肪酸の 2 面性、第 9 回日本在宅静脈経腸栄養研究会学術集会、2012.
- 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

潰瘍性大腸炎における末梢血および大腸粘膜内 NKG2A+ T 細胞の減少

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

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

A. 研究目的

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

B. 研究方法

8~10 週齢のオスの Balb/C マウスに、3~5%の DSS 水溶液を自由飲水させ DSS 腸炎マウスを作成した。末梢血単核球および大腸粘膜固有層内単核球を採取し NKG2A+ T 細胞についてフローサイトメトリーで検討した。また、NKG2A が腸炎抑制に働いているか確認するため、抗 NKG2A 抗体を腹腔内投与し腸管の組織学的検討を行った。一方ヒトでは

UC 患者、CD 患者、および健常ボランティアより末梢血を採取しフローサイトメトリーで検討した。また、UC、CD の手術検体、正常腸管組織として大腸癌患者の手術検体の正常部分を用い免疫染色による検討を行った。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

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

D. 考察

NKG2A+ T 細胞は、TCR 刺激の閾値の上昇、サイト

カイン産生の抑制、細胞傷害活性の減弱により T 細胞の免疫反応を調整すると考えられている。本研究で DSS 腸炎マウスでは炎症期で腸管内 NKG2A+ T 細胞の割合は増加し、炎症改善後には正常近くまで減少するという腸管局所で顕著な変化を示していたこと、また、DSS 腸炎マウスに抗 NKG2A 抗体を投与することで腸管粘膜の炎症巣が増加する傾向が認められたことから、NKG2A+ T 細胞は腸管の炎症部位に集積し、炎症を抑制している可能性が示唆された。ヒトでは過去の報告から NKG2A+ T 細胞が低下することが炎症過剰状態の要因の 1 つであると推定される。本研究での興味深い点は、UC 患者では NKG2A+ T 細胞が末梢血のみならず炎症局所の腸管粘膜固有層でも減少していたことである。これは DSS 腸炎マウスで NKG2A+ T 細胞が炎症期に腸管に集積していた現象と相反している。これらの結果から NKG2A+ T 細胞は過剰な炎症反応を抑制する作用を有しており、UC 患者では NKG2A+ T 細胞が減少しているために適切な免疫応答の調節が行えず、慢性・持続性の腸炎を発症している可能性が考えられた。

E. 結論

DSS 腸炎マウスでは炎症期に末梢血中の NKG2A+ T 細胞の割合が減少し大腸粘膜固有層中の NKG2A+ T 細胞の割合が増加していること、NKG2A+ T 細胞は腸炎の炎症抑制作用を有すると推定されること、

UC 患者では末梢血、大腸粘膜固有層両方の NKG2A+ T 細胞の割合が減少していることが示された。NKG2A+ T 細胞の炎症抑制機能について検討を深め、更に NKG2A+ T 細胞を量的・質的にコントロールすることができれば、新たな治療戦略につながる可能性がある。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表 1. 論文発表

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

2. 学会発表 なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

潰瘍性大腸炎における血球成分除去療法前後のケモカインプロファイリング

分担研究者 坪内 博仁 鹿児島市立病院 病院長

研究要旨：血球成分除去療法は副作用の少ない有効な治療法として認識されているが、効果発現に時間がかかるため治療期間が長期に及びやすい。また、効果予測マーカーがないため他の治療法にスイッチする機会が遅れてしまう可能性がある。

本研究では血球成分除去療法を受けた炎症性腸疾患患者の血液サンプル中のケモカイン濃度を測定し、新たな血球成分除去療法のバイオマーカーを探索した。ケモカインチップやELISA法による測定で潰瘍性大腸炎の血漿 CCL5 濃度は、クローン病や健常者と比較し有意に高濃度であった。寛解導入可能群の治療前の血漿 CCL5 濃度は非寛解群と比較し有意に高値を示しており、加療後に有意に低下していた。血漿 CCL5 濃度は血球成分除去療法の治療効果を予測でき、治療法の選択や治療期間の短縮を目指すことができる可能性がある。本研究により、CCL5 は炎症性腸疾患における血球成分除去療法のバイオマーカー候補ケモカインのひとつであることが示された。

共同研究者

上村修司 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科
消化器疾患・生活習慣病学 助教
小野陽平 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科
消化器疾患・生活習慣病学
沼田政嗣 鹿児島大学医学部・歯学部附属病院
光学医療診療部 講師
藤田 浩 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科
消化器疾患・生活習慣病学 助教
井戸章雄 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科
消化器疾患・生活習慣病学 教授

血中の炎症性サイトカインの減少やその産生能の抑制、制御性サイトカインの増加などが報告されているが、未だ明らかになっていない点も多い。炎症性腸疾患の病態には fractalkine、RANTES など様々なケモカインの関与が報告されているが、CAP におけるケモカインの変化を解析した報告はほとんどない。そのため、CAP 前後のケモカインの発現量を測定し、CAP のバイオマーカー探索ならびに CAP の作用機序の解明を目的に検討を行った。

A. 研究目的

本邦で開発された血球成分除去療法（CAP: cytapheresis）は、潰瘍性大腸炎やクローン病の難治例などに対し用いられている。CAP の作用機序として顆粒球や単球の除去、末梢

B. 研究方法

本研究は鹿児島大学関連施設の共同研究である”血球成分除去療法が疾患関連因子に与える影響“のサンプルを使用して行われた。当