

AMCoR

Asahikawa Medical College Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

旭川医科大学研究フォーラム（2006.12）7巻1号:55～68.

平成16年度「独創性のある生命科学研究」参画プロジェクト1 難治性腸疾患の分子基盤の研究

研究班長 河野 透

依 頼 稿 (報告)

平成16年度「独創性のある生命科学研究」参画プロジェクト 1 難治性腸疾患の分子基盤の研究

研究グループ構成と担当研究分野

1. 難治性腸疾患外科的治療（小腸移植）に関する研究

河野 透助教授、葛西眞一教授グループ 第二外科（現 消化器病態外科学分野）

立野正敏教授グループ 第二病理学（現 免疫病理分野）

2. 炎症性腸疾患の病因、病態に関する研究

2-1. 自然免疫と難治性腸疾患

蘆田知史講師、高後 裕教授グループ 第三内科（現 消化器・血液腫瘍制御内科学分野）

若宮伸隆教授グループ 微生物学講座

2-2. 細胞内情報伝達系レベルと炎症性腸疾患

奥村利勝教授グループ 総合診療部

谷口隆信教授グループ 第一生化学（現 細胞制御科学分野）

プロジェクト 1 研究背景と目的

炎症性腸疾患は難治性腸疾患の代表的疾患群であり、特に潰瘍性大腸炎、クローン病がその代表的疾患である。両疾患ともに現時点では原因不明であり、患者数は年間15%近く増加している。現在、潰瘍性大腸炎8万人、クローン病2万人以上が登録されている（図1）。しかも、一年あたりの発生率では炎症性腸疾患患者数が200万人以上いるといわれる欧米各国の発症率と同程度の発症率を示しているため、2010年には潰瘍性大腸炎13万、クローン病4万と両方で17万人近い患者数となることが予想されている（図2）。両疾患ともに若年者発症が多く、高齢化社会を迎えた日本をはじめ欧米各国における重要な働き手となる若年者がこれら疾患によって社会活動が制限されることが問題視され始めている。北海道は患者数も他の地域に比べても多く、その中で、旭川医科大学は北海道の中核病院として内科、外科領域において数多くの患者さんの治療に昼夜を問わず当たってきている（図3）。しかしながら疾患原因は不明であり、根本的な治療法が存在しないため、治療に難渋しているのが現状である。そこで、

この現状を打破する第一歩として旭川医科大学の基礎講座、臨床講座がグループを形成しながら、研究を進めていくのが本プロジェクトを遂行する重要な目的である。

1. 難治性腸疾患外科的治療（小腸移植）に関する研究

難治性腸疾患の克服を目指した小腸移植の分子基盤の研究

河野 透助教授、葛西眞一教授グループ 第二外科（現 消化器病態外科学分野）

海老澤良昭、千里直之 第二外科

前本篤男、綾部時芳、蘆田知史、高後 裕 第三内科

【研究成果の概要】

1) 研究背景と目的

成人において、クローン病やバーチエット病などの難治性腸疾患では、罹病期間が長期になると複数回の手術により短腸症候群となる症例や、小腸機能の廃絶のために食事摂取が不可能になり、長期生存が困難と

なる症例が多数出現してきている。旭川医科大学でのデータでもクローン病における再手術率は5年間で26%に達しており、数年以内に1 m以下の短腸症候群となる症例が統計学上予想されている(図4、図5)。そこで、小腸移植が有効な治療手段として登場するが、ヒトの小腸は強い拒絶反応(早期・晩期)のため移植が最も困難な臓器の1つである。本邦では未だに数例が成功したにすぎず、しかも多くの失敗例を伴っており、この分野に取り組んでいる研究機関も少ない。小腸移植の先進国であるアメリカにおいては早期拒絶反応に対する免疫抑制剤の新たな展開により、2001年以降は劇的に改善し、移植小腸生存率は1年以内では90%以上となった。しかしながら、未だに拒絶反応発見のための有効なマーカーが無い、晩期における拒絶反応の早期発見ができずに生存率の改善が進んでおらず、5年で40%未満が現状である。したがってどの患者が長期生存可能なのか判断することができないばかりか、定期的に小腸生検を行い粘膜の異常を早期に知るというサーベイランスを行っているが、患者に対する負担も大きいだけでなく、拒絶反応の早期発見には繋がっていない。

われわれはこれまでに、炎症性腸疾患症例の外科的切除された臨床材料の系統的解析を行い粘膜直下の粘膜固有層にこれまで見逃されてきた神経ネットワークが存在し、その神経ネットワークが小腸粘膜の形態(陰窩、絨毛)および陰窩の幹細胞分化、パネート細胞機能(抗菌物質分泌)をコントロールしている可能性を見いだしてきた(図6)。また多くの臓器で神経が免疫をコントロールしていることが明らかとなってきたことから、小腸の免疫機構に関して神経ネットワークが関与している可能性が想定される。そこで本研究では、ヒトの小腸移植後における拒絶反応早期発見のための重要なマーカーとして粘膜固有層に存在する神経ネットワークに着目した。つまり、移植小腸は完全に神経は切断されているが、移植時にレシーピエントの神経と接合されることはないことから、神経がドナーとレシーピエントの神経同士が再び有機的に接合し、神経ネットワークを復活させることで、移植された小腸は粘膜の形態および機能を維持し、免疫をコントロールし長期にわたり生着が可能となるのではないかと仮説を持つに至った(図7)。本研究では移植小腸の粘膜固有層の神経ネットワークの形態変化

と拒絶反応の有無との関連性を検討した。

2) 研究方法

アメリカにおける小腸移植拠点病院の1つであるジョージタウン大学小腸移植部門と共同研究^aを行い、移植小腸の経時的生検組織、拒絶反応によって摘出された移植小腸、宿主の移植原因となったクローン病小腸、先天的神経節欠損症の腸管などを現場で採取した。また、当科における手術材料でヒト正常小腸、クローン病小腸などを採取し、これら標本について一部はEDTAによって小腸粘膜を除去し、粘膜直下の固有層を露出し、神経関連性の免疫抗体であるPGP9.5、S-100、Neurofilament Protein、各種神経ペプチドの免疫抗体を使用した免疫染色およびDAPI核染による神経ネットワークの解析をレーザー顕微鏡を用いて行った。

3) 研究成果と考察

ヒト腸管粘膜上皮は腸管壁内の神経節からのびてきた神経線維終末に近接していることは既によく知られている。この神経と上皮細胞の近接した関係は水やイオンの出入りの調整に関与していると考えられている¹⁾。われわれは小腸の自然免疫機能と神経との関連を明らかにするという研究過程で、小腸粘膜上皮とその直下にある粘膜固有層を分離する技術を考案し、今回の研究に応用した。この方法によって機能的にも維持された陰窩および絨毛、つまり上皮全体を剥がし、粘膜直下の粘膜固有層の最も粘膜細胞に近接した部分を露出することに成功した。その結果、陰窩全体を包んでいるカップ状の固有層、絨毛内部の突出した固有層を露出した組織片(約2×2 cm)を得た²⁾。そこで、この組織を使用して神経全般を同定できるPGP9.5による免疫染色を行ったところ、驚くべきことに、神経ネットワークが露出した陰窩、絨毛、パイエルパッチの粘膜固有層表面をメッシュ様に覆うように存在することを明らかにできた。この神経繊維は上皮層に存在することが古くから動物やヒトで報告されてきたものと一致していると考えられる^{3,4,5)}。しかしながら、その神経線維および神経細胞が神経ネットワークをメッシュ様に構築されていることは報告されていない。これまで発見されてこなかった理由として、今回作製した組織片の特徴にあるものとする。つまり、組織全体を観察するために縦横約2×2 cmの組織片をその

まま利用した免疫染色を行うと目的とする粘膜固有層表面を粘膜細胞が覆っているため、十分抗体が浸透できないが、その粘膜細胞を剥がすことで、免疫染色可能となったものとする。さらには3D構築を行う目的でレーザー顕微鏡を使用することで、より神経ネットワークが明らかになったものと考えられる。グリアマーカーである S-100 と PGP との二重染色ではグリア細胞と絡み合っている神経ネットワークに存在することを明らかにできた。

クローン病では腸管神経が破壊され、神経細胞、神経線維が減少していることが、実験モデル、臨床例で報告されている^{6,7,8)}。このことが結果ではなく原因である可能性が指摘されている。つまり、神経破壊を選択的に行うことで腸管に炎症を起こすことができると報告があり、腸管神経が腸管粘膜防御機構を維持するために不可欠であるためと推定されている^{7,9)}。われわれの外科的切除したクローン病患者の腸管において炎症が強い活動期の部分と炎症が落ち着いている緩解期の部分を比較してみたところ、活動期の部分では粘膜固有層直上のメッシュ様神経ネットワークはほとんど破壊されていた。しかしながら、グリア細胞は残存していた。緩解期の部分ではメッシュ様神経ネットワークは神経細胞、神経線維、グリア細胞共に維持されているものから不完全に維持されているものまで様々であった。最近の報告ではグリア細胞がクローン病の病勢に関与している可能性を指摘しており、このことは今回の研究結果を指示するものとする⁷⁾。

まだ、仮説の段階ではあるが、われわれは今回発見したメッシュ用神経ネットワークが粘膜上皮のいわゆる「足場」的機能を有しているのではないかと考えている。つまり、腸管機能を維持するためには陰窩、絨毛の形態学的特色も維持しなければならないことは当然であり、神経ネットワークは機能と形態を維持する「足場」であるという立場で今後の研究を進めていきたい。緩解期のクローン病腸管で神経ネットワークが不完全に維持されている腸管粘膜における陰窩、絨毛の形態は正常のものとは全く異なる形態であったことはわれわれの仮説を一部指示するものとする。

移植小腸における検討では、移植後1年で拒絶反応もなく生着状況がよいものでは粘膜の絨毛、陰窩などの形態は維持され、メッシュ様神経ネットワークも存在していた。しかしながら、メッシュ様神経ネットワー

クの形態は明らかに正常とは異なっている症例も存在した。その症例における絨毛、陰窩の形態は正常とは異なっていた。この患者は後に、晩期の拒絶反応が出現し、再移植となった。その他、拒絶反応を起こした移植小腸では絨毛、陰窩は破壊または異常な形態を示し、メッシュ様神経ネットワークも破壊されており、グリア細胞までも消失していた。移植小腸における検討はまだ十分進んではないが、移植小腸の機能、形態を維持するためにはやはり「足場」としての粘膜直下のメッシュ様神経ネットワークの存在が重要である可能性があるのではないかと考え、移植小腸に対する拒絶反応出現を予測する上で、このメッシュ様神経ネットワーク構築がうまく行われているか否かを確認することが重要なのではないかと考える。つまり、神経ネットワークは移植小腸の拒絶反応マーカーになりうるか否かを今後さらに症例を重ねて検討していきたい。

4) ま と め

小腸粘膜上皮直下に陰窩、絨毛を裏打ちするようなメッシュ様構造をもつ神経ネットワークが存在することを明らかにし、小腸移植時における拒絶反応出現を予測するマーカーとなる可能性を示唆した。

References

1. Kunze, W.A.A. & Furness, J.B. The enteric nervous system and regulation of intestinal motility. *Ann. Rev. Physiol.* 61,117-142 (1999)
2. Ayabe, T. *et al.* Secretion of microbicidal α -defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria. *Nature Immunol.* 1, 113-118 (2000).
3. Balemba, O.B. *et al.* An immunohistochemical study of the organization of ganglia and nerve fibres in the mucosa of the porcine intestine. *Anat. Histol. Embryol.* 31, 237-246 (2002).
4. Schultzberg, M., *et al.* Distribution of peptide and catecholamine containing neurons in the gastrointestinal tract of rat and guinea pig: immunohistochemical studies with antisera to substance P, vasoactive intestinal peptide, enkephalins, somatostatin, gastrin/cholecystokinin, nerotensin, and dopamine β -hydroxylase. *Neuroscience* 5, 689-744 (1980).

5. Bredkjaer, H.E., Wulff, B.S., Emson, P.C., & Fahrenkrug, J. Location of PHM/VIP mRNA in human gastrointestinal tract detected by in situ hybridization. *Cell Tissue Res.* 276, 229-238 (1994)
6. Lomax A.E, Fernandez, E., & Sharkey KA. Plasticity of the enteric nervous system during intestinal inflammation. *Neurogastroenterology and Motility.* 17, 4-15 (2005)
7. Cornet A., et al. Enterocolitis induced by autoimmune targeting of enteric glial cells: A possible mechanism in Crohn's disease? *Proc Natl Acad Sci (USA)* 98, 13306-13311 (2001)
8. Sanovic, S., Lamb, D.P., & Belenherhassett, M.G. Damage to the enteric nervous system in experimental colitis. *Am. J. of Pathol.* 155, 1051-1057 (1999)
9. Bush, T.G. et al. Fulminant jejuno-ileitis following ablation of enteric glia in adult transgenic mice. *Cell* 93, 189-201 (1998).

海外共同研究者 a: T. Fishbein & M. Zasloff

Transplant Institute, Department of Surgery, Georgetown University School of Medicine, Washington, DC., USA

1. 難治性腸疾患外科的治療（小腸移植）に関する研究

移植片対宿主（GVH）病発症の解析

立野正敏教授グループ 第二病理学（現 免疫病理分野）

【研究成果の概要】

1) 研究背景と目的

多くの臓器移植の合併症として移植片対宿主（Graft versus Host: GVH）反応が問題となるが、移植片に含まれるT細胞を主体とするリンパ球の存在と拒絶予防に行われる免疫抑制剤投与による宿主の免疫能低下がその背景にあると考えられている（図9）。固形臓器の移植において移入されるリンパ球は100万個以下 Peyer's patch を含む小腸移植においては1億個台のリンパ球が移入され、移入リンパ球が原因となるGVH病が問題となることが推定され、GVH類似モデルとして免疫能の未発達な新生マウスにF1由来のリ

ンパ球を投与して発症するHVGモデルを用いて拒絶反応抑制に働く制御T細胞（Treg）の動態、機序を検討することを本研究の目的とした。

2) 研究方法

1. HVG病の誘導：新生24時間以内のBALB. Bマウスに（BALB.BxBALB/c）F1マウスのリンパ球を1000万個腹腔内投与することでHVG病を誘導した。HVG病の有無は脾腫・リンパ節腫大で判定した（図8）。
2. 表面マーカーの検索には以下の単クローン抗体を使用した。CD3, CD4, CD8, CD25, CD152, CD69, GITRに対する抗体はPharmingen社から購入し、使用説明書に従って使用した。
3. 末梢血に含まれるTregの測定：FACSscanを用いて細胞を測定しCELL-questプログラムで解析した。
4. 血中自己抗体の検討：HVG病マウスから経時的に血清を採取し抗核抗体はIFAで、抗T細胞抗体はT細胞培養株を用いFACSで検討した。抗CTLA-4抗体はCTLA-4-Igを用いてWestern Blotting法で検討した。
4. ハイブリドーマの作成：HVG病マウス脾細胞から細胞融合法でハイブリドーマを作製し、自己抗体産生をELISA法でスクリーニングした。

3) 結果

1. CD25陽性CD4細胞：一般にTregのマーカーと考えられるCD25陽性細胞はHVG病マウスで $18.3 \pm 2.3\%$ であり、対照マウスの $10.3 \pm 3.0\%$ に比べて増加がみられた。活性化T細胞マーカーであるCD69陽性細胞もHVG病マウスで増加しており、CD25が直接Treg数を反映しているか否かを次に検討した。
2. GITR陽性CD4細胞：新たなTregのマーカーである、GITRについて検討すると対照では $3.2 \pm 4.5\%$ に対し $0.7 \pm 0.8\%$ と著しい減少を認めた（図10）。先に述べたCD25陽性細胞に占めるGITR陽性細胞の割合で比較すると、正常対象マウスでは $48.5 \pm 3.2\%$ とCD25陽性細胞の約半数がTregと考えられるのに対してHVG病マウスでは $19.7 \pm 4.4\%$ とTregは絶対数ばかりでなく割合も減少していることが分かった。

3. 自己抗体の検討：経時的に血清を採取し、自己抗体の存在を検討すると一般に病的関与が強いと言われる抗核抗体は HVG 病誘導後 4 週を経て出現するのに対し、抗 T 細胞抗体は生後 6 日目で出現を認めた。Treg のマーカーの一つとされる CTLA-4 に対する自己抗体を検討すると、全 HVG 病マウスの 27 頭中 17 頭 (63.0%) に CTLA-4 に対する抗体が認められた。年齢別に分けて検討すると一ヶ月以内の若齢マウスでは抗 CTLA-4 自己抗体は 9 頭中 8 頭 (88.9%) に認められたのに対し、5 ヶ月令まででは 10 頭中 7 頭 (70.0%)、6 ヶ月令以上では 8 頭中 2 頭 (25.0%) と加齢に伴って抗 CTLA-4 抗体の出現頻度が低下する傾向がみられた (図11)。

4. CTLA-4に対する自己抗体産生ハイブリドーマの樹立の試み：生体内における抗 CTLA-4 自己抗体の作用を検討する目的で HVG 病マウス脾細胞から細胞融合法により自己抗体産生ハイブリドーマの樹立を試みたが、現在までのところ産生クローンの樹立は認められない。

4) 考 案

小型動物を用いた小腸移植の実験系において、HVG あるいは GVH 反応が報告されており、移植小腸におけるリンパ球の混在と拒絶予防に用いられる免疫抑制剤が原因のひとつと考えられている。一方、免疫学の最近の進歩から免疫応答を負に制御する細胞の存在がわかってきており、制御 T 細胞 (Treg) がその代表的なものである。Treg の減少は抗腫瘍効果の増大をきたすことから主として癌免疫の分野で注目されるが、逆に自己反応細胞を増強し、自己免疫現象を誘導する可能性も指摘されている。今回、リンパ系細胞を免疫機能の未発達な新生マウスに投与する HVG の系において Treg の動態を検討した。HVG 病を用いた理由は HVG 病誘導後、比較的早期に発症することと、脾腫・系統的リンパ節腫大を特徴とし、表面から病気の発症を触知できる点からである。今回検討したように、HVG 病を発症したマウスでは、一般に Treg のマーカーとされる CD25 陽性細胞は正常対象の約 1.8 倍に増加していたが、新たな Treg のマーカーである GITR を指標として検討すると正常対照の 1/5 に減少していることが分かり、Treg 数の減少が HVG 病形成に係わっていることが示唆された。実際の小腸移植に

おいて GVH あるいは HVG をモニターする場合には、CD25 陽性細胞ではなく GITR などの Treg 特異性の高いマーカーを用いた検討が必要と考えられた。Treg の減少によって種々の自己免疫減少が誘導されたが、その中で CTLA-4 に対する自己抗体産生は病的関与を考える上で興味深い。HVG 病誘導後早期に抗 CTLA-4 自己抗体産生がみられることと、CTLA-4 自体が Treg 表面に発現している点から Treg 数減少に何らかの役割を果たしている可能性がある (図12)。現在、抗 CTLA-4 自己抗体産生ハイブリドーマの樹立を試みており、病的関与について検討を進める予定でいる。

【関連する研究業績】

1. Nagato T, Kobayashi H, Yanai M, Sato K, Aoki N, Oikawa K, Kimura S, Abe Y, Celis E, Harabuchi Y, Tateno M. Identification and functional analysis of birch pollen allergen Bet v 1-specific regulatory T cells induced by stimulation with synthetic peptides. J Immunol, Submitted.
2. Kobayashi H, Nagato T, Sato K, Aoki N, Kimura S, Tanaka Y, Aizawa H, Tateno M, Celis E.. In vitro peptide immunization of target Tax protein human T-cell leukemia virus type-1-specific CD4+ helper T lymphocytes. Clin Cancer Res. 2006. in press.
3. Kobayashi H, Nagato T, Aoki N, Sato K, Kimura S, Tateno M, Celis E.. Defining MHC class II T helper epitopes for WT1 tumor antigen.. Cancer Immunol Immunother. 2006 Jul;55(7):850-60.
4. Nagato T, Kobayashi H, Kishibe K, Takahara M, Ogino T, Ishii H, Oikawa K, Aoki N, Sato K, Kimura S, Simizu N, Tateno M, Harabuchi Y. Expression of Interleukin-9 in Nasal Natural Killer/T-cell Lymphoma Cell Lines and Patients. Clin Cancer Res 2005;11:8250-57:
5. Kobayashi H, Nagato T, Aoki N, Sato K, Kimura S, Tateno M, Celis E. Defining MHC class II T helper epitopes for WT1 tumor antigen. Cancer Immunol Immunother. 2005 Oct 12;;1-11
6. Kobayashi H, Nagato T, Oikawa K, Sato K, Kimura S, Aoki N, Omiya R, Tateno M, Celis E. Recognition of prostate and breast tumor cells by helper T lymphocytes

specific for a prostate and breast tumor-associated antigen, TARP. Clin Cancer Res. 2005 May 15; 11(10):3869-78.

7. Kawase T, Hamazaki M, Ogura M, Kawase Y, Murayama T, Mori Y, Nagai H, Tateno M, Oyama T, Kamiya Y, Taji H, Kagami Y, Naoe T, Takahashi T, Morishita Y and Nakamura S. CD56/NCAM-positive Langerhans cell sarcoma: A clinicopathologic study of 4 cases. Int J Hematol 81: 323-329, 2005

2. 炎症性腸疾患の病因、病態に関する研究

2-1. 自然免疫と難治性腸疾患

炎症性腸疾患におけるパネート細胞の機能

小腸の免疫能の関与に関する研究

蘆田知史講師、高後 裕教授グループ 第三内科（現
消化器・血液腫瘍制御内科学分野）

稲場勇平 第三内科

前本篤男、綾部時芳 消化管再生修復講座

【研究成果の概要】

1) 研究背景と目的

これまで研究者らはヒトのクローン病において、小腸の分離 crypt から分泌される Paneth 細胞由来抗菌活性物質の活性が低下していることを見出し報告してきた（前本篤男 北海道医学会誌 2004 79(2) 129-36）。この結果は、クローン病の小腸においては生来備わっている生体防御反応のうち、自然免疫と総称される非特異的な細菌・真菌・ウイルスに対する防御反応が低下していることを示し、これが本疾患における病因のひとつとなっている可能性を示唆している。この Paneth 細胞由来抗菌活性物質の主体をなすものは α -defensin と呼ばれる peptide 群であり、この産生・分泌系の障害がクローン病の病因・病態に深く関与していることが推察される。本研究においては、ヒトの臨床材料では限界のある腸炎発症と自然免疫系の障害の関与に関する解析を追求するため、クローン病に近い免疫異常を有して自然発症する実験動物腸炎モデルである IL-10 knockout mice における自然免疫障害の有無について、Paneth cell α -defensin の発現を指標として解析した。その結果、このマウスにおいては、病理学的な腸炎の発症に先立ち Paneth cell α -defensin の産生

が低下していることを初めて明らかにし、このモデルを用いた研究がヒトのクローン病の発症過程を明らかにする上で極めて重要であることを見出した。

方 法

動物は 5 週齢から 15 週例の雌性 C57BL/6 マウス (WT)、及び C57BL/6-IL10tm1Cgn/J (KO)

それぞれに SPF よりノーマルコロニーに移した後 2 週毎に屠殺し、体重測定後、小腸、大腸、直腸組織を採取し、それぞれの重量や長さを測定した。小腸組織からは EDTA 分離法を用いて小腸陰窩採取した。陰窩からの蛋白は 30% の酢酸を使用して抽出した。

腸管炎症の評価は 2 週間毎に WT、KO マウスそれぞれについて小腸、遠位大腸組織をヘマトキシリン・エオジン (HE) で染色し病理学的評価を行った。

α -defensin mRNA 発現量の定量 RT-PCR による解析は、それぞれの週齢マウスの凍結した小腸陰窩より RNA を抽出した。1 μ g の RNA を鋳型とし、逆転写反応を行い cDNA を作成した。マウスの α -defensin である Cryptdin-1、-4、-5、および GAPDH について、PCR 反応を行い発現量を定量した。

α -defensin 蛋白発現量の解析は、小腸陰窩の蛋白分画を 12.5% acid/urea-polyacrylamide gel で電気泳動を行い (AU-PAGE)、Coomassie Blue 染色後蛋白量の比較を行った。また、小腸陰窩から抽出した蛋白を Polyacrylamid GEL で分離した後、ラビット抗 Cryptdin-1 抗血清と HRP 標識抗ラビット IgG 抗体を用いた Western blot で Cryptdin-1 蛋白量を比較した。

結 果

WT、KO マウスの 5 週齢、7 週齢、11 週齢、15 週齢における α -defensin (Cryptdin-1,-4,-5) mRNA の発現について定量-RTPCR を用いて検討を行った。Cryptdin-1, Cryptdin-4, Cryptdin-5 の発現量は、WT、KO のいずれの群も週齢を経るに従い低下し、11 週目以降はほぼ一定となった。KO 群は WT 群に比較し組織学的腸炎発症前に相当する 7 週目以降の各週齢でいずれの α -defensin mRNA も発現量が低値を示した (図 13)。

小腸陰窩より蛋白を抽出し、7 週齢の WT、KO マウスの α -defensin 蛋白発現量を解析した。AU-PAGE 法では、WT マウスに比較し KO マウス小腸蛋白に含

まれる α -defensin は、蛋白発現量が低下していることが示された。また SDS-PAGE-Western blot 解析では、WT マウスに比較し KO マウス小腸蛋白における Crptdin-1 の発現量が低下していた (図14)。

このモデルの報告者によれば、脱肛や体重減少を伴う強い炎症は、生後15週以降に発生するとされ、我々の施設でも生後17週以降の KO マウスで同様の所見が観察されている。従って本研究で用いた週齢の動物は、症状を伴う腸管病変形成前の発症初期と考えることができる。この時期の IL-10KO マウスにおいて、小腸 Paneth 細胞で産生・分泌される α -defensin の mRNA、蛋白の発現が低下していることが明らかとなった。この結果は、 α -defensin の発現量低下が、小腸・大腸における炎症の発生に関与するか、組織学的炎症所見の発現前に現れる最初の変化である可能性を示唆しており、自然免疫系の機能低下が炎症性腸疾患の発症原因と密接な関係があることを示すひとつの根拠となると考えられる。

本研究の結果は、共同研究者 稲場勇平の審査学位論文として現在投稿中である。

2. 炎症性腸疾患の病因、病態に関する研究

2-1. 自然免疫と難治性腸疾患

自然免疫、特にコレクチン関連分子が、難治性腸疾患にはたす役割の解明

若宮伸隆教授グループ 微生物学講座
研究組織

微生物学講座：若宮伸隆、吉田逸郎、小笠原正洋、大谷克城、本村旦、福田光子、張成宰、吉崎隆之、小山聡、福澤純

第2外科消化器グループ：河野透、柏手由里乃、海老沢良昭、紀野修一、石崎彰、葛西真一

第3内科学講座：綾部時芳、高後裕

【研究成果の概要】

1) 研究背景と目的

コレクチン分子は、コラーゲン様分子を内部構造にもつ、動物レクチンのファミリーで分泌型と膜型の2つのタイプに分類される。若宮らの研究グループは、これまでの研究において、膜型コレクチン CL-P1 が

血管内皮細胞に存在すること、また共同研究者の河野らは、分泌型 MBL が、肝臓において原発性腫瘍の存在が、正常部位での MBL 発現を減少させることを見出している。自然免疫に関与するとされている、従来のコレクチン分子とさらに現在あらたに発見された新規コレクチン分子の難治性腸疾患における新たな役割を解析することが本研究の目的である。

2) 研究方法

第2外科グループ (河野 透、海老沢良昭、千里直之) と共同で、難治性腸疾患に関わるコレクチン分子の性状とその動態を蛋白質レベル (組織免疫染色や ELISA) や核酸レベル (定量的 RT-PCR 解析) で検討をおこない、その生理的意義を解明することが目的であるが、まず正常人や実験動物での、従来の分泌型 MBL の分子レベルでの解析を該当期間に行った。すべてヒト検体は、本学倫理委員会に諮問した研究課題に基づき、書面によりインフォームドコンセントを得て、採取した。

3) 研究結果

川寄らは、マウス小腸において、絨毛上皮に MBL に存在をみとめているが、その後の Crovella らのヒト celiac 病における報告では、ヒト小腸の粘膜基底層の下に MBL の蓄積が報告されており、腸における MBL の発現については、その存在部位についての統一見解が得られていない。我々は、MBL の単クローン抗体を作成し、ヒト正常組織において免疫組織染色をおこなった。

結果としては、MBL はマウスの組織染色でみられたように小腸粘膜上皮細胞にはまったく発現せず、上皮組織とは異なる間質部である粘膜固有層に局限して存在することが明らかになった (図15)。また、小腸に存在する MBL 産生細胞は、CD3 非陽性、c-kit 陽性であることが見出された。さらに、クローン病患者における小腸での MBL 発現では、正常に比較してほとんど MBL 発現細胞が認められず、発現量の減少が認められた (図16)。

つぎに大腸における発現では、正常部位には、ほとんど MBL は発現しておらず、小腸との間に、発現の異同が認められた。さらに、炎症性腸疾患である潰瘍性大腸炎においても、いままでの組織染色の報告のご

とく炎症細胞の集積が認められたが、MBL 発現細胞の存在は認められなかった。しかしながら、大腸癌では、癌組織において癌細胞そのものに MBL の発現は認められなかったが、癌組織周囲部である間質部において、MBL 発現陽性細胞を多数認めた。

4) 考 察

MBL は、自然免疫に関与する分子で、コレクチンの subfamily であるが、ゲッシン類では、MBL-A, MBL-C の 2 種類が報告されている。しかしながら、分化発生の過程で、一方の遺伝子が偽遺伝子となり、サイレントになるケースがウサギやヒトなどで報告されている。ヒトでは、肝臓型の MBL-C がヒト MBL 遺伝子として単独で残存し、肝臓で主に発現している。本研究では、ゲッシン類における血清型 MBL-A、肝臓型 MBL-C の、肝臓以外の腸上皮組織における発現とは異なる、ヒト MBL 遺伝子の腸間質部での発現を明らかにした、最初の報告である。MBL 遺伝子自体は、いろんな動物種において、肝臓で第一義的に発現される。一方、肝臓以外の臓器における肝臓型 MBL-C の発現は、それぞれの動物種で異なっていることが、従来の研究に加えて、本研究の成果により、あらためて明らかにされた。しかしながら、本研究では、分子生物学的検討がされておらず、MBL 分子がその場所で産生されたかどうかの検討を行っていないために、異所性に産生されて腸上皮下に局在していることを否定できない。さらに、使用された個人の MBL 遺伝子のアレル解析を行っておらず、アレル変異による差異についての検討も必要であると考えられる。

結 論

ヒト組織において、肝臓以外における MBL 発現では、小腸間質部での MBL 発現陽性細胞の存在を明らかにした。さらに、大腸では、MBL 発現陽性細胞が認められなかった。小腸や大腸では、炎症性の腸疾患でも、その発現の増減は認められなかった。一方、大腸癌では、多くの例で、腫瘍周囲の間質部に MBL 発現陽性細胞が認められた。

今後の課題

腸の間質部における MBL 発現陽性細胞の同定とその役割を明らかにする。

MBL に遺伝子アレル解析と分子生物学的に MBL が de novo で産生されていることを明らかにする。

今回の研究では、分泌型コレクチンである MBL についての研究が進展したが、新規コレクチンにおいても、同様の検討をすることを計画している。

2. 炎症性腸疾患の病因、病態に関する研究 2-2. 細胞内情報伝達系レベルと炎症性腸疾患

核内転写調節因子 PPARs と炎症性腸疾患
奥村利勝教授グループ 総合診療部

【研究成果の概要】

潰瘍性大腸炎は大腸粘膜上皮の慢性の炎症を主体とする原因不明の疾患である。医学の進歩により種々の治療法が開発されて来ているが、病因が未解明のために改良の余地が大きい。副腎皮質ステロイドの局所及び全身投与は潰瘍性大腸炎の治療法の一つであるが、ステロイドの副作用や、漸減による再発、ステロイド抵抗性獲得など問題点もあり大腸粘膜の炎症もコントロールに万能ではない。我々はこれまで、核内受容体型転写因子 Peroxisome proliferator activated receptor γ (PPAR γ) (図17) に着目して消化器癌におけるこの分子の役割を解析し、様々な新知見を報告してきた。近年、他の研究グループから PPAR γ の ligand が潰瘍性大腸炎の動物モデルであるラット TNB colitis の病変形成を軽減させることが報告され、その臨床応用が注目されている。そこで我々は、PPAR γ ligand による大腸炎形成抑制作用が、どのようなメカニズムによるのかを明らかにしようと試みた。

PPAR γ ligand による大腸炎抑制は全身作用を介する場合と、大腸粘膜への直接作用が考えられる。今回は後者の直接作用の可能性を念頭におき、PPAR γ ligand の大腸粘膜上皮に及ぼす影響の解析を試みた。まず大腸粘膜上皮由来の細胞株に PPAR γ が発現していることを調べた。HT-29 (ヒト大腸癌細胞株) には PPAR γ mRNA 及び PPAR γ 蛋白が発現することを Northern 及び Western blot で明らかにした。発現する PPAR が確かに PPAR γ ligand によって活性化することを PPAR γ の DNA 上の結合部位である peroxisome proliferators response element (PPRE) を含むベクターを組み込んだ

細胞でレポーターアッセイを行った。PPAR γ ligand の troglitazone は用量依存性に転写活性を増加させることが明らかになり、発現する PPAR γ が目的の機能を有していることを確認した。すなわち、大腸粘膜上皮由来細胞株には機能性の PPAR γ が発現していることが明らかにできた (図18)。次に、HT-29 細胞に troglitazone を添加し、種々の遺伝子発現を解析している。これまで粘膜上皮の炎症に関与する可能性が指摘されている IL-1, IL-6, IL-8, TNF α などのサイトカインの遺伝子発現には変化を見ていない。現在、細胞間の interaction に関与する selectin などの接着因子に注目して大腸炎形成抑制に関与する分子を解析予定である。

2. 炎症性腸疾患の病因、病態に関する研究

2-2. 細胞内情報伝達系レベルと炎症性腸疾患

炎症性腸疾患における蛋白質チロシンキナーゼ Syk の関与

谷口隆信教授グループ 生化学講座 細胞制御科学分野

竹内昌之、石田敦彦、加藤剛志、谷口隆信

【研究成果の概要】

1. 目的

潰瘍性大腸炎や Crohn 病は代表的な慢性炎症性腸疾患であり難治性易再発性の腸管炎症を主徴とする。病因については遺伝的素因や環境因子あるいは免疫因子の関与が考えられているが詳細は不明である。また、前者においては、大腸癌のリスクが正常人と比べて10倍以上高く病因との関連が考えられている。

タンパク質チロシンキナーゼ Syk は乳腺をはじめ様々な上皮細胞に存在し、乳癌や卵巣癌、胃癌などにおいてその発現の低下が癌の悪性化や進行に相関していることが報告され、癌抑制性の機能を担っていると考えられている。これはもう一つのタンパク質チロシンキナーゼ Her2 が癌促進性であることと対照的である。

本研究において、腸上皮における Syk 及び Her2 の発現と潰瘍性大腸炎や Crohn 病の病態についての関連性を検討する。

2. 方法

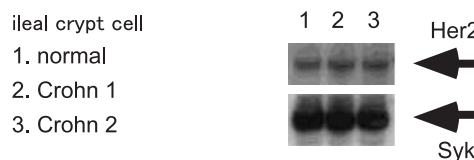
- 1) ヒト正常小腸陰窩細胞、Crohn 病症例小腸陰窩細胞、および、乳癌細胞株 MDAMB453 (MDA) について検討した。
- 2) whole cell lysate を SDS 電気泳動にて分離し PVDF 膜に蛋白質を転写した後、抗 Her2 又は抗 Syk 抗体を用いて免疫ブロットを行い対応する蛋白質の発現量を検討した。
- 3) Syk 遺伝子を発現ベクター pcDNA3.1 に組み込み細胞株に導入した。
- 4) 細胞増殖速度は 96-well plate にて細胞を培養し MTT 法で細胞数を定量した。

3. 結果

1) 小腸陰窩細胞での Syk と Her2 の発現

ヒト小腸陰窩細胞における Syk と Her2 の発現を正常例と Crohn 病症例で比較した。Fig. 1 に示すように、正常 1 例、Crohn 病 2 例のいずれにおいても、同程度の発現が認められた。

Fig.1 陰窩細胞における Syk と Her2 発現



2) MDA 細胞に対する Syk 導入

乳癌細胞株 MDA は内因性に Her2 を発現しているが Syk は発現していない。この細胞に対し Syk を導入した。

3) 細胞増殖速度の低下

MDA 細胞における Syk 導入と引き続く Her2 発現の低下が細胞に与える影響として、増殖速度について検討した所、MDA 細胞の Syk 定常発現クローン細胞の一つである MS5 では mock 細胞に比して増殖速度の低下が認められた。

4. 考察

炎症性腸疾患は特発性の慢性腸炎であり潰瘍性大腸炎と Crohn 病に分類される。これらは何らかの原因で腸管粘膜免疫機構が破綻し、腸管腔内の細菌や食餌な

どの抗原に対し過剰な免疫反応が惹起されることにより、持続的な炎症が生じていると考えられている。従って罹患した腸管壁内においては様々な免疫・炎症細胞が存在し、炎症の持続に関わっている。非受容体型のチロシンキナーゼである Syk は主として血液/免疫系の細胞に存在し、それらの機能、特に抗原受容体の活性化において必須のキナーゼであることが明らかにされている²⁾。さらに、Syk 欠損マウスにおいては腸管や皮膚において B cell 及び intraepithelial $\gamma\delta$ T cell の著しく減少することが報告されており¹⁴⁾、免疫系細胞の発達にも重要な機能を担っている。従って、炎症性腸疾患において Syk がどのように関わっているかについては非常に興味深い点であるが、これまでまだ報告されていない。今回、ヒト小腸陰窩細胞における Syk の発現を、正常例と Crohn 病症例で検討したところ、Fig. 1 に示すような豊富な発現が認められ、Syk が小腸陰窩細胞において機能していることが強く示唆された。

最近の研究では Syk は乳腺上皮細胞にも見出され、乳癌や卵巣癌などでその発現の低下が癌の悪性化や進行に相関していることが報告されており³⁻¹³⁾、癌抑制性の機能を担っていることが考えられる。一方、Her2 は乳癌をはじめとする種々の癌において代表的な癌促進性蛋白質で、その発現亢進は癌組織の異形性や遠隔転移率の上昇と相関があり、独立した予後不良因子であることが明らかにされている。また、臨床的に予後の判定や化学療法抵抗性の予測はもちろんのこと、抗 Her2 抗体（ハーセプチン）が治療に用いられ一定の効果が認められている¹⁾。これらの二つのキナーゼは何れも乳腺組織に存在する蛋白質チロシンキナーゼであり、下流の情報伝達経路の差違によりこのような違いが生じると考えられるが、今後の検討課題である。

我々は、タンパク質キナーゼにおいて構造の保存された領域に対する抗体を作成し、タンパク質セリン/スレオニンキナーゼ¹⁵⁾やタンパク質チロシンキナーゼ¹⁶⁾を網羅的に解析する手法を開発している。今後は、Syk や Her2 に限らず、炎症性腸疾患や癌などの様々な細胞現象における、タンパク質キナーゼの関与に焦点を当てて研究を進めていきたい。

5. 引用文献

- 1) Slamon DJ. et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against Her2 for metastatic breast cancer that over expresses Her2. *N Engl J Med* 2001; 344: 783-92
- 2) Taniguchi T. et al. Molecular cloning of a porcine gene syk that encodes a 72-kDa protein- tyrosine kinase showing high susceptibility to proteolysis. *J Biol Chem* 1991, 266: 15790-6
- 3) Coopman PJ. et al. The Syk tyrosine kinase suppresses malignant growth of human breast cancer cells. *Nature* 2000; 406: 742-7
- 4) Goodman, P. A., et al. Hypermethylation of the spleen tyrosine kinase promoter in T-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Oncogene* 2003, 22: 2504-14.
- 5) Toyama, T., et al. Reduced expression of the Syk gene is correlated with poor prognosis in human breast cancer. *Cancer Lett* 2003, 189: 97-102.
- 6) Wang, L., et al. Alternative splicing disrupts a nuclear localization signal in spleen tyrosine kinase that is required for invasion suppression in breast cancer. *Cancer Res* 2003, 63: 4724-30.
- 7) Dhillon, VS., et al. Promoter hypermethylation of MGMT, CDH1, RAR-beta and SYK tumour suppressor genes in granulosa cell tumours (GCTs) of ovarian origin. *Br J Cancer* 2004, 90: 874-81.
- 8) Moroni, M., et al. Progressive loss of Syk and abnormal proliferation in breast cancer cells. *Cancer Res* 2004, 64: 7346-54.
- 9) Wang, S., et al. Hypermethylation of Syk gene in promoter region associated with oncogenesis and metastasis of gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2004, 10: 1815-8.
- 10) Yuan, Y., et al. Reactivation of SYK expression by inhibition of DNA methylation suppresses breast cancer cell invasiveness. *Int J Cancer* 2005, 113: 654-9.
- 11) Yuan, Y., et al. Hypermethylation leads to silencing of the SYK gene in human breast cancer. *Cancer Res* 2001, 61: 5558-61.
- 12) Nakashima, H., et al. Clinical significance of nuclear expression of spleen tyrosine kinase (Syk) in gastric cancer. *Cancer Lett* 2005, in press.

- 13) Hoeller, C., et al. The non-receptor-associated tyrosine kinase Syk is a regulator of metastatic behavior in human melanoma cells. *J Invest Dermatol* 2005, 124: 1293-9.
- 14) Mallick-Wood CA, et al. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996, 93: 9704-9
- 15) Kameshita I, Tsuge T, Kinashi T, Kinoshita S, Sueyoshi N, Ishida A, Taketani S, Shigeri Y, Tatsu Y, Yumoto N, Okazaki K. A new approach for the detection of multiple protein kinases using monoclonal antibodies directed to the highly conserved region of protein kinases. *Anal Biochem* 2003, 322: 215-224,
- 16) Sugiyama Y, Sueyoshi N, Shigeri Y, Tatsu Y, Yumoto N, Ishida A, Taniguchi T, Kameshita I.: Generation and application of a monoclonal antibody that detects a wide variety of protein tyrosine kinases. *Anal Biochem* 2005, 347: 112-20.

平成16年度 独創性のある生命科学研究プロジェクト
1

難治性腸疾患の分子基盤の研究から得られた知見のまとめ

1. 粘膜固有層に神経ネットが存在し、小腸移植後の再生が小腸移植成功の鍵となる小腸粘膜機能維持、拒絶の抑制に関与している可能性を示唆できた
2. 小腸移植後の拒絶反応を抑制するT細胞に対する自己抗体出現が重要な拒絶反応であるGVH発病を引き起こしている可能性を示唆できた
3. クローン病の発症に関して小腸の自然免疫の担い手の1つであるパネート細胞の機能不全が病因論的に関与している可能性を示唆できた
4. 自然免疫の担い手の1つであるコレクチンがクローン病において発現低下が認められ、病因論的に関与する可能性を示唆できた
5. 炎症性腸疾患において抑制的に働く核内転写調節因子が新たな治療薬となる可能性を細胞レベルで検討できるモデルを確立
6. クローン病において癌抑制性タンパク質チロシンキナーゼが持続する慢性炎症による発癌を抑制している可能性を示唆できた

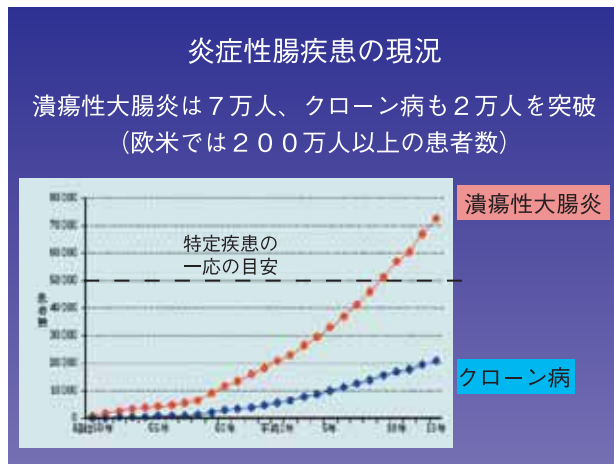


図 1

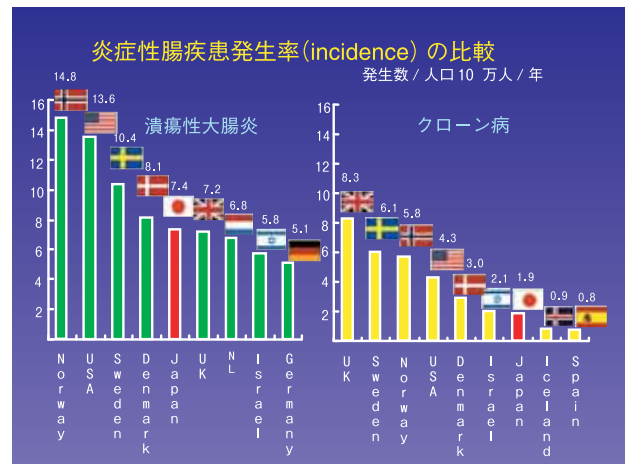


図 2

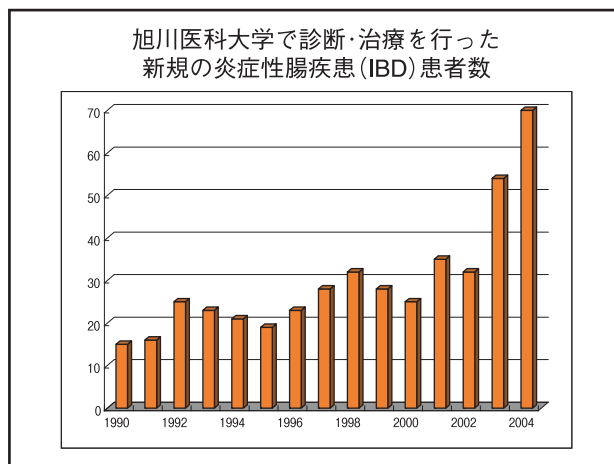


図 3

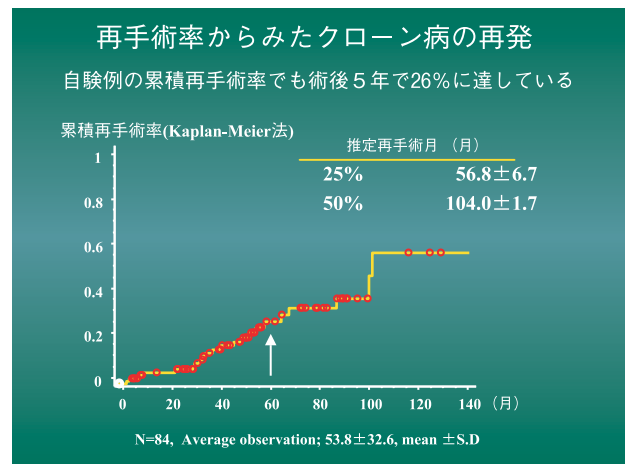


図 4

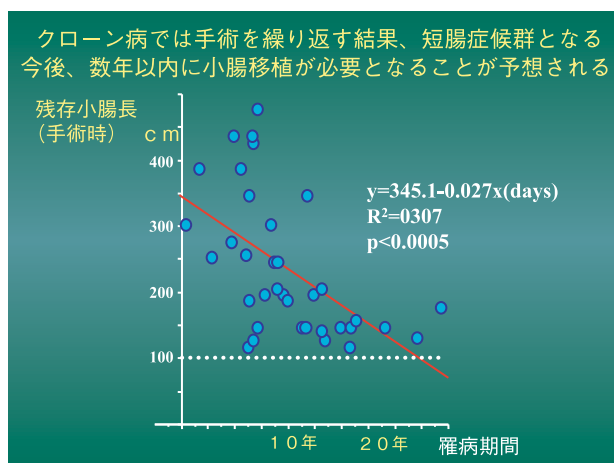


図 5

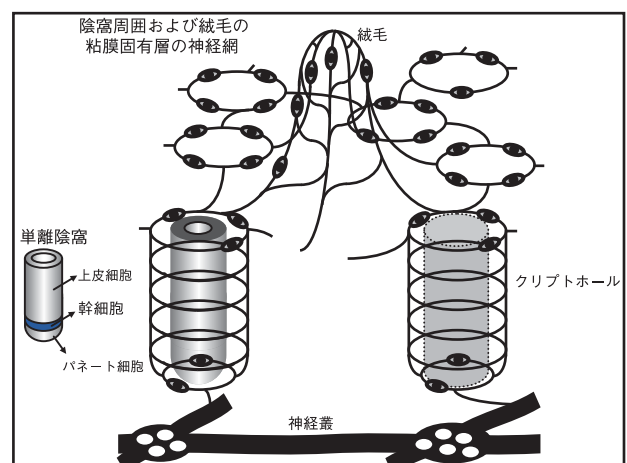


図 6

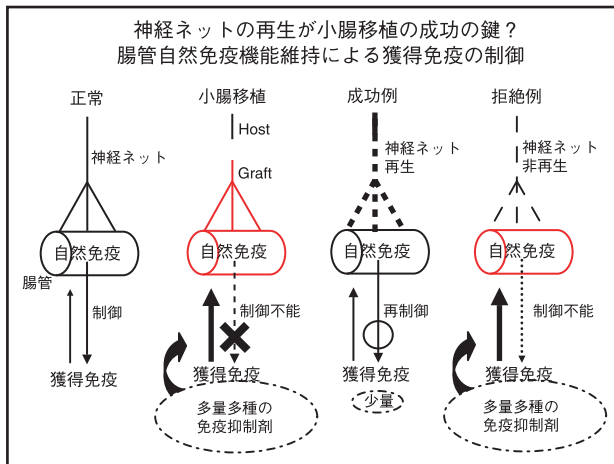


図 7

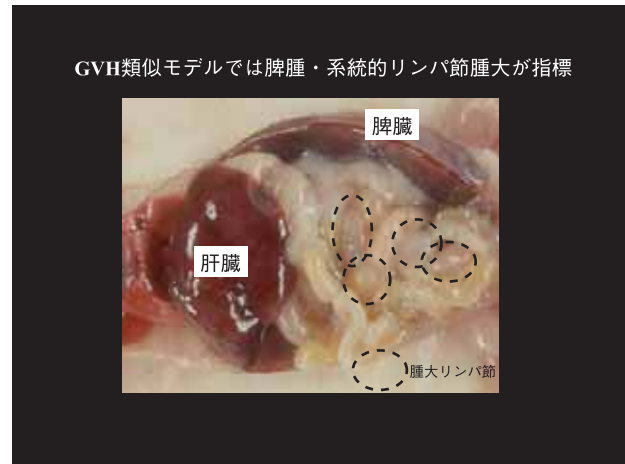


図 8

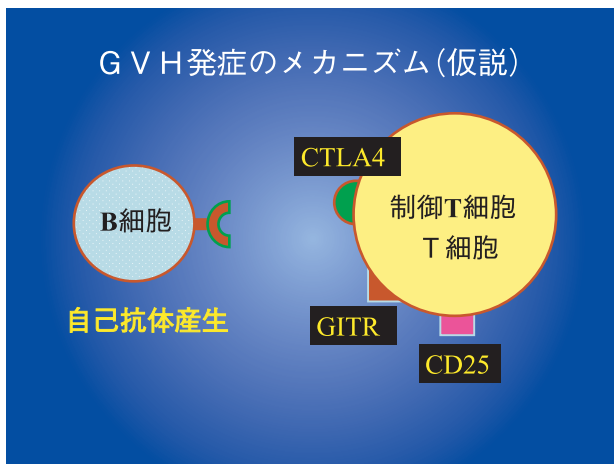


図 9

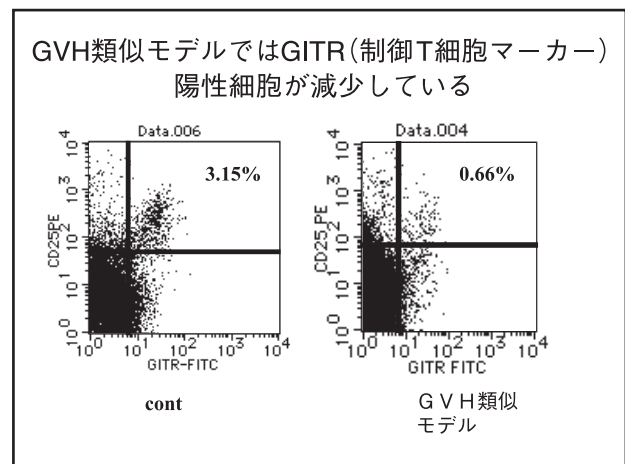


図10



図11

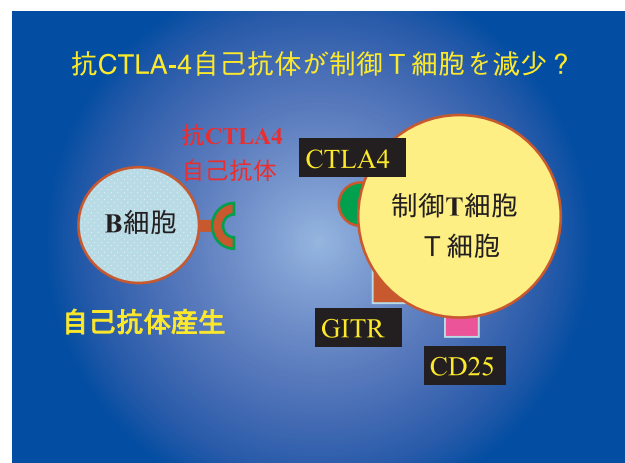


図12

α defensin mRNA発現量のRT-PCR解析

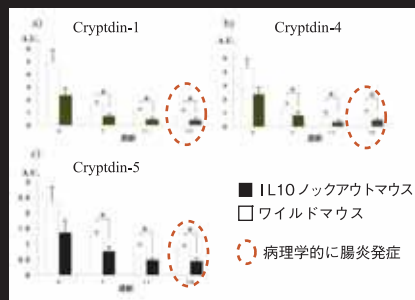


図13

ワイルド、ノックアウトマウスの小腸陰窩におけるCryptdin蛋白の発現

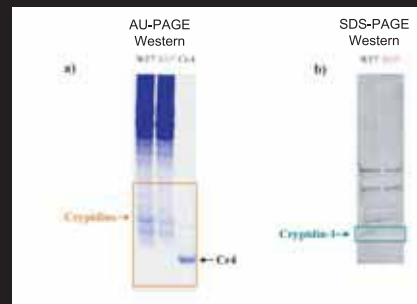


図14

MBL is expressed in lamina propria cells of human small intestine (空腸)

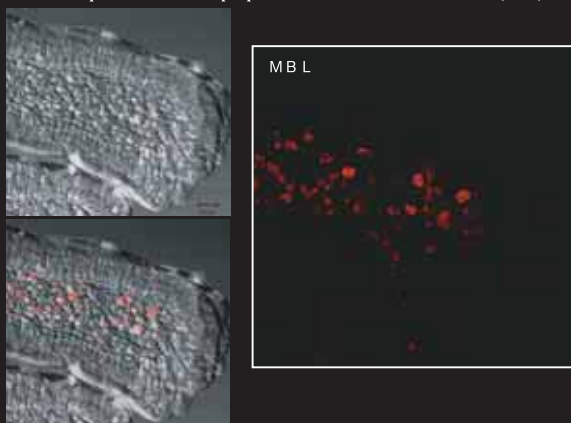


図15

クローン病とMBL産生細胞



図16

PPAR γ : peroxisome proliferator activated receptor

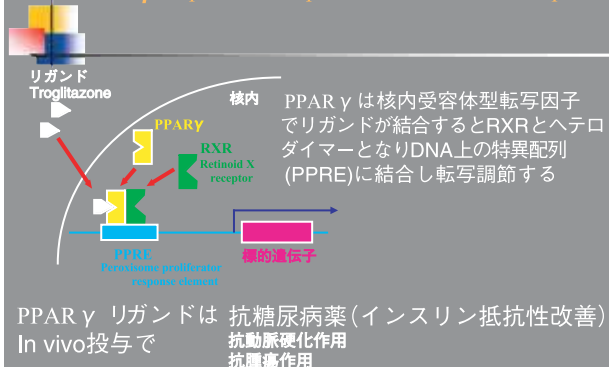


図17

大腸粘膜上皮由来細胞株 HT-29は転写活性を有する PPAR γ を発現する

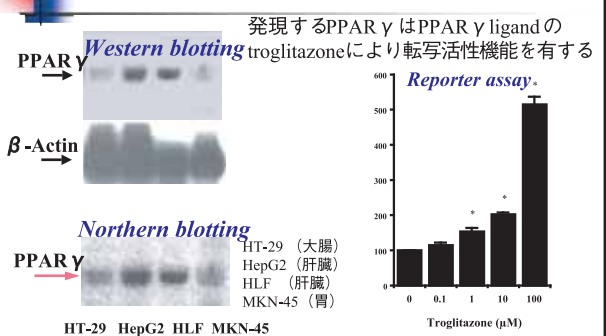


図18