

題 目

腸管粘膜の微小血管における Autotaxin / lysophospholipase D の発現亢進 と炎症性腸疾患の関連についての検討

八月 朔日 秀明
(消化器病学専攻)

防衛医科大学校

平成 2 5 年 6 月 1 日

目 次

第 1 章 緒言	1
第 2 章 潰瘍性大腸炎および Crohn 病患者大腸における HEV-like vessel の形成 と autotaxin 発現に関する検討	
第 1 節 目的	4
第 2 節 方法	5
第 3 節 結果	8
第 4 節 小括	9
第 3 章 腸炎マウスモデルにおける ATX 発現に関する検討	
第 1 節 目的	1 0
第 2 節 方法	1 0
第 3 節 結果	1 3
第 4 節 小括	1 3
第 4 章 ATX 阻害剤投与による腸炎モデルマウスに対する腸炎抑制効果の検討	
第 1 節 目的	1 4
第 2 節 方法	1 4
第 3 節 結果	1 7
第 4 節 小括	1 8

第5章	ATX 阻害剤によるリンパ球マイグレーションの抑制効果	
第1節	目的	19
第2節	方法	19
第3節	結果	21
第4節	小括	22
第6章	考察	23
第7章	結論	28
	謝辞	29
	引用文献	30
	図表	

第1章 緒言

腸管粘膜における、血管からリンパ組織へのリンパ球の移動（トラフィッキング）は、炎症性腸疾患（inflammatory bowel disease : IBD）の重要な病態の一つであり、また、腸管における微小循環の制御は、IBD 治療戦略の一つとされてきた。リンパ節やパイエル板など、2次リンパ組織での血管から組織内へのリンパ球トラフィッキングは、高円柱内皮細静脈（high endothelial venule : HEV）と呼ばれる特殊な血管内皮において、血管内皮上での回転(rolling: ローリング)、血管内皮との強固な接着 (adhesion: アドヒージョン)、そして血管内皮の間隙から2次リンパ組織への移動 (migration: マイグレーション) という一連の流れを介して行われる (図1) ¹⁾。この際、リンパ球側ではセレクトリンや免疫グロブリンスーパーファミリー・インテグリン、あるいはケモカイン受容体などが細胞表面に発現し、一方血管内皮側では、intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) や vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) といった接着分子の発現が亢進することが報告されている ²⁾。また、炎症を呈した腸管では、リンパ組織以外の部位であるにもかかわらず、リンパ球が多数浸潤・集積するという、異所性リンパ球マイグレーションが認められるが、その病態形成にこれらの接着分子が重要な役割を果たすとされている。加えて、mucosal vascular addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1)が腸管の血管内皮に特異的に発現して $\alpha_4\beta_7$ -integrin 陽性のTリンパ球を腸管へ誘導することが報告され、IBD に対する有効な治療ターゲットとなる可能性が示唆された ⁴⁻⁶⁾。近年、腸管におけるリンパ球のトラフィッキングをターゲットとした抗接着分子薬が使用されつつある。ヒト化抗 α_4 -integrin モノクローナル抗体である natalizumab もその一つであり、これは $\alpha_4\beta_7$ -integrin と MAdCAM-1、および $\alpha_4\beta_1$ -integrin と VCAM-1 の接着を阻害する ⁷⁾。また、腸炎モデルマウスを用いた実験では、MAdCAM-1 分子の抑制により腸炎の抑制効果が認められた ⁸⁾。一方、MAdCAM-1 と L-selectin を同時に阻害し

た場合、腸炎抑制効果は MAdCAM-1 を単独で阻害した時よりも強いという報告もあり、リンパ球マイグレーションにおいて、回転・接着それぞれの過程を阻害することが有効であることが示された⁹⁾。一方で、CD4⁺CD45RB^{high} T 細胞を腹腔内に移入した重度複合免疫不全 (severe combined immunodeficiency: SCID) マウスは重篤な腸炎を呈することが知られているが、β7-integrin 欠損マウスより抽出した CD4⁺CD45RB^{high} T 細胞を移入した場合においても同様の腸炎を呈することより¹⁰⁾、腸管炎症の病態にはβ7-integrin 非依存の経路が存在し、MAdCAM-1 およびβ7-integrin のみをターゲットとしても、リンパ球マイグレーションとそれに伴う腸炎を完全に抑制することはできないことが示唆されていた。

近年、Kanda らは、リンパ球の 2 次リンパ組織へのマイグレーションの際、リンパ球の運動性を向上させる新たなメカニズムについて発見、報告した¹¹⁾。このメカニズムに関与しているのがリゾフォスファチジン酸 (lysophosphatidic acid : LPA) 、およびその産生酵素であり、HEV に発現する autotaxin (ATX) である。リンパ球は HEV より産生される chemokine ligand 21(CCL21)により活性化され、自身の表面に発現した α4β1-integrin を介して ATX と結合する。ATX は血中に豊富に存在する lysophosphatidylcholine (LPC)を LPA に変換し、その結果、LPA がリンパ球の運動性を亢進させる (図 2)^{12,13)}。一方、IBD に代表される腸管炎症では、形状・機能共に HEV に類似した HEV-like vessel がリンパ組織外に形成され、リンパ球の病変部への異所性マイグレーションを亢進させる事が既に知られている¹⁴⁾。ATX は HEV に発現するため、リンパ節やパイエル板に高発現することは知られているが¹⁵⁾、IBD の病変部に出現する HEV-like vessel において ATX が発現するか、また、HEV-like vessel と ATX が病変粘膜における異所性リンパ球マイグレーションに関与するかについては明らかにされていない。そこで本研究において、IBD 患者腸管に認められる HEV-like vessel において ATX の発現がみられるかについて検討を行った。また、IBD の活動性と ATX の発現

の関連についても検討を行い、ATX が IBD の病態生理にかかわっている可能性について追求した。それに加えて、ATX が IBD 治療の新たなターゲットになるかどうかを調べるため、ATX 阻害剤の効果を実験腸炎モデル及びマウスの血管内皮細胞株 bEnd.3 細胞を用いた *in vitro* の検討において評価した。

第2章 潰瘍性大腸炎および Crohn 病患者大腸における HEV-like vessel の形成と ATX 発現に関する検討

第1節 目的

リンパ球の腸管への異所性マイグレーションは炎症性腸疾患の主要な病態の1つであり、すでに抗接着分子抗体などを用いたマイグレーションの抑制が臨床応用されている。リンパ球マイグレーションには血管内皮とリンパ球間での接着分子やケモカインなどにより調節されていることが知られているが、近年、それら以外にリゾリン脂質が関与することが報告された。ATX はリンパ球の門戸であるパイエル板やリンパ節の HEV に発現するが、その役割は lysophospholipase D (lysoPLD) 反応を担う LPA 産生酵素であり、血中の LPC を局所で LPA に変換させ、リンパ球の2次リンパ組織へのマイグレーションに関与することが報告された。また、腸管炎症時に静脈が 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ことも報告されているが、これらの炎症部血管内皮に ATX が発現しリンパ球マイグレーションに関与するかの検討はなされていない。そこで、潰瘍性大腸炎 (ulcerative colitis: UC)、Crohn 病 (Crohn's disease: CD) 患者大腸において、ATX の発現を評価し、その病態との関連を検討した。

第2節 方法

(1) 生検組織採取

CD (n=56、男性 39 名：女性 17 名；平均年齢 34.9 歳；範囲 20 歳-70 歳)もしくは UC (n=159、男性 70 名：女性 89 名；平均年齢 45.9 歳；範囲 20 歳-81 歳)にて防衛医科大学校消化器内科外来受診中の患者、および大腸腺腫患者(n=20、男性 10 名：女性 10 名、平均年齢 56.8 歳；範囲 46 歳-65 歳)を対象とし、通常内視鏡検査の際、生検鉗子にて組織を採取した。本研究は防衛医科大学校倫理委員会の承認（承認番号 923（725））を得たうえで、平成 21 年 10 月 6 日より平成 24 年 3 月 8 日までの間、全症例より書面によるインフォームドコンセントを得て実施した。

(2) 実験プロトコール

生検組織は、各患者において、内視鏡所見上炎症を呈さない大腸部位を非炎症部、何らかの炎症所見が認められる大腸部位を炎症部として粘膜の採取を行った。また、アフタ、潰瘍など、粘膜欠損を有する場合にはその周囲の残存する粘膜より組織を採取した。健常組織は、大腸腺腫切除の際、切除した腺腫近傍の健常粘膜を採取して使用した。生検組織は、採取直後に periodate-lysine-paraformaldehyde (PLP) 溶液もしくは RNA later に浸漬し、以後の実験に用いた。

免疫染色では、血管内皮のマーカーである CD34¹⁴⁾の発現および血管形体を指標として、病変部における HEV-like vessel の有無を確認し、ATX が HEV-like vessel に一致して発現しているか、確認を行った。加えて、HEV-like vessel 周囲へのリンパ球浸潤については β 7-integrin 染色を用いて評価を行った。また、RNA later に浸漬した検体からは相補的 DNA (complement DNA: cDNA)を作成し、

quantitative reverse transcription (QRT) - PCR 法を用い、ATX の発現量について、病変部・非病変部での比較検討を行った。

また、CD 患者の病変部は、粘膜を採取した部位の主な内視鏡的所見（発赤・びらん・アフタ・潰瘍）により、UC 患者の病変部は内視鏡的 Matts grade（表 1）¹⁶⁾により腸炎の程度を分類し、更に比較検討を行った。

（3）免疫組織染色

得られた生検組織は PLP 溶液に 4℃で 12 時間保存した後、10%、15%次いで 20%スクロース含有リン酸緩衝食塩水（phosphate buffered saline; PBS）で洗浄脱水。その後 Tissue-Tek OCT compound (Sakura Finetek Inc., Tokyo, Japan)に包埋し、ドライアイス・アセトンで凍結した。凍結された組織を 6μm 幅に薄切りし、CD34、β7-integrin、および ATX で二重免疫染色し、CD、UC 患者の腸管粘膜における HEV-like vessel 出現の有無と HEV-like vessel 内の ATX の発現、および HEV-like vessel 周囲の腸親和性リンパ球の浸潤について検討した。

一次抗体を 4℃で一晩反応させ洗浄後、ビオチン化した二次抗体と室温で 90 分反応させた。その後 streptavidin-fluorescein isothiocyanate (FITC, BD PharMingen, San Diego, CA, USA) 蛍光標識させた。二重染色においては、FITC ないし rhodamine で標識された対応する 2 次抗体で反応させた。標本は、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM510-V3.5, Carl Zeiss Co. Ltd, Oberkochen, Germany)にて観察を行った。

本検討で使用した一次抗体および二次抗体を下記に示す。

一次抗体

rat anti-human β7-integrin (clone: FIB27, BD PharMingen)

rabbit anti-human ATX (clone: polyclonal IgG, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX,

USA)

mouse anti-human CD34 (clone: NU-4A1, Nichirei Bioscience, Tokyo)

二次抗体

biotinylated goat anti-rabbit IgG (Stressgen Biotechnologies, San Diego, CA, USA)

rhodamine labeled anti-mouse IgG (BD PharMingen)

FITC labeled anti-rabbit IgG (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)

(3) RNA の抽出および QRT - PCR 法

RNA later に浸漬した生検組織より RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) を用いて RNA を抽出した。RNA 濃度を吸光度計で測定し、Superscript III reverse transcriptase with oligo(dT) and random primers (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いて、1 μ g の全 RNA より cDNA を作成した。QRT-PCR 法のプライマープローブとして、human ATX (Hs00196470 : Applied Biosystems, Carlsbad, CA) 、および human β GUS (Hs999999908 : Applied Biosystems) を用いた。96-well プレートに 10 μ l の PCR Master Mix (qPCR master mix plus; Eurogen, Seregno, Italy)、1 μ l の Taqman プローブ (Applied Biosystems) 及び 9 μ l (10ng) の作成した cDNA を混和して PCR 反応を行った (反応条件 : 50°C 2 分、95°C 10 分の preincubation の後、95°C 15 秒、60°C 1 分を 40 サイクル)。結果は、 $\Delta\Delta$ Ct 法を用いて ABI Prism 7900 sequence detection system (Applied Biosystems) で解析した。

(4) 統計学的処理

各データは平均値 $\pm$ 標準誤差で表した。2 群間の比較には Mann-Whitney U-test を使用し、3 群間以上の比較には one-way ANOVA and a post hoc test を使用し、p 値 0.05 未満を有意差ありとした。

第3節 結果

(1) 免疫染色における評価

ATX 染色では、CD、UC いずれの炎症部粘膜においても、ATX 陽性の血管内皮が観察された(図 3A、3C、3F、3I)。一方、CD34 染色においても、CD、UC いずれの炎症粘膜でも HEV-like vessel は、CD34 陽性で、かつ丈の高い内皮細胞で構成された血管として確認され(図 3D、3G、3J)、二重染色では、HEV-like vessel に一致して ATX が発現することが確認された(図 3E、3H)。また、 $\beta 7$ -integrin 染色では、多数の $\beta 7$ -integrin 陽性細胞が、HEV-like vessel 周囲に浸潤しているのが観察された(図 3K)。一方、大腸腺腫患者より採取した健常粘膜では、ATX (図 3L)、HEV-like vessel (図 3M)、 $\beta 7$ -integrin 陽性細胞(図 3N)いずれの発現も認められなかった。

(2) ATX messenger RNA 発現量に関する検討

まず CD 患者における検討を行った。ATX 発現量は、非炎症部群と比較して炎症部群で有意に高値を示した。また、非炎症部においても健常群と比較すると高値を示した(図 4A)。同一患者における炎症部と非炎症部の比較でも、ATX は炎症部において有意に高値を示した(図 4B)。更に、炎症部から採取した組織を、発赤、びらん、アフタ、潰瘍のいずれかを主な内視鏡所見としていたものに分類し、その ATX 発現量を比較してみると、粘膜傷害の程度が重篤になるに従い、その周囲に存在する粘膜の ATX は有意に増加傾向を示した(図 4C)。

次に、UC 患者の検討を行った。UC においても、ATX 発現量は、非炎症部群と比較して、炎症部群で有意に高値を認めた。その際に CD 患者と異なり、非炎症部は正常コントロールに比較して有意な発現亢進はみられなかった(図 5A)。同一患者における比較でも、炎症部における ATX 発現量は非炎症部と比較して

高値であった(図 5B)。また、炎症部の内視鏡的 Matts grade によってその発現程度を比較したところ、grade の上昇に伴い、ATX 発現量は有意な増加を示した(図 5C)。

第4節 小括

IBD の炎症部粘膜において、HEV-like vessel の形成が認められ、また、HEV-like vessel に一致して ATX の発現が認められた。UC および CD 患者における検討では、ATX が炎症部で有意に高値を示していた。以上より、UC、CD 患者において、ATX は HEV-like vessel に発現し、炎症形成に関与している可能性が示唆された。

第3章 腸炎マウスモデルにおける ATX 発現に関する検討

第1節 目的

第2章の検討において、ATX が腸管粘膜の炎症に関与している可能性が示唆されたため、腸炎モデルマウスを用いて、さらに検討を行うこととした。デキストラン硫酸ナトリウム (dextran sulfate sodium: DSS) を長期投与したマウスの大腸は、著明なリンパ球浸潤を伴った炎症像を呈することが知られている¹⁷⁾。また、 $CD4^+CD25^-$ T 細胞を SCID マウスの腹腔内へ移入した腸炎モデルにおいても、リンパ球浸潤を主体とした重篤な大腸炎を呈することが知られている¹⁸⁾。これら腸炎モデルマウスにおける ATX 発現量を評価し、ATX 発現の腸管炎症やリンパ球浸潤の程度との関係につき検討を行った。

第2節 方法

(1) $CD4^+CD25^-$ T 細胞移入 SCID マウスの作成

$CD4^+CD25^-$ T細胞はmouse $CD4^+CD25^+$ Treg cell isolation kit (Invitrogen Dynal AS, Oslo, Norway)を用いてMACSシステムで単離した。BALB/cマウス (8週齢、雄) の脾臓より採取した脾細胞から、Antibody Mix Human CD4に非結合の $CD4^+$ T細胞を分離し、次に $CD25^+$ 分画以外をネガティブセレクションにより単離し、これを $CD4^+CD25^-$ T細胞とした。単離した $CD4^+CD25^-$ T細胞 (5×10^5 個) は200 μ L のPBSに懸濁した後、SCIDマウス (6週齢、雄) の腹腔内に注入することで移入した(n=6)。 $CD4^+CD25^-$ T細胞移入後8週間目にすべてのマウスを安楽死させて、腸管を採取した。健常群として、通常のSCIDマウス (8週齢、雄) を用意し、腸炎マウスと同様に8週間飼育した後に安楽死させて腸管を採取し、腸炎群との比較

に用いた(n=6)。

(2) DSS 長期投与マウスの作成

BALB/c マウス (6 週齢、雌) を実験に使用した。3%DSS 溶液を自由飲水で7日間、続いて通常の水投与10日間、計17日間を1サイクルとし、5サイクルまでの間、観察を行った。また、DSS 投与1サイクル群~5サイクル群まで用意し、各サイクル終了時ごとに安楽死させて大腸を採取し、肉眼的所見、組織学的所見、および ATX messenger RNA 発現量について検討を行った(各群 n=6)。健常群として、通常の BALB/c マウス (6 週齢、雌) を用意し、85 日間飼育した後安楽死させて大腸を採取し、腸炎群との比較に用いた(n=6)。

尚、上記における両腸炎モデルマウスの検討は防衛医科大学校実験動物倫理委員会の承認を得て行った (承認番号 09089)。マウスの飼育は防衛医科大学校実験動物使用に関するガイドラインに従い、通常のマウス飼料および自由飲水にて行った。

(3) RNA の抽出およびリアルタイム QRT - PCR 法

第2章と同様の方法で行った。測定する項目として、murine ATX (Mm0051657) および murine MAdCAM-1(Mm00522088)の Taqman プライマープローブセットを用い、ABI Prism 7900 sequence detection system で解析した。内因性コントロールとして、TaqMan GAPDH Control Reagents kit を使用した。

(4)肉眼的および組織学的検討

肉眼的所見については、腸管の1 cmあたりの重さ (weight-to-length ratio) を用い、炎症に伴う腸管の肥厚、短縮の程度によって評価した。組織学的評価に使

用する標本は、肛門より 4 cm の位置にあたる腸管から採取した。採取された腸管は 10% ホルマリン緩衝溶液(Wako Chemicals, Osaka, Japan)に浸漬して固定し、パラフィンで包埋した。検体は 4 μ m 厚で切り出し、ヘマトキシリン - エオジン法で染色した後観察を行った。リンパ球数の計測の際には、CD3 陽性細胞をリンパ球とし、標本の水平方向 1mm 当たりの粘膜固有層に浸潤する細胞数を計測した。顕微鏡での組織所見は、以下の 3 つのパラメーターの合計で評価した：炎症の程度 (0-3, 0: なし、1: 軽度、2: 中等度、3: 重度)、粘膜傷害の深度 (0-3, 0: なし、1: 粘膜上皮のみ、2: 粘膜下層まで傷害、3: 壁全体に傷害)、陰窩の傷害 (0-4, 0: なし、1: 粘膜上皮の 1/3 未満に傷害、2: 粘膜上皮の 1/3~2/3 までが傷害、3: 上皮細胞のみ残存、4: 陰窩および上皮すべて消失)。以上のパラメーターの点数は、それを反映する部位の全体に占める割合を掛けた($\times 1$: 0-25%, $\times 2$: 26-50%, $\times 3$: 51-75%, $\times 4$: 76-100%)後に合計され、histopathology score とした (最大 40) ¹⁹⁾。この評価は、すべての腸炎モデルマウスに対して行った。また、組織学的評価については、同一標本につき 3 か所で行い、得られた 3 つの値を平均し、結果として使用した。

(5) 統計処理

各データは平均値 $\pm$ 標準誤差で表した。2 群間の比較には Mann-Whitney U-test を使用し、3 群間以上の比較には one-way ANOVA and a post hoc test を使用し、p 値 0.05 未満を有意差ありとした。

第3節 結果

(1) $CD4^+CD25^-$ T 細胞移入モデルマウスにおける ATX および MAdCAM-1 messenger RNA 発現

健常群と比較して、腸炎群の腸管では、浸潤リンパ球数は有意に増加していた(図 6A)。両群間の MAdCAM-1 および ATX messenger RNA 発現量を比較すると、腸炎群において、MAdCAM-1 (図 6B)、ATX (図 6C)いずれも messenger RNA 発現量が有意に高値を示した。

(2) DSS 長期投与モデルマウスにおける ATX および MAdCAM-1 messenger RNA 発現

DSS 投与サイクルの進行に伴い、腸管壁の肥厚、陰窩の短縮、炎症細胞浸潤といった炎症所見が著明に現れるようになり (図 7A-7D)、浸潤リンパ球数は増加傾向を示した (図 7E)。また、1 サイクルから 5 サイクル群まで、各サイクル群の MAdCAM-1 (図 7F)および ATX の messenger RNA 発現量 (図 7G)を比較したところ、2 サイクル目までは有意な上昇を認めなかったが、3 サイクル目以降は有意な増加を示したことから、炎症の形成に伴い、ATX の発現が亢進する可能性が示唆された。

第4節 小括

腸炎モデルマウスにおいても、炎症を呈した腸管において、MAdCAM-1 messenger RNA の発現亢進を伴い ATX messenger RNA は有意な発現増加を示した。また、DSS マウスにおける比較検討で示されたように、ATX は、炎症の形成に伴い強く発現される可能性が示唆された。

第4章 ATX 阻害剤投与による腸炎モデルマウスに対する腸炎抑制効果の検討

第1節 目的

前章での検討において、 $CD4^+CD25^-$ T 細胞移入モデルマウス、DSS 長期投与モデルマウスのいずれにおいても、病変部における浸潤リンパ球数の増加と、ATX および MAdCAM-1 の messenger RNA 発現亢進が確認され、リンパ球浸潤を主体とした腸炎に対する ATX の関与について、以後の実験を行うことの妥当性が示された。そこで、これらのモデルマウスを用い、ATX 阻害剤の投与による腸炎抑制効果について検討を行うこととした。

ATX 阻害剤としては、ビチオノール (Bithionol) (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) を使用した。ヒトの悪性黒色腫の細胞株を用いた実験では、Bithionol は細胞が産生する ATX のホスホリパーゼ活性を競合的に阻害し、細胞の遊走を有意に阻害することが既に報告されている²⁰⁾。しかし、リンパ球マイグレーションに対する Bithionol の抑制効果についてはいまだ報告がなされていない。そこで、Bithionol の腸炎モデルマウスに対する効果について検討を行った。

第2節 方法

(1) 生体内顕微鏡による、腸管粘膜におけるリンパ球マイグレーションの観察
マイグレーションの観察を行うため野生型(Wild Type: WT) BALB/c マウスの脾臓より T 細胞を採取した。8~10 週齢の雄性 WT マウスをペントバルビタール麻酔下で安楽死させ脾臓を摘出。スライドガラスで破碎後に ammonium phosphate/chloride lysis buffer で溶血させ、細胞 1×10^8 個あたり 20 ml の 1% ウシ胎児血清 (fetal bovine serum: FBS) 加ロズウェルパーク記念研究所培地 (Roswell Park memorial institute medium: RPMI) で懸濁し、1 g のナイロ

ンウールカラム(Kanto Kagaku, Tokyo, Japan)内で37°C、1時間インキュベートすることによりT細胞を採集した。採集した細胞は、洗浄の後5%FBS加RPMIで懸濁し、使用時まで氷上で保存した。リンパ球は、使用に先立ちcarboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE)にて、以前に報告された方法を用いて染色し²¹⁾、染色後30分以内に使用した。

大腸の微小血管におけるT細胞のマイグレーションは、倒立蛍光顕微鏡(IX70; Olympus, Tokyo, Japan)を用いて観察を行った。0.3mlのRPMIに懸濁した 3×10^7 個のT細胞をレシピエントマウスの内頸静脈より3分以上かけて投与し、60分後に、1mm四方の領域内で、大腸微小血管外に移動しているT細胞の数を計測した。また、計測は、1検体につき3か所で行い、その平均値を結果として用いた。レシピエントマウスとして、CD4⁺CD25⁻ 移入 SCID マウスおよび WT BALB/c マウスを使用した。CD4⁺CD25⁻T細胞 移入 SCID マウスはBithionol 投与群と Bithionol 非投与群を用意し、WT BALB/c マウスは健常群として使用した (各群 n = 6)。Bithionol 投与群には、Bithionol をセルメチルセルロース (CMC) 溶液 200 μ l に溶解し、1 mg/body の用量で観察の12時間前に腹腔内投与した。異所性リンパ球マイグレーションを目的とした、*in vivo* での bithionol の使用報告は存在しないが、bithionol は肝蛭症の治療薬として用いられているため、この使用報告に基づいて投与量を決定した²²⁾。

本検討および以下に述べる腸炎モデルマウスでの Bithionol 抑制効果の検討は防衛医科大学校実験動物倫理委員会の承認を得て行った (承認番号 09089)。マウスの飼育は防衛医科大学校実験動物使用に関するガイドラインに従い、通常のマウス飼料および自由飲水にて行った。

(2) 腸炎モデルマウスに対する Bithionol の腸炎抑制効果

腸炎モデルマウスは、第3章で使用したものと同様、DSS 長期投与モデルマ

ウスおよび $CD4^+CD25^-$ T 細胞移入 SCID マウスを使用した。各モデルマウスは、健常群、Bithionol 非投与群、Bithionol 投与群の 3 群に分けて実験を行った（各群 $n=6$ ）。健常群は、DSS マウス実験では DSS を投与しない WT BALB/c マウスを用い、 $CD4^+CD25^-$ T 細胞移入マウス実験では、リンパ球移入をしていない SCID マウスを使用した。Bithionol 投与群には Bithionol を 1 mg/body をセルメチルセルロース (CMC) 溶液 200 μ l に溶解して隔日腹腔内に投与し、非投与群には CMC 溶液のみを 200 μ l、腹腔内に隔日投与した。DSS モデルマウスは DSS 投与を 5 サイクル施行、 $CD4^+CD25^-$ T 細胞移入モデルマウスはリンパ球移入後 8 週間後に炎症を評価した。

(3) 腸炎の評価

腸管炎症の評価は、第 3 章、第 2 節に記載した方法を用いて行った。

(4) 統計処理

各データは平均値 $\pm$ 標準誤差で表した。2 群間の比較には Mann-Whitney U-test を使用し、3 群間以上の比較には one-way ANOVA and a post hoc test を使用し、 p 値 0.05 未満を有意差ありとした。

第3節 結果

(1) 生体内顕微鏡による、腸管粘膜におけるリンパ球マイグレーションの観察
健常群においては、血管内皮に接着もしくは血管外へ浸潤しているリンパ球数はごく少数であった(図 8A)。CD4⁺CD25⁻ T 細胞移入 SCID マウス群では、浸潤リンパ球数は著明に増加した(図 8B)。また、この腸炎モデルマウスに Bithionol を投与した群では、リンパ球の血管内皮への接着、および血管外へのマイグレーションが有意に抑制された(図 8C、8D)。

(2) CD4⁺CD25⁻ T 細胞移入 SCID マウスに対する Bithionol の腸炎抑制効果
肉眼的観察では、腸炎を誘発したマウスの腸管は健常なマウスと比較して壁が浮腫状に肥厚し、短縮していたが、Bithionol を投与したモデルマウスでは、壁肥厚と腸管の短縮が改善しており(図 9A)、weight-to-length ratio(図 9B)も有意に改善していた。また、顕微鏡下における観察でも、CD4⁺CD25⁻ T 細胞移入 SCID マウスで見られた腸管壁の肥厚や炎症細胞浸潤等の所見の有意な改善を認め(図 9C、D)、Bithionol 非投与群と比較して、Bithionol 投与群では histopathology score (図 9E) および浸潤リンパ球数の有意な減少(図 9F)が認められ、Bithionol 投与により、CD4⁺CD25⁻ T 細胞移入 SCID マウスにおいて、その腸炎発症が有意に抑制されることが示された。

(3) DSS 長期投与モデルマウスに対する Bithionol の腸炎抑制効果
肉眼的観察では、腸炎を誘発したマウスの腸管は健常なマウスと比較して壁が浮腫状に肥厚し、短縮していたが、Bithionol を投与したモデルマウスでは、壁肥厚と腸管の短縮が改善しており(図 10A)、weight-to-length ratio も有意に改善していた(図 10B)。また、顕微鏡下における観察でも、DSS 長期投与マウスで

見られた腸管壁の肥厚や炎症細胞浸潤等の所見の有意な改善を認め(図 10C, D)、Bithionol 非投与群と比較して、Bithionol 投与群では histopathology score (図 10E) および浸潤リンパ球数の有意な減少が認められ(図 10F)、Bithionol 投与により、 $CD4^{+}CD25^{-}$ T 細胞移入 SCID マウスと同様に、DSS モデルマウスの腸炎が有意に改善することが示された。

第 4 節 小括

ATX 阻害剤である Bithionol の投与により、モデルマウスにおける腸管でのリンパ球マイグレーション、および腸炎モデルでの腸管炎症は有意に抑制された。以上より、ATX が腸管炎症時のリンパ球の血管内皮からの遊走と局所への浸潤に関与している可能性が強く示唆された。

第5章 ATX 阻害剤によるリンパ球マイグレーションの抑制効果

第1節 目的

前章までの実験において、ATX は腸管炎症の病変部で高発現し、阻害剤の投与で腸炎が抑制されることが示された。前述のとおり、ATX はリンパ節やパイエル盤で、リンパ球の 2 次リンパ組織へのマイグレーションに関与していることが知られている^{11-13,15)}。このことから、ATX が、腸炎の病変部にてリンパ球マイグレーションにも関与している可能性が示唆された。そこで、マウスの血管内皮細胞株 bEnd.3 を用い、ATX の HEV-like vessel におけるリンパ球マイグレーションへの関与、およびそのメカニズムについての検討を、bEnd.3 細胞を用いて行った。bEnd.3 細胞は血管内皮細胞の 1 種であり、TNF α 投与により HEV 化し、MAdCAM-1 などの接着分子が発現することが既に報告されている²³⁾。これを transwell assay の cell layer に使用し²⁴⁾、その ATX 発現量、および ATX 阻害剤の有無、LPA analogue 添加によるリンパ球マイグレーションの変化につき評価を行った。

第2節 方法

(1) bEnd3 cell line の HEV 化

2×10^5 個の bEnd.3 細胞 (ATCC, Tokyo, Japan) を 1ml の 10%FBS 加ダルベッコ・フォークト変法イーグル最小必須培地(Dulbecco's Modified Eagle Medium: DMEM)に懸濁させて Falcon Multiwell cell culture 6well plate (Becton Dickinson Labware, NJ, USA)に加え、2 日間培養を行った。その後細胞を PBS で 2 度洗浄し、5ng mouse TNF α を含んだ 1 ml の assay medium を加えた。TNF α 投与後 4

時間で細胞を採取し、その MAdCAM-1 および ATX messenger RNA 発現量を QRT-PCR を用いて測定した。コントロール群として、TNF α を投与せずに培養した bEnd.3 細胞を使用し、比較を行った。

(2) *In vitro* における ATX 阻害剤のリンパ球マイグレーションに対する効果

HEV を通ってマイグレーションするリンパ球に対する ATX 阻害剤と LPA analogue の影響を *in vitro* で検討した。ATX 阻害剤としては Bithionol を使用し、LPA analogue としては、GCPR に結合して LPA の働きを阻害することが報告されている 1-bromo-3(s)-hydroxy-4-(palmitoyloxy)butylphosphonate (BrP-LPA, Echelon Biosciences, Salt Lake City, UT, USA)^{25,26)}を使用して検討を行った。

マイグレーションに用いる脾細胞は、WT BALB/c マウスの脾臓より採取した。8~10 週齢の雄性 WT マウスをペントバルビタール麻酔下で安楽死させ脾臓を摘出。スライドガラスで破碎後に ammonium phosphate/chloride lysis buffer で溶血させ、洗浄の後 5%FBS 加 RPMI で懸濁し、使用時まで氷上で保存した。

マイグレーションの評価は、Boyden chamber assay を用いて行った²¹⁾。Assay では、upper chamber として 6-well Millicell hanging cell culture inserts (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA : 孔径 5 μ m) を、lower chamber として Falcon Multiwell cell culture 6well plate (Becton Dickinson Labware, NJ, USA)を使用した。Upper chamber に 5×10^4 個の bEnd.3 細胞を散布し、37°C、5% CO₂ 環境下で 2 日間培養を行い、続いて cell monolayer に 5 ng の TNF- α (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland)を投与したうえで、更に 4 時間培養した。その後 1×10^6 個の脾細胞を upper chamber に散布し、4 時間後に lower chamber へマイグレーションした脾細胞数を計測した。ATX 阻害剤投与群では、10 nM の Bithionol を upper chamber に投与した。LPA analogue 投与群では、BrP-LPA を 40 μ M の濃度で投与した。Lower chamber にマイグレーションした細胞は、Bürker-Türk hemacytometer を用

いて数量計測を行った。

(3) 統計処理

各データは平均値±標準誤差で表した。2群間の比較には Mann-Whitney U-test を使用し、3群間以上の比較には one-way ANOVA and a post hoc test を使用し、p 値 0.05 未満を有意差ありとした。

第3節 結果

(1) bEnd.3 細胞の HEV 化

TNF α を投与した bEnd.3 細胞では、通常の bEnd.3 細胞と比較して、MAdCAM-1 および ATX の messenger RNA 発現量が有意に増大していた (図 11A)。このことから、TNF α により HEV-like vessel に変化した bEnd.3 細胞では ATX の発現が強く認められることが示された。

(2) in vitro における ATX 阻害剤のリンパ球マイグレーションに対する効果

TNF α により HEV 化した bEnd.3 細胞の層を通過してマイグレーションする脾細胞数は、HEV 化していない bEnd.3 の層を通過する脾細胞数より有意に多かった。また、Bithionol の投与により、マイグレーションは有意に抑制された。加えて、BrP-LPA の投与でもマイグレーションは有意に抑制されており、HEV-like vessel を介するリンパ球マイグレーションは LPA 依存性であることが示唆された (図 11B)。

第4節 小括

TNF α により活性化された bEnd.3 細胞は MAdCAM-1 発現の亢進と併せ、ATX 発現の有意な増加も認められ、また、これを transwell assay の cell layer として用いた実験では、マイグレーションは通常の bEnd.3 細胞を用いた時と比較して有意に亢進していた。Bithionol の投与による ATX の阻害で、マイグレーションは有意に抑制された。LPA analogue の投与でマイグレーションは有意に抑制された。以上より、*in vitro* においても、ATX や LPA がリンパ球のマイグレーションに関与していることが示唆された。

第6章 考察

ATXはリゾホスホリパーゼ活性を有し、加水分解によってLPCをLPAに変換させる働きを有する²⁷⁻²⁹⁾が、初めはmelanoma細胞より分離され、その細胞遊走や腫瘍細胞の転移を亢進させることが報告されていた^{30,31)}。産生されたLPAは、G protein-coupled LPA-receptor (GCPR)を介し、細胞増殖、マイグレーション、およびサイトカイン放出といった現象を亢進させることが報告されている^{26-29, 32-40)}。さらに、その後の研究では、生理的環境下において、ATXはパイエル板やリンパ節などの2次リンパ組織に存在するHEVから産生されていることが発見された¹²⁾。HEVはリンパ球マイグレーションの中心の場所であり、通常リンパ節やパイエル板など、特別な部位にのみ存在するが、慢性関節リウマチ、橋本病などの炎症性疾患の病変部において、既存の静脈がHEV-like vesselに変化するという報告がなされており¹³⁾、CD、UCなどに代表される腸管炎症の病態下でも同様の変化が生じる可能性も考えられる^{41,42)}。しかしながら、HEV-like vesselにおけるATXの発現や腸管炎症で生じる異所性リンパ球マイグレーションにおけるATXの関与については、未だ報告はみられなかった。

本研究は、IBD患者および腸炎モデルマウスにおけるHEV-like vesselの出現の有無およびATXの発現に対し、評価を行ったものである。本検討におけるHEV-like vessel同定の指標としては、CD34の発現および血管形態を使用した。CD34はL-セレクチンのカウンターレセプターとして作用することから、HEV-like vesselのL-selectinの同定にも用いられる^{41,43,44)}。今回の検討では、CD、UC患者いずれの病変部粘膜でもCD34陽性の高内皮円柱様構造、いわゆるHEV-like vesselの発現が認められる一方、健常部粘膜ではその存在が認められず、腸管の炎症においても、HEVへの誘導現象が起こっているものと推察された。一方、β7-integrinと、血管内皮上のMAdCAM-1は、リンパ球マイグレーションの中心的

役割を果たす接着分子である。MAdCAM-1はHEV、および炎症組織のHEV-like vesselに発現し、 $\beta 7$ -integrin陽性リンパ球のマイグレーションに不可欠な役割を果たすことが報告されている⁴⁵⁻⁴⁸。免疫染色による観察では、CD34陽性の血管内皮の周囲には著明に $\beta 7$ -integrin陽性リンパ球の浸潤が認められた。加えて、ATXがHEV-like vesselに一致して発現することが確認された。以上の結果より、IBD患者の病変粘膜にHEV-like vesselが出現し、かつATXはHEV-like vesselに発現して、リンパ球のマイグレーションに関与する可能性が示唆された。

Messenger RNAの検討では、CD、UCいずれにおいても炎症部でATXの発現量が有意に増加しており、これも炎症に伴いHEV-like vesselが出現する可能性を示唆しているものと思われた。しかしながら、これだけでは、ATXが炎症の増悪に関連するか否かの評価は不十分であった。そこで、CDは発赤・びらん・アフタ・潰瘍の内視鏡的所見、UCは内視鏡的Matts gradeにより更に分類し、病勢に伴うATX発現量の変化について検討を行った。その結果、CD、UCいずれにおいても、病勢の進行に伴い、ATX発現量は増加傾向を示し、ATXが腸炎における病変の悪化に関連する可能性が示唆されることとなった。

腸炎モデルとして、本研究では $CD4^{+}CD25^{-}$ T 細胞 移入SCIDマウスとDSS長期投与モデルマウスの2種のマウスを使用した。WTマウスより取り出した $CD4^{+}CD25^{-}$ T細胞を腹腔内へ移入したSCIDマウスは、移入後5-8週間で小腸及び大腸に重篤な腸炎を呈することが知られている。また、腸炎を呈した腸管は、病理的な所見として、壁全層に及ぶ炎症、上皮細胞の過形成、多核白血球や単核球の浸潤、陰窩膿瘍、上皮細胞の剥離等が認められる。一方、DSSを長期反復投与したBALBc マウスも同様に、陰窩や上皮の傷害を呈し、また、顆粒球や単核球の著明な浸潤や浮腫、潰瘍の形成が認められることが報告されている⁴⁸。これらのモデルマウスの腸炎形成のメカニズムは異なっており、 $CD4^{+}CD25^{-}$ T細胞移入SCIDマウスでは、腸内抗原に対する免疫異常や、Th1やTh17細胞などの炎症

惹起性T細胞の増加を原因とし、全層性の炎症を呈する^{18,50-52)}のに対し、DSS腸炎では、局所における免疫異常、粘膜内マクロファージの活性化、DSS自体による直接的な傷害、および腸内細菌叢の変化など、複数の因子が関わることで、上皮細胞より傷害されていく⁵³⁻⁵⁷⁾。しかし、いずれのモデルマウスを用いた検討でも、腸炎の形成に伴い、腸管への浸潤リンパ球数は増加を示すこと、加えて MAdCAM-1 messenger RNA発現量の増加傾向が確認されたため、HEV-like vesselの出現を伴ったリンパ球主体の腸炎を模した状況を呈するものと判断された。ここにおいても、ATX messenger RNA発現量は増加傾向を示し、更にDSS長期投与モデルマウスにおいては、DSS投与サイクルの進行に伴った増加傾向が確認された。以上の結果より、炎症の遷延に伴ってHEV-like vesselが出現し、異所性リンパ球マイグレーションを促すこと、そしてHEV-like vesselにおいて、ATXがリンパ球マイグレーションへ関与する可能性が示唆された。また、今まで、炎症の遷延に伴うHEV-like vesselの発生については数多くの報告があるものの^{14,41,58-63)}、同一炎症の発生直後と遷延時におけるHEV-like vessel発生の比較については十分な検討はなされていなかった。DSSの長期投与に伴うATX発現の増加は、異所性に誘導されるHEV-like vesselは炎症の早期には出現していないことを示唆していると考えられた。

当初、ATX は癌細胞の運動性および転移に対する働きが着目されており、阻害剤としてのLPAアナログおよびATX阻害剤についての検討結果が複数報告されてきたが^{20,25,64-66)}、本研究ではBithionol およびBrP-LPAに注目した。BithionolはlysoPLD活性を競合的に阻害し、更にmelanoma細胞を使用した実験で、その遊走および転移を著明に阻害することが明らかにされている²⁰⁾。一方、BrP-LPAはLPA analogueであり、GPCRに結合することでLPAの働きを阻害することが報告されている²⁵⁾。生体内蛍光顕微鏡による観察では、Bithionolの投与により、リンパ球マイグレーションの有意な抑制が観察された。更に、腸炎モデルマウ

スにおいては、Bithionol の投与により、腸炎が浸潤リンパ球数の減少とともに有意な改善傾向を示した。一方、control 群に対する Bithionol の投与は、浸潤リンパ球数に有意な変化をもたらさなかった。これは、ATX が HEV もしくは HEV-like vessel にのみ発現し、正常粘膜に分布する静脈にはそれらが存在しないことより、Bithionol の影響を受けなかったためと考えられ、かつ、ATX が腸管粘膜においては炎症下の異所性リンパ球マイグレーションにのみ関連していることを裏付ける結果であると思われた。これらの結果より、Bithionol が、炎症に伴うリンパ球浸潤を抑制することにより、腸炎を軽快させる可能性が示唆された。

しかしながら、これらの検討では LPA analogue は使用していないため、ATX 阻害剤の腸炎阻害効果は Bithionol の非特異的な効果による可能性も否定できなかった。また、LPA の半減期は短く、LPA 自体の組織内濃度測定は困難であったため、bEnd.3 細胞と transwell assay を用い、*in vitro* におけるリンパ球マイグレーションに対する ATX 阻害剤の効果について、更なる検討を行った。bEnd.3 細胞は血管内皮細胞で、TNF α の刺激により HEV 化することが報告されており、transwell assay の cell layer として用いることにより、HEV-like vessel を模した状況を作ることができると考えたためである。また、TNF α を投与した bEnd.3 細胞では、ATX messenger RNA の発現が認められたことから、これらを用いた検討が可能であると判断した。TNF α により HEV 化した bEnd.3 の層をマイグレーションするリンパ球の数は、通常の bEnd.3 の層をマイグレーションするリンパ球数より有意に多数みられたが、BrP-LPA、Bithionol いずれの投与によっても、この増加は有意に抑制された。これらの所見は、ATX-LPA 系が通常の HEV のみならず、炎症の環境下において形成される HEV-like vessel でもリンパ球のマイグレーションに関与していることを示唆している。

リンパ球マイグレーションの制御は、炎症性腸疾患に対する治療の重要な命

題の一つである。マイグレーションは複数のプロセスから成り、かつ多数の接着分子が関与しているため、現在行われている接着分子の阻害のみでは、十分な治療効果が得られるとはいえない。ATX-LPA 系は、腸管炎症の異所性リンパ球マイグレーションにおいて重要な役割を果たしており、炎症性腸疾患に対する新たな治療ターゲットとなる可能性があることが示された。

第7章 結論

1. ヒト IBD における免疫染色で、UC および CD の両疾患において、病変部の腸管粘膜に ATX 発現を伴う HEV-like vessel の存在が確認された。CD においては大腸での ATX messenger RNA 発現量は非病変部においても健常者より高く、CD および UC 両者の活動性炎症部位では非活動性部位と比較して有意に高値を示し、またその発現量の高低は内視鏡的炎症所見の程度とも一致していた。
2. DSS 長期投与および $CD4^{+}CD25^{-}$ T 細胞移入 SCID マウスの 2 種類の腸炎モデルマウスを用いた実験で、ともに腸炎モデルマウス腸管における ATX messenger RNA 発現量は非腸炎群に比して増加していた。ATX 阻害剤の Bithionol を用いた実験では生体顕微鏡下で腸管の微小血管へのリンパ球マイグレーションが阻害され、腸炎モデルに Bithionol を投与すると腸炎を有意に改善できた。このことより、ATX はリンパ球マイグレーションの亢進に伴う腸炎の増悪に関与する可能性が示唆された。
3. bEnd.3 細胞を用いた実験では、HEV-like vessel に誘導された血管内皮において、ATX がリンパ球マイグレーションに関与していることが示された。ATX-LPA 系の阻害により亢進したリンパ球マイグレーションが抑制され、IBD に対する新たな治療ターゲットとなる可能性が示された。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました防衛医科大学校内科学講座教授 穂苅量太博士および防衛医科大学校長 三浦総一郎博士に衷心より感謝申し上げます。

本研究の遂行に際し、貴重な御助言、御協力を賜りました防衛医科大学校内科学講座教室員諸先生に深く感謝の意を表します。

また本研究の一部は防衛医科大学校振興会および厚生労働省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」からの助成金により実施しました。この場を借りて深謝いたします。

本研究の主旨は、厚生労働省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」班会議（2010 年 1 月、東京）（2010 年 7 月、東京）（2011 年 1 月、東京）（2011 年 7 月、東京）（2012 年 1 月、東京）、日本消化器病学会大会（第 52 回、2010 年 10 月、横浜）、（第 53 回、2011 年 10 月、福岡）、日本消化器病学会総会（2011 年 5 月、東京）、日本微小循環学会総会（第 36 回、2011 年 2 月、名古屋）（第 37 回、2012 年 3 月、盛岡）、日本消化器免疫学会総会（第 48 回、2011 年 7 月、金沢）、日本リンパ学会総会（第 35 回、2011 年 5 月、東京）、米国消化器病学会大会（2010 年 5 月、ニューオリンズ）（2011 年 5 月、シカゴ）（2012 年 5 月、サンディエゴ）において発表した。

引用文献

- 1) **Miyasaka M, Tanaka T.** Lymphocyte trafficking across high endothelial venules: dogmas and enigmas. *Nat. Rev. Immunol* 2004 ; 4 : 360–370.
- 2) **von Andrian UH, Mempel TR.** Homing and cellular traffic in lymph nodes. *Nat. Rev. Immunol* 2003 ; 3 : 867–878.
- 3) **Miquel S, Julián P, Esther A, J. Ignasi E, Yolanda A, Montserrat E, et al.** VCAM-1 and ICAM-1 mediate leukocyte-endothelial cell adhesion in rat experimental colitis. *Gastroenterology*. 1999 ; 116(4) : 874-83.
- 4) **Briskin M, Winsor-Hines D, Shyjan A, Cochran N, Bloom S, Wilson J, et al.** Human mucosal addressin cell adhesion molecule-1 is preferentially expressed in intestinal tract and associated lymphoid tissue. *Am J Pathol* 1997 ; 151 : 97–110.
- 5) **Fujimori H, Miura S, Koseki S, Hokari R, Komoto S, Hara Y, et al.** Intravital observation of adhesion of lamina propria lymphocytes to microvessels of small intestine in mice. *Gastroenterology* 2002 ; 122 : 734–44.
- 6) **Souza HS, Elia CC, Spencer J, MacDonald TT.** Expression of lymphocyte-endothelial receptor-ligand pairs, a4b7/MAdCAM-1 and OX40/OX40 ligand in the colon and jejunum of patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 1999 ; 45 : 856–63.
- 7) **Ghosh S, Goldin E, Gordon FH, Malchow HA, Rask-Madsen J, Rutgeerts P, et al.** Natalizumab for active Crohn's disease. *N Engl J Med*. 2003 ; 348 : 24-32.
- 8) **Kato S, Hokari R, Matsuzaki K, Iwai A, Kawaguchi A, Nagao S, et al.** Amelioration of murine experimental colitis by inhibition of mucosal addressin cell adhesion molecule-1. *J Pharmacol Exp Ther*. 2000 ; 295 : 183-189.
- 9) **Rivera-Nieves J, Olson T, Bamias G, Bruce A, Solga M, Knight RF, et al.**

L-Selectin, $\alpha 4\beta 1$, and $\alpha 4\beta 7$ integrins participate in CD4⁺ T cell recruitment to chronically inflamed small intestine. *J Immunol* 2005 ; 174 : 2343-2352.

10) **Park EJ, Mora JR, Carman CV, Chen J, Sasaki Y, Cheng G, et al.** Aberrant activation of integrin $\alpha 4\beta 7$ suppresses lymphocyte migration to the gut. *J Clin Invest*. 2007 ; 117 : 2526-38.

11) **Kanda H, Newton R, Klein R, Morita Y, Gunn MD, Rosen SD.** Autotaxin, an ectoenzyme that produces lysophosphatidic acid, promotes the entry of lymphocytes into secondary lymphoid organs. *Nat Immunol*. 2008 ; 9 ; 415-423.

12) **Dietmar V and Martin KW.** A new player in lymphocyte homing. *Nat Immunol*. 2008 ; 9 ; 347-8.

13) **Umemoto E, Hayasaka H, Bai Z, Cai L, Yonekura S, Peng X, et al.** Novel regulators of lymphocyte trafficking across high endothelial venules. *Crit Rev Immunol* 2011 ; 31 : 147-69.

14) **Jean PG and Timothy AS.** High endothelial venules (HEVs): specialized endothelium for lymphocyte migration. *Immunology Today* 1995 ; 9 : 449-57.

15) **Palmeri D, Zuo FR, Rosen SD, Hemmerich S.** Differential gene expression profile of human tonsil high endothelial cells: implications for lymphocyte trafficking. *J Leukoc Biol*. 2004 ; 75 ; 910–927.

16) **Matts SG.** The value of rectal biopsy in the diagnosis of ulcerative colitis. *Q J Med* 1961 ; 30 : 393-407.

17) **Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R.** A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology*. 1990 ; 98 : 694-702.

18) **Ostanin DV, Bao J, Koboziev I, Gray L, Robinson-Jackson SA, Kosloski-Davidson M, et al.** T cell transfer model of chronic colitis: concepts,

considerations, and tricks of the trade. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009 ; 296 : G135–G146.

19) **Dieleman LA, Palmen MJ, Akol H, Bloemena E, Peña AS, Meuwissen SG, et al.** Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines. *Clin Exp Immunol* 1998 ; 114 : 385–391.

20) **Saunders LP, Ouellette A, Bandle R, Chang WC, Zhou H, Misra RN, et al.** Identification of small-molecule inhibitors of autotaxin that inhibit melanoma cell migration and invasion. *Mol Cancer Ther.* 2008 ; 7 : 3352-3362.

21) **Miura S, Tsuzuki Y, Fukumura D, Serizawa H, Suematsu M, Kurose I, et al.** Intravital demonstration of sequential migration process of lymphocyte subpopulations in rat Peyer's patches. *Gastroenterology* 1995 ; 109 : 1113–23.

22) **Matsuoka H, Tongu Y, Aji T, Ishii A, Nakanishi T, Nakada H, et al.** Seven cases of human fascioliasis in and around Okayama prefecture. *Journal of Okayama Medical Association* 1987; 99: 1491-1502.

23) **Sikorski EE, Hallmann R, Berg EL, Butcher EC.** The Peyer's patch high endothelial receptor for lymphocytes, the mucosal vascular addressin, is induced on a murine endothelial cell line by tumor necrosis factor- α and IL-1. *J. Immunol.* 1993; 151: 5239–5250.

24) **Röhneilt RK, Hoch G, Reiss Y, Engelhardt B.** Immunosurveillance modelled in vitro: naive and memory T cells spontaneously migrate across unstimulated microvascular endothelium. *Int. Immunol.* 1997 ; 9 : 435–450.

25) **Jiang G, Xu Y, Fujiwara Y, Tsukahara T, Tsukahara R, Gajewiak J, et al.** Alpha-substituted phosphonate analogues of lysophosphatidic acid (LPA) selectively inhibit production and action of LPA. *ChemMedChem.* 2007 ; 2 : 679–690.

26) **Prestwich GD, Gajewiak J, Zhang H, Xu X, Yang G, Serban M.**

Phosphatase-resistant analogues of lysophosphatidic acid: agonists promote healing, antagonists and autotaxin inhibitors treat cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2008 ; 1781 : 588–594.

27) **Umezū-Goto M, Kishi Y, Taira A, Hama K, Dohmae N, Takio K, *et al.*** Autotaxin has lysophospholipase D activity leading to tumor cell growth and motility by lysophosphatidic acid production. *J Cell Biol*. 2002 ; 158 : 227-233.

28) **Gaetano CG, Samadi N, Tomsig JL, Macdonald TL, Lynch KR, Brindley DN.** Inhibition of autotaxin production or activity blocks lysophosphatidylethanolamine-induced migration of human breast cancer and melanoma cells. *Mol. Carcinogen*. 2009 ; 48 : 801-809.

29) **Khurana S, Tomar A, George SP, Wang Y, Siddiqui MR, Guo H, *et al.*** Autotaxin and lysophosphatidic acid stimulate intestinal cell motility by redistribution of the actin modifying protein villin to the developing lamellipodia. *Exp. Cell. Res*. 2008 ; 314 : 530-542.

30) **Stracke ML, Krutzsch HC, Unsworth EJ, Arestad A, Cioce V, Schiffmann E, *et al.*** Identification, purification, and partial sequence analysis of autotaxin, a novel motility-stimulating protein. *J. Biol. Chem*. 1992 ; 267 : 2524-2529.

31) **Xu X, Prestwich GD.** Inhibition of tumor growth and angiogenesis by a lysophosphatidic acid antagonist in an engineered three-dimensional lung cancer xenograft model. *Cancer*. 2010 ; 116 : 1739-1750.

32) **van Meeteren LA, Moolenaar WH.** Regulation and biological activities of the autotaxin-LPA axis. *Prog. Lipid Res*. 2007 ; 46 : 145-160.

33) **Nakanaga K, Hama K, Aoki J.** Autotaxin - an LPA producing enzyme with diverse functions. *J. Biochem*. 2010 ; 148 : 13-24.

34) **Xu Y, Shen Z, Wiper DW, Wu M, Morton RE, Elson P, *et al.*** Lysophosphatidic

- acid as a potential biomarker for ovarian and other gynecologic cancers. *JAMA*. 1998 ; 280 : 719-723.
- 35) **Sugiura T, Nakane S, Kishimoto S, Waku K., Yoshioka Y, Tokumura A.** Lysophosphatidic acid, a growth factor-like lipid, in the saliva. *J. Lipid Res.* 2002 ; 43 : 2049-2055.
- 36) **Georas SN, Berdyshev E, Hubbard W, Gorshkova IA, Usatyuk PV, Saatian B, et al.** Lysophosphatidic acid is detectable in human bronchoalveolar lavage fluids at baseline and increased after segmental allergen challenge. *Clin. Exp. Allergy*. 2007 ; 37 : 311-322.
- 37) **Zhao Y, Natarajan V.** Lysophosphatidic acid signaling in airway epithelium: role in airway inflammation and remodeling. *Cell. Signal*. 2009 ; 21 : 367-377.
- 38) **Anliker B, Chun J.** Cell surface receptors in lysophospholipid signaling. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 2004 ; 15 : 457-465.
- 39) **Ye X, Ishii I, Kingsbury MA, Chun J.** Lysophosphatidic acid as a novel cell survival/apoptotic factor. *Biochim. Biophys. Acta*. 2002; 1585: 108-113.
- 40) **Pamuklar Z, Federico L, Liu S, Umezu-Goto M, Dong A, Panchatcharam M, et al.** Autotaxin/lysopholipase D and lysophosphatidic acid regulate murine hemostasis and thrombosis. *J. Biol. Chem.* 2009 ; 284 : 7385-7394.
- 41) **Kobayashi M, Mitoma J, Nakamura N, Katsuyama T, Nakayama J, Fukuda M.** Induction of peripheral lymph node addressin in human gastric mucosa infected by *Helicobacter pylori*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 2004 ; 101 : 17807–17812.
- 42) **Drayton DL, Liao S, Mounzer RH, Ruddle NH.** Lymphoid organ development: from ontogeny to neogenesis. *Nat. Immunol.* 2006 ; 7 : 344–353.
- 43) **Puri KD, Finger EB, Gaudernack G, Springer TA.** Sialomucin CD34 is the major L-selectin ligand in human tonsil high endothelial venules. *J. Cell Biol.* 1995 ; 131 :

261-70.

44) **Baumhueter S, Dyhdal N, Kyle C, Lasky LA.** Global vascular expression of murine CD34, a sialomucin-like endothelial ligand for L-selectin. *Blood*. 1994 ; 84 : 2554-2565.

45) **Tsuzuki Y, Miura S, Suematsu M, Kurose I, Shigematsu T, Kimura H, et al.** Alpha 4 integrin plays a critical role in early stages of T lymphocyte migration in Peyer's patches of rats. *Int Immunol*. 1996 ; 8 : 287—295.

46) **Iizuka T, Tanaka T, Suematsu M, Miura S, Watanabe T, Koike R, et al.** Stage specific expression of mucosal addressin cell adhesion molecule-1 during embryogenesis in rats. *J Immunol*. 2000 ; 164 : 2463—2471.

47) **Warnock RA, Campbell JJ, Dorf ME, Matsuzawa A, McEvoy LM, Butcher EC.** The role of chemokines in the microenvironmental control of T versus B cell arrest in Peyer's patch high endothelial venules. *J Exp Med*. 2000; 191: 77—88.

48) **Agace WW, Roberts AI, Wu L, Greineder C, Ebert EC, Parker CM.** Human intestinal lamina propria and intraepithelial lymphocytes express receptors specific for chemokines induced by inflammation. *Eur J Immunol*. 2000; 30: 819-826.

49) **Elson CO, Sartor RB, Tennyson GS, Riddell RH.** Experimental models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 1995 ; 109 : 1344-67.

50) **Elson CO, Cong Y, McCracken VJ, Dimmitt RA, Lorenz RG, Weaver CT.** Experimental models of inflammatory bowel disease reveal innate, adaptive, and regulatory mechanisms of host dialogue with the microbiota. *Immunol Rev*. 2005 ; 206 : 260–276.

51) **Izcue A, Coombes JL, Powrie F.** Regulatory T cells suppress systemic and mucosal immune activation to control intestinal inflammation. *Immunol Rev*. 2006; 212: 256–271.

- 52) **Powrie F.** T cells in inflammatory bowel disease: protective and pathogenic roles. *Immunity*. 1995; 3: 171–174.
- 53) **Araki Y, Andoh A, Fujiyama Y, Bamba T.** Development of dextran sulphate sodium-induced experimental colitis is suppressed in genetically mast cell-deficient Ws/Ws rats. *Clin Exp Immunol*. 2000 ; 119 : 264-9.
- 54) **Takagi H, Kanai T, Okazawa A, Kishi Y, Sato T, Takaishi H, et al.** Contrasting Action of IL-12 and IL-18 in the Development of Dextran Sodium Sulphate Colitis in Mice. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 2003 ; 38 : 837-44.
- 55) **Watt J, Marcus R.** Experimental ulcerative disease of the colon. *Meth Achiev Exp Pathol*. 1975 ; 7 : 56-71.
- 56) **Iwanaga T, Hoshi O, Han H, Fujita T.** Morphological analysis of acute ulcerative colitis experimentally induced by dextran sulfate sodium in the guinea pig: some possible mechanisms of cecal ulceration. *J Gastroenterol*. 1994 ; 29 : 430-8.
- 57) **Onderdonk AB, Hermos JA, Bartlett JG.** The role of the intestinal microflora in experimental colitis. *Am J Clin Nutr*. 1977 ; 30 : 1819-25.
- 58) **Baumhueter S, Dybdal N, Kyle C, Lasky LA.** Global Vascular Expression of Murine CD34, a Sialomucin-Like Endothelial Ligand for L-Selectin. *Blood*. 1994 ; 84 : 2554-65
- 59) **Rosen SD.** Ligand for L-selectin: homing, inflammation, and beyond. *Annu Rev Immunol*. 2004 ; 22 : 129–156.
- 60) **Renkonen J, Tynnenen O, Hayry P, Paavonen T, Renkonen R.** Glycosylation might provide endothelial zip codes for organ-specific leukocyte traffic into inflammatory sites. *Am J Pathol*. 2002 ; 161 : 543–550.
- 61) **Aloisi F, Pujol-Borrell R.** Lymphoid neogenesis in chronic inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol*. 2006 ; 6 : 205–217.

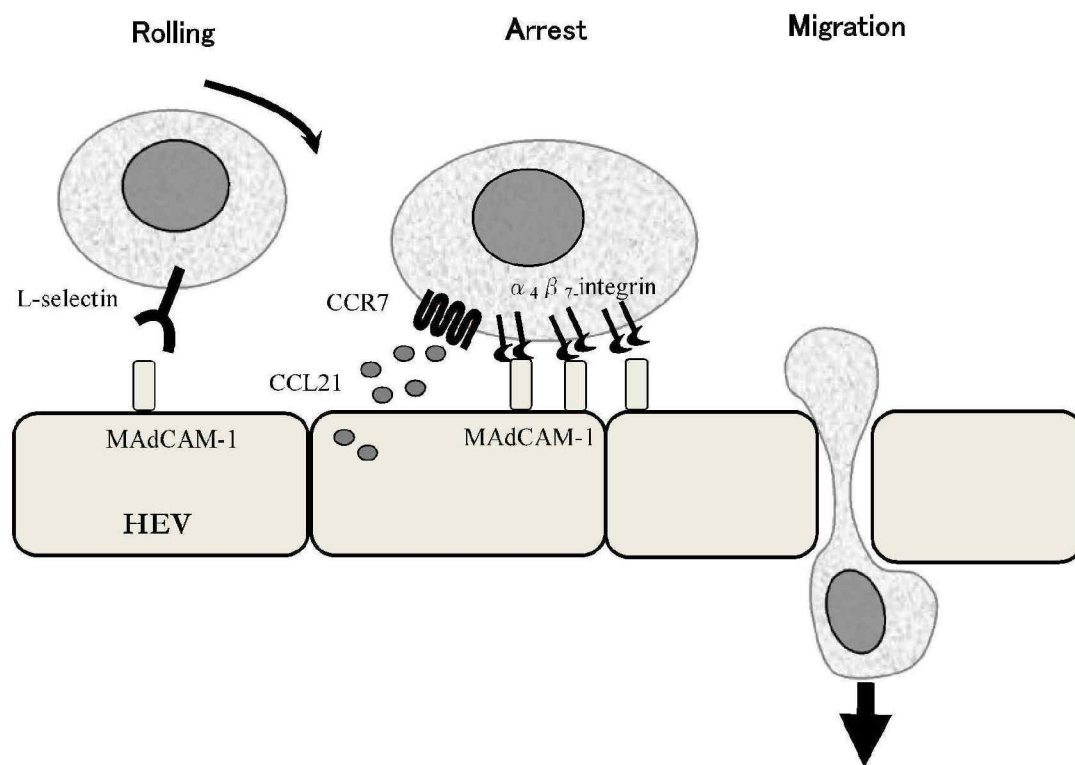
- 62) **Suzawa K, Kobayashi M, Sakai Y, Hoshino H, Watanabe M, Harada O, *et al.***
 Preferential induction of peripheral lymph node addressin on high endothelial venule-like vessels in the active phase of ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol.* 2007 ; 102 : 1499–1509.
- 63) **Kobayashi M, Hoshino H, Masumoto J, Fukushima M, Suzawa K, Kageyama S, *et al.***
 GlcNAc6ST-1-mediated decoration of MAdCAM-1 protein with L-selectin ligand carbohydrates directs disease activity of ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 2009 ; 15 : 697–706.
- 64) **Cui P, Tomsig JL, McCalmont WF, Lee S, Becker CJ, Lynch KR, *et al.***
 Synthesis and biological evaluation of phosphonate derivatives as autotaxin (ATX) inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* 2007 ; 17 : 1634–40.
- 65) **Baker DL, Fujiwara Y, Pigg KR, Tsukahara R, Kobayashi S, Murofushi H, *et al.***
 Carba analogs of cyclic phosphatidic acid are selective inhibitors of autotaxin and cancer cell invasion and metastasis. *J Biol Chem.* 2006 ; 281 : 22786–93.
- 66) **Liu XW, Sok DE, Yook HS, Sohn CB, Chung YJ, Kim MR.** Inhibition of lysophospholipase D activity by unsaturated lysophosphatidic acids or seed extracts containing 1-linoleoyl and 1-oleoyl lysophosphatidic acid. *J Agric Food Chem.* 2007 ; 55 : 8717–22.

図 表

表 1

Grade 1	血管透見像正常、易出血性なし
Grade 2	血管透見像の消失 易出血性なし、またはごく軽度 自然出血なし、粘膜発赤軽度 微細顆粒状変化あり 膿様粘液なし
Grade 3	血管透見像消失 易出血性あり、自然出血あり 粘膜浮腫状、発赤しやや粗 膿様粘液の付着あり
Grade 4	潰瘍 易出血性、自然出血著明 膿様粘液の付着あり 腸管の拡張不良

[表 1] 内視鏡的 Matts Grade



【図1】 腸管 high endothelial venule (HEV)におけるリンパ球マイグレーション

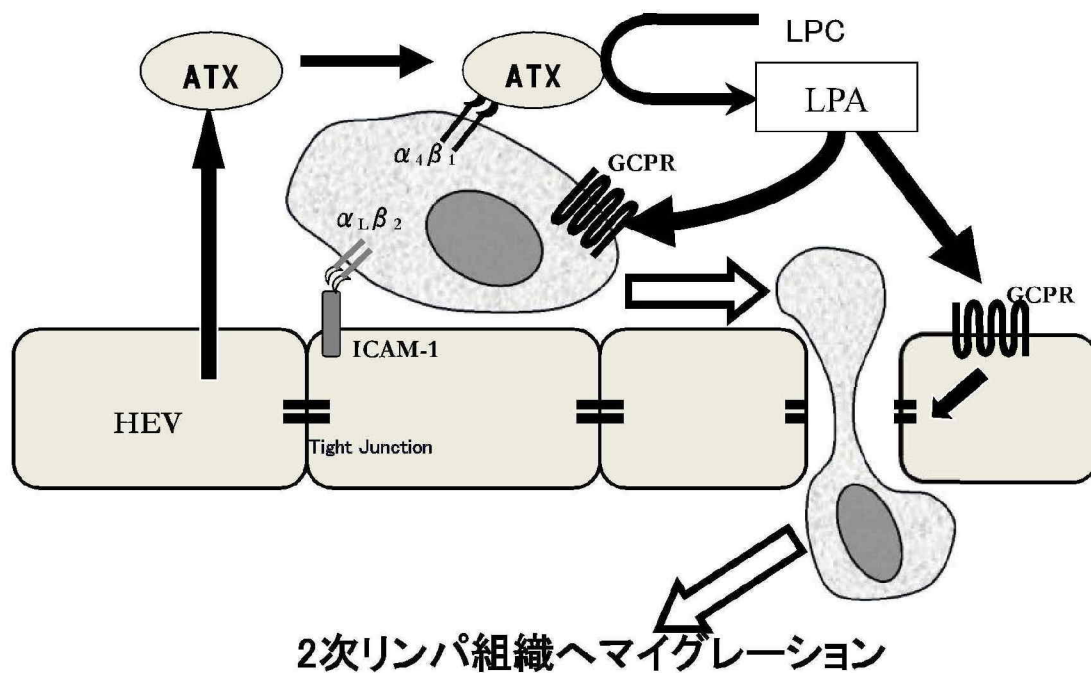
リンパ球は、まず血管内皮細胞上を弱い接着をしながら転回（rolling）を開始するが、その際にL-selectinがHEVに発現するMAdCAM-1と弱く結合する。初期の転回により内皮は活性化され、さまざまなケモカインを産生し、活性化された $\alpha_4\beta_7$ -integrinがMAdCAM-1と強固に結合することで、リンパ球は内皮細胞上に静止（arrest）し、その後内皮細胞の間を割り込んで2次リンパ組織へ進入（migration）する。

CCL21: chemokine ligand 21

CCR7: chemokine receptor 7

HEV: high endothelial venule

MAdCAM-1: mucosal vascular addressin cell adhesion molecule-1



【図2】リンパ球マイグレーションにおける ATX および LPA の関与
 ATXはHEVより産生され、arrestの状態にあるリンパ球表面のレセプター*と結合する。その後、ATXは血中に存在するLPCをLPAに変換し、LPAはG protein-coupled receptor (GPCR)に結合することでリンパ球の運動性を亢進させて2次リンパ組織へのマイグレーションを促す。また、LPAはHEVにも作用し、細胞間隙を拡げてリンパ球の透過性を亢進させる働きも有する。

*レセプターとして、既に報告のある $\alpha_4\beta_1$ -integrin の他、未知のレセプターの関与が示唆されている。

ATX: autotaxin

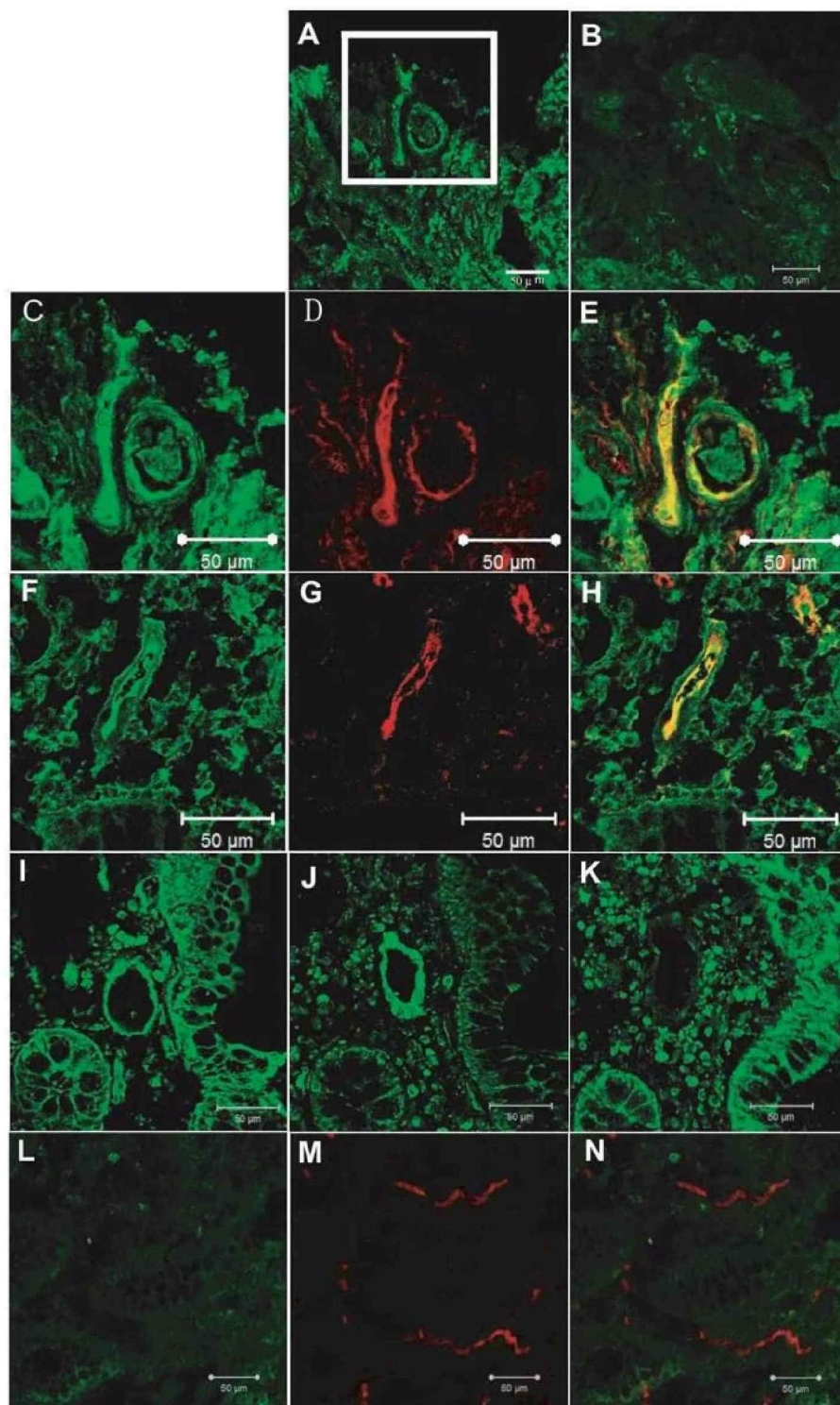
HEV: high endothelial vessel

ICAM-1: intercellular adhesion molecule-1

LPC: lysophosphatidylcholine

LPA: lysophosphatidic acid

GPCR: G protein-coupled receptor



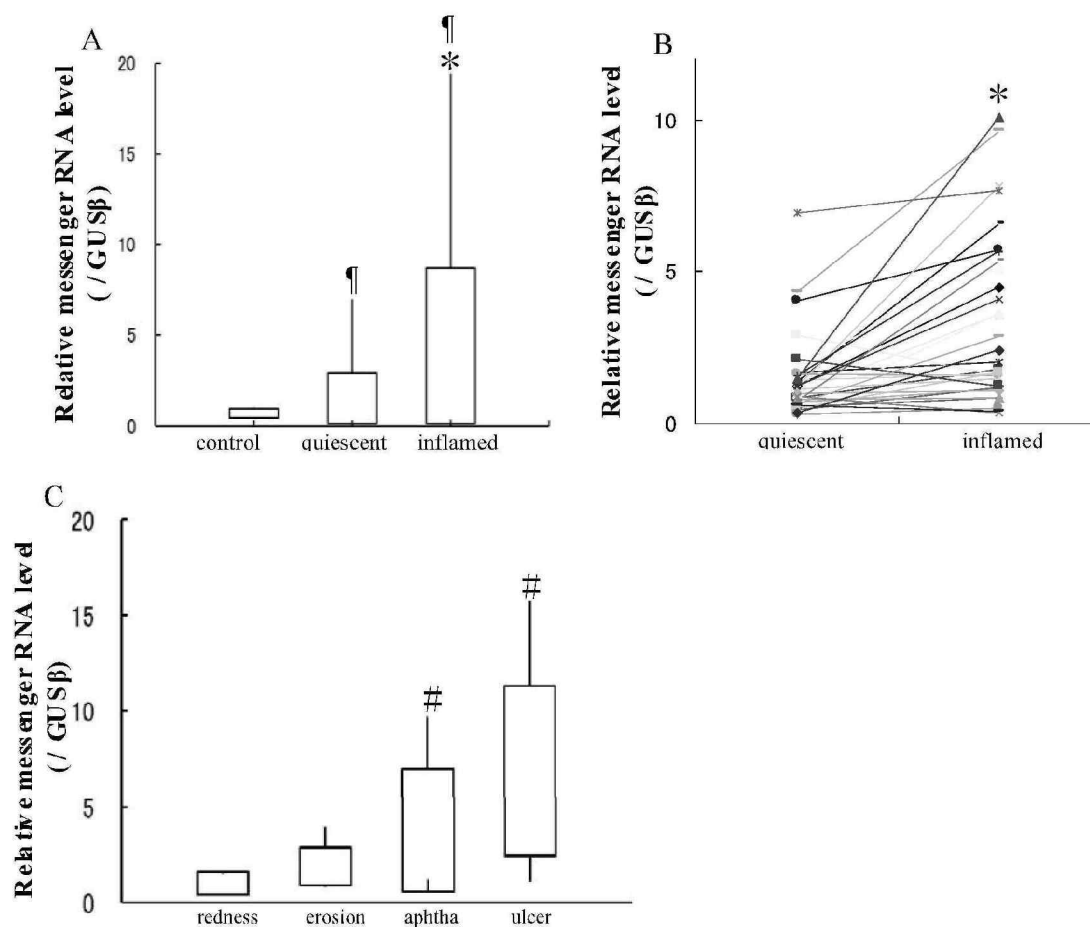
【図 3】 HEV-like vessel の免疫染色像

- (A) CD 患者の腸管組織の ATX 染色
 - (B) アイスotypeコントロール IgG による negative control
 - (C) CD 患者における病変部の ATX 染色
 - (D) CD 患者における病変部の CD34 染色像
 - (E) CD 患者における病変部の ATX、CD34 の二重染色像
 - (F) UC 患者における病変部の ATX 染色
 - (G) UC 患者における病変部の CD34 染色像
 - (H) UC 患者における病変部の ATX、CD34 の二重染色像
 - (I) CD 患者における病変部の ATX 染色像
 - (J) CD 患者における病変部の CD34 染色像
 - (K) CD 患者における病変部の $\beta 7$ -integrin 染色
 - (L) 健常大腸粘膜の ATX 染色
 - (M) 健常大腸粘膜の CD34 染色像
 - (N) 健常大腸粘膜の ATX、CD34 の二重染色像
- (A)、(B)は弱拡大像 (×100)、(C) - (N)は強拡大像 (×400) を示す。

ATX は、CD 患者(A, C, I)、UC(F)患者いずれの病変粘膜においても観察されたが、健常大腸粘膜では ATX の染色を認めなかった(L)。

また、HEV-like vessel は CD34 陽性の、厚い血管内皮として染色され、かつ ATX の発現が、CD 患者(D, E, J)および UC 患者(G, H)いずれにおいても認められたが、健常大腸粘膜では発現が認められなかった(M, N)。

更に、HEV-like vessel の周囲には、 $\beta 7$ -integrin-positive 陽性の細胞が多数浸潤しているのが認められた (K)。



【図 4】 CD 患者における ATX messenger RNA 発現についての検討

(A) コントロール群および CD 患者における非炎症部 (quiescent) と炎症部 (inflamed) との比較

CD 患者非炎症部は健常コントロール(control)と比較して高値を示した。非炎症部 (n=44) と比較して、炎症部 (n=39) における ATX messenger RNA の発現は有意に亢進していた。

(B) 同一患者間における比較

同一患者間における比較においても、ATX messenger RNA の発現量は非炎症部と比較して炎症部で有意な高値を示した (n=31)。

(C) 炎症部位の所見による比較

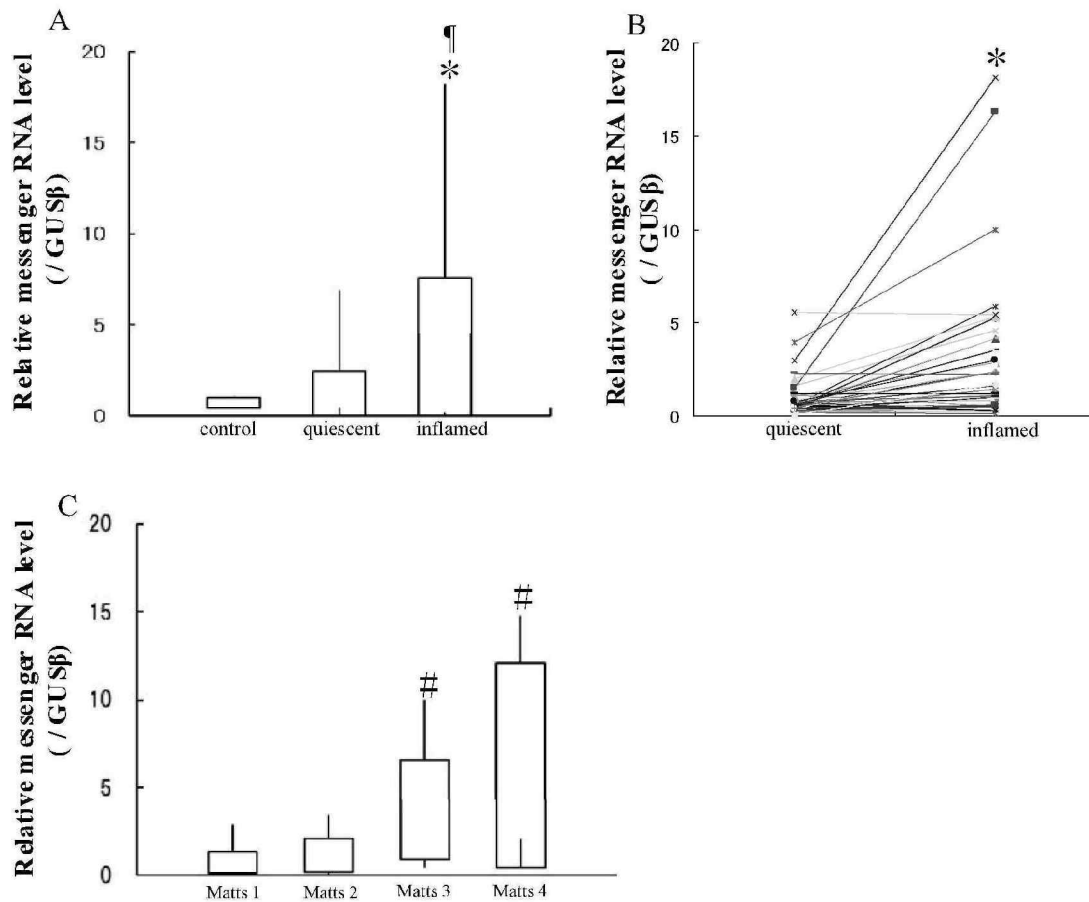
内視鏡的に発赤(redness、n=16)、びらん(erosion、n=12)、アフタ(aphtha、n=17)、潰瘍(ulcer、n=18)のいずれかを主とするものに分類して比較したところ、粘膜上皮の破壊の進行に伴い、ATX messenger RNA 発現量は増加傾向を示した。

内因性コントロールは GUS β を使用した。2 群間の比較には Mann-Whitney U-test を使用し、3 群間以上の比較には one-way ANOVA and a post hoc test を使用した。(A)、(C) のデータは平均値 $\pm$ 標準誤差で表した。

*p<0.05 対 quiescent 群。† p<0.05 対 control 群。

p<0.05 対 redness 群。

control; 健常部 quiescent; 非炎症部 inflamed; 炎症部



【図 5】 UC 患者における ATX messenger RNA 発現についての検討

(A) 健常組織 (control) 群および UC 患者における非炎症部 (quiescent) と炎症部 (inflamed) との比較

UC 患者非炎症部は健常組織と比較して変化を認めなかった。非炎症部 (n=66) と比較して、炎症部 (n=61) における ATX messenger RNA の発現は有意に亢進していた。

(B) 同一患者間における比較

同一患者間における比較においても、ATX messenger RNA の発現量は非炎症部と比較して炎症部で有意な高値を示した (n=45)。

(C)炎症部位の内視鏡的 Matts grade による比較

内視鏡的 Matts grade に分類して ATX messenger RNA 発現量の比較検討を行ったところ、Matts grade の上昇に伴い、ATX messenger RNA の発現量は有意に増加傾向を示した。

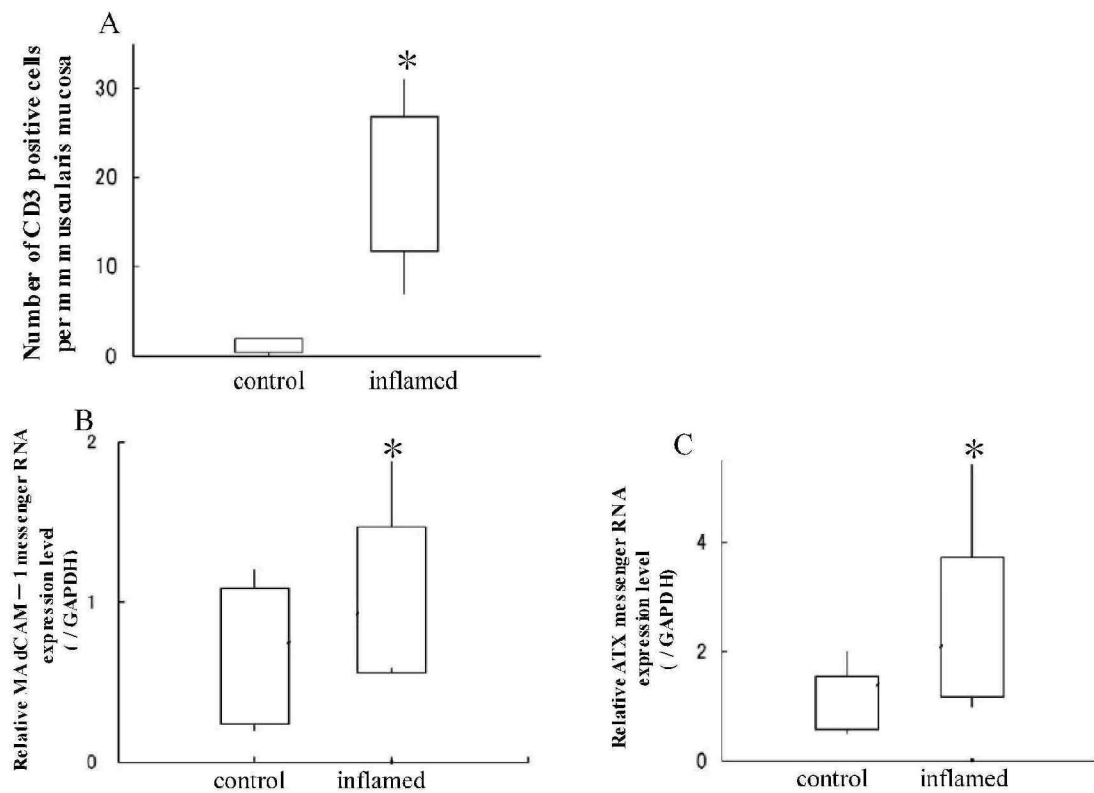
(Matts 1: n=33、Matts 2: n=40、Matts 3: n=27、Matts 4: n=17)

内因性コントロールは GUS β を使用した。2 群間の比較には Mann-Whitney U-test を使用し、3 群間以上の比較には one-way ANOVA and a post hoc test を使用した。(A)、(B) のデータは平均値 $\pm$ 標準誤差で表した。

*p<0.05 対 quiescent 群。 ¶ p<0.05 対 control 群。

p<0.05 対 Matts'1 群。

control; 健常部 quiescent; 非病変部 inflamed; 病変部



【図 6】 $CD4^+CD25^-$ T 細胞移入 SCID マウスの腸管粘膜における ATX messenger RNA 発現についての検討

(A) 腸管粘膜の浸潤リンパ球数の比較

健常群 (control) として、通常の SCID マウスの腸管を用いた。健常群 (control) と比較して、腸炎群 (inflamed) において浸潤リンパ球数は有意に増加していた。

(B) MAdCAM-1 messenger RNA 発現量の比較

MAdCAM-1 messenger RNA 発現量は、健常群に比べ腸炎群において有意に増加を示した。

(C) ATX messenger RNA 発現量の比較

ATX messenger RNA 発現量も、健常群に比べ腸炎群において有意に増加を示した。

messenger RNA 発現量測定の際の内因性コントロールは GAPDH を使用した。

統計学的解析には Mann-Whitney U-test を使用した。各データは平均値±標準誤差で表した（各群 n=6）。

* $p<0.05$ 対健常群。

control：健常群 inflamed：腸炎群

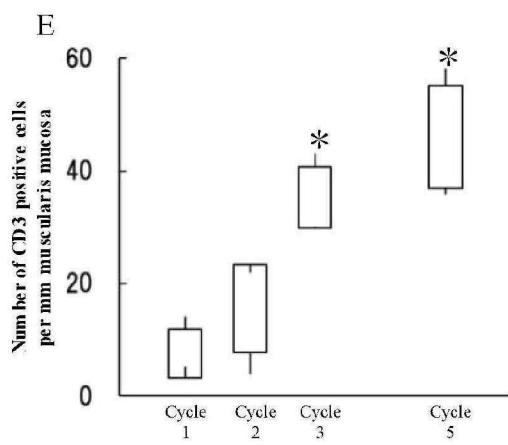
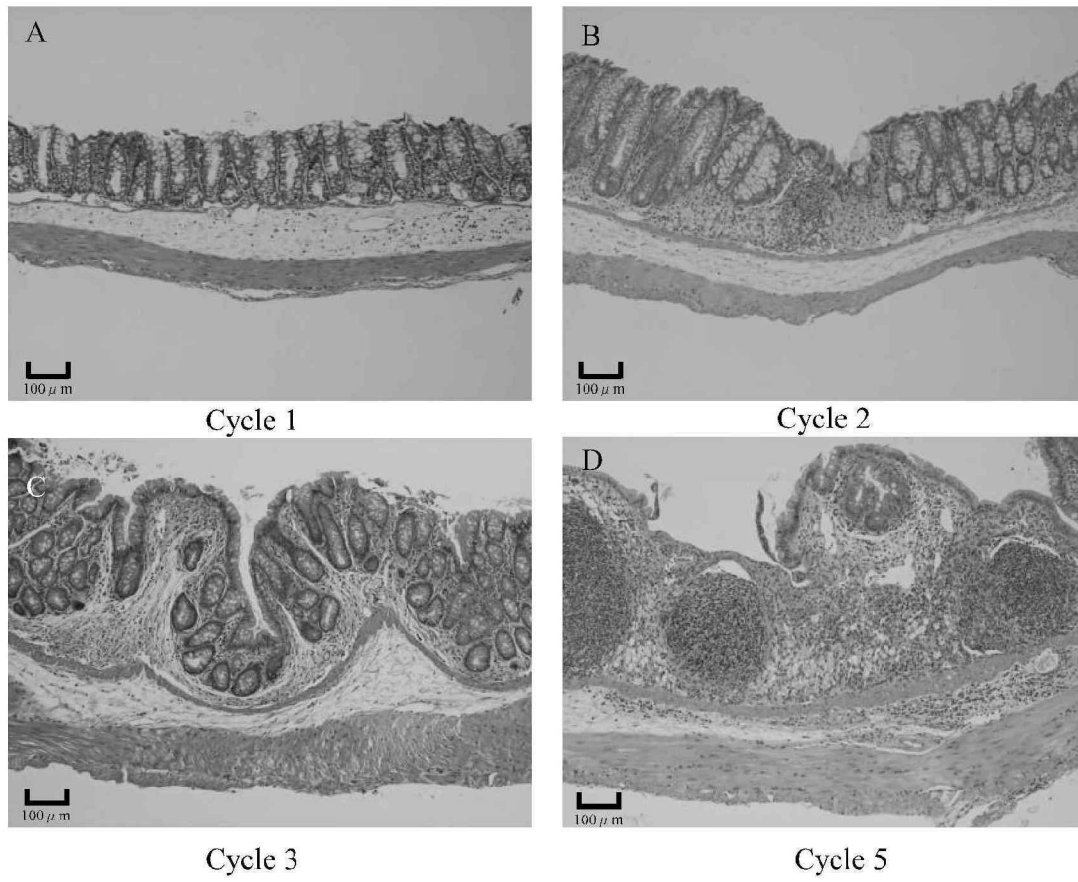
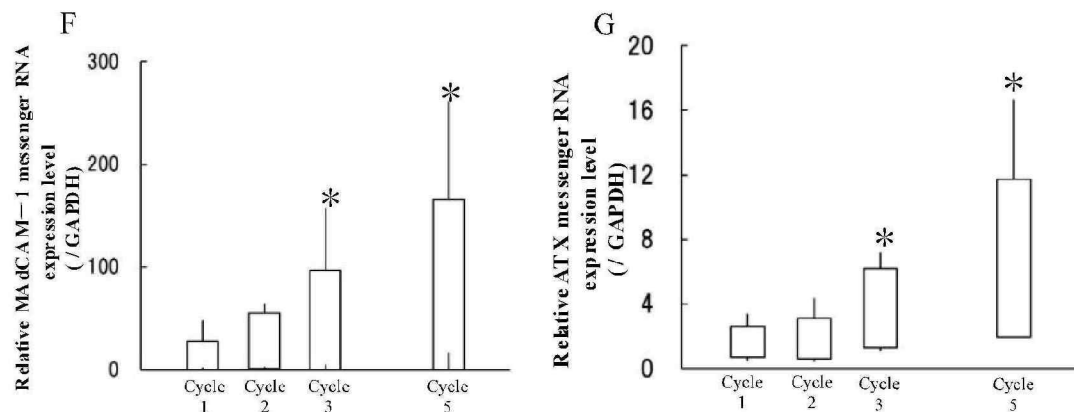


図 7



【図 7】 DSS 腸炎マウスにおける腸炎と ATX messenger RNA 発現との関連についての検討。

(A-D) 各サイクル (DSS 投与 1,2,3,5 サイクル後)の病理組織像

DSS 投与サイクルの進行に伴い、腸管壁の肥厚、細胞浸潤、陰窩の短縮など、炎症所見が顕著になっていった。

(E) 浸潤リンパ球数の比較

リンパ球数の計測の際には、CD3 陽性細胞をリンパ球とし、粘膜筋板 1mm 当たりの粘膜に浸潤する細胞数を計測した。DSS 投与サイクルの進行に伴い、浸潤リンパ球数は有意に増加傾向を示した。

* $p < 0.05$ 対 cycle 1 群。

(F): MAdCAM-1 messenger RNA 発現量の比較

腸炎の長期化に伴い、MAdCAM-1 messenger RNA 発現量は有意に増加傾向を示した。

* $p < 0.05$ 対 cycle 1 群。

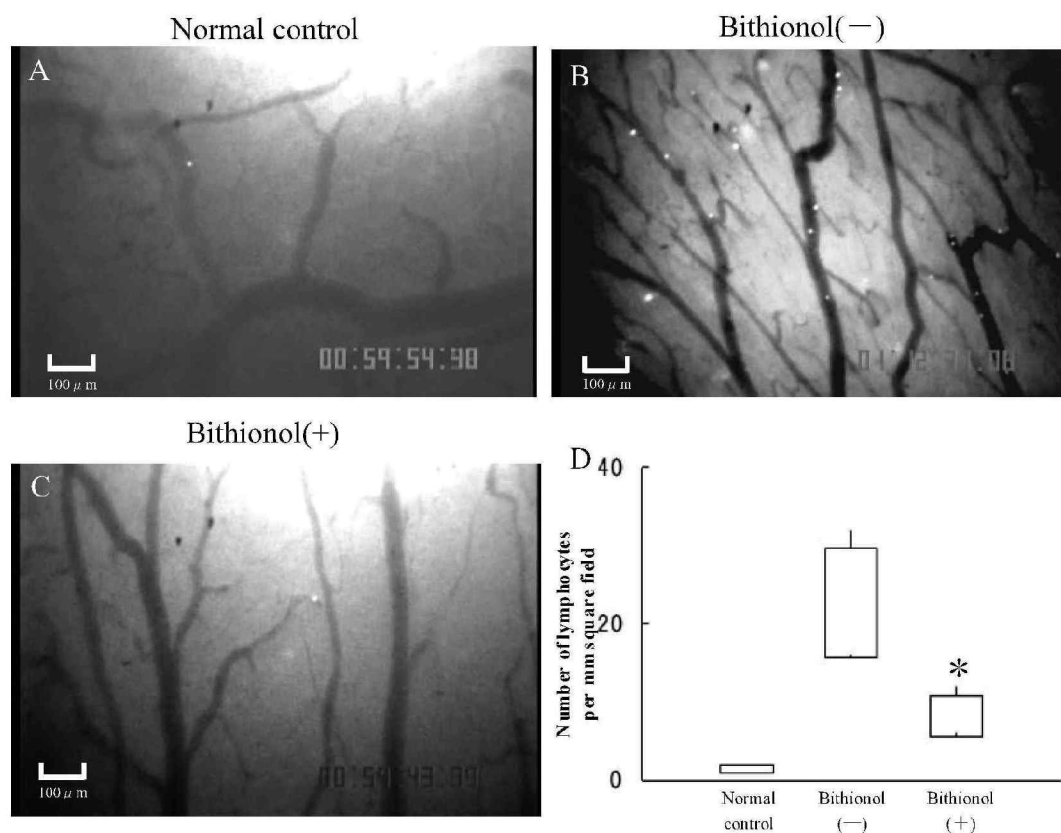
(G): ATX messenger RNA 発現量の比較

ATX messenger RNA 発現量は、腸炎の長期化に伴い有意に増加傾向を示した。

* $p < 0.05$ 対 cycle 1 群。

内因性コントロールには GAPDH を使用した。

統計学的分析には one-way ANOVA and a post hoc test を使用し、 p 値 0.05 未満を有意差ありとした。各データは平均値±標準誤差で表した（各群 $n=6$ ）。



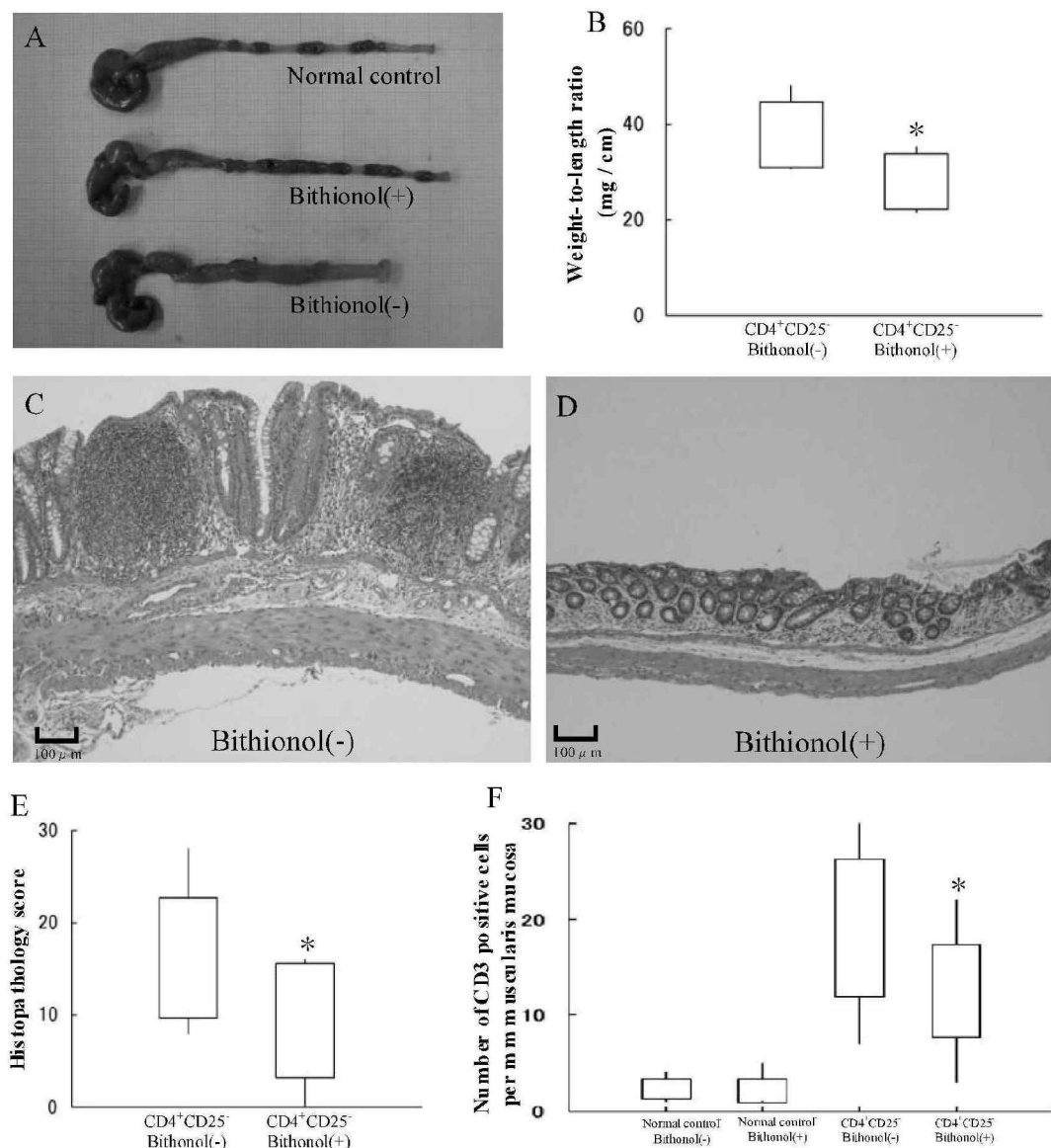
【図8】

(A-C) $CD4^+CD25^-$ T細胞移入SCIDマウスにおけるCFSE標識 Tリンパ球の腸管粘膜への浸潤に関する検討

健常群では、血管内皮への接着および血管外へマイグレーションするTリンパ球の数は極めて少ない (A)。 $CD4^+CD25^-$ T細胞移入SCIDマウスでは、多数のTリンパ球が血管内皮に接着し、血管外へマイグレーションしているのが認められた (B)。 Bithionolの投与により、リンパ球のマイグレーションは有意に抑制された (C、D)。

統計学的分析にはone-way ANOVA and a post hoc test を用い、p値0.05未満を有意差ありとした。各データは平均値±標準誤差で表した。

* $p < 0.05$ 対 Bithionol(-) 群。

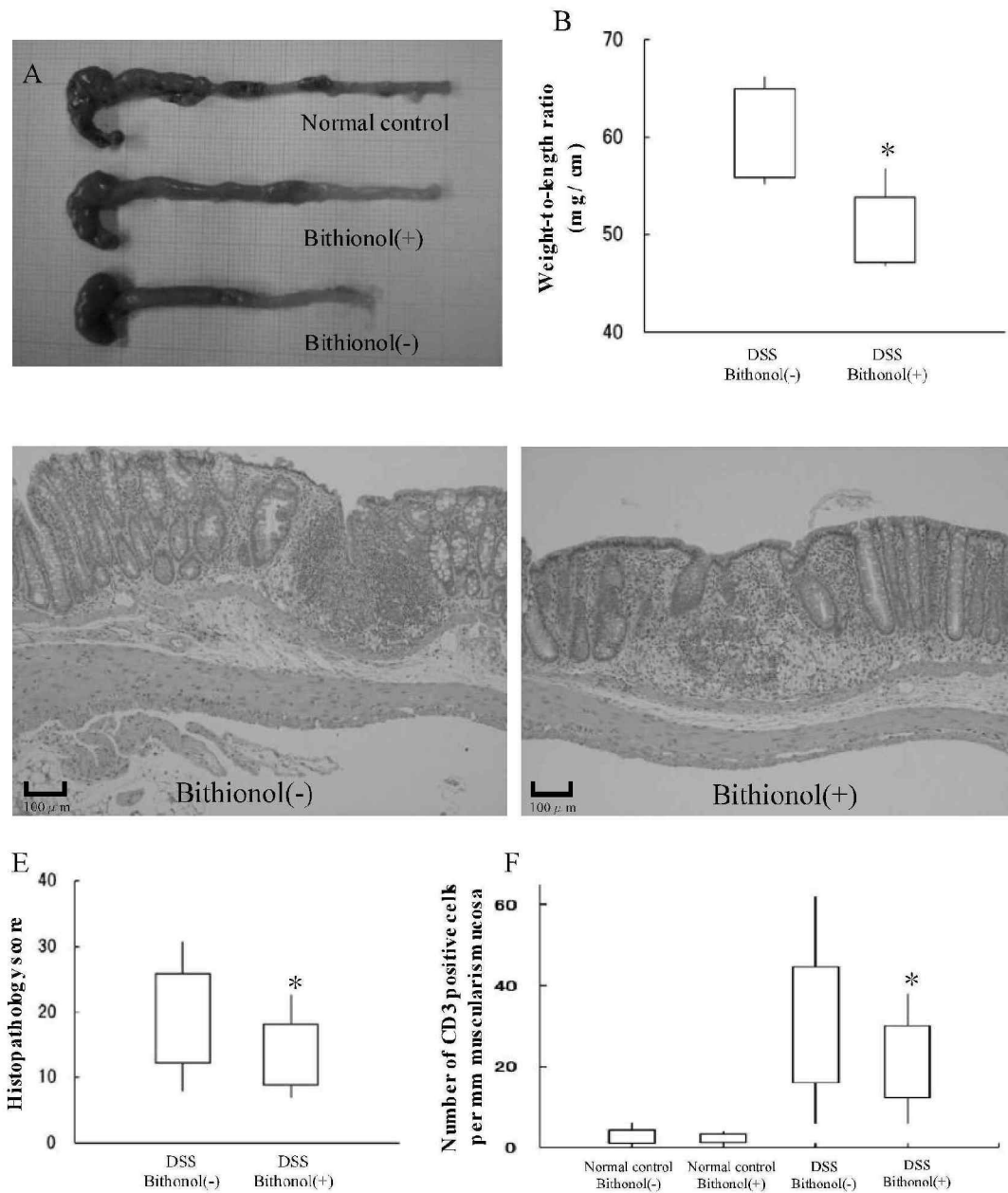


【図 9】Bithionol の CD4⁺CD25⁻ T 細胞移入 SCID マウスの腸管炎症に対する改善効果についての検討

Bithionol 投与により、腸管の短縮および壁肥厚は明らかに改善傾向を示し(A)、weight-to-length ratio (B) も改善を示した。組織学的にも CD4⁺CD25⁻ T細胞移入 SCIDマウスで見られた腸管壁の肥厚、陰窩の短縮、炎症細胞浸潤等の所見の有

意な改善を認め(C, D)、病理学的スコア(E)も改善した。また、Bithionol投与により腸炎群における浸潤リンパ球数は減少を示したが、健常群間ではBithionolによる浸潤リンパ球数に変化を認めなかった(F)。2群間の比較はMann-Whitney U-testを使用した。3群間以上の比較はone-way ANOVA and a post hoc testを使用した。いずれの検定においても、p値0.05未満を有意差ありとした。各データは平均値±標準誤差で表した。

* $p < 0.05$ 対 $CD4^{+}CD25^{-}$ - Bithionol(-) 群。



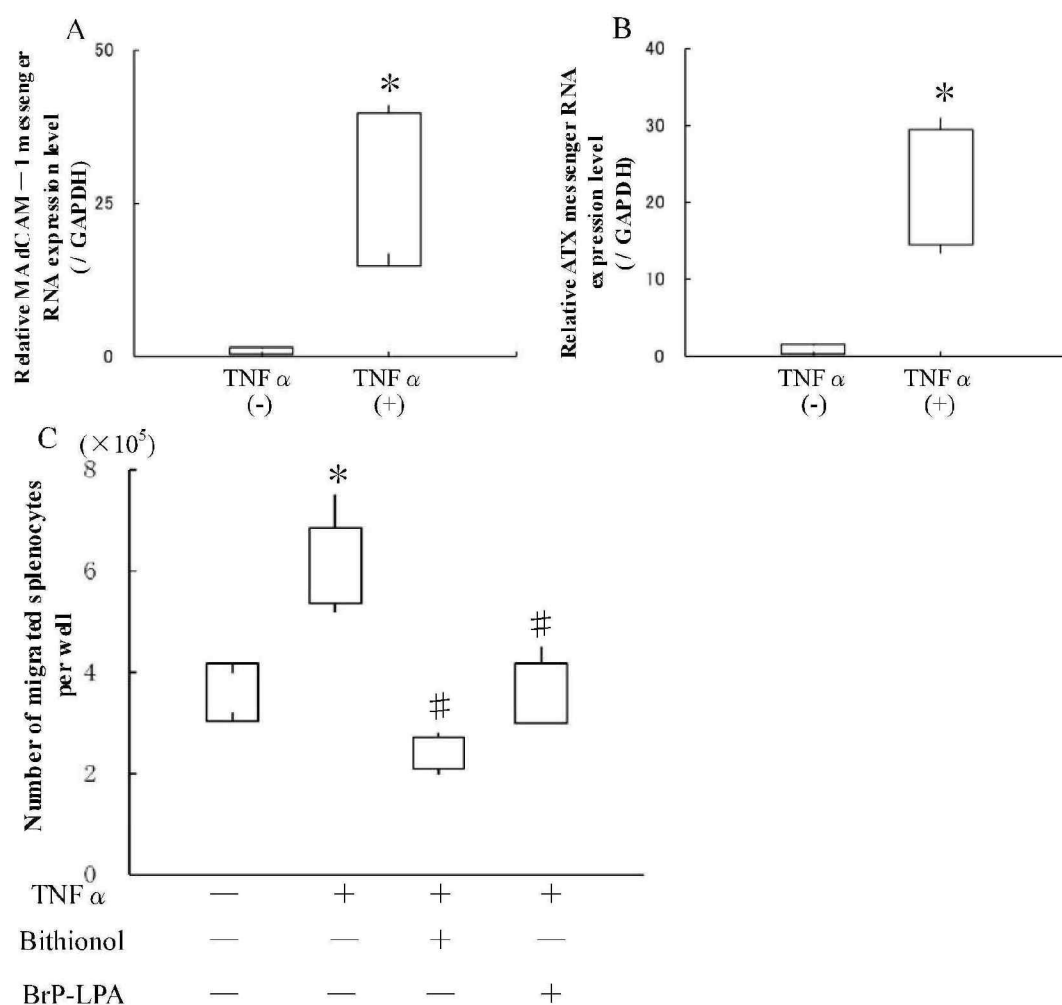
【図 10】 Bithionol の DSS 腸炎マウスの腸管炎症に対する改善効果についての検討

Bithionol 投与により、腸管の短縮および壁肥厚は明らかに改善傾向を示し(A)、weight-to-length ratio (B) も改善を示した。組織学的にも DSS 長期投与マウスで

見られた腸管壁の肥厚や炎症細胞浸潤等の所見の有意な改善を認め(図 10C, D)、病理学的スコア(E)も改善した。また、Bithionol 投与により腸炎群における浸潤リンパ球数は減少を示したが、健常群間では Bithionol による浸潤リンパ球数に変化を認めなかった(F)。

2 群間の比較は Mann-Whitney U-test を使用した。3 群間以上の比較は one-way ANOVA and a post hoc test を使用した。いずれの検定においても、p 値 0.05 未満を有意差ありとした。各データは平均値±標準誤差で表した。

* $p < 0.05$ 対 DSS - Bithionol(-) 群。



【図 11】 ATX 阻害剤のリンパ球マイグレーションへの抑制効果についての検討

(A) TNF α により活性化した bEnd.3 細胞では、通常の bEnd.3 細胞と比較して MAdCAM-1 messenger RNA の有意な発現亢進が認められた。

(B) TNF α の投与により、bEnd.3 細胞における ATX messenger RNA の発現量も同様に有意な亢進を認めた。

(C) Transendothelial cell migration assay では、TNF α の投与により、bEnd.3 細胞の層をマイグレーションする脾細胞の数は増加したが、Bithionol の投与により、このマイグレーションは有意に抑制された。BrP-LPA の投与でも、同様にマイ

グレーションは抑制された (C)。

内因性コントロールは GUS β を使用した。

2 群間の比較には Mann-Whitney U-test を使用した。各データは平均値 $\pm$ 標準誤差で表した。

* $p < 0.05$ 対 TNF α (-) 群。

$p < 0.05$ 対 TNF α (+)Bithionol(-)BrP-LPA(-) 群。