

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

レチノイド関連化合物の消化管免疫疾患への治療応用

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 土肥 多恵子

平成22(2010)年 5月

研究報告書目次

目 次	
I. 総括研究報告 レチノイド関連化合物の消化管免疫疾患への治療応用 土肥多恵子	3
II. 分担研究報告	
1. レチノイド関連化合物の免疫系に対する効果の解析 土肥多恵子	7
2. レチノイド関連化合物の合成 首藤 紘一	9
3. レチノイド関連化合物の消化管免疫疾患への治療応用 日比 紀文	11
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	13

厚生労働科学研究費補助金(創薬基盤推進研究事業)
総括研究報告書

レチノイド関連化合物の消化管免疫疾患への治療応用

研究代表者 土肥多恵子

独立行政法人国立国際医療センター研究所肝炎免疫研究センター消化器疾患研究部
部長

研究要旨 本研究は Am80 をはじめとする合成レチノイドの炎症性腸疾患をはじめとする免疫疾患への応用を促進することを目的としている。本年度は、まず AM80 のヒト免疫系に対する作用を解析した。AM80 存在下で分化誘導された樹状細胞は LPS 刺激時に IL-12 低産生であり、またナイーブ T 細胞を Th1 に誘導する能力も低下していた。このことは、Th1 反応が病態の主体をなすクローン病において Am80 が新たな治療薬となりうることを示唆する成績と考えられた。また、マウスでは Am80 が、放射線照射による上皮傷害からの粘膜保護作用を有するが明らかとなった。さらにレチノイド関連化合物の合成を進めるとともに、Am80 の投与方法を長期あるいは慢性の自己免疫疾患モデルで検討し、臨床に応用するための課題解決への重要な情報をえた。Am80 以外にも炎症治療に有効な合成レチノイドを得るため、関連化合物ライブラリーから、ケモカイン受容体シグナルによる Ca²⁺ 流入阻害活性によってスクリーニングを行い、8 種の候補化合物を得た。

A. 研究目的

レチノイドとはビタミン A と同等の活性を持つ化合物群、あるいはレチノイン酸受容体(RAR)に結合する化合物を示す。レチノイン酸は生体において細胞増殖・分化、形態形成など多様かつ重要な機能を持っている。特に近年制御性 T 細胞分化を司るなど、免疫・炎症応答における重要性が注目されている。分担研究者の首藤は、合成レチノイド Am80 を開発し、現在白血病治療薬として使用されている。

本研究は合成レチノイドの炎症性腸疾患をはじめとする免疫疾患への応用を促進することを目的とする。炎症性腸疾患の一つクローン病は慢性の非特異性腸管炎症をきたす原因不明の疾患であり、本邦でも若年者を中心に患者数が増加している。腹痛・下痢などの腹部症状や、食事制限のため、就業・学業などにも影響を及ぼす場合も少なくなく、原因究明・新たな治療薬の開発は急務であるといえる。近年の基礎・臨床両面からの精力的な研究の成果により、個体の遺伝子により規定される疾患感受性、食事や衛生状態などの環境因子、腸内細菌叢などが複雑に関与しあい、消化管粘膜における免疫過剰状態が病態の中心をなすことが解明されてきた。この過剰な免疫反応の中心にあるのが、サイトカ

インを産生するリンパ球やリンパ球の分化を制御する樹状細胞であり、これら細胞の機能を制御する薬剤の開発が多数開発中である。

本年度は Am80 の免疫系、特にヒトマクロファージへの作用を明らかにするとともに、消化管上皮細胞回転への影響も明らかにする。また、クローン病治療のための投与計画のための動物試験をすすめ、さらに副作用が少なく有効な新規合成レチノイド化合物の開発に向けて、新規誘導体の合成を行うとともに、レチノイド関連化合物ライブラリーから抗炎症作用を持つものを探索した。

B. 研究方法

1. Am80 以外の抗炎症作用を持つ合成レチノイドを探索するため、ケモカイン受容体発現細胞を作製し、そのリガンドで刺激し、Ca イオン流入を Flex Station (ABI) で測定した。このスクリーニング系に、乙卯研究所で合成されたレチノイド関連化合物を加え、Ca イオン流入阻害効果のある化合物を探索した。
2. Am80 を腹腔内投与した 1 日後に、マウスに 3Gy γ 線を照射し、1 及び 3 日後の回腸、空腸、大腸の炎症状態を Am80 の投与をしていないマウスと比較した。サンプリングの 1 時間前に BrdU を腹腔内投与して、増殖細胞

をラベルし、抗 BrdU 抗体による組織免疫染色を行ってクリプトあたりの分裂細胞数をカウントした。また、Tunel 法にて crypt あたりのアポトーシス細胞をカウントした。

3. レチノイン酸受容体サブクラス選択性において、従来の最良の化合物である Am80 よりも強く選択性を持つ化合物で消化器免疫疾患の治療により好ましいと見られる化合物を探索した。

4. 自己免疫疾患モデル NOD マウスを用いて Am80 の投与方法についての検討を行った。

5. 健常人由来の末梢血 CD14 陽性単球を granulocyte-macrophage colony stimulation factor(GM-CSF)20mg/ml と IL-4 20ng/ml により 6 日間培養し樹状細胞(DC)を分化誘導する系において、レチノイド化合物である Am80 の与える影響につき検討した。検討項目としては、①分化した樹状細胞の形態と表面抗原マーカー (FACS)、②LPS 刺激によるサイトカイン産生(ELISA 法ならびに CBA 法)やその mRNA 発現(real-time PCR 法)、③ Am80 添加にて分化した DC の抗原提示細胞としての機能を検討するため、ナイーブ T 細胞と共培養させる (allo mixed lymphocyte reaction)系におけるサイトカイン産生を細胞質内染色(intracellular cytokine staining; ICCS)、の 4 つに分けて検討した。

(倫理面への配慮)

本年度の研究は健常人末梢静脈血 10ml を検体として使用した。研究計画は、提供者の自由意志を尊重する方法で検体の提供を依頼し、侵襲は採血のみとし、解析にあたっては検体を匿名化する方法で立て、慶應義塾大学医学部の倫理委員会で承認されている

(2009-259 免疫担当細胞の分化誘導および機能制御に関する in vitro 研究)。動物実験は、動物愛護を十分配慮した計画を立て、該当施設での実験委員会の審査を受けて承認された後に行った。

C. 研究結果

1. ケモカイン受容体発現細胞を用いたスクリーニングの結果、現在のところ、 $2 \cdot 10 \mu\text{M}$ の濃度で、50%程度の阻害効果をもつ 8 種類の化合物が選択された。マウス腹腔マクロファージをリポポリサッカライドで刺激し、上清のサイトカイン分泌を測定する系をもちい、炎症性サイトカイン産生を抑制する活性があるかどうか、Am80 と比較しつつ検討している。現在のところいずれの化合物も TNF- α 産生の抑制傾向が見られている。

2. 放射線照射の 1 日後では、Am80 投与マウスの回腸と空腸において、非投与群に比べて BrdU 陽性細胞数の有意な増加が確認された。また、TUNEL によって検出されるアポトーシス細胞も減少する傾向があった。大腸ではその効果は統計学的有意差が見られた。

3. 化合物の探索の結果、4-[6a-methyl-5,6,6a,7,8,9-hexahydro-4H-2-phenarenyl]carbamoyl]benzoic acid の安息香酸部分の置換誘導体、特に F 誘導体をみいだした。

4. タミバロテンの連続経口 (混餌) 投与によって NOD マウスは発症が抑制されることを既に示している、今年度においては長期(18 週)の連続投薬(混餌投与)、1 週投薬 3 週休薬で 18 週飼育、8 週投薬のうち 10 週休薬の 3 グループの比較をおこなった。一日投与量は $1 \text{ mg} / \text{kg}$ (混餌)。結論は、Am80 の連続投与群は、18 週連続群も 8 週投与 10 週休薬群もともに、対照群に比して糖尿病の発症が抑制された。しかし、1 週投薬 3 週休薬群は、大変に意外なことに、糖尿病の発生頻度が非常に高く、半数が 16 週までに死亡した。連続投与群は 8 週も 18 週もいずれも膵臓、顎下腺におけるリンパ球浸潤の軽快がみられた。

5. ヒト末梢血細胞を用いた解析

①DC の形態と表面マーカー

Am80 で分化誘導した樹状細胞(Am80-DC)は通常の DC (cDC)が浮遊性であるのに対し、接着性を示すことや典型的な DC marker である CD1a を欠くなど、マクロファージと一部共通する性質を示した。

②LPS 刺激時のサイトカイン産生

Am80-DC では cDC と比較し IL-12p70, IL-12p40 の産生が抑制されることが確認された。TNF- α , IL-23 については低下傾向はあったものの、有意差は得られなかった。また、cDC を LPS で刺激する際に Am80 を添加しても、この IL-12 の抑制効果は認められなかった。

③ naïve CD4 細胞を用いた allo Mixed lymphocyte reaction の実験では、Am80-DC は Th1 細胞への誘導能が低下していた。

D. 考察

Am80 については、免疫系に対する抗炎症作用以外に、粘膜保護作用のあることが明らかとなった。上皮細胞傷害が見られる炎症性腸疾患に対してはこの作用はメリットが有ると考えられ、また、放射線照射や、抗癌剤知慮の際の副作用防止に応用できる可能性もある。Am80 以外の化合物についてもスクリーニングでヒットが見つかり、抗炎症作用も有

すると思われるので、それぞれの特徴、Am80との優位性が有るかどうかなどについて今後検討していく予定である。

新規化合物は好ましい標的とするRAR α に選択性が高く(RAR β の50倍、RAR γ の500倍。RXRにはほぼゼロ)、吸収排泄も良好とみられるので、動物での生物試験のために十分な量をうるための合成法の改良を進めている。

タミバロテン投与計画については、8週投与でもその効果は、さらに少なくとも10週は持続するという、いわば、治癒に近い効果をもつことを示した。

一方、不連続して長期投与をおこなうことには、実際の応用を考えた場合には避けたほうが良いかもしれないという重要な結果である。Am80はすでに臨床で用いられており、長期投与の臨床研究もおこなわれているが、投与間隔の設定には注意が喚起される。当然、クローン病の臨床治療の場合においても考慮されるべきで、投与は基本的に連続投与を採用するか、休薬は短期間にすべきであろうとおもわれる。

ヒト末梢血細胞を用いた本年度の研究結果より、RAシグナルは単球を低IL-12産生性、すなわち炎症惹起能の低い樹状細胞に分化させることが示された。また、典型的なDCマーカーを発現しておらず、形態的にもマクロファージと共通する性質を示した。LPS刺激は自然免疫を反映する実験系だが、Am-DCはそれのみならず、ナイーブT細胞のTh1への分化も抑制した。IFN- γ を中心とするTh1反応はクローン病の病態を特徴付けるものであり、前述のRAが直接T細胞にも働きかけるという報告とあわせ、自然免疫のみならず、獲得免疫の面からも広くTh1を抑制するという結果となった。また、Am80の効果は通常分化を遂げた樹状細胞には効果が見られず、前駆細胞である単球の樹状細胞への分化段階でのみ発揮された。これは、現在起っている炎症を強力に抑制することにより、クローン病で劇的な効果を挙げている抗TNF- α 抗体とはまったく異なる炎症抑制機序であり、維持療法としての可能性からも非常に興味深い。

F. 健康危険情報

なし

E. 結論

1. 合成レチノイド Am80 は消化管粘膜保護作用を有していた。レチノイド関連化合物ライブラリーから、Ca²⁺ 流入抑制活性によって

スクリーニングを行った結果、抗炎症作用を有する可能性のある候補化合物 8 種を得た。

2. 投与計画を判断するためNODマウスを用いた投与法の検討をすすめた。臨床における投与計画に考慮すべき結果を得た。

3. Am80 存在下で分化誘導された樹状細胞は LPS 刺激時に IL-12 低産生であり、またナイーブ T 細胞を Th1 に誘導する能力も低下していた。このことは、Th1 反応が病態の主体をなすクローン病において Am80 が新たな治療薬となりうることを示唆する成績と考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Dohi T, Borodovsky A, Wu P, Shearstone JR, Kawashima R, Runkel L, Rajman L, Dong X, Scott ML, Michaelson JS, Jakubowski A, and Burkly LC, TWEAK/Fn14 Pathway: a nonredundant role in intestinal damage in mice through a TWEAK/ intestinal epithelial cell axis *Gastroenterology*, 136:912-923, 2009
2. 土肥多恵子 TWEAK/Fn14 経路の炎症と組織修復における意義。「感染・炎症・免疫」第39巻 第3号, 62-64, 2009
3. 土肥多恵子 腹膜癒着を引き起こす、腹腔マクロファージの特異的ケモカイン応答臨床免疫・アレルギー科 51(2):168-173, 2009
4. Kawahara K, Nishi K, Suenobu M, Ohtsuka H, Maeda A, Nagatomo K, Kuniyasu A, Staufenbiel M, Nakagomi M, Shudo K, Nakayama H. Oral administration of synthetic retinoid Am80 (Tamibarotene) decreases brain beta-amyloid peptides in APP23 mice. *Biol Pharm Bull.* 2009 Jul;32(7):1307-9.
5. Katsuki H, Kurimoto E, Takemori S, Kurauchi Y, Hisatsune A, Isohama Y, Izumi Y, Kume T, Shudo K, Akaike A. Retinoic acid receptor stimulation protects midbrain dopaminergic neurons from inflammatory degeneration via BDNF-mediated signaling. *J Neurochem.* 2009 Jul;110(2):707-18. 2009
6. Klemann C, Raveney BJ, Klemann AK, Ozawa T, von Hörsten S, Shudo K, Oki S, Yamamura T. Synthetic retinoid AM80 inhibits Th17 cells and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Am J Pathol.* 2009 Jun;174(6):2234-45. 2009
7. Takenaga M, Ohta Y, Tokura Y, Hamaguchi A, Shudo K, Okano H, Igarashi R. The effect of Am-80, a synthetic retinoid, on spinal cord injury-induced motor dysfunction in rats. *Biol Pharm Bull.* 2009 32(2):225-31.

8. Miwako I, Shudo K. Oral administration of synthetic retinoid Am80 inhibits the development of type 1 diabetes in non-obese diabetic (NOD) mice. *Biol Pharm Bull.* 2009 Jan;32(1):157-9.
9. Takada Y, Hisamatsu T, Kamada N, Kitazume MT, Honda H, Oshima Y, Saito R, Takayama T, Kobayashi T, Chinen H, Mikami Y, Kanai T, Okamoto S, Hibi T. Monocyte chemoattractant protein-1 contributes to gut homeostasis and intestinal inflammation by composition of IL-10-producing regulatory macrophage subset. *J Immunol.* 1;184(5):2671-6, 2010.
10. Kamada N, Hisamatsu T, Honda H, Kobayashi T, Chinen H, Takayama T, Kitazume MT, Okamoto S, Koganei K, Sugita A, Kanai T, Hibi T. TL1A produced by lamina propria macrophages induces Th1 and Th17 immune responses in cooperation with IL-23 in patients with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.*;16(4):568-75, 2010.
11. Sakuraba A, Sato T, Kamada N, Kitazume M, Sugita A, Hibi T. Th1/Th17 immune response is induced by mesenteric lymph node dendritic cells in Crohn's disease. *Gastroenterology* 137(5):1736-45, 2009.
12. Kamada N, Hisamatsu T, Honda H, Kobayashi T, Chinen H, Kitazume MT, Takayama T, Okamoto S, Koganei K, Sugita A, Kanai T, Hibi T. Human CD14+ macrophages in intestinal lamina propria exhibit potent antigen-presenting ability. *J Immunol.* 1;183(3):1724-31, 2009
13. Wada Y, Hisamatsu T, Kamada N, Okamoto S, Hibi T. Retinoic acid contributes to the induction of IL-12-hypoproducing dendritic cells. *Inflamm Bowel Dis.* 15(10):1548-56, 2009
2. 学会発表
1. 土肥多恵子, マウス腸炎モデルにおける上皮細胞由来 TNF-スーパーファミリー分子の意義 日本消化器免疫学会シンポジウム 2009年7月24日 松山
2. Dohi T, Kawashima R, Burkly LC. Role of TWEAK (TNF- α -Like Weak Inducer of Apoptosis) in Intestinal Inflammation and Tissue Repair. Selected as Poster of distinction, Digestive Disease Week 2009, Chicago, May 31, 2009
3. 土肥多恵子, Linda C. Burkly. TWEAK/Fn14 経路による消化管自然免疫応答 パネルディスカッション11 自然免疫と消化管 第51回日本消化器病学会大会, 京都, 2009年10月15日
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

厚生労働科学研究費補助金(創薬基盤推進研究事業)
分担研究報告書

レチノイド関連化合物の免疫系に対する効果の解析

研究分担者 土肥多恵子

独立行政法人国立国際医療センター研究所肝炎免疫研究センター消化器疾患研究部
部長

研究要旨 レチノイドとはビタミンAと同等の活性を持つ化合物群、あるいはレチノイン酸受容体(RAR)に結合する化合物を示す。本研究では合成レチノイドAm80の消化管粘膜保護作用について検討した。また、Am80以外にも抗炎症作用を有する化合物を得るため、レチノイド関連化合物ライブラリーから、Ca²⁺流入抑制活性によってスクリーニングを行った。その結果、現在8種の候補化合物を得た。現在マクロファージを用いてその作用を検証中である。

A. 研究目的

合成レチノイドの炎症性腸疾患をはじめとする免疫疾患への応用を促進することを目的とする。レチノイドとはビタミンAと同等の活性を持つ化合物群、あるいはレチノイン酸受容体(RAR)に結合する化合物を示す。レチノイン酸は生体において細胞増殖・分化、形態形成など多様かつ重要な機能を持っている。分担研究者の首藤によって開発された合成レチノイドAm80は白血病治療薬として使用されているが、本研究ではAm80の免疫系、特にマクロファージへの作用を明らかにするとともに、消化管上皮細胞回転への影響も明らかにする。さらに、より副作用が少なく有効な新規合成レチノイド化合物をライブラリーから探索する。

B. 研究方法

1. Am80以外の抗炎症作用を持つ合成レチノイド度を探索するためケモカイン受容体発現細胞を作製し、そのリガンドで刺激し、Caイオン流入をFlex Station (ABI)で測定した。このスクリーニング系に、乙卯研究所で合成されたレチノイド関連化合物を加え、Caイオン流入阻害効果のある化合物を探索した。

2. Am80の上皮細胞回転への影響を解明するため、Am80を腹腔内投与した1日後に、マウスに3Gy g線を照射し、1及び3日後の回腸、空腸、大腸の炎症状態をAM80の投与をしていないマウスと比較した。サンプリングの1時間前にBrdUを腹腔内投与して、増

殖細胞をラベルし、抗BrdU抗体による組織免疫染色を行ってクリプトあたりの分裂細胞数をカウントした。また、Tunel法にてcryptあたりのアポトーシス細胞をカウントした。

(倫理面への配慮)

動物実験は、動物愛護を十分配慮した計画を立て、該当施設での実験委員会の審査を受けて承認された後に行った。

C. 研究結果

1. 放射線照射の1日後では、AM80投与マウスの回腸と空腸において、非投与群に比べてBrdU陽性細胞数の有意な増加が確認された。また、TUNELによって検出されるアポトーシス細胞も減少する傾向があった。大腸ではその効果は統計学的有意差が見られた。

2. ケモカイン受容体発現細胞を用いたスクリーニングの結果、現在のところ、2・10 μ Mの濃度で、50%程度の阻害効果をもつ8種類の化合物が選択された。マウス腹腔マクロファージをリポポリサッカライドで刺激し、上清のサイトカイン分泌を測定する系をもちい、炎症性サイトカイン産生を抑制する活性があるかどうか、Am80と比較しつつ検討している。現在のところいずれの化合物もTNF- α 産生抑制傾向が見られている。

D. 考察

Am80については、免疫系に対する抗炎症作用以外に、粘膜保護作用のあることが明らかとなった。上皮細胞傷害が見られる炎症性腸疾

患に対してはこの作用はメリットが有ると考えられ、また、放射線照射や、抗癌剤知慮鵜の際の副作用防止に応用できる可能性もある。Am80以外の化合物についてもスクリーニングでヒットが見つかり、抗炎症作用も有すると思われるので、それぞれの特徴、Am80との優位性が有るかどうか等について今後検討していく予定である。

F. 健康危険情報

なし

E. 結論

合成レチノイドAm80は消化管粘膜保護作用を有していた。レチノイド関連化合物ライブラリーから、Ca²⁺流入抑制活性によってスクリーニングを行った結果、抗炎症作用を有する可能性のある候補化合物8種を得た。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Dohi, T, Borodovsky A, Wu P, Shearstone JR, Kawashima R, Runkel L, Rajman L, Dong X, Scott ML, Michaelson JS, Jakubowski A, and Burkly LC, TWEAK/Fn14 Pathway: a nonredundant role in intestinal damage in mice through a TWEAK/intestinal epithelial cell axis *Gastroenterology*, 136:912-923, 2009

2. 土肥多恵子 TWEAK/Fn14経路の炎症と組織修復における意義。「感染・炎症・免疫」第39巻 第3号, 62-64, 2009

3. 土肥多恵子 腹膜癒着を引き起こす、腹腔マクロファージの特異的ケモカイン応答臨床免疫・アレルギー科 51(2):168-173, 2009

2. 学会発表

1. 土肥多恵子, マウス腸炎モデルにおける上皮細胞由来 TNF-スーパーファミリー分子の意義 日本消化器免疫学会シンポジウム 2009年7月24日 松山

2. Dohi T, Kawashima R, Burkly LC. Role of TWEAK (TNF- α -Like Weak Inducer of Apoptosis) in Intestinal Inflammation and Tissue Repair. Selected as *Poster of distinction*, Digestive Disease Week 2009, Chicago, May 31, 2009

3. 土肥多恵子、Linda C. Burkly. TWEAK/Fn14経路による消化管自然免疫応答 パネルディスカッション11 自然免疫と消化管 第51回日本消化器病学会大会, 京都、2009年10月15日

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金(創薬基盤推進研究事業)
分担研究報告書

レチノイド関連化合物の合成

研究分担者 首藤 紘一 財団法人乙卯研究所 所長

研究要旨 本課題研究において、タミバロテン (Am80) がクローン病の種々の動物モデルにおいて治療効果を示すことをあきらかにしてきたが、投与方法、特に長期投与が連続的がよいか、間歇的がよいかに関してのデータがなく、臨床への応用において、解決が求められる大きな問題である。このため長期あるいは慢性の自己免疫疾患モデルでの投与方法の検討を計画した。タミバロテンによるクローン病治療のための投与計画のための動物試験をすすめ、臨床に応用するための課題解決への重要な情報をえた

A. 研究目的

白血病治療薬として承認されているAM80(タミバロテン)開発の実績に基づき、タミバロテンによるクローン病治療のための投与計画のための動物試験をすすめる。また、Am80の他にも、抗炎症作用を有する新規レチノイドを合成し、開発をめざす。

B. 研究方法

1. レチノイン酸受容体サブクラス選択性において、従来の最良の化合物であるAm80よりも強く選択性を持つ化合物で消化器免疫疾患の治療により好ましいと見られる化合物を探索した。
2. 自己免疫疾患モデルNODマウスAm80の投与方法についての検討を行った。

C. 研究結果

化合物の探索の結果、4-[6a-methyl-5,6,6a,7,8,9-hexahydro-4H-2-phenarenyl]carbamoyl]benzoic acidの安息香酸部分の置換誘導体、特にF誘導体をみいだした。

NODマウスは膵臓や唾液腺がかかわる自己免疫疾患を発症する病態マウスであるが、長期飼育によって自然発症するという点において、基本的な長期慢性の自己免疫疾患のモデルとして薬剤の評価に用いることができる。すでに、タミバロテンの連続経口(混餌)投与によってNODマウスは発症が抑制されることを示したが、今年度においては長期(18週)の連続投薬(混餌投与)、1週投薬3週休薬で18週飼育、8週投薬のち10週休薬の3グループの比較をおこなった。一日投与量は1mg/kg(混餌)。結論は、Am80の連続投与群は、18週連続群も8週投与10週休薬群もともに、対照群に比して

糖尿の発症が抑制された。しかし、1週投薬3週休薬群は、大変に意外なことに、糖尿の発生頻度が非常に高く、半数が16週までに死亡した。連続投与群は8週も18週もいずれも膵臓、顎下腺におけるリンパ球浸潤の軽快がみられた。

D. 考察

新規化合物は好ましい標的とするRAR α に選択性が高く(RAR β の50倍、RAR γ の500倍。RXRにはほぼゼロ)、吸収排泄も良好とみられるので、動物での生物試験のために十分な量をうるための合成法の改良を進めている。

タミバロテン投与計画については、8週投与でもその効果は、さらに少なくとも10週は持続するという、いわば、治癒に近い効果をもつことを示した。一方、不連続して長期投与をおこなうことには、実際の応用を考えた場合には避けたほうが良いかもしれないという重要な結果である。間隔の検討が必要であるものの、長期間歇を含む投与が病態を悪化させることは、タミバロテン中止がリバウンドによる内生のレチノイン酸の異常産生、あるいは受容体特にRAR γ の異常産生の繰り返しが原因ではないかと推察している。タミバロテンはすでに臨床で用いられており、長期投与の臨床研究もおこなわれているが、投与間隔の設定には注意が喚起される。当然、クローン病の臨床治療の場合においても考慮されるべきで、投与は基本的に連続投与を採用するか、休薬は短期間にすべきであろうとおもわれる。

E. 結論

投与計画を判断するためNODマウスを用いた投与方法の検討をすすめた。臨床における投与計画に考慮すべき結果を得た。

G. 研究発表

1. Kawahara K, Nishi K, Suenobu M, Ohtsuka H, Maeda A, Nagatomo K, Kuniyasu A, Staufenbiel M, Nakagomi M, Shudo K, Nakayama H. Oral administration of synthetic retinoid Am80 (Tamibarotene) decreases brain beta-amyloid peptides in APP23 mice. *Biol Pharm Bull.* 2009 Jul;32(7):1307-9.
2. Katsuki H, Kurimoto E, Takemori S, Kurauchi Y, Hisatsune A, Isohama Y, Izumi Y, Kume T, Shudo K, Akaike A. Retinoic acid receptor stimulation protects midbrain dopaminergic neurons from inflammatory degeneration via BDNF-mediated signaling. *J Neurochem.* 2009 Jul;110(2):707-18. 2009
3. Klemann C, Raveney BJ, Klemann AK, Ozawa T, von Hörsten S, Shudo K, Oki S, Yamamura T. Synthetic retinoid AM80 inhibits Th17 cells and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Am J Pathol.* 2009 Jun;174(6):2234-45. 2009
4. Takenaga M, Ohta Y, Tokura Y, Hamauchi A, Shudo K, Okano H, Igarashi R. The effect of Am-80, a synthetic retinoid, on spinal cord injury-induced motor dysfunction in rats. *Biol Pharm Bull.* 2009 Feb;32(2):225-31.
5. Miwako I, Shudo K. The effect of Oral administration of synthetic retinoid Am 80 inhibits the development of type 1 diabetes in non-obese diabetic (NOD) mice *Biol Pharm Bull.* 2009 Jan;32(1):157-9.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

厚生労働科学研究費補助金(創薬基盤推進研究事業)
分担研究報告書

レチノイド関連化合物の消化管免疫疾患への治療応用

研究分担者 日比 紀文
慶應義塾大学医学部内科学 教授

研究要旨 近年、RA(retinoic acid)シグナルの炎症抑制効果が解明されつつある。本研究では、急性前骨髄性白血病にすでに臨床応用されている Am80 を用い、RA のクローン病の新規治療薬としての可能性を樹状細胞の機能制御の面から検討した。健康人由来の末梢血中単球を Am80 存在下で分化させると、IL-12 低産生の樹状細胞が誘導された。またこの樹状細胞は、ナイーブ T 細胞を Th1 へ誘導する能力も低下していた。この成績は、Am80 が自然免疫・獲得免疫の両面から樹状細胞に影響を与え、クローン病の病態の中心をなす Th1 反応を抑制する効果を持つことを示すものと考えられる。

A. 研究目的

厚生労働省の特定疾患のひとつであるクローン病は慢性の非特異性腸管炎症をきたす原因不明の疾患であり、本邦でも若年者を中心に患者数が増加している。腹痛・下痢などの腹部症状や、食事制限のため、就業・学業などにも影響を及ぼす場合も少なくなく、原因究明・新たな治療薬の開発は急務であるといえる。近年の基礎・臨床両面からの精力的な研究の成果により、個体の遺伝子により規定される疾患感受性、食事や衛生状態などの環境因子、腸内細菌叢などが複雑に関与しあい、消化管粘膜における免疫過剰状態が病態の中心をなすことが解明されてきた。この過剰な免疫反応の中心にあるのが、サイトカインを産生するリンパ球やリンパ球の分化を制御する樹状細胞であり、これら細胞の機能を制御する薬剤の開発が多数開発中である。本研究では近年、細胞分化や炎症性シグナルに影響を及ぼす効果が解明されつつあるビタミンAシグナルに注目し、*in vitro* 実験の成果を踏まえ、臨床研究を通じた新たなクローン病治療薬としての可能性まで追求する。

B. 研究方法

健康人由来の末梢血 CD14 陽性単球を granulocyte-macrophage colony stimulation factor(GM-CSF)20mg/ml と IL-4 20ng/ml により 6 日間培養し樹状細胞(DC) を分化誘導する系において、レチノイド化合物である

Am80 の与える影響につき検討した。検討項目としては、①分化した樹状細胞の形態と表面抗原マーカー (FACS)、②LPS 刺激によるサイトカイン産生(ELISA 法ならびに CBA 法)やその mRNA 発現(real-time PCR 法)、③ Am80 添加にて分化した DC の抗原提示細胞としての機能を検討するため、ナイーブ T 細胞と共培養させる (allo Mixed lymphocyte reaction) 系におけるサイトカイン産生を細胞質内染色 (intracellular cytokine staining; ICCS)、の 4 つに分けて検討した。

(倫理面への配慮)

本年度の研究は健康人末梢静脈血 10ml を検体として使用した。本研究は慶應義塾大学医学部の倫理委員会で承認されており (2009-259 免疫担当細胞の分化誘導および機能制御に関する *in vitro* 研究)、提供者の自由意志の尊重、検体匿名化は徹底しており、また侵襲も採血のみであることから、倫理面には十分配慮している。

C. 研究結果

①DCの形態と表面マーカー

まずは、Am80の至適濃度を決定するため、1,10,100nM, 1 mmの濃度で培養後のviabilityを検討した。1mmではcell viabilityの低下が見られたため、以後の実験は100nMの濃度を中心に行った。Am80で分化誘導した樹状細胞(Am80-DC)は通常のDC (cDC)が浮遊性であるのに対し、接着性を示すことや典型的な

DC-markerであるCD1aを欠くなど、マクロファージと一部共通する性質を示した。

②LPS刺激時のサイトカイン産生

Am80-DCではcDCと比較しIL-12p70, IL-12p40の産生が抑制されることが確認された。TNF- α , IL-23については低下傾向はあったものの、有意差は得られなかった。また、cDCをLPSで刺激する際にAm80を添加しても、このIL-12の抑制効果は認められなかった。

③naïve CD4細胞を用いたallo Mixed lymphocyte reactionの実験では、Am80-DCはTh1細胞への誘導能が低下していた。

D. 考察

レチノールの代謝物であるRA (retinoic acid) は、免疫機能の調整に重要な働きをしており、T細胞においてT helper (Th) 1細胞への分化抑制 (Iwata M., *Int Immunol*, 2003)、T細胞におけるgut-homing receptorsの発現強化(Iwata M., *Immunity*, 2004)、またtight-junction proteinsの発現を誘導することで、腸管上皮細胞のバリア機能を強めることが報告されている(Osanai M., *Mol Pharmacol*, 2007)。さらに近年、RAが制御性T細胞(regulatory T-cell; Treg)を誘導するという報告(Boehmer H.V., *J Exp Med*, 2007 Kang S., *J Immunol*, 2007)もされていることから、RAは腸管免疫系に深く関与していると考えられているが、抗原提示細胞であるDC分化におけるRAの役割についてはほとんど知られていなかった。本年度の研究結果より、RAシグナルは単球を低IL-12産生性、すなわち炎症惹起能の低い樹状細胞に分化させることが示された。また、典型的なDCマーカーを発現しておらず、形態的にもマクロファージと共通する性質を示した。LPS刺激は自然免疫を反映する実験系だが、Am-DCはそれのみならず、ナイーブT細胞のTh1への分化も抑制した。IFN- γ を中心とするTh1反応はクローン病の病態を特徴付けるものであり、前述のRAが直接T細胞にも働きかけるという報告とあわせ、自然免疫のみならず、獲得免疫の面からも広くTh1を抑制するという結果となった。また、Am80の効果は通常の分化を遂げた樹状細胞には効果が見られず、前駆細胞である単球の樹状細胞への分化段階でのみ発揮された。これは、現在起こっている炎症を強力に抑制することにより、クローン病で劇的な効果を挙げている抗TNF- α 抗体とはまったく異なる炎症抑制機序であり、維持療法とし

での可能性からも非常に興味深い。

E. 結論

AM80存在下で分化誘導された樹状細胞はLPS刺激時にIL-12低産生であり、またナイーブT細胞をTh1に誘導する能力も低下していた。このことは、Th1反応が病態の主体をなすクローン病においてAm80が新たな治療薬となりうることを示唆する成績と考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Takada Y, Hisamatsu T, Kamada N, Kitazume MT, Honda H, Oshima Y, Saito R, Takayama T, Kobayashi T, Chinen H, Mikami Y, Kanai T, Okamoto S, Hibi T. Monocyte chemoattractant protein-1 contributes to gut homeostasis and intestinal inflammation by composition of IL-10-producing regulatory macrophage subset. *J Immunol*. 2010 1;184(5):2671-6.
2. Kamada N, Hisamatsu T, Honda H, Kobayashi T, Chinen H, Takayama T, Kitazume MT, Okamoto S, Koganei K, Sugita A, Kanai T, Hibi T. TL1A produced by lamina propria macrophages induces Th1 and Th17 immune responses in cooperation with IL-23 in patients with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2010;16(4):568-75.
3. Sakuraba A, Sato T, Kamada N, Kitazume M, Sugita A, Hibi T. Th1/Th17 immune response is induced by mesenteric lymph node dendritic cells in Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2009;137(5):1736-45.
4. Kamada N, Hisamatsu T, Honda H, Kobayashi T, Chinen H, Kitazume MT, Takayama T, Okamoto S, Koganei K, Sugita A, Kanai T, Hibi T. Human CD14+ macrophages in intestinal lamina propria exhibit potent antigen-presenting ability. *J Immunol*. 2009 1;183(3):1724-31.
5. Wada Y, Hisamatsu T, Kamada N, Okamoto S, Hibi T. Retinoic acid contributes to the induction of IL-12-hypoproducing dendritic cells. *Inflamm Bowel Dis*. 2009;15(10):1548-56.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Dohi T, Borodovsky A, Wu P, Shearstone JR, Kawashima R, Runkel L, Rajman L, Dong X, Scott ML, Michaelson JS, Jakubowski A, and Burkly LC	TWEAK/Fn14 Pathway: a nonredundant role in intestinal damage in mice through a TWEAK/ intestinal epithelial cell axis	Gastroenterology	136	912-923	2009
土肥多恵子	TWEAK/Fn14 経路の炎症と 組織修復における意義。	「感染・炎症・ 免疫」	第 39 巻 第 3 号	62-64	2009
土肥多恵子	腹膜癒着を引き起こす、腹腔 マクロファージの特異的ケ モカイン応答	臨床免疫・アレ ルギー科	51(2)	168-173	2009
Kawahara K, Nishi K, Suenobu M, Ohtsuka H, Maeda A, Nagatomo K, Kuniyasu A, Staufenbiel M, Nakagomi M, Shudo K, Nakayama H.	Oral administration of synthetic retinoid Am80 (Tamibarotene) decreases brain beta-amyloid peptides in APP23 mice.	Biol Pharm Bull.	32(7)	1307-9	2009
Katsuki H, Kurimoto E, Takemori S, Kurauchi Y, Hisatsune A, Isohama Y, Izumi Y, Kume T, Shudo K, Akaike A.	Retinoic acid receptor stimulation protects midbrain dopaminergic neurons from inflammatory degeneration via BDNF-mediated signaling.	J Neurochem.	110(2)	707-18	2009
Klemann C, Raveney BJ, Klemann AK, Ozawa T, von Hörsten S, Shudo K, Oki S, Yamamura T.	Synthetic retinoid AM80 inhibits Th17 cells and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis.	Am J Pathol.	174(6)	2234-45.	2009
Takenaga M, Ohta Y, Tokura Y, Hamaguchi A, Shudo K, Okano H, Igarashi R.	The effect of Am-80, a synthetic retinoid, on spinal cord injury-induced motor dysfunction in rats.	Biol Pharm Bull.	32(2)	225-31.	2009

Miwako I, Shudo K.	Oral administration of synthetic retinoid Am80 inhibits the development of type 1 diabetes in non-obese diabetic (NOD) mice	Biol Pharm Bull.	32(1)	157-9.	2009
Takada Y, Hisamatsu T, Kamada N, Kitazume MT, Honda H, Oshima Y, Saito R, Takayama T, Kobayashi T, Chinen H, Mikami Y, Kanai T, Okamoto S, Hibi T.	Monocyte chemoattractant protein-1 contributes to gut homeostasis and intestinal inflammation by composition of IL-10-producing regulatory macrophage subset.	J Immunol.	184(5)	2671-6,	2010.
Kamada N, Hisamatsu T, Honda H, Kobayashi T, Chinen H, Takayama T, Kitazume MT, Okamoto S, Koganei K, Sugita A, Kanai T, Hibi T.	TL1A produced by lamina propria macrophages induces Th1 and Th17 immune responses in cooperation with IL-23 in patients with Crohn's disease.	Inflamm Bowel Dis.	16(4)	568-75	2010.
Sakuraba A, Sato T, Kamada N, Kitazume M, Sugita A, Hibi T	Th1/Th17 immune response is induced by mesenteric lymph node dendritic cells in Crohn's disease.	Gastroenterology	137(5)	1736-45	2009.
Kamada N, Hisamatsu T, Honda H, Kobayashi T, Chinen H, Kitazume MT, Takayama T, Okamoto S, Koganei K, Sugita A, Kanai T, Hibi T.	Human CD14+ macrophages in intestinal lamina propria exhibit potent antigen-presenting ability.	J Immunol.	183(3)	1724-31	2009
Wada Y, Hisamatsu T, Kamada N, Okamoto S, Hibi T.	Retinoic acid contributes to the induction of IL-12-hypoproducing dendritic cells.	Inflamm Bowel Dis	15(10)	1548-56	2009

