

201009010A

別添1

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22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 土肥 多恵子

平成23(2011)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研究センター研究所・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を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。本年度はマウス粘膜傷害モデルにおいて、Am80が、粘膜上皮細胞に対してアポトーシス抑制作用を持つことが明らかになり、粘膜保護作用を持つことが明らかとなった。また、Am80の作用機序として、連続投与終了後もTh1型T細胞増殖の強い抑制効果が持続することが明らかとなった。ヒト末梢血由来の樹状細胞においてもAm80はTh1誘導能抑制効果を示し、患者大腸粘膜固有層細胞のTNF- α 産生を抑制することがわかった。これらの結果は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。この結果を受けて、23年度の医師主導臨床試験実施のためのプロトコル作成を開始した。新たに合成したレチノイド関連化合物については、スクリーニングを進め、現在20種近くの化合物でマウスマクロファージに対するLPS刺激後サイトカイン産生抑制作用を確認できており、一部はヒト末梢血由来細胞でもその効果が認められた。

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、消化管上皮細胞回転への作用を明らかにし、クローン病治療のための投与計画を検証する動物試験の一部を23年度の前倒しで行った。副作用が少なく有効な新規合成低分子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スクリーニングしヒト由来の細胞にも結うような物を見いだした。

B. 研究方法

1. 合成レチノイドの抗炎症活性: Am80以外の合成レチノイドを及びその他の低分子化合物の抗炎症作用を検証するため、C57BL/6マウスから、無刺激の腹腔内滲出細胞を採取し、96ウェルプレートで2時間培養を行った後、浮遊細胞を取り除くことで、マクロファージ細胞分画を得た。これに、大腸菌由来LPS 100ng/mlを加え、試験化合物の存在下で培養を行った。24時間後、培養上清を回収してTNF- α 、IL-6、IL-10をELISA法により測定した。その一部についてはヒト末梢血由来の細胞を用いた検証も行った。さらにAm80による消化管上皮細胞回転への影響を調べるため放射線照射後の小腸上皮細胞のアポトー

シス数を算定した。

2. 合成：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免疫疾患の治療により好ましいと見られる化合物を引き続き探索した。

3. マウスにおける Am80 連続投与の効果：C57BL/6 マウスに、Am80 を 5mg/kg/day/10ml の用量で7日間強制経口投与を行い、終了直後 (day 1)及び終了後3日目(day 3)に、腹腔内滲出細胞を採取し、96 ウェルプレートで2時間培養を行った後、浮遊細胞を取り除くことで、マクロファージ細胞分画を得た。これに、大腸菌由来 LPS 100ng/ml を加え、試験化合物の存在下で培養を行った。24 時間後、培養上清を回収して IL-12, TNF- α , IL-1b, IL-6 を、Multiplex ビーズ法により測定した。また、腸間膜リンパ節は、抗 CD3 抗体固着プレートで2日間培養し、生細胞数をカウントするとともにを上清の IL-4, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17, IFN- γ , TNF- α を測定した。

4. DC の形態と表面マーカー：健常人由来の末梢血 CD14 陽性単球を granulocyte-macrophage colony stimulation factor (GM-CSF) 20 mg/ml と IL-4 20 ng/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)、③Am80 添加にて分化した DC の抗原提示細胞としての機能の3項目である。

5. 大腸粘膜固有層細胞に対する効果：患者手術検体から粘膜固有層単核球細胞 (lamina propria mononuclear cell; LPMC)を単離し LPS 刺激時のサイトカイン産生が Am80 添加により抑制されるかどうかを CBA 法により検討した。

(倫理面への配慮)

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た。

C. 研究結果

1. 合成レチノイドの抗炎症活性：マウス腹腔マクロファージに対して、Am80 は 1-5 mM の

濃度で、TNF- α , IL-6 及び IL-10 の産生を抑制した。新規合成レチノイドのなかからは Am80 に匹敵する炎症性サイトカイン抑制作用を持つものが見いだされ、TNF- α , IL-6, IL-10 それぞれの抑制について異なった特性も見られた。また、別なライブラリーから得られた低分子化合物 20 種は、ヒト末梢血由来単核球を LPS 刺激した際の TNF- α 産生を抑制した。これらの化合物には、明らかな急性の細胞毒性は確認されていない。また放射線照射後の上皮のアポトーシスは Am80 投与群で明らかに減少しており、Am80 の粘膜保護作用が示された。

2. 合成：化合物の探索の結果、4-[6 α -methyl-5,6,6 α ,7,8,9-hexahydro-4H-2-phenar enyl]carbamoyl]benzoic acid の安息香酸部分の F 誘導体について代表的自己免疫疾患であるリウマチのコラーゲン誘導マウスモデルにおいて十分な治療効果を示した。

3. マウスにおける Am80 連続投与の効果：腹腔より回収されたマウスマクロファージが LPS 刺激後に産生するサイトカイン量は、対照群に比べて、Am80 投与群でばらつきが大きくなったが、有意な変動をすることはなかった。これに対して、腸間膜リンパ節 T 細胞は抗 CD3 抗体刺激に対する増殖能が抑制されており、Day 1 では、対照群で見られるクラスター形成を伴う細胞増殖が Am80 投与群でほとんど見られなかった。その効果は day 3 においても持続していた。サイトカイン産生能は Th1 応答の強い抑制、Th2 の促進作用が見られた。

4. DC の形態と表面マーカー：Am80 (100 nM) 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。LPS 刺激時のサイトカイン産生について、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。Naïve CD4 細胞を用いた allo Mixed lymphocyte reaction では、Am80-DC は Th1 細胞への誘導能が低下していた。

5. 大腸粘膜固有層細胞に対する効果：大腸がん手術検体非癌部 (対照)、クローン病患者手術検体から単離した LPMC 1 x 10⁶/well を 100ng/ml の LPS で刺激し、TNF- α を含めた炎症性サイトカインの誘導について real-time PCR 法、CBA 法を用いて検討した。その結果、クローン病患者手術検体から得られた LPMC は対照群と比較して LPS 刺激による TNF- α 産生が高いが、刺激時に Am80 を添加することによりその産生が抑制されること

が明らかとなった。

D. 考察

Am80 はマウス、ヒトにおいてマクロファージ・単球系の細胞の自然免疫応答を抑制する効果を持つことが明らかとなった。また、合成化合物の中から、Am80 以外にも同様な抗炎症作用を持つと見られる化合物が得られた。これらの化合物の Am80 との優位性、*in vivo* 腸炎モデルにおいても効果を持つかどうか等について 23 年度に検討する予定である。

新規化合物は RAR α に選択性が高く (RAR β の 50 倍、RAR γ の 500 倍。RXR にはゼロ)、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に合成法を改良し動物での試験をおこなうことができた。

Am80 投与計画のための動物実験として、マウスに連続投与を行うと投与終了後にも Th1 細胞応答の抑制が認められた。この結果は、ヒトにおいても連続投与の終了後にも、T 細胞応答を含む獲得免疫応答を抑制する効果があると予測される。23 年度はこのような作用がさらに遷延するかどうか、観察期間を延長した実験を実施する予定である。タミバロテンはすでに臨床で用いられており、本課題では 23 年度にはクローン病の臨床治療を計画していたが資金不足のため、この臨床試験計画は大幅な変更を余儀なくされている。

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。本研究により、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。さらに Am-DC はナイーブ T 細胞の Th1 への分化も抑制したことからクローン病における IFN- γ を中心とする過剰な Th1 免疫応答を制御できる可能性がある。さらに LPMC における炎症性サイトカイン産生を抑制することから *in vitro* のみならず *in vivo* における炎症抑制効果も期待できると考えられる。これらの結果は RA およびその誘導体が自然免疫のみならず、獲得免疫の面からも広く Th1 を抑制するというこ

とを示している。このようにレチノイン酸シグナルを介した炎症制御は抗 TNF- α 抗体とはまったく異なる作用機序を有しており新たなクローン病治療の標的として興味深い。

この結果を受けて、本研究では 23 年度にはクローン病の臨床試験を計画していたため試験実施のためのプロトコール作成を開始した。

E. 健康危険情報
なし

F. 結論

本研究で明らかとなった Am80 の持つ Th1 応答抑制作用、粘膜保護作用は、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強く示唆する成績である。Am80 以外にも同様な抗炎症作用を持つと見られる化合物が得られた。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Burkly LC, Dohi T. The TWEAK/Fn14 Pathway in Tissue Remodeling: For Better or for Worse. *Adv Exp Med Biol* 2011;691:305-322
2. Watanabe-Takahashi M, Sato T, Dohi T, Noguchi N, Kano F, Murata M, Hamabata T, Natori Y, Nishikawa K. An orally applicable Shiga toxin neutralizer functions in the intestine to inhibit the intracellular transport of the toxin. *Infect Immun* 2010;78:177-183
3. Sasawatari S, Yoshizaki M, Taya C, Tazawa A, Furuyama-Tanaka K, Yonekawa H, Dohi T, Makrigiannis AP, Sasazuki T, Inaba K, Toyama-Sorimachi N. The Ly49Q receptor plays a crucial role in neutrophil polarization and migration by regulating raft trafficking. *Immunity* 32:200-213, 2010.
4. 土肥多恵子 コロニックパッチ、臨床粘膜免疫学 清野 宏編、株式会社シナジー、東京、2010 年
土肥多恵子 IBD の動物実験モデル 日比紀文編、炎症性腸疾患 医学書院、東京、2010 年
5. Ito A, Muratake H, Shudo K. Novel synthesis of ureas: application of t-butylureas. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2010 Jan;58(1):82-6.
6. Suzuki H, Utsunomiya I, Shudo K. Synthesis and application of [1,2,5] triazepane and [1,2,5]oxadiazepane as versatile structural units for drug discovery. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2010;58(7):1001-2
7. H. Matsushita, M. Hijioka, A. Hisatsune, Y. Isohama, K. Shudo, H. Katsuki. A retinoic acid receptor agonist Am80 rescues neurons,

attenuates inflammatory reactions and improves behavioral recovery after intracerebral hemorrhage in mice *J. Cerebral Blood Flow & Metabolism* (2010) 1-13

8. Kurauchi Y, Hisatsune A, Isohama Y, Sawa T, Akaike T, Shudo K, Katsuki H. Midbrain dopaminergic neurons utilize nitric oxide/cyclic GMP signaling to recruit ERK that links retinoic acid receptor stimulation to up-regulation of BDNF. *J Neurochem.* 116, 323-33 (2011)

9. 久松理一、日比紀文 総説 『クローン病の長期予後について考える』日本消化器病学会雑誌 2011 108 巻 3 号 p373-380

10. 久松理一、日比紀文 特集：小腸疾患：診断と治療の進歩 II. 診療の進歩 6. Crohn 病 日本内科学会雑誌第 100 巻 2011 第 1 号 p85-95

11. Naruse H, Hisamatsu T, Yamauchi Y, Chang JE, Matsuoka K, Kitazume MT, Arai K, Ando S, Kanai T, Kamada N, Hibi T. Intracellular bacteria recognition contributes to maximal interleukin (IL)-12 production by IL-10-deficient macrophages. *Clin Exp Immunol.* 2011 Apr;164(1):137-44.

12. Takayama T, Kamada N, Chinen H, Okamoto S, Kitazume MT, Chang J, Matuzaki Y, Suzuki S, Sugita A, Koganei K, Hisamatsu T, Kanai T, Hibi T. Imbalance of NKp44(+) NKp46(-) and NKp44(-)NKp46(+) natural killer cells in the intestinal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology.* 2010 Sep;139(3):882-92.

13. 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.

14. 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.

2. 学会発表

1. Oshio T, Kawashima R, Kawamura YI, Okada T, Phongsisay V and Dohi T. A novel chemokine-receptor antagonist inhibits activation of peritoneal macrophages and peritoneal adhesion. 14th International Congress of Immunology. Kobe, Aug. 25, 2010

2. T Dohi, R Kawashima, YI. Kawamura, J Michaelson, and L C. Burkly. Effect of combination treatment with TNF-inhibitor and anti-TWEAK antibody in mouse hapten-induced colitis Digestive Disease Week 2010, May 3, 2010

3. 香月博志、松下英明、肘岡雅宣、首藤紘一 脳内出血モデルマウスに対する Am80 の治療効果 日本レチノイド研究会 21 回、46 (2010)

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研究センター研究所・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。本年度は 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、さらに、新規合成レチノイド化合物及び低分子化合物ライブラリーから探索した化合物からその抗炎症効果について検証した。その結果、合成レチノイド化合物より 5 種、その他の低分子化合物から 20 種類の物質を得て、TNF- α 及び IL-6 産生を抑制することを発見した。それらの一部にはヒト末梢血由来単核球によるサイトカイン産生を抑制する物も見られている。

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、本年度は 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、さらに、新規合成レチノイド化合物及び低分子化合物ライブラリーから探索した化合物からその抗炎症効果について検証した。

B. 研究方法

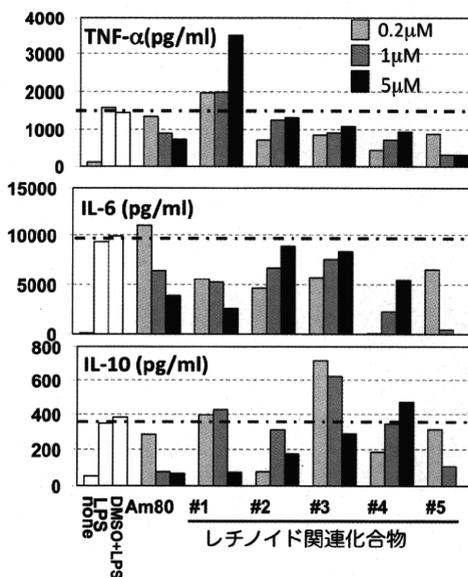
1. C57BL/6 マウスから、無刺激の腹腔内滲出細胞を採取し、96 ウェルプレートで 2 時間培養を行った後、浮遊細胞を取り除くことで、マクロファージ細胞分画を得た。これに、大腸菌由来 LPS 100ng/ml を加え、試験化合物の存在下で培養を行った。24 時間後、培養上清を回収して TNF- α , IL-6, IL-10 を ELISA 法により測定した。その一部についてはヒト末梢血由来の細胞を用いた検証も行った。さらに Am80 による消化管上皮細胞回転への影響を調べるため放射線照射後の小腸上皮細胞のアポトーシス数を算定した。

(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。ヒト末梢血細胞を用いた解析は、平成 22 年 12 月 10 日に倫理委員会より承認された計画(受付番号 121)に基づいて行った。

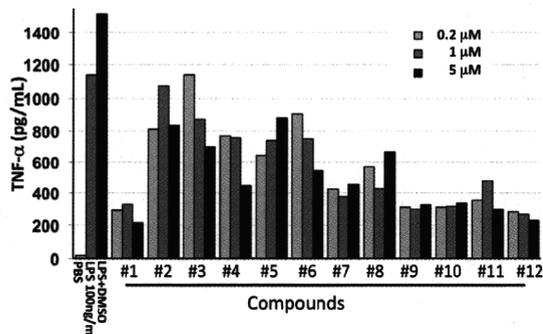
C. 研究結果

1. マウス腹腔マクロファージに対して、Am80 は 1-5 μ M の濃度で、TNF- α , IL-6 及び IL-6 の産生を抑制した。(図)



レチノイド関連化合物によるマクロファージサイトカイン産生の抑制

新規合成レチノイドのなかからは Am80 に匹敵する炎症性サイトカイン抑制作用を持つものが、見いだされ、TNF- α 、IL-6、IL-10 それぞれの抑制について異なった特性も見られた。また、別なライブラリーから得られた低分子化合物 20 種は、ヒト末梢血由来単核球を LPS 刺激した際の TNF- α 産生を抑制した。下図にそのデータの一部を示した。



これらの化合物には、急性の細胞毒性は確認されていない。

D. 考察

Am80 はマウス、ヒトにおいてマクロファージ・単球系の細胞の自然免疫応答を抑制する効果を持つことが明らかとなった。また、合成化合物の中から、Am80 以外にも同様な抗炎症作用を持つと見られる化合物が得られた。これらの化合物の Am80 との優位性、*in vivo* 腸炎モデルにおいても効果を持つかどうか等について 23 年度に検討する予定である。

E. 健康危険情報

なし

F. 結論

合成レチノイド Am80 はマクロファージ・単球系の自然免疫応答を抑制することによって、抗炎症作用を発揮していることが明らかになった。また、マウス、ヒトマクロファージ・単球系細胞においても、低分子化合物物ライブラリーから、同様な抗炎症効果を持つ物質も見いだすことができた。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Burkly LC, Dohi T. The TWEAK/Fn14 Pathway in Tissue Remodeling: For Better or for Worse. *Adv Exp Med Biol* 2011;691:305-322

2. Watanabe-Takahashi M, Sato T, Dohi T, Noguchi N, Kano F, Murata M, Hamabata T, Natori Y, Nishikawa K. An orally applicable Shiga toxin neutralizer functions in the intestine to inhibit the intracellular transport of the toxin. *Infect Immun* 2010;78:177-183

3. Sasawatari S, Yoshizaki M, Taya C, Tazawa A, Furuyama-Tanaka K, Yonekawa H, Dohi T, Makrigiannis AP, Sasazuki T, Inaba K, Toyama-Sorimachi N. The Ly49Q receptor plays a crucial role in neutrophil polarization and migration by regulating raft trafficking. *Immunity* 32:200-213, 2010.

4. 土肥多恵子 コロニックパッチ、臨床粘膜免疫学 清野 宏編、株式会社シナジー、東京、2010 年

5. 土肥多恵子 IBD の動物実験モデル 日比紀文編、炎症性腸疾患 医学書院、東京、2010 年

2. 学会発表

1. Oshio T, Kawashima R, Kawamura YI, Okada T, Phongsisay V and Dohi T. A novel chemokine-receptor antagonist inhibits activation of peritoneal macrophages and peritoneal adhesion. 14th International Congress of Immunology. Kobe, Aug. 25, 2010

2. T Dohi, R Kawashima, Y I. Kawamura, J Michaelson, and L C. Burkly. Effect of combination treatment with TNF-inhibitor and anti-TWEAK antibody in mouse hapten-induced colitis *Digestive Disease Week* 2010, May 3, 2010

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

課題研究において、タミバロテン (Am80) に引き続き、新たな合成レチノイドの製造と製法の改良をすすめた。また、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明らかにしてきたが、投与方法、特に連続的投与ののちの遷延効果の可能性についての検証をすすめている。新規化合物について動物モデルでの効果を確認した。

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。本年度は特に連続投与終了後の効果について、動物実験を行う。

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引き続き探索した。

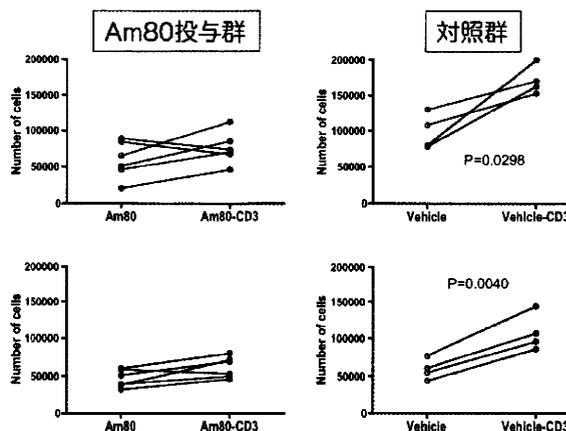
2. C57BL/6 マウスに、Am80 を 5mg/ kg/ day/ 10ml の用量で 7 日間強制経口投与を行い、終了直後(day 1)及び終了後 3 日目(day 3)に、腹腔内滲出細胞を採取し、96 ウェルプレートで 2 時間培養を行った後、浮遊細胞を取り除くことで、マクロファージ細胞分画を得た。これに、大腸菌由来 LPS 100ng/ml を加え、試験化合物の存在下で培養を行った。24 時間後、培養上清を回収して IL-12, TNF- α , IL-1 β , IL-6 を Multiplex ビーズ法により測定した。また、腸間膜リンパ節は、抗 CD 3 抗体固着プレートで 2 日間培養し、生細胞数をカウントするとともに上清の IL-4, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17, IFN- γ , TNF- α を測定した。

C. 研究結果

1. 化合物の探索の結果、前年までに見出した 4-[6 α -methyl-5,6,6 α ,7,8,9-hexahydro-4H-2-phenarenyl] carbamoyl] benzoic acid の

安息香酸部分の F 誘導体について代表的自己免疫疾患であるリウマチのコラーゲン誘導マウスモデルにおいて十分な治療効果を示した。

投与終了後に回収されたマウスマクロファージが LPS 刺激後に産生するサイトカイン量は、対照群に比べて、Am80 投与群ではばらつきが大きくなったが、有意な変動をすることはなかった。これに対して、腸間膜リンパ節 T 細胞は抗 CD3 抗体刺激に対する増殖能が抑制されており、Day 1 では、対照群で見られるクラスター形成を伴う細胞増殖が Am80 投与群でほとんど見られなかった。その効果は day 3 においても持続していた(下図)。サイトカイン産生能は Th1 応答の強い抑制、Th 2 の促進作用が見られた。



Am80投与群におけるCD3刺激による細胞増殖抑制

D. 考察

新規化合物は RAR α に選択性が高く(RAR β の 50 倍、RAR γ の 500 倍。RXR にはゼロ)、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に合成法を改良し

動物での試験をおこなうことができた。

タミバロテン投与計画については、マウスに連続投与を行うと投与終了後にも Th1 細胞応答の抑制が認められた。この結果は、ヒトにおいても連続投与の終了後にも、T 細胞応答を含む獲得免疫応答を抑制する効果があると予測される。23 年度はこのような作用がさらに遷延するかどうか、観察期間を延長した実験を実施する予定である。Am80 はタミバロテンとしてすでに臨床で用いられており、本研究では 23 年度にはクローン病の臨床試験を計画していたが資金がなく、計画は大幅な変更を余儀なくされる。

E. 結論

Am80 連続投与により、投与終了後も T 細胞応答が抑制されることが明らかとなった。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ito A, Muratake H, Shudo K. Novel synthesis of ureas: application of t-butylureas. Chem Pharm Bull (Tokyo). 2010 Jan;58(1):82-6.

2. Suzuki H, Utsunomiya I, Shudo K. Synthesis and application of [1,2,5]triazepane and [1,2,5]oxadiazepane as versatile structural units

for drug discovery. Chem Pharm Bull (Tokyo). 2010;58(7):1001-2

3. H. Matsushita, M.Hijioka, A.Hisatsune, Y. Isohama, K.Shudo, H.Katsuki

A retinoic acid receptor agonist Am80 rescues neurons, attenuates inflammatory reactions and improves behavioral recovery after intracerebral hemorrhage in mice

J. Cerebral Blood Flow & Metabolism 2010) 1-13

4. Kurauchi Y, Hisatsune A, Isohama Y, Sawa T, Akaike T, Shudo K, Katsuki H. Midbrain dopaminergic neurons utilize nitric oxide/cyclic GMP signaling to recruit ERK that links retinoic acid receptor stimulation to up-regulation of BDNF. J Neurochem. 116, 323-33 (2011)

2. 学会発表

1. 香月博志、松下英明、肘岡雅宣、首藤紘一
脳内出血モデルマウスに対する Am80 の治療効果 日本レチノイド研究会 21 回、46 (2010)

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。特にクローン病では Th1 にシフトした過剰な免疫応答が病態の中心であることがわかっている。樹状細胞は局所免疫応答を制御しており、樹状細胞の機能を制御する薬剤の開発が進んでいる。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の 3 項目である。

また、患者手術検体から粘膜固有層単核球細胞(lamina propria mono nuclear cell; LPMC)を単離し LPS 刺激時のサイトカイン産生が Am80 添加により抑制されるかどうかを CBA 法により検討した(項目④)。

(倫理面への配慮)

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)

C. 研究結果

①DC の形態と表面マーカー

Am80(100nM)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。

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。

④大腸がん手術検体非癌部（対照）、クローン病患者手術検体から単離した LPMC 1 x 10⁶/well を 100ng/ml の LPS で刺激し、TNF α を含めた炎症性サイトカインの誘導について real-time PCR 法、CBA 法を用いて検討した。その結果、クローン病患者手術検体から得られた LPMC は対照群と比較して LPS 刺激による TNF α 産生が高いが、刺激時に Am80 を添加することによりその産生が抑制されることが明らかとなった。

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。本研究により、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。さらに Am-DC はナイーブ T 細胞の Th1 への分化も抑制したことからクローン病における IFN- γ を中心とする過剰な Th1 免疫応答を制御できる可能性がある。さらに LPMC における炎症性サイトカイン産生を抑制することから in vitro のみならず in vivo における炎症抑制効果も期待できると考えられる。これらの結果は RA およびその誘導体が自然免疫のみならず、獲得免疫の面からも広く Th1 を抑制しようということを示している。このようにレチノイン酸シグナルを介した炎症制御は抗 TNF- α 抗体とはまったく異なる作用機序を有しており新たなクローン病治療の標的として興味深い。

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

論文発表

1. 久松理一、日比紀文 総説 『クローン病の長期予後について考える』日本消化器病学会雑誌 2011 108 巻 3 号 p373-380
2. 久松理一、日比紀文 特集：小腸疾患：診断と治療の進歩 II. 診療の進歩 6. Crohn 病 日本内科学会雑誌第 100 巻 2011 第 1 号 p85-95
3. Naruse H, Hisamatsu T, Yamauchi Y, Chang JE, Matsuoka K, Kitazume MT, Arai K, Ando S, Kanai T, Kamada N, Hibi T. Intracellular bacteria recognition contributes to maximal interleukin (IL)-12 production by IL-10-deficient macrophages. *Clin Exp Immunol*. 2011 Apr;164(1):137-44.
4. Takayama T, Kamada N, Chinen H, Okamoto S, Kitazume MT, Chang J, Matuzaki Y, Suzuki S, Sugita A, Koganei K, Hisamatsu T, Kanai T, Hibi T. Imbalance of NKp44(+)NKp46(-) and NKp44(-)NKp46(+) natural killer cells in the intestinal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2010 Sep;139(3):882-92.
5. 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.
6. 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.

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

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
土肥多恵子	コロニックパッチ	清野 宏	臨床粘膜免疫学	株式会社シナジー	東京	2010	157-163
土肥多恵子	IBDの動物実験モデル	日比紀文	炎症性腸疾患	医学書院	東京	2010	315-319

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
Burkly LC, Dohi T. 2011;691:305-322	The TWEAK/Fn14 Pathway in Tissue Remodeling: For Better or for Worse.	Adv Exp Med Biol	691	305-322	2011
Watanabe-Takahashi M, Sato T, Dohi T, Noguchi N, Kano F, Murata M, Hamabata T, Natori Y, Nishikawa K.	An orally applicable Shiga toxin neutralizer functions in the intestine to inhibit the intracellular transport of the toxin.	Infect Immun	78	177-183	2010
Sasawatari S, Yoshizaki M, Taya C, Tazawa A, Furuyama-Tanaka K, Yonekawa H, Dohi T, Makrigiannis AP, Sasazuki T, Inaba K, Toyama-Sorimachi N.	The Ly49Q receptor plays a crucial role in neutrophil polarization and migration by regulating raft trafficking.	Immunity	32	200-213	2010
Ito A, Muratake H, Shudo K.	Novel synthesis of ureas: application of t-butylureas.	Chem Pharm Bull (Tokyo).	58	82-6	2010
Suzuki H, Utsunomiya I, Shudo K	Synthesis and application of [1,2,5]triazepane and [1,2,5]oxadiazepane as versatile structural units for drug discovery	Chem Pharm Bull (Tokyo).	58	1001-2	2010
H. Matsushita, M.Hijioka, A.Hisatsune, Y. Isohama, K.Shudo, H.Katsuki	A retinoic acid receptor agonist Am80 rescues neurons, attenuates inflammatory reactions and improves behavioral recovery after intracerebral hemorrhage in mice	J.Cerebral Blood Flow & Metabolism		1-13	2010

Kurauchi Y, Hisatsune A, Isohama Y, Sawa T, Akaike T, Shudo K, Katsuki H.,	Midbrain dopaminergic neurons utilize nitric oxide/cyclic GMP signaling to recruit ERK that links retinoic acid receptor stimulation to up-regulation of BDNF.	J Neurochem.	116	323-33	2011
Naruse H, Hisamatsu T, Yamauchi Y, Chang JE, Matsuoka K, Kitazume MT, Arai K, Ando S, Kanai T, Kamada N, Hibi T.	Intracellular bacteria recognition contributes to maximal interleukin (IL)-12 production by IL-10-deficient macrophages.	Clin Exp Immunol.	Apr;164(1)	137-44	2011
Takayama T, Kamada N, Chinen H, Okamoto S, Kitazume MT, Chang J, Matuzaki Y, Suzuki S, Sugita A, Koganei K, Hisamatsu T, Kanai T, Hibi T.	Imbalance of NKp44(+)NKp46(-) and NKp44(-)NKp46(+) natural killer cells in the intestinal mucosa of patients with Crohn's disease.	Gastroenterology.	Sep;139(3)	882-92	2010
久松理一、日比紀文	総説 『クローン病の長期予後について考える』	日本消化器病学会雑誌	108 巻 3 号	p373-380	2011
久松理一、日比紀文	特集：小腸疾患：診断と治療の進歩 II. 診療の進歩 6.Crohn病	日本内科学会雑誌	第 100 巻 第 1 号	p85-95	2011

