

201108006A

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 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 土肥 多恵子

平成 24 (2012) 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	8
2. レチノイド関連化合物の合成 首藤 紘一	11
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	13
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	16
IV. 研究成果の刊行物・別刷	18

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。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。Am80 および新規合成レチノイド化合物、低分子化合物ライブラリーから探索した化合物の、特にマクロファージケモタキシスへの作用を試験しその抗炎症効果について検証した。さらに、AM80 連続投与後の効果の持続性についてもマウスを用いて検証を行った。さらに化合物を用いて腹腔内炎症モデル、大腸炎モデルの抑制能についても試験を行った。その結果、合成レチノイド化合物を含む 6 種の低分子化合物でケモタキシス阻害効果が見られ、*in vivo* 炎症モデルにおいても、Am80 をしのぐ炎症抑制効果をもつ化合物が得られた。また、Am80 は連続投与によって強い免疫修飾効果(Th1 応答抑制)が得られ、投与終了後も遷延効果の見られることが明らかとなった。Am80 に勝る新規構造のレチノイドとして、タミバロテンのプロドラッグ M700 を合成し、その体内動態をラットで試験した。M700 は十分にタミバロテンに代替のできる新規化合物であり、自己免疫疾患及びそのほかの難治性疾患の治療薬として更なる研究開発の意義があると考えられる。また、RAR アゴニストである Am80 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。健常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、さらにナイーブ T 細胞を Th1 へ誘導する能力も低下していた。さらに AM80 やその類似化合物のクローン病腸管単核球細胞からのサイトカイン産生抑制効果についても検討した。これらの成績は、Am80 が自然免疫・獲得免疫の両面から免疫能に影響を与え、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

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 および新規合成レチノイド化合物、低分子化合物ライブラリーから探索した化合物の、特にマクロファージケモタキシスへの作用を試験しその抗炎症効果について検証した。さらに、AM80 連続投与後の効果の持続性についてもマウスを用いて検証を行った。さらに化合物を用いて腹腔内炎症モデル、大腸炎モデルの抑制能についても試験を行った。Am80 に勝る新規構造のレチノイドとして、タミバロテンのプロドラッグ M700 を合成し、その体内動態をラットで試験した。また、引き続き RAR アゴニストである Am80 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、さらに新たな化合物での検討も加えた。

## B. 研究方法

1. ケモタキシスアッセイ：マクロファージの重要な機能である遊走能については、独自に開発した Chemokine-induced macrophage aggregation (CIMA) assay を用いた (Hoshino et al, *J Immunol*;178:5296, 2007) 。すなわち、我々の確立したマウス中皮細胞株を、プレートに単層培養し、C57BL/6 マウスからえられた無刺激の腹腔内滲出細胞マクロファージ分画を採取して加えた。これにケモカイン CCL1 で刺激を加えるとマクロファージが遊走、集合し、凝集塊を形成する。この凝集塊の大きさを画像解析によって定量し、ケモタキシス活性とした。Am80 の他に 6 種類の化合物による CIMA の阻害効果を調べた。

### 2. 連続投与効果

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-a, 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 抗体固層化プレートで 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- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ を測定した。

### 3. in vivo 疾患モデル

腹腔内炎症モデルとして、マウスに Cecum abrasion を行い、同時に Am80 および関連化合物 7 種をそれぞれ投与し、6 日後に開腹して癒着の程度を判定した。大腸炎モデルとして、ハプテンであるトリニトロベンゼンスルホン酸をエタノールとともに大腸内投与し 4 日後に大腸組織を摘出して肉眼的組織学的に解析を加えた。Am80 および、3 種の化合物を炎症誘導時に一回投与し、炎症の抑制効果を調べた。

### 4. 合成

Am80 に勝る新規構造のレチノイドとして、タミバロテンのプロドラッグ M700 を合成し、その体内動態をラットで試験した。

### 5. ヒト由来検体を用いた解析

健康人由来の末梢血 CD14 陽性単球を granulocyte-macrophage colony stimulation factor (GM-CSF) 20 $\mu$ g/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)

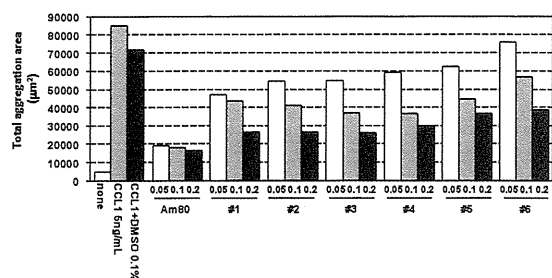
(倫理面への配慮)

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)。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. ケモタキシスアッセイ

本実験に用いた retinoid 関連およびケモカ  
イン関連の低分子化合物はいずれも  
0.02mM の低濃度から濃度依存性に強いケ  
モタキシス阻害活性を示した。(下図)



### 2. 連続投与効果

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、3 日後まで有意な変動をす  
ることはなかったが、7-14 日後には一部の炎症性  
サイトカイン産生の亢進が見られた。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。また、Day3 まで IL-10 産生の  
低下が見られたが、day7-14 には無処置群と  
同程度となった。サイトカイン産生能は投与  
終了直後は Th1 応答の強い抑制、Th 2 の促  
進作用が見られたがこれは 7-14 日までは継  
続しなかった。

### 3. *in vivo* 疾患モデル

Am80 の腹腔内炎症抑制効果は明らかでは  
なかった。しかし関連化合物 7 種のうち、4  
種は優位に癒着を抑制した。大腸炎モデルに  
おいては Am80 の効果は個体差が大きく、  
一定でなかった。この他の 3 種の低分子化合  
物では炎症を抑制する傾向が有り、一つは統

計学的にも優位な効果が見られた。

## 4. 合成

新規構造であって代謝的に Am80 に変換され  
るプロドラッグの合成をすすめた。単純なプロ  
ドラッグ化はカルボキシル基の修飾、アミド基  
の修飾が考えられ幾つかの化合物の合成をお  
こなったが、特記する化合物は得られなかった。  
しかし、カルボキシル基をプロピオン酸基に置  
換した M700 は、吸収もよく体内で  $\beta$ -酸化が  
進み効率よく Am80 (タミバロテン) へと変  
換される。したがって、本化合物は実質的に  
Am80 と基本的に同一の薬理作用を有する。  
ラットおよびマウスへの M700 投与による活  
性体 Am80 の血中動態は Am80 本体の投与の  
場合の Cmax は予想されたように低く、T1/  
2 も好ましく、かつ AUC も良好であった。

実際に M700 による代表的な自己免疫疾患  
とみられるコラーゲン誘導のリウマチモデル  
において Am80 とほぼ同様な治療効果をみた。  
Am80 は弱いながら皮膚刺激性を有するが、  
M700 は皮膚に対する直接作用はない。また、  
活性体であるタミバロテンについてさらなる  
抗炎症に関する薬理結果をえている。

## 5. ヒト由来検体を用いた解析

### ① DC 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。

### ② LPS 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  
10<sup>6</sup>/well を 100ng/ml の LPS で刺激し、TNF $\alpha$   
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 $\alpha$  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。一方で類似化合物にはその効果は認められなかった。また IL-12 については AM80 の直接添加で抑制されることはなく、この点については分化段階での作用が重要であると考えられた。

#### 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。本年度の研究においてはマクロファージのケモタキシスを抑制し、さらに、腹腔内炎症を抑制、あるいは大腸炎を軽減する効果のある新規低分子化合物が得られた。その効果は Am80 をしのぐものもあった。Am80 は連続投与によって、T 細胞機能を抑制し遷延効果も見られることが明らかとなった。今回使用した腸炎モデルや腹腔内炎症抑制効果は一回投与で急性炎症モデルであるので、Am80 は連続投与の可能な慢性炎症でより効果が発揮されるのではないかと予測される。

また、ヒト由来のサンプルを用いた解析により、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- $\gamma$  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- $\alpha$  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。一方で AM80 もその類似化合物も TNF $\alpha$  抑制などの直接効果は弱く、この点では免疫調整薬として期待されるのではないかと思う。

このように、本研究においてはタミバロテンが臨床研究にまで進展することを期待していた。そして、その背景となる多くの研究結果がえられたものの、厚労省よりの指示により本研究費の枠内での臨床研究を行えなかった。しかし、その研究結果は、Am80 のみならず、本年度得られたプロドラッグ M700 や、スクリーニングで得られた低分子化合物についても外挿されることであり、レチノイド関連化合物の今後の展開に大いに寄与するものである。

#### E. 健康危険情報

なし

#### F. 結論

本研究で明らかとなった Am80 の持つケモタキシス抑制作用、Th1 応答抑制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示唆する成績である。Am80 以外にも新規な構造の合成レチノイド M700 および低分子化合物をえた。これらは Am80 同様におおくの難治性疾患の治療に有効と考えている。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Takahashi D, Hase K, Kimura S, Nakatsu F, Ohmae M, Mandai Y, Sato T, Date Y, Ebisawa M, Kato T, Obata Y, Fukuda S, Kawamura YI, Dohi T, Katsuno T, Yokosuka O, Waguri S, Ohno H. The epithelia-specific membrane trafficking factor AP-1B controls gut immune homeostasis in mice. *Gastroenterology*; 141:621-32, 2011
2. Kawashima R, Kawamura YI, Oshio T, Son A, Yamazaki M, Hagiwara T, Okada T, Inagaki-Ohara K, Wu P, Szak S, Kawamura

- YJ, Konishi F, Miyake O, Yano H, Saito Y, Burkly LC, Dohi T. Interleukin-13 Damages Intestinal Mucosa via TWEAK and Fn14 in Mice-A Pathway Associated With Ulcerative Colitis. *Gastroenterology*;141:2119-2129 2011
3. H.Matsushita, M.Hijioka, A.Hisatsune, Y.Isohama, K.Shudo, H.Katsuki. Natural and synthetic retinoids afford therapeutic effects on intracerebral hemorrhage in mice. *Eur. J. Pharmacol.* In press.
  4. Ichikawa R, Takayama T, Yoneno K, Kamada N, Kitazume MT, Higuchi H, Matsuoka K, Watanabe M, Itoh H, Kanai T, Hisamatsu T Ichikawa R, Takayama T, Yoneno K, Kamada N, Kitazume MT, Higuchi H, Matsuoka K, Watanabe M, Itoh H, Kanai T, Hisamatsu T and Hibi T. Bile acids induce monocyte differentiation toward IL-12 hypo-producing dendritic cells via a TGR5-dependent pathway. *Immunology* 2012 Jan 12. and Hibi T. Bile acids induce monocyte differentiation toward IL-12 hypo-producing dendritic cells via a TGR5-dependent pathway. *Immunology* 2012 Jan 12.
  5. Sujino T, Kanai T, Ono Y, Mikami Y, Hayashi A, Doi T, Matsuoka K, Hisamatsu T, Takaishi H, Ogata H, Yoshimura A, Littman DR, Hibi T. Regulatory T Cells Suppress Development of Colitis, Blocking Differentiation of T-Helper 17 Into Alternative T-Helper 1 Cells. *Gastroenterology*. 2011 Jun 7 ; 141(3) : 1014-23
2. 学会発表
1. T Oshio, R Kawashima, YI. Kawamura, T Okada, T Haga, A Matsukawa, S Kakuta, Y Iwakura, T Dohi. A Novel Chemokine-Receptor Antagonist Inhibits Activation of LPS-Stimulated Peritoneal Macrophages and Peritoneal. *Digestive Disease Week 2011. Chicago May 9, 2011*
  2. 大塩 智之. ケモカインを標的とした低分子化合物による腹膜癒着予防法の開発. 第2回創薬Innovation Forum 2011 東京、2011年7月5日
  3. Oshio T, Kawashima R, Kawamura YI, Okada T, Haga T, Matsukawa A, Kakuta S, Iwakura Y, Dohi T. 低分子化合物による腹腔マクロファージのケモタキシス及びLPS刺激サイトカイン産生抑制/Inhibition of CCR8-mediated chemotaxis and LPS-induced cytokine secretion of peritoneal macrophages by a small molecule compound. 日本免疫学会、千葉、2011年11月27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。Am80 および新規合成レチノイド化合物、低分子化合物ライブラリーから探索した化合物の、特にマクロファージケモタキシスへの作用を試験しその抗炎症効果について検証した。さらに、AM80 連続投与後の効果の持続性についてもマウスを用いて検証を行った。さらに化合物を用いて腹腔内炎症モデル、大腸炎モデルの抑制能についても試験を行った。その結果、合成レチノイド化合物を含む 6 種の低分子化合物でケモタキシス阻害効果が見られ、*in vivo* 炎症モデルにおいても、Am80 をしのご炎症抑制効果をもつ化合物が得られた。また、Am80 は連続投与によって強い免疫修飾効果が得られ、投与終了後も遷延効果の見られることが明らかとなった。

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 および新規合成レチノイド化合物、低分子化合物ライブラリーから探索した化合物の、特にマクロファージケモタキシスへの作用を試験しその抗炎症効果について検証した。さらに、AM80 連続投与後の効果の持続性についてもマウスを用いて検証を行った。さらに化合物を用いて腹腔内炎症モデル、大腸炎モデルの抑制能についても試験を行った。

B. 研究方法

1. ケモタキシスアッセイ：マクロファージの重要な機能である遊走能については、独自に開発した Chemokine-induced macrophage aggregation (CIMA) assay を用いた (Hoshino et al, *J Immunol*;178:5296, 2007) . すなわち、我々の確立したマウス中皮細胞株を、プレートに単層培養し、C57BL/6 マウスからえられた無刺激の腹腔内滲出細胞マクロファージ分画を採取して加えた。これにケモカイン CCL1 で刺激を加えるとマクロファージが遊走、集合し、凝集塊を形成する。この凝集塊の大きさを画像解析によって定量し、ケモタキシス活性とした。Am80 の他に 6 種類の化合物による CIMA の阻害効果を調べた。
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

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-a, 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 抗体固層化プレートで 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- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  を測定した。

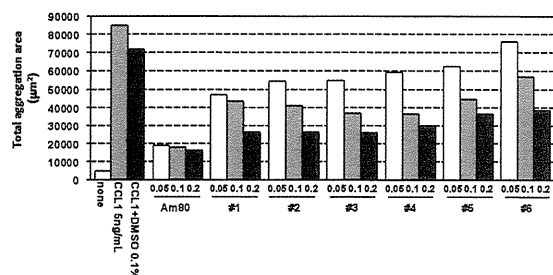
3. 腹腔内炎症モデルとして、マウスに Cecum abrasion を行い、同時に Am80 および関連化合物 7 種をそれぞれ投与し、6 日後に開腹して癒着の程度を判定した。大腸炎モデルとして、ハプテンであるトリニトロベンゼンスルホン酸をエタノールとともに大腸内投与し 4 日後に大腸組織を摘出して肉眼的組織学的に解析を加えた。Am80 および、3 種の化合物を炎症誘導時に一回投与し、炎症の抑制効果を調べた。

#### (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. 本実験に用いた retinoid 関連およびケモカイン関連の低分子化合物はいずれも 0.02mM の低濃度から濃度依存性に強いケモタキシス阻害活性を示した。(下図)



2. 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、3 日後まで有意な変動をすることはなかったが、7-14 日後には一部の炎症性サイトカイン産生の亢進が見られた。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。また、Day3 まえ IL-10

産生の低下が見られたが、day7-14 には無処置群と同程度となった。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投与終了直後は Th1 応答の強い抑制、Th 2 の促進作用が見られたがこれは 7-14 日までは継続しなかった。

3. Am80 の腹腔内炎症抑制効果は明らかではなかった。しかし関連化合物 7 種のうち、4 種は優位に癒着を抑制した。大腸炎モデルにおいては Am80 の効果は個体差が大きく、一定でなかった。この他の 3 種の低分子化合物では炎症を抑制する傾向が有り、一つは統計学的にも優位な効果が見られた。

### D. 考察

マクロファージのケモタキシスを抑制し、さらに、腹腔内炎症を抑制、あるいは大腸炎を軽減する効果のある新規低分子化合物が得られた。その効果は Am80 をしのぐものもあった。Am80 は連続投与によって、T 細胞機能を抑制し遷延効果も見られることが明らかとなった。今回使用した腸炎モデルや腹腔内炎症抑制効果は一回投与で急性炎症モデルであるので、Am80 は連続投与の可能な慢性炎症でより効果が発揮されるのではないかと予測される。

### E. 健康危険情報

なし

### F. 結論

合成レチノイド Am80 は連続投与によって強い免疫能修飾効果が得られ、投与終了後も持続することが分かった。また、低分子化合物物ライブラリーから、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. Takahashi D, Hase K, Kimura S, Nakatsu F, Ohmae M, Mandai Y, Sato T, Date Y, Ebisawa M, Kato T, Obata Y, Fukuda S, Kawamura YI, Dohi T, Katsuno T, Yokosuka O, Waguri S, Ohno H. The

epithelia-specific membrane trafficking factor AP-1B controls gut immune homeostasis in mice.

*Gastroenterology*;141:621-32, 2011

2. Kawashima R, Kawamura YI, Oshio T, Son A, Yamazaki M, Hagiwara T, Okada T, Inagaki-Ohara K, Wu P, Szak S, Kawamura YJ, Konishi F, Miyake O, Yano H, Saito Y, Burkly LC, Dohi T. Interleukin-13 Damages Intestinal Mucosa via TWEAK and Fn14 in Mice-A Pathway Associated With Ulcerative Colitis. *Gastroenterology*;141:2119-2129 2011

## 2. 学会発表

1. T Oshio, R Kawashima, YI. Kawamura, T Okada, T Haga, A Matsukawa, S Kakuta, Y Iwakura, T Dohi. A Novel Chemokine-Receptor Antagonist Inhibits Activation of LPS-Stimulated Peritoneal

Macrophages and Peritoneal. Digestive Disease Week 2011. Chicago May 9, 2011

2. 大塩 智之. ケモカインを標的とした低分子化合物による腹膜癒着予防法の開発. 第2回創薬Innovation Forum 2011 東京、2011年7月5日
3. Oshio T, Kawashima R, Kawamura YI, Okada T, Haga T, Matsukawa A, Kakuta S, Iwakura Y, Dohi T. 低分子化合物による腹腔マクロファージのケモタキシス及びLPS刺激サイトカイン産生抑制/Inhibition of CCR8-mediated chemotaxis and LPS-induced cytokine secretion of peritoneal macrophages by a small molecule compound. 日本免疫学会、千葉、2011年11月27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

Am80(タミバロテン)に勝る新規構造のレチノイドとして、タミバロテンのプロドラッグ M700 を合成し、その体内動態をラットで試験した。M700 は十分にタミバロテンに代替のできる新規化合物であり、自己免疫疾患及びそのほかの難治性疾患の治療薬として更なる研究開発の意義がある。

A. 研究目的

合成レチノイドタミバロテンが細胞障害性を有さない白血病治療薬として、きわめて高い効果を示す。この化合物はおおくの自己免疫疾患に対して有効であるとの期待があり、動物モデルによる試験や一部臨床においても有効性が期待できることが判明しているが、適応疾患は急性前骨髄球性白血病のみである。この化合物によるクローン病治療のための動物も行われている。本課題ではタミバロテンより特徴的なレチノイドを得ることを目指した研究をすすめる。

B, C. 研究方法および研究結果

タミバロテンの薬理効果はすばらしく、やや排泄が早いという問題を持つが、吸収排泄や毒性にも問題がない。しかし、化合物の特許が消失しているため新薬としての適用拡大に対して開発のインセンティブが小さい。ここでは、新規構造であって代謝的に Am80 に変換されるプロドラッグの合成をすすめた。単純なプロドラッグ化はカルボキシル基の修飾、アミド基の修飾が考えられ幾つかの化合物の合成をおこなったが、特記する化合物は得られなかった。しかし、カルボキシル基をプロピオン酸基に置換した M700 は、吸収もよく体内でβ-酸化が進み効率よく Am80 (タミバロテン) へと変換される。したがって、本化合物は実質的に Am80 と基本的に同一の薬理作用を有する。ラットおよびマウスへの M700 投与による活性体 Am80 の血中動態は Am80 本体の投与の

場合の Cmax は予想されたように低く、T1/2 も好ましく、かつ AUC も良好であった。

実際に M700 による代表的な自己免疫疾患とみられるコラーゲン誘導のリウマチモデルにおいて Am80 とほぼ同様な治療効果をみた。Am80 は弱いながら皮膚刺激性を有するが、M700 は皮膚に対する直接作用はない。

また、活性体であるタミバロテンについてさらなる抗炎症に関する薬理結果をえている。

D. 考察

本研究においてはタミバロテンが臨床研究にまで進展することを期待していた。そして、その背景となる多くの研究結果がえられたものの、資金削除のため人でのデータはえられなかった。しかし、その研究結果は、ここで得られたプロドラッグ M700 についても外挿されることであり、M700 の今後の展開に大いに寄与するものである。

また、Am80 と同じように脳内炎症の抑制も強く抑制することが確認されつつあり、おおくの脳神経疾患、たとえばアルツハイマー病などにも用いると考えている。

E. 結論

新規な構造の合成レチノイド M700 をえた。M700 はタミバロテン同様におおくの難治性疾患の治療に有効とみられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. H.Matsushita, M.Hijioka, A.Hisatsune,  
Y.Isohama, K.Shudo, H.Katsuki. Natural  
and synthetic retinoids afford therapeutic  
effects on intracerebral hemorrhage in mice.  
Eur. J. Pharmacol. In press.

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、RAR アゴニストである Am80 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てきた。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、さらにナイーブ 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。さらに Am80 やその類似化合物のクローン病腸管単核球細胞からのサイトカイン産生抑制効果についても検討した。

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。

③naive 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  $1 \times 10^6$ /wellを100ng/mlのLPSで刺激し、TNF $\alpha$ 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 $\alpha$ 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。一方で類似化合物にはその効果は認められなかった。またIL-12についてはAM80の直接添加で抑制されることはなく、この点については分化段階での作用が重要であると考えられた。

## 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- $\gamma$ 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- $\alpha$ 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。一方でAM80もその類似化合物もTNF $\alpha$ 抑制などの直接効果は弱く、この点では免疫調整薬として期待されるのではないかと思う。

## 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。一方でAM80もその類似化合物もTNF $\alpha$ 抑制などの直接効果は弱く、この点では免疫調整薬として期待されるのではないかと思う。

## G. 研究発表

### 論文発表

1. Ichikawa R, Takayama T, Yoneno K, Kamada N, Kitazume MT, Higuchi H, Matsuoka K, Watanabe M, Itoh H, Kanai T, Hisamatsu T, Ichikawa R, Takayama T, Yoneno K, Kamada N, Kitazume MT, Higuchi H, Matsuoka K, Watanabe M, Itoh H, Kanai T, Hisamatsu T and Hibi T. Bile acids induce monocyte differentiation toward IL-12 hypo-producing dendritic cells via a TGR5-dependent pathway. *Immunology* 136:153-162, 2012
2. Sujino T, Kanai T, Ono Y, Mikami Y, Hayashi A, Doi T, Matsuoka K, Hisamatsu

T, Takaishi H, Ogata H, Yoshimura A,  
Littman DR, Hibi T.Regulatory T Cells  
Suppress Development of Colitis, Blocking  
Differentiation of T-Helper 17 Into  
Alternative T-Helper 1 Cells.  
Gastroenterology. 2011 Jun 7 ; 141(3) :  
1014-23

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	孤立リンパ小節	上野川修一	食品免疫アレルギーの事典	朝倉書店	東京	2011	61-62
土肥多恵子	ムチン	財団法人日本ビフィズス菌センター	腸内共生系のバイオサイエンス	丸善	東京	2011	159-166

## 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
Takahashi D, Hase K, Kimura S, Nakatsu F, Ohmae M, Mandai Y, Sato T, Date Y, Ebisawa M, Kato T, Obata Y, Fukuda S, Kawamura YI, Dohi T, Katsuno T, Yokosuka O, Waguri S, Ohno H.	The epithelia-specific membrane trafficking factor AP-1B controls gut immune homeostasis in mice	Gastroenterology	141	621-32	2011
Kawashima R, Kawamura YI, Oshio T, Son A, Yamazaki M, Hagiwara T, Okada T, Inagaki-Ohara K, Wu P, Szak S, Kawamura YJ, Konishi F, Miyake O, Yano H, Saito Y, Burkly LC, Dohi T.	Interleukin-13 Damages Intestinal Mucosa via TWEAK and Fn14 in Mice-A Pathway Associated With Ulcerative Colitis	Gastroenterology	141	2119-2129	2011
H.Matsushita, M.Hijioka, A.Hisatsune, Y.Isohama, K.Shudo, H.Katsuki.	Natural and synthetic retinoids afford therapeutic effects on intracerebral hemorrhage in mice.	Eur. J. Pharmacol	In press		
Ichikawa R, Takayama T, Yoneno K, Kamada N, Kitazume MT, Higuchi H, Matsuoka K, Watanabe M, Itoh H, Kanai T, Hisamatsu T, Ichikawa R, Takayama	Bile acids induce monocyte differentiation toward IL-12 hypo-producing dendritic cells via a TGR5-dependent pathway.	Immunology	136	153-162	2012

T, Yoneno K, Kamada N, Kitazume MT, Higuchi H, Matsuoka K, Watanabe M, Itoh H, Kanai T, Hisamatsu T and Hibi T.					
Sujino T, Kanai T, Ono Y, Mikami Y, Hayashi A, Doi T, Matsuoka K, Hisamatsu T, Takaishi H, Ogata H, Yoshimura A, Littman DR, Hibi T	Regulatory T Cells Suppress Development of Colitis, Blocking Differentiation of T-Helper 17 Into Alternative T-Helper 1 Cells.	Gastroenterology	141	1014-23	2011

## The Epithelia-Specific Membrane Trafficking Factor AP-1B Controls Gut Immune Homeostasis in Mice

DAISUKE TAKAHASHI,<sup>\*,‡</sup> KOJI HASE,<sup>\*,‡,§</sup> SHUNSUKE KIMURA,<sup>‡</sup> FUBITO NAKATSU,<sup>||</sup> MASUMI OHMAE,<sup>‡</sup> YASUSHI MANDAI,<sup>¶</sup> TORU SATO,<sup>¶</sup> YASUHIRO DATE,<sup>‡</sup> MASASHI EBISAWA,<sup>\*,‡</sup> TAMOTSU KATO,<sup>\*,‡</sup> YUUKI OBATA,<sup>‡</sup> SHINJI FUKUDA,<sup>\*,‡</sup> YUKI I. KAWAMURA,<sup>#</sup> TAEKO DOHI,<sup>#</sup> TATSURO KATSUNO,<sup>¶</sup> OSAMU YOKOSUKA,<sup>¶</sup> SATOSHI WAGURI,<sup>\*\*</sup> and HIROSHI OHNO<sup>\*,‡</sup>

<sup>\*</sup>Department of Supramolecular Biology, Graduate School of Nanobioscience, Yokohama City University, Yokohama, Japan; <sup>‡</sup>Laboratory for Epithelial Immunobiology, Research Center for Allergy and Immunology, RIKEN, Yokohama, Japan; <sup>§</sup>PRESTO, Japan Science and Technology Agency, Tokyo, Japan; <sup>||</sup>Department of Cell Biology, Yale University School of Medicine, New Haven, Connecticut; <sup>¶</sup>Department of Clinical Cell Biology, Graduate School of Medicine, Chiba University, Chiba, Japan; <sup>#</sup>Department of Gastroenterology, Research Institute, International Medical Center of Japan, Tokyo, Japan; <sup>\*\*</sup>Department of Anatomy and Histology, School of Medicine, Fukushima Medical University, Fukushima, Japan

**BACKGROUND & AIMS:** Epithelial cells that cover the intestinal mucosal surface maintain immune homeostasis and tolerance in the gastrointestinal tract. However, little is known about the molecular mechanisms that regulate epithelial immune functions. Epithelial cells are distinct in that they are highly polarized; this polarity is, at least in part, established by the epithelium-specific polarized sorting factor adaptor protein (AP)-1B. We investigated the role of AP-1B-mediated protein sorting in the maintenance of gastrointestinal immune homeostasis. **METHODS:** The role of AP-1B in intestinal immunity was examined in AP-1B-deficient mice (*Ap1m2*<sup>-/-</sup>) by monitoring their phenotypes, intestinal morphology, and epithelial barrier functions. AP-1B-mediated protein sorting was examined in polarized epithelial cells from AP-1B knockdown and *Ap1m2*<sup>-/-</sup> mice. **RESULTS:** *Ap1m2*<sup>-/-</sup> mice developed spontaneous chronic colitis, characterized by accumulation of interleukin-17A-producing, T-helper 17 cells. Deficiency of AP-1B caused epithelial immune dysfunction, such as reduced expression of antimicrobial proteins and impaired secretion of immunoglobulin A. These defects promoted intestinal dysbiosis and increased bacterial translocation within the mucosa. Importantly, AP-1B deficiency led to mistargeting of a subset of basolateral cytokine receptors to the apical plasma membrane in a polarized epithelial cell line and in colonic epithelial cells from mice. AP1M2 expression was reduced significantly in colonic epithelium samples from patients with Crohn's disease. **CONCLUSIONS: AP-1B is required for proper localization of a subset of cytokine receptors in polarized epithelial cells, which allows them to respond to cytokine signals from underlying lamina propria cells. The AP-1B-mediated protein sorting machinery is required for maintenance of immune homeostasis and prevention of excessive inflammation.**

**Keywords:** Inflammatory Bowel Disease; Immune Response; IgA; T Cell.

The intestinal mucosal surface is exposed to a profusion of microorganisms. Intestinal epithelial cells (IECs) lining the mucosal surface comprise a physical barrier that separates the host's internal milieu from the

external environment. Intercellular junctional complexes such as tight junctions between IECs are essential for this barrier function. In addition, IECs play dual roles as sensors and effectors in the mucosal immune system.<sup>1,2</sup> IECs sense microbial attachment as well as inflammatory signals on the mucosa, and then serve as effector cells by rapidly releasing an array of chemokines and antimicrobial products.<sup>2,3</sup> IECs also contribute to the adaptive immune response by transporting immunoglobulin (Ig)A across the epithelial layer.<sup>4</sup> The physiological importance of epithelial cell functions is underscored by the recent findings that the intestinal epithelium-specific ablation of Nuclear factor- $\kappa$ B essential modulator (NEMO) or TAK1 causes epithelial apoptosis and impaired expression of antimicrobial peptides, resulting in severe intestinal inflammation.<sup>5,6</sup> The pathogenesis of human Crohn's disease (CD), an inflammatory disease of the intestines, also seems to involve impaired expression of certain antimicrobial peptides.<sup>7</sup> Thus, the integrity of the intestinal epithelium is fundamental for gut immune homeostasis.

Epithelial cells, including IECs, are strikingly polarized with a well-defined distribution of their plasma membrane proteins into apical and basolateral domains,<sup>8</sup> which is key to the maintenance of epithelial integrity. For example, Toll-like receptors 2 and 4 have been reported to localize to the apical domain in polarized epithelial cells.<sup>9</sup> By contrast, cytokine receptors, including interleukin-6 receptor (IL-6 signal transducer [IL-6st]) and interferon- $\gamma$  receptor (IFN- $\gamma$ RI), are found in the basolateral domain.<sup>10,11</sup> These observations have led to the paradigm that the proper localization of these cell surface receptors, which function as microenvironmental sensors, is of central importance in maintaining gut immune homeostasis. Epithelial cell polarization requires a polarized membrane

**Abbreviations used in this paper:** AP, adaptor protein; IECs, intestinal epithelial cells; IFN, interferon; IL-6R, interleukin-6 receptor; KD, knock down; MDCK, Madin-Darby canine kidney; plgR, polymeric immunoglobulin receptor; SFB, segmented filamentous bacteria; Th, T-helper; TNF, tumor necrosis factor.

© 2011 by the AGA Institute

0016-5085/\$36.00

doi:10.1053/j.gastro.2011.04.056

trafficking machinery that governs transport of membrane proteins to the proper membrane domains.<sup>12</sup>

Newly synthesized integral membrane and secretory proteins are transported from the endoplasmic reticulum via the Golgi complex to the *trans*-Golgi network, where the sorting to distinct membrane domains takes place.<sup>8</sup> Among the best-characterized sorting regulators are the adaptor protein (AP) complexes. AP complexes play a pivotal role not only in the formation of clathrin-coated vesicles but also in the cargo protein selection by recognizing the sorting signals within the cytoplasmic tail of integral membrane proteins.<sup>8</sup> Each AP complex functions in a distinct sorting pathway. It is well established that AP-2 mediates clathrin-dependent endocytosis from the plasma membrane to early endosomes, whereas AP-1B is expressed specifically in polarized epithelial cells and plays an essential role in basolateral sorting at recycling endosomes of certain membrane proteins.<sup>8,13</sup> These observations raise the possibility that AP-1B-mediated protein sorting in IECs is involved in the immune homeostasis in the mucosa. Here, we investigated this possibility by using mice deficient in the *Ap1m2* gene, which encodes the  $\mu$ 1B subunit of AP-1B.<sup>14</sup>

We report that *Ap1m2*<sup>-/-</sup> mice spontaneously develop T-helper (Th)17-dominant colitis as a consequence of a defect in 2 major epithelial effector functions: the expression of antimicrobial proteins and the luminal transport of secretory IgA. These defects enhanced the translocation of bacteria into the mucosa. The compromised epithelial immune function in *Ap1m2*<sup>-/-</sup> mice appears to result from mistargeting of a substantial number of basolateral cytokine receptors and the polymeric Ig receptor (pIgR) to the apical plasma membrane. We also show that, compared with normal mucosa, *APIM2* expression is downregulated in the colonic epithelium of CD mucosa, and a basolateral cytokine receptor was found to be mislocalized in one of the patient samples. Overall, our findings support an essential role of AP-1B-dependent protein sorting in the regulation of mucosal immunity that is required for gut homeostasis.

## Materials and Methods

### Animal Experiments

*Ap1m2*<sup>-/-</sup> mice (Hase et al, unpublished observation) were maintained under specific pathogen-free conditions in the RIKEN animal facility. To deplete commensal microbiota, *Ap1m2*<sup>-/-</sup> mice received a 4 mmol/L acetic acid solution containing 1 g/L ampicillin sodium, 0.5 g/L vancomycin hydrochloride, 1 g/L neomycin sulfate, and 1 g/L metronidazole (Wako, Osaka, Japan) as drinking water for 4 weeks beginning at 4 weeks of age. The Animal Research Committee of RIKEN Yokohama Institute approved all studies. Endoscopic biopsies of colonic mucosa were performed at the Chiba University Hospital with informed consent from the patients.

### Patient Samples

Biopsy specimens were obtained endoscopically from inflamed areas of the colon of 6 patients with CD with the

patients' informed consent. Normal control samples were taken from 5 patients with colonic polyps and were free of inflammation as judged by histopathology. The age of the patients with CD (mean  $\pm$  standard error of the mean) was 27.3  $\pm$  3.7 years (range, 20–42 y) and that of normal controls was 55.8  $\pm$  7.0 years (range, 33–73 y). Clinical activity was evaluated by serum concentration of C-reactive protein and CD Activity Index for patients with CD. Endoscopic activity was evaluated by the Simple Endoscopic Score for CD, and Matt's classification score for CD patients. The activity of the patients with CD was mild because the mean  $\pm$  standard error of the mean of the C-reactive protein level was 1.57  $\pm$  0.68 mg/mL (range, 0.4–4.8 mg/mL), the CD Activity Index was 144.0  $\pm$  45.6 mg/mL (range, 24.3–350.3 mg/mL), and the Simple Endoscopic Score for CD was 22.2  $\pm$  6.2 mg/mL (range, 6–48 mg/mL). Two of the patients with CD were receiving no treatment, and 4 patients were receiving mesalamine. The experimental protocol was reviewed and approved in advance by the ethics committees of Chiba University and RIKEN Yokohama Research Institute.

### Statistical Analyses

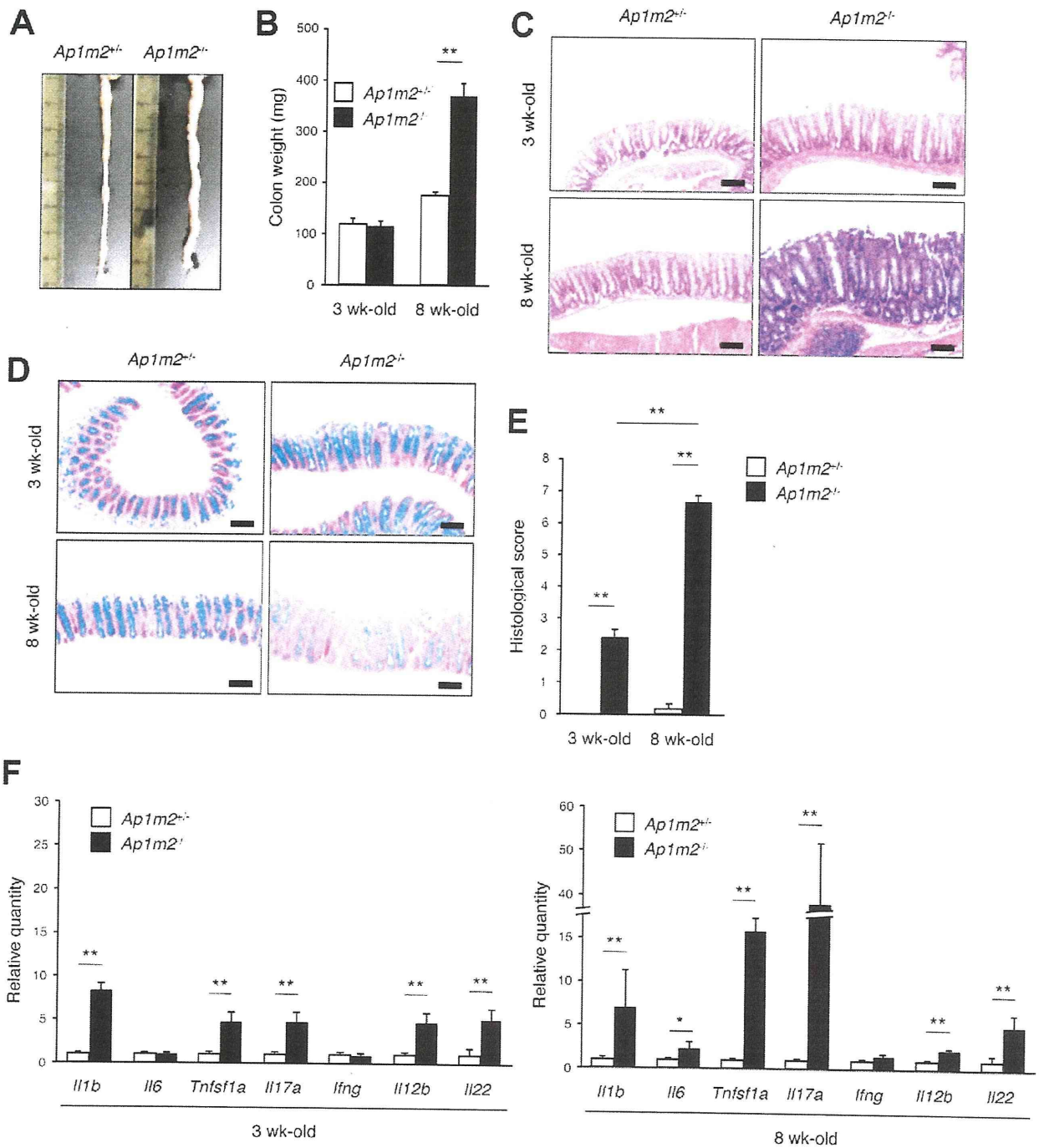
Differences between 2 or more groups were analyzed by the Student *t* test or a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey test, respectively. When variances were not homogeneous, the data were analyzed by the Wilcoxon-Mann-Whitney test or the Kruskal-Wallis ANOVA followed by a Scheffé test.

## Results

### *Ap1m2*<sup>-/-</sup> Mice Spontaneously Develop Colitis

To explore the importance of AP-1B in gut immune homeostasis, we analyzed *Ap1m2*<sup>-/-</sup> mice. *Ap1m2*<sup>-/-</sup> mice showed thickening of the large bowel wall at 8 weeks of age (Figure 1A and B). Histologic examination showed epithelial hyperplasia, edema, distorted crypt architecture, and loss of goblet cells in the colonic tissue (Figure 1C and D). These pathologic changes were associated with massive cellular infiltrates into the colonic mucosa and submucosa. In 3-week-old *Ap1m2*<sup>-/-</sup> mice, inflammatory infiltrates were less abundant and histologic alterations of the colonic tissue were minimal (Figure 1C). Thus, colitis becomes apparent after weaning in these mice (Figure 1B–E). Consistently, expression of inflammatory cytokine genes such as tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  (*Tnfs1a*) and IL-17A (*Il17a*) was increased in the colons of 8-week-old *Ap1m2*<sup>-/-</sup> mice (Figure 1F).

AP-1B is widely expressed in polarized epithelial cells of various tissues, including pancreas, kidney, prostate, testis, and lung, in addition to the gut.<sup>14</sup> To exclude the possibility that AP-1B ablation in other tissues might cause intestinal inflammation, we generated mice with an IEC-specific deletion of *Ap1m2* (*Villin-Cre Ap1m2*<sup>fllox/fllox</sup>). *Villin-Cre Ap1m2*<sup>fllox/fllox</sup> mice also spontaneously developed colitis with pathologic changes identical to those observed in the conventional *Ap1m2*<sup>-/-</sup> mice (Supplementary Figure 1A and B). Thus, colitis development in *Ap1m2*<sup>-/-</sup> mice is a direct consequence of the ablation of AP-1B in IECs.



**Figure 1.** *Ap1m2<sup>-/-</sup>* mice spontaneously develop colitis. (A) Macroscopic view of the intestines of 8-week-old *Ap1m2<sup>-/-</sup>* and control *Ap1m2<sup>+/-</sup>* littermate mice. (B) Colon weight from 3- and 8-week-old *Ap1m2<sup>-/-</sup>* and control *Ap1m2<sup>+/-</sup>* mice ( $n = 14$  or 18 at 3 weeks of age;  $n = 28$  or 32 at 8 weeks of age, respectively). Data are pooled from 9 independent experiments (mean and standard error of the mean). \*\* $P \leq .001$ . (C and D) Colonic tissue sections were stained with (C) H&E or with (D) alcian blue and nuclear fast red. Scale bars, 100  $\mu\text{m}$ . (E) Histologic scores from *Ap1m2<sup>-/-</sup>* mice and control *Ap1m2<sup>+/-</sup>* littermates ( $n = 4-6$  per each group) were calculated based on the criteria described in the Materials and Methods section. Data are representative of 3 independent experiments (mean and standard deviation). \*\* $P \leq .01$ . (F) Expression of cytokine mRNA in colonic tissue from 3- and 8-week-old mice was analyzed by quantitative polymerase chain reaction. Data were normalized to expression of *Actb* (encoding  $\beta$ -actin), and are presented as fold change relative to the normalized value in *Ap1m2<sup>+/-</sup>* mice. Data are pooled from 3 independent experiments with a total of 5-7 mice per group (mean and standard error of the mean). \* $P \leq .05$ , \*\* $P \leq .01$ .