

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～23年度 総合研究報告書

研究代表者 土肥 多恵子

平成24 (2012) 年 5月

総合研究報告書目次レイアウト (参考)

目 次	
I. 総合研究報告 レチノイド関連化合物の消化管免疫疾患への治療応用	----- 3
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 1 1
III. 刊行物へのリンク一覧表	----- 1 5

厚生労働科学研究費補助金(創薬基盤推進研究事業)
総合研究報告書

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RARアゴニストである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の他にも受容体選択性の高い新規合成レチノイドを合成し、さらに低分子化合物ライブラリーからスクリーニングを行って抗炎症作用を持つ化合物を探索した。これらの化合物の、免疫系への作用をマウスおよびクローン病患者を含むヒト由来の細胞で試験を行った。In vitroでの試験に加えて、マウス腹腔内炎症モデル、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低分子化合物で、マクロファージからの炎症性サイトカイン産生抑制活性を持つもの、ケモタキシス阻害効果をもつものが得られ、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。また、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、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。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。本研究成果として新たに得られたM700はじめ、新規合成レチノイド、およびスクリーニングで得られた化合物も十分にAm80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ている。

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

首藤 紘一・財団法人乙卯研究所・所長

日比 紀文・慶應義塾大学医学部内科学・教授

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。

本研究では、初年度より Am80 の免疫系、ヒトマクロファージへの作用を明らかにするとともに、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、消化管上皮細胞回転への影響の解析を開始した。また、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。22 年度は引き続き低分子化合物のスクリーニング、作用の検証に加えて Am80 の免疫系・消化管上皮細胞回転への作用をマウスおよび IBD 患者を含むヒト検体を用いて解析し、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も開始した。また、臨床試験プロトコル作製などの準備を開始した。これに基づき 23 年度に研究開始時に本研究目的として掲げ認められていた臨床試験を開始する予定であったが、厚労省事務局よりの指示により中止することとなった。薬効試験は 23 年度も引き続き行い、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機能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

I. Am80 および新規化合物の合成と探索

I-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 Flux、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。

I-2. 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合成、探索した。このうち、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。

II. Am80 および関連化合物の抗炎症効果の解析

II-1. 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、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。

II-2. 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。

II-3. 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。

II-4. 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上清のIL-4, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17, IFN- γ , TNF- α を測定した。

II-5 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。

II-6 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。

III. Am80のヒト由来細胞に対する作用

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)、③Am80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)、について検討した。

また、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。(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

I. Am80および新規化合物の合成と探索

I-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、2-10 μ Mの濃度で、50%程度の阻害効果をもつ化合物が一個選択された。この関連構造を持つ化合物20種類以上を入手し同様の試験および抗炎症作用の試験に供した。

I-2. 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。この化合物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。また、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見た。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。

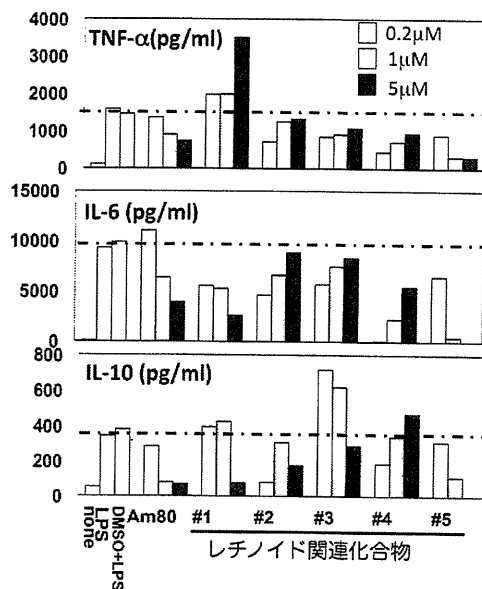
II. Am80 および関連化合物の抗炎症効果の解析

II-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、また放射線照射後の TUNEL によって検出されるアポトーシス細胞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。

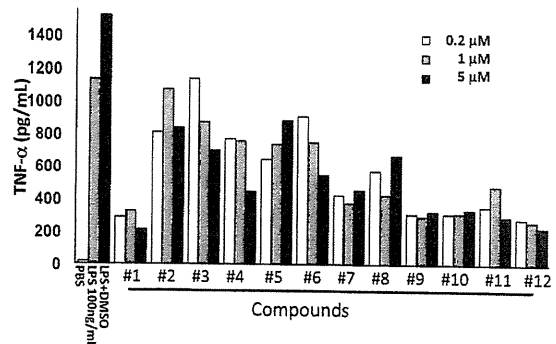
II-2. タミバロテンの連続経口（混餌）投与によって NODマウスは発症が抑制されることを既に示している、今年度においては長期(18 週)の連続投薬(混餌投与)、1 週投薬3 週休薬で18 週飼育、8 週投薬のち10 週休薬の3 グループの比較をおこなった。一日投与量は1 mg / k g（混餌）。結論は、Am80 の連続投与群は、18 週連続群も8 週投与10 週休薬群もともに、対照群に比して糖尿病の発症が抑制された。しかし、1 週投薬3 週休薬群は、大変に意外なことに、糖尿病の発生頻度が非常に高く、半数が16 週までに死亡した。連続投与群は8 週も18 週もいずれも膵臓、顎下腺におけるリンパ球浸潤の軽快がみられた。

II-3. 合成レチノイドの抗炎症活性：受容体サブクラス選択性のことなる数種の合成レチノイドについての評価を進めた。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。(図1)。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(図2)。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。

(図1) レチノイド関連化合物によるマウスマクロファージサイトカイン産生の抑制



(図2) 低分子化合物によるヒト PBMC サイトカイン産生の抑制

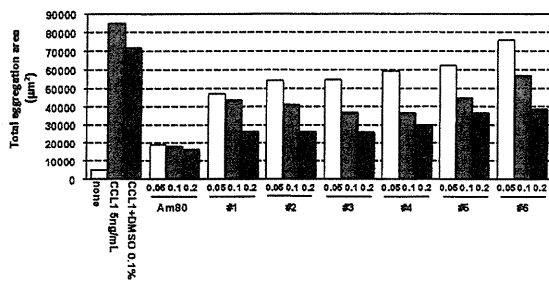


II-4. マウスにおける Am80 連続投与の効果：腹腔より回収されたマウスマクロファージが LPS 刺激後に産生するサイトカイン量は、対照群に比べて、Am80 投与群でばらつきが大きくなったが、7-14 日後には一部の炎症性サイトカイン産生の亢進が見られた。これに対して、腸間膜リンパ節 T 細胞は抗 CD3 抗体刺激に対する増殖能が抑制されており、Day 1 では、対照群で見られるクラスター形成を伴う細胞増殖が Am80 投与群でほとんど見られなかった。その効果7 日後でも持続していた。サイトカイン産生能は投与終了直後は Th1 応答の強い抑制、Th2 の促進作用が見られたがこれは7-14 日までには継続しなかった。

II-5. 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。(図3)

(図3) 合成レチノイドおよびスクリーニングで得られた低分子化合物によるマウスマクロファージケモタキシス抑制効果



II-6. *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。

III. Am80のヒト由来細胞に対する作用

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。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。

また、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 1×10^6 /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。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、T 細胞における gut-homing receptors の発現強化、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。さらに近年、RA が制御性 T 細胞を誘導するという報告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。本研究結果として、まず Am80 については、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、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、抗癌剤治療の際の副作用防止に応用できる可能性もある。

ヒト末梢血細胞を用いた研究成果よりは、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 添加 DC はそのみならず、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、維持療法としての可能性からも非常に興味深い。

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。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、本研究の成果より、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。

Am80 以外のレチノイド関連の新規化合物は RARα に選択性が高い物も得られ、スクリーニングでもヒットが見つかり、*in vitro* では抗炎症作用、マクロファージのケモタキシスを抑制作用、さらに、*in vivo* では腹腔内炎症を抑制、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 をしのぐものもあり、それぞれの特徴も明らかにされているので、今後創薬シーズとして開発の段階へと進めたい。

本研究においては本課題の開始時には 23 年度にクローン病の臨床治療を計画し承認されていたが 22 年度の終わりになって厚労省より本研究計画枠内での臨床試験は中止されたいとの申し渡しを受け、臨床試験計画は大幅な変更を余儀なくされた。このように Am80 の臨床研究にまで進展することを期待して研究を開始し、その背景となる多くの研究結果がえられたものの、臨床試験を行えなかった。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、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。また、Am80 以外にも同様な抗炎症作用を持つ新規な構造の合成レチノイドおよび低分子化合物を得た。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

- 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.
6. Burkly LC, Dohi T. The TWEAK/Fn14 Pathway in Tissue Remodeling: For Better or for Worse. *Adv Exp Med Biol* 2011;691:305-322
7. 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
8. 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.
9. 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
10. 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

11. Ito A, Muratake H, Shudo K. Novel synthesis of ureas: application of t-butylureas. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2010 Jan;58(1):82-6.
12. 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
13. 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
14. 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)
15. 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
16. 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
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. 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
22. 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
23. 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.
24. 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.
25. 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. 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)
 4. 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
 5. 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
 6. 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
 7. T Oshio, R Kawashima, YI. Kawamra, 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
 8. 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
 9. 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

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
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
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,	A retinoic acid receptor	J.Cerebral		1-13	2010

M.Hijioka, A.Hisatsune, Y. Isohama, K.Shudo, H.Katsuki	agonist Am80 rescues neurons, attenuates inflammatory reactions and improves behavioral recovery after intracerebral hemorrhage in mice	Blood Flow & Metabolism			
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
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 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
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

III. 刊行物へのリンク一覧表

Title	PMID
TWEAK/Fn14 Pathway: a nonredundant role in intestinal damage in mice through a TWEAK/intestinal epithelial cell axis	19109961
Oral administration of synthetic retinoid Am80 (Tamibarotene) decreases brain beta-amyloid peptides in APP23 mice.	19571405
Retinoic acid receptor stimulation protects midbrain dopaminergic neurons from inflammatory degeneration via BDNF-mediated signaling.	19457078
Synthetic retinoid AM80 inhibits Th17 cells and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis.	19389933
The effect of Am-80, a synthetic retinoid, on spinal cord injury-induced motor dysfunction in rats.	19182380
Oral administration of synthetic retinoid Am80 inhibits the development of type 1 diabetes in non-obese diabetic (NOD) mice	19122301
Monocyte chemoattractant protein-1 contributes to gut homeostasis and intestinal inflammation by composition of IL-10-producing regulatory macrophage subset.	20107182
TL1A produced by lamina propria macrophages induces Th1 and Th17 immune responses in cooperation with IL-23 in patients with Crohn's disease.	19834969
Th1/Th17 immune response is induced by mesenteric lymph node dendritic cells in Crohn's disease.	19632232
Human CD14+ macrophages in intestinal lamina propria exhibit potent antigen-presenting ability.	19592647
Retinoic acid contributes to the induction of IL-12-hypoproducing dendritic cells.	19340880
The TWEAK/Fn14 Pathway in Tissue Remodeling: For Better or for Worse.	21153335
An orally applicable Shiga toxin neutralizer functions in the intestine to inhibit the intracellular transport of the toxin.	19858299
The Ly49Q receptor plays a crucial role in neutrophil polarization and migration by regulating raft trafficking.	20153219
Novel synthesis of ureas: application of t-butyureas.	20045971
Synthesis and application of [1,2,5]triazepane and [1,2,5]oxadiazepane as versatile structural units for drug discovery	20606357
A retinoic acid receptor agonist Am80 rescues neurons, attenuates inflammatory reactions and improves behavioral recovery after intracerebral hemorrhage in mice	20551971
Midbrain dopaminergic neurons utilize nitric oxide/cyclic GMP signaling to recruit ERK that links retinoic acid receptor stimulation to up-regulation of BDNF.	20649843
Intracellular bacteria recognition contributes to maximal interleukin (IL)-12 production by IL-10-deficient macrophages.	21352199
Imbalance of NKp44(+)NKp46(-) and NKp44(-)NKp46(+) natural killer cells in the intestinal mucosa of patients with Crohn's disease.	20638936
The epithelia-specific membrane trafficking factor AP-1B controls gut immune homeostasis in mice	21669204
Interleukin-13 Damages Intestinal Mucosa via TWEAK and Fn14 in Mice-A Pathway Associated With Ulcerative Colitis	21893119
Natural and synthetic retinoids afford therapeutic effects on intracerebral hemorrhage in mice.	22465180
Bile acids induce monocyte differentiation toward IL-12 hypo-producing dendritic cells via a TGR5-dependent pathway.	22236403
Regulatory T Cells Suppress Development of Colitis, Blocking Differentiation of T-Helper 17 Into Alternative T-Helper 1 Cells.	21699791

