



Title	マウス炎症性腸疾患モデルにおける新規抗炎症薬3-[(dodecylthiocarbonyl)methyl]glutarimideによる炎症抑制効果に関する研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	市川, 伸樹
Description	配架番号 : 2244
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12346号
Issue Date	2016-06-30
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/62533
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Nobuki_Ichikawa_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 市 川 伸 樹

学 位 論 文 題 名

マウス炎症性腸疾患モデルにおける新規抗炎症薬

3-[(dodecylthiocarbonyl)methyl]glutarimide による炎症抑制効果に関する研究

(Studies on Anti-inflammatory Effect of 3-[(dodecylthiocarbonyl)methyl]glutarimide on Murine Models of Inflammatory Bowel Disease)

【背景と目的】潰瘍性大腸炎・クローン病に代表される慢性炎症性腸疾患（IBD）は、1980年代以降著明に漸増している難治性疾患である。近年、アミノサリチル酸、ステロイドに加え、免疫抑制剤、抗 TNF α 抗体の使用により治療成績が向上しているが、未だ難治性で、更なる治療法の開発が望まれる。IBD の原因は未解明だが、遺伝的因子と環境的因子が組み合わさって起こるとされ、その病態は、T 細胞の無秩序増殖と、主にマクロファージから放出される過剰な炎症性サイトカインによる、持続性炎症が特徴とされる。一方、3-[(dodecylthiocarbonyl)methyl]glutarimide (DTCM-G) は抗菌薬 9-methylstreptimide の誘導体で 355Da の低分子薬である。DTCM-G は RAW264.7 細胞株において、LPS 刺激による AP-1 の誘導を抑制し iNOS や COX2 の産生を抑制する事が知られる。また、mTOR 経路の阻害によって細胞周期の進展を抑制し primary T 細胞の増殖を抑制し、マウス同種心移植モデルにおいて生存率を上げる。我々は、T 細胞の増殖抑制作用とマクロファージの活性化抑制作用を併せ持つ DTCM-G が、IBD 治療において切望される、より効果的な治療薬となり得る可能性を考えた。その臨床応用にむけて、2つのマウス IBD モデルを用い、DTCM-G の腸炎抑制効果について検討し、新規 IBD 治療薬としての可能性を探索した。

【対象と方法】雄 BALB/c マウス（8 週齢、24-26g）に 150 μ l の TNBS 溶液（1.5mgTNBS/50%Et-OH）を注腸して TNBS 腸炎を誘発した。治療群は DTCM-G40 mg/kg を 1 日 2 回腹腔内投与し対照群と比較した。血便、下痢、体重減少の程度を毎日評価し、4 日目には犠牲死させた検体の腸閉塞の有無、大腸長、肉眼的な大腸炎の程度・組織学的傷害の程度、免疫染色/MPO 活性定量による好中球浸潤量の評価を行った。また、抗 CD4、CD8、F4/80 抗体による免疫組織化学染色により、腸管標本の浸潤大腸粘膜単核球 (LPMC) の種類、程度を 2、4 病日に経時的に評価した。更に、腸管から単離した LPMC を、抗 CD11b 抗体、CD4 抗体、CD8 抗体で染色し、フローサイトメトリーを用いて構成細胞の量、割合を評価した。機序解析の為、単離 LPMC に 2 μ g/ml の concanavalin A を添加して T 細胞の増殖能を評価し、また CD4 陽性 t-bet 陽性 Th1 細胞、CD4 陽性 CD25 陽性 Foxp3 陽性 Treg 細胞の割合を評価した。DSS 腸炎に於いては、雄 C57BL/6 マウス（8 週齢、22-25g）に 3%DSS を 5 日間自由飲水させて大腸炎を誘発させ、その後更に 5 日間通常の水を飲水させて継続する炎症経過を 10 日目まで観察した。治療群へは DTCM-G 20 または 40 mg/kg を

1 日 2 回腹腔内投与し対照群と比較した。腸炎の経過は血便、下痢、体重減少の程度を評価した。10 日目に犠牲死させ、組織診で腸管の傷害度を評価した。RAW264.7 細胞株を用いた実験では、7.5 μ g/ml の DTCM-G に 2 時間暴露させた後、1 μ g/ml の LPS で刺激し、24 時間後の培養上清を採取し IL-6、TNF- α の濃度を ELISA 法により評価した。また、7.5 μ g/ml の DTCM-G に 2 時間暴露させた後、1 μ g/ml の LPS で刺激し、0-45 分後の AKT、PDK1、AKT、GSK-3 β 、c-Raf、p70^{S6K} のリン酸化の程度を western blot 法により評価した。

【結果】40mg/kg の DTCM-G は TNBS 腸炎において、体重減少、血便、下痢の程度を総合した Disease Activity Index(DAI)を 2 から 4 日目に著明に軽快させた。4 日目においては体重減少の程度を軽快させ、検体では、腸炎の肉眼スコア、腸管短縮抑制の程度、腸閉塞抑制の割合、組織診、組織スコア、MPO 活性定量において、著明な腸炎抑制効果を認めた。また、免疫染色による組織診では 2 日目の F4/80 陽性マクロファージ、CD4 陽性 T 細胞および、2 日目、4 日目の MPO 陽性好中球の浸潤を抑制した。2 日目の単離 LPMC の解析では、DTCM-G は CD11b 陽性マクロファージ、CD4 陽性 T 細胞数を有意に減少させたが、LPMC 中 T 細胞の concanavalin A 刺激による増殖は抑制せず、CD4 陽性 T-bet 陽性細胞の割合や CD4 陽性 CD25 陽性 Foxp3 陽性細胞の割合を変化させなかった。一方、DTCM-G は TNBS 腸炎において、2 日目の腸管組織の TNF- α 、IL-6、MCP-1、IFN- γ の mRNA 発現を抑制した。DSS 腸炎においては、7-10 日目の体重減少、DAI を有意に軽快させ、組織評価でも、著明な腸炎抑制効果を認めた。また、DTCM-G は RAW264.7 細胞株において LPS 刺激による TNF- α 、IL-6 の産生を抑制した。DTCM-G は、LPS 刺激による AKT serine473 のリン酸化を抑制したが、下流分子 c-Raf、p70^{S6K} のリン酸化は抑制されず、GSK-3 β serine9 においてはリン酸化を亢進させた。

【考察】DTCM-G は、2 つのマウス炎症性腸疾患モデルにおいて、強力な腸炎抑制効果を発揮した。TNBS 腸炎においては、マクロファージと CD4 陽性 T 細胞の浸潤数が臨床的な炎症のピークにむけて平行して増加し、腸管における炎症性サイトカイン mRNA の発現増加はこれに伴っていた。DTCM-G がこれらを抑制したことから、DTCM-G が CD4 陽性 T 細胞やマクロファージの浸潤/活性化を抑制し、腸炎を軽快させている事が考えられた。DTCM-G は遅れて徐々に増加した好中球の浸潤も抑制したが、これは、CD4 陽性 T 細胞やマクロファージの増殖、浸潤または活性化が抑制され炎症が軽快した結果、誘導されるのではないかと考えた。過去に示されている DTCM-G の primary T 細胞の増殖と IFN- γ 産生抑制効果に反して、単離 LPMC における T 細胞の増殖抑制効果は証明できなかった。にもかかわらず、生体内では CD4 陽性 T 細胞の浸潤数や IFN- γ の mRNA 発現が抑制された事は、LPMC の解析結果が生体内での反応を反映していないか、MCP-1 などのケモカイン発現が抑えられた事で CD4 陽性 T リンパ球を含めた白血球の浸潤が抑制され、腸管内の CD4 陽性細胞が減少した可能性を考えた。一方、DTCM-G は LPS 刺激による RAW264.7 マクロファージの活性化を抑制し TNF- α 、IL-6 の産生を抑制する事が分かり、マクロファージ活性化抑制と腸炎抑制効果との関連が考えられた。その機序として GSK-3 β 活性の抑制との関連が示唆された。

【結語】DTCM-G の炎症性腸疾患における新たな治療薬としての可能性が示唆された。