HOKKAIDO UNIVERSITY

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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k12346
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/62534
Type	doctoral thesis
File Information	Nobuki_Ichikawa.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学　位　論　文

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)

2016 年 6 月

北 海 道 大 学

市川　伸樹
Nobuki Ichikawa

学　位　論　文

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)

2016 年 6 月

北 海 道 大 学

市川　伸樹
Nobuki Ichikawa

目　　次

発表論文目録および学会発表目録・・・・・・・・・・・・・・・　1 頁

緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　3 頁

略語表・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　23 頁

実験方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　27 頁

実験結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　47 頁

考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　60 頁

総括および結論・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　66 頁

謝辞・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　67 頁

引用文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　68 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した.

Nobuki Ichikawa, Kenichiro Yamashita, Tohru Funakoshi, Shin Ichihara, Moto Fukai, Masaomi Ogura, Nozomi Kobayashi, Masaaki Zaitsu, Tadashi Yoshida, Susumu Shibasaki, Yasuyuki Koshizuka, Yusuke Tsunetoshi, Masanori Sato, Takahiro Einama, Michitaka Ozaki, Kazuo Umezawa, Tomomi Suzuki, Satoru Todo. Novel anti-inflammatory agent 3-[(dodecylthiocarbonyl)-methyl]-glutarimide ameliorates murine models of inflammatory bowel disease. Inflammation Research 65, 245-260 (2016).

本研究の一部は以下の学会に発表した.

1. 市川伸樹、山下健一郎、船越徹、柴崎晋、深井原、尾崎倫孝、梅澤一夫、藤堂省:「炎症性腸疾患モデルに対する DTCM-glutarimide の効果に関する検討」第 110 回日本外科学会定期学術集会 2010 年 4 月 8-10 日名古屋
2. Ichikawa N, Yamashita K, Funakoshi T, Shibasaki S, Ichihara S, Fukai M, Suzuki T, Ozaki M, Umezawa K, Todo S A Novel Anti-Inflammatory Agent, DTCM-Glutarimide, Attenuates Experimental Colitis in Mice Digestive Disease Week 2010 May 1-5, 2010 New Orleans, LA.
3. 市川　伸樹、山下　健一郎、船越　徹、吉田　雅、小林　希、腰塚　靖之、財津　雅昭、柴崎　晋、常俊　雄介、小倉　正臣、深井　原、市原真、尾崎　倫孝、梅澤　一夫、藤堂　省:「炎症性腸疾患モデルにおける新規化合物 DTCM-G の腸炎抑制効果に関する検討」第 111 回日本外科学会定期学術集会　紙上開催
4. Ichikawa N, Yamashita K, Funakoshi T, Shibasaki S, Ichihara S, Kobayashi N, Koshizuka Y, Zaitsu M, Fukai M, Suzuki T, Ozaki M, Umezawa K, Todo S A Novel Anti-Inflammatory Agent, 3-[(dodecylthiocarbonyl)-methyl]-glutarimide, Ameliorates Murine Models of Inflammatory Bowel Disease. Digestive Disease Week

2011 May 7 - 10, 2011; Chicago, IL.

5. Ichikawa N, Yamashita K, Funakoshi T, Ichihara S, Kobayashi N, Koshizuka Y, Zaitsu M, Ogura M, Yoshida T, Tsunetoshi Y, Fukai M, Suzuki T, Ozaki M, Umezawa K, Todo S A Novel Anti-Inflammatory Agent, 3-[(dodecylthiocarbonyl)-methyl]-glutarimide, Ameliorates Murine Models of Inflammatory Bowel Disease. The 25th ISUCRS Biennial Congress June 24-26, 2012 Seoul, Bologna, Italy

緒言

1、IBD(Inflammatory Bowel Disease)の臨床

1－①　IBD とは

炎症性腸疾患（IBD）において、クローン病（CD：Crohn's Disease）と潰瘍性大腸炎（UC :Ulcerative colitis）は２つの代表的な炎症性腸疾患である。CD は、1623 年にドイツの外科医 Wilhelm Fabry によってはじめて発見され[1]、後にアメリカの内科医 Burril B Crohn によって命名された[2]。疾患は原因不明で、主として若年者にみられ、潰瘍や線維化を伴う肉芽腫性炎症性病変からなり、消化管のどの部位にも起こりうる。消化管以外（特に皮膚）にも病変が起こることがある。臨床像は病変の部位や範囲によって多彩である。発熱、栄養障害、貧血などの全身症状や関節炎、虹彩炎、肝障害などの全身性合併症がおこりうる。

UC は、イギリスの内科医 Samuel Wilks によって 1859 年に初めて報告されている[3]。これによると、UC は、主として粘膜を侵し、しばしば、びらんや潰瘍を形成する原因不明の大腸のびまん性非特異性炎症である。医科学国際組織委員では「主として粘膜と粘膜下層を侵す、大腸特に直腸の特発性、非特異炎症性疾患。30 歳以下の成人に多いが、小児や 50 歳以上の年齢層にもみられる。原因は不明で、免疫病理学的機序や心理学的要因の関与が考えられている。通常血性下痢と種々の程度の全身症状を示す。長期にわたり、かつ大腸全体を侵す場合には悪性化の傾向がある。」と定義している。多くの患者は再燃と緩解を繰り返すことから長期間の医学管理が必要となる。

1－②　IBD の疫学

CD は北ヨーロッパ、イギリス、北アメリカにおいては、約 50 年前より増加傾向を認め、現在罹患率は横ばいとなってきたが、南ヨーロッパ、アジア、発展途上国など頻度の多くない国においては、罹患率は増え続けている[4]。CD のアメリカにおける罹患率はヒスパニックで 10 万人あたり 4.1 人、アジア人で 5.6 人、白人で 43.6 人、黒人で 29.8 人となっており人種や地域による偏りを認める[5]。特に、CD、UC ともユダヤ人に多いが、人種が同一でも住んでいる場所によって罹患率が異なる[6-9]。家族歴は IBD 発症のリスクとなり得、CD では 1 親等内の CD 発症が 2.2-16.2%、IBD 発症が 5.2-22.5%、また、UC においては、1 親等内の UC 発症が 5.7-15.5%、IBD 発症が 6.6-15.8%とリスクが増加する[10]。CD の１卵生双生児において 37.3%、

UC で 10%が双生児とも発症し、CD の 2 卵生双生児において 7%、UC で 3%が双生児とも発症する [11,12]。これらは、遺伝的要因のみならず環境要因が関わっていることを示している。本邦においては、20-25 年前より IBD の増加傾向を認める。最近の有病率を示したデータはないが、厚生労働省特定疾患治療研究事業における医療受給者証登録証所持者数は、2014 年度で UC が 170781 人、CD が 40885 人、このうち 2014 年新規登録者数は UC が 15665 人、CD が 2614 人で、推定有病率は、UC で 10 万人あたり 113 人、CD で 27 人程度である。本邦における CD の好発年齢は 10 歳代後半から 20 歳代に多く、男性で 20-24 歳、女性で 15-19 歳にピークがみられる。男女比は約 2：1 で男性に多い。家族内発症は 1.5%、手術率は発症 10 年で 70.8%である。UC の発症年齢のピークは男性で 20-24 歳、女性で 25-29 歳にみられるが、若年者から高齢者まで発症する。男女比は 1：1 で性差はみられない。

1－③　IBD の臨床像

CD は、口から肛門までの全腸管にわたり、腸管の全層を侵す再発性の腸炎であり、狭窄、瘻孔、膿瘍などの合併症を伴う。初診時の発症部位は、回腸末端が 47%、大腸が 28%、回腸大腸が 21%、上部消化管が 3%であり、狭窄穿孔とも伴わないものが 70%、狭窄が 17%、穿孔（瘻孔、膿瘍）が 13%であった [13]。臨床症状は、病変部位と合併症にもよるが、下痢、腹痛、発熱、腸閉塞症状が一般的である。CD においては、病変の部位はあまり変化しないが、病勢は大きく変わり、非狭窄病変から狭窄性病変に至るものが 27%、穿孔に至るものが 29%存在する [13]。ある一時点において、活動性の低いものは 15-25%で、55-65%は寛解状態にあり、慢性的に活動状態にある CD 患者は 13-20%である。しかしながら、67-73%の CD 患者は間欠的に慢性の炎症状態に陥り、数年間寛解を維持できるのは 10-13%にすぎない [14,15]。やがて 20 年内にほとんどの患者は手術に移行する [16,17]。CD 患者の生命予後はわずかに短い（standard mortality ratio1.3(CI 1.1-1.6)観察期間 44 年）[18]

UC では、粘膜に限局した腸炎が引き起こされ、病変は大腸に限局する。直腸から連続性に口側に向かって病変が認められることが通常で、病変の範囲によって、直腸炎型、左側結腸型、全大腸型、（時に右側あるいは区域性大腸炎型）に分類される。全大腸型まで移行すると重症例となることが多い [19,20]（軽症；1 日 4 回以内の血便かつ、全身症状＝発熱、頻脈、貧血、赤沈亢進がない：　中等症；4 回から 6 回の血便、軽度の全身症状：　重症；6 回以上の血便かつ全身症状を伴う）。本邦における診断基準は、臨床症状（持

続性反復性の粘血・血便、あるいはその既往)、大腸内視鏡像（血管透見像の消失、粗ぞうまたは細顆粒状で易出血性の粘膜、粘血膿性分泌物の付着、多発性びらん、潰瘍、偽ポリポーシスがび慢性に見られる事)、注腸 X 線所見（ハウストラの消失や腸管の狭小短縮)、生検組織学的所見（活動期は、粘膜全層にびまん性の炎症細胞浸潤や陰窩膿瘍､高度の杯細胞減少が見られ、寛解期では、腺の配列異常や委縮が残存）から構成されている[21]。臨床症状と伴に特徴的な腸管病変や病理学的所見が確認でき､類縁疾患が鑑別できれば確定診断に至る。患者の半数は寛解状態にあるが、約 9 割は間欠的に増悪寛解を繰り返している。診断後初期の 3～7 年間においては、25%の患者は寛解のまま経過するが、年間に 18%ずつ再発し、総じると 57%が間欠的に再発する。10 年後の大腸切除率は 24%に及ぶ[22]。左半結腸型の半分以上の患者が 25 年の間に病変の口側進展を認める。逆に 75%の全大腸型では 25 年の間に病変の改善を認める[23]。UC 患者の生命予後は、健常人と変わらない[24,25]。

1－④　IBD の治療

<CD の寛解導入>

本邦において、CDの初診・診断時、急性増悪時寛解導入療法が第1選択となる。栄養療法には、成分栄養剤投与を中心とした経腸栄養療法と完全静脈栄養療法がある。完全静脈栄養療法は、活動性が極めて高く腸管運動を制限せざるを得ない場合、狭窄や大量出血、瘻孔、穿孔といった重篤な腸管合併症によって経腸栄養が不可能な場合、短期的に試行される。1984年O'Morainらによって、完全成分栄養療法がステロイド投与と同等の寛解導入効果があると報告され[26]、本邦では安全かつ有効な寛解導入の初期療法、更には寛解維持療法として汎用されてきた。成分栄養療法の有効性は、①腸管の安静を保つこと、②栄養状態を改善し病状の回復を早めること、③窒素源がアミノ酸の為､免疫学的抗原性を有さないこと､④腸管機能を亢進させ、免疫炎症的な惹起作用を有するとされる脂肪成分を制限していることなどが考えられている。しかし、極端な食事制限はむしろ患者の生活の質を低下させること、欧米では、ほとんど実施されていない治療法であることなどの問題点がある。コクランライブラリーのメタアナリスにおいては、CDの寛解導入においての効果は、総じてステロイドが優っていたが、精度の高い２つのstudyのみに限ると差を認めなかった（n=34 vs 35 オッズ比1.18 (0.37-3.70)）[27]。欧米において、薬物療法の第一選択は、軽症例の場合、回腸や回盲部ではステロイド（budesonide 9mg/day）[28,29]、回盲部から大腸

では、5－ASA（5-aminosalicylic acid； sulfasalazine 4000mg/day またはmesalazine3200-4000mg/day）が選択される[30-34]（これらの薬剤で無効の場合は、ステロイド（プレドニン40-60mg/day）が選択される[19,30,31,35-37]。CDの寛解導入では全体の44%の患者にステロイドが用いられ（逆に非ステロイドで56%が寛解する）[38]、4週で58%が完全寛解を得、更に26%が病状の改善を認める。1年後において、32%がステロイドの効果を持続するが、逆に28%はステロイド依存性となっている。また、40%は手術に移行する[38]。プレドニン耐性例では、Infliximab5mg/kg 0、2、6週目の投与が選択される(奏効率65%、寛解率32%) [39]。

<CD の寛解維持>

寛解維持期の食事療法としては、高脂肪摂取が推奨され[40]、脂肪の種類としては ω-3/ω-6 系脂肪酸の比率を上げることに効果があり得る（1 日 2.7g の魚油、1 年寛解維持 59%対 26%）[41]。本邦において用いられている mesalazine は、放出調節剤として、小腸から大腸全般にわたり有効な５－ASA 濃度を到達させる製剤であるとされ、臨床経験から CD 寛解導入の第 1 選択、寛解維持の第 1 選択とされている[42,43]。ステロイドの寛解維持効果は否定的とされ、Budesonide においても、寛解維持効果は 6 か月程度である[44]。ステロイド依存性症例の場合、寛解維持にアザチオプリン 2-3mg/kg、6-MP（mercaptopurine）1-1.5mg/kg、Methotrexate 25mg/week が使用される[19,35-37,45-47]。アザチオプリン、6-MP の効果発現に 17 週、Methotrexate の効果発現に 6-8 週かかる為、おもに寛解維持薬として用いられる。Infliximab は寛解維持においても有効であり、5mg/kg を 8 週毎に投与する[33,48]。瘻孔形成した CD 患者への第一選択は ciprofloxacine1000mg/day や metronidazole による抗生剤療法が推奨されるが[19,35-37]、文献的根拠はない。第 2 選択とされるアザチオプリン、6-MP はメタアナリスにおいて有効性が示唆されている[45]。Infliximab は瘻孔閉鎖においても効果を認め、以上の薬剤が無効の場合使用される[49,50]。

<UC の寛解導入>

UC の寛解導入で、軽症から中等症においての第一選択は、5-ASA であり、経口または注腸投与が行われる[19,20]。直腸炎型、左側結腸型においては、注腸製剤が有用であり[51]、時にステロイド注腸が併用される。ステロイド単剤注腸は有用であるが[51]、5-ASA 注腸の効果には及ばない[52]。また、全大腸型では、5-ASA の経口投与が行われる。活動期の UC に対する、1 日 1500mg

から 2400mg の 5-ASA で、寛解率 40-70%の効果があり、3000mg から 4800mg の投与で効果の増加は 10%程度の患者に認める[53-56]。5-ASA 製剤に 2 週間以内に反応しない症例においては、プレドニン 40mg/day から 1mg/kg/day の経口投与が行われる[35]。軽症例のほとんどは 5-ASA で寛解を得るが、中等症以上では、ステロイド導入となることが多い。Faubion によると、UC 患者の 34%はステロイド導入の適応となり(逆に 5-ASA は 66%に奏功)、このうち 4 週間で完全寛解となるものが 54%、改善傾向を認めるものが 30%ある。しかしながら、1 年後のステロイド継続症例が 49%あり、22%はステロイド依存性に、29%は手術に移行する[38]。本邦において、ステロイド依存性の場合、アザチオプリンまたは、6－MP の経口投与が追加される[57]。欧米では、Infliximab（TNF（tumor necrosis factor）α キメラモノクローナル抗体）5mg/kg が 0week、2week、6week のタイミングで併用される[58]。重症例（あるいは、2 週間のステロイド内服無効例）では、点滴静注によるステロイド投与が行われる（1-1.5mg/kg）[35]。無効時は（1-2 週間以内)、アザチオプリンまたは 6-MP 併用のもとに、中等症では、血球成分除去療法が行われるが、その効果に文献的根拠は少ない（Sands の研究では、寛解率 17% 、奏効率 44% ）[59]、重症ではシクロスポリン持続点滴静注（2-4mg/kg）が併用される[60-62]。また、ステロイド抵抗例に対して、Infliximab[63]、Tacrolims[64,65] の有用性も報告されている。劇症例（重症基準；5 回以上の排便、顕血便、37.5 度以上発熱、90 回/分以上頻脈、ヘモグロビン 10g/dl 以下貧血、赤沈 30mm/h 以上　を満たし、かつ 15 回以上/day の血性下痢持続、38 度以上発熱持続、白血球数 10000 以上、強い腹痛の 4 項をすべて満たすもの）においては、絶飲食、プレドニン 1-1.5mg/日静注あるいは、上下腸間膜動脈動注 10-20mg、広域スペクトラム抗生物質、全身管理が行われるが、改善のないものや、中毒性巨大結腸症を来したものは時期を逸せず手術が必要となる[57]。

<UC の寛解維持>

UC の寛解維持療法としては、5-ASA の経口（あるいは注腸）投与が行われる。ステロイドは寛解維持における効果を認めないため[66-69]、5-10mg/週程度の減量が必要である。5-ASA 投与中に再燃を認めたもの、ステロイド依存性のもの、重症例で寛解導入にシクロスポリンやタクロリムスが使用されたのもでは、アザチオプリン 2-3mg/kg または 6-MP1-1.5mg/kg の投与が行われる[35,70-72]。Infliximab はステロイド依存性や 5-ASA、アザチオプリン、6-MP 無効例の寛解維持に有効である[58]。Methotrexate は UC には

奏功しない[73]。

1－⑤　臨床上の問題点

IBD 治療において、寛解導入に最も重要な役割を果たすのはステロイドであり、5-ASA などの非ステロイド療法により寛解の得られない患者においてステロイド投与がなされる。Faubion によると、クローン病においては全体の 44%の患者にステロイドが用いられるが、16%はステロイドが奏効せず、28%がステロイド依存性となる[38]。また、UC 患者においても、34%はステロイド導入の適応となり、16%はステロイドが奏功せず 22%がステロイド依存性になる。一方、ステロイドの使用は、重症合併症を引き起こし、IBD 患者の死亡率をあげている[74]。難治性症例に対するステロイド耐性、依存性症例をいかに治療するかが、臨床上の一つの大きな問題点である。慢性関節リウマチにおいて臨床応用され[75]、クローン病へと適応拡大された抗 TNF-αキメラモノクローナル抗体、infliximab は、ステロイド耐性、依存性症例を含む難治性クローン病患者の寛解導入、寛解維持に劇的な効果（寛解導入 58-62%、44 週-54 週の長期寛解維持 38-52%）を発揮したが[39,76,77]、ステロイド離脱率は 29%のみであった[77]。近年、Infliximab の初回治療からの使用（アザチオプリンとの併用）は、従来のステップアップ方式の治療法と同等以上の効果が得られ、52 週においてのステロイド非使用非手術寛解率は有意に高く（61%42%）、104 週においても同等の寛解維持がなされると報告されたが、難治性患者における長期経過中のステロイド使用率に有意差は認めておらず、ステロイド耐性、依存性といった問題は、依然として大きな問題と言える。同時に、劇的な効果といわれる Infliximab においても、35-38%の難治性症例初回非奏功例[39,76]、48-62%の長期寛解維持離脱例[76,77]が存在する事は事実であり、Infliximab 耐性に対する新規治療法の開発も望まれるところである。

2、腸管免疫と IBD の病態

2-①　獲得免疫

＜T 細胞＞

IBD においては、活性化された Tcell の apotosis が十分に行われず Tcell が無秩序増殖し、慢性的な炎症が持続すると報告される[78,79]。古典的には、

CD においては Th（Helper T cell）1 で優位、UC においては Th2 優位な免疫反応が起こるとされる。IL（interleukin）-12 によって Th1 が誘導され、Th1 は、IFN(interferon)-γ、（TNF-α）を産生し、マクロファージの活性化と肉芽腫の形成を伴った遅延型過敏反応を誘導し、また IL-1, TNF-α, IL-6 を産生させる。一方、IL-4 は、Th2 を誘導し、IL-4、IL-5、IL-10、IL-13 の産生と液性免疫、アレルギー性の過敏反応を誘導する。炎症時の腸管上皮からは IL-1,IL-6,IL-8、TNF-α といった炎症性サイトカインが多く検出される。IL-1、TNF-α、IFN-γ は血管内皮細胞を活性化し、接着因子、ケモカインによって血管内の作動性細胞の動員を促し、炎症が増幅され、フリーラジカル、炎症性因子、酵素によって炎症が波及していく [80]。

＜Th1＞

CD 患者の腸管粘膜においては、IL-12 レベルの上昇と IFN-γ を産生する Tcell の増殖が認められ、CD 患者の LPMC(lamina propria mononuclear cells)においては IL-12 の産生が認められる [81,82]。IL-12 は p40 と p35 の heterodimer で単球、マクロファージ、DC（dendritic cell）から産生される [83]。IL-12p40 の抑制は、組織の IFN-γ、TNF-α の産生を減らし、T 細胞の apotosis を促進し、TNBS（2,4,6Trinitrobenzenesulfonic acid solution）腸炎の軽快、臨床においても CD の軽快を認めている [84-86]。IL-12 レセプターは β1 と β2 からなるが、CD の LP（lamina propria）-T 細胞の β2 サブユニットの高発現を認め、IL-12 レセプターの刺激で活性化される転写因子 STAT(Signal Transduction and Activator of Transcription)4 も高発現している [87]。動物モデルにおいて、STAT4 ノックアウトにより STAT4 の刺激で活性化される IFN-γ の産生がおさえられ、逆に STAT4 高発現マウスにおいては、IFN-γ、TNF-α 産生 CD4 陽性 T 細胞のびまん性浸潤を認める [88,89]。また、CD 患者の LP-T 細胞においては、転写因子 T-bet が高発現し [90]、IFN-γ の転写活性が促進され、IL-12Rβ2 の転写も促進している [91]。

＜Th2＞

UC の病態はよく分かっていないが、非典型的な Th2 優位の免疫反応が起こっており、IL-5,TGF（Transforming growth factor）-β の産生が亢進し、IL-4 の産生は抑制されている [92-95]。血中、組織中の TNF-α 濃度は上昇しており、LPMC の TNF-α 産生も増加している [95,96]、T 細胞の capsase を介したアポトーシスは減少している [97]。Th2 腸炎モデルにおいて IL-13 産生する NK（natural killer）T 細胞が特徴的で [98]、UC 患者の biopsy では

CD1d に誘導される NKTcell（atypical　CD161+CD1d+）を認め[99]、また、IL-13 による上皮透過性の亢進を認めた為[100,101]、UC において NKT および IL-13 が重要な役割を果たしていると考えられている。また、IL-13 は、上皮のアポトーシス、修復の遅延もと引き起こしている[101]。IL-13 は IL-13α2 レセプターを介し、TGF-β1 の産生、AP-1（Activator protein-1）を介した線維化の過程にも関わる[102,103]。また、ステロイド感受性および軽症-中等症 UC では active、inactive、健常の順に IL-6、IL-8、IL-10、TNF-α の産生も亢進しており、血球成分除去療法で IL-6,IL-8 産生が mRNA(messenger ribonucleic acid)レベルで有意に減少する[104]。重症例では IL-17 も上昇している[105] 神経系もまた、腸管グリアと上皮細胞、好酸球、マスト細胞の相互作用や、サブスタンス P、ヒスタミン、ニューロキニン、セロトニンなどによって、炎症の惹起、広がり、疼痛の出現などに関わっていると言われる。UC においては、腸管神経の変化が認められている[106]。またストレスなど交感神経の過度の緊張により、マスト細胞の脱顆粒、IFN-γ 産生の増加、細胞結合タンパクの変化 を伴った上皮の透過性亢進を認める[107,108]。

＜Th17＞

CD との関係が強く示唆されるエフェクターT 細胞として、IL-17A,IL-17F の分泌を特徴とする Th17 が存在する[105,109]。Th17 は、IL-23 によって誘導され、IL-17 を産生する新しいヘルパーT 細胞として 2003 年に初めて報告された[110]。ナイーブ Th は TGFβ の存在下で Th17 または Treg（regulatory T　cell）へ分化するが、IL-6、IL-21、IL-23 の作用が加わると転写因子 Foxp3(Forkhead Box P3)が抑制され、転写因子 RORγt(retinoic acid receptoe related orphan receptor γt)の作用で Th17 へ分化する。IL-23 は Th0 の IL-23R と結合により JAK2(Janus kinase 2)が自己リン酸化し、IL-23R をリン酸化する。結果、STAT3 がリン酸化、2 量体化し転写因子として働いて Th17 への分化を促すという経路が想定されている[111]。ただし、ナイーブ T 細胞に IL-23 レセプターは存在せず、その作用は、Th17 の分化作用を増幅させることである[110]。また、STAT5 は Th17 分化の抑制に働くとされる。逆に TGFβ の存在下で Foxp3 が発現すると Treg に分化する[112,113]。IFN-γ、IL-4 すなわち、Th1、Th2 によって Th17 は抑制される[114]。Th17 は CD で多く発現し、UC では重症例のみ、健常時の発現は認めない[105,115]。TNBS 腸炎モデルにおいて、IL-17R ノックアウト群の炎症軽快を認め、CD の病態における IL-17 の関与が示されている[116]。

IL-23 は、p19 と p40 からなる heterodimer で、p40 を IL-12 と共有する

サイトカインで[117]、CD 患者の腸管粘膜からは IL-23 の上昇がみられる[118]。クロモソーム 1p31 67Mb における IL-23R の変異が IBD 患者で報告され[119]、CD 患者においては、IL-23R 経路に関わる IL-12B、STAT3、JAK2 の変異も認められる。IL-23R は、RORγt（retinoic acid receptoe related orphan receptor γt）による調節のもとに Th17 細胞において高頻度に発現する[113,120]。また、UC においても IL-23R の変異が報告される[121]。

＜制御性 T 細胞(Treg)＞

エフェクターT 細胞と抑制性 T 細胞のバランスが崩れることが IBD の誘引とも考えられているが、抑制性 T 細胞の量的異常は指摘されるものの、Treg 自体の機能異常は報告されていない。inactive＜active な腸炎の状態で、組織、末梢血中の CD4+CD25high/Foxp3 陽性細胞の割合は減少している[122]。しかしながら、CD 患者の末梢血および大腸粘膜中の Treg は、健常者と同様の Tcell 増殖抑制効果、抗 TNF-α 産生効果、抗 Th1 分化効果を有する[123]。IL-6R の存在下では、FoxP3 の誘導は阻害され[124]、Treg の割合が減少していると考えられる。また、動物モデルにおける Th1 腸炎では、Fas/Fas ligand を介して Treg のアポトーシスが誘導されている[125]。また、IBD 患者の LPMC においては、転写因子 Smad7 が高発現しており、Treg の作用により活性化を抑制されないとの報告もある[126]。また、Retinoid Acid は Treg 分化に関与する[127-129] 。

＜樹状細胞（dendric cell; DC）＞

炎症下の DC は、MHC(major histocompatibility complex)や CD80、CD86 といった Co-Stimulateing molecle の数を増やし、TLR（Toll-like receptor）刺激に対する反応性を増加させ、ナイーブ T 細胞を Th1,Th2,Th17 といったエフェクターT 細胞や NKT 細胞に分化させると考えられている。また、リポソームにおける抗原精製能を活性化し、向炎症性のサイトカインを産生する[130]。IBD 患者の DC では、非炎症下で抑制されている、組織の TLR2、TRL4、 CD40 の発現が増加し、また CD では IL-12、IL-6 の産生増加している[131]。また、動物モデルで活性化 DC の生存期間の延長が示され[132,133]、これに、 RANK (recepter activator of NFκB（nuclear factor-kappa B）)-RANK ligand 経路の関与が言われる[134]。また、CD 患者では粘膜内の DC 数が増加している。主に CD83 陽性の成熟 DC が増加し[135]、炎症の遷延に関与している。またこれらの CD83 陽性 DC は CCR（CC chemokine receptors）7 とそのリガンド CCL（CC Chemokine Ligand）19、CCL21

を高発現している[135]。また、活性化されたT細胞にα4β7インテグリン、CCR9といったホーミングマーカーを誘導する[136,137]。活動期は寛回期より末梢血中の幼弱DCの割合も減少していることから、腸管に停在するDCが契機となり、腸管にホーミングするT細胞を繰り返し活性化し、炎症が再燃する可能性が示唆されている[138]。

2-②　自然免疫

＜食細胞とIg(immunoglobulin)A＞

下部消化管において、常在菌はマクロファージによって即時に殺されるが、DCによって取り込まれた常在菌は数日間DC内に保持され、DCはIgAの産生を誘導するとともに非炎症性の作用をする。IgAは常在細菌叢の変化に応じてヘルパーT細胞を介さずに産生調節され、粘膜の自浄作用を担っている[139]。この、自然免疫における細胞貪食作用の異常とIBDとの関連が考えられる。クロモソーム2q37 231MbのATG（autophagy-related genes）16L1タンパクの変異はCDの発症に関与するといわれる[140]。ATGタンパクは自食作用にかかわり、その異常により病原細菌の細胞内増殖を許し、腸管粘膜の細菌クリアランスを下げると考えられる。またATGは、上皮細胞や抗原提示細胞、CD4、CD8、CD19細胞にも存在し、獲得免疫における提示抗原の精製も調節している[141]。5q33 150MbのIRGM(Immunity-related GTPase family M protein)タンパクも細菌の自食と排出に関わり[142]、その変異もCD発症への関与が言われている[143]。

＜PPR（Pattern-Recognition Receptor）＞

上皮細胞、DC、マクロファージにおいては、TLR（Toll-like receptor)、NOD（nucleotide-binding oligomerization domain）などのPPRによって細菌特有のlipopolysaccaride（TLR4）, peptidoglycan（TLR2）, flagelin（TLR5), dsRNA(double-stranded RNA)（TLR3)、ssRNA(Single-stranded RNA)（TLR7,8)、CpGDNA(Deoxyribo Nucleic Acid)(TLR9）などが認識される。

TLRは大腸粘膜cell lineにおいてはTLR1-10のが確認されている[144]。健常な腸管上皮では、TRL3と基底側にTRL5が発現し、TRL2、TRL4は稀である。CDでは、TRL3が減少し、CD、UCいずれでもTRL4が増加している[145]。また、TRL9が発現し、バクテリアDNAと直接反応してIL-8

を分泌し、顆粒球を誘引する[146]。通常抑制されているTRL5もflagellinと結合し炎症を引き起こす[147]。上皮細胞内のNOD2も病原抗原に対する反応と同様に、ポジティブフィードバックによって自己増殖し、NFκB経路を賦活する[148,149]。

TRL４は、LPS（lipopolysaccharide）をリガンドとし、また、corecepterとしてCD14を必要とすることが特徴である[150]。ヒト大腸粘膜セルラインにおいて、TLR2、TLR4 はアダプタータンパク IRAK(Interleukin-1 receptor-associated kinase)や下流で MAPK(mitogen-activated protein kinasenase)（ERK(extracellular signal-regulated kinase)、JNK（c-Jun N-terminal kinase)）を活性化し、IL-8の産生を促進したが、この効果は、TLR2,4同時同量刺激や、培養を続けた場合はToll-interacting proteinの発現増加とともにダウンレギュレートされる[144]。

NODはC末端のLRR(leucine-rich-repeat)と呼ばれるドメイン、中央のNODドメイン、N末端のCARD（caspase-recruitment-domains）の3要素からなる。LRRが抗原認識（MDP：muramyl dipeptide）し、NODがATP(adenosine triphosphate)ase活性により自己oligomerisationを行い、CARDはTAK1（transforming groth factor-β-activated kinase 1）下流のシグナル伝達系に作用してNFκBやcapsaseを活性化させる。CARDドメインが１つあるか２つあるかによってNOD1とNOD2に分類される。一方、TLR2は、ペプチドグリカン刺激によってMyD88(myeloid differentiation primary protein 88)、IRAK(Interleukin 1-recepter associated kinase)、TRAF6（TNF-recepter-associated factor 6)、TAK1、IKK（inhibitor of NFκB kinase）複合体を介してシグナル伝達しNFκBを活性化させる[151]。クロモソーム16q12 49MbのNOD2遺伝子変異はCDの発症に関与するといわれる[152,153]。他にNOD1 [154]、TLR4 [155]、TLR9[156]の変異が知られている。また、Watanabe らによると、マウスの脾細胞においては、NOD2 はTLR2刺激からNFκBを介してTh1反応を抑制したと報告し[157]、NOD2の変異や欠落によってTh1反応が亢進している可能性が示されている。

＜マクロファージ＞

非炎症状態における腸管内のCX3CR(CX3 chemokine receptors)1陽性の単核食細胞がマクロファージである。腸管内LP(lamina propria)のマクロファージは,貪食殺菌能を保持し、腸管上皮を越えて侵入しようとするバクテリアを非炎症性に食作用で殺菌するが[158-160]、CD14を欠きTLR4に対する反応せず、炎症性サイトカインを産生しない[161]。また、IL-10などの

抗炎症性サイトカインを産生し、Th1、Th17 を誘導しない [150,162]。一方、炎症下において、CCR2 陽性のマクロファージが CCL2 などの化学走性に従って血中から浸潤し [163-167]、IL-1、IL-6、TNF-α、などの炎症性サイトカインを産生する [167-171]。CD,UC いずれにおいても、粘膜下マクロファージに健常下においては認めない TLR2、TLR4、TLR5 の発現を認める [172]。

＜好中球＞

CD,UC のいずれの組織像においても、好中球（PMN：polymolphonuclear neutrophil）の浸潤と上皮破壊が特徴的である [173-175]。IBD 患者の末梢血から採取した PMN は LPS 刺激に対して、可逆性の（IL-10 で抑制される）IL-1β、TNF-α 分泌能を獲得している [176]。一方、CD 患者特に回腸 CD の穿孔狭窄例で抗 GM-CSF （Granulocyte Macrophage colony-stimulating Factor）抗体が増加しており、貪食能の低下を認める [177]。CD 患者の末梢血中の PMN は、接着能、酸化還元能が低下しており、TNF-α の存在下においてもスーパーオキシダントの産生が少なく、GM-CSF の存在下で産生能は回復する [178]。CD では、皮膚、直腸、回腸への損傷で好中球の局所集積が悪く、IL-8、IL-1β の産生が低下している [179]。

＜サイトカイン＞

a）<u>TNF-α</u>

TNF-α は、17kD の炎症性サイトカインで、活性化されたマクロファージ、単球、慢性的に活性化された T 細胞で産生され、クローン病の病因の中でも非常に重要な位置を占める [39,49,180]。TNF-α の発現は、CD のマクロファージにおいても、UC もマクロファージにおいても認められる。IBD において、血中 TNF-α は病勢を反映している [181]。Infliximab をはじめとする抗 TNF-α 療法により CD の劇的改善が見られ [76]、大腸粘膜のバイオプシーでは IFN-γ 陽性 LPMC が減少している [182]。TNF-α は、IL-1β、IL-6 産生を増加、接着因子の発現増加、線維芽細胞の増殖を促進する [183-185]。また、TNF-α、IFN-γ は炎症性腸管において腸管上皮細胞、LPMC の TRAIL（TNF related apotosis inducing ligand）を発現を増加させ、アポトーシスを誘導する [186]。しかし IBD においては、活性化された T 細胞の apotosis が十分に行われず、慢性的な炎症が持続する [78,79]。TNF-α は NFκB、AP-1 を活性化させ抗アポトーシスサイトカインを誘導する [187]。逆に抗 TNF-α 抗体である Infliximab は、CD においてモノサイトや T 細胞のアポトーシスを増加させる [188,189]。

b) IL-1

IL-1 には IL-1α と IL-1β があり、いずれも様々な細胞で産生され、IL-1Ra レセプターを介して COX2(Cyclooxygenase 2)、phsoholipase A, iNOS(inducible nitric oxide synthase)の産生を促す[190]。腸管の macrophage は IL-1 convert enzyme が活性化できない為、前駆体が IL-1β に変換されないが、IBD における macrophage では IL-1 convert enzyme の活性化により IL-1β が放出される[191]。また、IL-1 の増加は IL-1Ra の産生増加により拮抗され、ダウンレギュレーションされ、IBD 患者においても血中 IL-1Ra は増加している[192]。しかしながら、active な IBD 患者においては IL-1Ra/IL-1 比は減少している[193]。

c) IL-6

IL-6 は、可溶性 IL-6 レセプター（sIL-6R）と結合し、gp130 タンパクを発現する細胞に作用する。CD および UC 患者の LPMC からは高濃度の IL-6 が検出される[96]。血中からも IL-6 は検出されるが[194]、CD においても UD においても IL-6R 濃度ががより病勢を反映する[195]。また、IL-6 血中濃度は再発リスクを反映し、20pg/ml 以上ではリスクが高いとされている[196]。別の研究においては、IL-6 血中濃度はステロイド治療中 CD 患者の CDAI（Crohn's Disease Activity Index）、寛解後の再発率と相関がみられる[197]。IBD において IL-6 は、T 細胞の anti-apotosis 状態を促進する[198,199]。刺激伝達には転写因子 STAT3 が関与する。IL-6 経路のブロックは、T 細胞のアポトーシス促進に加え、IFN-γ、TNF-α、IL-1β の産生を抑制する[197,200-202]。また、IL-6 は NFκB を介して ICAM（intercellular adhesion molecule）1 の発現を促進する[203]。動物モデルにおいて、CCL4、CCL5、CCR3、CCR4、CCR5、CXCR3 の発現を促進する[204]。

d) IL-17

IL-17 は TNF-α、IL-6、IL-1β の産生を誘導し、炎症を増幅させる[114,205,206]。更に Th17 自身も産生する TNF-α は、転写因子 C/EBP(CCAAT-enhancer-binding protein)δ を介して IL-17 と相乗的に働き IL-6 の産生を促進する[206]。IL-17 は大腸組織からの MIP(macrophage inflammatory protein)1α、MIP1β、MIP2 といった好中球を誘導するケモカイン産生を促進させ、また、T 細胞を誘導する RANTES(regulated on activation, normal T cell expressed and secreted)、マクロファージ、好酸

球を誘導するMCP1(monocyte chemotactic protein -1)の産生を促進させる[114,116]。

e) IL-10

IL-10は、抗原提示と炎症性サイトカインの産生（IL-12,IFN-γなど）を共に抑制する。IL-10はTregなどのリンパ球で産生される[207]。抗炎症性のサイトカインに分類されるIL-4は、Th2の分化を誘導し、また、CDやUCの患者の末梢血単球細胞からのVEGF(vascular endothelial growth factor)産生を抑制する。IBDにおいて、EGF(Epidermal Growth Factor)、Insulin-like groth factor, fibroblast groth factor、VEGFの産生を促進し粘膜保護や粘膜修復の方向に作用するTGFβの産生は、Smad7の高発現により抑制されている[208]。

f) ケモカイン

ケモカインは、ヘパリン結合性の小タンパクで、循環中の白血球を炎症部位や障害部位に誘導する働きをする。ケモカインは、7回膜貫通型のレセプターに結合し、結合したレセプターの種類によって働きが決まる。ケモカインは構造によって分類される。CCケモカインには、CCL2（MCP-1）、CCL3（MIP1α）、CCL4（MIP1β）、RANTESなどがある。CCL2,7,8,13、単球を誘導する。この中で、CCL2,13はCCR2のみ結合するが、CCL8はCCR2,5とCCL7はCCR1,2,3と結合する。それぞれのはっきりとした違いは分かっていないが、CCL2は、単球の浸潤に非常に重要な役割を果たし、ノックアウトマウスにおいては、単球が誘導されない。CCL2は、好塩基球、好酸球の誘導と脱顆粒を促す。CCL2ノックアウトマウスにおいては、Th1,2から放出されるサイトカインの産生が抑制される[209,210]。CCR7とそのリガンドCCL19,21は、抗原提示細胞からT細胞への抗原提示において重要な役割を果たす[211-213]。抗原提示能をもった抗原提示細胞やナイーブT細胞はCCR7を発現し[214]、CCL19,21に誘導されてリンパ節に侵入する。CCR7、CCL19,21の発現しないマウスモデにおいては、T細胞を介した免疫反応が起こらない[215]。B細胞とTh細胞の相互作用においてもB細胞のCCR7発現が関与する[216]。CCR9は腸管のホーミングマーカーで$\alpha_4\beta_7$-インテグリンと結合する。また、CXCケモカインの中でCXCL8（IL-8）は多形核白血球を急性炎症の場へ誘導する。CX_3Cケモカインは、CX_3CL1(fractalkine)が唯一で、細胞接着の働きがあり、血流の流れの中でも細胞を固着させる。可溶性のケモカインであるCXCL16もまた、細胞接着に働く。CXCL16は

DC やマクロファージに発現し、抗原提示細胞から T 細胞の相互作用に働く[217]。

3、新規 IBD 治療薬

3 – ①　抗 TNF-α 抗体

Adalimumab：完全ヒト型抗 TNF-α 抗体。抗抗体の産生減少が期待される。20mg、40mg、80mg（それぞれ初回倍量投与）の 2 週毎皮下注で寛解率がそれぞれ 18%、24%、36%（p=0.01 vs プラセボ 12%）であった[218]。Clinical phaseⅢトライアルでは 40mg の毎週投与または隔週投与でともに 88%の奏効率を認め、26 週各群 47%、40%（プラセボ 17%）、56 週で 41%、36%（プラセボ 12%）との寛解率を維持した。また 56 週で 23%、26%（プラセボ 6%）のステロイド離脱を得た[219]。Infliximab 耐性例に対しては、0 週 160mg、2 週 80mg 投与群の 4 週目寛解率は 21%に対し、プラセボ群 7%で、infliximab 耐性例においては、寛解率が低下する傾向を認めた[220]。抗 TNF-α 抗体として Certolizumab-pegol、可溶型抗 TNF-α レセプター抗体の Etanercept がある。Certolizumab-pegol は infliximab や adalimumab と同等の効果があるが[221,222]、Etanercept は CD においては無効である[223,224]。

3 – ②　接着因子阻害剤

Natalizumab：抗 α4integurin 抗体。中等-難治性 CD 患者に対し、0,4,8 週 300mg 投与群（n=724）とプラセボ群（n=181）を 10 週目の短期成績で評価したところ、response 率（56%vs49%）寛解率（37%vs30%）とも変わらなかった。しかし、ENACT2 試験において、この ENACT1 試験の奏功した 300 例に対し 300mg 投与を 56 週まで 4 週ごと継続した群とプラセボ投与した群に均等に無作為割り付けし比較したところ、36 週において投与群の 61%に奏功し 44%に寛解がみられた（プラセボ群奏効率 28%、寛解率 26%）[225]。別のトライアル（n=510）においても中等-難治性 CD 患者に対し、同様の投与スケジュールで評価され、初回投与で投与群 51%、プラセボ群 37%の奏功が得られ、8 週 12 週においても寛解率に差が見られた[226]。Natalizumab は 2005 年 2 月に市場に出回ったが、progressive multifocal leukoencephalopathy の発症が報告され（17.9 か月間投与で 1/1000 の確立[227]）、現在はアメリカのみで厳重監視のもと使用可能である。

MLN-0002：抗 α4β7integrin 抗体。181 人の難治性 UC 患者が参加した RCT（Randomized control trial）において、0.5mg/kg、2.0mg/kg28 日毎投与とプラセボ群が比較され[228]、6 週目において、寛解率はそれぞれ 33%、32%、14%であった。2 か月における寛解率は 28%、12%、8%で有意な効果を認めた。寛解率の低さは抗抗体の出現による可能性が考察されている[229]。

rhuMab-β7：抗 β7integrine 抗体、CCX282B：抗 CCR9 抗体、PF005476559：抗 MadCAM-1(mucosal addressin cell adhesion molecule-1)抗体。臨床研究へ導入中である。

3－③　抗サイトカイン抗体

ABT-874 、ustekinumab：抗 IL-12p40 抗体。CDAI 220-450 の CD 患者 79 名に対して ABT-874 の 1mg/kg、3mg/kg を 4 週毎投与、隔週投与する群とプラセボ群で比較した phase2 試験において、3mg/kg 隔週投与において response 率 75%、寛解率 38%の結果を得た（プラセボ response25%、寛解 0%）[86]。Ustekinumab の double-blind cross trial では 0-3 週プラセボ、8-11 週治療 90mg 皮下注群①、0-3 治療、3-11 週プラセボ群②、0 週目プラセボ 8 週目治療 4.5mg/kg 静注群③、 8 週目プラセボ 0 週目治療群④で、①②③④の結果を総合して評価された。皮下注 4 週目、6 週目での奏効率はともに 53vs30%と有意な効果が得られた[230]。

Fontolizumab:抗 IFN-γ 抗体。CDAI250-400 の CD 患者 45 人に対し 0.1mg/kg、1.0mg/kg、4mg/kg の 1 回投与を行ったところ、29 日までに、プラセボ群で 40%寛解、60%の奏効率を得た為、投与群と差が出なかった。しかしながら、4mg/kg 投与群では有意な内視鏡所見の改善と CRP（C-reactive protein）の低下を認めた[231]。他の phaseⅡでは、CDAI250-400 の CD 患者 133 人に対し、4mg/kg、10mg/kg4 週毎投与とプラセボ群で比較し、28 日目では差を認めなかったが、56 日目ではそれぞれ 69%、67%の奏功率を得、プラセボの 32%に比較しすぐれていた[232]。

Tocilizumab:抗 IL-6R 抗体。Ito らによると、CDAI150 以上の CD 患者 36 人に対して、8mg/kg を 2 週毎 12 週間の静注投与し、80%の response と 20%の寛解を得た。（プラセボは response30%、寛解 0%）。また、4 週毎の投与でも奏功率が 42%と 2 週毎投与と変化はなかった。治療群の生検で LPMC のアポトーシスを高率に認めた[233]。

3－④　抗炎症性サイトカイン刺激療法

IL-10：動物モデルにおいて、IL-10 産生 Lactococcus lactis 経口投与で局所の IL-10 濃度上昇と腸炎抑制効果を認め[234]、phase1 試験が行われている[235]。

IFNß1a：44mcg、66mcg、プラセボで週 3 回 8 週間の皮下投与で比較し、12 週目に評価したが、プラセボ群と比較し寛解率に差を認めなかった[236]。

3 – ⑤　抗 Tcell activation

Visilizumab:抗 CD3ε 抗体。難治性 UC 患者において、15、10μg/kg 2 連日の静注投与において 15μg 投与群では 7／8 例に 1 か月後の寛解、10μg 投与群で 2/2 例の 15 日後寛解を認めた[237]。10μg 投与群に 22 例を追加し、30 日目において 66%の寛解、84%の奏功率を認めた。1 年後に 22 例中 10 例は腸切を免れたが、腸切までの中央値は 160 日であった。しかし、Phase3 無作為 2 重盲検試験において腸切率に変化がなかった為、臨床応用への道は閉ざされた[238]。

Ch5D12:キメラ抗 CD40 抗体。18 名の CD 患者への投与において 72%の奏効率と 22%の寛解を認めたが[239]、プラセボ群がなく評価は難しい。

Daclizumab：ヒト化抗 CD25 抗体。Van Assche によると、159 名の中等度 UC 患者に対し、1mg/kg の 0,4 週投与、2mg/kg の 0,2,4,6 週投与とプラセボで比較したが効果を認めなかった[240]。(8 週の寛解率が 1mg で 2%、2mg で 7%、プラセボ群で 10%、奏功率がそれぞれ 25%、33%、44%)

Abatacept:B7-CD28pathway 阻害薬、Basiliximab(シムレクト)：キメラ抗 CD25 抗体の IBD への応用が期待されている。臨床研究導入中。

3 – ⑥　自然免疫の賦活化

Sargramostim: GM-CSF。腸管の自然免疫を活性化する。NCT00206596 トライアルにおいて、中—難治性ステロイド使用 CD 患者において（対象症例 124 例)、6μg/kg の連日皮下注投与で 22 週観察を行っている。エンドポイントは、ステロイド離脱奏功率および寛解率である。4 週目の経過では寛解率 18.6%対 4.9%、奏効率 23.3% 対 4.9%と効果を認めている[241]。

3 – ⑦　PPAR（peroxisome proliferator-activated receptors）γ agonist

PPAR は、nuclear hormone receptor superfamily の転写因子の 1 つである[242]。糖尿病治療薬 Thiazolidinedione が PPAR の γ サブタイプのリガンドの 1 つとして知られる。PPARγ は脂肪組織と大腸の上皮細胞に多く発現

しているが[243,244]大腸における役割は不明である。PPARγagonistは、動物モデルで腸炎抑制効果を認め[244,245]、IL-1β、TNF-αなどの炎症性サイトカイン産生を抑制するとともに、炎症細胞の増殖や接着因子の発現も抑制する[244,245]。また、上皮の結合性を維持し、IgAの産生を維持する[246]。IBDにおいては、UC患者において、PPARγの変異は認めなかったが、発現の減少を認めた[247]。CDにおいては、PPARγに関連するスニプスが示唆されている[248]。メカニズムの一つとしてPPARγはNFκBのサブユニットであるRelAを核外へ排出することにより抗炎症作用を示す[249,250]。腸内細菌Bacteroides vulgatusはPPARγ活性を増加させる[249]。 Rosiglitazone[251]の多施設共同無作為抽出2重盲検試験。対象症例105例の軽度～中等度のUC患者。12週間の1日2回4mgずつの経口投与群対プラセボ群で比較した。12週目における奏功率が 44%対23%、寛解率が 17% 対 2%と有意に優れていた。しかし、内視鏡的寛解においては8% 対 2%と差を認めなかった。

3－⑧　抗MAPK

RDP58：MyD88–IRAK–TRAF6 を抑制しMAPK系シグナルの上流を抑制する抗炎症性ペプチドである。①軽症から中等症の活動性UC例34例に対しプラセボとRDP58 200mg とRDP58 300mgを1：1：1に無作為割り付けし多施設共同の二重盲検試験を行ったところ、RDP58 200mg とRDP58 300mg 群でプラセボ群に対し有意な内視鏡的スコアの軽快を認めた（71%対72%対43%）[252]。

Semapimod：MAPKのリン酸化との結合を抑制する890Daの小分子である。中等症から重症のCD152名をプラセボ群、Semapimod 60mg1日投与群、Semapimod 3 日投与群に無作為割り付けし二重盲検試験を行ってCDAIに有意な改善を認めなかったが、その後オープンラベル試験に移行して比較した6日間投与、9日間投与群ではCDAIにおいて有意な軽快を認めた[253,254] 。

4、まとめ

IBD の原因は遺伝的因子、環境的因子など様々な仮説があるにもかかわらず、未だ判明していない。しかしながら、腸管免疫系のあらゆる場面で免疫が破綻している。結果、慢性的に、好中球の遊走とT 細胞の無秩序な増殖、炎症性サイトカインによる炎症波及、自己組織破壊がおこり難治性の腸

炎が引き起こされている。CD においては、Th1 優位の T 細胞増殖とサイトカイン産生、UC においては、Th2 優位の T 細胞増殖とサイトカインが特徴的であるが、TNF-α、IL-6、IL-1β などの炎症性サイトカインは共通して産生が増加している。CD における IL-17、UC における IL-13 は比較的特徴的である。いずれの疾患においても T 細胞抑制とマクロファージなどから産生される炎症性サイトカインの抑制が、治療のターゲットとされ、T 細胞を含む白血球の遊走、増殖を抑えるために、抗 integrine 抗体、抗 IL-12p40 抗体、抗 INFγ 抗体、抗 CD3 抗体、抗 CD40 抗体、抗 CD25 抗体など、炎症性サイトカインを抑制するために抗 TNF-α 抗体、抗 IL-6R 抗体など数々の薬剤の臨床治験が行われている。いずれの薬剤においても比較的良好な結果は得られるものの、完全に病勢を抑えることは困難であった。この状況を打開する新たな治療薬の開発が切望されている。

5、DTCM-G(3-[(dodecylthiocarbonyl) methyl]glutarimide)とは

これまでに、微生物 *Amycolatopsis* が産生する弱抗生物質 epoxyquinomycin C からの誘導体である小分子物質 dehydroxymethylepoxyquinomycin が開発され[255]、NFκB の活性を抑制することが示されている[255]、同物質は、NFκB の活性抑制により T 細胞の活性化を抑制しマウス同種心移植のグラフト生存期間を延長させる免疫抑制作用と[256]、マウスのアトピー性皮膚炎[257]や DSS（Dextran sulfate sodium）腸炎を軽快させる[258]抗炎症作用が示されている。そこで、更に効果的な抗炎症物質の探求を行ったところ、*Streptomyces* から産生される抗生物質 9-methylstreptimidone が、NFκB の過剰に活性化されている T 細胞白血病細胞のアポトーシスを誘導する事が分かった[259]。微生物から生成される 9-methylstreptimidone が希少な為、多くの誘導体をデザインし合成していったところ、3-[(dodecylthiocarbonyl) methyl]glutarimide (DTCM-G; 355 Da)の合成に成功した[260]。DTCM-G は RAW264.7 において、LPS 刺激に対する NO（nitric oxide）産生を抑制する[261]。また、NFκB 活性を抑制しないものの AP-1 の活性化を抑制し、iNOS の産生や COX2 の産生を抑制することが示されている[260]。更に、マウスの primary T 細胞において $P70^{S6K}$（p70 S6 kinase）のリン酸化を抑制する事でｍTOR(mammalian target of rapamycin)経路の抑制し、細胞周期の進展を抑制しその増殖を抑制する事、マウスアログラフト心移植においてグラフトの生存を延長させる

事が示されている[262]。また、マウスの移植後動脈硬化症モデルにおいて、DTCM−G がアロ免疫応答および血管平滑筋増殖を抑制することで移植後動脈硬化症の進行を減弱させる事、その機序の検討として、DTCM-G が血管平滑筋細胞の Cyclin D1 の発現を抑制することで細胞周期のＧ１-S 期の移行を阻害し、細胞増殖を抑制する事が示されている[263]。他、免疫/炎症以外にも RANKL/LPS に誘導される破骨細胞の分化を Akt-GSK（Glycogen synthase kinase）3β-NFAT(Nuclear factor of activated T cells)c1 経路および NF-κB-NFATc1 経路を介して抑制する報告や[264]、ヒト T 細胞白血病 MT-1 細胞株における caspase3 の活性化と RelB への付着を亢進させアポトーシスを誘導する報告[265]、PDK1(Phosphoinositide-dependent kinase-1)のリン酸化抑制により 5637/T24 前立腺癌細胞株の浸潤/増殖を抑制し、細胞周期のＧ１-S 期移を行抑制する報告がある[266]。

≪本研究の目的≫

本研究では、新規抗炎症薬 DTCM-G のマウス炎症性腸疾患モデルにおける腸炎抑制効果およびその作用機序に関して検討することを通して、DTCM-G の新規 IBD 治療薬としての可能性を探求する。

≪本研究の結論≫

新規抗炎症薬 DTCM-G は、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。本研究によって，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。

略語表

本文中及び図中で使用した略語は以下の通りである.

ACK	Ammonium-Chloride-Potassium
ATG	autophagy-related genes
AP-1	Activator protein-1
5-ASA	5-aminosalicylic acid
ATP	adenosine triphosphate
BCA	bicinchoninic acid
BSA	Bovine serum albumin
CARD	caspase-recruitment-domains
CCL	CC Chemokine Ligand
CCR	CC chemokine receptors
C/EBP	CCAAT-enhancer-binding protein
CD	Crohn's Disease
CDAI	Crohn's Disease Activity Index
cDNA	complementary DNA
CMC	carboxymethyl cellulose
COX2	Cyclooxygenase 2
CREB	cAMP response element binding protein
CRP	C-reactive protein
CX3CR	CX3 chemokine receptors
DAI	Disease Activity Index
DC	dendritic cell
DDW	deionized distilled water
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribo Nucleic Acid
dNTP	Deoxynucleotide triphosphate
DSS	Dextran sulfate sodium
dsRNA	Double-stranded RNA
DTCM-G	3-[(dodecylthiocarbonyl) methyl]glutarimide
DTT	dithiothreitol
DW	distilled water

EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EGF	Epidermal Growth Factor
ELISA	Enzyme-linked immuno-sorbent assay
Eth	Ethanol
Foxp3	Forkhead Box P3
ERK	extracellular signal-regulated kinase
FCS	fetal calf serum
GAPDH	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GM-CSF	Granulocyte Macrophage colony-stimulating Factor
GSK-3β	Glycogen synthase kinase-3β
HBSS	Hanks' Balanced Salts Solution
HE	Hematoxylin-Eosin
HTA-Br	hexadecyltrimethylammonium bromide
IBD	Inflammatory Bowel Disease
ICAM	intercellular adhesion molecule
IFN	interferon
Ig	immunoglobulin
IL	interleukin
iNOS	inducible nitric oxide synthase
IRAK	Interleukin-1 receptor-associated kinase
IRGM	Immunity-related GTPase family M protein
JAK2	Janus kinase 2
JNK	c-Jun N-terminal kinase
LiCl	lithium chloride
LP	lamina propria
LPMC	lamina propria mononuclear cells
LPS	lipopolysaccharide
LRR	leucine-rich-repeat
MadCAM-1	mucosal addressin cell adhesion molecule-1
MAPK	mitogen-activated protein kinasenase
MCP	monocyte chemotactic protein
MDP	muramyl dipeptide
MHC	major histocompatibility complex
MIP	macrophage inflammatory protein
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromid

mTOR mammalian target of rapamycin
MPO myeloperoxidase
6-MP 6-mercaptopurine
mRNA messenger RNA
MyD88 myeloid differentiation primary protein 88
NFAT Nuclear factor of activated T cells
NFκB nuclear factor-kappa B
NK natural killer
NO nitric oxide
NOD nucleotide-binding oligomerization domain
PBS Phosphate buffered saline
PCR Polymerase Chain Reaction
PDK1 Phosphoinositide-dependent kinase-1
PI3K Phosphoinositide 3-kinase
PIP2 phosphatidyl-inositol 4,5 diphosphate
PIP3 phosphatidyl-inositol 3,4,5 triphosphate
PMN polymolphonuclear neutrophil
PPAR peroxisome proliferator-activated receptors
$p70^{S6K}$ p70 S6 kinase
PTEN phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10
RANK recepter activator of NFκB
RANTES regulated on activation, normal T cell expressed and secreted
RCT Randomized control trial
RIPA Radio-Immunoprecipitation Assay
RNA ribonucleic acid
RO Reverse Osmosis
RORγt retinoic acid receptoe related orphan receptor γt
RPMI Roswell Park Memorial Institute -1640 medium
RT-PCR Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction
ssRNA Single-stranded RNA
STAT Signal Transduction and Activator of Transcription
TAK1 transforming groth factor-β-activated kinase 1
T-bet T-box transcription factor
TBS Tris Buffered Saline
TGF Transforming growth factor

Th	Helper T cell
TLR	Toll-like receptor
TNF	tumor necrosis factor
TNBS	2,4,6Trinitrobenzenesulfonic acid solution
TRAF	tumor necrosis factor receptor-associated factor
TRAIL	TNF related apotosis inducing ligand
Treg	regulatory T cell
UC	Ulcerative colitis
VEGF	vascular endothelial growth factor

実験方法

本研究の実験計画書は,「北海道大学動物実験に関する規程」に則って承認され，同規程に従って施行された.

1 – ①　TNBS 腸炎の誘導および DTCM-G による腸炎抑制効果の検討

TNBS 腸炎を誘導し､1 日 2 回 40mg/kg の DTCM-G を腹腔内注射によって投与し、腸炎の抑制効果を検討した。評価は、1-4 日目の DAI（Disease Activity Index)、体重減少、血便、下痢の程度、4 日目の大腸閉塞の有無、腸管長、腸管重、肉眼スコア、組織所見、組織所見、組織スコア、MPO(myeloperoxidase)定量評価、2 日目 4 日目の好中球のカウントにより行った。

準備：

Mice：Balb/c, (SLC Japan), male, 8 week, Weight 24-26g

北海道大学大学院医学研究科附属動物実験施設内で, 12h 毎の明暗サイクル下、気温 25℃湿度 55%で、病原体より隔離された状態で管理した。１ゲ―ジ３匹とし、餌（Oriental Yeast Co.,Itd）投与と給水口からの給水下に飼育した。7-14 日前に納入し、前々日の体重測定を行った。

TNBS/50%ethanol 溶液

2,4,6iTrinitrobenzenesulfonic acid solution（Sigma-Aldorich Japan）、エタノール、蒸留水を用いて、TNBS1.5mg/50％Ethanol(Eth)溶液を全量 150μL になるよう調整した。（5%TNBS 30μl + DW (distilled water)45μl + 100% ethanol 75μl）

DTCM-G

DTCM-G 原末を DMSO(Dimethyl sulfoxide)に溶解し 0.5%CMC(carboxymethyl cellulose)溶液で 25 倍希釈した。(DMSO4%)
十分に加温・溶解し、超音波で粉砕・撹拌し使用した

他準備物品

Isoflurene､カプセル､麻酔用瓶･小瓶 、３.５Fr ソフトカテーテル×１本、体重計、便潜血シート、1ml シリンジ

手順：

腸炎導入の前日夕に、グループ分けを行い絶食とした。腸炎導入 2 時間前に、体重測定の上、1 匹ずつ穴あきカプセルに入れ排便させた。DW＋Eth 溶液はあらかじめ作成しておいた。腸炎導入 1 時間前に、DTCM g を準備し、腹腔内投与（ip）した。TNBS 投与直前に DW＋Eth 溶液に TNBS を混入し薬液調整を完了した。準備完了後、腸炎導入開始した。Isoflurane にて呼吸抑制が出現し始める程度に麻酔し、3.5-Fr soft catheter を肛門縁から約 4 cm 挿入（脾彎曲部にカテが当たるまで）し、1cm 引いたところから 150ul の薬液をゆっくり注腸した。注入後３０秒間頭低位に保持し、麻酔が覚めたことを確認後ケージに戻した。4 日目まで 12 時間ごとに DTCM―G の腹腔内投与を行った。毎日、朝の投与前に体重を測定し、またマウスをカップに入れ排便させ、下痢、便鮮血のチェックを行いスコアリングした。4 日目 1 回目の DTCM-G 投与後、マウスを犠牲死させ検体を評価した。

評価：以下の項目を評価する

- Body Weight Loss　（day1-４）
- DAI　（day1-４）
- Histological score
- Macroscopic score
- 腸管長、腸管重（上行結腸から直腸までで評価）
- 腸閉塞有無
- MPO 定量評価

検体評価必要物品

メジャー、剪刃、攝子、綿棒、３.５Fr ソフトカテーテル、1ml シリンジ、蒸留水、画用紙、スコアシート、デジカメ、カセット、ホルマリン、液体窒素、エッペン

検体評価手順：

検体マウスを頚椎脱臼し、開腹し腸閉塞有無の所見を確認した。大腸を摘出し自然長を測定後、便排出させ、腸管の重さ測定した。その後腸管内腔をフラッシュし画用紙に並べた。腸管は長軸切開し macroscopic score をスコアリングした（剖検施行者以外による盲検とする）。腸を縦方向に 2 分枝一方を近位端から 2.5cm ずつホルマリン固定し、札幌総合病理研究所にて、

HE(Hematoxylin-Eosin)染色を施行し， Histological score をスコアリングした(病理医による盲検)。もう一方はエッペンに梱包し液体窒素で凍結保存し MPO の定量評価に用いた。

スコアリング基準

① DAI：Cooper らの報告による以下のスコアリング基準を用いた[267]。

Score	Weight loss	Stool consistency	Occult/gross bleeding
0	None	Normal	Normal
1	1-5%	Loose stool (slight)	Hemoccult+
2	5-10%	Loose stool	Hemoccult++
3	10-20%	Muddy stool	Hemoccult+++
4	>20%	Water stool	Gross bleeding

(文献 272 より引用)

② Macroscopic score：Wallace らの報告による以下のスコアリング基準を用いた [268]。

Criteria for macroscopic scoring of colonic damage feature score	
0	Normal appearance
1	Focal hyperemia, no ulcer
2	Ulceration without hyperemia or bowel wall thickening
3	Ulceration with inflammation at one site
4	Ulceration/inflammation at two or more sites
5	Major sites of damage extending. 1cm along the length of the colon
6-10	When an area of damage extended 2cm along the length of the colon, the score was increased by 1 for each additional cm of involvement.

(文献 273 より引用)

③ Histological score： 札幌総合病理研究所にて，HE 染色しを施行し，病理医により盲検法を用いて、組織の炎症評価を行った。スコアリングは Neurath らの報告に従い [84] 下記の基準を用いた。

Histological score	
grade 0	no sign of inflammation
grade 1	very low-level leukocyte infiltration
grade 2	low-level leukocyte infiltration

grade 3	high-level leukocyte infiltration, high vascular density, and thickened colonic wall
grade 4	transmural leukocyte infiltration, goblet cell loss, high vascular density, and thickened colonic wall

(文献 84 より引用)

1－② MPO 定量評価

準備物品：
Ice box、SKミル、弾丸、2mlエッペン、超音波、液体窒素
1× PBS(Phosphate buffered saline) 1ml ×検体数+1
HTA-Br(hexadecyltrimethylammonium bromide) 5mg＋ 1× PBS 1ml ×検体数+1

手順：
凍結腸管を SK ミルを用いて破砕した。1×PBS を 1ml 加え攪拌し、4℃ 30,000g で 30 分遠心分離した。上清を破棄した後 0.5% hexadecyltrimethyl ammonium bromide を添加した 1×PBS に溶解した。10 秒氷中につけた後、30 秒超音波で破砕し、3 回凍結解凍超音波処理を繰り返した （液体窒素⇔on ice)。20000 g で 15 分間遠心分離し上清を使用した。測定に当たっては、あらかじめ、スタンダードと Working Solution を作成しておき、スタンダードをウェルに 50ul ずつ注入し、assay buffer を 60μl ずつ加えた。続いて Positive control に 50ul の MPO、sample well に 50μl のサンプルを注入し、それぞれ、assay buffer を 10μl ずつ加えた。Negative control には 50μl のサンプルと 10ul の MPO inhibitor を加えた。Working solution を positive control、negative control、sample well にそれぞれ 50μl ずつ加えた。吸光度計で 1 分ごとに 30 分間、480-490nm 励起と 515-520nm 放散の吸光度を測定した。

1－③ 免疫染色

凍結保存した腸管切片は、札幌総合病理研究所にて、抗 MPO 抗体 (polyclonal rabbit anti-human myeloperoxidase (Dako, Glostrup, Denmark))、抗 F4/80 抗体(MC497R; Serotec Ltd)、抗 CD4 抗体(GK1.5;

Santa Cruz Biotechnology Inc, Tokyo, Japan)、抗 CD8 抗体(MCA609EL; Serotec Ltd, Oxford, UK)を用いて染色しを施行し，病理医により盲検法を用いて、陽性細胞のカウントをおこなった。200 倍の視野にて観察し、最も炎症の強い部分を 2 カ所選んでカウントした。リンパ濾胞内の免疫細胞はカウントから除外した。

1－④　LPMC 評価

盲腸を除いた大腸を摘出し、LPMC を単離して LPMC 構成細胞の解析（CD4 陽性細胞、CD8 陽性細胞、CD11ｂ陽性細胞、CD4 陽性 CD25 陽性 Foxp3 陽性細胞､CD4 陽性 T-bet 陽性細胞)､リンパ球の増殖能を検討した。また、これと比較のため、腸間膜リンパ節を摘出し、ここからリンパ球を単離して、増殖能の検討を行った。

1－④－i　LPMC 単離方法：

準備品：
ビーカー2 個、20ml フラスコ１、30ml フラスコ１、スタラー１、スタラーバー１、洗浄液 20ml、組織融解液①②各 10ml、上皮処理液 10ml、50ml ファルコンチューブ２、RPMI(Roswell Park Memorial Institute -1640 medium)20ml＋9ml、5ml シリンジ１、100μm ストレーナー２、40μm ストレーナー２、セッシ、比重遠心液 40%8ml/75%1.5ml、ピペット、電動ピペット、Perfectmedium（下記）1ml＋500μl＋cell 数調整用、15ml ファルコンチューブ 5

組織洗浄液：
1×PBS20ml

上皮処理液：
EDTA(ethylenediaminetetraacetic acid)（100mM）100μl
+Dithiothreitol(500mM) 20μl　　（1mol=154.25g　500mM=77.125mg/ml）
+Penicillin10000u/ml +Streptomycine10000u/ml 100μl
+ カルシウム、マグネシウム（-）HBSS(Hanks' Balanced Salts Solution) 10ml　/匹

組織融解液①：

Complete RPMI 9ml
collagenase　D（Roche)20mg/ml 500μl
DNase　I (Sigma) 10mg/ml 500μl

組織融解液②：

Complete RPMI 9ml
collagenase　D（Roche)20mg/ml 250μl
DNase　I (Sigma) 10mg/ml 500μl
Dispase　Ⅱ(Roche)　40mg/ml 250μl

比重遠心：

40%Percoll Plus solution 3.2ml+PBS4.8ml
75%Percoll Plus solution 1.125ml+PBS0.375ml

Percoll solution：Percol plus 90ml + 10 倍 PBS10ml
Perfect medium：RPMI 1640＋100 U/mL penicillin＋100 μg/mL streptomycin＋10% fetal bovine serum+ 50 μM 2-mercaptoethanol

手順：

あらかじめ、ビーカーに組織洗浄液を用意しておいた。また、ビーカーに 10ml の上皮処理液、30ml フラスコに 10ml の組織融解液①、20ml フラスコに組織融解液②を十分に温めておいた。直前に上皮処理液に薬剤を添加した。スタラーをインキュベーター内に準備した。遠心は 20 度に設定した。事前準備が出来たら、マウスを頚椎脱臼にて sacrifice し腸管を摘出した。腸管をフラッシュし、長軸で切開し、抗生剤入り PBS 内で洗浄した。腸管を 1.5cm 長に切離し 10 ml of CaMg free HBSS＋1mM EDTA ＋1mM DTT(dithiothreitol)＋抗生剤 mix1000 単位溶液内に入れ、37°C で 15 分攪拌した。この時点で組織融解液①に酵素を入れておいた。15 分後、残組織を 10 ml の RPMI の入った 50 ml ファルコンチューブに入れ、20 秒間ボルテックスした。更に残組織を新しい 10 ml の RPMI 内で再度 20 秒間ボルテックスした。続いて、残組織を 10 ml の collagenase solution①に入れ、37°C で 20 分間攪拌した。この時点で組織融解液②に酵素を入れておいた。20 分後、内溶液を 5ml シリンジで、慎重に吸引排出を繰り返し、100μm streiner、続いて 40μm streiner でこした(細胞浮遊液①)。残組織を

collagenase solution② 10ml に移し 37°C で 10 分間攪拌する。5ml シリンジで、慎重に吸引排出を繰り返し、更に 37°C で 10 分間攪拌した。5ml シリンジで、慎重に吸引排出後、Dispase10mg を入れ、更に 37°C で 10 分間攪拌した。新しい 100μm streiner、続いて 40μm streiner でこし、細胞浮遊液②を回収した。①②を 20 度 500g で 5 分間遠心し、ペレットを 40%percoll 8ml に溶し、Percoll75%液 1.5ml の上に静かに乗せた。Percoll (40% 8ml /75% 1.5ml)内で 20 分 20℃2000 回転比重遠心した。リンパ球の層を取り出し Perfect medium 1ml+RPMI 9ml を足し 4℃500g で 5 分間遠心分離した。Perfect medium を 500μl 加え、トリパンブルー40+cell 液 10μl を混ぜて cell カウントした。

1－④－ⅱ　腸間膜リンパ節リンパ球単離方法：

準備品
物品：
シャーレ　検体数×２、1cc シリンジ　検体数×２、電動ピペット、解剖セット、タイマー、血球計算盤、70μm cell strainer　検体数×２、15ml ファルコンチューブ　検体数×２、トリパレンブルー

最低薬液量：
HBSS38 x 検体 ml
RPMI 18x 検体 ml
Perfect medium 15 x 検体 ml
ACK (Ammonium-Chloride-Potassium) lysing buffer　1.5 x 検体 ml

手順：
Ice を準備し、シャーレに HANKS10ml を用意しておいた。頚椎脱臼にてマウスを安楽死させ、開腹してリンパ節を摘出し On ice とした。この時、出来るだけ出血を避け、脂肪を除去しておいた。次にリンパ節を 70μm cell strainer に乗せ、1cc シリンジ内筒でホモジネートした。電動ピペットを用い、ホモジネート液を Cell strainer に 3 度通し、15ml ファルコンチューブに回収した後、300g４℃で５分間遠心分離し、上清を捨てた。続いて、ACK lysing buffer を 500 μL 注入し、on ice で 3 分間放置し赤血球を破砕した。更に HANKS を 9ml 注入し 300g４℃で５分間遠心分離し上清を捨てた。最後に RPMI9ml＋perfect medium1ml を加え、300g４℃で５分遠心分離し

た。上清を捨てペレットを回収した。

1－④－ⅲ　単離細胞増殖能評価と染色方法：

使用抗体：

fluorescein isothiocyanate-anti-mouse CD4 （L3T4）
fluorescein isothiocyanate-anti-mouse CD25 （7D4）
peridinin chlorophyll-anti-mouse CD4 （L3T4）
peridinin chlorophyll-anti-mouse CD8 （53-6.7）
phycoerythrin-anti-mouse CD11b （M1/70）
（Becton-Dickinson and Co, Franklin Lakes, NJ）

phycoerythrin-anti-mouse T-bet（4B10）
phycoerythrin-anti-mouse T-bet（FJK-16s）
（eBiosciences San Diego, CA）

各 isotype control

手順：

セルカウントの上、2×10^{6} 個/ml になるように溶液を調整し、96well-U-bottom plate に 100μl ずつ注入し Perfect medium100μl/well 追加した。増殖能評価においては、20μg/ml に調整した concanavalin A を各 well 10μl ずつ加え（最終濃度 2 μg/ml）。37°C、5% CO2 下に培養した。評 40 時間後にチミジン 1μl＋perfect medium24μl を各 well に入れ、その 8 時間後、ハーベスターで回収し、β-counter (Perkin Elmer; Boston, MA)で解析した。cell surface staining では、まず検体ペレットに HANKS 50 μL ＋抗体 1 μL /tube ずつ入れ、ボルテックスした。4℃暗所で 15 分置き、HANKS 500 μL/tube を足して，300g4℃で 5 分間遠心し、上清を除去し、ペレットを粉砕した。CD4,CD8,CD11b のみ染色の場合にはこの時点で２％中性緩衝ホルマリンを 300μl/tube 加えボルテックスした。intra-cellular staining を追加する場合は、cell surface staining 後、上清を捨て，eBioscience (fixation/permeabilization)と fix/perm-Diluent を 1:3 で 200μL/tube で入れ、30 分間置いた。続いて Permeabilization wash buffer を Water で 10 倍希釈し、これを検体に 500 μL/tube 足して、遠心分離し、

更にこれをもう一回繰り返した。抗 T-bet、FoxP3 抗体は 1 tube あたり、wash buffer 100 μL＋ 抗体 2 μL を入れた。30 分室温に置き、Wash buffer で洗った後に、2%ホルマリンで固定した。FACSCalibur 309 TM (Becton-Dickinson)を用いて flow cytemetry を行い、データを FlowJo software (Tree Star, Inc, Ashland, OR). を用いて解析した。

1－⑤　RT-PCR(Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction)

盲腸を除いた大腸を摘出し、-80 度で凍結保存した。この検体からｍRNA を抽出し、逆転写によって cDNA(complementary DNA)を作成し、RT-PCR 法によって大腸組織内の炎症性メディエターのｍRNA 発現を定量評価した。GAPDH(glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)の mRNA 発現量を 1 として比をとって各ｍRNA のレベルを解析した。

1－⑤－ｉ　RNA の抽出

準備品：

発泡スチロール容器 2 個(ice と液体窒素入り)、曲りペアン、液体窒素、SK-ミル＋tube(弾丸)、TRIzol（invitrogen 15596026)、クロロホルム（和光純薬 100ml 034-02603)、純エタノール（和光純薬)、70%エタノール、イソプロパノール（和光純薬 325-00045)、蒸留水(invitrogen GIBCO 10977-015)、1.5ml eppen tube 3×検体数+1、1.0ml eppen tube 1×検体数、SK-ミル用丸底 tube 1×検体数

手順：

あらかじめ発砲スチロール容器にアルミホイルで包んだままの粉砕用の金属を入れ､液体窒素を少し浸かるくらいまで入れ､検体のセラムチューブ、丸底チューブを 3 つ入れた SK ミル本体も液体窒素につけ準備を整えた。セラムチューブから凍結のまま検体を SK-ミルのチューブ内へ移し､粉砕用の金属を取り出して清潔にアルミを剥がし､強彎のケリーでチューブ内に入れ、ふたを閉めた。再度液体窒素に漬けて完全に冷却した後、外容器に入れて 30～40 回／30 秒程度（検体の種類による）下に打ち付けるようによく振り（少し回転させながら)､組織を粉砕した。チューブを外容器から取り出し、

念のため再度液体窒素で冷却した。キムタオルで把持してチューブを取り出し、ふたを開けてそっとチューブを倒して中の金属を出し、強鬱のケリーで把持し金属を取り除いた。一旦液体窒素で再冷却し、チューブをはじいて粉末の固まった部分を砕いてから TRIzol 1000μl を入れた。この時、500μl 程度をチューブの底にぶつけるようにして粉末を拡散させてから、十分にピペッティングし壁についたものも落とした。その後、1.5ml eppen tube に移し、on ice とした。最後の検体が処理完了したら、前の検体を取り出し、同時に 3 分間室温で置いた。続いてクロロホルムを 200μl 加え(1000μl ピペット)、ふたをしっかり閉めて 20 回程度よく振った（イチゴシャーベット状になる)。これによりクロロホルムでタンパクが溶解した。3 分間室温放置後、5000rpm 15min 4℃で遠心分離した。遠心により 3 層（上：透明、中：白、下：ピンク）に分かれ、RNA 層（上層：500μl 程度）を 200μl のピペットで分割して回収し、新しい 1.5ml eppen tube に移した。TRIzol を total 1000μl（およそ）になるように加えた後、クロロホルムを 200μl 加え、ふたをしっかり閉めて 20 回程度よく振り、15000rpm 15min 4℃で遠心分離した。更に上清（600μl 程度の量）を 200μl のピペットで分割して回収し、新しい 1.5ml eppen tube に移し、同量のイソプロパノールを加えた後、Tube を反転させ、軽く混ぜ、室温で 10 分安置した。15000rpm 10min 4℃で遠心分離した後、ペレットが落下しないよう気をつけて上清を捨て、-20℃で保存していた 75%エタノールを 500～600μl（ペレットが大きいときは 1000μl と見た目で微調整）加えた。Tube を反転させ、軽く混ぜ、同じ向きで、eppen tube を遠心機にセットして、15000rpm 5min 4℃で遠心分離した。ここで、上清を 200μl ピペットで水滴が残らないようにゆっくりと吸引して回収し、キムワイプ上にひっくり返して 2-3 分置き水切りをした。壁に残った水滴がある場合は、ひっくり返した状態のままピペットで吸い取り、ペレットの周りに少し水分が残るくらいで完了とした。最後にこれに 50μl の蒸留水を入れ、タッピングして完全に溶解させた。ここから、1μl をとり（液面ギリギリで採取)、59μl の蒸留水と合わせて 60 倍に希釈し吸光度測定器(BIO-RAD SmartSpec ™ で吸光度を測定し RNA 量を測った。(希釈用 1ml eppen tube は、前もって準備し、59μl の蒸留水を入れておく残りの検体(約 49μl)は、10μl ずつ 1ml eppen tube に小分けし、deep freezer（-80℃）に入れて凍結保存し cDNA 合成に使用した。

<u>1－⑤－ⅱ cDNA 合成手順：</u>

準備品：
Template RNA 溶液（以前に RNA 抽出し、10μl で-80℃stock しているサンプル）、Omniscript RT Kit (50 検体分) （QIAGEN cat no:205111）、10X Buffer RT、dNTP(Deoxynucleotide triphosphate) Mix(5μM)、蒸留水（RNase free water）、RNase inhibitor(Roche)、Oligo dT 20 primer(TOYOBO(10μM)、発泡スチロール容器＋氷＋eppen 立て、200μl PCR tube×検体数、1.5ml eppen×2 本、0.5 ml PCR tube×検体数

手順：
あらかじめ、10X Buffer RT、dNTP Mix、Oligo dT 20 primer をフリーザーから取り出し、溶解後ボルテックス、spin down する他、DDW(deionized distilled water)を 1.5ml eppen に分注し、また、Template RNA(10μl)を氷上で溶解しておいた。全検体を、蒸留水を加えて希釈し 250μg/ml とし、また、1X Buffer RT を調整し（10X Buffer RT 6μl + DDW 54μl ）、さらにマスターミックスを調整した（DDW：225μl、10X Buffer RT：45μl、dNTP: 45μl、Oligo dT 20 primer :45μl の順に混合）。RNase inhibitor をフリーザーから取り出し spin down 後 **1X** Buffer RT で 4 倍希釈し（10units/μl）、22.5μl マスターミックスに加えた。次いで Omniscript Reverse Transcriptase をフリーザーから取り出し spin down 後、マスターミックスに 22.5μl 加えた。軽く（2-3 秒以内）ボルテックスし spin down し、ラベリングした各 200μl PCR tube に 27μl ずつ分注し氷上に置いた。各検体を 3μl ずつ加えふたを閉め、Thermal cycler にセットし、37℃ x 60 分 ⇒93℃ x 5 分 ⇒4℃の条件で c DNA へ逆転写した。終了後、0.5μl PCR tube に移し、-20℃で凍結させた。

<u>1－⑤－ⅲ primer の設計～プラスミドの作成：</u>
手順：
ブラウザー上で Ensemble で目的mRNA の exon を選定し、primer3 で primer を作成した後、NCBI（BLAST）で作成した primer から翻訳されるタンパクをシュミレーションし確認した。発注した Primer が届いたらリアルタイム PCR を行い、primer の動作チェックを行った（DDW7μl＋buffer（primer mix：BIO-RAD iQ SYBR Green Super mix #170-8880）10μl＋10 倍希釈 primer（F 1μl、R 1μl）+template cDNA 1μl）。95℃,3min→95℃,10s→60℃,30s→72℃,30s を 40 サイクル行い、melting curve を確認

して、産物が単一である事を確認した。続いて pGEM-T easy vector system（#A1360 : promega）を用い、ベクタープラスミドへ PCR 産物の Ligation を行った。大腸菌 JM109（TAKARA　#9052）へこれをインサートし、Lysogeny Broth 培地プレート上で大腸菌を培養した。コロニーをピックアップし、M13 primer を使用して（インサート部位の近傍に増幅開始部位がある。ベクターに cDNA が入っていればその cDNA が増幅されるように設計されている）、1 コロニーにつき、DDW 8μl＋10×buffer 1μl＋dNTP 0.8μl＋primer M13F 0.1μl＋primer M13R 0.1μl＋ExTaq 0.05μl：合計 約 10μl で PCR を行った（94℃,5min→94℃,30s→55℃,30s→72℃,1min→72℃,5min を 30 サイクル）。電気泳動により PCR 産物のタンパク量が想定通りかを確認し、良いコロニーを用いて液体培養で大腸菌を増殖させた（Lysogeny Broth バッファー内で 37℃,240rpm で振盪培養 12 時間以上）。得られた菌液を室温 12000rpm で 1 分間遠心分離し、ペレットから QIAGEN miniprep kit #27106 を用いてプラスミド抽出を行った。最後に、このプラスミドを用いてシークエンス PCR を行い（#4336917 Big Dye terminator v3.1 cycle sequencing kit）、PCR 産物の塩基配列を確認した。

【作成した primer】

GAPDH：（NM-008084）

5-TACACTGAGGACCAGGTTGT

5-CTGTAGCCGTATTCATTGTC

IFN-γ：（NM-008337）

5- GCGTCATTGAATCACACCTG

5-TGAGCTCATTGAATGCTTGG

IL-10：(NM-010548.2)

5- GGTTGCCAAGCCTTATCGGA

5-ACCTGCTCCACTGCCTTGCT

MCP-1：（NM-011333）

5- TCCCAATGAGTAGGCTGGAG

5-TCTGGACCCATTCCTTCTTG

TNF-α：(NM-013693)

5-ACCCTCACACTCAGATCATC

5-GAGTAGACGAGTAGACAAGGTACAACCC

IL-1ß：（NM-008361）

5- GGATGAGGACATGAGCACCT

5-AGCTCATATGGGTCCGACAG

IL-6：（NM-031168）

5- GAAAGCCAGAGTCCTTCAGAG

5-CCACTCCTTCTGTGACTCC

IL-12-p40 :(NM-008352)

5- AGGAGACAGAGGAGGGGTGT

5- AATAGCGATCCTGAGCTTGC

IL-17 :(NM-010552)

5-CCAGGGAGAGCTTCATCTGT

5-CTTGGCCTCAGTGTTTGGAC

1－⑤－ⅳ　RT-PCR：

準備品（1 検体）：

プラスミド、プライマーF/R 1μl、cDNA サンプル 2μl、SYBR Green 10μl、DDW 6μl、LightCycler キャピラリー

手順：

まず最初に、プラスミド（濃度 10E6～10E1 までの 6 エッペン）、プライマーF/R と cDNA を－20℃のフリーザから取り出し、常温解凍してボルテックス、spin down し on ice とした。次に（1 検体あたり）SYBR Green：10μl＋DDW：6μl＋primer F (10μM)：1μl＋primer R (10μM)：1μl の割合で Mix を作成し、ほんのわずかにボルテックスし、タッピング、spin down し on ice とした。続いて、冷蔵庫から Light cycler 用の centrifuge adaptor を出し、必要本数のキャピラリーをセットし、Mix18μl と検体/プラスミドラダー2μl ずつを濃度の薄い検体から添加していった。このときピペッティングして添加物を均一濃度にした後、ふたをし、キャピラリーを 1000 回転で数秒 spin down した。Light cycler 本体にキャピラリーをセットし PCR を行った（条件：Denature: 94℃15 分、PCR: 60℃20 秒→72℃30 秒 x40 サイクル。Melting curve: 65℃から 95℃までジワジワと上がる）。

各 mRNA レベル解析を解析し，GAPDH の発現量を 1 として比をとった

２、DSS 腸炎腸炎の誘導および DTCM-G による腸炎抑制効果の検討

DSS 腸炎を誘導し、1 日 2 回 20mg/kg または 40mg/kg の DTCM-G を腹腔内注射によって投与し、腸炎の抑制効果を検討した。評価は、1-10 日目の DAI、体重減少、血便、下痢の程度、10 日目の腸管長、腸管重、肉眼スコア、組織所見、組織所見、組織スコアにより行った。

DSS　colitis の誘導

マウス：C57BL/6　雄 8 週　22-24g

北海道大学大学院医学研究科附属動物実験施設内で, 12h 毎の明暗サイクル下、気温 25℃湿度 55%で、病原体より隔離された状態で管理した。 1 ゲ―ジ３匹とし、餌（Oriental Yeast Co.,Itd）投与と給水口からの給水下に飼育した。

DTCM-G：

DTCM-G 原末を DMSO(Dimethyl sμlfoxide)に溶解し 0.5%CMC(carboxymethyl cellμlose)溶液で 25 倍希釈した。(DMSO4%) 十分に加温・溶解し、超音波で粉砕・撹拌し使用した

準備物品：

Isoflurene、カプセル、麻酔用瓶・小瓶 、体重計、便潜血シート

手順：

あらかじめ、8 w 22-24 g male C57BL/6 を仕入れ、6 匹飼い、明暗 12 時間サイクル 23℃下に 1 週間前から予備飼育しておいた。3 日前から 1 匹飼いとし、給水瓶（water 用、DSS 用）、cage を確保した。給水瓶名前ラベル、cage ラベルを作成し、滅菌瓶に滅菌 RO 水を準備した。3%（w/w）DSS は、前日夕に作り常温保存した（DSS 粉末は変質吸湿しやすいので使用までの保存には、遮光除湿に注意した）。また、前日、前々日からマウスの体重測定を行った。実験初日にマウスのグループ分けを行い、体重変動の小さいものをできるだけ vehicle 群に割り当てた。カテーテルチップで 3%（w/w）DSS を 60ml ずつ給水瓶に入れ準備した。治療薬（20,40mg/kgDTCM-G または vehicle）を投与しこれに引き続き DSS 飲水を開始した（当日 20 時から）。連日、1 日 2 回の治療薬投与をおこない、毎朝クリニカルスコアチ

ェックを行った。5 日目朝-夕に vehicle 群で全例が血便やや下痢となったら DSS 飲水を water 飲水に変えた。10 日目朝分の投薬後、マウスを犠牲死させ、腸の長さ、重さをチェックした。腸管を長軸方向に 2 分し、1 片は proximal、meddle、distal に分け組織に提出した。もう 1 片は、洗浄後、水分を拭き取り、セラムチューブに入れて液体窒素で冷却後保存した。

評価：以下の項目を評価した

- DAI （day1-10）
- Histological score
- 腸管長、腸管重（上行結腸から直腸までで評価）

札幌総合病理研究所にて，HE 染色しを施行し，病理医により盲検法を用いて、組織の炎症評価を行った。スコアリングは下記の基準に従った[269]。

① Inflammation Severity
0: none, 1: mild, 2: moderate, and 3: severe
② Inflammation Extent
0: none; 1: mucosa, 2: mucosa and submucosa, 3: transmural
② Crypt Damage
0: none
1: one-third of the basal tissue is damaged
2: two-thirds of the basal tissue is damaged
3: only the surface epithelium is intact
4: the entire crypt and epithelium is lost
③ The Percentage involved in the Mlcer or Erosion
1:<1 %, 2: 1-15 %, 3:16-30 %, 4: 31-45 %, and 5: 46-100 %

severity, extent, and crypt damage の各スコアに percentage スコアをかけて足したものを最終スコアとした
(文献 361 より引用)

3、RAW cell を用いた in vitro 実験

RAW264.7 細胞株に各濃度の DTCM-G を投与の上で 8 時間培養し

MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromid) assay を行って、DTCM-G の毒性を評価した。また、TNFα、IL-6 産生抑制効果を検討する為、各濃度の DTCM-G を投与し 2 時間後に LPS で刺激し、8 時間培養の上、上清中の TNFα、IL-6 量を ELISA(Enzyme-linked immuno-sorbent assay)法を用いて評価した。更に、DTCM-G の作用機序を解析する為、DTCM-G を投与し 2 時間後に、LPS で刺激し 0 分 5 分 15 分後 45 分後のタイミングで細胞を回収し、タンパクを抽出して AKT 経路（PDK1、AKT、c-Raf、p70S6K、GSK-3β）のリン酸化の程度を western blot 法を用いて行った。

3 – ①　MTT アッセイ

準備品：

100mmDISH、0.5%FCS(fetal calf serum)入り DMEM(Dμlbecco's Modified Eagle Medium)、10%FCS 入り DMEM、96well plate、DTCM-G/0.04%DMSO、5mg/mlMTT

手順：

RAW cell をコンフルエントになるまで培養し、100mm dish の培地を 0.5%FCS 入り DMEM へ変更し、24 時間 starvation した。次に 100mm dish を 10 または 0.5%FCS 入り DMEM へ戻し、細胞を回収し、96well plate へ $1x10^4$cells/100μL/well ずつ播種し直した。2 時間の incubation 後、0-40μg/ml の DTCM-G(100μL/well)を播種し 4 時間培養した。MTT (5mg/ml)を 20 μl 追加し、4 時間培養後、上清を全て吸引し、DMSO 100 μl 追加した。570nm の吸光度を測定し、細胞の viability を評価した。

3 – ②　ELISA

準備品：

100mmDISH、0.5%FCS 入り DMEM、96well plate、DTCM-G/0.04%DMSO、LPS(20ug/ml) 、 Plate 、 ELISA set: Capture & Detection Ab, HRP-Streptavidin

手順：

RAW cell をコンフルエントになるまで培養し、100mm dish の培地を 0.5%FCS 入り DMEM へ変更し、24 時間 starvation した。次に 100mm dish

を 10%FCS 入り DMEM へ戻し、細胞を回収し、96well plate へ 1x10^{4}cells/100μL/well ずつ播種し直した。2 時間の incubation 後、0-20μg/ml DTCM-G(100μL/well)を播種し 2 時間培養した。ここへ LPS(20μg/ml)を 10 μl 追加し（最終濃度 1μg/ml）、8 時間培養し上清を 50μl ずつ回収した。 一方、ELISA アッセイの準備として前日に Capture Ab を Coating buffer で希釈し，100 μl/well で Precoat し、シールをして一晩冷蔵しておいた。当日、シールを温めてから剥がし、室温の Wash buffer (1x PBS containing 0.05% tween-20) 200 μl/well で 3 回洗浄し、排液後にキムタオルの上で優しく叩いた。3 回目の液を捨てる前に Assay Diluent を用意し、捨てた後に、100 μl/well で blocking し、シールを貼り直し，1 時間室温に静置した。（この間にサンプル、スタンダードの調整を行った）。1 時間後、シールを剥がし、液を捨て、Wash buffer で一回洗浄し、キムタオルの上で優しく叩いた。その後、Standard, Sample をそれぞれ 100 μl/well でまき、シールをして 2 時間室温で静置した。シールを剥がし，液をすて，Wash buffer で 3 回洗浄した。続いて、Assay Diluent で Capture Ab と HRP-Streptavidine をそれぞれ 250 倍希釈し、よく混ぜて、100 μl/well でまき、シールをし、1 時間室温で静置した。1 時間後、シールを剥がし、液を捨て、3 回洗浄を行った。3 回目は振盪機で振盪させ、その間に、Reagent buffer を A: B (1:1)で調整した。その後 1 回洗浄後、Reagent buffer を 100 μl/well でまいた。約 10～20 分間反応させ、サンプルの色が変わってきた時点で反応を止めた。Stop solution は，2N の H_2SO_4 を 50 μl/well 注入した。吸光度測定器で測定しサイトカイン濃度を測定した。

３ － ③　 western blot

３ － ③ － ｉ　タンパクの抽出：

準備品：

RAW264.7　18dish＋予備、Cell wiper　18 本、回収用エッペン 18 本、保存用エッペン 18×XXX 本、10%FCS＋Ab 入り DMEM200ml、0.5%FCS＋抗生剤入り DMEM200ml、DMSO 5ml、100mg/mlDMSO　DTCM/0.04% DMSO　30μl、PBS　60ml、RIPA(Radio-Immunoprecipitation Assay)バッファー +3I　2000μl+60μl 、2mg/ml　LPS　200μl 、Pierce BCA(bicinchoninic acid) protain assay kit

手順：

RAW cell をコンフルエントになるまで培養し、100mm dish の培地を 0.5%FCS 入り DMEM へ変更し、24 時間 starvation した。次に 100mm dish を 10%FCS 入り DMEM へ戻し、細胞を回収し、96well plate へ 1x10^{4}cells/100μL/well ずつ播種し直した。2 時間の incubation 後、0-20μg/ml DTCM-G(100μL/well)を播種し 2 時間培養した。ここへ LPS(20ug/ml)を 10 μl 追加し（最終濃度 1μg/ml)、0/5/15/45 分のタイミングで検体を処理した。各 dish を PBS3ml で 3 回ずつ洗浄し、しっかり水切りし-80℃で保存した。アッセイ時は、これに RIPA＋3×inhibitor 100μl を入れ、cell wiper で回収した。Sonication を 1-2 秒行い、4℃で 5 分間 incubate した。4℃、14999rpm で 15 分間遠心分離し、上清を予冷した別のマイクロチューブに 40μl ずつ回収後攪拌し、10μl ずつ保存した。続いて BCA protein assay にて濃度測定を行った。Working Reagent を調整した後（A20ml＋B400μl)、10 倍希釈したサンプル 25μl/well（Tripricate)、スタンダード 25μl/well （duplicate）をプレートに入れた。Working Reagent を 200μl ずつ添加し、37 度で 30 分 incubate した。吸光度測定（562 nm)を行いタンパク濃度を測定した。

<u>３ － ③ － ⅱ Western Blot：</u>

準備品：

サンプル、10x Tris/Glycine/SDS、miliQ、メスシリンダー、 ミニプロティアン TGX ゲル 10% 10well、電極、泳動槽、iBlot Transfer Stacks(PVDF)、10x TBS(Tris Buffered Saline)、Tween20、スキムミルク、BSA(Bovine serum albumin) fraction V、1 次抗体、2 次抗体、Super Signal West Dura extended duration chemiluminescentsubstrate (Thermo Fisher Scientific)

使用抗体：

PDK1
phospho-PDK1 (serine 241; C49H2)
AKT
phospho-AKT (serine 473; D9E)
phospho- AKT (threonine 308; C31E5E)

c-Raf
phospho-c-Raf （serine 259）
$p70^{S6K}$
phospho-$p70^{S6K}$ (threonine 421/serine 424)
GSK-3β (27C10)
phospho-GSK-3β(serine 9; D85E2)
GAPDH (14C10)
すべて Cell Signaling Technology Japan K.K., Tokyo, Japan

手順：

まず、4mg/ml になるよう Sample を調整した。 Sample buffer 11μl と Sample11μl をマイクロチューブで混合（20μl アプライの場合）し、スピンダウンし、キャップを付けて 100℃で 3 分間ボイルし、スピンダウンした。1000ml のメスシリンダーに泳動バッファー（100ml 10x Tris/Glycine/SDS＋900ml miliQ）を準備し、また、ゲルを袋から出し、脱イオン水で軽く洗い、緑の絶縁テープをとり準備した。ゲルをゲル板にセットし、、電極、泳動槽の準備を行った。ウェルの中をフラッシュした後に、スタンダード及び Sample を 20μl ずつアプライした。続いて、Stacking 50V 30 分、Running 100V120 分の条件で電気泳動を行った。 ゲルをカセットから取り出し、well を切った後、メンブレン上に手でゲルを移し、その上に iBlot ろ紙（脱イオン水に浸しておく）を乗せ、ブロッティングローラーを用いて気泡を除いた。電極面を上にして、陰極スタックを乗せ、ブロッティングローラーで気泡を除き、P-3 の条件で 7 分間ブロッティングを行った。ボールペンでメンブレンにネーミングし、カッターでいらないレーンを切った。続いて、450ml miliQ ＋50ml 10x TBS＋500μl Tween20 で TBS-T を作成し、20ml の TBS-T＋1g のスキムミルクを用い、37℃で 1 時間ブロッキング を行った。TBS-T で 5 分間 x3 回の 洗浄を行った後、一次抗体（量は抗体の添付文書に従う）＋10ml TBS-T+ 0.5g BSA fraction V を用いて 4℃overnight 振盪下の条件で一次抗体反応を行った。その後、再度 TBS-T で 5 分間 x 3 回の洗浄を行い、1 μl の二次抗体＋10 ml TBS-T を用いて室温，振盪，1 時間の二次抗体反応を行った。TBS-T で 5 分間 x 3 回の洗浄を行った後、West Dura（Solution A : B=1:1）で反応させ、検出を行った。West Dura を均一にまいた後、5 分間室温でインキュベーションし、ChemiDoc TM MP System, Bio-Rad Laboratories で信号を検出した。

4、統計学的解析

- 測定結果は，平均値 ± 標準誤差、或いは，標準偏差で標記した
- 全ての統計学的処理は，StatView J-5.0 (Abacus Concept, Berkeley, CA, USA)を用いて計算した.
- p value < 0.05 の場合を統計学的に有意差ありと判定した
- 独立した 2 群間の比較検討には，Student's t-test を使用した.
- LPMC、MTT アッセイ、ELISA によるサイトカインの評価は one-way analysis of variance により比較し Bonferroni correction で補正した
- 体重変化、DAI の変化は repeated measures analysis of variance により比較し Bonferroni correction で補正した

実験結果

１、 TNBS 腸炎の腸炎抑制効果検討

1 － ① TNBS 腸炎のモデルの確立：

雄 BALB/c マウス（8 週齢、24-26g）に 150μl の TNBS 溶液(50%Eth-OH)を作成し、これを注腸して TNBS 腸炎を誘発した。TNBS 量は 1.0mg から 2.5mg までで比較し、炎症が全検体に腸炎が均一かつ確実に誘導され、十分な生存が得られる 1.5mg を採用した。このモデルにおいて、臨床症状の経過を検討し、4 日目以降炎症が終息傾向となる為（Fig. 1)、DTCM-G の腸炎抑制効果の検討においては、4 日間の臨床経過と 4 日目の検体評価によって行った。

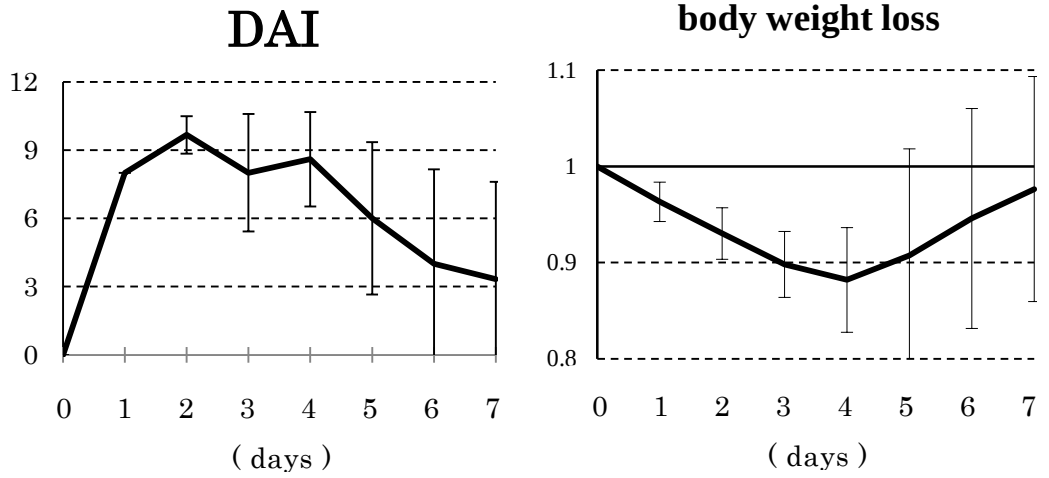


Fig.1 （TNBS 腸炎の自然経過）

TNBS1.5mg/50%Eth（150μL）を注腸し、その後 7 日間、体重減少、下痢、血便をスコアリングし評価した。DAI は 4 日目以降急激に軽快し、体重も 4 日目以降軽快の傾向を認めた。（n=6　mean ± standard deviation）

1 – ② TNBS 腸炎の腸炎抑制効果検討：

雄 BALB/c マウス（8 週齢、24-26g）に TNBS1.5mg/body(50%Eht)を注腸して TNBS 腸炎を誘発し、4 日間経過を観察した。治療群は DTCM-G40 mg/kg、Vehicle control は同量の 3%DMSO を含む 0.5%CMC 溶液を 1 日に 2 回、連日腹腔内投与にて行った。臨床スコアとして、血便・下痢・体重減少からなる DAI(disease activity index)を観察期間中連日評価した。4 病日において、マウスを犠牲死させ、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 MPO による好中球浸潤量の評価を評価した。TNBS は、下痢、体重減少を主徴とする腸炎を誘発した。これに対し、

DTCM-G 40 mg/kg 投与は、腸炎導入後 4 日目の体重減少を抑制し、2-4 日目の DAI スコアを改善させた。また、DTCM-G は、4 日目において腸炎範囲を評価した肉眼スコアを有意に改善させ、腸管短縮抑制効果、腸閉塞抑制効果を認めた（Fig.2）。

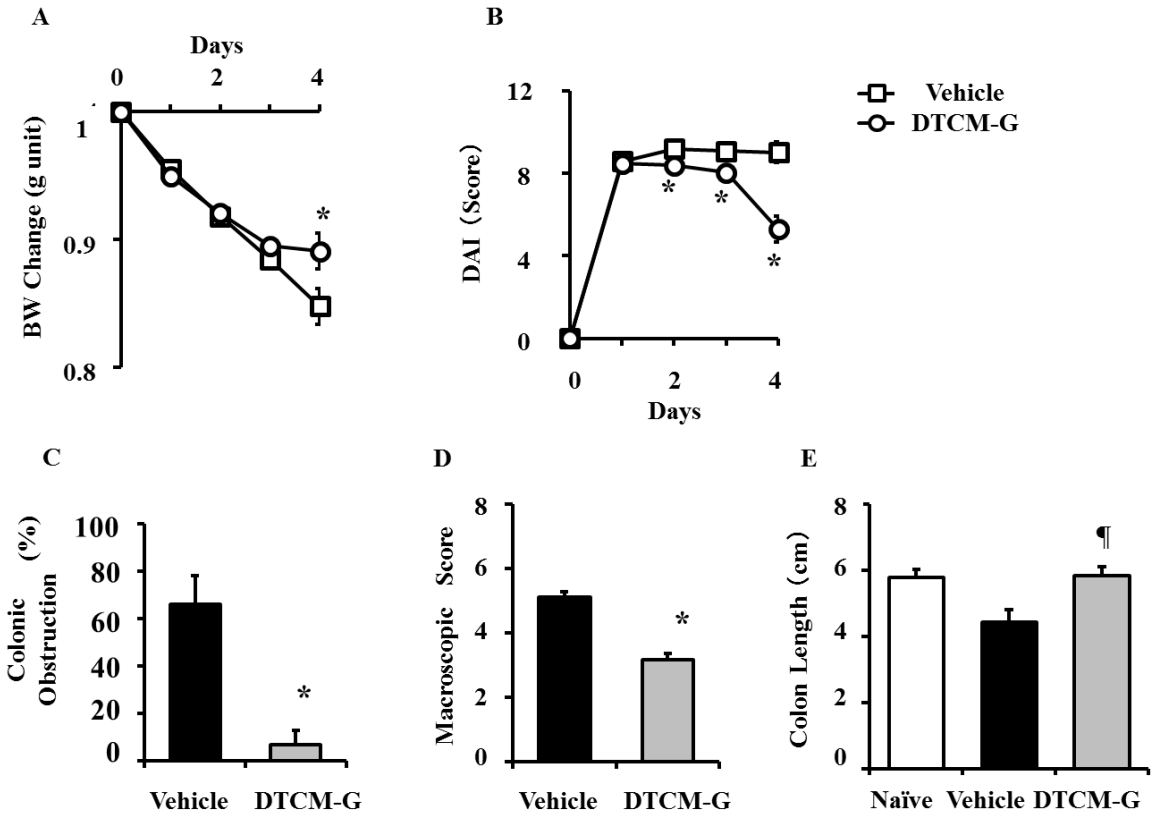


Fig.2（DTCM-G は TNBS 腸炎を抑制する）

TNBS1.5mg/50%Eth（150μL）を注腸し、(A) 体重減少、(B) DAI、(C) 大腸閉塞の頻度、(D) 肉眼スコア、(E) 腸管長において有意な軽快をみとめた。(n=6、mean ± standard error of the mean、* ; $p<0.05$、¶ ; $p<0.0167$)

また、4 日目の検体を病理組織学的に評価すると、無治療群で腸管全層にわたる著明な炎症細胞浸潤と腸管の浮腫状変化が特徴的であったが、DTCM-G は有意に炎症細胞浸潤を抑制し、組織スコアも改善させた（Fig.3）。また、MPO に対する免疫染色を行い腸炎 2 日目、4 日目の好中球浸潤数を定量すると、2 日目、4 日目いずれにおいても、DTCM－G は好中球の浸潤数有意に減らした。また、4 日目における腸管組織をホモジネートし MPO 活性を評価すると DTCM-G は、これも有意に抑制した（Fig.3）。

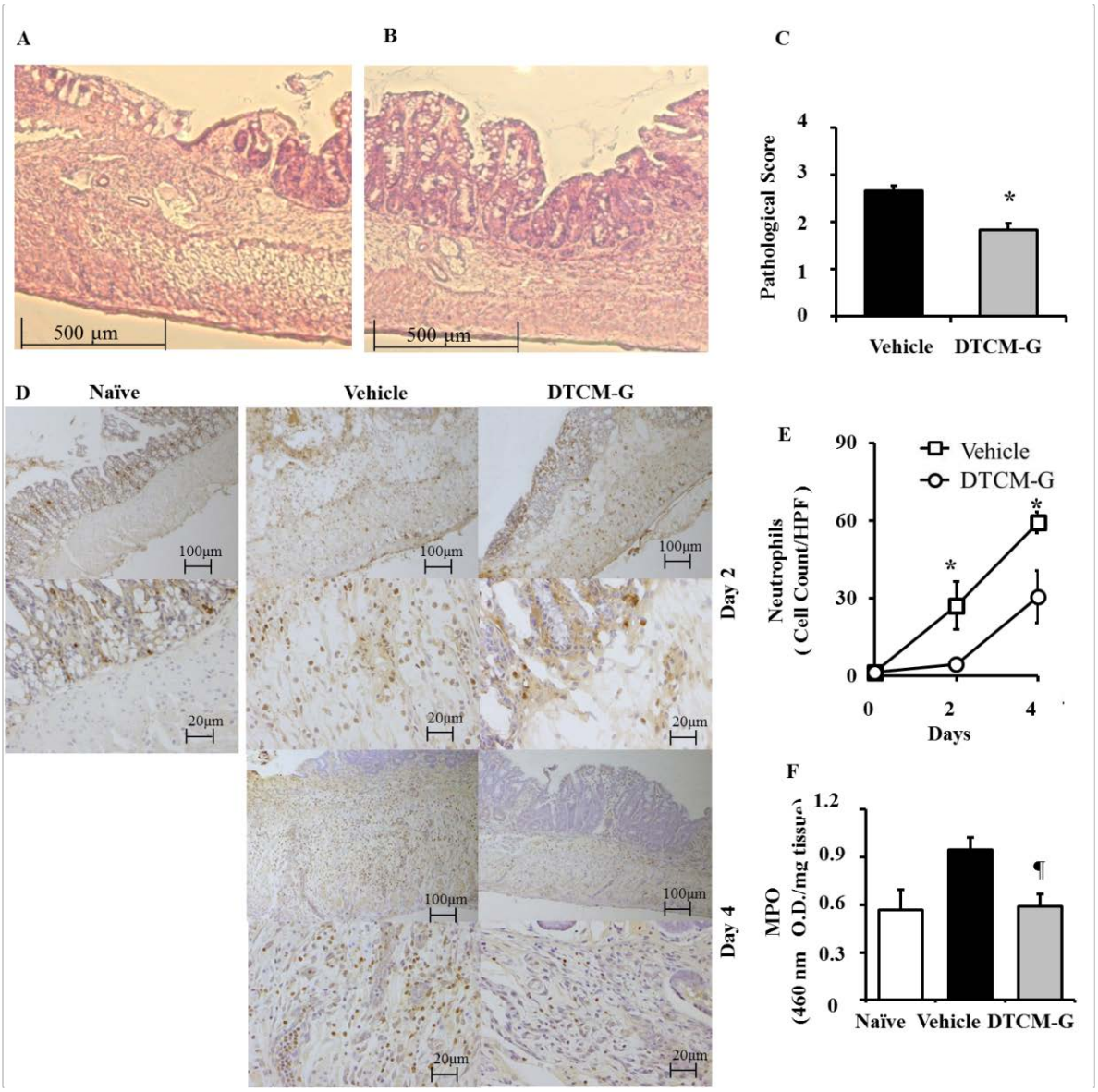


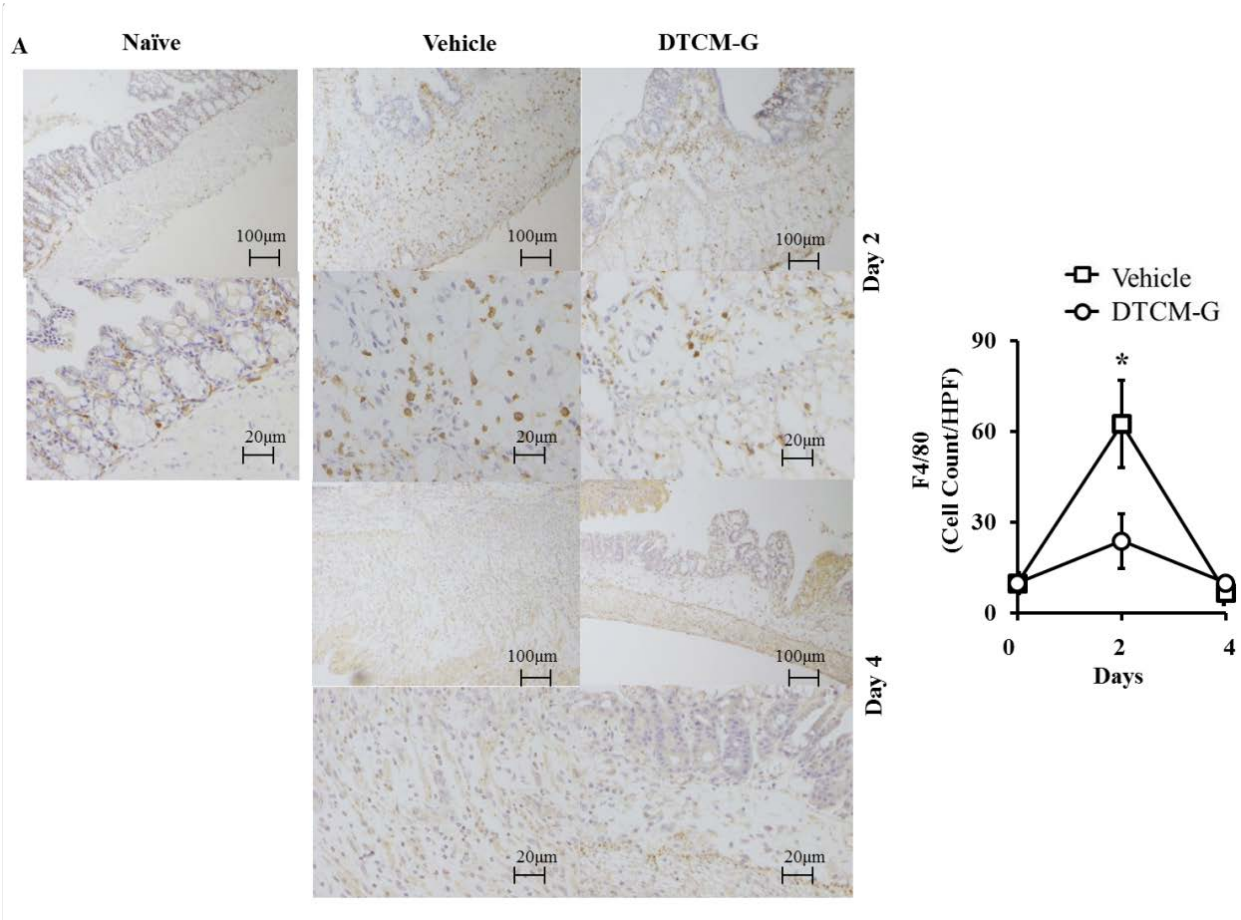
Fig.3（DTCM-G は TNBS 腸炎の組織像を軽快させ、好中球浸潤を抑制する）

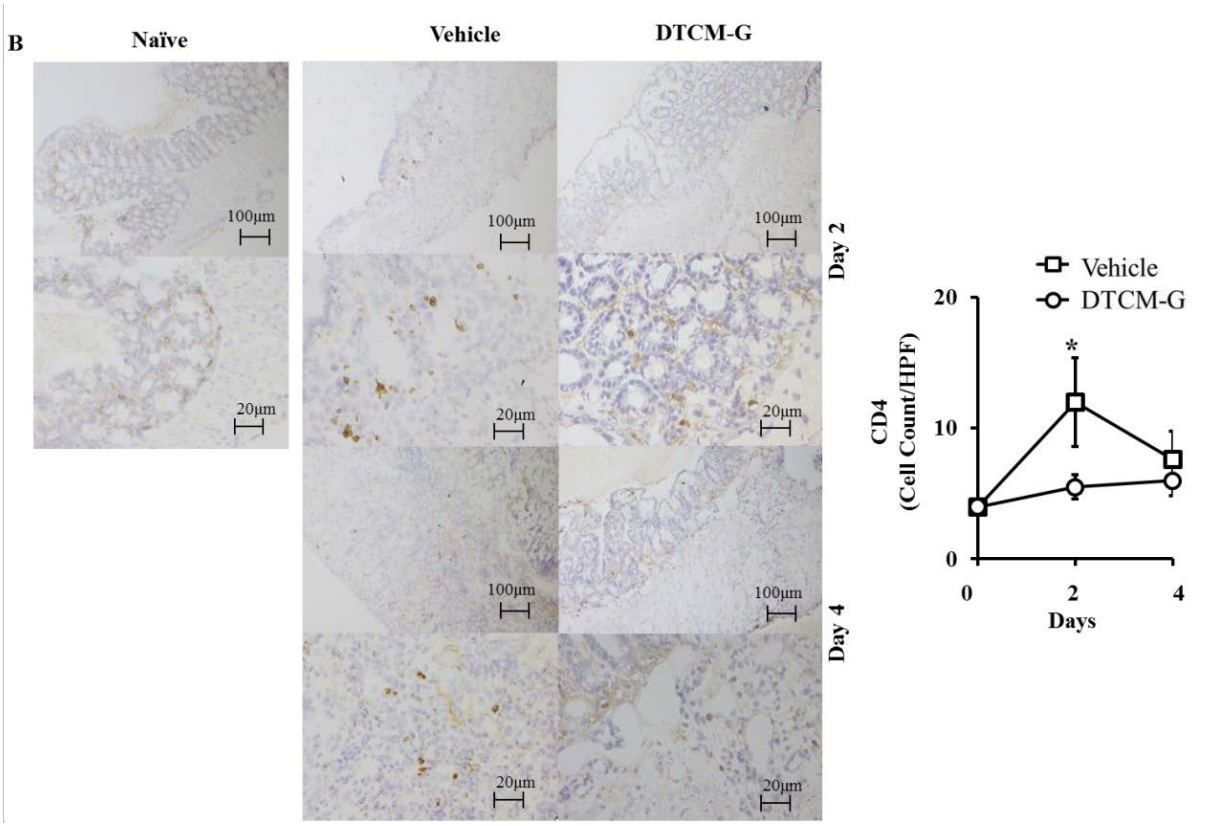
4 日目の大腸組織（HE 染色、40 倍、（A）Viecle、（B）DTCM-G）において組織障害および炎症細胞の浸潤を有意に抑制していた。MPO 免疫染色により 2 日目、4 日目の浸潤好中球数を、もっとも浸潤の多い視野 2 カ所において 200 倍の

視野内の好中球数をカウントし、有意な好中球浸潤の軽快をみとめた（(D) 2 日目 4 日目および腸炎導入前の MPO 染色像。上段 40 倍、下段 200 倍。(E) カウント数。n=4、mean ± standard error of the mean、* ; p<0.05）ホモジネートした 4 日目腸管組織の MPO 活性を評価すると有意な軽快がみられた(n=4、mean ± standard error of the mean、¶ ; p<0.0167)。

1 – ③ DTCM-G の大腸粘膜単核球（LPMC）浸潤抑制効果の検討：

また、腸管標本の免疫組織化学染色により浸潤大腸粘膜単核球の種類・程度を 2、4 病日にて経時的に評価した。無治療群において LPMC は 2 日目に増加し 4 日目に減少していた。F4/80 陽性細胞が LPMC の大半を占めていたが、2 病日に著明に増加し、4 病日に減少していた。これに対し DTCM-G は 2 病日の F4/80 陽性細胞の浸潤を有意に減少させていた。CD4 陽性細胞も同様に、2 病日で増加し、4 病日に減少していた。DTCM-G は 2 病日の CD4 陽性細胞の浸潤を有意に減少させていた。一方、CD8 陽性細胞は増加することなく経過し DTCM-G 投与においてもこれに影響を与えなかった。(Fig.4A-C)




B
Naïve
Vehicle
DTCM-G
100μm
20μm
Day 2
Day 4
Vehicle
DTCM-G
CD4
(Cell Count/HPF)
20
10
0
*
0
2
4
Days

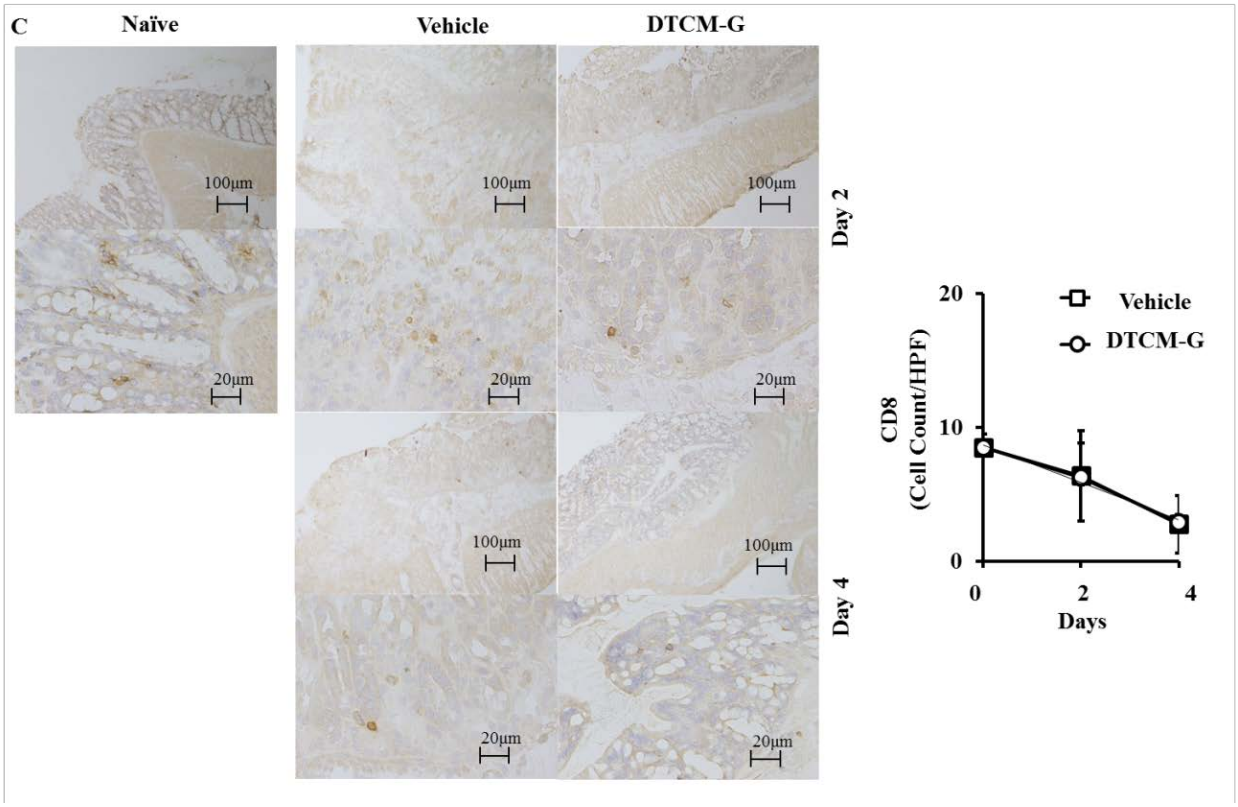

C
Naïve
Vehicle
DTCM-G
100μm
20μm
Day 2
Day 4
Vehicle
DTCM-G
CD8
(Cell Count/HPF)
20
10
0
0
2
4
Days

Fig4.（DTCM-G は LPMC の浸潤を抑制する：免疫染色）

（A）抗 F4/80 抗体、（B）抗 CD4 抗体、（C）抗 CD8 抗体で大腸組織を染色し、腸炎導入前、2 日目、4 日目の陽性細胞数を、もっとも浸潤の多い視野 2 カ所において 200 倍の視野内の好中球数をカウントし、有意な F4/80 陽性細胞/CD4 陽性細胞浸潤の軽快をみとめた（上段 40 倍、下段 200 倍。カウント数 ; n=4、mean ± standard error of the mean、* ; $p<0.05$）

また、腸管から LPMC を単離し、抗 CD11b 抗体、CD4 抗体、CD8 抗体で染色し FACS を用いて pheno-type を評価した所、全体に占める CD11b 細胞の割合、リンパ球に占める CD4,CD8 陽性細胞の割合に有意な変化を認めなかったが、収量個数で比較すると、CD11b 陽性細胞は TNBS 腸炎誘導により増加し、DTCM-G はそれを有意に減少させた。CD4 陽性細胞も同様に TNBS 腸炎誘導により増加し、DTCM-G はそれを減少させた。CD8 陽性細胞に関しては有意な変化を認めなかった。(Fig.5)

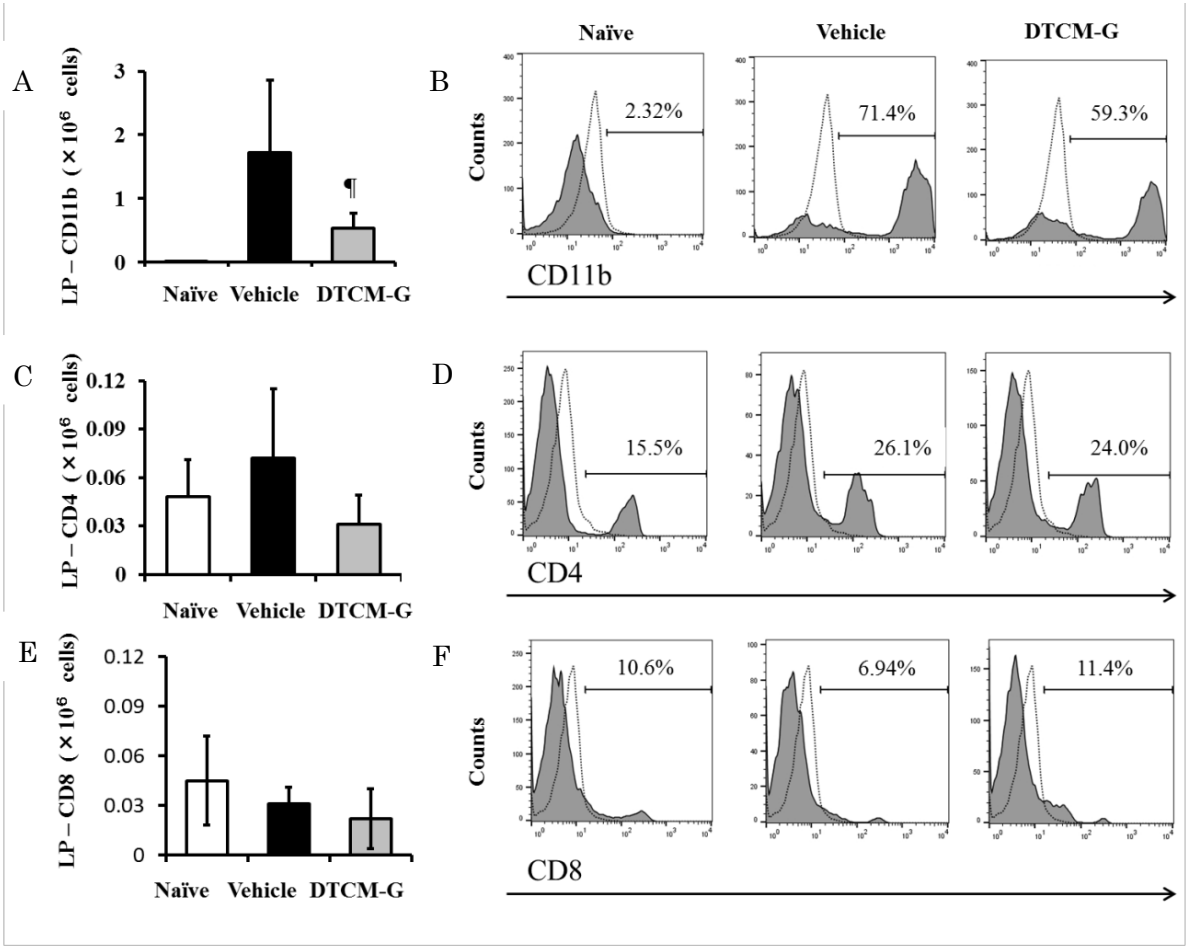


Fig5.（DTCM-G は LPMC の浸潤を抑制する：単離 LPMC）

2 日目における大腸組織から LPMC を単離し、(A,B)抗 CD11b、(C,D) 抗 CD4、

（E、F）抗 CD8 抗体で染色しフローサイトメトリーで陽性細胞の収量（A,C,E）と割合（B,D,F）を、腸炎未導入、vehicle 群、DTCM-G 投与群で比較し、CD11b の収量においての有意差を認めた。(mean ± standard deviation。N=4、p＜0.0167 vs. the vehicle-only control mice)

1－④ DTCM-G の大腸組織における炎症性因子産生抑制効果の検討：

上記結果において 2 病日における LPMC の浸潤抑制効果が示され為、2 病日における組織中炎症性サイトカインの mRNA 定量評価を RT-PCR により行ったところ、腸炎によって亢進した TNF-α、IL-6、MCP-1 の mRNA 発現を DTCM-G は有意に抑制していた。(Fig.6)

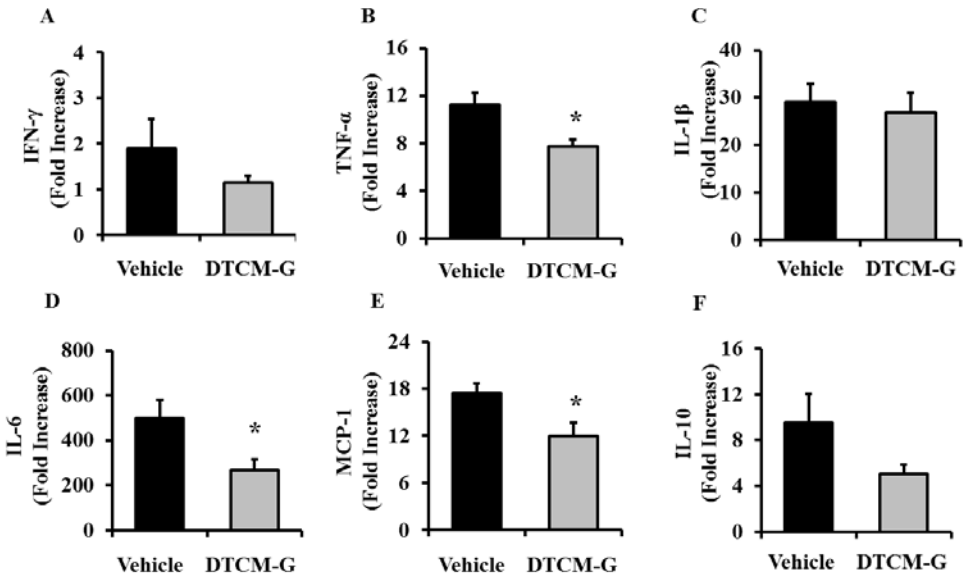


Fig.6（DTCM-G は炎症性サイトカイン mRNA 産生を抑制する）

2 日目の大腸組織から mRNA を抽出し、(A) IFN-γ、(B) TNF-α、(C) IL-1β、(D) IL-6、(E) MCP-1、(F) IL-10 の発現量を評価した。結果は glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase（GAPDH）の発現量により補正し、非腸炎での発現量を 1 として比較した。(mean ± standard error of the mean。Duplication of 8 mice/group ;*p<0.05 vs. the vehicle-injected control mice)

以上より、DTCM-G は TMBS-腸炎の抑制効果を認め、マクロファージおよび CD4 陽性 T リンパ球の浸潤を抑制し、またそれに伴う炎症性サイトカインの産生を抑制することが分かった。

2、DSS 腸炎の腸炎抑制効果検討

次に、DTCM-G が他のモデルにおいても同様に腸炎抑制効果を示すかどうか調べるために DSS 腸炎における腸炎抑制効果を検討した。雄 C57BL/6 マウス（8 週齢、22-25g）に 3%DSS を 5 日間(day0-5)自由飲水させて大腸炎を誘発させ、その後 5 日間通常の水を飲水させて継続する炎症経過を観察した。治療群へは DTCM-G 40 mg/kg、Vehicle control へは同量の 4%DMSO を含む 0.5%CMC 溶液を 1 日に 2 回、連日腹腔内投与した。腸炎の経過は DAI のスコアリングを行い評価した。両群とも 10 日目に犠牲死させ、大腸組織を採取し、組織診において、腸管の傷害度を評価した。これに対して DTCM-G は 7-10 日目の体重減少、6-10 日目の DIA を容量依存性に軽減させ、40　mg/kg 投与群は、組織像、組織スコアでも有意な腸炎抑制効果を認めた。（Fig.7）

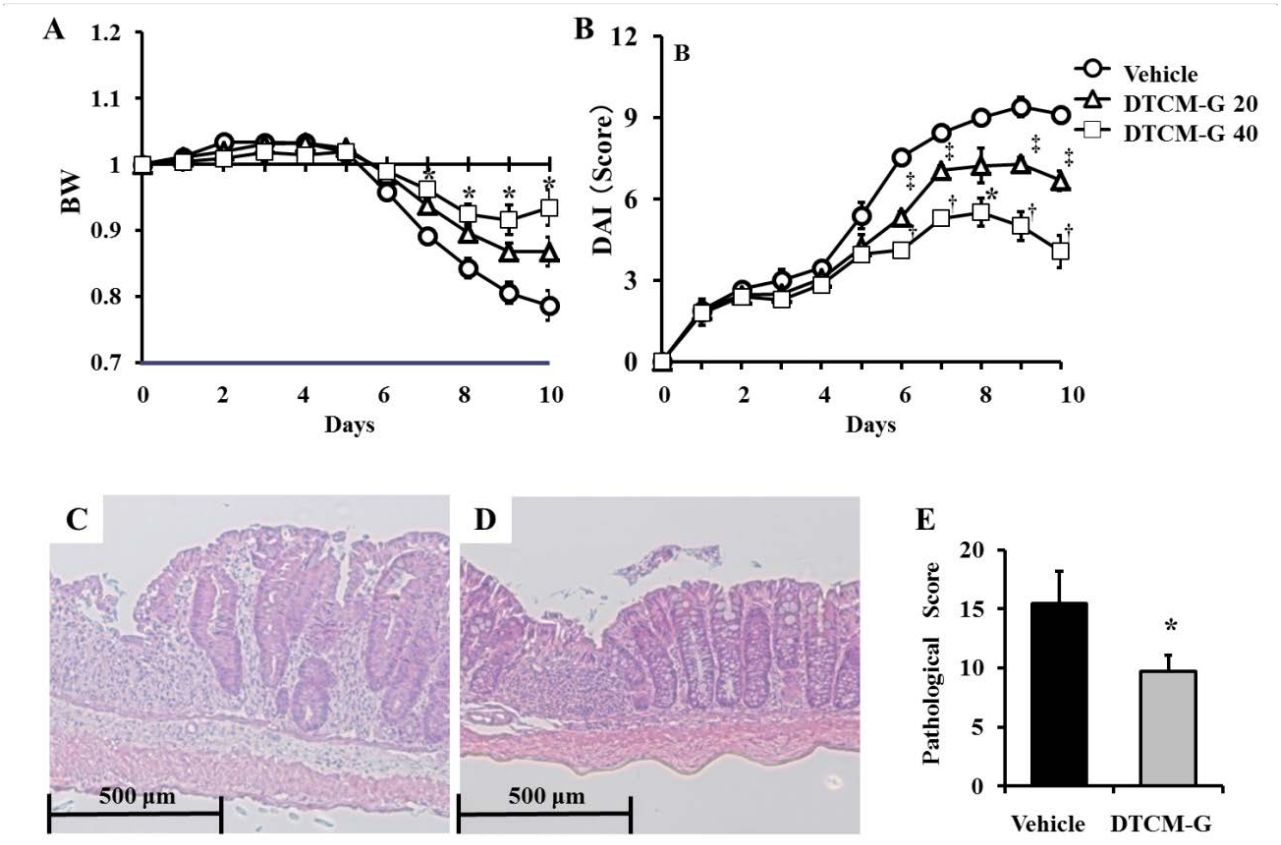


Fig.7（DTCM-G は DSS 腸炎を抑制する）

3%DSS 水溶液を 5 日間内服させた。20mg/kg、40mg/kg の DTCM-G を 1 日 2 回腹腔内投与し、10 日目まで観察した。(A) 体重減少、(B) DAI で評価すると、容量依存性に腸炎の抑制効果を認めた。10 日目の検体において、(D) 40mg/kg

の DTCM-G 投与は(C)コントロール群に比較して著名に組織像を改善させ、(E)組織スコアにおいても有意な軽快をみとめた。(n=6、mean ± standard error of the mean、* ; p<0.057)

3、腸炎抑制機序の検討

3 – ① 単離 LPMC 中の CD4 陽性細胞の増殖能および phenotype 評価：

以上のように 2 つのマウス IBD モデルで DTCM-G が著名な腸炎抑制効果を示したため、その作用機序の解明を試みた。まず、TNBS 腸炎は、TNBS と結合した自己組織に反応する CD4 陽性細胞が多クローン性に増殖することで誘発される腸炎とされる事、DTCM-G が Tcell の増殖と IFN-γ産生を抑制する効果を有する事から、DTCM-G が LPMC 中の CD4 陽性細胞の増殖を抑制したのではないかと仮説をたてた。そこで、単離 LPMC に concanavalin A を添加して増殖能を評価した。しかしながら、2 病日目の LPMC において DTCM-G の増殖抑制効果を認めなかった(Fig.7)。評価時期の問題や単離操作による問題を考え 1 病日の LPMC や腸間膜リンパ節のリンパ球でも同様の評価を行ったが DTCM-G の増殖抑制効果を認めなかった(Fig.8)。また、CD4 陽性細胞の中で Th1 の割合減少や Treg の割合増加の可能性を考え、CD4 陽性 t-bet(T-box transcription factor)陽性細胞、CD4 陽性 CD25 陽性 Foxp3 陽性細胞の割合を評価したが、有意な変化を認めなかった(Fig.9)。

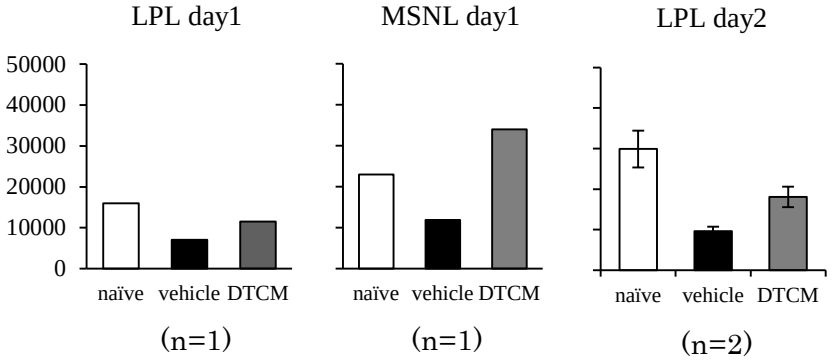


Fig.8 (DTCM-G は単離した腸管粘膜/腸間膜リンパ節リンパ球の増殖を抑制しない)

1 日目または 2 日目における腸管粘膜、腸間膜リンパ節のリンパ球を単離し、10 万個のリンパ球に対して 2 μg/ml の concanavalin A で刺激した。ペニシリン 100u/ml、ストレプトマイシン 100μg/ml、10%FBS、50μM2-mercaptoethanol を添加した RPMI1640 培地で 37℃5%CO2 下に 48 時間培養し、測定 8 時間前に

3H-thymidine (1 μCi/well)を添加し β-counter (Perkin Elmer; Boston, MA)で3H-thymidine 取り込み量を測定した。しかしながら、DTCM-G による増殖抑制効果を示すことができなかった。

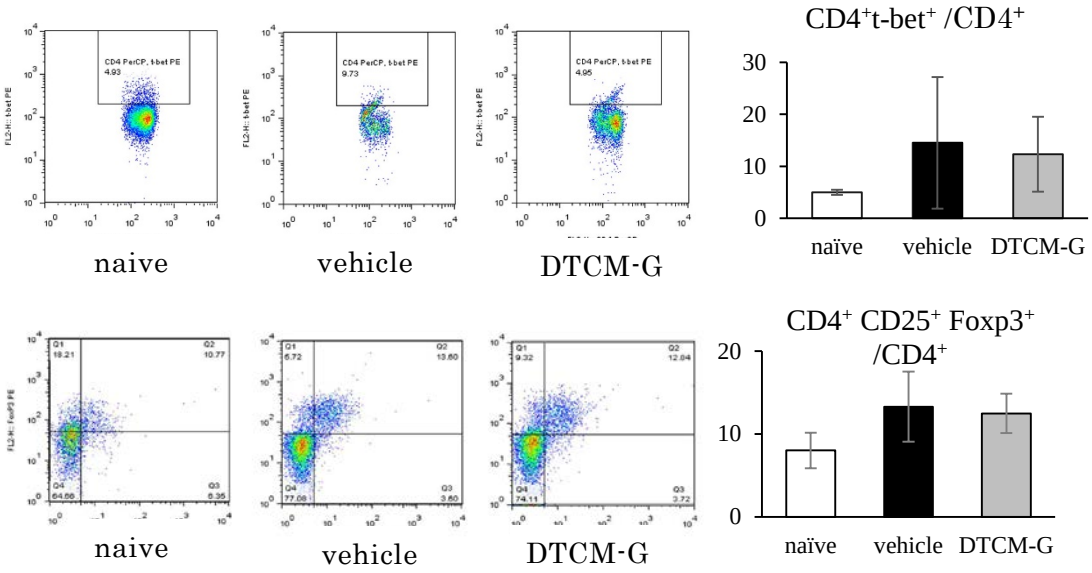


Fig.9（DTCM-G は LPMC におけるの Th1、Treg 誘導に影響を与えない）

2 日目における単離 LPMC を抗 CD4/T-bet 抗体（上段 n=3　mean ± standard deviation)、抗 CD4/CD25/Foxp3 抗体（下段　n=5　mean ± standard deviation）で染色しフローサイトメトリーで陽性細胞の割合を、腸炎未導入、vehicle 群、DTCM-G 投与群で比較したが有意差を認めなかった。

3－②　RAW264.7 細胞を用いた抗炎症作用の検討および作用機序解析：

次に、他に可能性のある腸炎抑制機序として、DTCM-G がマクロファージの活性化を抑制したのではないかと仮説を立てた。マクロファージにおける DTCM-G の作用を検討するため RAW264.7 細胞株を用いた。0.04%DMSO で溶解した 0-20μg/ml　DTCM-G に 2 時間暴露させた後、1 μg/ml の LPS で刺激し、8 時間後の RAW264.7 細胞株の viability を評価すると 10mg/ml 以下の DTCM-G では、viability の低下はみられなかった。次に 0.04%DMSO で溶解した 7.5μg/ml の DTCM-G に 2 時間暴露させた後、1 μg/ml の LPS で刺激し、24 時間後の培養上清を採取した。上清中の炎症性サイトカインを、ELISA 法を用いて定量評価し、対照群（0.04%DMSO）と比較した。DTCM-G は LPS 刺激による IL-6、TNF-α の産生を有意に抑

制した。（Fig.9）

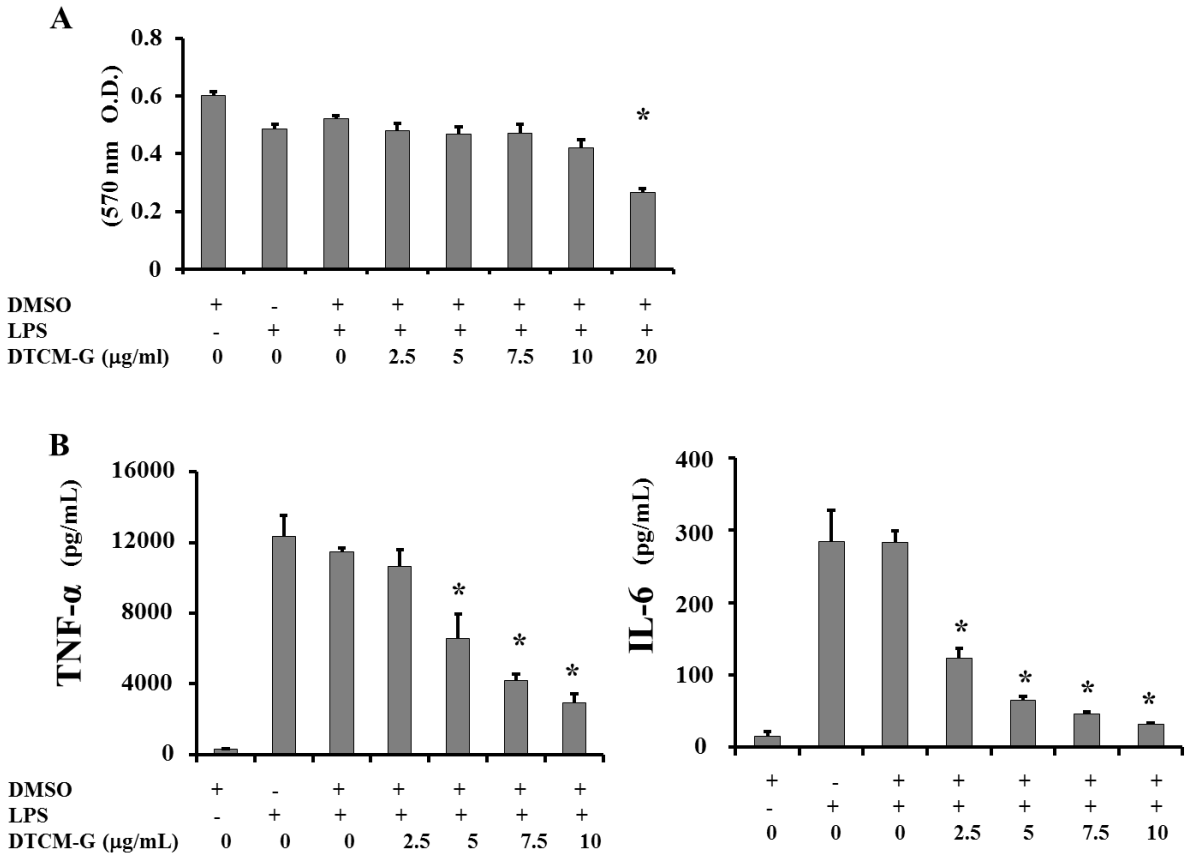


Fig.9（DTCM-G は RAW264.7 細胞株の LPS 刺激に対する IL-6、TNF-α産生を抑制する）

（A） RAW264.7 細胞株に 0-20μg/ml の DTCM-G を 2 時間投与の上 1μg/ml の LPS で刺激し 8 時間培養して MTT を加え 4 時間後の吸光度(570nm)を測定した。10μg/ml 以下の濃度では毒性を及ぼさない事がわかった。(mean ± standard error of the mean from three independent experiments *p＜0.0018 vs.the dimethyl sμlfoxide [DMSO]-only treated cells).（B） 0-10mg/ml の DTCM-G を投与し 2 時間後に 1μg/ml LPS で刺激し、8 時間培養の上、上清中の TNFα、IL-6 量を ELISA 法を用いて評価した。DTCM-G は容量依存性に TNFα、IL-6 産生を抑制した。(mean ± standard error of the mean from three independent experiments *p＜0.0023 vs.the DMSO-only treated cells).

このようにDTCM－GはLPS刺激に対するマクロファージの活性化を抑制する事が示された。Primary Tcellにおいて、DTCM-GはAKTの下流である p70S6K のリン酸化を抑制することが示されている。そこで、RAW264.7細胞おいてもAKTを中心とするカスケードがDTCM-Gの作用機序に関わるのではないかと考え、RAW264.7細胞を0.04%DMSO で溶解した7.5μg/mlのDTCM-Gに2時間暴露させた後、1μg/mlのLPSで刺激し、0-45分の間のAKTカスケードにおけるリン酸化の変化とDTCM-Gがそれに及ぼす作用に関し検討した。LPS刺激によりPDK1、AKT、GSK-3β、c-Raf、p70S6Kともリン酸化が亢進した。これに対しDTCM-GはPDK1、c-Raf、p70S6Kのリン酸化に影響を与えず、AKTのリン酸化を抑制した一方、その下流のGSK-3βのリン酸化は亢進させていた。（Fig.10）

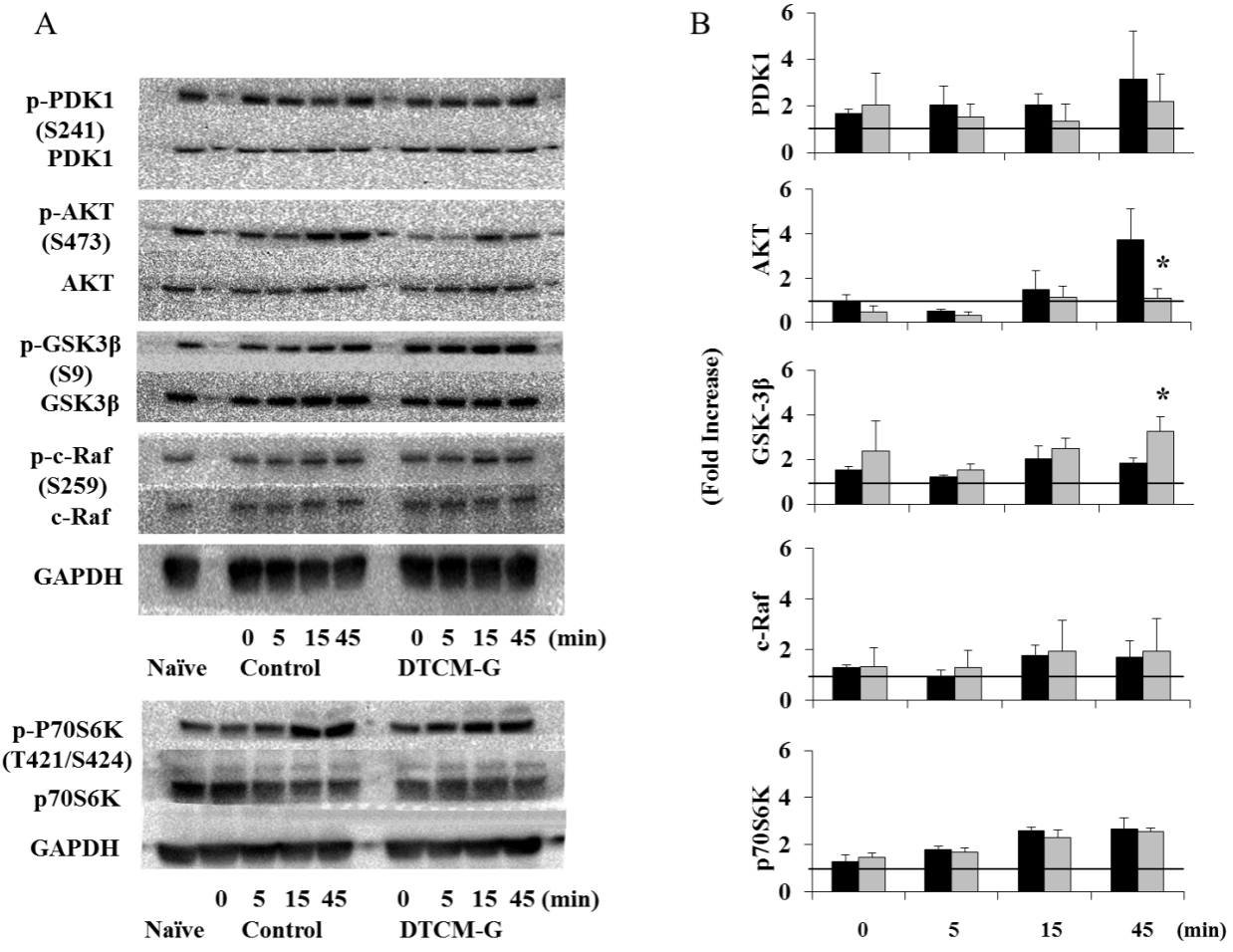


Fig.10（DTCM-GはAKTのリン酸化を抑制しGSK-3βのリン酸化を亢進させた）
（A）7.5mg/mlのDTCM-Gを投与し2時間後に1μg/ml LPSで刺激し、0-45分後に細胞を回収しタンパクを抽出して、PDK1（S241）、AKT（S473）、GSK3β

（S9）、c-Raf（S259）、P70S6K（T421/S424）のリン酸化の程度を比較した。（B）各全タンパク量に対するリン酸化タンパク量比を、未刺激細胞における値を 1 として換算し比較した。(mean ± standard error of the mean from three independent experiments *p＜0.05).

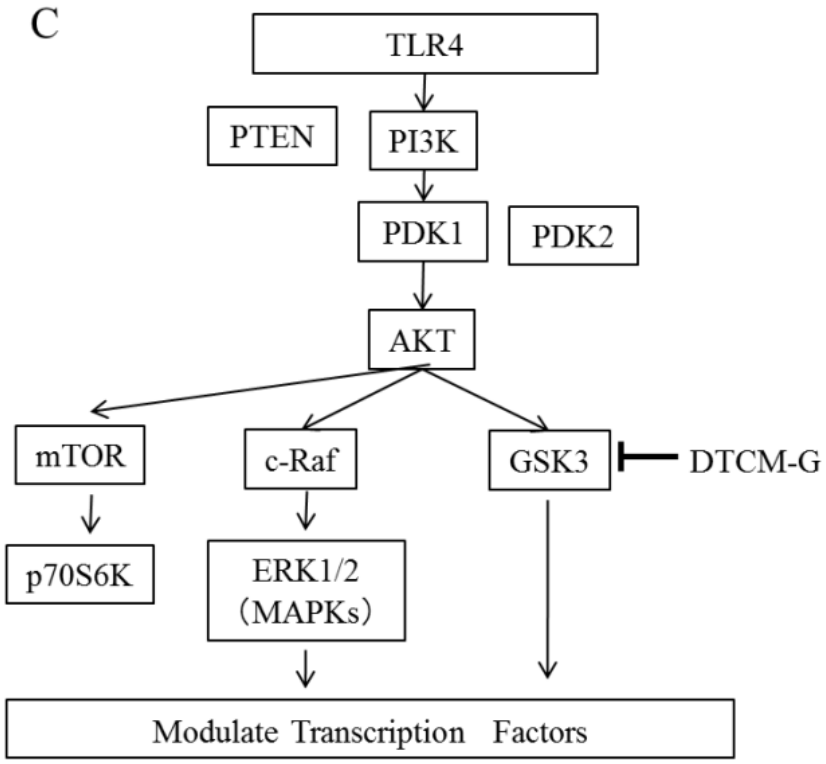


Fig.11　PI3K（Phosphoinositide 3-kinase）-AKT-GSK3 経路のシェーマ

考察

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、アミノサリチル酸製剤（5-ASA）、ステロイドに加え免疫抑制剤・抗 TNFα 抗体の使用により治療成績が向上しているが、未だ難治性であり更なる治療法の開発が望まれる。IBD の原因は未解明であるが、遺伝的因子と環境的因子が組み合わさって引き起こされるとされ、その病態は T 細胞の無秩序な増殖、マクロファージなどから産生される過剰な炎症性サイトカインによる炎症波及が特徴とされる。一方、新規抗炎症薬 DTCM-G は抗菌薬 9-methylstreptimide の誘導体で 355Da の低分子薬である [260]。DTCM-G は RAW264.7 細胞株において、LPS 刺激による NF-κB の誘導は阻害しないものの、AP-1 の誘導を抑制し、NO や COX2 の産生を抑制する事が知られる [260]。また、primary T 細胞において mTOR 経路の抑制により細胞周期の進展を抑制し、増殖を抑制する [262]。また、マウス同種心移植モデルにおいて生存率を上げる事が分かっている [262]。我々は、マクロファージの活性化抑制作用と T 細胞の増殖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、その臨床応用にむけて、マウスを用いた２つの IBD モデルでの DTCM-G の腸炎抑制効果について検討した。

TNBS 腸炎は、1989 年 Morris らによりラットの慢性大腸炎モデルとして発表され [270]、1995 年 Neurath らがマウスでの導入を報告した [84]。TNBS と伴に注腸されるエタノールが腸管粘膜を障害し、TNBS が腸管粘膜内に浸透する。TNBS は、自己組織と結合して抗原性を発揮し、Th1 に誘導される遅延過敏反応を誘導するハプテンであり、TNBS 腸炎においては、腸管由来組織がハプテン化され、Th1 に誘導される CD 類似の特徴を有する IBD モデルが誘導される [271]。このモデルでは、下痢、体重減少を主徴とする腸炎が誘発され、炎症のピークである 4 日目において評価すると、炎症部腸管の全周性腸壁肥厚による腸閉塞を高率に認め、腸管は短縮していた。炎症部位は近位大腸中心にあり、炎症部腸管は発赤し壁肥厚および潰瘍形成を伴っていた。また組織像においては、腸管全層にわたる著明な炎症細胞浸潤と浮腫状変化が特徴的で、ホモジネートした腸管組織では MPO 活性が著明に上昇していた。DTCM-G はこのモデルに対し、体重減少、下痢、血便の程度、腸閉塞の頻度、腸炎の肉眼所見や MPO 活性、組織学的所見において明らかな腸炎抑制効果を示した。El-Salhy らもまた、Wistar rat における TNBS 腸炎で、DTCM-G が内視鏡像、検体の肉眼所見、組織所見で評

価して著明な腸炎抑制効果を示した事を報告している[272]。

一方、DSS 腸炎は、DSS を含む水をマウスに飲水させることで腸炎を発症させる。DSS はムコ多糖の一種で，腸粘膜上皮障害を起こす。粘膜バリア障害の結果、DSS は粘膜下層に達し抗原提示細胞に貪食される。これにより活性化した抗原提示細胞が T 細胞活性化を引き起こし、UC の特徴を有する IBD モデルが誘導される[273]。体重減少、下痢、血便を主徴とする腸炎が誘導され、炎症のピークである 10 日目の組織像では、粘膜障害と粘膜下層を中心とする炎症細胞浸潤の像を呈した。DTCM-G はこのモデルに対しても、体重減少、下痢、血便の程度、組織学的所見において、明らかな腸炎抑制効果を示した。以上のように２つのマウス IBD モデルにおける著明な DTCM-G の腸炎抑制効果が示された。

次に DTCM-G の腸炎抑制のメカニズムを TNBS 腸炎用いて解析した。まず、免疫染色を用いた組織診で、腸炎の構成細胞について評価した。時系列評価を行うと、F4/80 陽性マクロファージと CD4 陽性 T 細胞は 2 日目に最も多く、4 日目には減少傾向にある特徴を認めた。マクロファージと CD４陽性 T 細胞の増加が臨床的な炎症のピークにむけて平行して増加する点は過去の報告どおりであった[274,275]。また、Palman らの報告同様、好中球も遅れて徐々に増加し、4 日目に最も多くなった[276]。これに対して DTCM-G は、2 日目のマクロファージ、CD4 陽性 T 細胞、好中球の浸潤を抑制し、4 日目においても好中球浸潤を有意に抑制していた。また、2 日目においては、LPMC を単離し構成細胞を検討した。LPMC に対する CD11b 陽性マクロファージ、リンパ球に対する CD4 陽性細胞の割合は、腸炎でともに増加したが、DTCM-G による有意な割合の変化は来さなかった。しかしながら、収量で評価すると CD11b 陽性マクロファージや CD4 陽性 T 細胞は腸炎で著明に増加し、DTCM-G はこれを減少させた。以上より、マクロファージ、CD4 陽性 T 細胞の浸潤抑制が DTCM-G の腸炎抑制効果の機序に関連していると考えた。4 日目の好中球浸潤抑制に関してはその結果として誘導されるのではないかと考えた。

次に、マクロファージや T 細胞の浸潤抑制効果がはっきりしていた 2 日目において、腸管組織中の炎症性サイトカイン/ケモカインの mRNA 発現量を解析した。Th1 を反映する IFN-γ に加え、マクロファージなどから産生され IBD の病勢に反映するサイトカインで、モノサイトや T 細胞のアポトーシスを抑制し炎症を遷延させる TNF-α、IL-6 のｍRNA 発現を評価した

[187,188,198,199]。他、IBD における腸管マクロファージから放出される IL-1β[191]、抗炎症性サイトカイン IL-10、マクロファージなどの遊走に重要な役割を果たす MCP-1[209,210] を評価した。RT-PCR で評価すると、過去の報告通り腸管内の TNF-α、IL-6、MCP-1、IL-1β、IL-10、IFN-γ のサイトカイン mRNA 発現は増加していた。他に IBD の病態に関連する IL-12p40[84,86]、IL-17[105,109] のｍRNA 発現も評価を試みたが、対照群での mRNA 増加を証明できなかった。一方、DTCM-G 投与は TNF-α、IL-6、MCP-1 の発現を有意に抑制し、IFN-γ の発現も抑制していた。これは、DTCM-G はマクロファージおよび CD4 陽性細胞の浸潤を抑制した事を反映した結果だと考えられた。あるいは、浸潤のみならず炎症細胞の活性化を抑制し、炎症性サイトカインの産生を抑制して腸炎を抑制している事が考えられた。

TNBS 腸炎は、TNBS と結合した自己組織に反応する CD4 陽性細胞が多クローン性に増殖することで誘発される腸炎とされる事[270]、DTCM-G がマウスの primary Tcell の増殖と IFN-γ 産生を抑制する効果を有する事[262]、マウスの同種心移植モデルで生存率を改善させる事から[262]、DTCM-G が LPMC 中の CD4 陽性細胞の増殖を抑制し腸炎を抑制する機序が DTCM-G の主作用なのではないかと仮説をたてた。そこで、単離 LPMC に concanavalin A を添加して 2 日目 LPMC 中の CD4 陽性細胞の増殖能を評価した。しかしながら、対照群の増殖能は非腸炎導入マウスの LPMC よりも低く、DTCM-G 投与群では増殖能はむしろ亢進していた。腸炎の経過において 2 日目は LPMC 数増加のピークであり、この時の T 細胞の増殖能自体はピークアウトしているのでないかと考え、評価タイミングがの変更を考慮した。そこで腸炎 1 日目の LPMC で同様の評価を行ったが、結果は同じであった。更に、LPMC の単離操作によるリンパ球の viability 低下やリンパ球の純正さの問題を排除するため、腸間膜リンパ節のリンパ球を単離し、増殖能を評価したが、やはり対照群の増殖能が最も低く、DTCM-G 群では対照群より増殖能が亢進していた。この所見から、大腸の単離 LPMC では、DTCM-G は CD4 陽性細胞の増殖を抑制しないと解釈される。しかしながら、TNBS 腸炎における LPMC/腸間膜リンパ節リンパ球、さらには、IBD 患者の LPMC を解析すると増殖能が亢進していることがが報告されており[277,278]、これらの報告と、我々の結果において対照群で増殖能が低かった点との解離が存在する。これらの報告では、我々の検討と比較して刺激の種類や検体採取タイミングが異なり、検討の余地がある為、今後の研究課題として残る。

また一方で、CD4 陽性細胞の構成変化に注目し、CD4 陽性細胞の中で Th1 の割合減少や Treg の割合増加の可能性を考えた。そこで、LPMC 中の CD4 陽性 t-bet 陽性細胞、CD4 陽性 CD25 陽性 Foxp3 陽性細胞の割合を評価したが、いずれも対照群で増加を認めたものの、DTCM-G 投与群との有意な変化を認めなかった。この所見からは、DTCM-G は T 細胞の Th1 や Treg への分化を誘導しないと解釈された。

しかしながら、DTCM-G が大腸組織への CD4 陽性リンパ球の浸潤を抑制し、IFN-γ の mRNA 発現を抑制した事は確かであり、単離 LPMC の実験結果が実際の腸管内での病態を反映していない可能性があると考えられる。すなわち、LPMC の結果に反して、実際の腸管内では DTCM-G が IFN-γ 産生 T リンパ球の増殖を抑制している可能性がある。あるいは、増殖抑制や Th1 分化誘導以外の機序として、遊走抑制の可能性がある。例えば、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が考えられる。事実、Khan らは、MCP-1 ノックアウトマウスに DNBS 腸炎を誘導すると腸炎の重度度が軽く T 細胞の浸潤と IFN-γ 産生が抑制されることを報告している [279]。

一方、TNBS 腸炎はマクロファージの高度な浸潤が特徴的である [276]。また、抗 CD11b 抗体や抗 CD18 抗体によってマクロファージを抑制した TNBS 腸炎では、TNBS 腸炎が重症化しないことが示されている [280,281]。このようにマクロファージは TNBS 腸炎において炎症の中心的な役割を果たしていると考えられる。マクロファージの浸潤抑制のみならず、DTCM-G は、腸管内でのマクロファージ由来の TNF-α、IL-6、MCP-1mRNA 発現 [282,283] を抑制しており、マクロファージの活性化を抑制する事が DTCM-G の主作用なのではないかと次に仮説をたてた。LPMC や Primary なマクロファージでの実験系が確立できなかった為、マウスのマクロファージ類似細胞株 RAW264.7 細胞株を用いて検討した。同セルラインで DTCM-G が LPS 刺激による NO、COX2 産生を抑えることを Takeiri らが示している [260]。本検討ではこれに加えて、DTCM-G が LPS 刺激による TNF-α、IL-6 の産生を抑えることを示し、DTCM-G がマクロファージの炎症活性を抑制することが示された。

これまでに、Takeiri らは、DTCM-G による、RAW264.7 細胞の LPS 刺激に対する活性化抑制効果は、AP-1 の抑制による事を示している [260]。また、

それは、MAPK 経路を介するものではなく、NF-κB、CREB(cAMP response element binding protein)、C/EBPβ の活性化を抑制しない事が示されている [260]。一方、私たちは、これまでに、DTCM-G が primary T 細胞において $P70^{S6K}$ のリン酸化を抑制すること、c-Jun の DNA 結合を抑制することを示している [262]。$P70^{S6K}$ は AKT シグナル経路の下流であるので [284]、DTCM-G が、LPS 刺激に対する AKT や $P70^{S6K}$ の活性化に影響を与えるかどうかを検討した。炎症反応においても AKT 経路は影響を受け、LPS 刺激は PI3K の p110β サブユニットを介して PIP2（phosphatidyl-inositol 4,5 diphosphate）をリン酸化させ PIP3（phosphatidyl-inositol 3,4,5 triphosphate）へ変化させる [285]。PDK1 と AKT が PIP3 に結合すると AKT がリン酸化される。逆に PTEN（phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10）は PIP3 を PIP2 に変えこれを抑制する [286]。リン酸化された AKT は c－Raf をリン酸化させ、MAPK や AP-1 や NF-κB などの転写因子の活性化を抑制することが知られる [286,287]。PI3K 系阻害薬 wortmannin 、AKT 阻害薬 Ly294002 やｍTOR 阻害薬ラパマイシンは $P70^{S6K}$ のリン酸化を抑制し、NF-κB を介さない形で NO 産生を抑制する事も知られている [284,288]。一方でまた、AKT のリン酸化は GSK-3β のリン酸化を亢進して NF-κB の転写活性を抑制する事が知られ、このように AKT のリン酸化亢進は抗炎症性の作用を及ぼすとされいている [289]。RAW264.7 に LPS 刺激を加えると、これらの報告通り、PDK1、AKT、c-Raf、$P70^{S6K}$、GSK-3β のリン酸化が亢進した。これに対し DTCM-G は、AKT の serine473 のリン酸化を抑制した（AKT の Thr308 のリン酸化は、どの実験群でも検出する事が出来なかった)。しかしながら、DTCM-G は c-Raf のリン酸化を抑制せず、$P70^{S6K}$ のリン酸化も抑制しなかった。一方、もう一つの AKT 下流分子である GSK-3β のリン酸化に対しては抑制せず、逆に亢進させる結果となった。AKT serine473 のリン酸化に関しては抑制されたものの下流の分子に影響を与えていない事から、GSK-3β のリン酸化亢進が DTCM-G の主作用に関わるのではないかと考えられた。リン酸化亢進によって GKS-3β の活性は抑制され、抗炎症作用をもたらす事が分かってる為 [289,290]、私たちは、DTCM-G が腸管の障害を抑制した機序が、このマクロファージにおける GSK-3β の抑制によるものなのではないかと考えている。実際、PI3K ノックダウンによる GSK-3β 抑制は自己誘発性腸炎を軽減させる事や [291]、GSK-3β 抑制剤である LiCl(lithium chloride)や SB216763 が、マウスの DSS 腸炎を軽快させることが報告されている [292]。今後、AKT のリン酸化が抑制された結果との解離や GSK-3β から下流の反応、AP-1（特に c-jun）

や NF-κB との関係、生体内での GSK-3β の抑制の証明などが、今後の研究課題として残る。

TNBS 腸炎、DSS 腸炎における便の状態や体重減少から判断すると、マウスへの 1 日 80mg/kg の DTCM-G 投与では、10 日間まで安全に投与できた。また、マウス心移植における慢性拒絶モデルにおいては、1 日 40mg/kg の DTCM-G 投与では、4 週間まで安全に投与できた[263]。よって、マウスにおける以上のような投与方法では、DTCM-G の毒性を呈さないと考えられた。今後、DTCM-G の臨床応用に向けては、高等動物での安全性や効果の検討が必要と考えられる。また、経口投与での検討や既存薬剤との効果比較は DTCM-G の臨床応用への可能性を検討する上での課題である。

以上より、DTCM-G はマウスの IBD モデルにおいてマクロファージの活性化と浸潤を抑制し著明な腸炎抑制効果を示した。DTCM-G は IBD 治療における効果的な治療薬になる可能性があると考えられた。

総括及び結論

1　研究全体から得られた新知見

- DTCM-G は TNBS 腸炎において、体重減少、血便、下痢の程度、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 定量で評価し、著明な腸炎抑制効果を認めた
- DTCM-G は TNBS 腸炎においてマクロファージ、CD4 陽性 T 細胞および、好中球の浸潤を抑制した
- DTCM-G は TNBS 腸炎において、腸管組織の TNF-α、IL-6、MCP-1、IFN-γ の mRNA 発現を抑制した
- DTCM-G は DSS 腸炎において、体重減少、血便、下痢の程度、組織診、組織スコアで評価し、著明な腸炎抑制効果を認めた.
- 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、RAW264.7 細胞株において LPS 刺激による AKT serine473 のリン酸化を抑制したが、下流分子のリン酸化は抑制されず、GSK-3β serine9 においてはリン酸化を亢進させた

2　新知見の意義

DTCM-G は IBD 治療における効果的な治療薬になる可能性があると考えられた。

3　今後の研究展開と課題

機序解明においては、生体内での GKS-3β リン酸化亢進の証明や、上下流分子との関係究明が必要である。臨床応用に向けては経口投与での検討や既存薬剤との効果比較が今後の課題である。更に、DTCM-G の臨床応用に向けては高等動物での安全性や効果の検討が必要と考えられる。

謝辞

本博士論文は,筆者が北海道大学大学院医学研究科消化器外科学分野 I 博士課程在学中において行った研究をまとめたものです。研究計画の立案から、基礎論文、博士論文作成の全ての過程に至るまで、御指導御鞭撻を賜りました北海道大学大学院医学研究科移植外科学講座特任教授山下健一郎先生へ心より感謝申し上げます。本研究を遂行し、基礎論文を作成するにあたり、御指導を賜りました前北海道大学大学院医学研究科消化器外科学分野 I 教授藤堂省先生へ深く感謝申し上げます。また、学位論文を作成するにあたり、多大なる御指導を賜りました北海道大学大学院医学研究科消化器外科学分野 I 教授武冨紹信先生へ深謝致します。実験の遂行、論文の作成にあたり、ご助言を頂きました北海道大学医学部保健学科教授尾崎倫孝先生、前北海道大学大学院医学研究科置換外科再生医学講座特任准教授鈴木友己先生、北海道大学大学院医学研究科移植外科学講座特任助教深井原先生に感謝いたします。DTCM-G の開発に携わり試薬を御提供下さった愛知医科大学分子標的医薬講座教授梅澤一夫先生へ感謝申し上げます。病理学的評価を頂きました札幌厚生病院病理部の市原真先生に感謝致します。最後に、実験を共に手伝って下さり、論文作成にも多大なる御助言を頂きました北海道大学大学院医学研究科消化器外科学分野 I 船越徹先生、小倉正臣先生、小林希様、財津雅昭先生、吉田雅先生、柴崎晋先生、腰塚靖之先生、常俊雄介先生、佐藤正法先生、永生高広先生、堀米正敏様、研究室の皆様方に心より感謝申し上げます。

引用文献

1. No authors listed. Wilhelm Fabry (1560-1624)--the Other Fabricius. *JAMA.* **190**, 933 (1964).
2. Crohn, B.B., Ginzburg, L. & Oppenheimer, G.D. Landmark article Oct 15, 1932. Regional ileitis. A pathological and clinical entity. By Burril B. Crohn, Leon Ginzburg, and Gordon D. Oppenheimer. *JAMA.* **251**, 73-9 (1984).
3. Wilks, S. Morbid appearances in the intestine of Miss Bankes. *London medical Times and Gazette* **2**, 264 (1859).
4. Loftus, E.V., Jr. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology* **126**, 1504-17 (2004).
5. Kurata, J.H., Kantor-Fish, S., Frankl, H., Godby, P. & Vadheim, C.M. Crohn's disease among ethnic groups in a large health maintenance organization. *Gastroenterology* **102**, 1940-8 (1992).
6. Hampe, J. *et al.* Anticipation in inflammatory bowel disease: a phenomenon caused by an accumulation of confounders. *Am. J. Med. Genet.* **92**, 178-83 (2000).
7. Heresbach, D. *et al.* Anticipation in Crohn's disease may be influenced by gender and ethnicity of the transmitting parent. *Am. J. Gastroenterol.* **93**, 2368-72 (1998).
8. Niv, Y., Abuksis, G. & Fraser, G.M. Epidemiology of ulcerative colitis in Israel: a survey of Israeli kibbutz settlements. *Am. J. Gastroenterol.* **95**, 693-8 (2000).
9. Grossman, A. *et al.* Epidemiology of ulcerative colitis in the Jewish population of central Israel 1970-1980. *Hepatogastroenterology* **36**, 193-7 (1989).
10. Russell, R.K. & Satsangi, J. IBD: a family affair. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **18**, 525-39 (2004).
11. Thompson, N.P., Driscoll, R., Pounder, R.E. & Wakefield, A.J. Genetics versus environment in inflammatory bowel disease: results of a British twin study. *BMJ.* **312**, 95-6 (1996).
12. Orholm, M., Binder, V., Sorensen, T.I., Rasmussen, L.P. & Kyvik, K.O. Concordance of inflammatory bowel disease among Danish twins. Results of a nationwide study. *Scand. J. Gastroenterol.* **35**, 1075-81 (2000).
13. Louis, E. *et al.* Behaviour of Crohn's disease according to the Vienna

classification: changing pattern over the course of the disease. *Gut* **49**, 777-82 (2001).

14. Loftus, E.V., Jr., Schoenfeld, P. & Sandborn, W.J. The epidemiology and natural history of Crohn's disease in population-based patient cohorts from North America: a systematic review. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **16**, 51-60 (2002).
15. Munkholm, P., Langholz, E., Davidsen, M. & Binder, V. Disease activity courses in a regional cohort of Crohn's disease patients. *Scand. J. Gastroenterol.* **30**, 699-706 (1995).
16. Cosnes, J. *et al.* Long-term evolution of disease behavior of Crohn's disease. *Inflamm. Bowel. Dis.* **8**, 244-50 (2002).
17. Cosnes, J. *et al.* Impact of the increasing use of immunosuppressants in Crohn's disease on the need for intestinal surgery. *Gut* **54**, 237-41 (2005).
18. Jess, T., Winther, K.V., Munkholm, P., Langholz, E. & Binder, V. Mortality and causes of death in Crohn's disease: follow-up of a population-based cohort in Copenhagen County, Denmark. *Gastroenterology* **122**, 1808-14 (2002).
19. Carter, M.J., Lobo, A.J., Travis, S.P. & Ibd Section, B.S.o.G. Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults. *Gut* **53 Suppl 5**, V1-16 (2004).
20. Kornbluth, A., Sachar, D.B. & Practice Parameters Committee of the American College of, G. Ulcerative colitis practice guidelines in adults (update): American College of Gastroenterology, Practice Parameters Committee. *Am. J. Gastroenterol.* **99**, 1371-85 (2004).
21. 棟方昭博. 潰瘍性大腸炎診断基準改定案、厚生省特定疾患難治性炎症性腸管障害調査研究班. *平成 9 年度研究報告書*, 96-99 (1998).
22. Langholz, E., Munkholm, P., Davidsen, M. & Binder, V. Course of ulcerative colitis: analysis of changes in disease activity over years. *Gastroenterology* **107**, 3-11 (1994).
23. Langholz, E., Munkholm, P., Davidsen, M., Nielsen, O.H. & Binder, V. Changes in extent of ulcerative colitis: a study on the course and prognostic factors. *Scand. J. Gastroenterol.* **31**, 260-6 (1996).
24. Winther, K.V., Jess, T., Langholz, E., Munkholm, P. & Binder, V. Survival and cause-specific mortality in ulcerative colitis: follow-up of a population-based cohort in Copenhagen County. *Gastroenterology* **125**, 1576-82 (2003).
25. Jess, T. *et al.* Changes in clinical characteristics, course, and prognosis of inflammatory bowel disease during the last 5 decades: a population-based

study from Copenhagen, Denmark. *Inflamm. Bowel. Dis.* **13**, 481-9 (2007).

26. O'Morain, C., Segal, A.W. & Levi, A.J. Elemental diet as primary treatment of acute Crohn's disease: a controlled trial. *Br. Med. J. (Clin. Res. Ed.)* **288**, 1859-62 (1984).
27. Akobeng, A.K. & Thomas, A.G. Enteral nutrition for maintenance of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst. Rev.*, Cd005984 (2007).
28. Kane, S.V. *et al.* The effectiveness of budesonide therapy for Crohn's disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **16**, 1509-17 (2002).
29. Schoon, E.J. *et al.* Bone mineral density in relation to efficacy and side effects of budesonide and prednisolone in Crohn's disease. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **3**, 113-21 (2005).
30. Summers, R.W. *et al.* National Cooperative Crohn's Disease Study: results of drug treatment. *Gastroenterology* **77**, 847-69 (1979).
31. Malchow, H. *et al.* European Cooperative Crohn's Disease Study (ECCDS): results of drug treatment. *Gastroenterology* **86**, 249-66 (1984).
32. Tremaine, W.J., Schroeder, K.W., Harrison, J.M. & Zinsmeister, A.R. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of the oral mesalamine (5-ASA) preparation, Asacol, in the treatment of symptomatic Crohn's colitis and ileocolitis. *J. Clin. Gastroenterol.* **19**, 278-82 (1994).
33. Hanauer, S.B. & Stromberg, U. Oral Pentasa in the treatment of active Crohn's disease: A meta-analysis of double-blind, placebo-controlled trials. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **2**, 379-88 (2004).
34. Singleton, J.W. *et al.* Mesalamine capsules for the treatment of active Crohn's disease: results of a 16-week trial. Pentasa Crohn's Disease Study Group. *Gastroenterology* **104**, 1293-301 (1993).
35. Lichtenstein, G.R., Abreu, M.T., Cohen, R., Tremaine, W. & American Gastroenterological, A. American Gastroenterological Association Institute technical review on corticosteroids, immunomodulators, and infliximab in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **130**, 940-87 (2006).
36. Hanauer, S.B., Sandborn, W. & Practice Parameters Committee of the American College of, G. Management of Crohn's disease in adults. *Am. J. Gastroenterol.* **96**, 635-43 (2001).
37. Travis, S.P. *et al.* European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: current management. *Gut* **55 Suppl 1**, i16-35 (2006).

38. Faubion, W.A., Jr., Loftus, E.V., Jr., Harmsen, W.S., Zinsmeister, A.R. & Sandborn, W.J. The natural history of corticosteroid therapy for inflammatory bowel disease: a population-based study. *Gastroenterology* **121**, 255-60 (2001).

39. Targan, S.R. *et al.* A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor alpha for Crohn's disease. Crohn's Disease cA2 Study Group. *N. Engl. J. Med.* **337**, 1029-35 (1997).

40. Bamba, T. *et al.* Dietary fat attenuates the benefits of an elemental diet in active Crohn's disease: a randomized, controlled trial. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **15**, 151-7 (2003).

41. Belluzzi, A. *et al.* Effect of an enteric-coated fish-oil preparation on relapses in Crohn's disease. *N. Engl. J. Med.* **334**, 1557-60 (1996).

42. Camma, C., Giunta, M., Rosselli, M. & Cottone, M. Mesalamine in the maintenance treatment of Crohn's disease: a meta-analysis adjusted for confounding variables. *Gastroenterology* **113**, 1465-73 (1997).

43. Akobeng, A.K. & Gardener, E. Oral 5-aminosalicylic acid for maintenance of medically-induced remission in Crohn's Disease. *Cochrane Database Syst. Rev.*, CD003715 (2005).

44. Sandborn, W.J. *et al.* Budesonide for maintenance of remission in patients with Crohn's disease in medically induced remission: a predetermined pooled analysis of four randomized, double-blind, placebo-controlled trials. *Am. J. Gastroenterol.* **100**, 1780-7 (2005).

45. Pearson, D.C., May, G.R., Fick, G.H. & Sutherland, L.R. Azathioprine and 6-mercaptopurine in Crohn disease. A meta-analysis. *Ann. Intern. Med.* **123**, 132-42 (1995).

46. Feagan, B.G. *et al.* Methotrexate for the treatment of Crohn's disease. The North American Crohn's Study Group Investigators. *N. Engl. J. Med.* **332**, 292-7 (1995).

47. Feagan, B.G. *et al.* A comparison of methotrexate with placebo for the maintenance of remission in Crohn's disease. North American Crohn's Study Group Investigators. *N. Engl. J. Med.* **342**, 1627-32 (2000).

48. Baert, F. *et al.* Influence of immunogenicity on the long-term efficacy of infliximab in Crohn's disease. *N. Engl. J. Med.* **348**, 601-8 (2003).

49. Present, D.H. *et al.* Infliximab for the treatment of fistulas in patients with Crohn's disease. *N. Engl. J. Med.* **340**, 1398-405 (1999).

50. Sands, B.E. *et al.* Infliximab maintenance therapy for fistulizing Crohn's

disease. *N. Engl. J. Med.* **350**, 876-85 (2004).

51. Scholmerich, J. Review article: systemic and topical steroids in inflammatory bowel disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **20 Suppl 4**, 66-74 (2004).
52. Marshall, J.K. & Irvine, E.J. Rectal corticosteroids versus alternative treatments in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut* **40**, 775-81 (1997).
53. Sutherland, L.R., May, G.R. & Shaffer, E.A. Sulfasalazine revisited: a meta-analysis of 5-aminosalicylic acid in the treatment of ulcerative colitis. *Ann. Intern. Med.* **118**, 540-9 (1993).
54. Kruis, W. *et al.* The optimal dose of 5-aminosalicylic acid in active ulcerative colitis: a dose-finding study with newly developed mesalamine. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **1**, 36-43 (2003).
55. Hanauer, S.B. *et al.* Delayed-release oral mesalamine at 4.8 g/day (800 mg tablet) for the treatment of moderately active ulcerative colitis: the ASCEND II trial. *Am. J. Gastroenterol.* **100**, 2478-85 (2005).
56. Kamm, M.A. *et al.* Once-daily, high-concentration MMX mesalamine in active ulcerative colitis. *Gastroenterology* **132**, 66-75; quiz 432-3 (2007).
57. 棟方昭博. 厚生労働科学研究費補助金難治性疾患対策研究事業難治性炎症性腸管障害に関する調査研究. *平成 17 年度研究報告書*, 13-15 (2006).
58. Rutgeerts, P. *et al.* Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *N. Engl. J. Med.* **353**, 2462-76 (2005).
59. Sands, B.E. *et al.* A randomized, double-blind, sham-controlled study of granulocyte/monocyte apheresis for active ulcerative colitis. *Gastroenterology* **135**, 400-9 (2008).
60. Lichtiger, S. *et al.* Cyclosporine in severe ulcerative colitis refractory to steroid therapy. *N. Engl. J. Med.* **330**, 1841-5 (1994).
61. Van Assche, G. *et al.* Randomized, double-blind comparison of 4 mg/kg versus 2 mg/kg intravenous cyclosporine in severe ulcerative colitis. *Gastroenterology* **125**, 1025-31 (2003).
62. D'Haens, G. *et al.* Intravenous cyclosporine versus intravenous corticosteroids as single therapy for severe attacks of ulcerative colitis. *Gastroenterology* **120**, 1323-9 (2001).
63. Jarnerot, G. *et al.* Infliximab as rescue therapy in severe to moderately severe ulcerative colitis: a randomized, placebo-controlled study. *Gastroenterology* **128**, 1805-11 (2005).
64. Ogata, H. *et al.* A randomised dose finding study of oral tacrolimus (FK506)

therapy in refractory ulcerative colitis. *Gut* **55**, 1255-62 (2006).

65. Baumgart, D.C., Wiedenmann, B. & Dignass, A.U. Rescue therapy with tacrolimus is effective in patients with severe and refractory inflammatory bowel disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **17**, 1273-81 (2003).
66. Truelove, S.C. & Hambling, M.H. Treatment of ulcerative colitis with local hydrocortisone hemisuccinate sodium; a report on a controlled therapeutic trial. *Br. Med. J.* **2**, 1072-7 (1958).
67. Hanauer, S.B. *et al.* Budesonide enema for the treatment of active, distal ulcerative colitis and proctitis: a dose-ranging study. U.S. Budesonide enema study group. *Gastroenterology* **115**, 525-32 (1998).
68. Truelove, S.C. & Witts, L.J. Cortisone in ulcerative colitis; final report on a therapeutic trial. *Br. Med. J.* **2**, 1041-8 (1955).
69. Baron, J.H., Connell, A.M., Kanaghinis, T.G., Lennard-Jones, J.E. & Jones, A.F. Out-patient treatment of ulcerative colitis. Comparison between three doses of oral prednisone. *Br. Med. J.* **2**, 441-3 (1962).
70. Jewell, D.P. & Truelove, S.C. Azathioprine in ulcerative colitis: final report on controlled therapeutic trial. *Br. Med. J.* **4**, 627-30 (1974).
71. Ardizzone, S. *et al.* Randomised controlled trial of azathioprine and 5-aminosalicylic acid for treatment of steroid dependent ulcerative colitis. *Gut* **55**, 47-53 (2006).
72. Hawthorne, A.B. *et al.* Randomised controlled trial of azathioprine withdrawal in ulcerative colitis. *BMJ.* **305**, 20-2 (1992).
73. Oren, R. *et al.* Methotrexate in chronic active ulcerative colitis: a double-blind, randomized, Israeli multicenter trial. *Gastroenterology* **110**, 1416-21 (1996).
74. Lichtenstein, G.R. *et al.* Serious infections and mortality in association with therapies for Crohn's disease: TREAT registry. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **4**, 621-30 (2006).
75. Elliott, M.J. *et al.* Randomised double-blind comparison of chimeric monoclonal antibody to tumour necrosis factor alpha (cA2) versus placebo in rheumatoid arthritis. *Lancet* **344**, 1105-10 (1994).
76. Rutgeerts, P. *et al.* Efficacy and safety of retreatment with anti-tumor necrosis factor antibody (infliximab) to maintain remission in Crohn's disease. *Gastroenterology* **117**, 761-9 (1999).
77. Hanauer, S.B. *et al.* Maintenance infliximab for Crohn's disease: the ACCENT I randomised trial. *Lancet* **359**, 1541-9 (2002).

78. Ina, K. *et al.* Resistance of Crohn's disease T cells to multiple apoptotic signals is associated with a Bcl-2/Bax mucosal imbalance. *J. Immunol.* **163**, 1081-90 (1999).

79. Van den Brande, J.M. *et al.* Infliximab but not etanercept induces apoptosis in lamina propria T-lymphocytes from patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* **124**, 1774-85 (2003).

80. Papadakis, K.A. & Targan, S.R. Role of cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Annu. Rev. Med.* **51**, 289-98 (2000).

81. Monteleone, G. *et al.* Interleukin 12 is expressed and actively released by Crohn's disease intestinal lamina propria mononuclear cells. *Gastroenterology* **112**, 1169-78 (1997).

82. Parronchi, P. *et al.* Type 1 T-helper cell predominance and interleukin-12 expression in the gut of patients with Crohn's disease. *Am. J. Pathol.* **150**, 823-32 (1997).

83. Trinchieri, G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 133-46 (2003).

84. Neurath, M.F., Fuss, I., Kelsall, B.L., Stuber, E. & Strober, W. Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. *J. Exp. Med.* **182**, 1281-90 (1995).

85. Fuss, I.J. *et al.* Anti-interleukin 12 treatment regulates apoptosis of Th1 T cells in experimental colitis in mice. *Gastroenterology* **117**, 1078-88 (1999).

86. Mannon, P.J. *et al.* Anti-interleukin-12 antibody for active Crohn's disease. *N Engl. J. Med.* **351**, 2069-79 (2004).

87. Parrello, T. *et al.* Up-regulation of the IL-12 receptor beta 2 chain in Crohn's disease. *J. Immunol.* **165**, 7234-9 (2000).

88. Simpson, S.J. *et al.* T cell-mediated pathology in two models of experimental colitis depends predominantly on the interleukin 12/Signal transducer and activator of transcription (Stat)-4 pathway, but is not conditional on interferon gamma expression by T cells. *J. Exp. Med.* **187**, 1225-34 (1998).

89. Wirtz, S. *et al.* Cutting edge: chronic intestinal inflammation in STAT-4 transgenic mice: characterization of disease and adoptive transfer by TNF- plus IFN-gamma-producing CD4+ T cells that respond to bacterial antigens. *J. Immunol.* **162**, 1884-8 (1999).

90. Neurath, M.F. *et al.* The transcription factor T-bet regulates mucosal T cell activation in experimental colitis and Crohn's disease. *J. Exp. Med.* **195**,

1129-43 (2002).

91. Peng, S.L. The T-box transcription factor T-bet in immunity and autoimmunity. *Cell. Mol. Immunol.* **3**, 87-95 (2006).

92. Bouma, G. & Strober, W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 521-33 (2003).

93. Fuss, I.J. *et al.* Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. *J. Immunol.* **157**, 1261-70 (1996).

94. Plevy, S. The immunology of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol. Clin. North. Am.* **31**, 77-92 (2002).

95. Murch, S.H., Lamkin, V.A., Savage, M.O., Walker-Smith, J.A. & MacDonald, T.T. Serum concentrations of tumour necrosis factor alpha in childhood chronic inflammatory bowel disease. *Gut* **32**, 913-7 (1991).

96. Reinecker, H.C. *et al.* Enhanced secretion of tumour necrosis factor-alpha, IL-6, and IL-1 beta by isolated lamina propria mononuclear cells from patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *Clin. Exp. Immunol.* **94**, 174-81 (1993).

97. Peppelenbosch, M.P. & van Deventer, S.J. T cell apoptosis and inflammatory bowel disease. *Gut* **53**, 1556-8 (2004).

98. Heller, F., Fuss, I.J., Nieuwenhuis, E.E., Blumberg, R.S. & Strober, W. Oxazolone colitis, a Th2 colitis model resembling ulcerative colitis, is mediated by IL-13-producing NK-T cells. *Immunity* **17**, 629-38 (2002).

99. Fuss, I.J. *et al.* Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. *J. Cli. Invest.* **113**, 1490-7 (2004).

100. Ceponis, P.J., Botelho, F., Richards, C.D. & McKay, D.M. Interleukins 4 and 13 increase intestinal epithelial permeability by a phosphatidylinositol 3-kinase pathway. Lack of evidence for STAT 6 involvement. *J. Biol. Chem.* **275**, 29132-7 (2000).

101. Heller, F. *et al.* Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. *Gastroenterology* **129**, 550-64 (2005).

102. Fichtner-Feigl, S. *et al.* Induction of IL-13 triggers TGF-beta1-dependent tissue fibrosis in chronic 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid colitis. *J. Immunol.* **178**, 5859-70 (2007).

103. Fichtner-Feigl, S., Strober, W., Kawakami, K., Puri, R.K. & Kitani, A. IL-13 signaling through the IL-13alpha2 receptor is involved in induction of TGF-beta1 production and fibrosis. *Nat. Med.* **12**, 99-106 (2006).

104. Matsuda, R. *et al.* Quantitive cytokine mRNA expression profiles in the colonic mucosa of patients with steroid naive ulcerative colitis during active and quiescent disease. *Inflamm. Bowel. Dis.* **15**, 328-34 (2009).

105. Fujino, S. *et al.* Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut* **52**, 65-70 (2003).

106. Neunlist, M. *et al.* Changes in chemical coding of myenteric neurones in ulcerative colitis. *Gut* **52**, 84-90 (2003).

107. Furlan, R. *et al.* Sympathetic overactivity in active ulcerative colitis: effects of clonidine. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **290**, R224-32 (2006).

108. Demaude, J., Salvador-Cartier, C., Fioramonti, J., Ferrier, L. & Bueno, L. Phenotypic changes in colonocytes following acute stress or activation of mast cells in mice: implications for delayed epithelial barrier dysfunction. *Gut* **55**, 655-61 (2006).

109. Paradowska, A., Masliniski, W., Grzybowska-Kowalczyk, A. & Lacki, J. The function of interleukin 17 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz).* **55**, 329-34 (2007).

110. Aggarwal, S., Ghilardi, N., Xie, M.H., de Sauvage, F.J. & Gurney, A.L. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J. Biol. Chem.* **278**, 1910-4 (2003).

111. Parham, C. *et al.* A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12Rbeta1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R. *J. Immunol.* **168**, 5699-708 (2002).

112. Zhou, L. *et al.* TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgammat function. *Nature* **453**, 236-40 (2008).

113. Ivanov, II *et al.* The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* **126**, 1121-33 (2006).

114. Park, H. *et al.* A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat. Immunol.* **6**, 1133-41 (2005).

115. Nielsen, O.H., Kirman, I., Rudiger, N., Hendel, J. & Vainer, B. Upregulation of interleukin-12 and -17 in active inflammatory bowel disease. *Scand. J. Gastroenterol.* **38**, 180-5 (2003).

116. Zhang, Z., Zheng, M., Bindas, J., Schwarzenberger, P. & Kolls, J.K. Critical role of IL-17 receptor signaling in acute TNBS-induced colitis. *Inflamm. Bowel. Dis.* **12**, 382-8 (2006).

117. Hunter, C.A. New IL-12-family members: IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 521-31 (2005).

118. Schmidt, C. *et al.* Expression of interleukin-12-related cytokine transcripts in inflammatory bowel disease: elevated interleukin-23p19 and interleukin-27p28 in Crohn's disease but not in ulcerative colitis. *Inflamm. Bowel. Dis.* **11**, 16-23 (2005).

119. Duerr, R.H. *et al.* A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* **314**, 1461-3 (2006).

120. Palmer, M.T. & Weaver, C.T. Immunology: narcissistic helpers. *Nature* **448**, 416-8 (2007).

121. Fisher, S.A. *et al.* Genetic determinants of ulcerative colitis include the ECM1 locus and five loci implicated in Crohn's disease. *Nat. Genet.* **40**, 710-2 (2008).

122. Maul, J. *et al.* Peripheral and intestinal regulatory CD4+ CD25(high) T cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **128**, 1868-78 (2005).

123. Kelsen, J. *et al.* FoxP3(+)CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties can be cultured from colonic mucosa of patients with Crohn's disease. *Clin. Exp. Immunol.* **141**, 549-57 (2005).

124. Dominitzki, S. *et al.* Cutting edge: trans-signaling via the soluble IL-6R abrogates the induction of FoxP3 in naive CD4+CD25 T cells. *J. Immunol.* **179**, 2041-5 (2007).

125. Reardon, C., Wang, A. & McKay, D.M. Transient local depletion of Foxp3+ regulatory T cells during recovery from colitis via Fas/Fas ligand-induced death. *J. Immunol.* **180**, 8316-26 (2008).

126. Fantini, M.C. *et al.* Smad7 controls resistance of colitogenic T cells to regulatory T cell-mediated suppression. *Gastroenterology* **136**, 1308-16, e1-3 (2009).

127. Coombes, J.L. *et al.* A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J. Exp. Med.* **204**, 1757-64 (2007).

128. Sun, C.M. *et al.* Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *J. Exp. Med.* **204**, 1775-85 (2007).

129. Benson, M.J., Pino-Lagos, K., Rosemblatt, M. & Noelle, R.J. All-trans retinoic acid mediates enhanced T reg cell growth, differentiation, and gut homing in the face of high levels of co-stimulation. *J. Exp. Med.* **204**, 1765-74 (2007).
130. Trombetta, E.S. & Mellman, I. Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu. Rev. Immunol.* **23**, 975-1028 (2005).
131. Hart, A.L. *et al.* Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* **129**, 50-65 (2005).
132. Malmstrom, V. *et al.* CD134L expression on dendritic cells in the mesenteric lymph nodes drives colitis in T cell-restored SCID mice. *J. Immunol.* **166**, 6972-81 (2001).
133. Leithauser, F., Trobonjaca, Z., Moller, P. & Reimann, J. Clustering of colonic lamina propria CD4(+) T cells to subepithelial dendritic cell aggregates precedes the development of colitis in a murine adoptive transfer model. *Lab. Invest.* **81**, 1339-49 (2001).
134. Ashcroft, A.J. *et al.* Colonic dendritic cells, intestinal inflammation, and T cell-mediated bone destruction are modulated by recombinant osteoprotegerin. *Immunity* **19**, 849-61 (2003).
135. Middel, P., Raddatz, D., Gunawan, B., Haller, F. & Radzun, H.J. Increased number of mature dendritic cells in Crohn's disease: evidence for a chemokine mediated retention mechanism. *Gut* **55**, 220-7 (2006).
136. Annacker, O. *et al.* Essential role for CD103 in the T cell-mediated regulation of experimental colitis. *J. Exp. Med.* **202**, 1051-61 (2005).
137. Mora, J.R. *et al.* Selective imprinting of gut-homing T cells by Peyer's patch dendritic cells. *Nature* **424**, 88-93 (2003).
138. Baumgart, D.C. *et al.* Patients with active inflammatory bowel disease lack immature peripheral blood plasmacytoid and myeloid dendritic cells. *Gut* **54**, 228-36 (2005).
139. Macpherson, A.J. *et al.* A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria. *Science* **288**, 2222-6 (2000).
140. Hampe, J. *et al.* A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat. Genet.* **39**, 207-11 (2007).
141. Amano, A., Nakagawa, I. & Yoshimori, T. Autophagy in innate immunity against intracellular bacteria. *J. Biochem.* **140**, 161-6 (2006).
142. Singh, S.B., Davis, A.S., Taylor, G.A. & Deretic, V. Human IRGM induces

autophagy to eliminate intracellular mycobacteria. *Science* **313**, 1438-41 (2006).

143. Parkes, M. *et al.* Sequence variants in the autophagy gene IRGM and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nat. Genet.* **39**, 830-2 (2007).

144. Otte, J.M., Cario, E. & Podolsky, D.K. Mechanisms of cross hyporesponsiveness to Toll-like receptor bacterial ligands in intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* **126**, 1054-70 (2004).

145. Cario, E. & Podolsky, D.K. Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect. Immun.* **68**, 7010-7 (2000).

146. Akhtar, M., Watson, J.L., Nazli, A. & McKay, D.M. Bacterial DNA evokes epithelial IL-8 production by a MAPK-dependent, NF-kappaB-independent pathway. *FASEB. J.* **17**, 1319-21 (2003).

147. Rhee, S.H. *et al.* Pathophysiological role of Toll-like receptor 5 engagement by bacterial flagellin in colonic inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **102**, 13610-5 (2005).

148. Rosenstiel, P. *et al.* TNF-alpha and IFN-gamma regulate the expression of the NOD2 (CARD15) gene in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* **124**, 1001-9 (2003).

149. Berrebi, D. *et al.* Card15 gene overexpression in mononuclear and epithelial cells of the inflamed Crohn's disease colon. *Gut* **52**, 840-6 (2003).

150. Hornef, M.W., Frisan, T., Vandewalle, A., Normark, S. & Richter-Dahlfors, A. Toll-like receptor 4 resides in the Golgi apparatus and colocalizes with internalized lipopolysaccharide in intestinal epithelial cells. *J. Exp. Med.* **195**, 559-70 (2002).

151. Baumgart, D.C. & Carding, S.R. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet* **369**, 1627-40 (2007).

152. Hugot, J.P. *et al.* Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* **411**, 599-603 (2001).

153. Ogura, Y. *et al.* A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* **411**, 603-6 (2001).

154. McGovern, D.P. *et al.* Association between a complex insertion/deletion polymorphism in NOD1 (CARD4) and susceptibility to inflammatory bowel disease. *Hum. Mol. Genet.* **14**, 1245-50 (2005).

155. Franchimont, D. *et al.* Deficient host-bacteria interactions in inflammatory bowel disease? The toll-like receptor (TLR)-4 Asp299gly polymorphism is associated with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut* **53**, 987-92 (2004).
156. Torok, H.P. *et al.* Crohn's disease is associated with a toll-like receptor-9 polymorphism. *Gastroenterology* **127**, 365-6 (2004).
157. Watanabe, T., Kitani, A., Murray, P.J. & Strober, W. NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2-mediated T helper type 1 responses. *Nat. Immunol.* **5**, 800-8 (2004).
158. Mowat, A.M. & Bain, C.C. Mucosal macrophages in intestinal homeostasis and inflammation. *J. Innate. Immun.* **3**, 550-64 (2011).
159. Varol, C., Zigmond, E. & Jung, S. Securing the immune tightrope: mononuclear phagocytes in the intestinal lamina propria. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 415-26 (2010).
160. Persson, E.K., Jaensson, E. & Agace, W.W. The diverse ontogeny and function of murine small intestinal dendritic cell/macrophage subsets. *Immunobiology* **215**, 692-7 (2010).
161. Smythies, L.E. *et al.* Human intestinal macrophages display profound inflammatory anergy despite avid phagocytic and bacteriocidal activity. *J. Clin. Invest.* **115**, 66-75 (2005).
162. Denning, T.L., Wang, Y.C., Patel, S.R., Williams, I.R. & Pulendran, B. Lamina propria macrophages and dendritic cells differentially induce regulatory and interleukin 17-producing T cell responses. *Nat. Immunol.* **8**, 1086-94 (2007).
163. Rugtveit, J. *et al.* Respiratory burst of intestinal macrophages in inflammatory bowel disease is mainly caused by CD14+L1+ monocyte derived cells. *Gut* **37**, 367-73 (1995).
164. Kamada, N. *et al.* Abnormally differentiated subsets of intestinal macrophage play a key role in Th1-dominant chronic colitis through excess production of IL-12 and IL-23 in response to bacteria. *J. Immunol.* **175**, 6900-8 (2005).
165. Grimm, M.C., Pavli, P., Van de Pol, E. & Doe, W.F. Evidence for a CD14+ population of monocytes in inflammatory bowel disease mucosa--implications for pathogenesis. *Clin. Exp. Immunol.* **100**, 291-7 (1995).
166. Schenk, M., Bouchon, A., Seibold, F. & Mueller, C. TREM-1--expressing intestinal macrophages crucially amplify chronic inflammation in experimental colitis and inflammatory bowel diseases. *J. Clin. Invest.* **117**, 3097-106 (2007).

167. Rugtveit, J. *et al.* Cytokine profiles differ in newly recruited and resident subsets of mucosal macrophages from inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **112**, 1493-505 (1997).
168. Mahida, Y.R., Wu, K.C. & Jewell, D.P. Respiratory burst activity of intestinal macrophages in normal and inflammatory bowel disease. *Gut* **30**, 1362-70 (1989).
169. Rogler, G. *et al.* Nuclear factor kappaB is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa. *Gastroenterology* **115**, 357-69 (1998).
170. Hausmann, M. *et al.* Subtractive screening reveals up-regulation of NADPH oxidase expression in Crohn's disease intestinal macrophages. *Clin. Exp. Immunol.* **125**, 48-55 (2001).
171. Hausmann, M. *et al.* Cathepsin D is up-regulated in inflammatory bowel disease macrophages. *Clin. Exp. Immunol.* **136**, 157-67 (2004).
172. Hausmann, M. *et al.* Toll-like receptors 2 and 4 are up-regulated during intestinal inflammation. *Gastroenterology* **122**, 1987-2000 (2002).
173. Kucharzik, T., Walsh, S.V., Chen, J., Parkos, C.A. & Nusrat, A. Neutrophil transmigration in inflammatory bowel disease is associated with differential expression of epithelial intercellular junction proteins. *Am. J. Pathol.* **159**, 2001-9 (2001).
174. Sasaki, Y., Tanaka, M. & Kudo, H. Differentiation between ulcerative colitis and Crohn's disease by a quantitative immunohistochemical evaluation of T lymphocytes, neutrophils, histiocytes and mast cells. *Pathol. Int.* **52**, 277-85 (2002).
175. Seldenrijk, C.A. *et al.* Histopathological evaluation of colonic mucosal biopsy specimens in chronic inflammatory bowel disease: diagnostic implications. *Gut* **32**, 1514-20 (1991).
176. Nikolaus, S. *et al.* Increased secretion of pro-inflammatory cytokines by circulating polymorphonuclear neutrophils and regulation by interleukin 10 during intestinal inflammation. *Gut* **42**, 470-6 (1998).
177. Han, X. *et al.* Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor autoantibodies in murine ileitis and progressive ileal Crohn's disease. *Gastroenterology* **136**, 1261-71, e1-3 (2009).
178. Biagioni, C. *et al.* Redox state and O2*- production in neutrophils of Crohn's disease patients. *Exp. Biol. Med. (Maywood).* **231**, 186-95 (2006).

179. Marks, D.J. *et al.* Defective acute inflammation in Crohn's disease: a clinical investigation. *Lancet* **367**, 668-78 (2006).

180. Kontoyiannis, D., Pasparakis, M., Pizarro, T.T., Cominelli, F. & Kollias, G. Impaired on/off regulation of TNF biosynthesis in mice lacking TNF AU-rich elements: implications for joint and gut-associated immunopathologies. *Immunity* **10**, 387-98 (1999).

181. Reimund, J.M. *et al.* Mucosal inflammatory cytokine production by intestinal biopsies in patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *J. Clin. Immunol.* **16**, 144-50 (1996).

182. Baert, F.J. & Rutgeerts, P.R. Anti-TNF strategies in Crohn's disease: mechanisms, clinical effects, indications. *Int J Colorectal Dis* **14**, 47-51 (1999).

183. Baumann, H. & Gauldie, J. The acute phase response. *Immunol. Today.* **15**, 74-80 (1994).

184. Scallon, B.J., Moore, M.A., Trinh, H., Knight, D.M. & Ghrayeb, J. Chimeric anti-TNF-alpha monoclonal antibody cA2 binds recombinant transmembrane TNF-alpha and activates immune effector functions. *Cytokine* **7**, 251-9 (1995).

185. Siegel, S.A. *et al.* The mouse/human chimeric monoclonal antibody cA2 neutralizes TNF in vitro and protects transgenic mice from cachexia and TNF lethality in vivo. *Cytokine* **7**, 15-25 (1995).

186. Begue, B. *et al.* Implication of TNF-related apoptosis-inducing ligand in inflammatory intestinal epithelial lesions. *Gastroenterology* **130**, 1962-74 (2006).

187. Mudter, J. & Neurath, M.F. Apoptosis of T cells and the control of inflammatory bowel disease: therapeutic implications. *Gut* **56**, 293-303 (2007).

188. Lugering, A. *et al.* Infliximab induces apoptosis in monocytes from patients with chronic active Crohn's disease by using a caspase-dependent pathway. *Gastroenterology* **121**, 1145-57 (2001).

189. ten Hove, T., van Montfrans, C., Peppelenbosch, M.P. & van Deventer, S.J. Infliximab treatment induces apoptosis of lamina propria T lymphocytes in Crohn's disease. *Gut* **50**, 206-11 (2002).

190. Dinarello, C.A. The IL-1 family and inflammatory diseases. *Clin. Exp. Rheumatol.* **20**, S1-13 (2002).

191. McAlindon, M.E., Hawkey, C.J. & Mahida, Y.R. Expression of interleukin 1 beta and interleukin 1 beta converting enzyme by intestinal macrophages in health and inflammatory bowel disease. *Gut* **42**, 214-9 (1998).

192. Ashwood, P. *et al.* Functional interactions between mucosal IL-1, IL-ra and TGF-beta 1 in ulcerative colitis. *Inflamm. Res.* **53**, 53-9 (2004).

193. Dionne, S., D'Agata, I.D., Hiscott, J., Vanounou, T. & Seidman, E.G. Colonic explant production of IL-1and its receptor antagonist is imbalanced in inflammatory bowel disease (IBD). *Clin. Exp. Immunol.* **112**, 435-42 (1998).

194. Gross, V., Andus, T., Caesar, I., Roth, M. & Scholmerich, J. Evidence for continuous stimulation of interleukin-6 production in Crohn's disease. *Gastroenterology* **102**, 514-9 (1992).

195. Mitsuyama, K. *et al.* Soluble interleukin-6 receptors in inflammatory bowel disease: relation to circulating interleukin-6. *Gut* **36**, 45-9 (1995).

196. Louis, E. *et al.* A high serum concentration of interleukin-6 is predictive of relapse in quiescent Crohn's disease. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **9**, 939-44 (1997).

197. Reinisch, W. *et al.* Clinical relevance of serum interleukin-6 in Crohn's disease: single point measurements, therapy monitoring, and prediction of clinical relapse. *Am. J. Gastroenterol.* **94**, 2156-64 (1999).

198. Atreya, R. *et al.* Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo. *Nat. Med.* **6**, 583-8 (2000).

199. Neurath, M.F. *et al.* Regulation of T-cell apoptosis in inflammatory bowel disease: to die or not to die, that is the mucosal question. *Trends. Immunol.* **22**, 21-6 (2001).

200. Van Kemseke, C., Belaiche, J. & Louis, E. Frequently relapsing Crohn's disease is characterized by persistent elevation in interleukin-6 and soluble interleukin-2 receptor serum levels during remission. *Int. J. Colorectal. Dis.* **15**, 206-10 (2000).

201. Kallen, K.J. The role of transsignalling via the agonistic soluble IL-6 receptor in human diseases. *Biochim. Biophys. Acta.* **1592**, 323-43 (2002).

202. Yamamoto, M., Yoshizaki, K., Kishimoto, T. & Ito, H. IL-6 is required for the development of Th1 cell-mediated murine colitis. *J. Immunol.* **164**, 4878-82 (2000).

203. Salmi, M. & Jalkanen, S. Human leukocyte subpopulations from inflamed gut bind to joint vasculature using distinct sets of adhesion molecules. *J. Immunol.* **166**, 4650-7 (2001).

204. McLoughlin, R.M. *et al.* IL-6 trans-signaling via STAT3 directs T cell

infiltration in acute inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **102**, 9589-94 (2005).

205. Langrish, C.L. *et al.* IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J. Exp. Med.* **201**, 233-40 (2005).

206. Ruddy, M.J. *et al.* Functional cooperation between interleukin-17 and tumor necrosis factor-alpha is mediated by CCAAT/enhancer-binding protein family members. *J. Biol. Chem.* **279**, 2559-67 (2004).

207. Mizoguchi, A., Mizoguchi, E., Takedatsu, H., Blumberg, R.S. & Bhan, A.K. Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation. *Immunity* **16**, 219-30 (2002).

208. Sanchez-Munoz, F., Dominguez-Lopez, A. & Yamamoto-Furusho, J.K. Role of cytokines in inflammatory bowel disease. *World. J. Gastroenterol.* **14**, 4280-8 (2008).

209. Charo, I.F. & Peters, W. Chemokine receptor 2 (CCR2) in atherosclerosis, infectious diseases, and regulation of T-cell polarization. *Microcirculation* **10**, 259-64 (2003).

210. Gu, L. *et al.* Control of TH2 polarization by the chemokine monocyte chemoattractant protein-1. *Nature* **404**, 407-11 (2000).

211. Cyster, J.G. Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs. *Science* **286**, 2098-102 (1999).

212. Cyster, J.G. Lymphoid organ development and cell migration. *Immunol. Rev.* **195**, 5-14 (2003).

213. Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A. & Mantovani, A. Chemokines and dendritic cell traffic. *J. Clin. Immunol.* **20**, 151-60 (2000).

214. Mantovani, A. The chemokine system: redundancy for robust outputs. *Immunol. Today.* **20**, 254-7 (1999).

215. Muller, G., Hopken, U.E. & Lipp, M. The impact of CCR7 and CXCR5 on lymphoid organ development and systemic immunity. *Immunol. Rev.* **195**, 117-35 (2003).

216. Reif, K. *et al.* Balanced responsiveness to chemoattractants from adjacent zones determines B-cell position. *Nature* **416**, 94-9 (2002).

217. Charo, I.F. & Ransohoff, R.M. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N. Engl. J. Med.* **354**, 610-21 (2006).

218. Sandborn, W.J. *et al.* Adalimumab for maintenance treatment of Crohn's

disease: results of the CLASSIC II trial. *Gut* **56**, 1232-9 (2007).

219. Colombel, J.F. *et al.* Adalimumab for maintenance of clinical response and remission in patients with Crohn's disease: the CHARM trial. *Gastroenterology* **132**, 52-65 (2007).

220. Sandborn, W.J. *et al.* Adalimumab induction therapy for Crohn disease previously treated with infliximab: a randomized trial. *Ann. Intern. Med.* **146**, 829-38 (2007).

221. Sandborn, W.J. *et al.* Certolizumab pegol for the treatment of Crohn's disease. *N. Engl. J. Med.* **357**, 228-38 (2007).

222. Schreiber, S. *et al.* Maintenance therapy with certolizumab pegol for Crohn's disease. *N. Engl. J. Med.* **357**, 239-50 (2007).

223. Sandborn, W.J. *et al.* Etanercept for active Crohn's disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* **121**, 1088-94 (2001).

224. Rutgeerts, P. *et al.* Onercept for moderate-to-severe Crohn's disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **4**, 888-93 (2006).

225. Sandborn, W.J. *et al.* Natalizumab induction and maintenance therapy for Crohn's disease. *N. Engl. J. Med.* **353**, 1912-25 (2005).

226. Targan, S.R. *et al.* Natalizumab for the treatment of active Crohn's disease: results of the ENCORE Trial. *Gastroenterology* **132**, 1672-83 (2007).

227. Van Assche, G. *et al.* Progressive multifocal leukoencephalopathy after natalizumab therapy for Crohn's disease. *N. Engl. J. Med.* **353**, 362-8 (2005).

228. Feagan, B.G. *et al.* Treatment of ulcerative colitis with a humanized antibody to the alpha4beta7 integrin. *N. Engl. J. Med.* **352**, 2499-507 (2005).

229. Feagan, B.G. *et al.* Treatment of active Crohn's disease with MLN0002, a humanized antibody to the alpha4beta7 integrin. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **6**, 1370-7 (2008).

230. Sandborn, W.J. *et al.* A randomized trial of Ustekinumab, a human interleukin-12/23 monoclonal antibody, in patients with moderate-to-severe Crohn's disease. *Gastroenterology* **135**, 1130-41 (2008).

231. Reinisch, W. *et al.* A dose escalating, placebo controlled, double blind, single dose and multidose, safety and tolerability study of fontolizumab, a humanised anti-interferon gamma antibody, in patients with moderate to severe Crohn's disease. *Gut* **55**, 1138-44 (2006).

232. Hommes, D.W. *et al.* Fontolizumab, a humanised anti-interferon gamma

antibody, demonstrates safety and clinical activity in patients with moderate to severe Crohn's disease. *Gut* **55**, 1131-7 (2006).

233. Ito, H. *et al.* A pilot randomized trial of a human anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody in active Crohn's disease. *Gastroenterology* **126**, 989-96; discussion 947 (2004).

234. Steidler, L. *et al.* Treatment of murine colitis by Lactococcus lactis secreting interleukin-10. *Science* **289**, 1352-5 (2000).

235. Braat, H. *et al.* A phase I trial with transgenic bacteria expressing interleukin-10 in Crohn's disease. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **4**, 754-9 (2006).

236. Pena-Rossi, C. *et al.* Clinical trial: a multicentre, randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-finding, phase II study of subcutaneous interferon-beta-la in moderately active ulcerative colitis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **28**, 758-67 (2008).

237. Plevy, S. *et al.* A phase I study of visilizumab, a humanized anti-CD3 monoclonal antibody, in severe steroid-refractory ulcerative colitis. *Gastroenterology* **133**, 1414-22 (2007).

238. Rutgeerts, P., Vermeire, S. & Van Assche, G. Biological therapies for inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* **136**, 1182-97 (2009).

239. Kasran, A. *et al.* Safety and tolerability of antagonist anti-human CD40 Mab ch5D12 in patients with moderate to severe Crohn's disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **22**, 111-22 (2005).

240. Van Assche, G. *et al.* Daclizumab, a humanised monoclonal antibody to the interleukin 2 receptor (CD25), for the treatment of moderately to severely active ulcerative colitis: a randomised, double blind, placebo controlled, dose ranging trial. *Gut* **55**, 1568-74 (2006).

241. Valentine, J.F. *et al.* Steroid-sparing properties of sargramostim in patients with corticosteroid-dependent Crohn's disease: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 study. *Gut* **58**, 1354-62 (2009).

242. Mangelsdorf, D.J. *et al.* The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* **83**, 835-9 (1995).

243. Fajas, L. *et al.* The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene. *J. Biol. Chem.* **272**, 18779-89 (1997).

244. Dubuquoy, L. *et al.* PPARgamma as a new therapeutic target in inflammatory bowel diseases. *Gut* **55**, 1341-9 (2006).

245. Su, C.G. *et al.* A novel therapy for colitis utilizing PPAR-gamma ligands to inhibit the epithelial inflammatory response. *J. Clin. Invest.* **104**, 383-9 (1999).

246. Ponferrada, A. *et al.* The role of PPARgamma on restoration of colonic homeostasis after experimental stress-induced inflammation and dysfunction. *Gastroenterology* **132**, 1791-803 (2007).

247. Dubuquoy, L. *et al.* Impaired expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in ulcerative colitis. *Gastroenterology* **124**, 1265-76 (2003).

248. Sugawara, K. *et al.* Linkage to peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in SAMP1/YitFc mice and in human Crohn's disease. *Gastroenterology* **128**, 351-60 (2005).

249. Kelly, P.J., Musuka, G., Eoghin, G.N., Tebje-Kelly, J.B. & Carter, S. Serosurvey for canine distemper virus exposure in dogs in communal lands in Zimbabwe. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* **76**, 104-6 (2005).

250. Ruiz, P.A., Kim, S.C., Sartor, R.B. & Haller, D. 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J2-mediated ERK signaling inhibits gram-negative bacteria-induced RelA phosphorylation and interleukin-6 gene expression in intestinal epithelial cells through modulation of protein phosphatase 2A activity. *J. Biol. Chem.* **279**, 36103-11 (2004).

251. Lewis, J.D. *et al.* Rosiglitazone for active ulcerative colitis: a randomized placebo-controlled trial. *Gastroenterology* **134**, 688-95 (2008).

252. Travis, S. *et al.* RDP58 is a novel and potentially effective oral therapy for ulcerative colitis. *Inflamm. Bowel. Dis* **11**, 713-9 (2005).

253. Hommes, D. *et al.* Inhibition of stress-activated MAP kinases induces clinical improvement in moderate to severe Crohn's disease. *Gastroenterology* **122**, 7-14 (2002).

254. Dotan, I. *et al.* A randomised placebo-controlled multicentre trial of intravenous semapimod HCl for moderate to severe Crohn's disease. *Gut* **59**, 760-6 (2010).

255. Matsumoto, N. *et al.* Synthesis of NF-kappaB activation inhibitors derived from epoxyquinomicin C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **10**, 865-9 (2000).

256. Ueki, S. *et al.* Control of allograft rejection by applying a novel nuclear factor-kappaB inhibitor, dehydroxymethylepoxyquinomicin. *Transplantation* **82**, 1720-7 (2006).

257. Hamasaka, A. *et al.* Topical application of dehydroxymethylepoxyquinomicin improves allergic inflammation via NF-kappaB inhibition. *J. Allergy. Clin.*

Immunol. **126**, 400-3 (2010).

258. Funakoshi, T. *et al.* A novel NF-kappaB inhibitor, dehydroxymethylepoxyquinomicin, ameliorates inflammatory colonic injury in mice. *J. Crohns. Colitis.***6**, 215-25 (2012).

259. Umezawa, K. [Screening of bioactive metabolites that suppress inflammation]. *Tanpakushitsu.Kakusan.Koso.* **52**, 1685-9 (2007).

260. Takeiri, M. *et al.* Inhibition of macrophage activation and suppression of graft rejection by DTCM-glutarimide, a novel piperidine derived from the antibiotic 9-methylstreptimidone. *Inflamm. Res.* **60**, 879-88 (2011).

261. Ota, E. *et al.* Synthesis and biological evaluation of molecular probes based on the 9-methylstreptimidone derivative DTCM-glutarimide. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **22**, 164-7 (2012).

262. Shibasaki, S. *et al.* Immunosuppressive effects of DTCM-G, a novel inhibitor of the mTOR downstream signaling pathway. *Transplantation* **95**, 542-50 (2013).

263. Zaitsu, M. *et al.* 3-[(dodecylthiocarbonyl)methyl]-glutarimide attenuates graft arterial disease by suppressing alloimmune responses and vascular smooth muscle cell proliferation. *Transplantation* **99**, 948-56 (2015).

264. Koide, N., Kaneda, A., Yokochi, T. & Umezawa, K. Inhibition of RANKL- and LPS-induced osteoclast differentiations by novel NF-kappaB inhibitor DTCM-glutarimide. *Int. Immunopharmacol.* **25**, 162-8 (2015).

265. Kuboki, M., Ito, A., Simizu, S. & Umezawa, K. Activation of apoptosis by caspase-3-dependent specific RelB cleavage in anticancer agent-treated cancer cells: involvement of positive feedback mechanism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **456**, 810-4 (2015).

266. Brassesco, M.S. *et al.* Cytostatic in vitro effects of DTCM-glutarimide on bladder carcinoma cells. *Asian. Pac. J. Cancer. Prev.* **13**, 1957-62 (2012).

267. Cooper, H.S., Murthy, S.N., Shah, R.S. & Sedergran, D.J. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab. Invest.* **69**, 238-49 (1993).

268. Wallace, J.L., Keenan, C.M., Gale, D. & Shoupe, T.S. Exacerbation of experimental colitis by nonsteroidal anti-inflammatory drugs is not related to elevated leukotriene B4 synthesis. *Gastroenterology* **102**, 18-27 (1992).

269. Dieleman, L.A. *et al.* Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines. *Clin. Exp. Immunol.* **114**, 385-91 (1998).

270. Morris, G.P. *et al.* Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology* **96**, 795-803 (1989).

271. te Velde, A.A., Verstege, M.I. & Hommes, D.W. Critical appraisal of the current practice in murine TNBS-induced colitis. *Inflamm. Bowel. Dis.* **12**, 995-9 (2006).

272. El-Salhy, M. *et al.* Amelioration of severe TNBS induced colitis by novel AP-1 and NF- kappa B inhibitors in rats. *Scientific World Journal* **2014**, 813804 (2014).

273. Okayasu, I. *et al.* A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* **98**, 694-702 (1990).

274. Hollenbach, E. *et al.* Inhibition of RICK/nuclear factor-kappaB and p38 signaling attenuates the inflammatory response in a murine model of Crohn disease. *J. Biol. Chem.* **280**, 14981-8 (2005).

275. Pereira-Fantini, P.M. *et al.* A33 antigen-deficient mice have defective colonic mucosal repair. *Inflamm. Bowel. Dis.* **16**, 604-12 (2010).

276. Palmen, M.J. *et al.* Non-lymphoid and lymphoid cells in acute, chronic and relapsing experimental colitis. *Clin. Exp. Immunol.* **99**, 226-32 (1995).

277. Wen, Q., Zhou, L., Chen, H. & Zhang, Y. N-(3', 4'-dimethoxycinnamonyl) anthranilic acid alleviated experimental colitis by inhibiting autoimmune response and inducing CD4+ CD25+ regulatory T cells production. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **28**, 1330-8 (2013).

278. Sun, Y. *et al.* Novel immunomodulatory properties of cirsilineol through selective inhibition of IFN-gamma signaling in a murine model of inflammatory bowel disease. *Biochem. Pharmacol.* **79**, 229-38 (2010).

279. Khan, W.I. *et al.* Critical role of MCP-1 in the pathogenesis of experimental colitis in the context of immune and enterochromaffin cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.* **291**, G803-11 (2006).

280. Kanai, T. *et al.* Macrophage-derived IL-18-mediated intestinal inflammation in the murine model of Crohn's disease. *Gastroenterology* **121**, 875-88 (2001).

281. Palmen, M.J., Dijkstra, C.D., van der Ende, M.B., Pena, A.S. & van Rees, E.P. Anti-CD11b/CD18 antibodies reduce inflammation in acute colitis in rats. *Clin. Exp. Immunol.* **101**, 351-6 (1995).

282. Woywodt, A. *et al.* Mucosal cytokine expression, cellular markers and adhesion molecules in inflammatory bowel disease. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **11**,

267-76 (1999).

283. Neurath, M.F. *et al.* Predominant pathogenic role of tumor necrosis factor in experimental colitis in mice. *Eur. J. Immunol.* **27**, 1743-50 (1997).

284. Salh, B., Wagey, R., Marotta, A., Tao, J.S. & Pelech, S. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase, protein kinase B, and p70 S6 kinases in lipopolysaccharide-stimulated Raw 264.7 cells: differential effects of rapamycin, Ly294002, and wortmannin on nitric oxide production. *J. Immunol.* **161**, 6947-54 (1998).

285. Tsukamoto, K. *et al.* Critical roles of the p110 beta subtype of phosphoinositide 3-kinase in lipopolysaccharide-induced Akt activation and negative regulation of nitrite production in RAW 264.7 cells. *J. Immunol.* **180**, 2054-61 (2008).

286. Luyendyk, J.P. *et al.* Genetic analysis of the role of the PI3K-Akt pathway in lipopolysaccharide-induced cytokine and tissue factor gene expression in monocytes/macrophages. *J. Immunol.* **180**, 4218-26 (2008).

287. Guha, M. & Mackman, N. The phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway limits lipopolysaccharide activation of signaling pathways and expression of inflammatory mediators in human monocytic cells. *J. Biol. Chem.* **277**, 32124-32 (2002).

288. Weinstein, S.L. *et al.* Phosphatidylinositol 3-kinase and mTOR mediate lipopolysaccharide-stimulated nitric oxide production in macrophages via interferon-beta. *J. Leukoc. Biol.* **67**, 405-14 (2000).

289. Martin, M., Rehani, K., Jope, R.S. & Michalek, S.M. Toll-like receptor-mediated cytokine production is differentially regulated by glycogen synthase kinase 3. *Nat. Immunol.* **6**, 777-84 (2005).

290. Steinbrecher, K.A., Wilson, W., 3rd, Cogswell, P.C. & Baldwin, A.S. Glycogen synthase kinase 3beta functions to specify gene-specific, NF-kappaB-dependent transcription. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 8444-55 (2005).

291. Uno, J.K. *et al.* Altered macrophage function contributes to colitis in mice defective in the phosphoinositide-3 kinase subunit p110delta. *Gastroenterology* **139**, 1642-53, 1653 e1-6 (2010).

292. Hofmann, C., Dunger, N., Scholmerich, J., Falk, W. & Obermeier, F. Glycogen synthase kinase 3-beta: a master regulator of toll-like receptor-mediated chronic intestinal inflammation. *Inflamm. Bowel. Dis.* **16**, 1850-8 (2010).