

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591474

研究課題名（和文）新規 NF- κ B 活性阻害薬（DHMEQ）を用いた炎症性腸疾患の新しい治療

研究課題名（英文）New Treatment Strategies for Inflammatory Bowel Disease using a novel

NF- κ B inhibitor（DHMEQ）

研究代表者：鈴木 友己（SUZUKITOMOMI）

北海道大学・大学院医学研究科・特任准教授

研究者番号：70374238

研究成果の概要（和文）：新規 NF- κ B 阻害剤 DHMEQ は、2つの炎症性腸疾患モデル（DSS 誘発腸炎、TNBS 腸炎）において著明な腸炎抑制効果を認めた。炎症性腸疾患に有用である可能性が考えられ、新規 IBD 治療薬として臨床応用への可能性を大いに期待させる結果であった。

一方で、更に効力の強い新規 NF- κ B 阻害剤の開発を模索し 3-[(dodecylthiocarbonyl)methyl]glutarimide（DTCM-G）を得た。DTCM-G においても、2つの炎症性腸疾患モデルにおいて著明な腸炎抑制効果を認め、新規 IBD 治療薬として臨床応用への可能性を大いに期待させる結果であった。DTCM-G の作用機序を RAW264.7 細胞において検討し AKT および GSK-3 β 活性抑制との関係が考えられた。

研究成果の概要（英文）：A novel NF- κ B inhibitor, DHMEQ, strongly ameliorated development of two types of experimental colitis in mice (DSS colitis and TNBS colitis) and DHMEQ appears as a promising candidate for treatment of inflammatory bowel disease. On the other hand, we explored the development of another stronger NF- κ B inhibitor and got 3-[(dodecylthiocarbonyl)-methyl]-glutarimide (DTCM-G). We also demonstrated DTCM-G notably attenuated two types of experimental murine models of IBD. We investigated the underlying mechanism in the anti-inflammatory effect of DTCM-G by using RAW264.7 cells and demonstrated that the inhibition of AKT and GSK-3 β activations were related with the anti-inflammatory effect of DTCM-G.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2010 年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 2011 年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 2012 年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| | | | |
| 総計 | 3,000,000 | 900,000 | 3,900,000 |

研究分野：医歯薬学

分科：外科系臨床医学

細目：消化器外科

キーワード：炎症性腸疾患、腸管免疫、NF- κ B

1. 研究開始当初の背景

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) に加え免疫抑制剤・抗 TNF α 抗体の使用により治療成績が向上しているが、未だ難治性であり更なる治療法の開発が望まれる。IBD の腸粘膜では、炎症性サイトカイン産生を制御する転写因子 NF- κ B の持続的な活性化とその制御失調が起こっていることが知られている。また、臨床治療薬の 5-ASA や抗 TNF α 抗体には NF- κ B の間接的阻害作用があり、動物実験においては Simvastatin、crucumin、NF- κ B decoy 等による大腸炎抑制効果、NF- κ B 活性抑制効果が報告されている。これらより、NF- κ B の核内移行を選択的に阻害する新規薬剤である DHMEQ の治療効果が期待される。

2. 研究の目的

マウスの大腸炎モデルを用いて DHMEQ の腸炎抑制効果を検討する。

3. 研究の方法

(1) In vitro: 結腸細胞株 (HT-29)、マクロファージ細胞株 (RAW264.7) をそれぞれ LPS 10 ng/ml と 10 μ g/ml で刺激し、DHMEQ 添加による HT-29 からの IL-8、RAW264.7 からの TNF α ・IL-6 の産生抑制効果を ELISA 法で検討した。同時に、RAW264.7 では NF- κ B のサブユニットである p65 の核内移行を免疫組織化学染色により確認した。

(2) In vivo

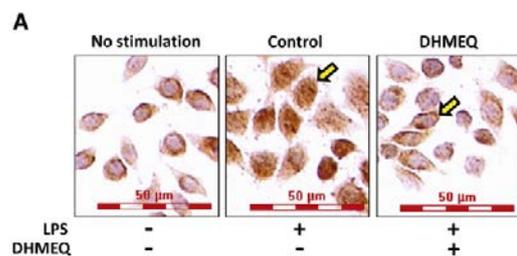
DSS 腸炎の腸炎抑制効果検討: 8 週齢雄 C57BL/6 マウスに 3%デキストラン硫酸ナトリウム (DSS:36-50kDa) を 5 日間飲水させて大腸炎を誘発し、その後 5 日間 RO 水を飲水させた。大腸炎の評価は体重減少・下痢・血便による disease activity index(DAI)、大腸浮腫、組織学的スコアリング、免疫組織化

学染色による細胞浸潤の程度、大腸組織中の炎症性サイトカイン mRNA 発現により行い、DHMEQ の大腸炎抑制効果を検討した。

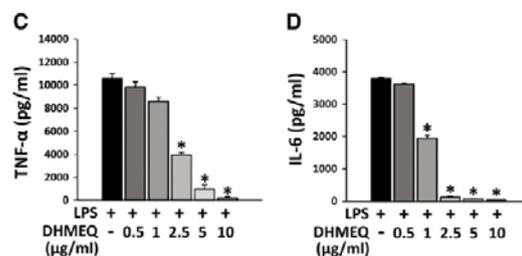
TNBS 腸炎の腸炎抑制効果検討: 8 週齢雄 BALB/c マウスに 2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) 1.5mg を含んだ 50%エタノール溶液を注腸して大腸炎を誘発し、4 日間経過を観察した。DHMEQ は両大腸炎ともに連日腹腔内投与した。大腸炎の評価は体重減少・下痢・血便による disease activity index(DAI)、大腸浮腫、組織学的スコアリングにより行い、DHMEQ の大腸炎抑制効果を検討した。

4. 研究成果

(1) In vitro: RAW264.7 細胞において、DHMEQ は LPS 刺激による p65 の核内移行を阻害し、炎症性サイトカインである IL-6、TNF α の産生も有意に抑制していた。また、HT-29 細胞では、LPS 刺激による IL-8 の産生を有意に抑制していた。



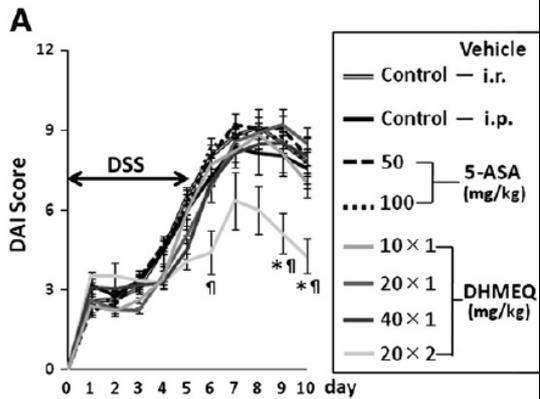
(p65 核内移行抑制効果)



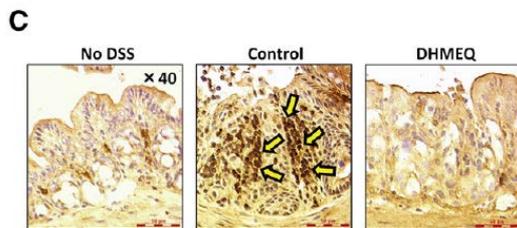
(IL-6、TNF- α 産生抑制効果)

(2) In vivo: DSS 腸炎では、DHMEQ20mg/kg1 日 2 回投与群で DAI スコア、大腸浮腫、組織学的スコアリングの有意な改善を認めた。ま

た標準治療薬である 5-ASA の投与では、明らかな DSS 腸炎の改善を認めなかった。大腸組織の免疫組織化学染色 (IHC) では、F4/80 (マクロファージ)・CD4 陽性細胞、また核内 p65 陽性の炎症細胞浸潤を有意に抑制した。大腸組織中の炎症性サイトカインの解析では、IL-1 β 、TNF α 、IL-6、IL-12p40、IL-17、MCP-1 の mRNA 発現を有意に抑制していた。

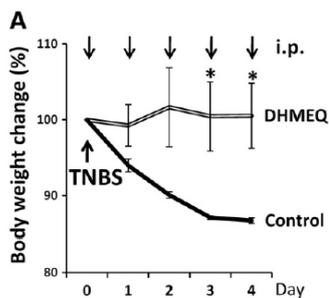


(DHMEQ の DSS 腸炎抑制効果)



(腸管炎症細胞の p65 核内移行抑制効果)

さらに、TNBS 腸炎においても DHMEQ 15mg/kg 1 日 2 回投与と群では体重減少、肉眼的の大腸障害スコアリング、組織学的スコアリングの有意な改善を認めた。



(DHMEQ の TNBS 腸炎抑制効果)

以上のように、新規 NF- κ B 阻害剤 DHMEQ は、RAW264.7 細胞において p65 の核内移行抑制と炎症性サイトカインの産生抑制効果を認めた。また、DSS 誘発腸炎、TNBS 腸炎においても著明な腸炎抑制効果を認めた。本剤は、炎症性腸疾患に有用である可能性が考えられた。新規 IBD 治療薬として臨床応用への可能性を大いに期待させる結果を得た。今後は、小動物、大動物を用いた毒性試験、薬物動態の解析を通じて臨床応用の準備を進める予定である。

一方で、更に効力の強い新規 NF- κ B 阻害剤の開発を模索したところ、RAW264.7 マクロファージに対する抗炎症効果を発揮する新規薬剤 3-[(dodecylthiocarbonyl)methyl]glutarimide (DTCM-G) を得た。DTCM-G は、炎症性転写因子 AP-1 の核内移行を抑制することが分かっている。近年、IBD 患者の腸管で、AP-1 の持続的な活性化が確認されており、AP-1 活性の抑制により、NF- κ B と同様に炎症性連鎖反応をごく初期の段階で抑制し、より確実な抗炎症効果を得ることが可能であると考えられた。したがって、DHMEQ に加えて DTCM-G の臨床応用を目指し、動物モデルにおける DTCM-G の効果検討を行った。

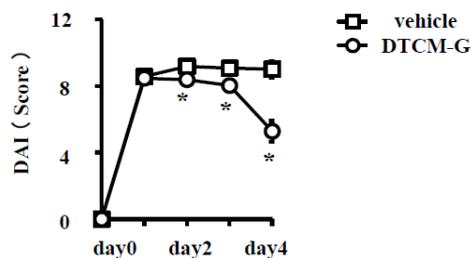
【方法】2-①TNBS 腸炎の腸炎抑制効果検討：雄 BALB/c マウス (8 週齢、24-26g) TNBS 1.5mg/body (50%Et-OH) を注腸して TNBS 腸炎を誘発し、4 日間経過を観察した。治療群は DTCM-G 40 mg/kg、Vehicle control は同量の 3%DMSO を含む 0.5%CMC 溶液を 1 日に 2 回、連日腹腔内投与にて行った。臨床スコアとして、血便・下痢・体重減少からなる DAI (disease activity index) を観察期間中連日評価した。4 病日において、マウスを犠牲死させ、大腸採取時に大腸長、重量の測定、MPO による好中球浸潤量の評価、肉眼的な大腸炎の程度・組織学的傷害の程度を評価した。

また、腸管標本の免疫組織化学染色により浸潤細胞の種類・程度を2、4病日にて経時的に評価した。2病日においては、単離大腸粘膜単核球 (LPMC) の解析による浸潤細胞の種類・程度の評価 RT-PCR を行い、組織中炎症性サイトカインの mRNA 定量評価を追加した。2-②DSS 腸炎の腸炎抑制効果検討: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、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。治療群は DTCM-G 40 mg/kg、Vehicle control は同量の 4%DMSO を含む 0.5%CMC 溶液を 1 日に 2 回、連日腹腔内投与にて行った。腸炎の経過は DAI のスコアリングにより評価を行った。両群とも day10 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。

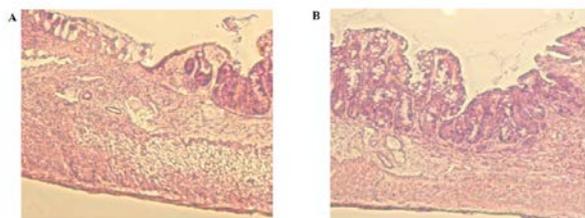
2-③RAW264.7 細胞の抗炎症作用の検討および作用機序解析: RAW264.7 細胞株を 0.04%DMSO で溶解した $7.5 \mu\text{g/ml}$ DTCM-G に 2 時間暴露させた後、 $1 \mu\text{g/ml}$ の LPS で刺激し、24 時間後の培養上清を採取した。上清中の炎症性サイトカインを、ELISA 法を用いて定量評価し対照群 (0.04%DMSO) と比較した。また LPS 刺激後のシグナルカスケードにおいて、Western blot 法によりタンパク評価を行い、抗炎症作用の機序解析を行った。

【結果】2-①TNBS 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、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。病理組織学的には、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。また、

腸炎 2 日目、4 日目の好中球浸潤を有意に抑制し、4 日目における組織の MPO 活性も有意に抑制した。

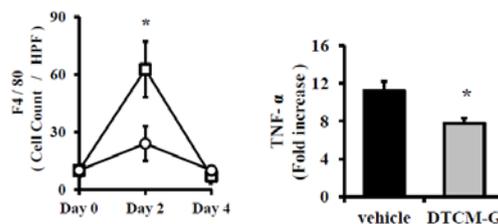


(DTCM-G の TNBS 腸炎抑制効果)



(組織像の改善: 対照群左、DTCM-G 右)

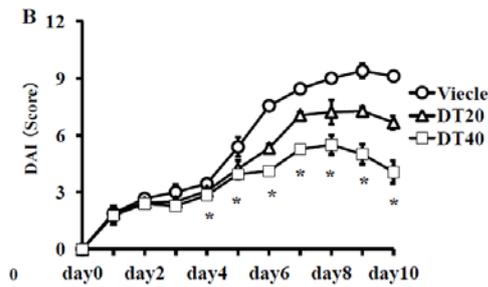
組織免疫染色では、炎症の早期、2 病日において F4/80 陽性細胞が主たる浸潤細胞であったが、DTCM-G は、同日の F4/80 陽性細胞、CD4 陽性細胞の浸潤を有意に抑制した。単離 LPMC の FACS 解析でも CD11b 陽性細胞陽性細胞が主たる浸潤細胞であったが、DTCM-G は CD11b 陽性細胞陽性細胞数を有意に減少させた。更に 2 病日の大腸組織を用いた RT-PCR において、無治療群で TNF- α 、MCP-1、IL-6 の mRNA 高発現を認め、DTCM-G はこれを有意に抑制した。



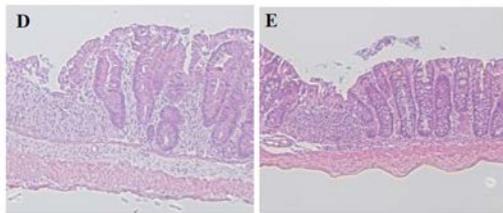
(マクロファージ浸潤 / TNF- α 産生抑制)

2-②DSS 腸炎モデルでも、DTCM-G 40 mg/kg 投与群は、4-10 日目における DAI を有意に軽

減させ、10日目の組織スコアでも有意な腸炎抑制効果を認めた。

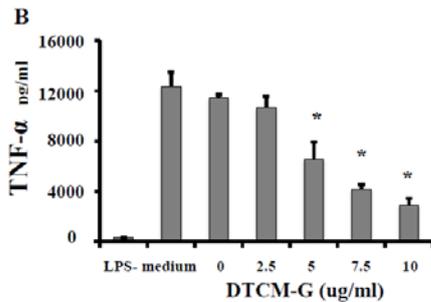


(DTCM-G の DSS 腸炎抑制効果)

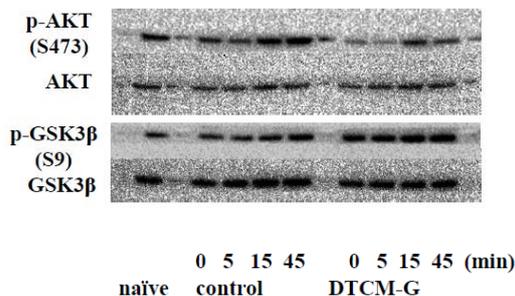


(組織像の改善：対照群左、DTCM-G 右)

2-③RAW264.7 細胞においては、DTCM-G は LPS 刺激による IL6、TNF α の産生を有意に抑制した。また、AKT リン酸化の抑制および GSK-3 β のリン酸化亢進を認め、抗炎症効果との関係が考えられた。



(IL-6、TNF- α 産生抑制効果)



(AKT リン酸化抑制/GSK-3 β リン酸化亢進)

以上のように、DTCM-G は、マクロファージを中心とした免疫細胞の浸潤を抑制し TNBS 腸炎を軽快させた。また、DSS 誘発腸炎においても腸炎抑制効果を認めた。RAW264.7 細胞において DTCM-G は炎症性サイトカインの産生を抑制し AKT および GSK-3 β 活性抑制との関係が考えられた。以上より本剤は、炎症性腸疾患に有用である可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

1) Funakoshi T, Yamashita K, Ichikawa N, Fukai M, Suzuki T, Goto R, Oura T, Kobayashi N, Katsurada T, Ichihara S, Ozaki M, Umezawa K, Todo S. A novel NF- κ B inhibitor, dehydroxymethylepoxyquinomicin, ameliorates inflammatory colonic injury in mice. *Journal of Crohn's and Colitis* 2012, 6: 215-225 査読あり

[学会発表] (計 9 件)

1) Ichikawa N, Yamashita K, Funakoshi T, Ichihara S, Kobayashi N, Koshizuka Y, Zaitzu 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 Palazzo della Cultura e dei Congressi, Bologna, Italy

2) Ichikawa N, Yamashita K, Funakoshi T, Shibasaki S, Ichihara S, Kobayashi N, Koshizuka Y, Zaitzu 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; McCormick Place, Chicago, US

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, 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 Ernest N. Morial Convention Center, New Orleans, US

5) Funakoshi T, Yamashita K, Ichikawa N, Kobayashi N, Fukai M, Suzuki T, Goto R, Oura T, Katsurada T, Ozaki M, Umezawa K, Todo S. A novel NF- κ B inhibitor, DHMEQ ameliorates inflammatory colonic injuries in mice. Digestive Disease Week 2010 May 1-5, 2010 Ernest N. Morial Convention Center, New Orleans, US

6) 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、名古屋国際会議場

7) 船越徹、市川伸樹、山下健一郎、深井原、鈴木友己、桂田武彦、後藤了一、大浦哲、小林希、尾崎倫孝、梅澤一夫、藤堂省：「新規

NF- κ B 阻害剤 DHMEQ の大腸炎モデルにおける炎症抑制作用」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、名古屋国際会議場

8) Funakoshi T, Yamashita K, Ichikawa N, Kobayashi N, Fukai M, Suzuki T, Goto R, Oura T, Katsurada T, Ozaki M, Umezawa K, Todo S. The therapeutic effect of a novel NF- κ B inhibitor, DHMEQ, on experimental colitis in mice. The 24th ISUCRS Biennial Congress March 19-23, 2010 COEX, Seoul, Korea

9) 船越徹、山下健一郎、深井原、鈴木友己、木本好美、長山紘明、後藤了一、大浦哲、梅澤一夫、尾崎倫孝、藤堂省：「新規 NF- κ B 阻害剤 DHMEQ の DSS 誘発大腸炎抑制効果」第 109 回日本外科学会定期学術集会 2009 年 4 月 2-4 日福岡、福岡国際会議場

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北海道大学・大学院医学研究科・特任准教授
鈴木 友己 (SUZUKI TOMOMI)

研究者番号：70374238

(2) 研究分担者

北海道大学・大学院医学研究科・特任准教授
山下 健一郎 (YAMASHITA KENICHIRO)

研究者番号：00399940

(3) 連携研究者 無し