

氏名	おおぬき まさよし 大貫 公義
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	博士甲第 号
学位授与の日付	2022年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	レチノイドX受容体アゴニストによる大腸炎抑制機構の解明
論文審査委員	(主査) 教授 長谷 耕二 (博士(薬学)) (副査) 教授 大澤 匡範 (博士(学術)) 教授 多胡 めぐみ (博士(薬学))

## 論文内容の要旨

### 【研究全体の背景】

炎症性腸疾患 (Inflammatory bowel disease: IBD) は原因不明の難治性疾患である。IBDの根治療法は確立されておらず、内科治療の目標は、活動性の疾患を寛解に導くことと、寛解状態を維持することである。しかしながら、既存の治療法では十分な効果が認められない、または、副作用により投薬を中止せざるをえない症例も多いのが現状である。したがって、安全性と有効性に優れた薬剤の開発が求められている。

核内受容体であるレチノイドX受容体 (Retinoid X receptor: RXR) は3つのアイソフォーム (RXR $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) が存在し、特に免疫系細胞ではRXR $\alpha$ を比較的強く発現する。いずれのRXRアイソフォームもリガンド結合に伴い、ホモダイマー、または peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)、liver X receptor (LXR)、constitutive androstane receptor (CAR)、nuclear hormone receptor 77 (Nur77)、nur-related factor 1 (Nurr1) のいずれかとのヘテロダイマーを形成し、標的遺伝子の発現を誘導する。RXRリガンドは、単独で全てのヘテロダイマーを活性化でき、これはパーミッシブ機構と呼ばれている。PPAR、LXR、Nur77の活性化は、実験的大腸炎の抑制や回復促進に寄与するため、RXRリガンドのパーミッシブ機構により大腸炎を強力に抑制できる可能性がある。

本研究では、第1部において実験的大腸炎に対するRXRアゴニストの炎症抑制効果の評価、第2部においてRXRアゴニストによる大腸炎抑制メカニズムの解明を行った。

### 第1部 実験的大腸炎に対するRXRパーシャルアゴニストの抗炎症効果の検証

#### 【背景】

RXRアゴニストはパーミッシブ機構により複数の炎症抑制に関わるRXRヘテロダイマーを活性化できるため、IBDなどに対する抗炎症薬として期待できる。しかしながら、RXRアゴニストは肝肥大や高トリグリセリド血症といった副作用が問題となっている。共同研究者の加来田らは、RXR活性を既存のRXRフルアゴニストであるベキサロテン

の 75%程度に抑えることで副作用を減弱した RXR パーシャルアゴニスト 1-[(3,5,5,8,8-Pentamethyl-5,6,7,8-tetrahydronaphthalen-2-yl) amino] benzotriazole-5-carboxylic Acid (CBt-PMN)を開発した。そこで、第 1 部の研究では IBD の動物モデルであるデキストラン硫酸ナトリウム (Dextran sulfate sodium: DSS) 誘導性大腸炎を用いて CBt-PMN の抗炎症効果を検証した。

#### 【方法】

DSS 誘導性大腸炎は、2% DSS をマウスに 6 日間自由摂取させることで誘導した。DSS の投与開始 2 日前より CBt-PMN (30 mg/kg/day)をマウスに経口投与した。DSS 投与開始 9 日後に免疫病理学的解析を行った。大腸粘膜固有層の細胞は EDTA 処理により大腸組織から上皮を剥離した後、コラギナーゼにより単離した。血中の細胞は心採血をおこなった後、RBC lysis buffer によって赤血球を除去することで単離した。その後、蛍光標識抗体で染色し細胞の性状解析及びソーティングを行った。骨髄由来マクロファージ (Bone marrow-derived macrophages: BMc) はマウスの骨髄細胞を macrophage colony-stimulating factor (M-CSF)と共に 6 日間培養することで得た。その後、lipopolysaccharide (LPS)及び各 RXR 関連受容体アゴニストの存在下、あるいは、非存在下で培養し種々の解析を行った。レポーター遺伝子アッセイのために COS-1 細胞に PPAR $\delta$ /RXR $\alpha$  または Nur77/RXR $\alpha$  を発現させ、それらの応答領域の下流にルシフェラーゼを発現させた。CBt-PMN を処理しルシフェラーゼ活性を測定した。大腸組織及び単離した細胞における mRNA の発現は qPCR により調べた。大腸の組織学的評価は組織切片を Hematoxylin & Eosin 染色し行った。BMc 培養上清中のサイトカイン濃度は Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)により測定した。

#### 【結果・考察】

##### 実験的大腸炎に対する CBt-PMN の効果

RXR パーシャルアゴニスト CBt-PMN の抗炎症作用を評価するために DSS 誘導性大腸炎マウスに CBt-PMN を経口投与した。DSS の投与による体重減少や、下痢、血便といった IBD 様症状が観察されたが、これらの症状は、CBt-PMN 投与群で軽度であった。さらに、CBt-PMN 投与群では DSS 誘導性大腸炎に伴う大腸の短縮や病理学的変化が抑制された。また、炎症性サイトカインである *Tnf* 及び *Il6* の発現が有意に低かった。このように、CBt-PMN は DSS 誘導性大腸炎に対して抑制効果を示した。

##### CBt-PMN が大腸粘膜固有層の免疫細胞に与える影響

免疫学的性状解析のために、大腸粘膜固有層 (cLP) の免疫細胞群をフローサイトメトリーによって解析した。その結果、好中球が CBt-PMN 投与群において減少していた。炎症時においてマクロファージは CXCL1 及び CXCL2 を産生して好中球の組織内遊走を促すが、CBt-PMN 投与群では大腸組織における *Cxcl1* 及び *Cxcl2* 遺伝子の発現低下が観察された。この作用により、好中球が減少した可能性が示唆された。続いて、CBt-PMN の標的となる細胞を探索するため、大腸炎発症時及び定常状態において、大腸及び血中

に存在する主要な免疫細胞集団を取得し免疫細胞で発現が高い *Rxra* の遺伝子発現を調べた。その結果、大腸炎発症時及び定常状態において、樹状細胞、マクロファージ、好中球、単球、B 細胞、T 細胞は何れも *Rxra* を発現していたが、なかでも単球が最も高く *Rxra* を発現していた。

単球は DSS 誘導性大腸炎モデルマウスにおいて、血中から大腸に浸潤し TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 などの炎症性サイトカインを産生する。また、単球の除去により DSS 誘導性大腸炎の発症が抑制されるため、単球は本モデルにおいてエフェクター細胞と考えられている。したがって、cLP から単球を単離し、炎症性サイトカインの遺伝子発現を調べた。その結果、CBt-PMN 投与群では Vehicle 群と比較して有意に *Il6* の遺伝子発現が低下していた。また、有意差はなかったが、*Tnf* の遺伝子発現は CBt-PMN 投与群で減少傾向であった。マクロファージ、好中球、樹状細胞においても *Il6* の遺伝子発現を調べたところ、CBt-PMN 投与群でマクロファージにおいてのみ *Il6* の遺伝子発現が低下していた。以上の結果から、CBt-PMN は単球及びマクロファージにおいて炎症機能を抑制することが考えられる。

#### 抗炎症作用を示す RXR パートナー受容体の探索

RXR のパーミッシブ機構により、RXR リガンドは RXR パートナー受容体アゴニストの非存在下で複数の RXR ヘテロダイマーが活性化する。したがって、CBt-PMN の単球における炎症抑制機構において 2 つ以上の抗炎症作用を示すヘテロダイマーを活性化している可能性がある。そこで、単球においてどのような RXR ファミリー分子が発現しているのかを明らかにするために、RXR とヘテロダイマーを形成する受容体の遺伝子発現を調べた。その結果、DSS 誘導性大腸炎下の cLP に存在する単球において、*Nr4a1*、*Nr4a2*、*Nr1h2*、*Nr1h3*、*Nr1i3*、*Ppard*、*Pparg* の遺伝子発現が認められた。BMc においても単球と同様に *Nr4a1* (Nur77)、*Nr4a2* (Nurr1)、*Nr1h2* (LXR $\beta$ )、*Nr1h3* (LXR $\alpha$ )、*Nr1i3* (CAR)、*Ppard* (PPAR $\delta$ )、*Pparg* (PPAR $\gamma$ )が発現していた。また、CBt-PMN は BMc において LPS 依存的な IL-6 及び TNF- $\alpha$  の産生を抑制したので、CBt-PMN による炎症抑制機構の解明に BMc を用いることにした。

CBt-PMN の炎症抑制作用に関わる RXR ヘテロダイマーを同定するために、単球と BMc で共通して発現する RXR パートナー受容体に対するアゴニストを BMc 培養液に添加し、LPS 依存的な IL-6 及び TNF- $\alpha$  の産生を調べた。その結果、BMc において PPAR $\delta$  及び Nur77 に対するアゴニストが濃度依存的に LPS 刺激による IL-6 及び TNF- $\alpha$  の産生を抑制した。以上の結果から、LPS 依存的な炎症性サイトカイン産生の抑制に PPAR $\delta$ /RXR 及び Nur77/RXR が寄与していると考えられる。実際に、ルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイにより、CBt-PMN が PPAR $\delta$ /RXR と Nur77/RXR を直接活性化することが判明した。さらに、CBt-PMN を BMc に処理すると PPAR $\delta$ /RXR の標的遺伝子である *Lpcat3* 及び Nur77/RXR の標的遺伝子である *Ikbke* の発現が増加した。このように、CBt-PMN の炎症抑制作用には PPAR $\delta$ /RXR 及び Nur77/RXR の活性化が寄与する

ことが考えられる。本研究により RXR パーシャルアゴニスト CBt-PMN は DSS 誘導性大腸炎の病態を改善することが明らかとなった。そのメカニズムとして、CBt-PMN のパーミッシブ機構による PPAR $\delta$ /RXR 及び Nur77/RXR ヘテロダイマーの活性化による、単球及びマクロファージの炎症応答の抑制が考えられる。しかしながら、何故マクロファージの炎症機能が抑制されたのかについては不明である。

## 第2部 RXR を介した CX<sub>3</sub>CR1<sup>hi</sup>マクロファージ分化誘導機構の解明

### 【背景】

腸管に存在するマクロファージは、抗炎症性サイトカインである IL-10 を産生し炎症制御に働く。また、表現型マーカーとしてケモカイン及び細胞接着分子の役割を果たす CX<sub>3</sub>CR1 が高発現している。通常のマクロファージは LPS などの微生物の刺激により炎症性サイトカインを産生するが、腸管特有の CX<sub>3</sub>CR1<sup>hi</sup>マクロファージは微生物による刺激を受けても炎症は起こさない。すなわち、血液から腸管に浸潤する Ly6C<sup>+</sup>単球は、IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ などを活発に産生するが、CX<sub>3</sub>CR1<sup>hi</sup>マクロファージに分化すると炎症誘導能を失う。これは常に大量の微生物に暴露されている腸管の環境に対応した自然免疫系の適応機構と言える。本機構を介して、腸内細菌に対する過剰な自然免疫応答は抑制され、大腸における慢性炎症は未然に防がれている。しかしながら、このような生物学的重要性に関わらず、腸管特有の CX<sub>3</sub>CR1<sup>hi</sup>マクロファージ分化誘導機構は長年に亘り不明である。我々は、単球に *Rxra* が高発現し、RXR アゴニストの投与により大腸のマクロファージの炎症機能が抑制されることを見出した。したがって、RXR の活性化により単球の CX<sub>3</sub>CR1<sup>hi</sup>マクロファージの分化が誘導されているのではないかと仮説を立てた。本研究では、加来田らが合成した大腸移行型 RXR フルアゴニスト 6-[N-ethyl-N-(3-isobutoxy-4-isopropylphenyl) amino] nicotinic acid (NEt-3IB)を用いて、RXR の活性化による CX<sub>3</sub>CR1<sup>hi</sup>マクロファージ分化誘導の検証及びそのメカニズムを探る。

### 【方法】

DSS 誘導性大腸炎は第1部で示した方法で誘導した。DSS の投与開始と同時に NEt-3IB (10 mg/kg/day)を経口投与した。骨髓細胞は M-CSF の存在下において、NEt-3IB、9-*cis*-レチノイン酸 (9-*cis*-RA)、または Adenine nucleotide translocase 2 (ANT2)阻害剤である Carboxyatractyloside (CAT)を添加し6日間培養した。その後、CX<sub>3</sub>CR1<sup>hi</sup>マクロファージの分化をフローサイトメトリーにより計測した。また、Flux analyzer を用いて酸素消費速度を指標とした酸化的リン酸化の評価、及び、ミトコンドリア複合体 I、II、III、IV、V のタンパク発現を Western Blotting により解析した。骨髓細胞の培養2日目に、骨髓由来単球を回収し、トランスクリプトーム解析を実施した。cLP の細胞の解析、qPCR、ELISA は第1部で示した方法で行った。

### 【結果・考察】

NEt-3IB の投与は DSS の大腸炎症状を減弱し CX<sub>3</sub>CR1<sup>hi</sup>マクロファージを増加させる

cLP に存在する単球及びマクロファージに与える NET-3IB の影響を評価するために、DSS 誘導性大腸炎マウスに NET-3IB を経口投与した。その結果、NET-3IB 投与群では Vehicle 群と比較して、大腸炎による体重減少、下痢、血便の症状が緩和された。cLP の免疫細胞集団を解析したとこと、NET-3IB 投与群では CX<sub>3</sub>CR1<sup>hi</sup> マクロファージが有意に増加していた。CX<sub>3</sub>CR1<sup>hi</sup> マクロファージの前駆細胞である Ly6C<sup>+</sup>単球は、NET-3IB 投与群で減少していた。

#### NET-3IB は BMc において CX<sub>3</sub>CR1<sup>hi</sup> マクロファージの誘導を促進する

NET-3IB が直接的に CX<sub>3</sub>CR1<sup>hi</sup> マクロファージの分化誘導を促進するかどうかを BMc 培養系において検討した。NET-3IB 処理群では Vehicle 処理群と比較して CX<sub>3</sub>CR1<sup>hi</sup> マクロファージが増加し、Ly6C<sup>+</sup>単球は減少していた。内因性 RXR リガンドである 9-*cis*-RA の処理でも NET-3IB と同様に、CX<sub>3</sub>CR1<sup>hi</sup> マクロファージが増加し、単球が減少した。以上の結果から、RXR の活性化は単球の CX<sub>3</sub>CR1<sup>hi</sup> マクロファージへの分化を促進することが示唆された。さらに、NET-3IB 存在下で培養された BMc は、大腸のマクロファージと同様に LPS 刺激に対する TNF- $\alpha$  の産生が抑制され、IL-10 の産生が増加した。以上の結果から、NET-3IB は、単球の CX<sub>3</sub>CR1<sup>hi</sup> マクロファージ分化を促進し、*in vitro* の BMc において抗炎症性の性質を促進することが示唆された。

マクロファージの炎症機能は細胞内代謝プロファイルに依存することが知られている。エネルギー代謝が解糖系優位の場合は炎症性の M1 マクロファージに分化し、一方で、酸化的リン酸化優位の場合は抗炎症性という点で CX<sub>3</sub>CR1<sup>hi</sup> マクロファージに類似した M2 マクロファージに分化する。したがって、NET-3IB によって誘導された BMc において抗炎症性の性質が促進されていた理由として、細胞内代謝プロファイルが酸化的リン酸化にシフトしていたことが予想された。そこで、NET-3IB と共に誘導された BMc の細胞内代謝プロファイルを Flux analyzer を用いて測定した。その結果、NET-3IB 処理群は Vehicle 処理群と比較して、有意に酸化的リン酸化が亢進していた。また、NET-3IB と共に誘導された BMc では、酸化的リン酸化に寄与するミトコンドリア複合体 I、II、III、IV、V の発現が NET-3IB 投与群で増加傾向であった。したがって、NET-3IB による抗炎症性の BMc の誘導には酸化的リン酸化の亢進が示唆される。

#### NET-3IB による CX<sub>3</sub>CR1<sup>hi</sup> マクロファージ誘導機構の解明

NET-3IB による単球の CX<sub>3</sub>CR1<sup>hi</sup> マクロファージ分化誘導機構を明らかにするために、NET-3IB 存在下で誘導した骨髄由来単球を単離し、トランスクリプトーム解析を行った。その結果、酸化的リン酸化を促進する複数のミトコンドリア関連遺伝子群の発現が NET-3IB の処理で増加した。qPCR 解析では、*Slc25a5* (ANT2) が NET-3IB の処理で増加することが分かった。ANT2 は、ミトコンドリア内膜に存在する ADP/ATP トランスロケーターで酸化的リン酸化に寄与する分子である。そこで、NET-3IB は単球において、*Slc25a5* の発現を増加させ、酸化的リン酸化を亢進することで CX<sub>3</sub>CR1<sup>hi</sup> マクロファージへの分化を促進する可能性が予想された。実際に、骨髄細胞を ANT2 の阻害により酸化的リン

酸化を抑制する化合物である CAT 及び NET-3IB と共に培養し BMc に分化させると、NET-3IB による CX<sub>3</sub>CR1<sup>hi</sup> マクロファージ誘導作用が消失した。

第 2 部の研究により RXR アゴニストは単球の CX<sub>3</sub>CR1<sup>hi</sup> マクロファージ分化を促進することが明らかとなった。その分化促進メカニズムとして、*Slc25a5* の転写促進を介した酸化的リン酸化の亢進が寄与しているかもしれない。以上より、RXR アゴニストは、炎症性の単球から抗炎症性の CX<sub>3</sub>CR1<sup>hi</sup> マクロファージへの分化を促すことで大腸炎の発症を抑制することが示唆された。

#### 【研究全体の総括】

本研究から、RXR アゴニストは DSS 誘導性大腸炎を抑制することが判明した。RXR アゴニストによる大腸炎の抑制機構として、単球の炎症機能の抑制及び単球の CX<sub>3</sub>CR1<sup>hi</sup> マクロファージ分化の促進が考えられる。

### 論文審査結果の要旨

IBD は原因不明の難治性疾患であり、根治療法は確立されていない。内科治療の目標は、活動性の疾患を寛解に導くことと、寛解状態を維持することである。しかしながら、既存の薬剤療法では十分な効果が認められない、または、副作用により投薬を中止せざるをえない症例も多いのが現状である。したがって、安全性と有効性に優れた薬剤の開発が依然として求められている。申請者は、本論文において RXR アゴニストが DSS 誘導性大腸炎を抑制し、その抑制機構として単球の炎症機能の抑制及び単球の CX<sub>3</sub>CR1<sup>hi</sup> マクロファージ分化の促進が寄与することを明らかにした。

第 1 部の研究において申請者は、RXR フルアゴニストによる肝肥大や高トリグリセリド血症などの副作用が問題となっていたため、RXR 活性をフルアゴニストの 75%程度に抑えることで副作用を減弱した RXR パーシャルアゴニスト CBt-PMN を用いて副作用及び実験的大腸炎に対する抑制効果を検証した。その結果、CBt-PMN は RXR フルアゴニストと比較して副作用が低減されており、また、RXR フルアゴニストと同程度の大腸炎抑制作用を示した。CBt-PMN の投与により、好中球の大腸への浸潤が抑制されること、本モデルのエフェクター細胞である単球及びマクロファージの炎症機能が抑制されることを見出した。申請者は、CBt-PMN による大腸炎抑制作用のメカニズムとして、PPAR $\delta$ /RXR $\alpha$  及び Nur77/RXR $\alpha$  ヘテロダイマーの活性化によって単球の炎症機能が抑制されることを明らかにした。第 1 部の研究において、CBt-PMN は、RXR アゴニストの副作用の問題点を克服し実験的大腸炎を抑制することを示すことができた。

第 2 部の研究において、第 1 部の研究で観察された RXR アゴニストによるマクロファージにおける炎症機能の抑制に着目し、大腸において単球から抗炎症機能を持った CX<sub>3</sub>CR1<sup>hi</sup> マクロファージへの分化に RXR の活性化が寄与していると仮説を立てた。そ

ここで、大腸移行性の高い RXR アゴニスト NEt-3IB を DSS 誘導性大腸炎マウスに投与したところ、大腸炎が抑制され、大腸において単球が減少し CX<sub>3</sub>CR1<sup>hi</sup> マクロファージが増加した。また、*in vitro* の BMc を用いた系で、NEt-3IB が単球の CX<sub>3</sub>CR1<sup>hi</sup> マクロファージへの分化を促進すること、及びマクロファージにおいて抗炎症性の性質を増強することが示された。申請者は、マクロファージの炎症機能が細胞内代謝プロファイルに依存し、抗炎症性の M2 マクロファージの分化に酸化的リン酸化が寄与することから、NEt-3IB と共に誘導した BMc において代謝状態を評価した。その結果、NEt-3IB 処理群では酸化的リン酸化に寄与するミトコンドリア活性及びミトコンドリア複合体の発現が増加した。また、単球においても NEt-3IB 処理群では酸化的リン酸化に寄与するミトコンドリア遺伝子である *Slc25a5* (ANT2) の発現が増加していた。さらに、ANT2 の阻害により NEt-3IB による CX<sub>3</sub>CR1<sup>hi</sup> マクロファージの誘導促進作用が抑制されることを示した。第 2 部の研究において申請者は、NEt-3IB による CX<sub>3</sub>CR1<sup>hi</sup> マクロファージ分化促進機構として、*Slc25a5* の転写活性化を介した酸化的リン酸化の亢進が寄与する可能性を見出した。

本研究において、RXR アゴニストは、単球及びマクロファージを標的とした新たな作用機序に立脚した IBD 治療薬の開発に繋がる可能性が示された。

口頭発表において、副査の大澤教授から「RXR ヘテロダイマーによって RXR パートナー受容体による転写活性化が生じるメカニズム」について質問があり、申請者は、「RXR リガンド非存在時はコリプレッサーが結合しておりパートナー受容体による転写活性化が抑制されているが、RXR リガンドが RXR に結合するとコンフォメーションの変化が生じ、コアクチベーターが結合できるようになり、パートナー受容体による転写活性化が生じるようになる。」と回答した。また、「RXR ヘテロダイマーは最初から存在しているか。」との質問に対し、申請者は、「最初から存在しておらず、リガンドが結合することにより核内に移行しヘテロダイマーを形成する。」と回答した。副査の多胡教授から、「RXR の活性化が抗炎症作用を示すメカニズム」について質問があり、申請者は、「単球の腸管型マクロファージ (CX<sub>3</sub>CR1<sup>hi</sup> マクロファージ) への分化促進によるもの。また、分化促進の過程における単球の炎症機能の抑制も抗炎症性に寄与する可能性がある」と回答した。また、「ミトコンドリア複合体の発現が上がったことで、酸化的リン酸化が亢進したのか。」との質問に対し、「ミトコンドリア複合体の阻害で酸化的リン酸化の指標である酸素消費速度が低下するという報告があるので、複合体の発現が上がることで酸化的リン酸化が亢進する可能性がある。」と回答した。

申請者の博士論文、発表会での発表、試問に対する回答はおおむね妥当であり、RXR アゴニストを用いることで単球及びマクロファージを標的とした新たな作用機序に立脚した IBD 治療薬の開発に貢献できる本研究は学術的に大きな価値があり、博士 (薬学) を授与するにふさわしい学力を有すると判断した。

## 論文目録

### 【主論文に関する原著論文】

Onuki M., Watanabe M., Ishihara N., Suzuki K., Takizawa K., Hirota M., Yamada T., Egawa A., Shibahara O., Nishii M., Fujihara M., Makishima M., Takahashi D., Furusawa Y., Kakuta H., Hase K. A partial agonist for retinoid X receptor mitigates experimental colitis. *Int. Immunol.* 31: 251-262, 2018.