

博士学位論文 2021 年度

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

【要約版】

慶應義塾大学大学院薬学研究科

大貫公義

目次

第1部 実験的大腸炎に対するレチノイド X 受容体 パーシャルアゴニストの抗炎症効果の検証	2
第1章 序論	3
第2章 実験材料と方法	5
第3章 結果	9
第4章 考察	13
第5章 表	15
第2部 レチノイド X 受容体を介した CX ₃ CR1 ^{hi} マクロファージ 分化誘導機構の解明	19
第1章 序論	20
第2章 実験材料と方法	22
第3章 結果	26
第4章 考察	29
第5章 表	31
参考文献	33
謝辞	38

第 1 部

実験的大腸炎に対するレチノイド X 受容体パーシャル アゴニストの抗炎症効果

第1章 序論

炎症性腸疾患 (Inflammatory bowel disease: IBD)は原因不明の難治性疾患であり、クローン病と潰瘍性大腸炎に大別される。いずれの疾患も再燃と寛解を繰り返すことを特徴としており、腸管免疫系の制御異常が炎症の発症に関与している。高度成長期以降、本邦において IBD 患者数が急激に増加している。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。

IBD の発症には、遺伝的要因と環境的要因が関係し^{1,2}、環境的要因の 1 つである食生活においてコレステロールや動物性脂肪を多く含む食品の摂取は IBD のリスク因子と考えられている³。一方で、*n*-3 系不飽和脂肪酸であるドコサヘキサエン酸 (Docosahexaenoic acid: DHA)の摂取は IBD の発症リスクを低減する^{4,5}。また、DHA の投与は、IBD モデルであるデキストラン硫酸ナトリウム (DSS: dextran sodium sulfate)誘導性大腸炎モデルマウスにおいて大腸炎症状を減弱させる⁶。DHA は、アラキドン酸由来の炎症性脂質メディエーターであるプロスタグランジンとロイコトリエンの産生を抑制することで炎症を抑制し、DHA の代謝物であるレゾルビン⁷は好中球の遊走阻害や炎症性サイトカイン産生を抑制することで抗炎症作用を示すが⁷⁻⁹、DHA の抗炎症メカニズムは完全には明らかになっていない。DHA は核内受容体の一種であるレチノイド X 受容体 (Retinoid X receptor: RXR)のリガンドとして知られている¹⁰。RXR は RXR α , β , γ の 3 つのサブタイプが存在し、それらの活性化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)といった他の核内受容体とヘテロダイマーを形成し標的遺伝子の発現を誘導する¹¹。RXR リガンドは、パートナー受容体のリガンド非存在下において上述のヘテロダイマーを全て活性化することができる。これはパーミッシブ機構と呼ばれている¹²。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¹³⁻¹⁵、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。したがって、DHA の抗炎症メカニズムの一つとして RXR の活性化が予想される。また、RXR により特異的に作用する合成アゴニストは有効な IBD 治療薬として期待される。

しかしながら、RXR アゴニストはその連続投与により肝肥大や血中トリグリセリドの上昇といった副作用が生じるため、RXR アゴニストの既承認薬は皮膚 T 細胞性リンパ腫治療薬のベキサロテンに留まる¹⁶。そこで、共同研究者である加来田博貴博士 (岡山大学大学院医歯薬

総合研究科)らは、RXR 活性化をベキサロテンの 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¹⁶。RXR アゴニストは、1,1,4,4-テトラメチルテトラリン構造からなる脂溶性部位、安息香酸やニコチン酸からなる酸性部位、およびこれらを連結するリンカー部位から構成される。リンカー部位に閉環構造を導入することで RXR フルアゴニストが結合した際の RXR 構造に比べ不完全な構造を与え、閉環時に導入されるヘテロ原子の静電ポテンシャルなどによりパーシャルアゴニスト活性が得られる。RXR パーシャルアゴニストは、過剰投与においても受容体を完全には活性化せず、RXR フルアゴニストであるベキサロテンと比較して CBt-PMN は肝肥大や血中トリグリセリドの上昇といった副作用を抑えることに成功している¹⁶。本研究では、CBt-PMN を用いて実験的大腸炎に対する抑制作用の検証を行った。

第2章 実験材料と方法

2-1. 動物実験

全ての動物実験は慶應義塾大学の動物実験委員会によって承認されたプロトコルに従って実施した[承認番号: 14015-(1)～(6)]。C57BL/6J 雄性マウスは日本クレアから購入し、明暗周期 12/12 時間（照明点灯時間は 8:00 a.m.-8:00 p.m.）、温度 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $50\pm 5\%$ の specific-pathogen free (SPF) 環境下で飼育した。餌は日本クレアの CE-2 を使用し、すべての実験で飲水は自由摂取とした。1 週間以上の馴化飼育後、各種実験に供した。DSS 大腸炎モデルマウス作成のために、DSS（分子量: 36,000-50,000, MP Biomedicals）をマウスの飲料水に終濃度 2% で溶解し、6 日間マウスに飲水投与した。DSS 投与開始後 6 日目に通常水に変更した。合成された CBt-PMN は加来田博貴博士より供与を受けた¹⁶。CBt-PMN およびベキサロテンはエタノール（EtOH）に溶解後、0.5% CMC に懸濁させた。最終的な EtOH 濃度は 1% になるように調製した。CBt-PMN（30 mg/kg/day）およびベキサロテン（30 mg/kg/day）は DSS 投与開始と同時に、あるいは、投与開始 2 日前から経口投与した。対照群（Vehicle 群）には 1% の EtOH を含む 0.5% CMC（EtOH/CMC）溶液を投与した。投与期間中は 1 日 1 回、体重と飲水量を計測した。また、Katada らの方法に従い¹⁷、Disease activity index（DAI）スコアを評価した。具体的には表 1 に従い体重減少、下痢、血便の程度を数値化し、その合計を DAI スコアとした。便潜血は ColoScreen-ES（Helena Laboratories）を用いて判定した。DSS 投与 9 日後、マウスを安楽死させた後、大腸を摘出し回腸接合部から肛門までの長さを測定した。その後、組織学的解析、定量的 PCR（quantitative PCR: qPCR）、およびフローサイトメトリーに供した。

2-2. ヘマトキシリン&エオジン染色と組織学的スコアの評価

大腸組織サンプルは、10%ホルマリン中性緩衝液（Mildform 10N, Wako Pure Chemical Industries）で一晩固定した。固定後、パラフィンブロックに包埋し、ミクロームを用いて $3\ \mu\text{m}$ の組織切片を作成した。切片を脱パラフィン化・再水和し、ヘマトキシリン（Agilent Technologies）およびエオジン（Wako）で染色した後、マウントクイック（Daido Sangyo Co.）で封入した。組織学的スコアは盲検化を行い、表 2 に従い評価した。

2-3. 大腸粘膜固有層からの細胞の単離

大腸を摘出し縦方向に開き、Hank's Balanced Salt Solution（HBSS; ナカライテスク）で洗浄した。その後、大腸を 4 分割し 1 mM dithiothreitol（DTT; ナカライテスク）、20 mM EDTA（ナカライテスク）、12.5 mM HEPES（ナカライテスク）を含む HBSS 中で、マグネチックスターラ

一で攪拌しながら 37°Cにて 20 分間インキュベートし上皮を剥離した。その後、大腸組織を回収してミンスを行い、0.5 mg/ml collagenase (富士フイルム和光純薬), 0.125 mg/ml Deoxyribonuclease (DNase) I from bovine pancreas (Merck), 2% fetal calf serum (FCS; MP Biomedicals), 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 20 mM HEPES を含む RPMI1640 中で、マグネチックスターラーで攪拌しながら 37°Cにて 30 分間インキュベートすることで細胞を分散した。本溶液を 100 µm cell strainer にて濾過し、4°C, 500 × g にて 5 分間遠心分離を行った。沈殿物を 40% Percoll (GE Healthcare) に懸濁した。パスツールピペットを用いて 75% Percoll 溶液を下層に注入した後、20°C, 500 × g にて 20 分間遠心分離した。中間層を取り出し、2% FBS を含む Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS; ナカライテスク) 溶液にて洗浄後、同溶液に再懸濁した細胞をカウントし免疫染色を行った。

2-4. 血中からの細胞の単離

定常状態のマウスより、26G 注射針 (テルモ)を用いて心採血を行い、15 mM EDTA, 1% bovine serum albumin (ナカライテスク)を含む HBSS 中に回収した。4°C, 500 × g にて 5 分間遠心分離した後、RBC lysis buffer (BioLegend)によって赤血球を除去した。

2-5. 大腸上皮細胞の単離

大腸上皮細胞は Suzuki らの上皮剥離法¹⁸に従い行った。大腸組織を 1 mM DTT, 30 mM EDTA を含む HBSS 中で、氷上で 20 分間インキュベートした。その後、26G 注射針を用いて上皮細胞を剥離し、HBSS で洗浄した。その後、大腸上皮細胞は、1% 2-mercaptoethanol を含む Buffer RLT (RNeasy Mini Kit; Qiagen)、または、TRIzol (Thermo Fisher Scientific) に溶解した。大腸上皮細胞は qPCR に使用した。

2-6. フローサイトメトリーおよび fluorescence-activated cell sorting

2-3, 4 に記述した方法で得られた細胞懸濁液に、抗 CD16/32 抗体を用いて氷上で 15 分間インキュベートすることで Fc 受容体のブロッキングを行った。表 2 に示した各種蛍光標識抗体を加え、4°Cにて 30 分間インキュベートし細胞表面抗原を標識した。その後、2 回洗浄し死細胞を 7-amino-actinomycin D (BioLegend)で標識したものを解析に用いた。抗体等の希釈、細胞の洗浄は 2% FBS を含む D-PBS で行った。細胞内抗原を染色する場合、細胞表面抗原を染色した後、Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set (Thermo Fisher Scientific)を用いて固定および膜透過処理を行い、その後、細胞内抗原を染色した。死細胞の標識には Fixable Viability Stain 780 (BD Biosciences)を用いた。上述の方法で調製した検体は LSR

II Flow Cytometer (BD Biosciences) によって解析した。単球 (CD45⁺CD3⁻B220⁻CD11b⁺Ly6G⁻CD11c⁻MHCII⁻SSC^{lo}Ly6C^{hi})、好中球 (CD45⁺CD3⁻B220⁻CD11c⁻CD11b⁺Ly6G⁺)、マクロファージ (CD45⁺CD3⁻B220⁻CD11c⁻CD11b⁺Ly6G⁻MHCII⁺SSC^{lo})、樹状細胞 (CD45⁺CD3⁻B220⁻CD11c⁺Ly6G⁻MHC⁺)、B 細胞 (CD45⁺CD3⁻B220⁺)、T 細胞 (CD45⁺CD3⁺B220⁻) のソーティングには fluorescence-activated cell sorting (FACS) AriaIII (BD Biosciences) を使用した。

2-7. 骨髄由来マクロファージの培養

骨髄細胞をマウスの大腿骨および頸骨から採取し、100 μm のセルストレイナーで濾過した後、RBC Lysis Buffer によって赤血球を除去した。骨髄細胞を、12-well プレートにて 5 × 10⁵ cells/well で、10% FCS, 10 mM HEPES, 20 μM GlutaMAX I (Thermo Fisher Scientific), 55 μM 2-mercaptoethanol (Thermo Fisher Scientific), 100 U/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin, 20 ng/mL macrophage colony-stimulating factor (BioLegend) を含む培地中、5% CO₂, 37°C で 6 日間培養することにより骨髄由来マクロファージ (Bone marrow-derived macrophages: BMc) を得た。培養開始後 3 日目に培地を全量交換した。得られた BMc は、100 ng/mL lipopolysaccharide (LPS; Sigma) および RXR アゴニスト (CBt-PMN), LXR アゴニスト (T0901317; Sigma), CAR アゴニスト (TCPOBOP; Focus Biomolecules), PPARδ アゴニスト (GW501516; Sigma), PPARγ アゴニスト (Pioglitazone hydrochloride; 東京化成工業), Nur77 アゴニスト (Cytosporone b; Sigma) の存在下、あるいは、非存在下で培養した。各アゴニストは終濃度 5、10、または 20 μM になるように添加した。4 時間および 6 時間培養した BMc を qPCR に用い、12 時間培養した上清を Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) に用いた。

2-8. COS-1 細胞の培養

COS-1 細胞は 10% FBS, 0.2% NaHCO₃, 4 mM L-glutamine, 50,000 U/L penicillin, 50,000 μg/L streptomycin を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Gibco) 中、5% CO₂, 37°C で培養し、ルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイに用いた。

2-9. qPCR

qPCR で解析する大腸組織は使用するまで RNAlaterSolution (東洋紡) に浸漬し -30°C で保存した。大腸組織、大腸上皮細胞、および FACS により単離した各種細胞の total RNA は RNeasy Mini Kit または TRIzol を用いて、各製品プロトコルに従い抽出した。抽出した

total RNA を鋳型として iScript Advanced cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (Bio-Rad Laboratories)を用いて逆転写反応を行い、cDNA を合成した。合成された cDNA は SsoFAST EvaGreen Supermix (Bio-Rad Laboratories)を用いて解析した。PCR は CFX96 リアルタイム PCR 解析システムを使用した。遺伝子発現は *Actb* を内部標準として $\Delta\Delta Ct$ 法により解析した。本研究で使用したプライマーを表 3 に示した。全てのプライマーは北海道システムサイエンスより購入した。

2-10. ELISA

BMc の培養上清は 4°C, 20,000 × *g* にて 1 分間遠心分離した後上清を回収し、使用するまで -80°C で保存した。IL-6 および TNF- α の濃度は、ELISA kits (BioLegend)を用いて製品プロトコールに従い測定した。

2-11. ルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイ

ルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイは Kakuta らの方法¹⁶に従い評価した。RXR α と Nur77、あるいは、PPAR δ の遺伝子、各核内受容体応答エレメントの制御下にあるルシフェラーゼレポーター遺伝子、およびバックグラウンドとして分泌型アルカリホスファターゼ (SEAP) 遺伝子の 3 種類のベクターを COS-1 細胞にトランスフェクションした。それぞれの応答領域として、tk-PPRE \times 3-Luc (PPAR δ), NX' 3 \times 3-tk-Luc (Nur77)を使用した。トランスフェクションは、Effectene transfection reagent (QIAGEN)を用いて製品プロトコールに従い実施した。なお、これらのプラスミドは槇島誠教授 (日本大学医学部生化学講座)らより提供いただいた。トランスフェクションされた COS-1 細胞は、96-well プレートにて 2×10^4 cells/well で CBt-PMN と共に培養した。18 時間培養後、上清 25 μ L を別の 96-well プレートに移し、りん酸 4-メチルウンベリフェリル (富士フィルム和光純薬)を加えて SEAP 活性を測定した。また、残りの細胞は Steady-Glo luciferase assay system (Promega)を用いて、製品プロトコールに従いルシフェラーゼ活性を測定した。ルシフェラーゼ活性は、SEAP 活性によって補正して解析した。

2-12. 統計解析

2 群間の差の統計解析は等分散性が見られた場合には Student's *t*-test を行い、不等分散の場合には Mann-Whitney *U*-test を行った。3 群間以上の差の統計解析には、one-way ANOVA を使用し、有意差が見られた場合には Tukey's test、あるいは、Dunnnett's test を行った。全ての統計解析は GraphPad Prism 7 を用いて行った。*P* 値が 0.05 未満の時、有意な差があると判定した。

第3章 結果

3-1. CBt-PMN は DSS 誘導性大腸炎を減弱する

RXR パーシャルアゴニストである CBt-PMN の炎症抑制効果と副作用を評価するために、DSS 誘導性大腸炎モデルマウスに CBt-PMN および RXR フルアゴニストであるベキサロテンを投与した。2% DSS を飲水投与したところ体重減少、下痢、および血便といった IBD 様症状が観察された。Vehicle 投与群と比較して、CBt-PMN 投与群、およびベキサロテン投与群では体重減少が減弱した。さらに、体重当たりの肝重量を肝肥大の指標として比較したところ、CBt-PMN 投与群ではベキサロテン投与群で見られた肝肥大は生じなかった。また、CBt-PMN を DSS 投与 の 2 日前より前投与すると、Vehicle 投与群と比較して顕著に体重減少を抑制した。同様に、DAI スコアは、CBt-PMN 投与群において有意に改善していた。本モデルでは、炎症に伴い大腸長が短くなることが知られているが、Vehicle 投与群と比較して CBt-PMN 投与群では大腸が有意に長かった。大腸の組織切片のヘマトキシリン/エオジン (H&E) 染色像を観察したところ、Vehicle 投与群ではクリプト構造の破壊、細胞の浸潤、および杯細胞の消失が確認されたが、CBt-PMN 投与群ではこれらの病理学的変化が軽度であった。

腫瘍壊死因子 (Tumor necrosis factor: TNF)- α 、インターロイキン (interleukin: IL)-1 β 、IL-6、IL-17 などの炎症性サイトカインは、IBD および DSS 誘導性大腸炎における炎症の促進に寄与している^{19,20}。そこで大腸組織におけるこれらの炎症性サイトカインの遺伝子発現を qPCR で調べた。その結果、Vehicle 投与群と比較して CBt-PMN 投与群では有意に *Tnf*, *Il6*, *Il17a* の発現が低下していた。また、統計的な有意差はなかったが、*Il1b* の遺伝子発現も CBt-PMN 投与群で減少傾向であった。さらに、炎症性細胞の好中球の遊走に関わるケモカインである *Cxcl1* および *Cxcl2* の大腸組織における遺伝子発現を調べた²¹。その結果、CBt-PMN 投与群では Vehicle 投与群と比較して、*Cxcl1* および *Cxcl2* の遺伝子発現が有意に低下していた。以上の結果から、CBt-PMN は RXR の活性化に伴う肝肥大の副作用を減らしつつ、DSS 誘導性大腸炎を抑制することがわかった。

3-2. CBt-PMN による大腸の免疫細胞への影響

IBD および DSS 誘導性大腸炎の発症には、様々な大腸の免疫細胞が関与することが知られている^{22,23}。特に、単球や好中球などの炎症性細胞は大腸炎の発症と増悪に寄与する。CBt-PMN の投与が免疫細胞の構成に影響を与えているかどうか検証するために、CBt-PMN を投与した DSS 誘導性大腸炎モデルマウスの大腸粘膜固有層に存在する免疫細胞をフローサイトメトリーを用いて解析した。その結果、全白血球に占める好中球

(CD45⁺CD3⁻B220⁻CD11c⁻CD11b⁺Ly6G⁺)の割合が Vehicle 投与群と比較して CBt-PMN 投与群では減少していた。一方で、T 細胞 (CD45⁺ CD3⁺ B220⁻)、B 細胞 (CD45⁺CD3⁻B220⁺)、樹状細胞 (CD45⁺CD3⁻B220⁻CD11c⁺Ly6G⁻MHC⁺)、マクロファージ (CD45⁺CD3⁻B220⁻CD11c⁻CD11b⁺Ly6G⁻MHCII⁺SSC^{lo})、単球 (CD45⁺CD3⁻B220⁻CD11b⁺Ly6G⁻CD11c⁻MHCII⁻SSC^{lo}Ly6C^{hi})の割合は両群間で差がなかった。さらに、T 細胞の亜集団である制御性 T (Treg)細胞 (CD3⁺CD4⁺FoxP3⁺)は DSS 誘導性大腸炎において抗炎症作用を示し²⁴、Th1 細胞 (CD3⁺CD4⁺T-bet⁺)および Th17 細胞 (CD3⁺CD4⁺RORγt⁺)は炎症作用を示すため²⁵、これらの細胞に着目した。その結果、CD4⁺T 細胞に占める Treg 細胞と Th1 細胞の割合は Vehicle 投与群と CBt-PMN 投与群で差が認められなかった。一方、Th17 細胞の割合は CBt-PMN 投与群で有意上昇していた。しかしながら、上述のように大腸組織における *Il17a* の遺伝子発現が減少していたことから、CBt-PMN は、Th17 細胞の分化は促進するものの、そのサイトカイン産生機能を抑制する可能性がある。

続いて、CBt-PMN の標的となる細胞種の同定を試みた。CBt-PMN は RXR サブタイプの中で RXRα 活性が高いので、DSS 誘導性大腸炎条件下および定常状態条件下の大腸粘膜固有層および血中に存在する単球、マクロファージ、好中球、樹状細胞、B 細胞、T 細胞の *Rxra* の遺伝子発現を調べた。単球および好中球は炎症組織に多く存在し、定常状態の大腸組織には少ないため、定常状態条件下の単球および好中球における *Rxra* の発現解析では血中の単球と好中球を用いた。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、単球が最も高く *Rxra* を発現していた。

Ly6C^{hi} 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-α, IL-1β, IL-6 などの炎症性サイトカインを産生することが知られている²²。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ことから、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²²。CBt-PMN は大腸粘膜固有層における単球の割合には影響を与えなかったものの、*Rxra* が単球に高発現していることから、CBt-PMN が単球の炎症機能を抑制することで大腸炎の発症を緩和しているのではないかと推測した。これを検証するために、CBt-PMN および Vehicle を投与した DSS 誘導性大腸炎モデルマウスの大腸粘膜固有層から単球を単離し、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、有意差はなかったものの、*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 投与群ではマクロファージにおける *Il6* の遺伝子発現が低下していた。一方で、好中球および樹状細胞における *Il6* の遺

伝子発現は両群間で差がなかった。以上の結果から、CBt-PMN は単球およ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。

3-3. 大腸上皮細胞に対する CBt-PMN の影響

我々はさらに、大腸の粘膜表面において病原体や抗原に対してバリア機能を担う大腸上皮細胞への CBt-PMN の影響を調べた。上皮細胞は、タイトジャンクションを介して互いに強く接着することで大腸粘膜表面において生理学的バリアを形成している。そこで、DSS 投与開始 9 日目の Vehicle 投与群および CBt-PMN 投与群の上皮細胞において、タイトジャンクションを構成するタンパク質をコードする *Cldn1* および *Tjp1* の遺伝子発現を調べた。その結果、CBt-PMN 投与群および Vehicle 投与群の間で、*Cldn1* および *Tjp1* の遺伝子発現に差はなかった。炎症性サイトカインである TNF- α は、IBD および DSS 誘導性大腸炎の病態形成に関わり^{26,27}、また、上皮細胞のタイトジャンクションによるバリアを破壊することが知られている²⁸⁻³⁰。TNF 受容体 (TNF receptor: TNFR) 1 や TNFR2 の阻害は実験的大腸炎に対して抑制作用を示す³¹。そこで、TNFR1 をコードする *Tnfrsf1a* および TNFR2 をコードする *Tnfrsf1b* の遺伝子発現を調べた。その結果、CBt-PMN 投与群および Vehicle 投与群の間で *Tnfrsf1a* および *Tnfrsf1b* の遺伝子発現に差はなかった。以上の結果から、CBt-PMN は大腸上皮細胞のバリア機能に影響しないことが示唆された。

3-4. 抗炎症作用を示す RXR パートナー受容体の探索

RXR のパーミッシング機構により、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ことが知られている。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 のサブタイプ (RXR α , RXR β , RXR γ) をそれぞれコードする *Rxra*, *Rxrb*, *Rxrg* の遺伝子発現、および 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 誘導性大腸炎下の大腸粘膜固有層に存在する単球において、*Rxra*, *Nr4a1*, *Nr4a2*, *Nr1h2*, *Nr1h3*, *Nr1i3*, *Ppard*, *Pparg* の遺伝子発現が認められた。一方で、*Rxrb*, *Rxrg*, *Nr1h4*, *Nr1h5*, *Nr1i2*, *Ppara* の遺伝子発現は検出できなかった。BMc においても単球と同様な RXR 関連受容体の遺伝子発現パターンを示した。具体的には、*Nr4a1* (Nur77), *Nr4a2* (Nurr1), *Nr1h2* (LXR β), *Nr1h3* (LXR α), *Nr1i3* (CAR), *Ppard* (PPAR δ), *Pparg* (PPAR γ) が共通して発現していた。また、CBt-PMN は BMc において LPS 依存的な

IL-6 の産生を mRNA およびタンパクレベルで抑制したので、CBt-PMN の炎症抑制機構を解明するために 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 で共通して発現していた受容体に対するアゴニストを BMc に処理し、LPS 依存的な IL-6 の産生を調べた。各アゴニストは EC₅₀ の 10 倍以上の濃度である 5, 10, 20 μM で BMc に処理した。Nurr1 に対するアゴニストは市販されていないため、本研究において解析対象から除外した。その結果、BMc において PPARδ および 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 の産生を抑制した。一方で、LXR, CAR, PPARγ に対するアゴニストは IL-6 の産生を抑制しなかった。また、CBt-PMN は BMc において LPS 依存的な TNF-α の産生を mRNA およびタンパクレベルで抑制した。PPARδ および Nur77 に対するアゴニストもまた、LPS 刺激による TNF-α の産生を濃度依存的に抑制した。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 PPARδ/RXR および Nur77/RXR が寄与していると考えられる。

CBt-PMN が PPARδ/RXR および Nur77/RXR を活性化しているかどうか検証するために、PPARδ/RXR あるいは Nur77/RXR を発現し、それらの応答領域の下流にルシフェラーゼを発現する COS-1 細胞を用いたルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイを行った。CBt-PMN (0.1–10 μM) を、上述した PPARδ/RXR あるいは Nur77/RXR を発現した COS-1 細胞に処理すると、濃度依存的にルシフェラーゼ活性が上昇した。これらの結果と一致して、CBt-PMN を BMc に処理すると PPARδ/RXR の標的遺伝子である *Lpcat3* および Nur77/RXR の標的遺伝子である *Ikbke* の発現が増加していた。以上の結果から、CBt-PMN の炎症抑制作用には PPARδ/RXR および Nur77/RXR の活性化が寄与することが考えられる。

第4章 考察

本研究において、我々は RXR パーシャルアゴニスト CBt-PMN の経口投与が DSS 誘導性大腸炎を抑制することを示した。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²²。単球は、DSS の投与によって上皮バリアが破壊され微生物が侵入することで過度の免疫応答が起こることで積極的に血液中から大腸に浸潤し TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 などの炎症性サイトカインを産生する^{22,32}。興味深いことに、CBt-PMN の投与は、大腸粘膜固有層における単球の割合に影響せず *Il6* および *Tnf* の遺伝子発現を低下させた。これらの結果から、CBt-PMN の RXR の活性化による炎症抑制作用は、単球の遊走を抑制するのではなく、単球の炎症機能の抑制に起因することが示唆される。IL-6 は DSS 誘導性大腸炎の病態形成に寄与する³³。IL-6 は NF- κ B の活性化を誘導し、IBD において白血球遊走を増強し炎症反応の促進に関わる intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) の発現を増加させる^{34,35}。また、全身の IL-6 を欠損したマウスでは、炎症の維持に重要な STAT3 シグナルが抑制されることで対照群と比較して、DSS 誘導性大腸炎に抵抗性を示す³⁶。TNF- α もまた DSS 誘導性大腸炎の発症に関わっている³³。TNF- α は、大腸上皮において細胞接着分子の発現を低下させ、また、上皮細胞のアポトーシスを誘導することで大腸上皮バリアを破壊する。また、TNF- α は、粘膜に浸潤した白血球の炎症機能を促進することが知られている³⁷。DSS 誘導性大腸炎モデルマウスに IL-6 および TNF- α の中和抗体を投与すると大腸炎が劇的に改善する³³。まとめると、CBt-PMN による RXR の活性化は、IL-6 および TNF- α の発現を抑制し、それらの炎症性サイトカインシグナルによって引き起こされる大腸炎の病態形成を抑制することが考えられる。

大腸炎下において大腸に浸潤した単球は、*Il6* を高発現した炎症性のマクロファージに分化するため、マクロファージは大腸炎に寄与することが知られている²²。また、マクロファージによる IL-6 の産生が減少すると、DSS 誘導性大腸炎が減弱する³⁸。我々は、DSS 誘導性大腸炎下の大腸粘膜固有層に存在するマクロファージにおいて、*Rxra* が発現していることを確認した。したがって、CBt-PMN が直接的にマクロファージに作用し *Il6* の遺伝子発現を低下させ、DSS 誘導性大腸炎を抑制したことが示唆される。また、CBt-PMN の投与は大腸組織において *Cxcl1* および *Cxcl2* の遺伝子発現を低下させた。炎症に伴いマクロファージは CXCL1 および CXCL2 を産生するので^{39,40}、CBt-PMN はマクロファージにおいてこれらのケモカインの産生を抑制している可能性がある。

RXR は様々な核内受容体とヘテロダイマーを形成する。我々は、BMc および単球において、7種類の RXR パートナー受容体が発現していることを確認した。2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸誘導性大腸炎マウスにおいて、PPAR γ および RXR アゴニストにより *Tnf* および *Il1b* の遺伝子発現が減少することが報告されている¹⁴。一方で、DSS 誘導性大腸炎では、大腸組

織、腹腔浸潤細胞、大腸粘膜固有層に存在するリンパ球において *Pparg* の遺伝子発現が低下することが複数報告されている^{41,42}。我々は、BMc と単球で共通して発現していた 7 種類の RXR パートナー受容体の中で、単球において *Pparg* の遺伝子発現が最も低いことを確認した。さらに、PPAR γ /RXR ヘテロダイマーの活性化は BMc における炎症性サイトカインの産生を抑制できなかった。したがって、PPAR γ /RXR ヘテロダイマーは CBt-PMN のターゲットではないことが考えられる。対照的に、PPAR δ /RXR および Nur77/RXR ヘテロダイマーの活性化は、BMc において炎症性サイトカインの産生を抑制した。また、CBt-PMN は PPAR δ /RXR あるいは Nur77/RXR ヘテロダイマーの応答領域下のレポーター遺伝子の転写活性化を促進した。さらに、CBt-PMN の処理によりこれらのヘテロダイマーの標的遺伝子の発現が増加した。したがって我々は、CBt-PMN のパーミッシブ機構により PPAR δ /RXR および Nur77/RXR ヘテロダイマーを同時に活性化することで BMc における LPS 依存的な炎症応答を抑制すると考えている。PPAR δ /RXR ヘテロダイマーは、腹腔マクロファージにおいて B-cell lymphoma 6 (Bcl-6) の核内移行を促進し炎症性サイトカインの転写を抑制する⁴³。本機構は、Bcl-6 を欠損した BMc において IL-6 の発現が顕著に増加することから、PPAR δ /RXR ヘテロダイマー依存的な炎症抑制機構と考えられる⁴⁴。一方で、THP-1 細胞やヒト末梢血単球における Nur77 の過剰発現は、IL-1 β および TNF- α によって生じる NF- κ B の活性化を強力に抑制し、炎症性サイトカインおよびケモカインの発現を抑制する^{45,46}。過去の報告と我々の研究結果をまとめると、CBt-PMN のパーミッシブ機構による PPAR δ /RXR および Nur77/RXR ヘテロダイマーの活性化は、Bcl-6 の核移行および NF- κ B 経路の阻害という 2 種類の機構を通して単球およびマクロファージの炎症応答を抑制し、DSS 誘導性大腸炎の病態を改善している可能性がある。

IBD 治療薬の一種である 5-aminosalicylic acid による治療効果は、患部の濃度に依存することが知られている⁴⁷。したがって、今回は RXR パーシャルアゴニストを用いたが、治療効果を高めるために難吸収性で大腸移行型の RXR フルアゴニストを用いることでさらに強力な抗炎症作用が期待できる。

単球は大腸に浸潤すると一部が抗炎症性の CX₃CR1^{hi} マクロファージに分化する³²。したがって、本研究で観察されたマクロファージにおける炎症機能の抑制は、単球が CX₃CR1^{hi} マクロファージに分化していたことに起因する可能性が考えられる。本作業仮説については、引き続き第 2 部に記載した研究において検証を進めた。

第5章 表

表 1. DAI スコアの評価基準

Score	Body weight loss	Stool consistency	Occult blood-positive
0	No loss	Normal	Normal
1	1% to 5%	—	—
2	5% to 10%	Loose	Occult blood-positive
3	10% to 20%	—	—
4	Loss of more than 20%	Diarrhea	Gross bleeding

表 2. フローサイトメトリーで使用した抗体

Antibody	Clone	Source
Ant-CD16/32	93	BioLegend
Anti-B220	RA3-6B2	BioLegend
Anti-CD11b	M1/70	Theermo Fisher Scientific
Anti-CD11c	HL3	BD Biosciences
Anti-CD3	7A2	Tonbo Biosciences
Anti-CD3	145-2C11	Theermo Fisher Scientific
Anti-CD4	RM4-5	Tonbo Biosciences
Anti-CD45	30-F11	BioLegend
Anti-CX ₃ CR1	SA011F11	BioLegend
Anti-FoxP3	FJK-16s	Theermo Fisher Scientific
Anti-Ly6C	AL-21	BD Biosciences

Anti-Ly6G	1A8	Tonbo Biosciences
Anti-MHCII	M5/114.15.2	Theermo Fisher Scientific
Anti-ROTyT	Q31-378	BD Biosciences
Anti-T-bet	O4-46	BD Biosciences

表 3. プライマーリスト

<i>Gene</i>	Sequence	
<i>Actb</i>	Forward	5'-TTCTTTGCAGCTCCTTCGTT-3'
	Reverse	5'-ATGGAGGGGAATACAGCCC-3'
<i>Tnf</i>	Forward	5'-AGTTCTATGGCCCAGACCCT-3'
	Reverse	5'-CTCCTCCACTTGGTGGTTTG-3'
<i>Il1b</i>	Forward	5'-CGACAAAATACCTGTGGCCT-3'
	Reverse	5'-TTCTTTGGGTATTGCTTGGG-3'
<i>Il6</i>	Forward	5'-GTTCTCTGGGAAATCGTGGA-3'
	Reverse	5'-TTCTGCAAGTGCATCATCGT-3'
<i>Il17a</i>	Forward	5'-TTAAGGTTCTCTCCTCTGAA-3'
	Reverse	5'-TAGGGAGCTAAATTATCCAA-3'
<i>Cxcl1</i>	Forward	5'-ACTGCACCCAAACCGAAGTC-3'
	Reverse	5'-TGGGGACACCTTTTAGCATCTT-3'
<i>Cxcl2</i>	Forward	5'-AAGTTTGCCTTGACCCTGAA-3'
	Reverse	5'-AGGCACATCAGGTACGATCC--3'
<i>Rxra</i>	Forward	5'-CACCAAACATTTCTGCCGC-3'

	Reverse	5'-TCGACCCGTTGGAGAGTTGA-3'
<i>Rxb</i>	Forward	5'-CCACCTCTTACCCCTTCAGC-3'
	Reverse	5'-TGGAAGAAGTATGACTGGGA-3'
<i>Rrg</i>	Forward	5'-AGGGAAGCACTACGGTGTGTA-3'
	Reverse	5'-TCCCGACAGGTGTAGATGAGA-3'
<i>Nr4a1</i>	Forward	5'-TGATGTTCCCGCCTTTGC-3'
	Reverse	5'-CAATGCGATTCTGCAGCTCTT-3'
<i>Nr4a2</i>	Forward	5'-GTGTTCAAGCGCAGTATGG-3'
	Reverse	5'-TGGCAGTAATTTTCAGTGTGGT-3'
<i>Nr1h2</i>	Forward	5'-CAGTGCGTGCTCTCTGAGG-3'
	Reverse	5'-GGTCGGAGAAAGATCGTTTGTT-3'
<i>Nr1h3</i>	Forward	5'-CTCAATGCCTGATGTTTCTCCT-3'
	Reverse	5'-TCCAACCCTATCCCTAAAGCAA-3'
<i>Nr1h4</i>	Forward	5'-GGTCATGCAGACCTGTTGGAA-3'
	Reverse	5'-TGACGATCGCTGTGAGCAGA-3'
<i>Nr1h5</i>	Forward	5'-GCTTTTTCCGGCGTAGCATT-3'
	Reverse	5'-CCGCCTTACACTTCTTCAGTC-3'
<i>Nr1i2</i>	Forward	5'-GATGGAGGTCTTCAAATCTGCC-3'
	Reverse	5'-GGCCCTTCTGAAAAACCCCT-3'
<i>Nr1i3</i>	Forward	5'-CCCTGACAGACCCGGAGTTA-3'
	Reverse	5'-GCCGAGACTGTTGTTCATAAT-3'
<i>Ppara</i>	Forward	5'-AGAGCCCCATCTGTCCTCTC-3'

	Reverse	5'-ACTGGTAGTCTGCAAAACCAAA-3'
<i>Ppard</i>	Forward	5'-CCTAGGCAGCACAAGGGTCA-3'
	Reverse	5'-AGCCATATTCCCAGGCTGTCTC-3'
<i>Pparg</i>	Forward	5'-TGTCGGTTTCAGAAGTGCCTTG-3'
	Reverse	5'-TTCAGCTGGTCGATATCACTGGAG-3'
<i>Lpcat3</i>	Forward	5'-TCTTCTCCATCTTCCTGGGCTAC-3'
	Reverse	5'-AAGGAGTGGTAGAACTGGTGG-3'
<i>Ikbke</i>	Forward	5'-GGGTTACATTGGGTCCTGGAG-3'
	Reverse	5'-TCTGTGGCCTCCTTTCGTTC-3'
<i>Cldn1</i>	Forward	5'-ACTCCTTGCTGAATCTGAACAGT-3'
	Reverse	5'-GGACACAAAGATTGCGATCAG-3'
<i>Tjp1</i>	Forward	5'-CCTGTGAAGCGTCACTGTGT-3'
	Reverse	5'-CGCGGAGAGAGACAAGATGT-3'
<i>Tnfrsf1a</i>	Forward	5'-AGCACCCCAGGCTTTAGTTC-3'
	Reverse	5'-ATCGCAAGGTCTGCATTGTC-3'
<i>Tnfrsf1b</i>	Forward	5'-ACACCCTACAAACCGGAACC-3'
	Reverse	5'-AGCCTTCCTGTCATAGTATTCCT-3'

第 2 部

レチノイド X 受容体を介した

CX₃CR1^{hi} マクロファージ分化誘導機構の解明

第1章 序論

腸免疫系は、自己と非自己を認識し、外来異物を排除する生体防御システムである⁴⁸。この免疫において大きな役割を果たしているのが腸管免疫である。腸管は腸管粘膜に覆われており、その最も外側には腸上皮細胞が存在する。腸管粘膜の表面積は 400 m² にもおよび、食餌とともに侵入してくる病原体や、体細胞数を超える数の腸内常在細菌に曝されている。このように、常に感染の危険と隣り合わせにある腸管では、上皮細胞が互いに密に接することで、物理的なバリアを形成し、外来異物の侵入を防いでいる。加えて、腸上皮細胞の一種である杯細胞はムチンを産生し、粘膜面にムチン層を形成している。さらに、腸上皮細胞は抗菌タンパク質を産生することで、細菌の生体内への侵入を防いでいる。これらの上皮のバリア機能は腸管の恒常性維持において重要な役割を果たしている。また、細菌の侵入に対処するために多くの免疫細胞が上皮細胞の下に位置する粘膜固有層に分布し適応免疫応答を常に起こしている。一方で、過度な免疫応答は炎症を誘導し、腸管上皮バリアの破壊に繋がる。その結果、腸管粘膜組織への感染が起こる。したがって、腸管免疫系は免疫応答を制御する機構が多数備わっている。その 1 つに、ケモカインおよび細胞接着分子の役割を果たす CX₃CR1 を高発現したマクロファージ (CX₃CR1^{hi} マクロファージ) による免疫応答制御機構がある。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、腸管に存在する CX₃CR1^{hi} 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、血液から大腸に浸潤する単球は、IL-1 β , IL-6, TNF- α などを活発に産生するが、腸管型マクロファージに分化すると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。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。

近年、マクロファージの表現型は、組織特異的な環境因子と、それによって誘導される転写因子によって決定されることが明らかになっている⁴⁹。例えば、腹腔内で産生されたレチノイン酸は、マクロファージ前駆細胞に作用し、転写因子である GATA6 の発現を誘導する。これにより、B-1 細胞を介した抗体産生の制御を担う腹腔特異的なマクロファージへの分化が誘導される。また、脾臓ではマクロファージ前駆細胞において、ヘム鉄が転写因子である SpiC の発現を誘導し、老化赤血球の除去を行う脾臓マクロファージの分化を誘導することが知られている^{50,51}。一方で、大腸の CX₃CR1^{hi} マクロファージにおいて、分化誘導機構は明らかになっていない。組織特異的な環境因子が関わるものとしては、腸内細菌の存在で大腸の単球およびマクロファージを含む CD11b⁺ミエロイド細胞が、無菌 (Germ-free: GF) マウスの大腸の CD11b⁺細胞と比較して、LPS 刺激に対して IL-10 を産生することを示した報告に留まる⁵²。我々は、第

一部に示したように核内受容体 $\text{RXR}\alpha$ が、腸管の単球およびマクロファージに高発現しており、 RXR アゴニストがそれらの細胞において炎症機能を抑制することを明らかにした⁵³。また、マクロファージの炎症機能の抑制に単球の抗炎症性マクロファージへの分化、すなわち、 $\text{CX}_3\text{CR1}^{\text{hi}}$ マクロファージへの分化が示唆された。IBD 治療薬の一種である 5-aminosalicylic acid による治療効果は患部の濃度に依存するので⁴⁷、寛解を維持するために高い濃度で薬剤を大腸に到達させることは重要である。Kakuta らが合成した RXR フルアゴニスト 6-[N-ethyl-N-(3-isobutoxy-4-isopropylphenyl) amino] nicotinic acid (NEt-3IB) は $\text{RXR}\alpha$ 選択的で⁵⁴、難吸収性および腸肝循環により血中移行性が低く大腸移行性が高い^{55,56}。そこで本研究では、大腸炎抑制機構の解明の一貫として、大腸移行型 RXR アゴニスト NEt-3IB を用いて、 RXR の活性化による $\text{CX}_3\text{CR1}^{\text{hi}}$ マクロファージの分化誘導の検証を行う。

第2章 実験材料と方法

2-1. 動物実験

全ての動物実験は慶應義塾大学の動物実験委員会によって承認されたプロトコルに従って実施した[承認番号: 14015-(1)~(7)]。C57BL/6J 雄性マウスは日本クレアあるいは SLC から購入し、明暗周期 12/12 時間 (照明点灯時間は 8:00 a.m.-8:00 p.m.)、温度 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $50\pm 5\%$ の specific-pathogen free (SPF) 環境下で飼育した。餌は日本クレアの CE-2 を使用し、すべての実験で飲水は自由摂取とした。C57BL/6N 雄性無菌 (Germ-free: GF) マウスは日本クレアから購入し、明暗周期 12/12 時間 (照明点灯時間は 8:00 a.m.-8:00 p.m.)、温度 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $50\pm 5\%$ のアイソレーター内で飼育した。餌はオリエンタル酵母のガンマ線照射 (50 kGy) により滅菌した CMF を使用し、すべての実験で飲水は自由摂取とした。全てのマウスは 1 週間以上の馴化飼育後、各種実験に供した。DSS 大腸炎モデルマウス作成のために、DSS (分子量: 36,000-50,000, MP Biomedicals) をマウスの飲料水に終濃度 2% で溶解し、6 日間マウスに飲水投与した。DSS 投与開始後 6 日目に通常水に変更した。合成された NEt-3IB は加来田博貴博士らより供与を受けた⁵⁵。NEt-3IB はエタノール (EtOH) に溶解後、0.5% CMC に懸濁させた。最終的な EtOH 濃度は 1% になるように調製した。NEt-3IB (10 mg/kg/day) は DSS 投与開始と同時に経口投与した。対照群 (Vehicle 群) には 1% の EtOH を含む 0.5% CMC (EtOH/CMC) 溶液を投与した。投与期間中は 1 日 1 回、体重と飲水量を計測した。また、Katada らの方法に従い¹⁷、disease activity index (DAI) スコアを評価した。具体的には表 1 に従い体重減少、下痢、血便の程度を数値化し、その合計を DAI スコアとした。便潜血は ColoScreen-ES (Helena Laboratories) を用いて判定した。DSS 投与 9 日後、マウスを安楽死させた後、大腸を摘出し回腸接合部から肛門までの長さを測定した。その後、フローサイトメトリーに供した。

2-2. 抗生剤投与による腸内細菌の除去

Honda らの方法⁵⁷を一部改変し腸内細菌を除去した。具体的には、マウスに 1 g/L アンピシリン (ナカライテスク)、 0.5 g/L バンコマイシン (富士フィルム和光純薬)、 1 g/L ネオマイシン (ナカライテスク)、 1 g/L メロニダゾール (富士フィルム和光純薬)、 0.2 g/L シプロフロキサシン (東京化成工業) を含む飲料水を 5 週間自由飲水させた。その後、フローサイトメトリーに供した。

2-3. 大腸粘膜固有層からの細胞の単離

大腸を摘出後、腸管を縦に開き、メスで腸を横に二等分したのち、メッシュ上で 1-2 mm 四方に細分した。100 mL ビーカーに移し、1.5% FBS, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin を含む HBSS を加え、マグネチックスターラーで攪拌しながら 3 分間の洗浄を 2 回行った。上清吸引後、5 mM EDTA, 1 mM DTT, 1.5% FBS, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin を含む HBSS 溶液中で、マグネチックスターラーで攪拌しながら 37°C で 30 分間インキュベートし上皮を剥離した。上清吸引後、1.5% FBS, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin を含む HBSS で 3 分間の洗浄を 4 回行った。上清吸引後、0.1 mg/ml DNaseI, 1 mg/ml Collagenase, 1.5% FBS, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin を含む HBSS 溶液中で、マグネチックスターラーで攪拌しながら 37°C にて 1 時間インキュベートすることで細胞を分散した。本溶液を 100 µm cell strainer にて濾過し、4°C, 500 × g にて 5 分間遠心分離を行った。沈殿物を 40% Percoll に懸濁した。パスツールピペットを用いて 75% Percoll 溶液を下層に注入した後、20°C, 500 × g にて 20 分間遠心分離した。中間層を取り出し、1.5% FBS, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin を含む HBSS 溶液にて洗浄後、同溶液に再懸濁した細胞をカウントし免疫染色を行った。

2-4. フローサイトメトリーおよび FACS

2-3 に記述した方法で得られた細胞懸濁液に、抗 CD16/32 抗体を用いて氷上で 5 分間インキュベートすることで Fc 受容体のブロッキングを行った。表 2 に示した各種蛍光標識抗体を加え、4°C にて 30 分間インキュベートし細胞表面抗原を標識した。その後、2 回洗浄し死細胞を SYTOX AADvanced Dead Cell Stain (Thermo Fisher Scientific) で標識したものを解析に用いた。抗体等の希釈、細胞の洗浄は 2% FBS を含む D-PBS で行った。上述の方法で調製した検体の解析および骨髄細胞由来単球 (CD45⁺CD11b⁻Ly6C⁺) のソーティングには FACS AriaIII を使用した。

2-5. 骨髄由来単球および BMc の培養

骨髄細胞をマウスの大腿骨および頸骨から採取し、100 µm のセルストレイナーで濾過した後、RBC Lysis Buffer によって赤血球を除去した。骨髄細胞を、6-well プレート/マウスにて、20% FBS, 20 µM GlutaMAX I, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 20 ng/mL macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) を含む培地中、5% CO₂, 37°C で 2 日間培養することで (Bone marrow-derived monocytes: BMo) を得て、また、6 日間培養することにより BMc を得た。BMo は、10 µM NEt-3IB の存在化あるいは非存在化で誘導した。BMc は 10 µM 9-*cis*-retinoic acid (9-*cis*-RA), 10 µM NEt-3IB, 5 µM carboxyatractyloside の存在下あ

るいは非存在化で誘導した。培養開始後 3 日目に培地を全量交換した。得られた BMc は、100 ng/mL LPS の存在下あるいは非存在下で 24 時間培養し、上清を ELISA に用いた。

2-6. qPCR

FACS により単離した BMo (CD45⁺CD11b⁻Ly6C⁺) の total RNA は RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) を用いて、製品プロトコルに従い抽出した。抽出した total RNA を鋳型として ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (東洋紡) を用いて逆転写反応を行い、cDNA を合成し解析した。PCR は CFX96 リアルタイム PCR 解析システムを使用した。遺伝子発現は *Actb* を内部標準として $\Delta\Delta Ct$ 法により解析した。本研究で使用したプライマーを表 3 に示した。全てのプライマーは Integrated DNA Technologies より購入した。

2-7. ELISA

BMc の培養上清は 4°C, 20,000 × *g* にて 1 分間遠心分離した後上清を回収し、使用するまで -80°C で保存した。IL-10 および TNF- α の濃度は、それぞれ ELISA kits (R&D Systems), ELISA kits (BioLegend) を用いて各製品プロトコルに従い測定した。

2-8. RNA sequencing (RNA-seq)

FACS により単離した BMo (CD45⁺CD11b⁻Ly6C⁺) の total RNA は RNeasy Plus Mini Kit を用いて製品プロトコルに従い抽出した。ライブラリーの作製は Rhelixa に委託した。シーケンシングは Novaseq 6000, 150 bp, ペアエンドで行なわれた。得られたリードは、Trim Galore を用いてトリミングおよびクオリティチェックを行なった。HISAT2 を用いて mouse reference genome sequence (mm10) にマッピングした。StringTie を用いてリードカウントを計算した。EdgeR を用いて発現差異解析を行い、Graphical User Interface for TCC package (<https://infinityloop.shinyapps.io/TCC-GUI/>) を用いてエンリッチメント解析を行なった。

2-9. CUT&RUN

FACS により単離した BMo (CD45⁺CD11b⁻Ly6C⁺) から CUT&RUN Assay Kit (Cell Signaling TECHNOLOGY: CST) を用いて製品プロトコルに従い DNA の抽出を行なった。SimpleChIP ChIP-seq DNA Library Prep Kit for Illumina (CST) を用いて製品プロトコルに従いライブラリーの調整を行なった。以下の抗体を使用した。IgG (CST), RXR α (CST)。シーケンシングは Novaseq 6000, 150 bp, ペアエンドで行なわれた。得られたリードは、Bowtie2 を用いて mm10 にマッピングし、MACS2 を用いてピークコールを行なった。IGV を用いて得ら

れたマッピングデータを可視化した。その後、ClustalW (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>) および JASPAR (<https://jaspar.genereg.net/>) を用いて転写因子候補の特定を行った。

2-10. 統計解析

2 群間の差の統計解析は等分散性が見られた場合には Student's *t*-test を行い、不等分散の場合には Mann-Whitney *U*-test を行った。3 群間以上の差の統計解析には、one-way ANOVA を使用し、有意差が見られた場合には Tukey's test、あるいは、Dunnett's test を行った。全ての統計解析は GraphPad Prism 9 を用いて行った。*P* 値が 0.05 未満の時、有意な差があると判定した。

第3章 結果

3-1. NEt-3IB の投与は DSS 誘導性大腸炎マウスの大腸粘膜固有層における CX₃CR1^{hi} マクロファージを増加させる

大腸移行型 RXR フルアゴニストである NEt-3IB の炎症抑制効果を評価するために、DSS 誘導性大腸炎モデルマウスに NEt-3IB を投与した。2% DSS を飲水投与したところ、体重減少、下痢、血便といった IBD 様症状が観察された。これらの症状を NEt-3IB 投与群と Vehicle 投与群で比較したところ、NEt-3IB 投与群では体重減少が抑制された。同様に、DAI スコアは、NEt-3IB 投与群で有意に改善されていた。体重減少抑制効果について NEt-3IB は RXR パーシャルアゴニストよりも良好な結果が得られた。そこで、以下の実験では本薬剤を用いて、RXR 活性化を介した大腸炎抑制機構の解明を行うこととした。第 1 部の研究結果から、核内受容体 RXR α が大腸の単球に高発現することが明らかとなった⁵³。また、単球の抗炎症性の CX₃CR1^{hi} マクロファージ分化が示唆された。そこで、大腸の単球およびマクロファージについて性状解析を行った。NEt-3IB 投与群では、Vehicle 投与群と比較して有意に CX₃CR1^{hi} マクロファージの全白血球に対する割合が増加していた。さらに、CX₃CR1^{hi} マクロファージの前駆細胞である単球の割合が NEt-3IB 投与群で減少していた。以上の結果から、NEt-3IB は単球の CX₃CR1^{hi} マクロファージへの分化を促進することが示唆された。

3-2. 抗生剤投与による CX₃CR1^{hi} マクロファージの減少は NEt-3IB の投与で回復しない

大腸粘膜固有層に存在する CX₃CR1^{hi} マクロファージは、抗生剤による腸内細菌の除去により減少することが知られている⁵⁷。実際、GF マウスでは SPF マウスと比較して、有意に CX₃CR1^{hi} マクロファージが減少していた。DSS 誘導性大腸炎により CX₃CR1^{hi} マクロファージが減少するが³²、NEt-3IB を投与することで CX₃CR1^{hi} マクロファージが増加したことから、抗生剤投与による腸内細菌の除去で減少した CX₃CR1^{hi} マクロファージを増加させることができるのではないかと考えた。マウスに 5 週間抗生剤カクテルあるいは Vehicle、また、0.015% NEt-3IB 餌あるいはコントロール餌を自由摂取させた。その結果、抗生剤投与群で CX₃CR1^{hi} マクロファージが減少したが、NEt-3IB の処理でその減少は回復しなかった。また、抗生剤非投与群において、NEt-3IB の処理で CX₃CR1^{hi} マクロファージは増加しなかった。単球の割合は全ての群で有意な差は見られず、ほとんど大腸粘膜固有層には存在していなかった。定常状態や抗生剤投与条件下では、CX₃CR1^{hi} マクロファージの前駆細胞である単球が少ないため、NEt-3IB による CX₃CR1^{hi} マクロファージ促進作用が観察できなかったと考えられる。

3-3. BMc において NEt-3IB の処理は CX₃CR1^{hi} マクロファージの誘導を促進する

骨髄細胞は M-CSF の処理によって BMo を経て BMc に分化する⁵⁸。したがって、*in vivo* 同様に NEt-3IB の処理で、CX₃CR1^{hi}マクロファージの誘導を促進することができるのではないかと考えた。骨髄細胞の培養開始と同時に NEt-3IB あるいは内因性 RXR リガンドである 9-*cis*-RA を 6 日間処理した。その結果、NEt-3IB 処理群および 9-*cis*-RA 処理群では Vehicle 群と比較して有意に CX₃CR1^{hi}マクロファージの割合が増加した。また、NEt-3IB 処理群および 9-*cis*-RA 処理群で単球が減少しマクロファージが増加していた。以上の結果から、RXR の活性化は CX₃CR1 の発現に加え、単球からマクロファージへの分化を促進することが示唆された。

定常状態で大腸粘膜固有層のマクロファージは、LPS 刺激に対して炎症性サイトカインである TNF- α を産生せず抗炎症サイトカインである IL-10 を産生する⁵²。また、CX₃CR1^{hi}マクロファージのおよそ 72%が IL-10⁺細胞である³²。一方で、BMc は LPS 刺激に対して TNF- α および IL-10 の両方を産生する⁵²。NEt-3IB を処理した BMc が大腸粘膜固有層と同様な機能を持っているか検証するために、LPS 刺激によるサイトカイン産生を ELISA で解析した。その結果、NEt-3IB 処理群では Vehicle 処理群と比較して、LPS 刺激による TNF- α の産生が抑制され、IL-10 の産生が増加した。LPS 未刺激下においても NEt-3IB の処理群で IL-10 の産生が増加した。以上の結果から、NEt-3IB を処理した BMc は、LPS 刺激に対して炎症抑制的に働く点で大腸のマクロファージと類似していると言える。

3-4. NEt-3IB による CX₃CR1^{hi}マクロファージの誘導促進作用は *Slc25a5* の転写活性化が寄与する

NEt-3IB による CX₃CR1^{hi}マクロファージ誘導促進機構を明らかにするために、NEt-3IB を処理した BMo を単離し、トランスクリプトーム解析を行なった。その結果、120 遺伝子の発現が NEt-3IB の処理で増加していた。それらの遺伝子を用いてエンリッチメント解析を行なったところ、RXR パートナー受容体である LXR シグナルパスウェイが活性化していた。LXR が IL-4 依存的な抗炎症性マクロファージの誘導に寄与することは知られているが⁵⁹、CX₃CR1^{hi}マクロファージとの関連は報告されていない。一方で、マクロファージの細胞内代謝シグナルが酸化的リン酸化優位になることが、大腸での CX₃CR1^{hi}マクロファージの誘導に寄与しているという報告がある⁶⁰。実際、NEt-3IB の処理により、酸化的リン酸化に関わるミトコンドリア遺伝子 *Slc25a5*, *Mull*, *Ip6k2*, *Slc25a19* の発現が増加していた。BMo におけるそれらの遺伝子発現を qPCR で解析すると、NEt-3IB 処理群で *Slc25a5* の発現が Vehicle 処理群と比較して有意に増加していた。一方で、*Mull*, *Ip6k2*, *Slc25a19* の発現に差はなかった。また、CUT&RUN による RXR α ファミリー分子のターゲット候補遺伝子の探索結果からも、NEt-3IB により活性化した RXR α ファミリー分子が *Slc25a5* の 2 ヶ所のプロモーター領域に結合することが明らかになっ

た。それら 2 ヶ所の領域について ClustalW を用いて Multiple sequence alignment を行い、JSPAR を用いて結合する可能性の高い RXR α ファミリー分子を探索した。その結果、PPAR γ 、Nurr1、LXR β が *Slc25a5* のプロモーター領域に結合する可能性が示唆された。

Slc25a5 は ADP/ATP 交換輸送体の Adenine nucleotide translocase 2 (ANT2) をコードする遺伝子である。ANT2 は、細胞質からミトコンドリアマトリックスに ADP を輸送しミトコンドリアマトリックスから細胞質に ATP を輸送することで酸化的リン酸化に寄与する。実際、ANT2 阻害剤である、Carboxyatractyloside (CAT) を BMc に処理すると酸化的リン酸化が阻害される⁶¹。そこで、NEt-3IB による CX₃CR1^{hi} マクロファージの誘導促進に ANT2 が寄与しているかを検証するために、CAT および NEt-3IB 存在下で BMc を培養した。その結果、CAT の処理で NEt-3IB による CX₃CR1^{hi} マクロファージの誘導促進作用が抑制された。また、NEt-3IB 非存在下においても Vehicle 処理群と比較して CAT 処理群で CX₃CR1^{hi} マクロファージが減少していた。単球およびマクロファージにおいては、CAT 処理で単球が減少しマクロファージが増加しており、CAT 処理は NEt-3IB による単球のマクロファージ分化の促進を抑制しなかった。以上の結果から、NEt-3IB による酸化的リン酸化の亢進は CX₃CR1 の発現の促進に寄与するが、単球のマクロファージ分化の促進には寄与しないことが示唆された。

第4章 考察

本研究において、大腸移行型 RXR フルアゴニスト NEt-3IB の経口投与が DSS 誘導性大腸炎を抑制することを示した。また、NEt-3IB が単球の CX₃CR1^{hi} マクロファージの分化を促進することを示した。血液から大腸に浸潤する Ly6C⁺単球は、IL-1β、IL-6、TNF-αなどを活発に産生するが、腸管で CX₃CR1^{hi} マクロファージに分化すると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。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である。DSS 誘導性大腸炎下では定常状態と比較して大量の Ly6C⁺単球が大腸に流入するが、CX₃CR1^{hi} マクロファージの割合と絶対数は減少する³²。マクロファージが炎症型あるいは抗炎症型の性質を獲得することに、細部内代謝プログラムが関係する。細胞内代謝が解糖系にシフトすると炎症型となり⁶²、酸化的リン酸化にシフトすると抗炎症型となる⁶³。DSS 誘導性大腸炎マウスの大腸組織では解糖系に関わる遺伝子の発現が増加することから⁶⁴、炎症型マクロファージに分化しやすい環境であると言える。また、神経軸索におけるガイドランス因子として知られる *Sma6d* の欠損により PPARγ の発現が低下する。PPARγ 標的遺伝子で脂肪酸取り込みを行い酸化的リン酸化に関わる *CD36* の発現が低下することで酸化的リン酸化が抑制されること、IL-4 による抗炎症型マクロファージの誘導が阻害されることが BMc を用いた実験で明らかになっている⁶⁰。また、*Sma6d* 欠損マウスでは定常状態で大腸の CX₃CR1^{hi} マクロファージが減少し、DSS 誘導性大腸炎が増悪する⁶⁰。以上のことから、単球の CX₃CR1^{hi} マクロファージへの分化には細胞内代謝シグナルが酸化的リン酸化にシフトすることが重要である。

骨髄細胞を NEt-3IB 存在下で培養することで BMo において酸化的リン酸化に関わるミトコンドリア遺伝子の *Slc25a5* (ANT2) の発現が増加した。また、NEt-3IB によって CX₃CR1^{hi} マクロファージが増加し、ANT2 阻害剤である CAT によって NEt-3IB による CX₃CR1^{hi} マクロファージ誘導促進作用が抑制された。さらに、*Slc25a5* のプロモーター領域に PPARγ/RXRα, Nurr1/RXRα, LXRβ/RXRα ヘテロダイマーが結合する可能性が示唆された。以上の結果から、NEt-3IB は PPARγ/RXRα, Nurr1/RXRα, LXRβ/RXRα ヘテロダイマーを活性化し、*Slc25a5* の転写活性化を促進することで単球において酸化的リン酸化を亢進し CX₃CR1^{hi} マクロファージの分化誘導を促進することが示唆された。この仮説を検証するために、レポーター遺伝子アッセイを用いて *Slc25a5* の転写活性化に関わるヘテロダイマーを決定する必要がある。また、CAT あるいは NEt-3IB 処理下の各分化段階における細胞内代謝シフトを調べ、どの分化段階における代謝シフトが CX₃CR1^{hi} マクロファージの誘導に重要なのかを特定する必要がある。本研究から、先行研究における PPARγ による *CD36* の転写調節機構に加え、PPARγ/RXRα,

Nurr1/RXR α , LXR β /RXR α による *Slc25a5* の転写調節機構が相加的あるいは相乗的に働くことで、大腸における CX₃CR1^{hi} マクロファージは誘導されている可能性が示唆された。

単球の CX₃CR1^{hi} マクロファージの分化誘導メカニズムは十分に明らかになっていない。マウスに抗生剤を投与し、腸内細菌を除去することで大腸の CX₃CR1^{hi} マクロファージが減少することが報告されている⁵⁷。先行研究と一致して、我々も GF マウスおよび抗生剤投与マウスの大腸で CX₃CR1^{hi} マクロファージが減少することを確認した。したがって、腸内細菌由来の因子に RXR の内因性リガンド(9-*cis*-RA など)が含まれており、単球の CX₃CR1^{hi} マクロファージの分化を促進する可能性がある。今後、大腸組織や糞便中における 9-*cis*-RA 濃度を測定する必要がある。マウスの大腸において CX₃CR1^{hi} マクロファージは胎児期から存在しセルフリニューアルするが、生後、徐々に減少し単球由来の CX₃CR1^{hi} マクロファージに置き換わる^{65,66}。これは、生後に腸内細菌の定着により、大腸において一過性の炎症応答が誘導され Ly6C⁺単球が浸潤するからである。腸内細菌由来の因子を利用して、単球が CX₃CR1^{hi} マクロファージに分化し大腸において過度の炎症応答を抑制することは、大腸の環境を利用した適応機構と考えられる。その適応機構に RXR が寄与することが本研究により示唆された。

本研究結果から、NEt-3IB による DSS 誘導性大腸炎抑制機構に単球の CX₃CR1^{hi} マクロファージ分化の促進が示唆された。また、NEt-3IB はナイーブ CD4⁺ T 細胞移入誘導性大腸炎に対して、T-bet⁺ Th1 細胞における IFN γ の産生を抑制することで大腸炎症状を減弱する⁵⁶。したがって、NEt-3IB は単球・マクロファージおよび T 細胞といった複数の機構を介する新たな IBD 治療薬として期待が持てる。

第5章 表

表 1. DAI スコアの評価基準

Score	Body weight loss	Stool consistency	Occult blood-positive
0	No loss	Normal	Normal
1	1% to 5%	—	—
2	5% to 10%	Loose	Occult blood-positive
3	10% to 20%	—	—
4	Loss of more than 20%	Diarrhea	Gross bleeding

表 2. フローサイトメトリーで使用した抗体

Antibody	Clone	Source
Ant-CD16/32	S17011E	BioLegend
Anti-CD11b	M1/70	Theermo Fisher Scientific
Anti-CD45	30-F11	BioLegend
Anti-CX ₃ CR1	SA011F11	BioLegend
Anti-Ly6C	HK1.4	BD Biosciences

表 3. プライマーリスト

Gene	Sequence	
<i>Actb</i>	Forward	5'-GATCTGGCACCACACCTTCT-3'
	Reverse	5'-GGGGTGTGTAAGGTCTCAAA-3'
<i>Slc25a5</i>	Forward	5'-TTGTCAACCCAGCCCTGT-3'
	Reverse	5'-CAGTCAAGCGTGCCTGTG-3'

<i>Mull</i>	Forward	5'-GGCACCAGTTCGATGGTC-3'
	Reverse	5'-CACACAACACAGGCGCTC-3'
<i>Ip6k2</i>	Forward	5'-GCGATGATGCTTCGGAGGAA-3'
	Reverse	5'-CCGCCTGGTACACCTGCA-3'
<i>Slc25a19</i>	Forward	5'-GGCTACGGAGCTGTCCAA-3'
	Reverse	5'-TTGCGTCCTTCTGCCTTC-3'

参考文献

1. Yamamoto-Furusho, J. K. Genetic factors associated with the development of inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* **13**, 5594 (2007).
2. Molodecky, N. A. & Kaplan, G. G. Environmental risk factors for inflammatory bowel disease. *Gastroenterol. Hepatol. (N. Y.)*. **6**, 339–46 (2010).
3. Reif, S. *et al.* Pre-illness dietary factors in inflammatory bowel disease. *Gut* **40**, 754–760 (1997).
4. John, S. *et al.* Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids and the aetiology of ulcerative colitis: a UK prospective cohort study. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **22**, 602–606 (2010).
5. Chan, S. S. M. *et al.* Association between high dietary intake of the n-3 polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid and reduced risk of Crohn's disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **39**, 834–842 (2014).
6. Cho, J. Y., Chi, S. G. & Chun, H. S. Oral administration of docosahexaenoic acid attenuates colitis induced by dextran sulfate sodium in mice. *Mol. Nutr. Food Res.* **55**, 239–246 (2011).
7. Serhan, C. N., Chiang, N. & Van Dyke, T. E. Resolving inflammation: Dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 349–361 (2008).
8. Schif-Zuck, S. *et al.* Saturated-efferocytosis generates pro-resolving CD11b^{low} macrophages: Modulation by resolvins and glucocorticoids. *Eur. J. Immunol.* **41**, 366–379 (2011).
9. Krishnamoorthy, S. *et al.* Resolvin D1 binds human phagocytes with evidence for proresolving receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 1660–1665 (2010).
10. Lengqvist, J. *et al.* Polyunsaturated Fatty Acids Including Docosahexaenoic and Arachidonic Acid Bind to the Retinoid X Receptor α Ligand-binding Domain. *Mol. Cell. Proteomics* **3**, 692–703 (2004).
11. Dawson, M. I. & Xia, Z. The retinoid X receptors and their ligands. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1821**, 21–56 (2012).
12. Shulman, A. I., Larson, C., Mangelsdorf, D. J. & Ranganathan, R. Structural determinants of allosteric ligand activation in RXR heterodimers. *Cell* **116**, 417–429 (2004).
13. Jakobsson, T. *et al.* The oxysterol receptor LXR β protects against DSS- and TNBS-induced colitis in mice. *Mucosal Immunol.* **7**, 1416–1428 (2014).
14. Desreumaux, P. *et al.* Attenuation of colon inflammation through activators of the retinoid X receptor (RXR)/peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) heterodimer: A basis for new therapeutic strategies. *J. Exp. Med.* **193**, 827–838 (2001).

15. Hamers, A. A. J. *et al.* Deficiency of nuclear receptor Nur77 aggravates mouse experimental colitis by increased NF κ B activity in macrophages. *PLoS One* **10**, 1–22 (2015).
16. Kakuta, H. *et al.* RXR partial agonist CBT-PMN exerts therapeutic effects on type 2 diabetes without the side effects of RXR full agonists. *ACS Med. Chem. Lett.* **3**, 427–432 (2012).
17. Katada, K. *et al.* Dextran sulfate sodium-induced acute colonic inflammation in angiotensin II type 1a receptor deficient mice. *Inflamm. Res.* **57**, 84–91 (2008).
18. Suzuki, K. *et al.* Intestinal epithelial cell-specific deletion of α -mannosidase II ameliorates experimental colitis. *Cell Struct. Funct.* **39**, 25–39 (2018).
19. Rogler, G. & Andus, T. Cytokines in inflammatory bowel disease. *World J. Surg.* **22**, 382–389 (1998).
20. Perše, M. & Cerar, A. Dextran sodium sulphate colitis mouse model: Traps and tricks. *J. Biomed. Biotechnol.* **2012**, 1–13 (2012).
21. Sadik, C. D., Kim, N. D. & Luster, A. D. Neutrophils cascading their way to inflammation. *Trends Immunol.* **32**, 452–460 (2011).
22. Zigmund, E. *et al.* Ly6C^{hi} Monocytes in the Inflamed Colon Give Rise to Proinflammatory Effector Cells and Migratory Antigen-Presenting Cells. *Immunity* **37**, 1076–1090 (2012).
23. Fujino, S. *et al.* Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut* **52**, 65–70 (2003).
24. Zhang, H. L. *et al.* Regulatory T-cell depletion in the gut caused by integrin β 7 deficiency exacerbates DSS colitis by evoking aberrant innate immunity. *Mucosal Immunol.* **9**, 391–400 (2016).
25. Acharya, S. *et al.* Amelioration of Experimental autoimmune encephalomyelitis and DSS induced colitis by NTG-A-009 through the inhibition of Th1 and Th17 cells differentiation. *Sci. Rep.* **8**, 1–15 (2018).
26. Fischer, A. *et al.* Adalimumab prevents barrier dysfunction and antagonizes distinct effects of TNF- α on tight junction proteins and signaling pathways in intestinal epithelial cells. *AJP Gastrointest. Liver Physiol.* **304**, G970–G979 (2013).
27. Ding, X. *et al.* SLC26A3 (DRA) prevents TNF- α -induced barrier dysfunction and dextran sulfate sodium-induced acute colitis. *Lab. Investig.* **98**, 462–476 (2018).
28. Baker, O. J. *et al.* Proinflammatory cytokines tumor necrosis factor- α and interferon- γ alter tight junction structure and function in the rat parotid gland Par-C10 cell line. *Am. J. Physiol. Physiol.* **295**, C1191–C1201 (2008).

29. Ye, D., Ma, I. & Ma, T. Y. Molecular mechanism of tumor necrosis factor- α modulation of intestinal epithelial tight junction barrier. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* **290**, G496–G504 (2006).
30. Weber, C. R., Nalle, S. C., Tretiakova, M., Rubin, D. T. & Turner, J. R. Claudin-1 and claudin-2 expression is elevated in inflammatory bowel disease and may contribute to early neoplastic transformation. *Lab. Investig.* **88**, 1110–1120 (2008).
31. Su, L. *et al.* TNFR2 activates mlck-dependent tight junction dysregulation to cause apoptosis-mediated barrier loss and experimental colitis. *Gastroenterology* **145**, 407–415 (2013).
32. Bain, C. C. *et al.* Resident and pro-inflammatory macrophages in the colon represent alternative context-dependent fates of the same Ly6Chi monocyte precursors. *Mucosal Immunol.* **6**, 498–510 (2013).
33. Xiao, Y.-T., Yan, W.-H., Cao, Y., Yan, J.-K. & Cai, W. Neutralization of IL-6 and TNF- α ameliorates intestinal permeability in DSS-induced colitis. *Cytokine* **83**, 189–192 (2016).
34. Wang, L. *et al.* IL-6 Induces NF- κ B Activation in the Intestinal Epithelia. *J. Immunol.* **171**, 3194–3201 (2003).
35. Schreiber, S. *et al.* Absence of efficacy of subcutaneous antisense ICAM-1 treatment of chronic active Crohn's disease. *Gastroenterology* **120**, 1339–1346 (2001).
36. Suzuki, A. *et al.* Cis3/Socs3/Ssi3 Plays a Negative Regulatory Role in Stat3 Activation and Intestinal Inflammation. *J. Exp. Med.* **193**, 471–482 (2001).
37. Ślebioda, T. J. & Kmiec, Z. Tumour Necrosis Factor Superfamily Members in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *Mediators Inflamm.* **2014**, 1–15 (2014).
38. Steinert, A. *et al.* The Stimulation of Macrophages with TLR Ligands Supports Increased IL-19 Expression in Inflammatory Bowel Disease Patients and in Colitis Models. *J. Immunol.* **199**, 2570–2584 (2017).
39. Zhao, C. *et al.* Cellular Stress Amplifies TLR3/4-Induced CXCL1/2 Gene Transcription in Mononuclear Phagocytes via RIPK1. *J. Immunol.* **193**, 879–888 (2014).
40. De Plaen, I. G. *et al.* Lipopolysaccharide induces CXCL2/macrophage inflammatory protein-2 gene expression in enterocytes via NF- κ B activation: Independence from endogenous TNF- α and platelet-activating factor. *Immunology* **118**, 153–163 (2006).
41. Dou, X., Xiao, J., Jin, Z. & Zheng, P. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ is downregulated in ulcerative colitis and is involved in experimental colitis-associated neoplasia. *Oncol. Lett.* **10**, 1259–1266 (2015).
42. Katayama, K. *et al.* A novel PPAR γ gene therapy to control inflammation associated with inflammatory bowel disease in a murine model. *Gastroenterology* **124**, 1315–1324 (2003).

43. Takata, Y. *et al.* PPAR δ -mediated antiinflammatory mechanisms inhibit angiotensin II-accelerated atherosclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 4277–4282 (2008).
44. Yu, R. Y. L. *et al.* BCL-6 negatively regulates macrophage proliferation by suppressing autocrine IL-6 production. *Blood* **105**, 1777–1784 (2005).
45. Diatchenko, L. *et al.* Identification of novel mediators of NF-kappaB through genome-wide survey of monocyte adherence-induced genes. *J. Leukoc. Biol.* **78**, 1366–77 (2005).
46. Bonta, P. I. *et al.* Nuclear Receptors Nur77, Nurr1, and NOR-1 Expressed in Atherosclerotic Lesion Macrophages Reduce Lipid Loading and Inflammatory Responses. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **26**, 2288–2288 (2006).
47. Naganuma, M. *et al.* Measurement of colonic mucosal concentrations of 5-aminosalicylic acid is useful for estimating its therapeutic efficacy in distal ulcerative colitis: Comparison of orally administered mesalamine and sulfasalazine. *Inflamm. Bowel Dis.* **7**, 221–225 (2001).
48. Oppenheim, J. J., Biragyn, a., Kwak, L. W. & Yang, D. Roles of antimicrobial peptides such as defensins in innate and adaptive. *immunity. Ann. Rheum. Dis.* **62**, ii17–ii21 (2003).
49. Kurotaki, D., Sasaki, H. & Tamura, T. Transcriptional control of monocyte and macrophage development. *Int. Immunol.* **29**, 97–107 (2017).
50. Kohyama, M. *et al.* Role for Spi-C in the development of red pulp macrophages and splenic iron homeostasis. *Nature* **457**, 318–321 (2009).
51. Haldar, M. *et al.* Heme-mediated SPI-C induction promotes monocyte differentiation into iron-recycling macrophages. *Cell* **156**, 1223–1234 (2014).
52. Ueda, Y. *et al.* Commensal microbiota induce LPS hyporesponsiveness in colonic macrophages via the production of IL-10. *Int. Immunol.* **22**, 953–962 (2010).
53. Onuki, M. *et al.* A partial agonist for retinoid X receptor mitigates experimental colitis. *Int. Immunol.* **31**, 251–262 (2018).
54. Takamatsu, K. *et al.* The first potent subtype-selective retinoid X receptor (RXR) agonist possessing a 3-isopropoxy-4-isopropylphenylamino moiety, NEt-3IP (RXR α / β -dual agonist). *ChemMedChem* **3**, 780–787 (2008).
55. Kobayashi, T. *et al.* Positron emission tomography to elucidate pharmacokinetic differences of regioisomeric retinoid x receptor agonists. *ACS Med. Chem. Lett.* **6**, 334–338 (2015).
56. Matsumoto, R. *et al.* A Retinoid X Receptor Agonist Directed to the Large Intestine Ameliorates T-Cell-Mediated Colitis in Mice. *Front. Pharmacol.* **12**, 1–11 (2021).
57. Honda, M. *et al.* Perivascular localization of macrophages in the intestinal mucosa is regulated by Nr4a1 and the microbiome. *Nat. Commun.* **11**, 1329 (2020).

58. Francke, A., Herold, J., Weinert, S., Strasser, R. H. & Braun-Dullaeus, R. C. Generation of mature murine monocytes from heterogeneous bone marrow and description of their properties. *J. Histochem. Cytochem.* **59**, 813–825 (2011).
59. Kimura, T. *et al.* Polarization of M2 macrophages requires Lamtor1 that integrates cytokine and amino-acid signals. *Nat. Commun.* **7**, 1–15 (2016).
60. Kang, S. *et al.* Semaphorin 6D reverse signaling controls macrophage lipid metabolism and anti-inflammatory polarization. *Nat. Immunol.* **19**, 561–570 (2018).
61. Divakaruni, A. S. *et al.* Etomoxir Inhibits Macrophage Polarization by Disrupting CoA Homeostasis. *Cell Metab.* **28**, 490-503.e7 (2018).
62. Wang, T. *et al.* HIF1 α -Induced Glycolysis Metabolism Is Essential to the Activation of Inflammatory Macrophages. *Mediators Inflamm.* **2017**, 1–10 (2017).
63. Huang, S. C. C. *et al.* Cell-intrinsic lysosomal lipolysis is essential for alternative activation of macrophages. *Nat. Immunol.* **15**, 846–855 (2014).
64. Qu, D. *et al.* Chronic inflammation confers to the metabolic reprogramming associated with tumorigenesis of colorectal cancer. *Cancer Biol. Ther.* **18**, 237–244 (2017).
65. Bain, C. C. *et al.* Constant replenishment from circulating monocytes maintains the macrophage pool in the intestine of adult mice. *Nat. Immunol.* **15**, 929–37 (2014).
66. De Schepper, S. *et al.* Self-Maintaining Gut Macrophages Are Essential for Intestinal Homeostasis. *Cell* **175**, 400-415.e13 (2018).

謝辞

本研究を進めるにあたり、研究全般に渡って直接指導賜った慶應義塾大学薬学部 長谷耕二教授、大橋若奈特任講師、アステラス製薬株式会社 鈴木功一郎博士に深く感謝致します。

本研究を進めるにあたりご指導賜りました慶應義塾大学薬学部 木村俊介准教授、高橋大輔専任講師に深く感謝いたします。また、実験や解析においてご協力して下さいました岡山大学医歯薬総合研究科 加来田博貴准教授、渡邊将貴博士、藤原美智子様、東緑様、興和株式会社 芝原理様、慶應義塾大学薬学部 石原成美様、山田恭央特任助教、藤村由美子様、佐伯愛子様、日本大学医学部 槇島誠教授、沖縄科学技術大学院 廣田雅人様、大塚製薬株式会社 滝澤慧様、富山県立大学工学部 古澤之裕准教授に深く感謝致します。

諸々お世話になっている慶應義塾大学薬学部生化学講座、創薬研究センターの方々に感謝致します。本研究の遂行中、日本免疫学会「きぼうプロジェクト」より経済的な支援をいただきました。日本免疫学会関係者の方々に深く感謝致します。最後に、どんな時も私を支えてくれた両親に感謝致します。