博士論文

インドール化合物 Mitochonic acid-35（MA-35）は TNF-α、TGF-β_1シグナル伝達機構を阻害し、腸炎関連大腸癌と腸管線維化を抑制する

東北大学大学院医学系研究科医科学専攻
外科病態学講座　消化器外科学分野
金原　圭吾

目次

略語	p.3
第Ⅰ章　要約	p.6
第Ⅱ章　研究背景	p.8
第Ⅲ章　研究目的	p.12
第Ⅳ章　研究方法	p.13
第Ⅴ章　研究結果	p.22
第Ⅵ章　考察	p.27
第Ⅶ章　結論	p.32
第Ⅷ章　謝辞	p.33
第Ⅸ章　参考文献	p.34
第Ⅹ章　図説、図表	p.43

略語

Acta2：Actin, alpha 2

ALT：Alanine transaminase

AOM：Azoxymethane

AST：Aspartate aminotransferase

BUN：Blood urea nitrogen

CAC：Colitis-associated cancer

CD：Crohn’s disease

CD68：Cluster of differentiation 68

COX-2：Cyclooxygenase-2

DAI：Disease activity index

DMEM：Dulbecco’s Modified Eagle Medium

DMSO：Dimethyl sulfoxide

DSS：Dextran sodium sulfate

FBS：Fetal bovine serum

Fn1：Fibronectin 1

Glu：Glucose

Hb：Hemoglobin

H-E：Hematoxylin and eosin

1 Ht：Hematocrit

2 IBD：Inflammatory bowel disease

3 iCa：ionized calcium

4 IκB：Inhibitor of kappa B

5 IKK：I kappa B kinase

6 IL：Interleukin

7 iNOS：inducible nitric oxide synthase

8 LPS：Lipopolysaccharide

9 MA-35：Mitochonic acid-35

10 MCP-1：Monocyte chemotactic protein-1

11 MSI：Microsatellite instability

12 MSS：Microsatellite stable

13 NF-κB：Nuclear factor-kappa B

14 PS：Penicillin-streptomycin

15 RIPA：Radio-Immunoprecipitation Assay

16 tCO2：total carbon dioxide

17 TGF-β_1：Transforming growth factor-β1

18 TGFBR：Transforming growth factor-β receptor

19 TNBS：2,4,6- trinitrobenezene sulfonic acid

20 TNF-α：Tumor necrosis factor-α

UC：Ulcerative colitis

第 I 章　要約

炎症性腸疾患（Inflammatory bowel disease：IBD）では、慢性的な炎症により腸炎関連大腸癌（Colitis-associated cancer：CAC）を合併することがあり、生命予後に大きく関与する。また、炎症の結果生じる腸管線維化も、IBD における重要な課題の一つであり、有効な治療法がないのが現状である。CAC の進展には TNF-αが、腸管線維化には TGF-β_1 が関与すると報告されている。当大学腎・高血圧・内分泌科　阿部高明先生はインドール類似誘導体の化合物ライブラリーをスクリーニングし、TNF-α阻害作用をもつ新規化合物 Mitochonic acid-35（MA-35）を同定し、報告してきた。MA-35 は TNF-αシグナル伝達機構、TGF-β_1 シグナル伝達機構を抑制することで、腎の炎症および線維化を防ぐことが報告されている。

本研究では、腸炎関連大腸癌モデルであるアゾキシメタン（Azoxymethane：AOM）/デキストラン硫酸ナトリウム（Dextran sodium sulfate：DSS）モデルマウスを用いて、MA-35 が腫瘍形成抑制作用と抗線維化作用を示すかにつき検討した。

AOM/DSS モデルマウスに 70 日間、24 時間毎に MA-35 10 mg/kg を経口投与した。AOM/DSS 群と AOM/DSS+MA-35 群を比較すると、最終的な生存率は AOM/DSS+MA-35 群で有意に高値であった。2 群間に体重減少に違いはなかったが、疾患活動性指標である DAI スコアは、AOM/DSS 群と比べ、第 2、8 週において AOM/DSS+MA-35 群で有意に改善した。安楽死処置時の血中 Hb、Ht については、AOM/DSS 群では Control 群と比較し有意に低下したが、AOM/DSS+MA-35 群は

AOM/DSS 群より有意に高値であり、下血を抑制したと考えられた。腸管長については、AOM/DSS 群では Control 群と比べ短縮したが、MA-35 投与により短縮は有意に抑制された。腸管内腔の発癌を確認すると、Control 群では発癌は認めなかったが、AOM/DSS を投与したマウス全てに発癌を認めた。全大腸面積に占める腫瘍面積の割合は、AOM/DSS 群で高値であったが、MA-35 投与により腫瘍面積は有意に減少し、また直径 2 mm 以上の腫瘍の個数についても同様に、AOM/DSS+MA-35 群で有意に少なく、腫瘍形成は抑制された。病理学的には遠位結腸の癌部において炎症細胞の浸潤や細胞異型・構造異型に違いは認めなかったが、中位結腸から近位結腸においてMA-35 投与により炎症および線維化が抑制された。遠位結腸の癌部、中位結腸の異形成部、近位結腸の正常部において、炎症関連遺伝子（Tumor necrosis factor-α：*Tnfa*、Interleukin-6：*Il6*、Monocyte chemotactic protein-1：MCP-1/*Ccl2*、Cluster of differentiation 68：*Cd68*）と線維化関連遺伝子（Transforming growth factor beta 1：*Tgfb1*、Fibronectin 1：*Fn1*）を定量 PCR にて測定したところ、中位結腸異形成部において、AOM/DSS+MA-35 群は AOM/DSS 群と比べ、*Tnfa* mRNA 発現が抑制される傾向にあり、また *IL-6*、*Tgfb1*、*Fn1* mRNA 発現は有意に抑制されており、異形成部における炎症および線維化を抑制した。近位結腸正常部、遠位結腸癌部では各遺伝子の発現に違いは認めなかった。

以上より、MA-35 は異形成から癌に進展する過程において、腸炎関連大腸癌と腸管の線維化を抑制することで生命予後が改善する可能性が示唆され、IBD における新規治療薬になりうると考えられた。

第Ⅱ章　研究背景

炎症性腸疾患（Inflammatory bowel disease：IBD）は原因不明の慢性非特異性腸炎であり、主な病型として潰瘍性大腸炎（Ulcerative colitis：UC）とクローン病（Crohn's disease：CD）がある。これらの長期的な慢性炎症により発癌が促されることを、腸炎関連大腸癌（Colitis-associated cancer : CAC）と呼び、UC では主な死亡原因となっている[1)]。IBD 発症後 30 年での累積癌発症率は、UC では 18%、CD では 8.3%に及び、IBD における重要な課題である[1-3)]。IBD の詳細な病態は未だ不明であるが、炎症が CAC 発症の主要な原因の一つであり、発癌を促し進展していくと考えられている[4)]。炎症により傷害を受けた上皮と粘膜内の免疫細胞が、CAC の病因に重要な役割を担っている[5-7)]。免疫細胞から産生される炎症性サイトカインの Tumor necrosis factor-α（TNF-α）や Interleukin-6（IL-6）を介する Nuclear factor-kappa B（NF-κB）が、炎症の過程での主要な因子であり[8-10)]、永続的な NF-κBの活性化が CAC の進展に関与している[11)]。一般的に炎症が起こると、マクロファージから放出された TNF-αは、細胞表面の TNF-α受容体に結合し、I kappa B kinase（IKK）-α、IKK-βからなる IKK 複合体をリン酸化する。これにより IKK が活性化されると、阻害蛋白質 inhibitor of kappa B（IκB）をリン酸化し、IκB を分解することで NF-κB が阻害蛋白質から遊離し、核内へ移行・活性化され、TNF-α、MCP-1、IL-6 などの様々な炎症関連遺伝子の発現が増加する[12)]。この産生された TNF-αは、IKK/NF-κB シグナルを活性化し、ポジティブフィードバックを形成する[13)]。また、炎症の他に NF-κB は

細胞増殖にも関与しており、抗アポトーシス因子の産生を介して、アポトーシスを制御している。CAC の動物モデルとして、発癌物質であるアゾキシメタン（Azoxymethane : AOM）と炎症誘発剤であるデキストラン硫酸ナトリウム（Dextran sulfate sodium : DSS）を組み合わせて作成する AOM/DSS モデルマウスが広く知られているが [14, 15]、このモデルマウスにおいて、大腸上皮細胞の IKK-β遺伝子を欠失すると、上皮細胞のアポトーシスが増加し、CAC の発症が抑制される一方、骨髄細胞で IKK-β遺伝子を欠失すると、IL-6 などの炎症性サイトカインが抑制され、CAC の発症を抑制した [9]。また、その他の報告では、TNF-αを抑制することで、CAC の発症の抑制を認めた [16-19]。以上より、TNF-αを介する NF-κB の活性化が CAC の発症に重要であり、この TNF-αシグナル伝達経路を、可能な限り早期に抑制することが、CAC を回避する有効な手段であると考えられる。

また、IBD 患者においては腸管線維化により重篤な合併症が引き起こされる。炎症の結果、腸管線維化が進行すると腸管狭窄、臓器機能不全に陥る。現状、腸管線維化に対する有効な内科的治療薬はなく、手術を繰り返すことを余儀なくされるため、腸管線維化も IBD における重要な課題である [20-22]。腸管線維化には特に TGF-β_1が関与し [23, 24]、そのシグナル伝達は細胞内蛋白質である Smad により仲介される。一般的に、TGF-β_1 は細胞表面の TGF-β受容体に結合し、Smad2/3 をリン酸化する。リン酸化された Smad3（Ser423/425）は、Smad4 と 3 量体を形成後に核内へ移行し、目的遺伝子の転写を促進する [25]。この TGF-β_1/Smad3 シグナル伝達が、線維化の促進に特に重要とされている [25]。

現在、IBD 患者の代表的な治療薬として、副腎皮質ステロイドや 5-アミノサリチル酸製剤の他、ステロイド抵抗性や中等症以上の慢性炎症の場合にはインフリキシマブ、アダリムマブやエタネルセプトなどの抗 TNF-αモノクローナル抗体が臨床応用されている。抗 TNF-a 抗体は腸管粘膜の可溶性、膜結合型 TNF-αの中和作用により、腸管粘膜の回復、維持作用を有し[26]、有効な治療成績を示しているが、副作用として感染症と発癌のリスクが危惧されている[27]。一方、AOM/DSS モデルマウスにおいて、抗 TNF-α抗体は CAC の発症を抑制し[17, 28]、過去の大規模コホート研究では、短期間での抗 TNF-α抗体単独投与は発癌のリスクはないと報告された[29]が、長期での解析はまだなく、未だ controversial であり、TNF-α抑制薬のさらなる研究が必要である。

東北大学腎・高血圧・内分泌科　阿部高明先生はインドール類似誘導体の化合物ライブラリーの中から抗 TNF-α活性を示す誘導体をスクリーニングし、その中で最も強力な抗 TNF-α作用を示す Mitochonic acid-35（MA-35）を見出した。MA-35 は IKK のリン酸化を抑制することで TNF-αシグナル伝達機構を抑制し、マウスの肝・腎の炎症を改善した。加えて、Smad3 のリン酸化を抑制し、TGF-β_1 シグナル伝達機構を抑制することで腎の線維化を抑制した。このように MA-35 は TNF-α、TGF-β_1 両シグナル伝達機構を抑制することで、炎症および線維化を抑制することが示された[30]。

前述の通り、CAC の発症、進展には TNF-αが、腸管の線維化には TGF-β_1 が重要である。近年の報告では、TNF-α抑制薬として血糖降下薬のメトホルミン（1, 1-

dimethylbiguanide）[31]やベタニン[32]などが CAC 発症を抑制し、また、TGF-β_1抑制薬としてピルフェニドン[33]などが腸管線維化を抑制したが、臨床応用には至っておらず、また、これまでに AOM/DSS モデルマウスにおいて、TNF-αおよび TGF-β_1の両シグナル伝達を直接作用し、CAC の発症と腸管線維化を抑制した報告はない。MA-35 は TNF-αシグナル伝達と TGF-β_1 シグナル伝達に対する直接の阻害作用を持ち、経口投与で十分に作用する特性を持つため、CAC の進展と腸管線維化を抑制する新規治療薬になりうると考えられた。しかし、これまで MA-35 が CAC と腸管線維化に与える影響について解析されたことはない。

第Ⅲ章　研究目的

TNF-αシグナル伝達と TGF-β_1 シグナル伝達阻害作用を持つインドール化合物 MA-35 による腸炎関連大腸癌および腸管線維化の抑制効果を、腸炎関連大腸癌モデルである AOM/DSS モデルマウスを用いて検討する。

第Ⅳ章　研究方法

インドール化合物 Mitochonic acid-35 の化学名は 5-(3,5-dimethoxybenzyloxy)-3-indoleacetic acid であり、以下 MA-35 と記載した。細胞実験における MA-35 は 100%（w/v）Dimethyl sulfoxide（DMSO、Nacalai Tesque、Kyoto、Japan、#09659-14）に溶解し使用した。

1　細胞培養

ヒト大腸癌細胞株 HCT 116 細胞、HT-29 細胞（American Type Culture Collection：ATCC、Manassas、VA）を用いて、本研究を行った。HCT 116 細胞には 10%（v/v）fetal bovine serum（FBS、Biowest、Riverside、MO、#S1820）と 1%（v/v）penicillin-streptomycin（PS、Thermo Fisher Science、Saint Lois、MO、#15140122）を添加した Dulbecco’s Modified Eagle Medium（DMEM、Sigma-Aldrich、Saint Louis、MO、#D5671）を使用した。HT-29 細胞には 10%（v/v） FBS、1%（v/v）PS を添加した McCoy’s 5A medium（Thermo Fisher Scientific、#16600082）を使用した。これらの細胞は 37℃、5% CO_2、20% O_2 条件下（以下、通常条件下）にて培養と継代を行った。

2　腸炎関連大腸癌モデルマウスの作成と MA-35 の投与

全ての動物実験は、「東北大学における動物実験等に関する規定」に従い（承認番号：2017 医勤-251）実施した。MA-35 は当大学腎・高血圧・内分泌科　阿部高明先

生から供与頂き、本実験に使用した。腸炎関連大腸癌モデルマウスはアゾキシメタン（Azoxymethane：AOM、Wako、Tokyo、Japan、#011-20171）とデキストラン硫酸ナトリウム（Dextran Sulfate Sodium : DSS、MP Biomedicals、Cleveland、OH、#160110）を用いて作成した。まず 5 週齢雄性 ICR マウス（CLEA Japan、Tokyo、Japan）を 1 週間、順化飼育した。6 週齢時にマウスを無作為に Control 群（n=8）、AOM/DSS 群（n=8）、AOM/DSS+MA-35 群（n=8）に群分けした（**図 1A**）。AOM/DSS 投与群には 6 週齢時に AOM（10 mg/kg body weight）を腹腔内に投与し、その 7 日後より 1 週間 2.5%（w/v）DSS を自由飲水させ、その後 14 日間水道水を自由飲水させた。この DSS の投与を 3 サイクル行い、腸炎関連大腸癌モデルマウスを作成した。さらに AOM/DSS+MA-35 群には生理食塩水に懸濁した MA-35（10mg/kg body weight）を、Control 群、AOM/DSS 群には生理食塩水を、テフロン製経口チューブを用いて 24 時間毎に 70 日間、連日経口投与した。

　マウスは 3 サイクル目が終了した直後に、頸椎脱臼またはペントバルビタール腹腔内過剰投与による安楽死処置を行い、心臓血と大腸を採取した。人道的エンドポイントとしては、後述の Disease activity index（DAI）スコアを参考に、5 日間で 20%以上の体重減少、摂餌・飲水困難、下血等の症状に回復の兆しが認められない場合には、上記の安楽死処置を行うこととし、安楽死処置を施した日を生存曲線に記録した。採取した大腸は外観を写真に撮影し、大腸の長さを測定した。その後、大腸を長軸方向に切り開き写真を撮影した後に、さらに長軸方向に二分割した。片側を PCR 用組織、もう片側を病理用組織とした。PCR 用組織は実体顕微鏡を用いて近位

結腸の正常部、中位結腸の異形成部、遠位結腸の癌部をそれぞれ採取した[34)]。採血は少量のヘパリン処理をしたシリンジを用いて採取し、i-STAT（Fuso Pharmaceutical Industries、Osaka、Japan）にて Na、K、Cl、ionized Ca（iCa）、Total CO2、blood urea nitrogen（BUN）、hematocrit（Ht）、hemoglobin（Hb）を測定した。残余血液サンプルは 4℃、12,000 rpm で 10 分間、遠心分離した。血漿サンプル中の Aspartate aminotransferase（AST）は Fuji DRI-CHEM SLIDE GOT/AST-PIII（Fujifilm、Tokyo、Japan）を、Alanine transaminase（ALT）は Fuji DRI-CHEM SLIDE GPT/ALT-PIII（Fujifilm）を使用し、添付文書に従い測定した。

3　疾患活動性評価（Disease Activity Index score：DAI score）

マウスは週に 2 回、体重および便性状、下血について評価した。疾患活動性はこれらの指標から算出した。これを DAI スコアとして、過去の論文を参考に以下の項目をそれぞれスコアリングした[35)]。：体重減少（5%未満の減少または増加＝0；5%以上 10%未満の減少＝1；10%以上 15%未満の減少＝2；15%以上 20%未満の減少＝3；20%以上の減少＝4）、便性状（普通便＝0；軟便＝2；水様便＝4）、下血（茶色便＝0；赤みがかった便＝2；下血あり＝4）。DAI スコアはこれら 3 つの項目の点数を合計した値であり、 0（健康）から 12（劇症）までの範囲で算出される。

4　全大腸に占める大腸癌の面積の計算

安楽死処置後、大腸には癌を含むと思われる隆起性病変を肉眼的に認めた。切り

開いた大腸は全て写真に撮影し、隆起性病変の面積と全大腸面積を NIH Image J version 1.51（U. S. National Institutes of Health、MD、http://imagej.nih.gov/ij/index.html）にて測定した。全大腸に占める大腸癌の面積の計算式は、隆起性病変面積/全大腸面積 ×100 とし、算出した。

5　組織学的解析

　大腸は 10%中性緩衝ホルマリン溶液（Wako、Osaka、Japan、#062-01661）で固定し、パラフィン包埋処理後に 3 μm に薄切し、切片を作成した。切片はキシレン、エタノールにて脱パラフィン処理を行った。大腸組織の障害度を評価するために、ヘマトキシリン・エオジン（hematoxylin and eosin、H-E）染色を行った。過去の論文を参考に、以下の項目について組織学的炎症スコアリングを行った[36, 37]。組織学的炎症スコアは以下の合計値とした: ①腸陰窩のゆがみ（正常＝0 ; 腸陰窩の減少を伴う腸陰窩の激しいゆがみ＝3）、②炎症細胞浸潤の程度（正常＝0;炎症細胞の密集＝3）、③筋層の肥厚（腸陰窩の基部が粘膜筋板に位置する＝0 ; 著しい筋層の肥厚が存在＝3）、④杯細胞の減少（なし＝0 ; あり＝3）、⑤腸陰窩膿瘍の存在（なし＝0 ; あり＝3）。病理学的炎症の評価は、遠位結腸または中位結腸から近位結腸で行い、200 倍の倍率でランダムに 5 枚のスライドを選び、各項目について評価し、最大値を比較した。また、大腸の線維化を評価するために、マッソントリクローム（Masson’s Trichrome）染色を行った。中位結腸から近位結腸において、200 倍の倍率でランダムに撮影した 5 枚のスライドを Image J にて陽性面積を計算し、平均値を算出した。

6　ヒト大腸癌細胞株 HCT 116 への TNF-α、MA-35 添加実験

6-1　TNF-α添加後のリン酸化蛋白発現の時間変化の検討

HCT 116 細胞を 6 ウェルプレートに通常条件下に培養し、70～80%コンフルエントで 24 時間、無血清培地で培養した。次に recombinant human TNF-α（10 ng/mL、PeproTech、NJ、#300-01A）または溶媒対照として水を添加し、5 分後、15 分後、30 分後、60 分後に PhosSTOP（Roche、Basel、Switzerland、#04906845001）を加えた Radio-Immunoprecipitation Assay（RIPA）Buffer（Wako、Osaka、Japan、#182-02451）を用いて細胞を溶解した。IKK のリン酸化蛋白の発現量をウェスタンブロッティングにて評価した。

6-2　TNF-α添加後のリン酸化蛋白発現増加に対する MA-35 の効果の検討

HCT 116 細胞を、前述のように無血清培地で培養した後、MA-35（10 µM、30 µM、50 µM）または DMSO を 1 時間添加した。次に recombinant human TNF-α（10 ng/mL）または水を添加し 30 分後に PhosSTOP を加えた RIPA Buffer を用いて細胞を溶解した。同様に IKK のリン酸化蛋白の発現量をウェスタンブロッティングにて評価した。

7　ヒト大腸癌細胞株 HCT 116 細胞、HT-29 細胞への TGF-β_1、MA-35 添加実験

7-1　TGF-β_1 添加後のリン酸化蛋白発現の時間変化の検討

TNF-α添加後のリン酸化蛋白発現の検討と同様に、HCT 116 細胞に TGF-β_1 を添加したが p-Smad3 の発現が見られなかったため、ヒト大腸癌細胞株 HT-29 細胞に変更し、検討した。無血清培地で培養した後に recombinant human TGF-β_1（10 ng/mL、PeproTech、#100-21C）または水を添加し、5 分後、15 分後、30 分後、60 分後、120 分後に PhosSTOP を加えた RIPA Buffer を用いて細胞を溶解した。Smad3 のリン酸化蛋白の発現量をウェスタンブロッティングにて評価した。

7-2　TGF-β_1 添加後のリン酸化蛋白発現増加に対する MA-35 の効果の検討

HT-29 細胞を無血清培地で培養した後、MA-35（10 μM、30 μM、50 μM）または DMSO を 1 時間添加した。次に recombinant human TGF-β_1（10 ng/mL）または水を添加し、120 分後に RIPA Buffer を用いて細胞を溶解した。同様に Smad3 のリン酸化蛋白の発現量をウェスタンブロッティングにて評価した。

8　ウェスタンブロッティング

ヒト大腸癌細胞株 HCT 116 細胞または HT-29 細胞を、氷冷した PBS で 2 回洗浄後に PhosSTOP を加えた RIPA Buffer 100 μL を用いて細胞を溶解した。細胞溶解液を 4℃、15000 rpm で 30 分間遠心し、得られた上清中の蛋白質を回収した。回収した溶液 10 μL を使用し、Pierce BCA Protein Assay Reagent A 液と Pierce BCA Protein Assay Reagent B 液の混合液（A 液：B 液=50：1）（Thermo Fisher Scientific、#23227）を 200 μL 混合して、37℃で 30 分間加温後に NanoDrop2000（Thermo Fisher Scientific）

を用いて吸光度（A562）を測定した。測定した吸光度をもとに 4× Laemmli Sample Buffer（Bio-Rad、Hercules、CA、#1610747）、10× NuPAGE Sample Reducing Agent（Thermo Fisher Scientific、#NP0009）、蒸留水にて蛋白質濃度が 1 mg/mL となるように調整を行った後に、95℃で 5 分間加熱変性した。各サンプルを 10× Tris/Glycine/SDS Buffer（Bio-Rad、#161-0732）に浸したポリアクリルゲルの Mini-PROTEAN TGX Precast Gels（Bio-Rad、#456-1085）のウェルに等量ずつ注入して、200 V で電気泳動を行った。電気泳動後、Trans-Blot Turbo Transfer System（Bio-Rad）を用いて、Trans-Blot Turbo Transfer Pack（Bio-Rad、#1704156）のメンブレンに 2.5 A、25 V で 3 分間の条件で転写した。転写後、リン酸化蛋白には Phosphobloker Blocking Reagent（Cell Biolabs、San Diego、CA、#AKR-103）を、コントロール蛋白には PVDF Blocking Reagent（TOYOBO、Osaka、Japan、#NYPBR01）を用いて、メンブレンを 60 分間振盪し、ブロッキングを行った。一次抗体は抗 p-IKK 抗体（1：1000、Cell Signaling Technology：CST、Danvers、MA、#2697）、抗 IKK 抗体（1：1000、CST、#8943）、抗 p-Smad3 抗体（1：1000、CST、#9520）、抗 Smad3 抗体（1：1000、CST、#9523）を用い、リン酸化蛋白は Phosphobloker Blocking Reagent に、コントロール蛋白は Can Get Signal Solution1（TOYOBO、#NKB-101）に希釈し、4℃で一晩振盪した後に抗原抗体反応を行った。二次抗体は anti-rabbit IgG-HRP（1：1000、CST、#7074）を用い、リン酸化蛋白は Phosphobloker Blocking Reagent に、コントロール蛋白は Can get Signal Solution2（TOYOBO、#NKB-101）に希釈し、室温で 1 時間振盪して抗原抗体反応を行った。発色反応には Clarity Western ECL Substrate（Bio-Rad、#1705061）を用い、

Image Quant LAS 4000 mini（GE Healthcare Life Sciences、Marlborough、MA）にて撮影し、検出された目的蛋白質の濃度を Image J を用いて定量化した。同様の実験を 3 回行い、平均値を算出した。

9　定量リアルタイム PCR

動物組織からの total RNA の抽出には RNeasy Mini Kit（Qiagen、Hilden、Germany、#74104）を用いて、添付文書に従い行った。抽出した RNA 濃度は NanoDrop2000（Thermo Fisher Scientific）を用いて測定した。抽出した total RNA 1 μg を使用し、PrimeScript RT Reagent Kit（Perfect Real Time）（Takara Bio、Shiga、Japan、#RR037A）にて逆転写反応を行い cDNA を合成した。定量リアルタイム PCR のプライマーには TaqMan Gene Expression Assay（Applied Biosystemes、CA）を用いた。StepOnePlus™Real Time PCR System（Applied Biosystemes）を用いて、各遺伝子につき duplicate で PCR 反応を行い、⊿⊿CT 法にて解析を行った。内部コントロールに関しては、いずれも GAPDH mRNA の発現を標準に各遺伝子の補正を行った。使用した TaqMan Gene Expression Assay の遺伝子名と商品番号のリストを**表 2** に示した。

10　統計解析

全ての値は平均値±標準誤差（SEM）で表示した。2 群間の比較には Student’s *t*-test を、3 群間の比較には Dunnet’s test または Tukey’s test を使用した。生存率は Kaplan-Meier 生存曲線を用いて log-rank test にて評価した。統計学的解析には JMP

version 14（SAS Institute Inc、NC）を用いた。いずれの検定結果についても p 値が0.05 未満を統計学的に有意であるとした。

第Ⅴ章　研究結果

MA-35 は AOM/DSS モデルマウスにおいて腸炎関連大腸癌（Colitis-Associated Cancer：CAC）と腸管線維化の発症を抑制する。

初めにマウスの生存率について解析した（**図 1B**）。AOM/DSS 群では 8 匹中 4 匹が DSS による下痢、下血の影響で死亡した。AOM/DSS 投与後 10 週における最終的な生存率は、AOM/DSS 群では 50%、AOM/DSS+MA-35 群では 100%（死亡なし）であり、AOM/DSS+MA-35 群が有意に高値であり、統計上は生存率に有意差を認めた（$p=0.03$）。次に、AOM/DSS モデルマウスに MA-35（AOM/DSS+MA-35 群）または生理食塩水（AOM/DSS 群）を投与した際の体重比率の変化について解析した（**図 1C、1D**）。AOM/DSS を投与したマウスは、DSS 投与後に Control 群と比較し、体重は有意に減少した（$p<0.05$）。最終的には、AOM/DSS 群と AOM/DSS+MA-35 群の体重に有意差は認めなかった。次に DAI スコアの推移を解析した（**図 1E、1F**）。DSS を投与した全てのマウスで体重減少、下痢、下血を認め、DAI スコアの増加を認めた。しかし MA-35 投与により第 2、8 週目での DAI スコアは有意に低下した（$p<0.05$）。これらのデータより、MA-35 が AOM/DSS モデルマウスの臨床学的症状を改善し、生存率の延長に寄与したと考えられた。

DSS 腸炎モデルマウスでは、血中 Hb の減少と便中 Hb が増加するが [38, 39]、これは DSS による腸管出血を反映している [40]。そこで、次に規定の投与サイクルを終了後に安楽死処置をしたマウスの生化学検査を行った（**図 1G、表 1**）。AOM/DSS 群で

はControl群と比較し血中Ht、Hbは有意に低値であった（$p<0.01$）。しかし、MA-35投与にて血中Ht、HbはControl群と同程度まで改善した（$p<0.05$）。

DSS を投与したマウスでは腸管長が短縮することから、腸管の短縮は炎症の指標の一つである[14, 41-43]。そこで、腸管長について解析を行った（**図 2A、2B**）。大腸の長さは、Control群よりAOM/DSS群で有意に短縮していたが（$p<0.01$）、MA-35投与により腸管の短縮は抑制された（$p<0.05$）。さらに、AOM/DSSモデルマウスでは、主に遠位結腸から中位結腸にかけ発癌を認められる[14, 15, 43, 44]ことから、腸管内腔を確認したところ、AOM/DSS を投与した全てのマウスに、遠位結腸から中位結腸にかけて腫瘍を認めた（**図 2C**）。全大腸面積に対する腫瘍面積の割合は、AOM/DSS+MA-35群ではAOM/DSS群より有意に低かった（**図 2D**）。また、直径2 mm以上の腫瘍の個数も同様に、MA-35群で有意に少なかった（**図 2E**）。これらのデータから、MA-35がAOM/DSSモデルマウスにおいて発癌を抑制することが示唆された。

次に、大腸の炎症を評価するために遠位結腸、中位結腸から近位結腸のH-E染色を、線維化を評価するために中位結腸から近位結腸のMasson’s Trichrome染色を施行した。初めに遠位結腸での病理学的評価を行った（**図 3A**）。AOM/DSS を投与したマウスでは、主に遠位結腸にadenocarcinomaを認めた（2人の病理医が確認した）。癌部ではAOM/DSS群とAOM/DSS+MA-35群の間において、炎症細胞の浸潤や異型度（核・細胞比の増加や腺管構造の乱れ）に違いは認めなかった（**図 3A**）。一方、中位結腸から近位結腸における組織学的炎症スコアを評価すると、腸陰窩の減少と

ゆがみ（**図 3B、矢頭**）、炎症細胞の浸潤（**図 3B、白線**）は AOM/DSS 群、AOM/DSS+MA-35 群の両群に認めたが、AOM/DSS+MA-35 群で有意に組織学的炎症スコアは低値であった（**図 3B**）。また、中位結腸から近位結腸における Masson’s Trichrome 染色では、AOM/DSS 群の間質で有意に陽性面積は増加していた（**図 3C、矢頭**）。しかし、MA-35 投与により陽性面積は有意に減少しており（**図 3C**）、炎症だけでなく、腸管線維化も抑制したと考えられた。

MA-35 の抗炎症、抗線維化への影響を検討するため、大腸各部位における炎症関連遺伝子（Tumor necrosis factor-α：*Tnfa*、Interleukin-6：*Il6*、Monocyte chemotactic protein-1：MCP-1/*Ccl2*、Cluster of differentiation 68：*Cd68*）と線維化関連遺伝子（Transforming growth factor beta 1：*Tgfb1*、Fibronectin 1：*Fn1*）の発現を定量リアルタイム PCR にて評価した。近位結腸正常部において解析すると（**図 4A**）、AOM/DSS 群の *Tnfa* と *Il6* の mRNA 発現は Control 群より有意に高かった。AOM/DSS 群と AOM/DSS+MA35 群の間には有意な差を認めなかった。その他の炎症性関連遺伝子（*Ccl2*、*Cd68*）と線維化関連遺伝子（*Tgfb1*、*Fn1*）に変化は認めなかった。次に、中位結腸異形成部と遠位結腸癌部における炎症関連遺伝子と線維化関連遺伝子を、定量リアルタイム PCR にて評価した。Control 群には異形成部と癌部を認めなかったため、AOM/DSS 群と AOM/DSS+MA-35 群の 2 群間で比較した。近位結腸ではこの 2 群間に差がなかった一方、中位結腸異形成部を解析すると（**図 4B**）、AOM/DSS 群と比較し、AOM/DSS+MA-35 群の *Il6* mRNA 発現は有意に低く、また *Tnfa* mRNA 発現も低い傾向にあった。さらに *Tgfb1* と *Fn1* mRNA 発現も有意に低かった。しか

し、遠位結腸癌部では（**図 4C**）、AOM/DSS 群と AOM/DSS+MA35 群の間に炎症関連遺伝子、線維化関連遺伝子に有意な違いは認めなかった。以上より、MA-35 は異形成に至るまでの段階で、IL-6 に関連した炎症と線維化を抑制することが示唆された。

MA-35 は TNF-αシグナル伝達機構において IKK のリン酸化を阻害する。

　過去の研究で、MA-35 はヒト肝星細胞株 LX-2 細胞とラット腎線維芽細胞株 NRF-49F における TNF-α/IKK シグナル伝達と TGF-β_1/Smad3 シグナル伝達を抑制することが示された[30)]。そこで今回、MA-35 が大腸においても同様の作用を示すかを検証するために、ヒト大腸癌細胞株を用いて、MA-35 の TNF-α/IKK シグナル伝達と TGF-β_1/Smad3 シグナル伝達に対する作用を検討した。

　ヒト大腸癌細胞株 HCT 116 細胞において、IKK のリン酸化が TNF-α刺激後 30 分後に最大となった（**図 5A**）。この条件を用いて、TNF-α添加 30 分後の IKK リン酸化蛋白の発現増加に対する MA-35 の効果を検討した。TNF-α添加 30 分後に、IKK のリン酸化は有意に増加する一方、IKK のリン酸化は MA-35（30 μM、50 μM）添加により有意に減少した（**図 5B**）。以上の結果より、MA-35 はヒト大腸癌細胞株において、IKK のリン酸化を阻害し、TNF-αシグナル伝達を抑制することが示唆された。

MA-35 は TGF-β_1 シグナル伝達機構において Smad3 のリン酸化を阻害する。

　初めに Smad3 のリン酸化が最大となる時間を、HCT 116 細胞にて検討したが反応

を認めなかった（**図 6A**）。そこで、ヒト大腸癌細胞株 HT-29 細胞を用いて検討したところ、同細胞では Smad3 のリン酸化が TGF-β_1 刺激後 120 分後に最大となった（**図 6B**）。この条件を用いて、TGF-β_1 添加 120 後の Smad3 リン酸化蛋白の発現増加に対する MA-35 の効果を検討した。TGF-β_1 添加 120 分後に、Smad3 のリン酸化は有意に増加する一方、Smad3 のリン酸化は MA-35（10 μM、30 μM、50 μM）添加により軽度ではあるが減少しており、有意差を認めた（**図 6C**）。以上の結果より、MA-35 はヒト大腸癌細胞株において、Smad3 のリン酸化を阻害し、TGF-β_1 シグナル伝達を抑制することが示唆された。

第Ⅵ章　考察

本研究では、インドール化合物である MA-35 が、AOM/DSS モデルマウスにおける腸炎関連大腸癌と腸管の線維化を抑制することを明らかにした。

in vivo の実験では、MA-35 は AOM/DSS による体重減少を抑制しなかったが（**図 1C**、**1D**）、第 2、8 週目の下血などの臨床学的症状を軽減し（**図 1E**、**1F**）、血中 Hb、Ht を改善した（**図 1G**）。DSS 投与 2 サイクル目における DAI スコアに有意差を認めなかったが、これは DSS 投与 1 サイクル目に AOM/DSS 群の衰弱したマウスが死亡し、健康なマウスが残ったためと思われた。また、生存率については統計上、有意差を認め、MA-35 投与群が高値であった（**図 1B**）。これらのことから、MA-35 が DSS 腸炎による炎症および出血を軽減したことを反映しており、IBD 患者の急性期出血などを抑制する可能性があると思われた。また、大腸の短縮は炎症や線維化の指標であるが [42, 43, 45, 46]、MA-35 投与により短縮は軽減し（**図 2B**）、AOM/DSS により惹起された炎症性発癌も抑制された（**図 2D**、**2E**）。遠位結腸癌部では炎症細胞の浸潤や異型度（**図 3A**）、炎症関連遺伝子、線維化関連遺伝子の発現（**図 4C**）に違いは認めなかった。一方、中位結腸から近位結腸では、MA-35 により組織学的炎症スコアは軽減し（図 **3B**）、また中位結腸異形成部の炎症関連遺伝子（*Il6*）、線維化関連遺伝子（*Tgfb1*、*Fn1*）（**図 4B**）の発現は抑制された。IL-6 は炎症だけでなく、AOM/DSS モデルマウスにおいて IL-6 依存性に腫瘍が発育すること [47]、また、ヒト大腸癌では IL-6 の発現が腫瘍のステージ、サイズ、転移に相関がある [48]ことから、発癌にも重要なサイトカインである。また、Fn1 は細胞外マトリックスを構成する 1 つであり、

障害を受けた組織の回復期に増加し[49]、線維化の際には過剰生産される[50]。CD 患者の炎症後の組織では TGF-βと Fn を含む細胞外マトリックスタンパクに相関がある[51]。これらの結果から、MA-35 は炎症から異形成、癌へと進展する過程で、その進展に関わる遺伝子発現を制御して、発癌および線維化を抑制すると考えられた。本検討では代表的な炎症関連遺伝子、線維化関連遺伝子を測定したが、過去の報告ではこれら以外に、炎症関連遺伝子として IL-1β、IL-10、IL-17、inducible nitric oxide synthase（iNOS）、Cyclooxygenase-2（COX-2）[16, 52-54]、線維化関連遺伝子として Collagen 1、Actin, alpha 2（Acta2）[22, 33, 46, 55]などの関与が報告されている。本研究で、腫瘍の発生しづらい中位～近位結腸の組織学的炎症スコアが MA-35 投与により低下していたことは、MA-35 による臨床学的な腸炎の軽減とも合致しているが、MA-35 は近位結腸正常部における IL-6 や Fn1 の発現には影響を与えていなかった。これは、MA-35 によるこれらの因子の制御が、炎症や線維化の発生段階よりもそれらが進展する過程で重要になることを示唆しており、また MA-35 が、前述したような他の炎症および線維化関連遺伝子の発現を抑制することで、それらの発生段階をも制御している可能性がある。MA-35 は炎症および線維化を抑制したことから、これらの遺伝子を抑制する可能性がある。未だ IBD の炎症、CAC、線維化の発症の機序の詳細は不明だが、多くのサイトカインや種々の因子が関係していると考えられ、本検討以外の炎症関連遺伝子、線維化関連遺伝子の解析も必要と思われる。

in vitro の実験では、大腸における MA-35 の IKK 及び Smad3 のリン酸化への作用を検討するため、代表的なヒト大腸癌細胞株である HCT 116 細胞を用いたが、TGF-

β_1刺激に反応しなかった（**図 6A**）ため、HT-29 細胞に変更したところ、反応を認めた。大腸癌は腺腫から大腸癌になる過程で、様々な遺伝子異常が生じることがあるが、ミスマッチ修復遺伝子に変異や機能低下が起こると、マイクロサテライトの反復回数に違いが生じることをマイクロサテライト不安定性（microsatellite instability : MSI）と呼び[56, 57]、MSI が生じると高頻度に TGF-β receptor 2（TGFBR2)に変異がおこる[58]。HCT 116 細胞は MSI-high であり[59]、TGFBR2 に変異が起こり、TGF-β_1刺激に反応しなかったが、HT-29 細胞は microsatellite stable（MSS）であり[59]、TGF-β_1刺激に反応したと思われた。その他の要因として、TGF-β_1の刺激時間や添加量も可能性として考えられた。上記理由より細胞株は変更したが、MA-35 はヒト大腸癌細胞株において IKK のリン酸化と Smad3 のリン酸化を抑制することで、TNF-αシグナル伝達経路及び TGF-β_1伝達シグナル経路を抑制することを示した。前述のように、NF-κBは炎症の主要な転写因子であり、IKK のリン酸化により活性化される[12]。NF-κBと CAC の関連については過去の研究で示されており、メトホルミンが IκBαのリン酸化と DNA 結合能を抑制し、マウスでの急性腸炎、慢性腸炎、CAC を抑制した[31]。本検討でも同様に、MA-35 による IKK リン酸化の抑制が、抗炎症作用と CAC の進展抑制に寄与すると考えられた。さらに、MA-35 は Smad3 のリン酸化を抑制することで、TGF-β_1/Smad シグナル伝達を抑制した（**図 6C**）。TGF-β_1は線維化だけではなく、恒常性維持、創傷治癒、血管新生、発癌、細胞の分化など多岐にわたって重要な役割を担っている[60-62]。TGF-βシグナル伝達は癌抑制因子として働く一方で、発癌促進にも作用する[62, 63]。過去の報告では、Smad2/3 のリン酸化が CAC の進展に

重要な工程であると同時に CAC の指標であり[64]、更に、AOM/DSS モデルマウスの大腸では Smad のリン酸化が高発現していた[65]。従って、Smad3 のリン酸化の抑制もまた、発癌の抑制に関与した可能性があると考えられた。本検討では、MA-35 による Smad3 のリン酸化の抑制は軽度であるものの、有意差を認めた。現段階では発癌抑制の詳細な機序は不明であり、今後の課題として、実際の大腸検体での Smad3 および IKK のリン酸化抑制作用や、下流の遺伝子の発現抑制の確認が必要であると思われる。

　また、本研究では、MA-35 が大腸の線維化を抑制することを示した（**図 3C、4B**）。一般的に、TGF-β_1 は Collagen、Fibronectin などの線維化関連分子の転写を促進することが知られており[24, 66]、腸管の線維化を促進する。過去の報告では、IBD 患者の血中 TGF-β_1 が高値で、さらに *Tgfb1* mRNA が高発現であった[23]。また、腸炎モデルである DSS モデルマウスや別の腸炎モデルの 2, 4, 6-trinitrobenzenesulfonic acid（TNBS）モデルマウスでは、大腸における *Tgfb1* mRNA の発現が高く、腸管線維化を発症するが、TGF-β_1/Smad シグナル伝達を抑制することで、腸管線維化を軽減した[33, 55]。本研究では、AOM/DSS モデルマウスにおいて TGF-β_1/Smad シグナル伝達を抑制することで、線維化関連遺伝子である *Tgfb1*、*Fn1* mRNA 発現を減少させ、病理学的に腸管線維化を抑制することを示した。従って、MA-35 は抗炎症作用、発癌抑制だけでなく、腸管線維化に対する治療薬にもなりうると考えられた。

　前述のように、インフリキシマブ[16]やエタネルセプト[17]などの既存の抗 TNF-α抗体は、AOM/DSS モデルマウスにおいて CAC を抑制したが、副作用として感染症や

発癌のリスクが懸念されている[27]。これらの薬剤と比較し、MA-35 の利点は経口投与で安全に十分な効果を得られ、さらに TNF-α、TGF-β_1 シグナル伝達両経路を直接阻害することで、発癌と線維化を抑制することである。また、MA-35 は AOM/DSS モデルマウスや肝炎症モデルマウス、腎線維化モデルマウスで炎症と線維化を抑制することが示されたが、これらだけではなく他臓器における炎症モデル、線維化モデルでも効果が期待できると考えられる。

本研究の限界として、AOM/DSS 群のマウスが DSS による炎症のため半数死亡し解析で十分な匹数が得られなかったこと、MA-35 の大腸での生体利用率が不明であること、CAC は TNF-α、TGF-β_1 シグナル伝達だけではなく発癌遺伝子や癌抑制遺伝子の変異、腸管免疫、腸内細菌など多彩な要因で進展する[67]が、MA-35 の TNF-α、TGF-β_1 シグナル伝達以外に対する作用が不明であることが挙げられ、今後のさらなる解析が求められる。現状、IBD の重篤な合併症である CAC と腸管線維化の内科的治療法は確立されていないが、本研究結果を通じて、MA-35 は CAC と腸管線維化を抑制することで生命予後が改善する可能性が示唆され、MA-35 は IBD の新規予防薬、治療薬になりうると同時に、今後の IBD 治療薬開発の発展に寄与すると考えられた。

第Ⅶ章　結論

MA-35 は炎症から異形成、癌へと進展する過程において、腸炎関連大腸癌と腸管の線維化を抑制することで生命予後を改善する可能性が示唆され、IBD における新規治療薬になりうると考えられた。

第Ⅷ章　謝辞

　本研究を遂行するにあたり、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました東北大学大学院医工学研究科分子病態医工学/医学系研究科病態液性制御学　教授　阿部高明先生、東北大学大学院医学系研究科外科病態学講座消化器外科学分野　教授　海野倫明先生、消化器外科学分野　院内講師　大沼忍先生、東北大学大学院医工学研究科分子病態医工学/医学系研究科病態液性制御学　特任准教授　鈴木健弘先生、技術補佐　鈴木千登世先生、東北大学消化器内科　非常勤講師　金澤善丈先生、消化器外科学分野　渋谷恵美子様、稲辺景子様および御支援、御協力頂いた消化器外科学分野の皆様に厚く感謝申し上げます。

第IX章　参考文献

1. Eaden JA, Abrams KR, Mayberry JF. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. Gut. 2001;48(4):526-35.

2. Rubin DC, Shaker A, Levin MS. Chronic intestinal inflammation: inflammatory bowel disease and colitis-associated colon cancer. Front Immunol. 2012;3:107.

3. Canavan C, Abrams KR, Mayberry J. Meta-analysis: colorectal and small bowel cancer risk in patients with Crohn's disease. Alimentary pharmacology & therapeutics. 2006;23(8):1097-104.

4. Wu Y, Antony S, Meitzler JL, et al. Molecular mechanisms underlying chronic inflammation-associated cancers. Cancer letters. 2014;345(2):164-73.

5. Kanai T, Totsuka T, Uraushihara K, et al. Blockade of B7-H1 suppresses the development of chronic intestinal inflammation. Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950). 2003;171(8):4156-63.

6. MacDonald TT, Monteleone G, Pender SL. Recent developments in the immunology of inflammatory bowel disease. Scandinavian journal of immunology. 2000;51(1):2-9.

7. Totsuka T, Kanai T, Iiyama R, et al. Ameliorating effect of anti-inducible costimulator monoclonal antibody in a murine model of chronic colitis. Gastroenterology.

2003;124(2):410-21.

8. Li Q, Verma IM. NF-kappaB regulation in the immune system. Nature reviews Immunology. 2002;2(10):725-34.

9. Karin M, Greten FR. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. Nature reviews Immunology. 2005;5(10):749-59.

10. Grivennikov S, Karin E, Terzic J, et al. IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. Cancer Cell. 2009;15(2):103-13.

11. Greten FR, Eckmann L, Greten TF, et al. IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. Cell. 2004;118(3):285-96.

12. Guijarro C, Egido J. Transcription factor-kappa B (NF-kappa B) and renal disease. Kidney Int. 2001;59(2):415-24.

13. Klahr S, Morrissey J. Obstructive nephropathy and renal fibrosis. Am J Physiol Renal Physiol. 2002;283(5):F861-75.

14. Tanaka T, Kohno H, Suzuki R, et al. A novel inflammation-related mouse colon carcinogenesis model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate. Cancer Sci. 2003;94(11):965-73.

15. Thaker AI, Shaker A, Rao MS, et al. Modeling colitis-associated cancer with azoxymethane (AOM) and dextran sulfate sodium (DSS). J Vis Exp. 2012(67).

16. Kim YJ, Hong KS, Chung JW, et al. Prevention of colitis-associated

carcinogenesis with infliximab. Cancer Prev Res (Phila). 2010;3(10):1314-33.

17. Popivanova BK, Kitamura K, Wu Y, et al. Blocking TNF-alpha in mice reduces colorectal carcinogenesis associated with chronic colitis. J Clin Invest. 2008;118(2):560-70.

18. Stillie RM, Sapp HL, Stadnyk AW. TNFR1 Deficiency Protects Mice from Colitis-Associated Colorectal Cancer Coupled with a Decreased Level of Oxidative Damage in the Colon: Implications for Anti-TNF Therapy of Unremitting Colitis. Journal of Cancer Therapy. 2012;Vol.03No.06:15.

19. Moore RJ, Owens DM, Stamp G, et al. Mice deficient in tumor necrosis factor-alpha are resistant to skin carcinogenesis. Nature medicine. 1999;5(7):828-31.

20. De Salvo C, Ray S, Pizarro TT. Mechanisms and models for intestinal fibrosis in IBD. Digestive diseases (Basel, Switzerland). 2014;32 Suppl 1:26-34.

21. Van Assche G, Geboes K, Rutgeerts P. Medical therapy for Crohn's disease strictures. Inflammatory bowel diseases. 2004;10(1):55-60.

22. Holvoet T, Devriese S, Castermans K, et al. Treatment of Intestinal Fibrosis in Experimental Inflammatory Bowel Disease by the Pleiotropic Actions of a Local Rho Kinase Inhibitor. Gastroenterology. 2017;153(4):1054-67.

23. Allen SJ, Okoko B, Martinez E, et al. Probiotics for treating infectious diarrhoea. Cochrane database of systematic reviews (Online). 2004(2).

24. Ghosh AK, Yuan W, Mori Y, et al. Smad-dependent stimulation of type I collagen gene expression in human skin fibroblasts by TGF-β involves functional

cooperation with p300/CBP transcriptional coactivators. Oncogene. 2000;19:3546.

25. Meng XM, Nikolic-Paterson DJ, Lan HY. TGF-beta: the master regulator of fibrosis. Nat Rev Nephrol. 2016;12(6):325-38.

26. ten Hove T, van Montfrans C, Peppelenbosch MP, et al. Infliximab treatment induces apoptosis of lamina propria T lymphocytes in Crohn's disease. Gut. 2002;50(2):206-11.

27. Targownik LE, Bernstein CN. Infectious and Malignant Complications of TNF Inhibitor Therapy in IBD. The American Journal Of Gastroenterology. 2013;108:1835.

28. Lopetuso LR, Petito V, Zinicola T, et al. Infliximab does not increase colonic cancer risk associated to murine chronic colitis. World J Gastroenterol. 2016;22(44):9727-33.

29. Andersen N, Pasternak B, Basit S, et al. Association between tumor necrosis factor-α antagonists and risk of cancer in patients with inflammatory bowel disease. JAMA. 2014;311(23):2406-13.

30. Shima H, Sasaki K, Suzuki T, et al. A novel indole compound MA-35 attenuates renal fibrosis by inhibiting both TNF-alpha and TGF-beta1 pathways. Sci Rep. 2017;7(1):1884.

31. Koh SJ, Kim JM, Kim IK, et al. Anti-inflammatory mechanism of metformin and its effects in intestinal inflammation and colitis-associated colon cancer. Journal of gastroenterology and hepatology. 2014;29(3):502-10.

32. Kim DH, Sung B, Kang YJ, et al. Anti-inflammatory effects of betaine on AOM/DSSinduced colon tumorigenesis in ICR male mice. Int J Oncol. 2014;45(3):1250-6.

33. Li G, Ren J, Hu Q, et al. Oral pirfenidone protects against fibrosis by inhibiting fibroblast proliferation and TGF-β signaling in a murine colitis model. Biochemical Pharmacology. 2016;117:57-67.

34. Yamauchi R, Kominato K, Mitsuyama K, et al. Stereomicroscopic features of colitis-associated tumors in mice: Evaluation of pit pattern. Oncology letters. 2017;14(3):3675-82.

35. Shon WJ, Lee YK, Shin JH, et al. Severity of DSS-induced colitis is reduced in Ido1-deficient mice with down-regulation of TLR-MyD88-NF-kB transcriptional networks. Sci Rep. 2015;5:17305.

36. Cooper HS, Murthy SN, Shah RS, et al. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology. 1993;69(2):238-49.

37. Kim JJ, Shajib MS, Manocha MM, et al. Investigating intestinal inflammation in DSS-induced model of IBD. J Vis Exp. 2012(60).

38. Hamamoto N, Maemura K, Hirata I, et al. Inhibition of dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis in mice by intracolonically administered antibodies against adhesion molecules (endothelial leucocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1) or intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)). Clinical and Experimental Immunology. 1999;117(3):462-8.

39. Chua ACG, Klopcic BRS, Ho DS, et al. Dietary Iron Enhances Colonic Inflammation and IL-6/IL-11-Stat3 Signaling Promoting Colonic Tumor Development in Mice. PLoS ONE. 2013;8(11):e78850.

40. Lichtenberger LM, Fang D, Bick RJ, et al. Unlocking aspirin's chemopreventive activity: Role of irreversibly inhibiting platelet cyclooxygenase-1. Cancer prevention research (Philadelphia, Pa). 2017;10(2):142-52.

41. Suzuki R, Kohno H, Sugie S, et al. Strain differences in the susceptibility to azoxymethane and dextran sodium sulfate-induced colon carcinogenesis in mice. Carcinogenesis. 2006;27(1):162-9.

42. Suzuki R, Kohno H, Sugie S, et al. Sequential observations on the occurrence of preneoplastic and neoplastic lesions in mouse colon treated with azoxymethane and dextran sodium sulfate. Cancer Sci. 2004;95(9):721-7.

43. Tanaka T, Suzuki R, Kohno H, et al. Colonic adenocarcinomas rapidly induced by the combined treatment with 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine and dextran sodium sulfate in male ICR mice possess beta-catenin gene mutations and increases immunoreactivity for beta-catenin, cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase. Carcinogenesis. 2005;26(1):229-38.

44. Zaki MH, Vogel P, Body-Malapel M, et al. IL-18 production downstream of the Nlrp3 inflammasome confers protection against colorectal tumor formation. Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950). 2010;185(8):4912-20.

45. Sanderlin EJ, Leffler NR, Lertpiriyapong K, et al. GPR4 deficiency alleviates intestinal inflammation in a mouse model of acute experimental colitis. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease. 2017;1863(2):569-84.

46. Silvia S, Christel R, Caroline D, et al. The novel PPARγ modulator GED-0507-34 Levo ameliorates inflammation-driven intestinal fibrosis. Inflammatory bowel diseases. 2016;22(2):279-92.

47. Becker C, Fantini MC, Schramm C, et al. TGF-beta suppresses tumor progression in colon cancer by inhibition of IL-6 trans-signaling. Immunity. 2004;21(4):491-501.

48. Knupfer H, Preiss R. Serum interleukin-6 levels in colorectal cancer patients--a summary of published results. International journal of colorectal disease. 2010;25(2):135-40.

49. Biancheri P, Giuffrida P, Docena GH, et al. The role of transforming growth factor (TGF)-beta in modulating the immune response and fibrogenesis in the gut. Cytokine & growth factor reviews. 2014;25(1):45-55.

50. Border WA, Noble NA. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. The New England journal of medicine. 1994;331(19):1286-92.

51. Di Sabatino A, Jackson CL, Pickard KM, et al. Transforming growth factor beta signalling and matrix metalloproteinases in the mucosa overlying Crohn's disease strictures. Gut. 2009;58(6):777-89.

52. Zhang X, Wei L, Wang J, et al. Suppression Colitis and Colitis-Associated Colon

Cancer by Anti-S100a9 Antibody in Mice. Front Immunol. 2017;8:1774.
53. Xie L, Jiang FC, Zhang LM, et al. Targeting of MyD88 Homodimerization by Novel Synthetic Inhibitor TJ-M2010-5 in Preventing Colitis-Associated Colorectal Cancer. J Natl Cancer Inst. 2016;108(4).
54. Adisakwattana P, Nuamtanong S, Kusolsuk T, et al. Non-encapsulated Trichinella spp., T. papuae, diminishes severity of DSS-induced colitis in mice. Asian Pac J Allergy Immunol. 2013;31(2):106-14.
55. Kashima S, Fujiya M, Konishi H, et al. Polyphosphate, an active molecule derived from probiotic Lactobacillus brevis, improves the fibrosis in murine colitis. Translational Research. 2015;166(2):163-75.
56. Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, et al. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. Nature. 1993;363:558.
57. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. Science. 1993;260(5109):816.
58. Markowitz S, Wang J, Myeroff L, et al. Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. Science. 1995;268(5215):1336.
59. Ahmed D, Eide PW, Eilertsen IA, et al. Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. Oncogenesis. 2013;2(9):e71-e.
60. Derynck R, Feng X-H. TGF-β receptor signaling. Biochimica et Biophysica Acta

(BBA) - Reviews on Cancer. 1997;1333(2):F105-F50.

61. Massague J. TGF-beta signal transduction. Annual review of biochemistry. 1998;67:753-91.

62. Lampropoulos P, Zizi-Sermpetzoglou A, Rizos S, et al. TGF-beta signalling in colon carcinogenesis. Cancer letters. 2012;314(1):1-7.

63. Akhurst RJ, Derynck R. TGF-beta signaling in cancer--a double-edged sword. Trends in cell biology. 2001;11(11):S44-51.

64. Suzuki R, Fukui T, Kishimoto M, et al. Smad2/3 linker phosphorylation is a possible marker of cancer stem cells and correlates with carcinogenesis in a mouse model of colitis-associated colorectal cancer. J Crohns Colitis. 2015;9(7):565-74.

65. Shukla PK, Chaudhry KK, Mir H, et al. Chronic ethanol feeding promotes azoxymethane and dextran sulfate sodium-induced colonic tumorigenesis potentially by enhancing mucosal inflammation. BMC Cancer. 2016;16(1):189.

66. Ignotz RA, Massague J. Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. The Journal of biological chemistry. 1986;261(9):4337-45.

67. Terzic J, Grivennikov S, Karin E, et al. Inflammation and colon cancer. Gastroenterology. 2010;138(6):2101-14.e5.

第X章　図説

図 1　MA-35 は AOM/DSS モデルマウスにおいて炎症を抑制する

(**A**) 動物実験プロトコールのシェーマ。AOM/DSS モデルマウスに MA-35 または生理食塩水を、24 時間毎に 70 日間経口投与を行った。（各群 n=8）

(**B**) AOM/DSS 群と AOM/DSS+MA-35 群の生存率。AOM/DSS+MA-35 群では全例生存したが（n＝8）、AOM/DSS 群では半数が死亡し（n＝4）、MA-35 投与により有意に予後の改善を認めた（p=0.03）。

(**C**) 各群の体重変化の推移。DSS 投与後、AOM/DSS 群は Control 群と比べ有意に体重が減少した。AOM/DSS 群と AOM/DSS+MA-35 群には有意差は認めなかった。$^{\#}p$＜0.05 AOM/DSS 群 vs. Control 群。

(**D**-1) Control 群個体毎の体重変化の推移。

(**D**-2) AOM/DSS 群個体毎の体重変化の推移。

(**D**-3) AOM/DSS+MA-35 群個体毎の体重変化の推移。

(**E**)各群の Disease activity index（DAI）スコアの推移。第 2、8 週目において、AOM/DSS+MA35 群の DAI スコアは AOM/DSS 群の DAI スコアより有意に抑制された。*p＜0.05、**p＜0.01 AOM/DSS 群 vs. AOM/DSS+MA-35 群。

(**F**-1) Control 群個体毎の DAI スコアの推移。

(**F**-2) AOM/DSS 群個体毎の DAI スコアの推移。

(**F**-3) AOM/DSS+MA-35 群個体毎の DAI スコアの推移。

(G) 安楽死処置時の血中ヘモグロビン（Hb）、ヘマトクリット（Ht）。血中 Hb、Ht 共に AOM/DSS 群では Control 群より有意に低値であったが、AOM/DSS+MA-35 群では AOM/DSS 群より有意に高値であり貧血の改善を認めた。

データは平均値±SEM で示す。$^{\#}p$＜0.05、$^{\#\#}p$＜0.01 vs. Control 群、*p＜0.05、**p＜0.01 vs. AOM/DSS+MA-35 群。

図 2　MA-35 は AOM/DSS モデルマウスにおいて発癌を抑制する

(A) 大腸外観（典型例）。スケールバーは 1 cm を示す。

(B) 各群の腸管長の比較。AOM/DSS 群では Control 群より有意に短縮したが、AOM/DSS+MA-35 群では AOM/DSS 群より有意に長く、短縮を抑制した。

(C) 大腸内腔（典型例）。スケールバーは 1 cm を示す。白線は腫瘍性病変を示す。

(D) 全大腸面積に占める腫瘍面積の割合。Control 群では発癌は認めず、AOM/DSS 群で有意に発癌を認めた。一方、AOM/DSS+MA-35 群では AOM/DSS 群より腫瘍面積は有意に小さく、発癌の抑制を認めた。

(E) 直径が 2 mm 以上の腫瘍個数。AOM/DSS+MA-35 群では AOM/DSS 群より有意に少なかった。

データは平均値±SEM で示す。$^{\#\#}p$＜0.01 vs. Control 群、*p＜0.05、**p＜0.01 vs. AOM/DSS+MA-35 群。

図 3　病理学的炎症、線維化の評価

(**A**) 遠位結腸の H-E 染色。遠位結腸癌部では、AOM/DSS+MA-35 群と AOM/DSS 群に炎症細胞の浸潤や細胞異型・腺管の構造異型に違いは認めなかった。

(**B**) 中位結腸から近位結腸の H-E 染色。AOM/DSS 群、AOM/DSS+MA-35 群の両群に腸陰窩のゆがみ（矢頭）や炎症細胞の浸潤（白線）を認めたが、AOM/DSS+MA-35 群では AOM/DSS 群より抑制されており、組織学的炎症スコアも有意に少なかった。

(**C**) 中位結腸から近位結腸の Masson’s Trichrome 染色。AOM/DSS 群は Control 群より陽性面積は有意に大きかったが（矢頭）、AOM/DSS+MA-35 群は AOM/DSS 群より有意に小さく線維化の抑制を認めた。

×4 及び×20 でのスケールバーはそれぞれ 500 μm と 50 μm を示す。データは平均値±SEM で示す。$^{\#\#}p<0.01$ vs. Control 群、$*p<0.05$ vs. AOM/DSS+MA-35 群。

図 4　AOM/DSS モデルマウスにおいて MA-35 は大腸の炎症関連遺伝子、線維化関連遺伝子発現を抑制する。

(**A**) 近位結腸正常部での定量リアルタイム PCR 解析。AOM/DSS 群で *Tnfa*、*Il6* mRNA 発現が Control 群より有意に高かった。その他に有意差は認めなかった。

(**B**) 中位結腸異形成部での定量リアルタイム PCR 解析。MA-35 投与群で *Tnfa* mRNA 発現が抑制される傾向にあり、また *Il6*、*TGFb1*、*Fn1* mRNA 発現が有意に抑制された。

(**C**) 遠位結腸癌部での定量リアルタイム PCR 解析。各遺伝子の発現に有意差は認めなかった。

データは平均値±SEM で示す。$^{\#}p<0.05$、$^{\#\#}p<0.01$ vs. Control 群、$^{*}p<0.05$ vs. AOM/DSS+MA-35 群。

図 5　MA-35 は IKK のリン酸化を抑制する

(**A**) HCT 116 細胞における TNF-α（10 ng/mL）を添加した際の IKK のリン酸化蛋白発現の経時的変化（5、15、30、60 分後）。添加後 30 分後に最大となった。

(**B**) HCT 116 細胞に TNF-α（10 ng/mL）と MA-35（10 µM、30 µM、50 µM）を添加した際の IKK のリン酸化蛋白の発現変化。MA-35 を 30 µM、50 µM 添加した時に有意に IKK のリン酸化が抑制された。

いずれも MA-35 は TNF-α 添加 1 時間前に添加し DMSO をコントロールとした。

データは平均値±SEM で示す。$^{*}p<0.05$、$^{**}p<0.01$。

図 6　MA-35 は Smad3 のリン酸化を抑制する

(**A**) HCT 116 細胞に TGF-β_1（10 ng/mL）を添加したが、Smad3 リン酸化蛋白の発現は認めなかった。

(**B**) HT-29 細胞における TGF-β_1（10 ng/mL）を添加した際の Smad3 のリン酸化蛋白発現の経時的変化（5、15、30、60、120 分後）。添加後 120 分後に最大となった。

(C) HT-29 細胞に TGF-β_1（10 ng/mL）と MA-35（10 µM、30 µM、50 µM）を添加した際の Smad3 のリン酸化蛋白の発現変化。MA-35 を 10 µM、30 µM、50 µM 添加した時に、有意にリン酸化が抑制された。

いずれも MA-35 は TGF-β_1 添加 1 時間前に添加し DMSO をコントロールとした。データは平均値±SEM で示す。*p＜0.05、**p＜0.01。

表 1

AOM/DSS3 サイクル投与後の安楽死処置時の生化学検査

AOM/DSS 群は Control 群と比較し、血中 Ht、Hb が有意に低値であった。しかし、MA-35 投与により血中 Ht、Hb は改善し Control 群と同等になった。

データは平均値±SEM で示す。$^{\#\#}p$＜0.01 vs. Control 群、*p＜0.05 vs. AOM/DSS 群。

表 2

PCR 解析で用いた TaqMan Gene Expression Assay のプライマーリスト

図1

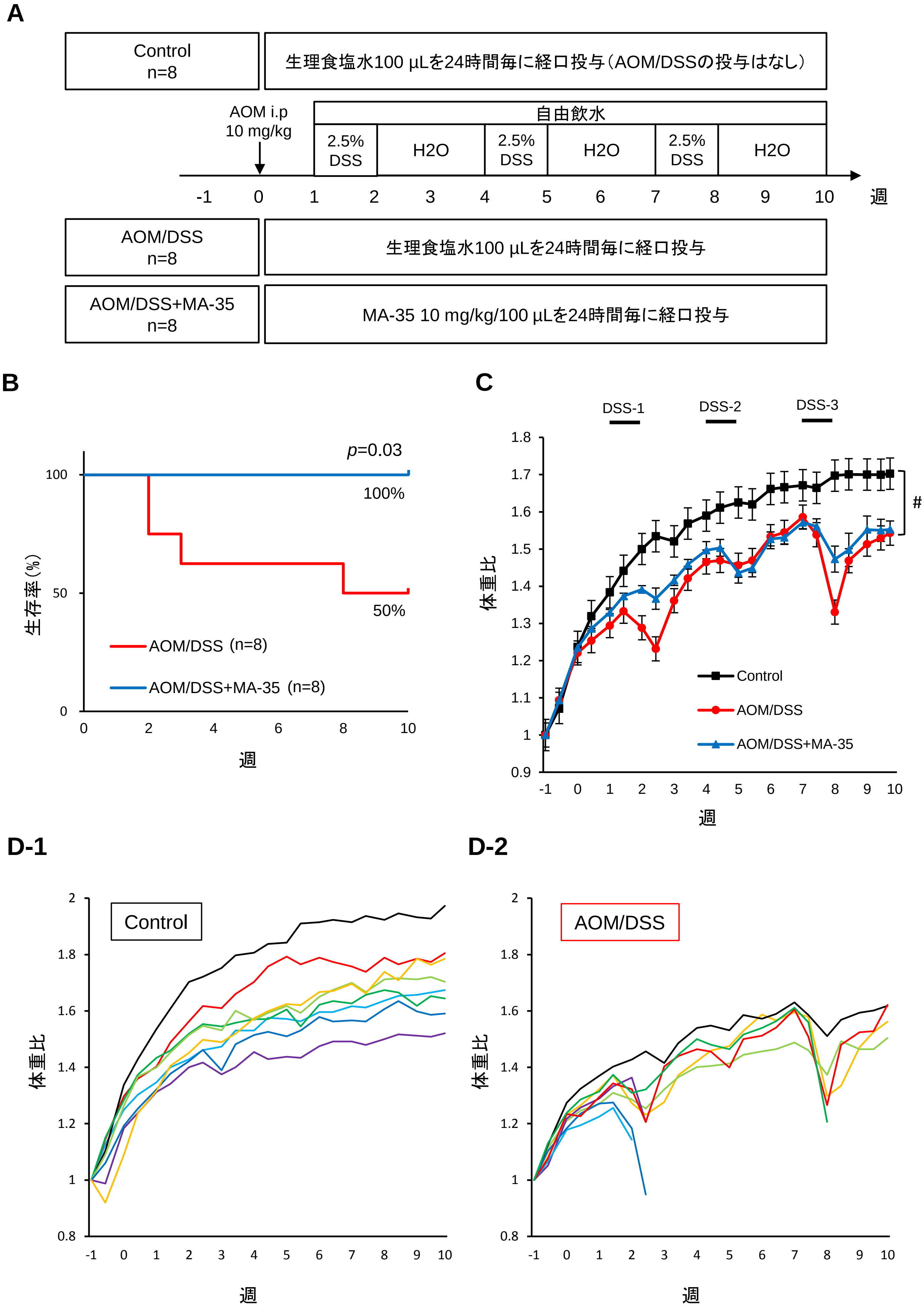

A
Control
n=8
生理食塩水100 µLを24時間毎に経口投与（AOM/DSSの投与はなし）
AOM i.p
10 mg/kg
自由飲水
2.5%
DSS
H2O
2.5%
DSS
H2O
2.5%
DSS
H2O
-1 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 週
AOM/DSS
n=8
生理食塩水100 µLを24時間毎に経口投与
AOM/DSS+MA-35
n=8
MA-35 10 mg/kg/100 µLを24時間毎に経口投与
B
p=0.03
100%
50%
生存率（%）
AOM/DSS（n=8）
AOM/DSS+MA-35（n=8）
週
C
DSS-1
DSS-2
DSS-3
体重比
Control
AOM/DSS
AOM/DSS+MA-35
#
週
D-1
Control
体重比
週
D-2
AOM/DSS
体重比
週

図1

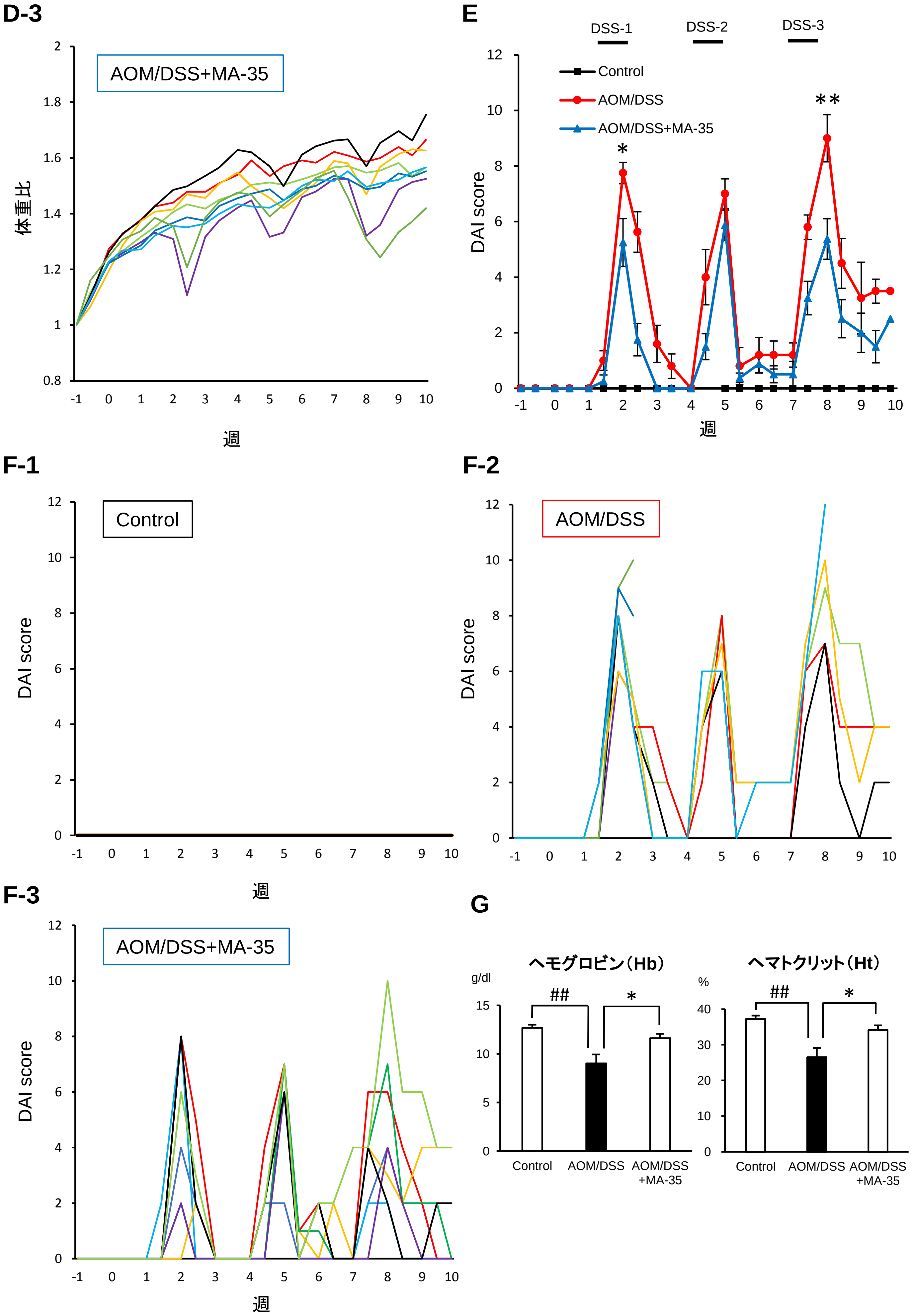
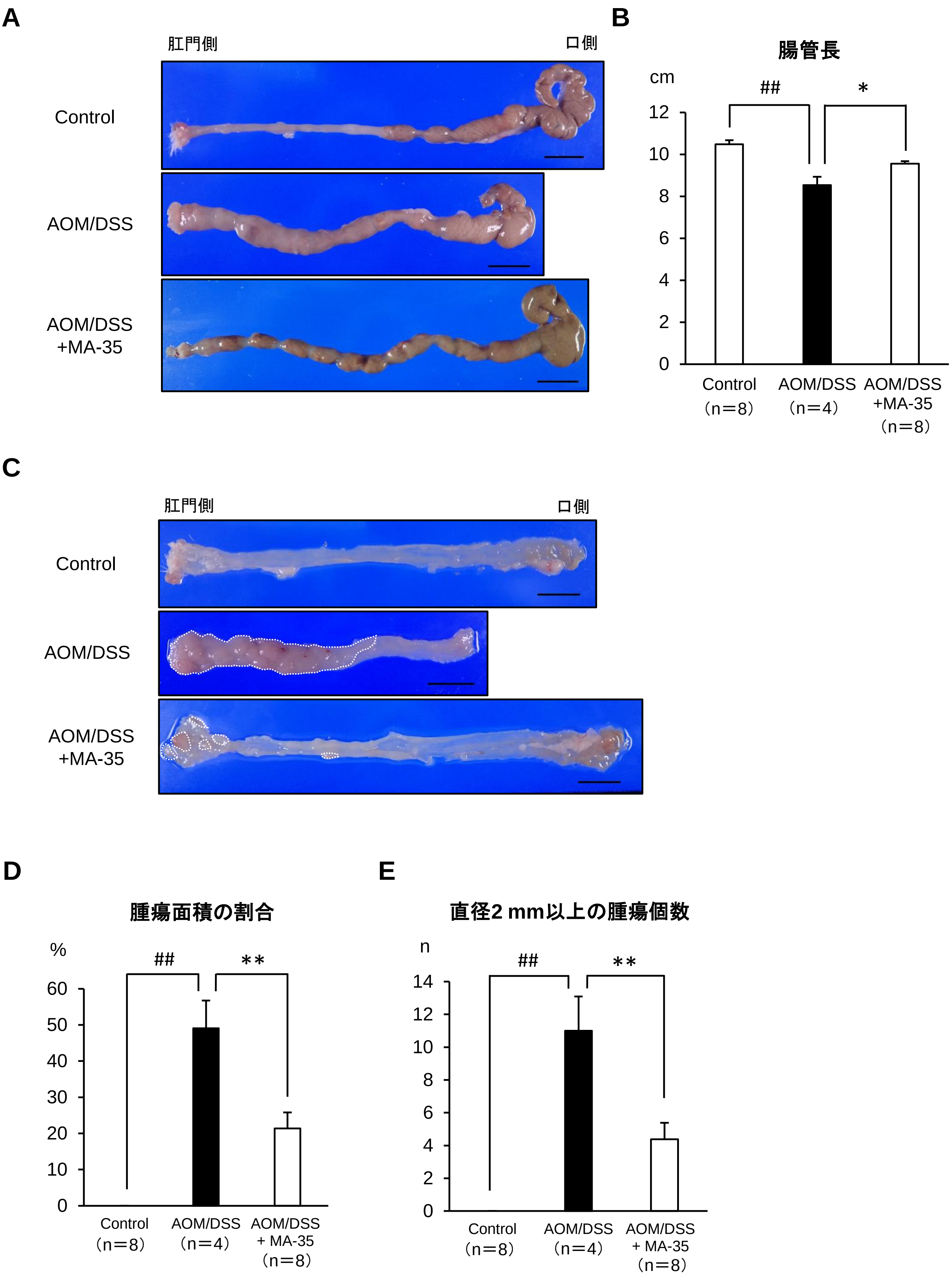

D-3
AOM/DSS+MA-35
体重比
2
1.8
1.6
1.4
1.2
1
0.8
-1 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
週
E
DSS-1
DSS-2
DSS-3
Control
AOM/DSS
AOM/DSS+MA-35
DAI score
12
10
8
6
4
2
0
*
**
-1 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
週
F-1
Control
DAI score
12
10
8
6
4
2
0
-1 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
週
F-2
AOM/DSS
DAI score
12
10
8
6
4
2
0
-1 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
F-3
AOM/DSS+MA-35
DAI score
12
10
8
6
4
2
0
-1 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
週
G
ヘモグロビン（Hb）
g/dl
15
10
5
0
##
*
Control
AOM/DSS
AOM/DSS +MA-35
ヘマトクリット（Ht）
%
40
30
20
10
0
##
*
Control
AOM/DSS
AOM/DSS +MA-35

図2



A
肛門側
口側
Control
AOM/DSS
AOM/DSS
+MA-35
B
腸管長
cm
##
*
12
10
8
6
4
2
0
Control
（n=8）
AOM/DSS
（n=4）
AOM/DSS
+MA-35
（n=8）
C
肛門側
口側
Control
AOM/DSS
AOM/DSS
+MA-35
D
腫瘍面積の割合
%
##
**
60
50
40
30
20
10
0
Control
（n=8）
AOM/DSS
（n=4）
AOM/DSS
+ MA-35
（n=8）
E
直径2 mm以上の腫瘍個数
n
##
**
14
12
10
8
6
4
2
0
Control
（n=8）
AOM/DSS
（n=4）
AOM/DSS
+ MA-35
（n=8）

図3

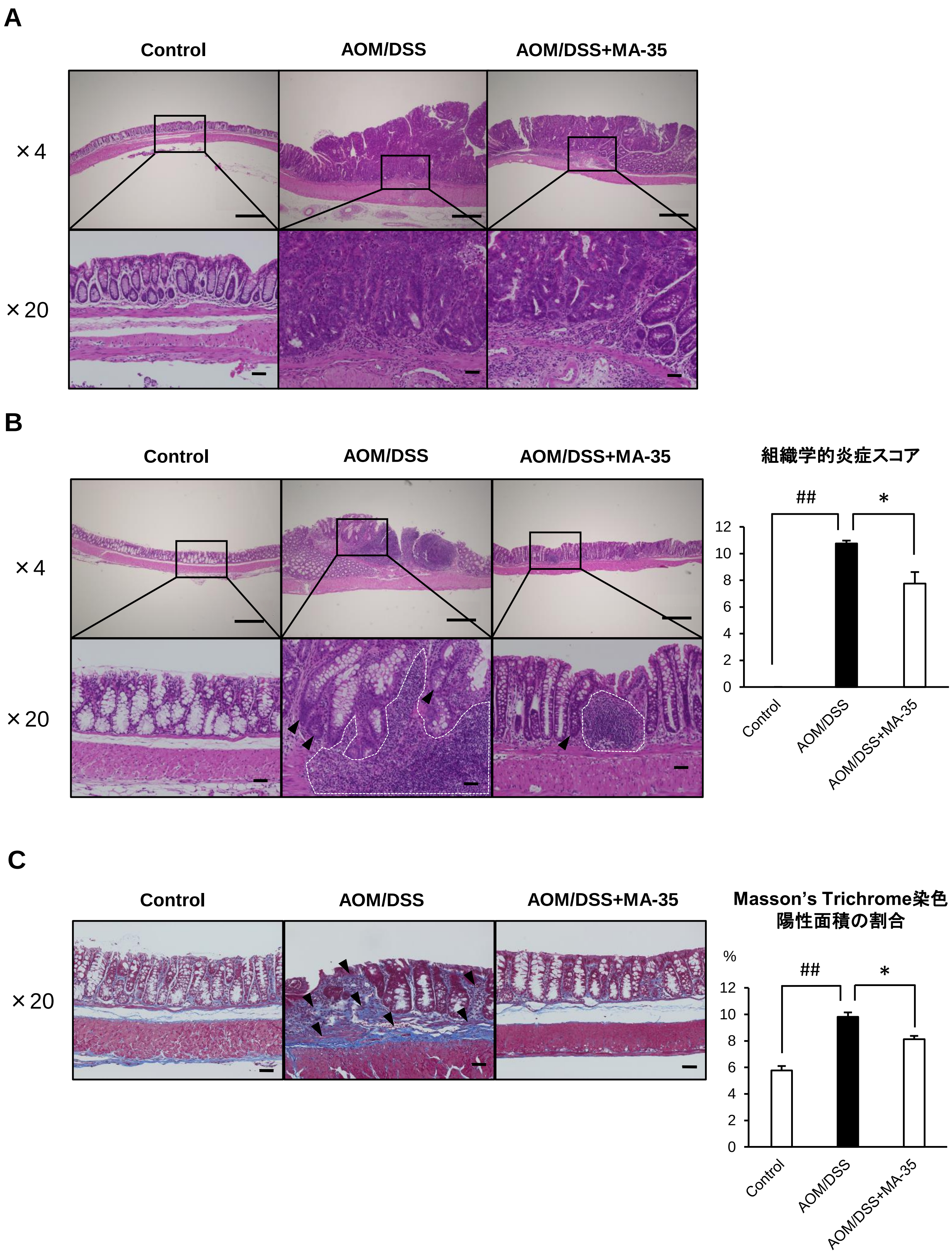

A
Control
AOM/DSS
AOM/DSS+MA-35
×4
×20
B
Control
AOM/DSS
AOM/DSS+MA-35
×4
×20
組織学的炎症スコア
##
*
12
10
8
6
4
2
0
Control
AOM/DSS
AOM/DSS+MA-35
C
Control
AOM/DSS
AOM/DSS+MA-35
×20
Masson’s Trichrome染色
陽性面積の割合
%
##
*
12
10
8
6
4
2
0
Control
AOM/DSS
AOM/DSS+MA-35

図4

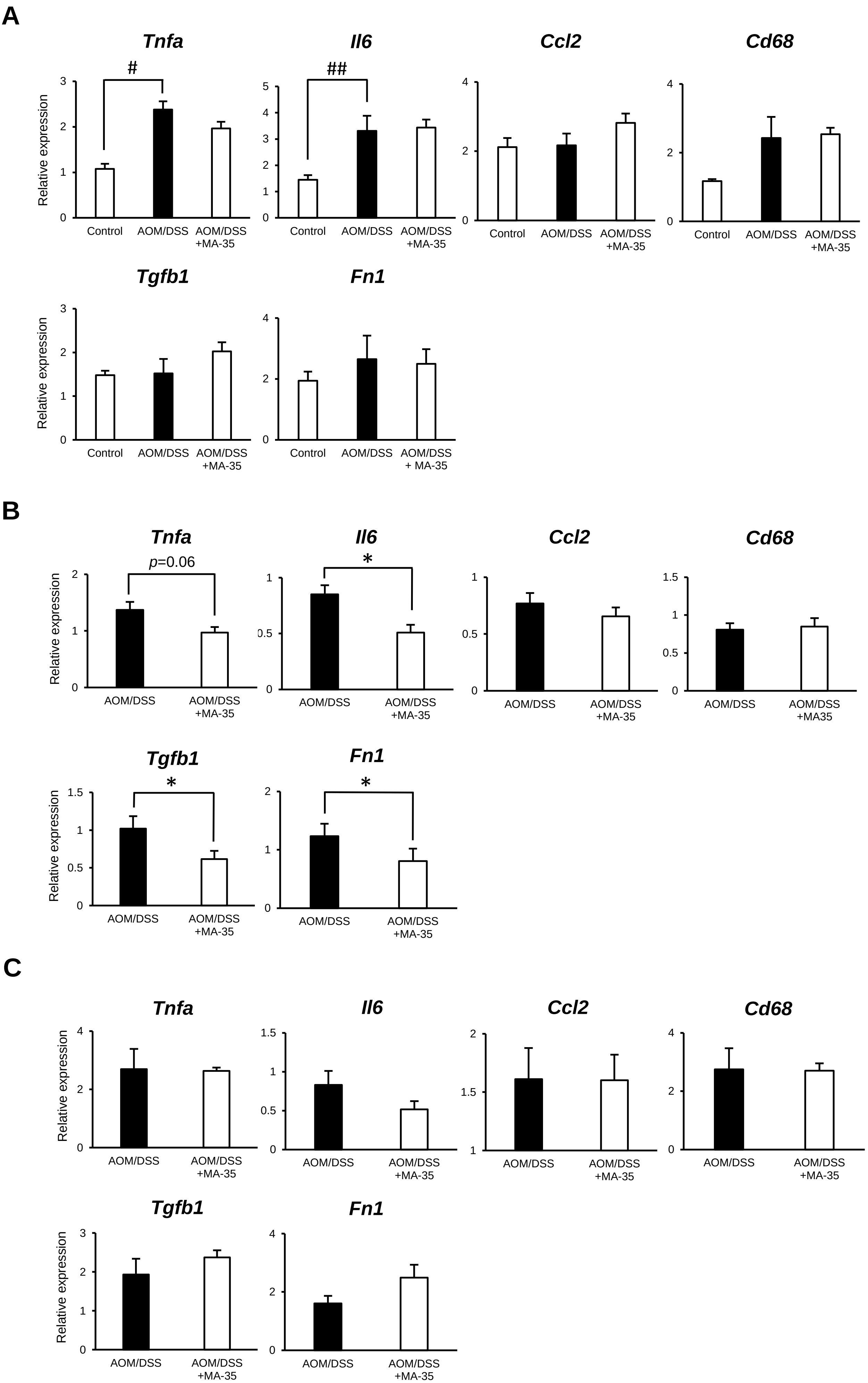
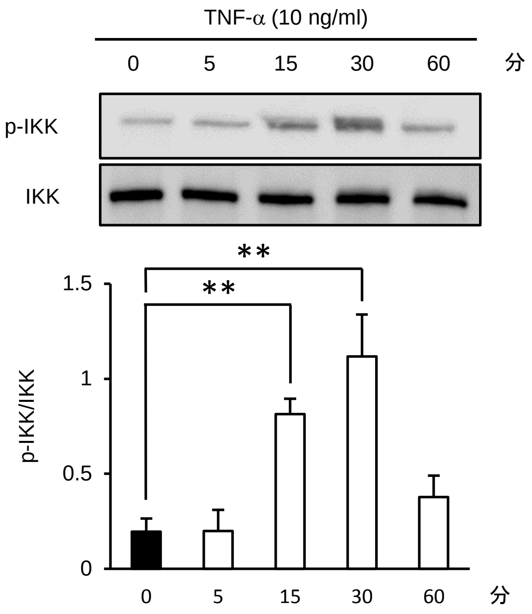

A
Tnfa
#
Relative expression
Control
AOM/DSS
AOM/DSS +MA-35
Il6
##
Ccl2
Cd68
Tgfb1
Fn1
AOM/DSS + MA-35
B
Tnfa
p=0.06
Il6
*
Ccl2
Cd68
AOM/DSS +MA35
Tgfb1
*
Fn1
*
C
Tnfa
Il6
Ccl2
Cd68
Tgfb1
Fn1

図5

A


TNF-α (10 ng/ml)
0 5 15 30 60 分
p-IKK
IKK
**
**
1.5
1
0.5
0
p-IKK/IKK
0 5 15 30 60 分

B

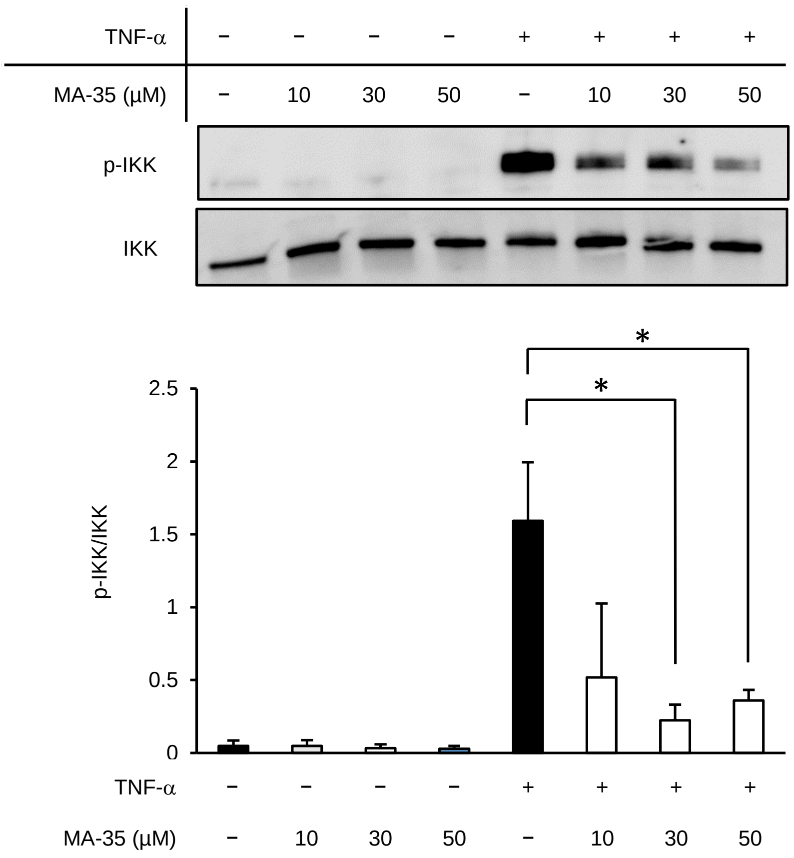
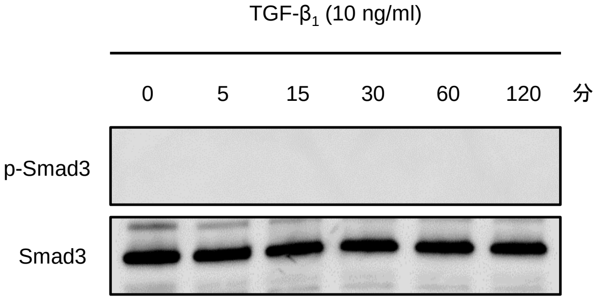
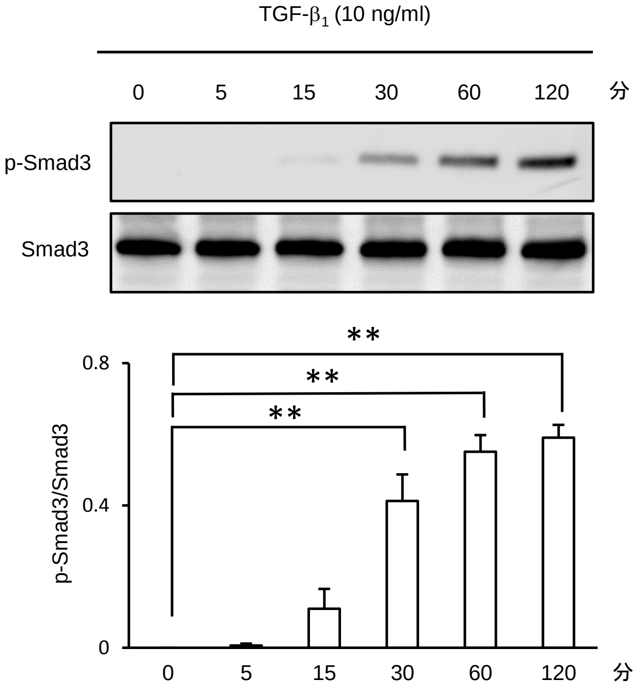

TNF-α − − − − + + + +
MA-35 (µM) − 10 30 50 − 10 30 50
p-IKK
IKK
*
*
2.5
2
1.5
1
0.5
0
p-IKK/IKK
TNF-α − − − − + + + +
MA-35 (µM) − 10 30 50 − 10 30 50

図6

A


TGF-β1 (10 ng/ml)
0 5 15 30 60 120 分
p-Smad3
Smad3

B


TGF-β1 (10 ng/ml)
0 5 15 30 60 120 分
p-Smad3
Smad3
**
**
**
0.8
0.4
0
p-Smad3/Smad3
0 5 15 30 60 120 分

B

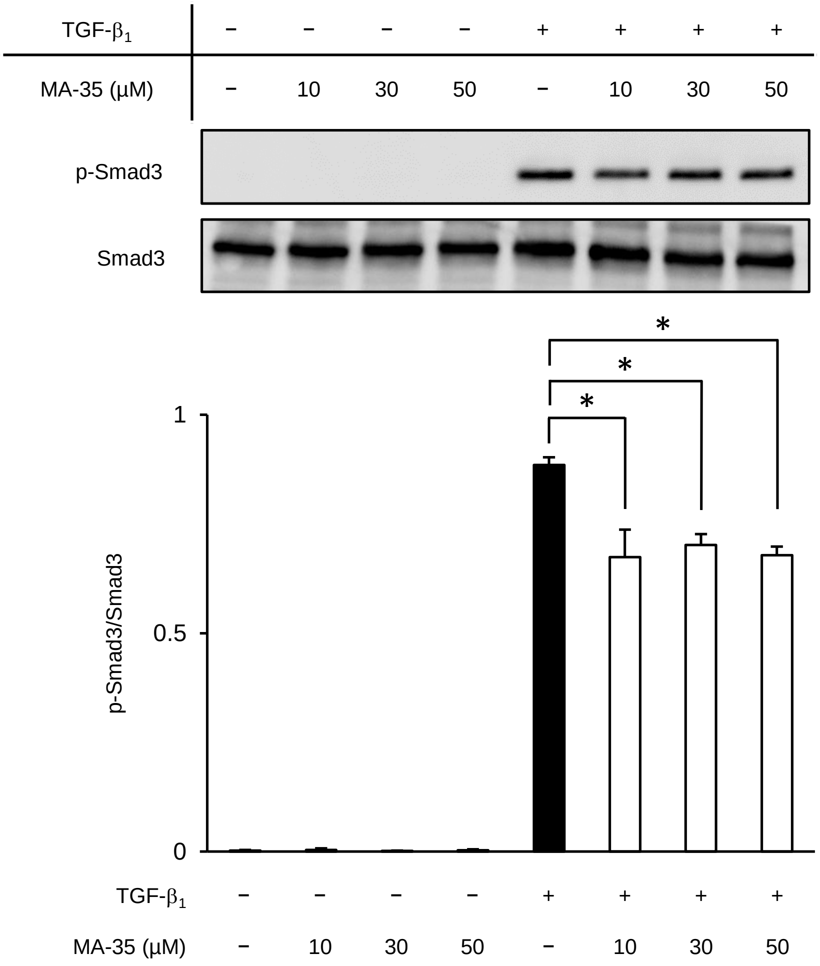

TGF-β1 − − − − + + + +
MA-35 (μM) − 10 30 50 − 10 30 50
p-Smad3
Smad3
*
*
*
1
0.5
0
p-Smad3/Smad3
TGF-β1 − − − − + + + +
MA-35 (μM) − 10 30 50 − 10 30 50

表1 安楽死処置時の生化学検査

		Control	AOM/DSS	AOM/DSS+MA-35
Na	mmol/L	139.8 ± 0.8	140.0 ± 1.5	141.9 ± 1.3
K	mmol/L	7.8 ± 0.3	8.1 ± 0.2	7.8 ± 0.2
Cl	mmol/L	114.3 ± 0.8	114.0 ± 0.9	113.8 ± 1.2
iCa	mmol/L	1.1 ± 0.02	1.1 ± 0.02	1.1 ± 0.03
Total CO2	mmol/L	20.5 ± 0.9	21.8 ± 1.1	23.4 ± 0.6
BUN	mg/dL	23.8 ± 1.1	23.3 ± 2.9	18.4 ± 1.1
Ht	%	36.5 ± 1.0	26.5 ± 2.7 ##	34.1 ± 1.3 *
Hb	g/dL	12.4 ± 0.3	9.0 ± 0.9 ##	11.6 ± 0.5 *
AST	U/l	110.4 ±12.7	139.3 ± 29.5	142.8 ± 14.7
ALT	U/l	51.0 ±4.3	55.3 ± 9.0	51.6 ± 3.8

##*p*＜0.01 vs. Control、**p*＜0.05 vs. AOM/DSS。

表2　PCR解析で用いたTaqMan Gene Expression　Assayのプライマーリスト

TaqMan Gene Expression Assays (Mouse)	
Fn1	Mm01256744_m1
Tgfb1	Mm01178820_m1
Tnfa	Mm00443260_g1
Ccl2	Mm00441242_m1
Cd68	Mm03047343_m1
Il6	Mm00446190_m1
GAPDH	Mm99999915_m1