

原 著

レチノイン酸は大腸上皮細胞において NF- κ B シグナリングを活性化する

獨協医科大学 内科学 (消化器)

内園まり子 島田 忠人

要 旨 All-trans retinoic acid (ATRA) は核内受容体である retinoic acid receptor (RAR) のリガンドであり、消化管を含む多くの組織で重要な生理作用を有している。最近、臨床的なレチノイン酸の使用と炎症性腸疾患との関連が注目されているが、この問題に関する基礎的な検討は行われていない。今回我々は、大腸癌由来細胞株を用いて、炎症・免疫応答において中心的な役割を果たしている nuclear factor- κ B (NF- κ B) シグナリングに対する ATRA の影響について、レポーター遺伝子解析法、リアルタイム定量的 RT-PCR 法にて検討を行った。ATRA および他のレチノイド化合物 (9-*cis* retinoic acid, 13-*cis* retinoic acid, AM580, retinol) は、大腸癌由来細胞株において用量依存性に NF- κ B を活性化した。また、ATRA は NF- κ B の代表的な標的遺伝子である IL-8 の発現を誘導した。RAR の活性化と比較すると NF- κ B 活性化に要する ATRA の濃度域は高かった。TNF- α による NF- κ B の活性化、IL-8 発現誘導は、ATRA をプレインキュベーションすることにより著明に増大し、相乗的な効果が認められた。ATRA は NF- κ B サブユニット (RelA, p50) の発現を増大させ、TNF 受容体 (TNFR1) の発現レベルも上昇させていた。これらの結果より、レチノイン酸は大腸上皮細胞において NF- κ B シグナリングを活性化し、TNF- α に対する感受性を増大させている可能性が示唆された。

Key Words : 大腸上皮細胞, all-trans retinoic acid, NF- κ B, IL-8, TNF- α

緒 言

ビタミン A (retinol) は標的細胞内で代謝されて all-trans retinoic acid (ATRA) となり、ATRA が核内受容体である retinoic acid receptor (RAR) のリガンドとして作用することにより、様々の重要な生理作用が発揮されている^{1,2)}。欧米では、ATRA の光学異性体であり ATRA と同様に RAR のリガンドとなる 13-*cis* retinoic acid (13-*cis* RA) (isotretinoin) が痤瘡などの皮膚疾患の治療に多用されているが、1986年、Brodin³⁾ は、isotretinoin の使用に伴って直腸炎を発症した26歳の女性患者について報告を行った。引き続き Martin ら⁴⁾ も、isotretinoin 服用開始後に直腸・S状結腸炎を発症した17歳男性症例を報告しているが、この症例では、直腸・S状結腸炎は isotretinoin の服用中止により軽快し、再投

与により増悪したことが確認されている。その後も isotretinoin との相関が疑われる炎症性腸疾患の症例報告が散見されており^{5~8)}、1997年から2002年の間に Food and Drug Administration (FDA) に寄せられた副作用情報を解析した Reddy ら⁹⁾ は、isotretinoin の使用に伴う炎症性腸疾患が85症例で発生していると報告している。これらの報告から、一部の患者において、レチノイン酸の使用が腸管の炎症の発症・増悪因子になっている可能性が考えられるが、そのメカニズムについては不明である。

Nuclear factor- κ B (NF- κ B) は、Rel homology domain (RHD) を有する5種類のDNA結合蛋白 (RelA, c-Rel, RelB, p50, p52) により構成されている転写因子ファミリーであり、通常ホモダイマーあるいはヘテロダイマーを形成して細胞質内に存在している。非刺激状態の細胞内では、NF- κ B ダイマーは inhibitors of κ B (I κ B) ファミリー蛋白が結合することにより不活化されているが、細菌やウイルス、double-stranded RNA など様々な刺激があると I κ B がリン酸化されて遊離し、NF- κ B は核内に移動して標的遺伝子の転写を促進する¹⁰⁾。

平成21年11月2日受付、平成21年11月20日受理
別刷請求先：内園まり子

〒321-0293 栃木県下都賀郡壬生町北小林880
獨協医科大学 内科学 (消化器)

表 1 使用した PCR プライマー

GAPDH (GenBank No.NM_002046)
Sense 5'-TGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAG-3'
Antisense 5'-TCCTTGGAGGCCATGTGGGCCAT-3'
PCR 産物 240 bp
IL-8 (GenBank No.NM_000584-2)
Sense 5'-TAAACATGACTTCCAAGCTGGC-3'
Antisense 5'-TACAATAATTTCTGTGTTGGCG-3'
PCR 産物 209 bp
RelA (GenBank No.NM_001145138.1)
Sense 5'-ACAACAACCCCTTCCAAGTT-3'
Antisense 5'-GTTCACTCGGCAGATCTTGAG-3'
PCR 産物 192 bp
P50 (GenBank No.NM_001165412.1)
Sense 5'-GATTTTTCCCCACAGATGTT-3'
Antisense 5'-TTCTGACGTTTCTCTGCACT-3'
PCR 産物 200 bp
TNFR1 (GenBank No.NM_001065.2)
Sense 5'-CTAGGGGACAGGGAGAAGAGA-3'
Antisense 5'-GCAGTGTCTGAGGTGGTTTTTC-3'
PCR 産物 198 bp
TNFR2 (GenBank No.NM_001066.2)
Sense 5'-CCTGAGCAACAGAGTGAGACC-3'
Antisense 5'-CCCACAGAGTCTCCAAATTCA-3'
PCR 産物 203 bp

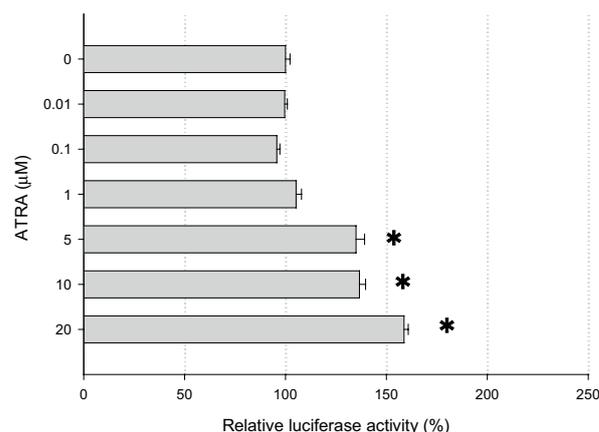
NF- κ Bの標的遺伝子は多岐にわたっているが¹¹⁾、各種のサイトカイン、ケモカイン等が含まれており、NF- κ Bは、一般に炎症・免疫応答の惹起過程で中心的な役割を果たしていると考えられている^{10,11)}。そこで、本研究において我々は、大腸癌由来細胞株を用い ATRA をはじめとするレチノイド化合物が大腸上皮細胞のNF- κ B活性にどのような影響を与えるかについて検討を行い、さらに、NF- κ Bの代表的な標的遺伝子であるIL-8の発現に対する ATRA の影響についても検討を行った。

方 法

1. 試 薬

TNF- α はR & D Systems (Minneapolis, MN) より、ATRA, retinolおよび9-*cis* retinoic acid (9-*cis* RA)はSigma (St. Louis, MO) より、13-*cis* RAおよびAM580はBiomol (Plymouth Meeting, PA) より購入した。ATRA, retinol, 9-*cis* RA, 13-*cis* RAおよびAM580はDMSOに溶かしストック溶液とした。SB203580, JNK inhibitor VはCalbiochem (San Diego, CA) より、PD98059はMerck (Darmstadt, Germany) より購入し

(A) 24時間



(B) 48時間

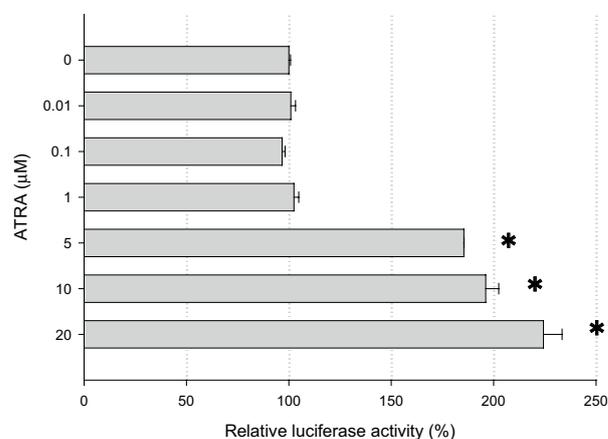


図 1 ATRAによるNF- κ Bの活性化(HCT116細胞). (A) 24時間インキュベーション. (B) 48時間インキュベーション. Mean \pm SD (n=3) *p<0.01 vs. Control (ATRA 0 μ M).

た。実験時の溶媒の最終濃度は0.1%以下であり、この濃度の溶媒自体は実験の結果に影響を与えなかった。

2. 細胞培養

ヒト大腸癌由来細胞株であるHCT116, SW480, DLD-1およびLS174T細胞はHuman Science Research Bank (大阪) より、Caco2細胞は大日本製薬(東京)より購入した。これらの細胞は10% fetal bovine serum (FBS) (Invitrogen, Carlsbad, CA) を添加したDulbecco's modified eagle medium (DMEM) (Invitrogen) で、37°C, 5% CO₂存在下で培養した。実験開始24時間前より0.1% FBS 加 DMEM 培養液に変更して実験を行った。

表2 ATRA (10 μ M, 24時間インキュベーション) によるNF- κ Bの活性化(コントロールに対する%)

Caco2	186.9 \pm 7.5	(3)
SW480	296.4 \pm 14.2	(3)
DLD-1	295.2 \pm 3.7	(3)
LS174T	232.5 \pm 9.5	(3)

Mean \pm SD (n)

3. RNA抽出およびpolymelase chain reaction (PCR)

培養細胞より Trizol 試薬 (Invitrogen) を用いて total RNA を抽出した. Ready-To-Go You-prime First Strand Beads (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), oligo (dT) primer (Invitrogen) を用いて, 逆転写反応により cDNA を作製した. リアルタイム定量的 reverse-transcription PCR (RT-PCR) は既報¹²⁾のごとく行ったが, 本研究では SYBR Premix Ex Taq (Takara, 大津, 滋賀) を用い, Opticon2リアルタイムPCR解析システム (BIO-RAD, Hercules, CA) を使用した. 同時に測定した GAPDH mRNA 発現量により結果の標準化を行った. 用いたPCRプライマーは表1に示す.

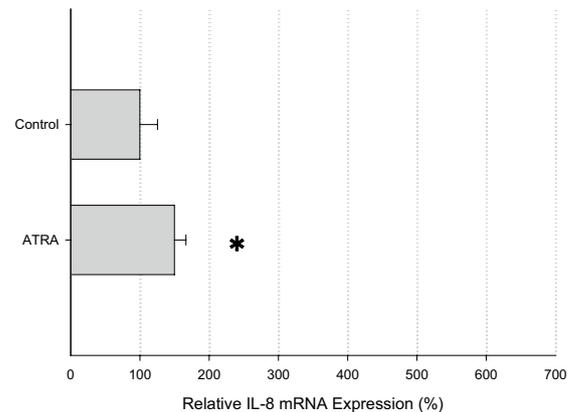
4. ベクター構築およびレポーター遺伝子解析

NF- κ Bの活性化は, luciferase 遺伝子の 上流に複数の NF- κ B binding element を挿入した NF- κ B-Luc ベクター (Takara) を用いて解析した. RARの活性化は, SEAP 遺伝子の 上流に複数の retinoic acid response element (RARE) を挿入した pRARE-TA-SEAP ベクター (Takara) を用いて解析した. 細胞を 24 穴プレートに培養し Lipofectamine2000 (Invitrogen) を用いて, NF- κ B-Luc ベクター (0.6 μ g/well) あるいは pRARE-TA-SEAP ベクター (0.6 μ g/well) をトランスフェクションした. 結果の標準化のために phRL-TK ベクター (Promega, Madison, WI) (0.01 μ g/well) も同時にトランスフェクションした. Luciferase 活性は Dual-Luciferase Reporter Assay (Promega), SEAP 活性は Great EscAPE SEAP Detection Kit (Takara) にて測定した.

5. 統計処理方法

データは平均値 \pm 標準偏差で示した. 2 群間の比較は unpaired t-test により有意差を検定した. 3 群以上のグループ間の比較には, 分散分析 (ANOVA) を行い, 有意差が認められた場合は ($p < 0.05$), Sheffe's test により各群間の比較を行い有意差を判定した.

(A) 24時間



(B) 48時間

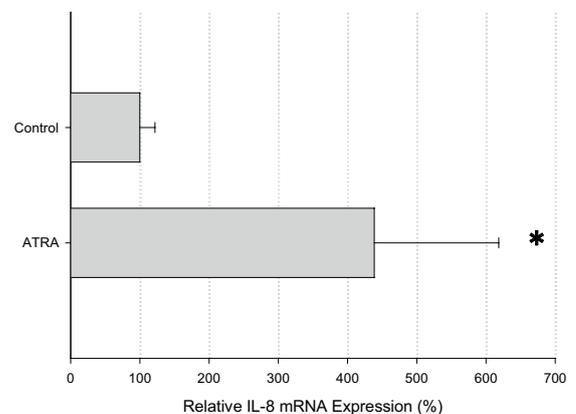


図2 IL-8 mRNA 発現に対する ATRA (10 μ M) の効果 (HCT116 細胞). (A) 24時間インキュベーション. (B) 48時間インキュベーション. Mean \pm SD (n=3) * $p < 0.01$ vs. Control (ATRA 0 μ M).

結 果

1. ATRA による NF- κ B の活性化

図1には, 大腸癌細胞株 HCT116 に, ATRA (0.01-20 μ M) を 24 時間 (図1A) あるいは 48 時間 (図1B) 作用させた時の NF- κ B 活性をレポーター遺伝子解析で検討した結果を示す. ATRA は濃度・時間依存性に NF- κ B を活性化しており, 5 μ M 以上の濃度で有意差が認められた. また, 表2に示すように, ATRA による NF- κ B の活性化は他の大腸癌由来細胞株 (Caco2, SW480, DLD-1, LS174T) でも確認された.

2. ATRA による IL-8 発現の誘導

そこで, NF- κ B の代表的な標的遺伝子である IL-8 発現に対する ATRA の効果を HCT116 細胞でみた.

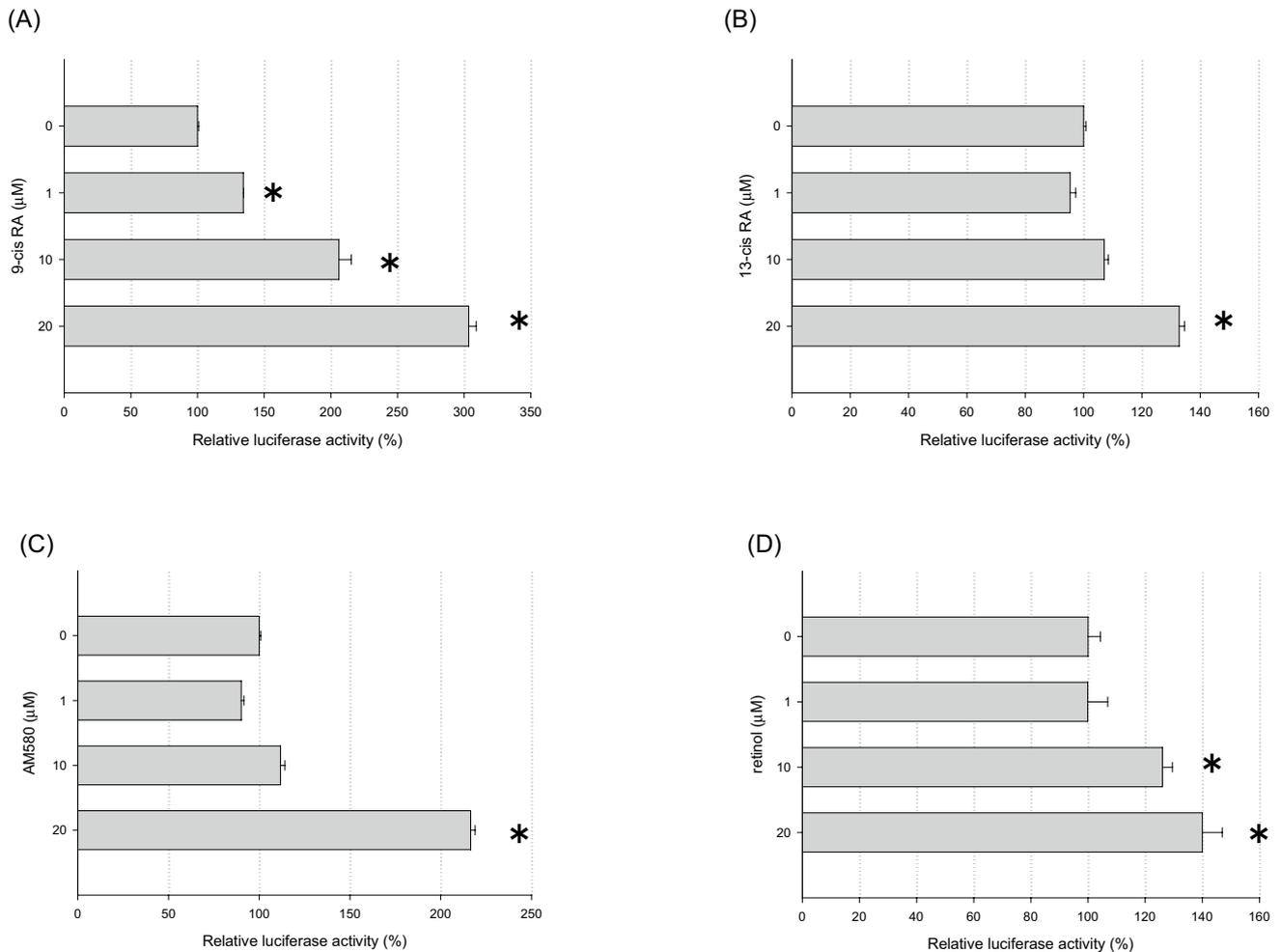


図3 他のレチノイド化合物によるNF- κ Bの活性化(24時間インキュベーション)。(A) 9-*cis* RA。(B) 13-*cis* RA。(C) AM580。(D) retinol. Mean \pm SD (n=3) * $p < 0.01$ vs. Control (各化合物0 μ M)。

ATRA (10 μ M) を24時間(図2A)あるいは48時間(図2B)投与し、リアルタイム定量的RT-PCR法でIL-8 mRNAの発現量を比較したところ、図2に示すようにIL-8の発現はATRAにより有意に増大していることが認められた。

3. NF- κ B活性に対する他のレチノイド化合物の影響

ATRA以外のレチノイド化合物の効果をみるため、HCT116細胞に9-*cis* RA(図3A)、13-*cis* RA(図3B)、AM580(図3C)、retinol(図3D)をそれぞれ投与し(24時間インキュベーション)、レポーター遺伝子解析によりNF- κ B活性の変化をみた。これらの図に示されているように、いずれの化合物も濃度依存性にNF- κ B活性を増大させている。

4. ATRAによるRARの活性化、およびATRAによるNF- κ B活性化に対するMAPキナーゼ阻害薬の影響

ATRAは本来RARリガンドとして機能しているので、HCT116細胞におけるRARの活性化をpRARE-TA-SEAPベクターを導入した細胞で検討した。図4Aに示すように、ATRAは濃度依存性にRARを活性化したが、ATRAによるNF- κ B活性化の場合と比較すると(図1参照)低い濃度域で有意な影響が認められ、0.1~1 μ MのATRAではSEAP活性は上昇したが、5 μ M以上の濃度ではATRAによるSEAP活性は減弱した。また、図4Bには、ATRAによるNF- κ B活性化に対する各種MAPキナーゼ阻害薬 {PD98059 (MEK 阻害薬) (10 μ M), SB203580 (p38 MAPキナーゼ阻害薬) (20 μ M), JNK inhibitor V (JNK 阻害薬) (10 μ M)} の影響を示す。各阻害薬はATRA投与1時間前に投与し、24時間後にNF- κ B活性を測定した。PD98059存在下ではATRAの

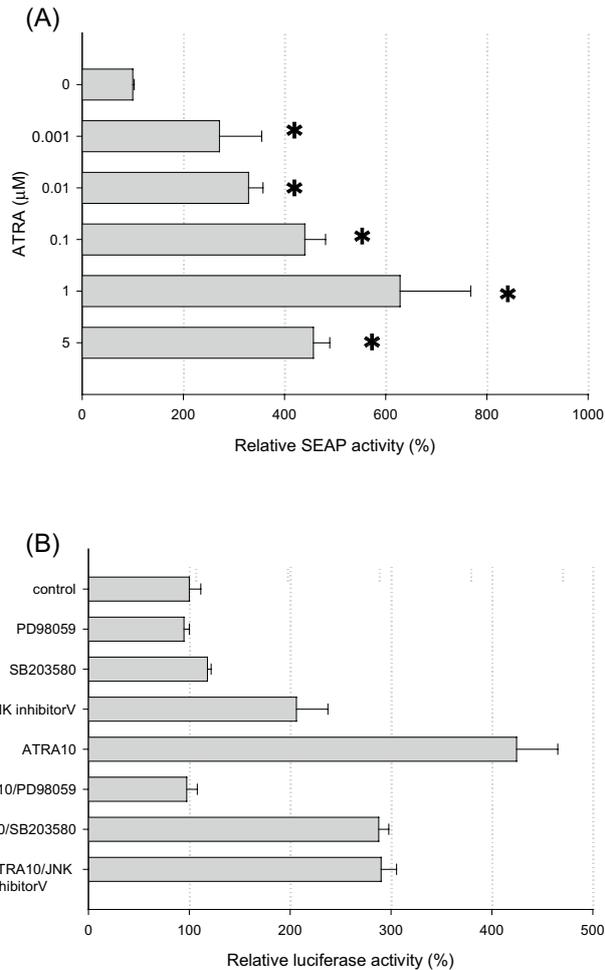


図4 (A) ATRAによるRARの活性化(HCT116細胞). Mean \pm SD (n=3) *p<0.01 vs. Control. (B) ATRA (10 μ M) によるNF- κ B活性化に対するMEK阻害薬(PD98059, 10 μ M), p38 MAPキナーゼ阻害薬(SB203580, 20 μ M), JNK阻害薬(JNK inhibitor V, 10 μ M)の影響. Mean \pm SD (n=3) *p<0.01 vs. Control.

効果はほとんど消失し、SB203580存在下でも部分的にATRAの効果が減弱している。JNK inhibitor Vの場合はそれ自体でNF- κ B活性に影響を与えているので結果の解釈は難しいが、ATRAあるいはJNK inhibitor V単独存在時のNF- κ B活性の和に比べると、ATRAおよびJNK inhibitor V同時投与時のNF- κ B活性は低くなっている。

5. ATRAとTNF- α との相互作用

次に、ATRAとTNF- α を同時投与した場合のNF- κ B活性の変化について検討を行った。図5は、HCT116細胞に対して、ATRA (10 μ M, 48時間)あるいはTNF- α (10 ng/ml, 24時間)を投与した群と、ATRA (10 μ M)を24時間プレインキュベーションした

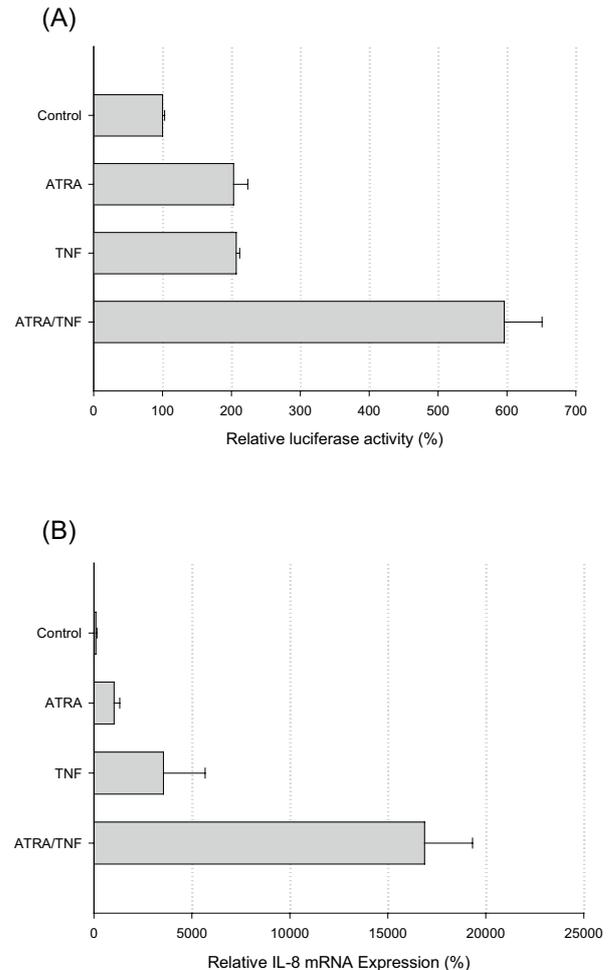


図5 ATRA (10 μ M)とTNF- α (10 ng/ml)との相互作用(HCT116細胞). (A) NF- κ Bの活性化. Mean \pm SD (n=3). (B) IL-8 mRNAの発現誘導. Mean \pm SD (n=3).

後にTNF- α (10 ng/ml)を加えて、ATRA + TNF- α をさらに24時間作用させた後のNF- κ B活性を比較したものである。この図に示されるように、ATRA + TNF- α 投与群では、それぞれを単独で投与した群と比較してNF- κ B活性が相乗的に増大することが認められた。

また、HCT116細胞で、ATRA (10 μ M)を24時間プレインキュベーションした後に、TNF- α (10 ng/ml)を6時間追加投与した時点でのIL-8 mRNA発現量を、それぞれ単独でATRA (24 + 6時間)あるいはTNF- α (6時間)投与後の発現量と比較した結果を図5Bに示すが、この場合もIL-8発現量はATRAとTNF- α により相乗的に増大している。

6. NF- κ Bサブユニット発現およびTNF- α 受容体発現に対するATRAの影響

ATRAがTNF- α によるNF- κ B活性化を相乗的に増

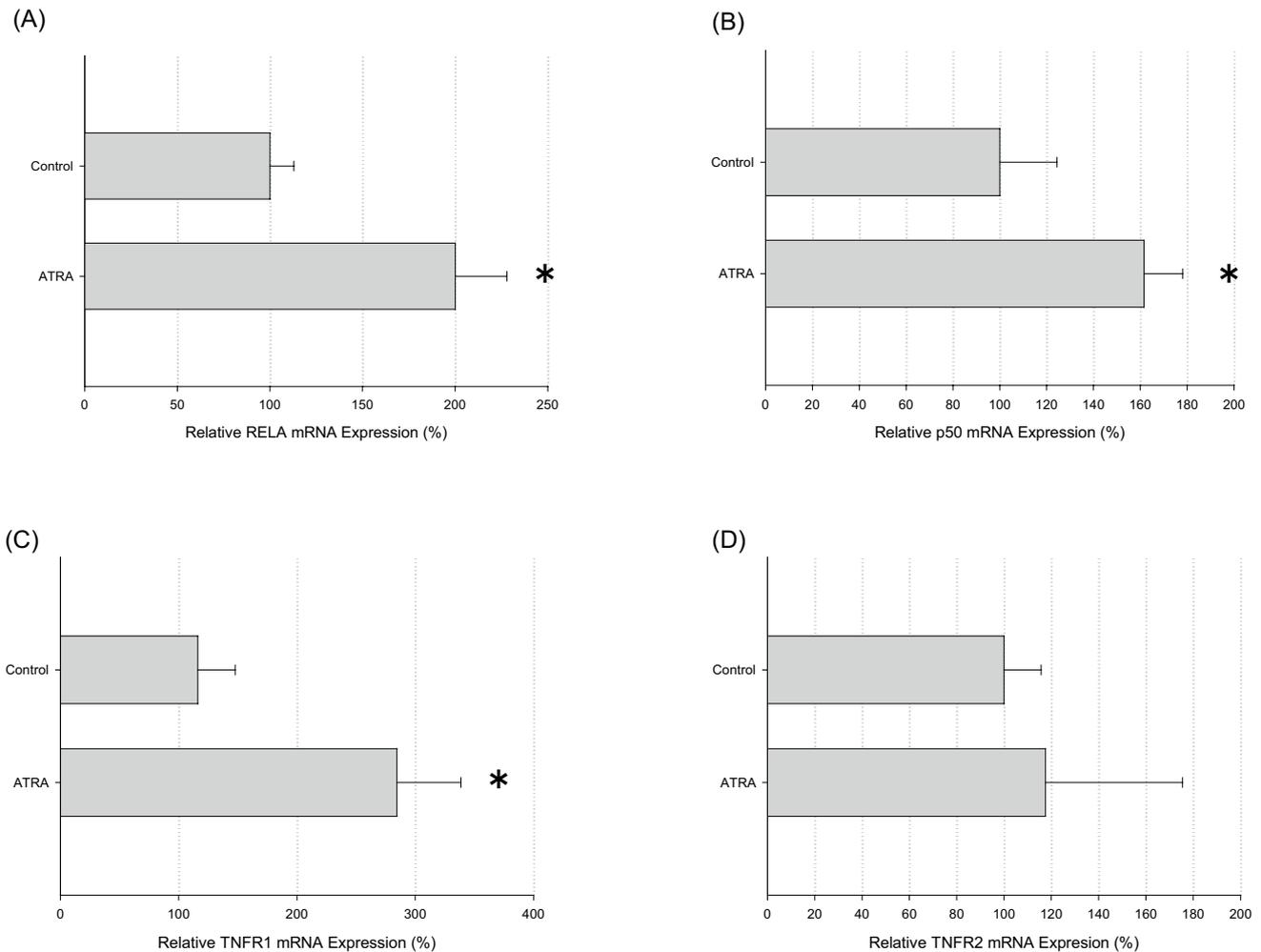


図6 RelA, p50, TNFR1, TNFR2発現に対するATRA (10 μ M, 24時間インキュベーション)の影響 (HCT116細胞). (A) RelA. (B) p50. (C) TNFR1. (D) TNFR2. Mean \pm SD (n=3) *p < 0.01 vs. Control.

大させることが認められたので、ATRA (10 μ M, 24時間投与)がNF- κ Bサブユニット (RelA, p50) およびTNF- α 受容体 (TNFR1, TNFR2)の発現量に影響を与えているか否かについてリアルタイム定量的RT-PCR法にて検討を行った。図6A-Dに示すように、ATRAはRelA, p50の発現量を有意に増大させており、また、TNFR1の発現量も有意に増大させていた。

考 察

本研究において我々は、大腸癌由来細胞株を用いて、NF- κ Bシグナリングに対するレチノイド化合物の影響について検討を行い、ATRAおよび他のレチノイド化合物 (9-*cis* RA, 13-*cis* RA, AM580, retinol)がNF- κ Bを活性化すること、ATRAがTNF- α によるNF- κ B活性化を相乗的に増大させることを認めた。また、NF- κ Bの標的遺伝子であるIL-8の発現もATRAによ

り誘導され、ATRAとTNF- α がIL-8誘導についても著明な相乗作用を有していることを確認した。

これまでにも、消化管以外の組織由来のいくつかの細胞種では、ATRAによるIL-8発現の誘導あるいはNF- κ Bの活性化が報告されている¹³⁻¹⁸⁾。ATRAによるNF- κ B活性化のメカニズムの詳細は不明であるが、図4Aに示したように、ATRAによるRARの活性化が低い濃度域で認められるのに対して、ATRAによるNF- κ Bの活性化には μ Mオーダーの濃度が必要である。したがって、ATRAによるNF- κ B活性化にはRARは直接的には関与していない可能性が高いと思われる。NF- κ Bの活性化は一般的にはI κ B kinase (IKK)がI κ Bをリン酸化することが必要であるが、非典型的なNF- κ B活性化経路も報告されており、この経路ではp38 MAPキナーゼが必要であるとされている¹⁰⁾。Daiら¹⁸⁾は、ケラチノサイトにおけるIL-8発現のATRAに

よる誘導がp38 MAPキナーゼ阻害薬によって抑制されることを報告しているが、本研究においてもATRAによるNF- κ Bの活性化はp38 MAPキナーゼ阻害薬であるSB203580によって抑制されているので、少なくとも部分的にはp38 MAPキナーゼがATRAによるNF- κ B活性化に関与しているかもしれない。また、本研究ではMEK阻害薬もATRAによるNF- κ B活性化を強力に抑制することが認められたが、この経路がどのように作用しているかは不明であり今後の検討課題である。

さらに、本研究ではATRAがNF- κ Bの主要なサブユニットであるRelAおよびp50の発現を増大させること、また、TNFレセプターのうちTNFR1の発現を有意に増大させることを示した。ATRAによるNF- κ Bサブユニットの発現量の変化はケラチノサイトでも認められているが¹⁸⁾、気道上皮細胞では明らかでない¹⁴⁾。また、ATRAによるTNF受容体発現量の増大は肺癌由来細胞株でも報告されている¹⁵⁾。これらの観察は、少なくとも部分的にはATRAとTNF- α との相乗作用の説明になりうると考えられる。臨床的な意義を考える上で、ATRAがTNF- α によるNF- κ Bの活性化を相乗的に増大させるという事実は重要である。

Isotretinoin (13-*cis* RA) の使用を契機として発症した炎症性腸疾患症例の中には使用中止後に速やかに改善している例もあるが、isotretinoin中止数年後にも炎症が継続している症例も報告されている⁷⁾。また、潰瘍性大腸炎と診断されている場合とCrohn病と診断されている場合があり、病態は一様でないようである⁹⁾。さらに、Crohn病患者に瘻瘻治療のため isotretinoin を使用して症状が悪化した症例も報告されており¹⁹⁾、これらの報告を総合すると、薬理学的な濃度のisotretinoinが、炎症性腸疾患発症のトリガー、あるいは増悪因子となっている症例があることは確かであると思われる。ただし、臨床的なエビデンスとしては、症例の蓄積は必ずしも十分ではないので、今後の検討がさらに必要であろう²⁰⁾。

本研究で主として使用したATRAは13-*cis* RAよりもNF- κ Bを強く活性化したが、ATRAは臨床的には急性前骨髄性白血病の治療に用いられている。ATRAの臨床的な使用に伴う副作用としてはレチノイン酸症候群が重要であるが、レチノイン酸症候群の場合は呼吸器症状が前面に出て全身症状も重篤なので、消化管病変についてはあまり注目されていない。しかしながら、レチノイン酸症候群の発症にも、ATRA刺激で過剰に産生されたIL-1 β 、IL-6、IL-8、TNF- α などの炎症性サイトカインが重要な役割を果たしていると考えられているので²¹⁾、消化管が精査された場合には何らかの病変のある確率は高いと思われる。

生理的にビタミンAは免疫系の調節にも重要な役割を有しており²²⁾、ビタミンAの補給は感染性下痢症の重症度を低下させることが知られている²³⁾。また、ATRAはTh1細胞への分化を抑制して、Th2細胞への分化を促進することや²⁴⁾、T細胞に小腸組織へのホーミング特異性を与える指令物質であることも提唱されている²⁵⁾。さらに、ATRAによりTregとTh17のバランスを調整することで、ATRAを逆に炎症性腸疾患の治療に用いようとする試みも行われているが²⁶⁾、本研究の結果およびisotretinoinと炎症性腸疾患に関するこれまでの臨床的なデータを基にすると、レチノイド化合物による炎症性腸疾患の治療の試みの妥当性については疑問が残る。

結 論

ATRAおよび他のレチノイド化合物は、大腸癌由来細胞株においてNF- κ Bを活性化し、NF- κ Bの標的遺伝子であるIL-8の発現もATRAにより誘導されることを見出した。また、TNF- α によるNF- κ Bの活性化、IL-8発現の誘導はATRAにより相乗的に増大した。これらの結果より、レチノイン酸は大腸上皮細胞においてNF- κ Bシグナリングを活性化し、炎症刺激に対する感受性を増大させている可能性が示唆された。

謝 辞 稿を終えるにあたり、ご協力を賜りました田部井恭子さん(獨協医科大学臨床医学研究センター)に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Chambon P : A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J* **10** : 940-954, 1996.
- 2) Bastien J, Rochette-Egly C : Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes. *Gene* **328** : 1-16, 2004.
- 3) Brodin MB : Inflammatory bowel disease and isotretinoin. *J Am Acad Dermatol* **14** : 843, 1986.
- 4) Martin P, Manley PN, Depew WT, et al : Isotretinoin-associated proctosigmoiditis. *Gastroenterology* **93** : 606-609, 1987.
- 5) Prokop LD : Isotretinoin : possible component cause of inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* **94** : 2568, 1999.
- 6) Reniers DE, Howard JM : Isotretinoin-induced inflammatory bowel disease in an adolescent. *Ann Pharmacother* **35** : 1214-1216, 2001.
- 7) Passier JLM, Srivastava N, Puijtenbroek EP : Isotretin-

- oin-induced inflammatory bowel disease. *Netherlands J Medicine* **64** : 52-54, 2006.
- 8) Spada C, Riccioni ME, Marchese M, et al : Isotretinoin-associated pan-enteritis. *J Clin Gastroenterol* **42** : 923-925, 2008.
 - 9) Reddy D, Siegel CA, Sands BE, et al : Possible association between isotretinoin and inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* **101** : 1569-1573, 2006.
 - 10) Tergaonkar V : NF κ B pathway : a good signaling paradigm and therapeutic target. *Int J Biochem Cell Biol* **38** : 1647-1653, 2006.
 - 11) Pahl HL : Activators and target genes of Rel/NF- κ B transcription factors. *Oncogene* **18** : 6853-6866, 1999.
 - 12) Shimada T, Koitabashi A, Fujii Y, et al : PPAR gamma mediates NSAIDs-induced upregulation of TFF2 expression in gastric epithelial cells. *FEBS Lett* **558** : 33-38, 2004.
 - 13) Harant H, de Martin R, Andrew PJ, et al : Synergistic activation of interleukin-8 gene transcription by all-trans retinoic acid and tumor necrosis factor- α involves the transcription factor NF- κ B. *J Biol Chem* **271** : 26954-26961, 1996.
 - 14) Chang MM, Harper R, Hyde DM, et al : A novel mechanism of retinoic acid-enhanced interleukin-8 gene expression in airway epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* **22** : 502-510, 2000.
 - 15) Manna SK, Aggarwal BB : All-trans-retinoic acid up-regulates TNF receptors and potentiates TNF-induced activation of nuclear factors- κ B, activated protein-1 and apoptosis in human lung cancer cells. *Oncogene* **19** : 2110-2119, 2000.
 - 16) Witcher M, Ross DT, Rousseau C, et al : Synergy between all-trans retinoic acid and tumor necrosis factor pathways in acute leukemia cells. *Blood* **102** : 237-245, 2003.
 - 17) Farina AR, Masciulli MP, Tacconelli A, et al : All-trans-retinoic acid induces nuclear factor κ B activation and matrix metalloproteinase-9 expression and enhances basement membrane invasivity of differentiation-resistant human SK-N-BE 9N neuroblastoma cells. *Cell Growth Differ* **13** : 343-354, 2002.
 - 18) Dai X, Yamasaki K, Shirakata Y, et al : All-trans-retinoic acid induces interleukin-8 via the nuclear factor- κ B and p38 mitogen-activated protein kinase pathways in normal human keratinocytes. *J Invest Dermatol* **123** : 1078-1085, 2004.
 - 19) Godfrey KM, James MP : Treatment of severe acne with isotretinoin in patients with inflammatory bowel disease. *Br J Dermatol* **123** : 653-655, 1990.
 - 20) Crockett SD, Gulati A, Sandler RS, et al : A causal association between isotretinoin and inflammatory bowel disease has yet to be established. *Am J Gastroenterol* **104** : 2387-2393, 2009.
 - 21) Patatanian E, Thompson DF : Retinoic acid syndrome : a review. *J Clin Pharm Ther* **33** : 331-338, 2008.
 - 22) Chales B Stephensen : Vitamin A, infection, and immune function. *Annu. Rev. Nutr* **21** : 167-192, 2001.
 - 23) Villamor E, Fawzi WW : Vitamin A supplementation : implications for morbidity and mortality in children. *J Infect Dis* **182** : S122-133, 2000.
 - 24) Iwata M, Eshima Y, Kagechika H : Retinoic acids exert direct effects on T cells to suppress Th1 development and enhance Th2 development via retinoic acid receptors. *Int Immunol* **15** : 1017-1025, 2003.
 - 25) Iwata M, Hirakiyama A, Eshima Y, et al : Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells. *Immunity* **21** : 527-538, 2004.
 - 26) Bai A, Lu N, Guo Y, et al : All-trans retinoic acid down-regulates inflammatory responses by shifting the Treg/Th17 profile in human ulcerative and murine colitis. *J Leukoc Biol* **86** : 959-969, 2009.

Retinoic acid activates NF- κ B signaling in colonic epithelial cells

Mariko Uchizono and Tadahito Shimada

Department of Gastroenterology, Dokkyo Medical University, Mibu, Tochigi 321-0293, Japan

All-trans retinoic acid (ATRA) is a ligand for the retinoic acid receptor (RAR), a member of the nuclear receptor superfamily, and it is well established that RARs play a critical role in the development and differentiation of various organs including gastrointestinal tract. Recently, several case reports suggested a possible association between the clinical use of retinoic acid and inflammatory bowel diseases. However, it is not known whether ATRA affects the inflammatory response of colonic epithelial cells. In this study, we examined the effect of ATRA on NF- κ B activity and IL-8 expression in colonic epithelial cells *in vitro*. NF- κ B activation and RAR activation were assessed by the reporter gene assay and IL-8 mRNA expression was assessed by the real-time quantitative RT-PCR. ATRA and other retinoid compounds (9-*cis* retinoic acid, 13-*cis* retinoic acid, AM580 and retinol) activated NF- κ B in a dose- and time-dependent manner in colonic cell lines (HCT116, Caco2,

SW480, DLD-1, and LS174T). However, compared to RAR activation, much higher concentrations of ATRA were needed to activate NF- κ B. ATRA also up-regulated the expression of IL-8, a target gene of NF- κ B. ATRA-induced NF- κ B activation was repressed by a MEK inhibitor and a p38 MAP kinase inhibitor. Preincubation with ATRA significantly potentiated TNF- α -induced activation of NF- κ B and TNF- α -induced expression of IL-8. ATRA was found to up-regulate the expression of NF- κ B subunits (RelA and p50) and TNF- α receptor 1. These results suggest that ATRA and other retinoid compounds can activate NF- κ B signaling and potentiate the inflammatory response to TNF- α in colonic epithelial cells.

Key words : colonic epithelial cells, all-trans retinoic acid, NF- κ B, IL-8, TNF- α