

平成 30 年 6 月 28 日現在

機関番号：34401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19354

研究課題名(和文) ERストレス誘導性細胞死の制御を標的としたNSAIDs起因性小腸潰瘍治療戦略

研究課題名(英文) The manipulation of ER stress-induced cell death as a therapeutic strategy for NSAIDs-induced intestinal ulcer.

研究代表者

小嶋 融一 (Yuichi, Kojima)

大阪医科大学・医学部・助教

研究者番号：10747744

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、NSAIDs起因性小腸障害におけるERストレス、オートファジー、及びアポトーシスの関与を明らかにし、小腸潰瘍治療の新たな分子標的を見出す事を目的とした。課題期間中に、オートファジーやコラーゲンの分解がNSAIDs起因性小腸障害に関連する事を申請者の所属する研究室が報告しているが、そのメカニズムとして、ERストレスに関連したユビキチン化反応を触媒するE3リガーゼ、Von Hippel Lindau (pVHL)が関与している事を報告した。これらを元に最終年度(平成29年)には研究成果を総説として発表することができた。加えて、実際にヒトでの治療を最適化するための臨床的知見も報告した。

研究成果の概要(英文)：Our aim was to discover a novel therapeutic molecular target for NSAIDs-induced intestinal ulcer. To achieve this, we explored how ER stress response, autophagy, and apoptosis were mutually interacted in the onset and development of the disorder. During a period of this grant, our colleagues reported that NSAIDs-induced intestinal ulcer was mitigated in intestine-specific autophagy-deficient mice, and a collagen loss caused by the fascinated turnover contributed to the onset of the disorder. Subsequently, we revealed that the fascinated turnover of collagen was caused by an E3 ligase, pVHL, which was published in peer-reviewed journal. Consequently, we could our research in review article in 2017. In addition, we published several clinical reports in regard to maximizing the established pharmacological therapy by using a state of art endoscopic investigation.

研究分野：下部消化管疾患

キーワード：ERストレス オートファジー NSAIDs 誘引性小腸潰瘍

1. 研究開始当初の背景

非ステロイド系消炎鎮痛薬 (NSAIDs) は、関節リウマチ、頭痛、手術後疼痛等に対し、広汎に用いられている。一方で、NSAIDs は胃粘膜において、びらん・出血・穿孔を伴う潰瘍など多様な病変を出現させることが知られている。近年、カプセル内視鏡 (capsule endoscopy : CE) やダブルバルーン内視鏡の発達により、NSAIDs が胃のみならず小腸および大腸にも粘膜傷害を惹起することが知られるようになった。酸が関与しない小腸障害の機序については、酸化ストレスによる粘膜透過性の亢進が炎症を引き起こす事等が考えられているが、その詳細な分子機序については不明な点が多い。

2. 研究の目的

NSAIDs が上部消化管のみならず小腸でも頻繁に粘膜障害を引き起こしている事が明らかとなってきた。ER ストレス応答は、酸化ストレス等小胞体ストレスに対する生体の応答反応であり、その破綻は癌、神経変性疾患のみならず、クローン病等消化管粘膜傷害の原因となることが報告されている。本研究は、NSAIDs 起因性小腸障害における ER ストレス、オートファジー、及びアポトーシスの役割を分子レベルで明らかにし、小腸潰瘍治療の新たな分子標的を見出すことを目的とした。本報告書では、以下の2つの個別研究課題について報告する。

NSAIDs 起因性小腸障害におけるアポトーシス誘導死に關与するコラーゲン分解機構の解明

(個別背景) NSAIDs 起因性小腸障害においては小腸上皮細胞のアポトーシスの亢進が報告されている。アポトーシスの亢進には NSAIDs 処理による酸化ストレスの増加や細胞の透過性の上昇など、様々な要因が示唆されているが、不明な点が多い。近年、申請者の研究室が、ラット小腸上皮細胞 IEC6 細胞を用いて、NSAIDs 処理群と未処理群のプロテオミクス解析を行ったところ、主要な細胞外マトリクスである I 型コラーゲンの減少を見出した。I 型コラーゲンの減少が、アポトーシス上昇の要因であることは、short inhibitory RNA (siRNA) を用いたコラーゲン遺伝子の発現抑制が NSAIDs に関係なくアポトーシスを誘導することに明らかにした。このことは NSAIDs による小腸上皮細胞のアポトーシス誘導にはコラーゲンの減少が深く関わっていることを強く示唆した (参考文献 1)。しかし、NSAIDs ? コラーゲンの減少 アポトーシス誘導において、どのような機序あるいは分子が、コラーゲンの減少を引き起こしているかその機序は明らかとされなかった。そこで、我々は、コラーゲン減少を引き起こす機序及び関連分子を明らかにすることを目的とした。

②ER ストレス反応を標的とした NSAIDs 起因性小腸障害の軽減効果の基礎研究

について明らかにすることを目的とした。

(個別背景)

ER は新規に合成された分泌及び膜タンパク質の折り畳みの場であり、恒常的にタンパク質が流れ込んでいる。ER には品質管理のためのシステムが存在し、正常タンパク質のみを通過させ、異常タンパク質はこれを認識して分解する小胞体分解 (ERAD) 系が存在する。しかし、何らかの異常により、過剰なタンパク質や異常なタンパク質が流入、或いは、折り畳み補助タンパク質 (シャペロン) の異常があると、ER における正常なタンパク質通過が停滞し、いわゆる ER ストレスが引き起こされる。ER ストレス下では、小胞体ストレス応答 (UPR) や ERAD 系が亢進し、増加した異常タンパク質は急速に修復されたり分解されたりする。これが ER ストレス応答反応である。

小腸特異的オートファジー欠損マウス (Atg5KO) に NSAIDs 起因性小腸障害を誘導すると、予想に反して症状の軽減が見られた。これを詳細に検討すると、Atg5KO では、緩やかな酸化ストレスの上昇が起きていた (引用文献 2)。NSAIDs 処理時に起こる、生体の防御反応のひとつに NRF/HO-1 タンパク質の誘導を伴う酸化ストレス応答反応がある。レバミピドやランソプラゾールといった NSAIDs による小腸障害に一定の効果があることが示唆される薬剤によっても強く誘導される (引用文献 3)。

我々は、Atg5KO において、消化管が恒常的に弱い酸化ストレスにさらされていることにより、NSAIDs 処理時に強い酸化ストレス応答が引き起こされていることに注目した。この現象は循環器疾患における、虚血・再灌流障害が前もって弱い酸化ストレスにさらされることによって軽減される、いわゆるブレコンディショニングにあたるのではないかと考えた。そこで本研究は、ER ストレス応答反応においてもブレコンディショニングが NSAIDs 起因性小腸障害の軽減につながるかどうかについての基礎的な知見を得ることを目的とした。

これらの研究成果について詳細に報告する。

3. 研究の方法

NSAIDs 起因性小腸障害におけるアポトーシス誘導死に關与するコラーゲン分解機構の解明

(方法)

IEC6 細胞の NSAIDs 起因性小腸障害モデル (IEC6 細胞を 200 μ M indomethacin (IM) により 24 - 48 時間処理) を用いて、Von Hippel Lindau (VHL) タンパク質 (pVHL) 発現量の変化を解析した。

pVHL のコラーゲン発現量に対する影響については、VHL 遺伝子を標的とした siRNA 処理及び VHL 遺伝子強制発現 IEC6 細胞を用いて解析した。評価は、I 型コラーゲン (Col1 α)、pVHL、Hypoxia-inducible factor 1 (HIF1

等タンパク質発現量変化については Western blot 法、アポトーシス誘導を示唆する細胞生存率は Cell-counting kit 8 を用いて測定した。

②ER ストレス反応を標的とした NSAIDs 起因性小腸障害の軽減効果の基礎研究

予め、低濃度の ER ストレス誘導剤、Thapsigarsin (TG) 処理した IEC6 細胞を 200 μ M IM 存在下で培養し、その後、GRP78、 α -Tubulin のタンパク質発現は Western blot 法、そして、細胞生存率は Cell-counting kit 8 を用いて測定した。

4. 研究成果

NSAIDs 起因性小腸障害におけるアポトーシス誘導死に関与するコラーゲン分解機構の解明

IM による VHL タンパク質の誘導。

コラーゲンの NSAIDs による減少が、タンパク質分解の亢進によるものと仮定すると、2 つの経路の亢進が予想される。リソソームによる分解の亢進かユビキチン/プロテオソーム経路 (UPR) の亢進である。後者の場合、その特異性を決めているのは E3 リガーゼと呼ばれる分子である。我々はコラーゲンのプロリンが水酸化されていることに注目した。pVHL と呼ばれる E3 リガーゼは HIF-1 の分解に関わり、その異常は VHL 病あるいは腎細胞ガンに関与している E3 リガーゼである。HIF-1 の分解はその水酸化状態によって制御されており、低酸素状態では水酸化 HIF-1 が減少することにより pVHL によるユビキチン化、しいてはプロテオソームに分解を回避するために安定化すると考えられている。すなわち、pVHL はタンパク質の水酸化状態を認識してユビキチン化している可能性があり、水酸化タンパク質であるコラーゲンもその基質となりうる可能性を示唆している。最初に我々は IM 処理と pVHL の関連について調べた。その結果、IM 処理は時間依存的に pVHL の発現を誘導し、そのピークは IM による細胞障害が著明な処理後 24h であることが明らかとなった (図 1A)。興味深いことに、IM による pVHL の誘導はラジカルスカベンジャー、Mn(III)TMPyp により有意に抑制されていた (図 1B)。

次に、pVHL の誘導と IM による細胞障害性との関連を調べるため、siRNA により pVHL の発現を抑制した IEC6 細胞を用いて IM に障害を検討した。IM は未処理あるいはコントロール siRNA 処理細胞に対して、約 20% 細胞生存率を低下させたが、siRNA により pVHL の発現を抑制した IEC6 細胞では有意に細胞生存率が上昇していた (図 2)。

すなわち、IM による IEC6 細胞の障害には pVHL の発現誘導、言い換えると、pVHL によってユビキチン化されるタンパク質の分解が必要であることが示唆された。

図 1、2 により IM による細胞障害には pVHL によるタンパク質分解が関与していることが示唆されたが、このタンパク質がコラーゲン

であるかどうかは不明である。我々は pVHL の既知基質である HIF-1 の関与がないことはすでに確かめている。

図 1 . IEC6 細胞における IM による pVHL の誘導

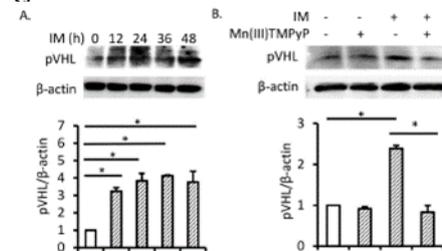
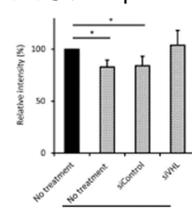
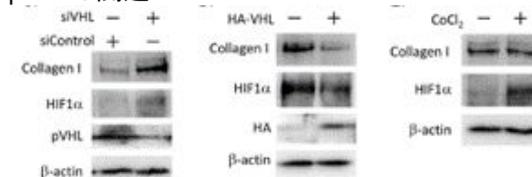


図 2 . IEC6 細胞における IM 起因性細胞障害に対する pVHL の関与



コラーゲン発現量と pVHL の発現量の関係は siRNA により pVHL 発現が抑制された IEC6 細胞および pVHL 遺伝子を過剰発現した IEC6 細胞を用い、コラーゲンの量を測定することにより検討した。CoCl₂ は HIF-1 の安定化をもたらすが、コラーゲン発現量には変化は見られなかった。これは IEC6 細胞において両タンパク質の制御機序が異なることを強く示唆した。予想されたように、pVHL 発現とコラーゲンの発現量は逆相関しており、pVHL が IM によるコラーゲン分解を制御する重要なタンパク質であることが強く示唆された (図 3)。pVHL の発現誘導とコラーゲン量の減少は IM 経口投与マウスにおいても観察された。

図 3 . IEC6 細胞におけるコラーゲン発現量と pVHL の関連



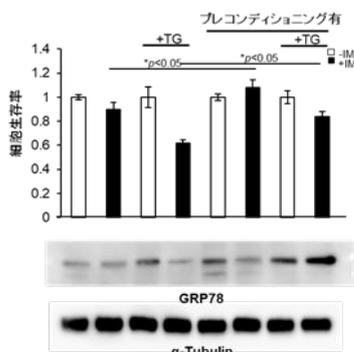
本研究により我々は、pVHL がコラーゲンを分解することにより NSAIDs によるアポトーシス誘導の誘導に関与していることを明らかにすることが出来た。

②ER ストレス反応を標的とした NSAIDs 起因性小腸障害の軽減効果の基礎研究

ER ストレスプレコンディショニングの IM 起因性の小腸細胞障害軽減効果を検討するために、低濃度 TG で数時間前処理した IEC6 細胞における、TG (1 μ M) による ER ストレス存在下での IM による IEC6 細胞の細胞障害を検討した。プレコンディショニングがない場合、TG の存在は顕著に IM による細胞障害を増悪した。一方、プレコンディショニングされた IEC6 細胞では、有意に細胞障害が軽減していた。ER ストレス応答反応の指標である GRP78

の発現量はプレコンディショニングにより増加していた(図4)。

図4. ERストレスプレコンディショニングのIMによるIEC細胞障害軽減効果



本研究では詳細な分子機序は明らかにすることが出来なかったが、プレコンディショニングがNSAIDs起因性小腸障害を軽減する可能性が強く示唆された。現在、本効果の詳細な分子機序と治療法としての可能性を検討中である。

<引用文献>

1. Harada S, Nakagawa T, Yokoe S, Edogawa S, Takeuchi T, Inoue T, Higuchi K, Asahi M, Autophagy Deficiency Diminishes Indomethacin-Induced Intestinal Epithelial Cell Damage through the Activation of ERK/Nrf2/HO-1 Pathway. *J Pharmacol Exp Ther* 査読有, 355(3), 353-361, 2015, DOI: 10.1124/jpet.115.226431.
2. Edogawa S., Sakai A., Inoue T *et al.* Down-regulation of collagen I biosynthesis in intestinal epithelial cells exposed to indomethacin: a comparative proteome analysis. *J Proteomics*, 査読有, 102(3), 35-46, 2014, DOI: 10.1016/j.jprot.2014.03.022.
3. Yoda Y, Amagasa K, Kato S, Higuchi K *et al.* Prevention by lansoprazole, a proton pump inhibitor, of indomethacin-induced small intestinal ulceration in rats through induction of heme oxygenase-1. *J Physiol Pharmacol*. 査読有, 61(3), 2010, PMID: 20610858

5. 主な発表論文

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計7件)

1. 中川孝俊、小嶋融一、樋口和秀、朝日通雄、オートファジーとERストレス応答の制御を標的としたNSAIDs起因性小腸潰瘍治療戦略. *BIO Clinica*. 査読無, 55-61, 2017
2. Ota K, Takeuchi T, Ozaki H, Kawaguchi S, Takahashi Y, Harada S, Edogawa S, Kojima Y, Kuramoto T, Higuchi K. Determination of the adequate dosage of rebamipide, a gastric mucoprotective drug, to prevent low-dose aspirin-induced gastrointestinal mucosal injury. *J Clin*

Biochem Nutr. 査読有, 59 (3), 231-7, 2016, DOI: 10.3164/jcfn.16-49

3. Kojima Y, Takeuchi T, Egashira Y, Higuchi K. Endoscopic Submucosal Dissection for Gastric Arteriovenous Malformation. *Intern. Med.* 査読有, 55(21), 3221-3, 2016, DOI: 10.2169/internalmedicine.55.7241

4. Kojima Y, Takeuchi T, Ota K, Harada S, Edogawa S, Narabayashi K, Nouda S, Okada T, Kakimoto K, Kuramoto T, Inoue T, Higuchi K. Effect of long-term proton pump inhibitor therapy and healing effect of irsogladine on nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced small-intestinal lesions in healthy volunteers. *J Clin Biochem Nutr*. 査読有, 57 (1) 60-5, 2015, DOI: 10.3164/jcfn.15-32.

5. Edogawa S, Takeuchi T, Kojima Y, Ota K, Harada S, Kuramoto T, Narabayashi K, Inoue T, Higuchi K. Current Topics of Strategy of NSAID-Induced Small Intestinal Lesions. *Digestion*, 査読有, 92(2), 99-107, 2015

6. Ota K, Nouda S, Takeuchi T, Iguchi M, Kojima Y, Kuramoto T, Inoue T, Shindo Y, Uesugi K, Fujito Y, Nishihara H, Ohtsuka N, Higuchi K. What Kind of Capsule Endoscope Is Suitable for a Controllable Self-Propelling Capsule Endoscope? Experimental Study Using a Porcine Stomach Model for Clinical Application (with Videos). *PLoS One*, 査読有, 10(10), 1-11, 2015, DOI: 10.1371/journal.pone.0139878.

7. Yokoe S, Nakagawa T, Kojima Y, Higuchi K, Asahi M. Indomethacin-Induced Intestinal Epithelial Cell Damage is Mediated by pVHL Activation through the Degradation of Collagen I and HIF-1. *BBRC*, 査読有, 468(4), 671-6, 2015, DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.11.014.

[学会発表](計0件)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

小嶋 融一 (Yuichi Kojima)

大阪医科大学・医学部・講師

研究者番号: 10747744

(2)研究分担者(0名)

(3)連携研究者(0名)

(4)研究協力者

中川 孝俊 (Takatoshi Nakagawa)

原田 智 (Satoshi Harada)

朝日 通雄 (Michio Asahi)

樋口 和秀 (Kazuhide Higuchi)