

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19790037  
 研究課題名（和文） オーバーハウザーMRI を用いた炎症性腸疾患に関わる活性酸素・活性窒素生成の解析  
 研究課題名（英文） Analysis of reactive oxygen/nitrogen generation associated with ulcerative colitis with Overhauser-enhanced MRI  
 研究代表者  
 安川 圭司（YASUKAWA KEIJI）  
 九州大学・大学院薬学研究院・助教  
 研究者番号：80372738

## 研究成果の概要：

潰瘍性大腸炎やクローン病は代表的な炎症性腸疾患であり、いずれも厚生労働省の特定疾患指定の難病で根治は極めて困難である。従って、潰瘍性大腸炎やクローン病の根本的治療法の確立や治療薬の開発・効能評価の為に、発症から進展に至るまでのメカニズム解明が急務である。一方、潰瘍性大腸炎やクローン病の病態形成に活性酸素や活性窒素の関与が示唆されている。最近、新規ラジカル画像化装置であるオーバーハウザーMRI(OMRI、または PEDRI)、および膜透過性の異なるニトロキシラジカルを用いて、DSS 惹起大腸炎を含む複数の疾患モデルで、細胞内と外での生体レドックス動態をリアルタイムで比較検討する手法を確立した。しかし、このレドックス変動が活性酸素または活性窒素の産生に起因するのか、また、その炎症性腸疾患の発症・進展との関連性について、詳細は検討されていない。

そこで本研究では、デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)などにより作成した大腸炎モデル動物において、OMRI 同時分離画像化法と組織学的手法などを併用し、病態の発症から進展に至るまでの一連の過程における活性酸素・活性窒素動態を検討した。

大腸炎の肉眼的・組織学的傷害がまだ観察されないDSS処置3日群では、直腸上皮細胞内でのみOMRI画像輝度の減少が認められ、その減少は膜透過性抗酸化剤DMSOのニトロキシルプローブとの同時投与や誘導型NOS(iNOS)阻害剤aminoguanidineの前処置により完全に抑制された。血便が現れ始め、直腸付近の上皮欠落が認められるDSS5日群では、結腸下部と直腸の上皮細胞内でOMRI画像輝度の減少が認められ、その減少はDMSOやaminoguanidineにより抑制された。著しい貧血や血便が観察され、大腸全体の上皮欠落、炎症性細胞の粘膜内浸潤が認められるDSS7日群では、大腸上皮の細胞内のみでなく細胞外でもOMRI画像輝度が減少し、その減少はDMSOやaminoguanidineにより完全に抑制された。また、Western Blot法で大腸粘膜iNOSタンパク発現を検討した結果、DSS3日群に結腸下部と直腸で増強し、その増強は7日群まで増大した。グリース法で大腸粘膜中のNO産生を評価した結果、5日群では結腸下部と直腸で増加し、7日群では、結腸下部と直腸での増加が更に亢進したことから、iNOSタンパク発現の結果と一致しており、確かに、結腸下部と直腸で発現したiNOS蛋白から産生したNOが上皮細胞内でのレドックス変動に寄与することが示唆された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	0	1,500,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	2,900,000	420,000	3,320,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：フリーラジカル、レドックス、活性酸素、一酸化窒素、潰瘍性大腸炎、オーバーハウザーMRI

## 1. 研究開始当初の背景

潰瘍性大腸炎やクローン病は代表的な炎症性腸疾患であり、いずれも厚生労働省の特定疾患指定の難病である。潰瘍性大腸炎はびまん性の大腸特異的に連続的に発症する疾患で、国内患者数は毎年約5千人増加し、平成14年現在77,073人(特定疾患医療受給者証交付件数)に到達した。病因としては、遺伝的因子と環境因子が複雑に関与し、消化管の免疫担当細胞を介して腸管局所でのTh2型優位の免疫応答を引き起こし、発症と炎症の持続を繰り返していると考えられているが、未だ詳細は不明である。一方、クローン病は消化管全体に非連続的に炎症や潰瘍が発生する疾患で、国内患者数は毎年約1,500人増加し、平成16年現在では23,188人である。病因としては遺伝的因子と環境因子が複雑に関与するほか、潰瘍性大腸炎とは異なり、Th1型優位の異常反応が生じていると考えられているが、未だ詳細は不明で、根治は極めて困難である。従って、潰瘍性大腸炎やクローン病の根本的治療法の確立や治療薬の開発・効能評価の為には、発症から進展に至るまでのメカニズム解明が急務である。

一方、潰瘍性大腸炎やクローン病の病態形成に活性酸素や活性窒素の関与が示唆されている。活動型の潰瘍性大腸炎患者の末梢血中で活性酸素産生が認められるとの臨床知見、活動型の潰瘍性大腸炎やクローン病の患者大腸粘膜でNO産生の増加が見られるとの報告から、フリーラジカル消去が病態治療の鍵となる可能性を有している。しかし、国内外の研究グループで報告された例はほとんどフリーラジカルが生成した結果を評価している。

最近、新規ラジカル画像化装置であるオーバーハウザーMRI(OMRI、またはPEDRI)、および膜透過性の異なるニトロキシルラジカルを<sup>14</sup>Nまたは<sup>15</sup>Nで標識したプローブ剤を用いて、厚さ約8ナノメートルのリポソーム膜の内と外でのレドックス動態を各々区別し、かつ同時に画像化することに世界で初めて成功し、OMRI同時分離画像化法の病態解析への可能性が期待された。そこで、<sup>14</sup>N標識膜透過性プローブ剤と<sup>15</sup>N標識非膜透過性プローブ剤の混合溶液をDSS処置7日群のマウスに直腸内投与すると、各々の画像が同時に得られ、その直後に撮像したMRI画像と一致したことから、同一個体の大腸での膜透過性の異なる2種のフリーラジカル分布を視覚化できることを示した。また、大腸炎の発症段階であるDSS3日群と5日群では、<sup>14</sup>N体のみOMRI画像輝度の減衰が見られたのに対し、DSS7日群では、<sup>14</sup>N体、<sup>15</sup>N体ともに画像輝度減衰が認められ、大腸上皮細胞の内と外でのレドックス変動をリアルタイムで比

較評価できることを示した。

以上のように、これまでの研究成果から、DSS惹起大腸炎を含む複数の疾患モデルで、細胞内と外での生体レドックス動態をリアルタイムで比較検討する手法を確立した。しかし、このレドックス変動が活性酸素または活性窒素の産生に起因するのか、また、その炎症性腸疾患の発症・進展との関連性について、詳細は検討されていない。

## 2. 研究の目的

デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)などの処置により惹起した大腸炎モデル動物において、OMRI同時分離画像化法と組織学的手法、分子生物学的手法を併用し、病態の発症から進展に至るまでの一連の過程における活性酸素・活性窒素動態を検討した。また、ニトロキシルプローブ剤のオーバーハウザーMRI(OMRI)画像輝度減衰とフリーラジカルとの定量的関係について、詳細に検討した報告例はない。そこで、NO発生系としてNOC7を用い、各種プローブ剤とNOC7より産生したNOとの反応性を、XバンドESRで検討した。

## 3. 研究の方法

### (1)大腸炎の作製

大腸炎は、ヒト潰瘍性大腸炎のモデルとして汎用されているデキストラン硫酸ナトリウム(DSS)およびクローン病のモデルとして汎用されているトリニトロベンゼンスルホン酸(TNBS)を用いて惹起した。DSS誘発大腸炎は、水道水に溶解した3%DSS(分子量5,000)をICRマウス(雄性、5週齢)に3,5、または7日間自由飲水させることで作製した。また、TNBS誘発大腸炎は、Balb/cマウス(雌性、8週齢)を24時間絶食後、イソフルラン麻酔下、50%エタノールに溶解したTNBS(1.7mg/kg)を直腸内投与することで作製した。

### (2) OMRI撮像

大腸炎マウスを24時間絶食し、ウレタン(2g/kg, i.m.)麻酔下、盲腸-大腸間を結紮し、<sup>14</sup>N-MC-PROXYL(2.5mM)または<sup>14</sup>N-MC-PROXYLと<sup>15</sup>N-carboxy-PROXYLの混合溶液を直腸内投与し、直後よりCORONAL面にてOMRI撮像を行った。OMRI撮像後、頸椎脱臼処置を施し大腸を摘出し、生理食塩水で洗浄後、大腸を3等分(結腸上部、結腸下部、直腸)し、その3等分した組織からiNOSタンパク定量、亜硝酸塩/硝酸塩定量、または組織評価用サンプルを採取した。組織評価用に採取したサンプルは10%中性緩衝ホルマリン溶液に浸漬した。また、残りのサンプルは、上皮組織を採取後秤量し、アルゴン置換後、-80にて保存した。

OMRI 撮像条件は以下の通りである。  
TR/TE/TESSR = 1200/25/400 ms, FOV = 48 × 48,  
matrix = 64 × 64, ESR Power = 67.8 W, ESR  
frequency = 220.6 MHz, slice thickness = 30 mm

### (3) 薬物投与

誘導型 NO 合成酵素(iNOS)特異的阻害剤  
Aminoguanidine (1 回あたり 20mg/kg)溶液又  
は非特異的 NOS 阻害剤 L-NAME(1 回あたり  
20mg/kg)溶液を投与直前に 6%DSS 溶液と 1:1  
混和し、1 日 2 回経口投与した。

### (4) iNOS タンパクおよび亜硝酸塩/硝酸塩の 定量

結腸上部、結腸下部および直腸の上皮粘膜  
における iNOS タンパクの発現は、ウェスタ  
ンブロット法を用いて行った。また、亜硝酸  
塩/硝酸塩は、グリース法キットを用いて定量  
した。

### (5) 組織学的評価

10%ホルマリンにて結腸上部、結腸下部お  
よび直腸組織を固定し、パラフィン包埋後、  
クライオスタットで 5 μm の厚さにカットし  
てプレパラートを作成し、ヘマトキシリン・  
エオジン(HE)にて染色を行った。

### (6) プロープと NO との反応性実験

NO は NOC7 の分解により発生させ、その  
生成量は、スピントラップ剤 Fe(MGD)<sub>2</sub>を用  
いて NO を捕捉し、生成したスピン付加体  
Fe(MGD)<sub>2</sub>-NO から見積もった。ニトロキシル  
プロープは MC-PROXYL, carbamoyl-  
PROXYL および hydroxy-TEMPO を用いた。  
0.1 M リン酸緩衝液(pH 7.4)に溶解したニトロ  
キシルプロープに NADPH, NOC7 を添加し、  
X-band ESR 装置にてプロープの ESR 信号を  
経時的に記録した。

## 4. 研究成果

### (1) OMRI を用いた DSS 惹起大腸炎マウスに おける大腸管腔内活性酸素産生の検討

DSS 惹起大腸炎モデルマウスにおける大  
腸管腔内の OMRI 撮像を行い、そのレドックス  
変動に及ぼす抗酸化剤の効果を検討した。

大腸炎の肉眼的・組織学的傷害がまだ観察  
されない DSS 処置 3 日群のマウスに膜透過性  
プロープ <sup>14</sup>N-MC-PROXYL を直腸内投与し、  
OMRI 撮像したところ、OMRI 画像輝度の減  
少が認められた。そこで、結腸上部、結腸下  
部、直腸それぞれ、任意の ROI(3 × 3)を 2 箇  
所ずつ選択し、その ROI での平均輝度を算出  
し、減衰速度を求めた結果、その画像輝度の  
減少は、直腸上皮細胞内でのみ認められた。  
その減少は、膜透過性抗酸化剤 DMSO のニト  
ロキシルプロープとの同時投与により、ほぼ

完全に抑制された。

血便が現れ始め、直腸付近の上皮欠落が認  
められる DSS5 日群では、結腸下部と直腸の  
上皮細胞内で OMRI 画像輝度の減少が認めら  
れ、その減少は DMSO により抑制された。

著しい貧血や血便が観察され、大腸全体の  
上皮欠落、炎症性細胞の粘膜内浸潤が認めら  
れる DSS7 日群では、大腸上皮の細胞内のみ  
でなく細胞外でも OMRI 画像輝度が減少し、  
その減少は DMSO により完全に抑制された。

以上より、DSS 惹起大腸炎モデルマウスに  
おいて、3 日群では直腸上皮細胞内で、5 日  
群では結腸下部と直腸の上皮細胞内で、7 日  
群では大腸全体で、活性酸素が産生している  
ことが示唆された。

### (2) OMRI を用いた DSS 惹起大腸炎マウスに おける大腸管腔内活性酸素産生の検討

ヒト潰瘍性大腸炎および DSS 惹起大腸炎  
において、その発症や進展に活性酸素産生の  
関与が示唆されている。そこで、Western Blot  
法で大腸粘膜 iNOS タンパク発現を検討した  
結果、DSS3 日群に結腸下部と直腸で増強し、  
その増強は 7 日群まで増大した。また、グ  
リース法で大腸粘膜中の亜硝酸塩/硝酸塩を評  
価した結果、5 日群で結腸下部、直腸で増強  
し、7 日群で、さらに増大した。以上より、5  
日群より結腸下部および直腸の粘膜中に発  
現した iNOS より NO が産生し、7 日群でさ  
らに増強していることが示唆された。

そこで、iNOS 特異的阻害剤  
aminoguanidine(AG)または非特異的 NOS 阻害  
剤 L-NAME を 1 日 2 回経口投与し、(1)と同  
様に、OMRI 撮像を行った。その結果、DSS3,  
5, 7 日群で見られた画像輝度の亢進は、い  
ずれも AG 処置で完全に抑制された。一方、  
L-NAME 処置でさらに減衰速度の亢進が認  
められた。OMRI 撮像後に大腸組織サンプル  
を採取し、HE 染色を行うと、5 日群で他の部  
位と比べて直腸で上皮傷害が顕著に認めら  
れ、7 日群で結腸上部および結腸下部で上皮  
傷害が起こっていたことから、直腸で、上皮  
細胞の欠落に先行してレドックス状態の変  
化が起こり、上皮傷害部位でレドックス状態  
が顕著に変動していることが示唆された。

OMRI 撮像後に大腸粘膜を採取し、亜硝酸  
塩/硝酸塩を定量した結果、AG は 7 日群にお  
ける結腸上部、直腸の亜硝酸塩/硝酸塩の増加  
を半分程度軽減し、L-NAME は 7 日群におけ  
る結腸上部、直腸の亜硝酸塩/硝酸塩の増加を  
完全に抑制した。

また、NOS 阻害剤が体重変化、大腸長、  
Disease Activity Index (DAI)に及ぼす影響を  
検討した結果、AG は DAI および体重減少を改  
善したのに対し、L-NAME は DAI および体重  
減少をさらに増悪させる傾向を示した。

以上より、結腸下部と直腸で発現した iNOS タンパクから産生した NO が上皮細胞内でのレドックス変動に寄与し、大腸炎形成に寄与するのに対し、恒常的に産生している NO はレドックス状態の恒常性に寄与し、大腸炎形成に対して保護的に作用している可能性が示唆された。

### (3) プロープと NO との反応性実験

ニトロキシルプロープ剤の OMRI 画像輝度減衰とフリーラジカルとの定量的関係について、詳細に検討した報告例はない。そこで、NO 発生系として NOC7 を用い、各種プロープ剤 (MC-PROXYL, carbamoyl-PROXYL, hydroxy-TEMPO) と NOC7 より産生した NO との反応性を、X バンド ESR で検討した。

NOC7 をリン酸緩衝液(pH7.4)に添加することで NOC7 が分解し、結果として生じる NO を MGD 鉄錯体で捕捉し、その ESR 信号を経時的に記録した結果、典型的な(MGD)<sub>2</sub>Fe-NO ラジカルの ESR スペクトルを与え、その信号強度の初速度は NOC7 濃度に依存して増加した。

そこで、電子供与体の存在下または非存在下、リン酸緩衝液に溶解したプロープ溶液に NOC7 を添加し、混合溶液を X-band ESR 測定し、その ESR 信号を経時的に記録した。いずれのプロープ剤も電子供与体 NADPH が存在しない場合には NO と反応せず、プロープ濃度より高濃度の電子供与体が存在する場合にのみ、ニトロキシルラジカルの ESR 信号の減衰が認められた。また、その減衰速度はいずれのプロープ剤も同程度であった。さらに、NOC7 濃度を変化させると、プロープの減衰速度は MGD 鉄錯体を用いたスピントラップ法で定量した NO 産生速度と相関することが示され、プロープ剤の OMRI 減衰速度を指標に NO 産生の半定量的評価が可能であることが示唆された。

### (4) TNBS 大腸炎モデルでの検討

TNBS 処置により、出血を伴う激しい粘膜傷害が認められた。しかし、血便が粘膜に付着しており、プロープを直腸内投与した際、管腔内の損傷部位にプロープの分布が認められなかったことから、本モデルでの OMRI を用いたレドックス解析は困難であると判断した。

## 5 . 主な発表論文等

(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 4 件)

Yasukawa K., Miyakawa R., Yao T., Tsuneyoshi M., Utsumi H., Non-invasive monitoring of redox status in mice with dextran

sodium sulphate-induced colitis, 43, 505-513, (2009), 査読有

Ichikawa K., Yamada KI., Yasukawa K., and Utsumi H. Analysis of In vivo Redox Status with Magnetic Resonance Technique, YAKUGAKU ZASSHI-JOURNAL OF THE PHARMACEUTICAL SOCIETY OF JAPAN, 129, 273-278, (2009), 査読無

内海英雄, 安川圭司, 磁気共鳴装置を用いたレドックス動態の分子イメージング, 機能材料, 28, 77-86, (2008), 査読無

Yasukawa K., Kanbe T., Shigemi R., Soeda T., Ichikawa K., Yamada KI., Utsumi H., Imaging analysis of generation of reactive oxygen species in rats with indomethacin-induced gastric lesion, Free Radical Biology & Medicine, 43, S181, (2007), 査読無

〔学会発表〕(計 2 件)

Yasukawa K., Mutsumoto Y., Utsumi H., Basic Study of Reactivity of Nitroxyl Radical Analogues and Nitric Oxide, 4<sup>th</sup> JSPS Core-to-Core Program Seminar: International In Vivo Redox Symposium, 3<sup>rd</sup> November (2007), Nihondaira Hotel (Shizuoka, Japan)

Yasukawa K., Kanbe T., Shigemi R., Yao T., Tsuneyoshi M. and Utsumi H., Imaging analysis of generation of reactive oxygen species in rats with indomethacin-induced gastric lesion, 6<sup>th</sup> JSPS Core-to-Core Seminar: US-JSPS EPR Core-to-Core Symposium, 27<sup>th</sup> May (2008), The Blackwell Inn, Columbus, Ohio, USA

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

安川 圭司 (YASUKAWA KEIJI)

九州大学・大学院薬学研究院・助教

研究者番号：80372738