

機関番号：24303
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21790680
 研究課題名（和文） ペルオキシレドキシン6（Prx-6）による腸管炎症性制御機構の解明
 研究課題名（英文） Elucidation of a regulatory mechanism by Peroxiredoxin 6 (Prx-6) in inflammatory bowel disease (IBD)
 研究代表者
 岡田 ひとみ (OKADA HITOMI)
 京都府立医科大学・医学研究科・助教（寄附講座）
 研究者番号：60533023

研究成果の概要（和文）：

YAMC細胞を用いた実験においてPrx-6が細胞保護作用・創傷治癒作用を発揮している可能性を示した。また、ヒト潰瘍性大腸炎において、炎症の原因となる顆粒球を除去する顆粒球吸着療法（GCAP）を行った患者の大腸粘膜でPrx-6の発現を検出した結果、治療効果のあった患者の大腸粘膜ではPrx-6の発現が治療前より増加していた。これらの結果は、Prx-6はIBD炎症制御に深く関与しており、IBDの治療効果を検討するマーカーとなる可能性を示している。

研究成果の概要（英文）：

It is suggested that Peroxiredoxin 6 (Prx-6) may provide cytoprotection and wound healing in YAMC cells. Ulcerative colitis (UC) patients were treated using granulocytapheresis (GCAP). After the treatment, Prx6 in the patients, which observed the therapeutic effect, increased. These results show that Prx-6 may be involved in mechanisms of inflammatory bowel disease (IBD) and be used as a marker of examination the therapeutic effect of IBD.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生化学、プロテオミクス、消化管
 科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学
 キーワード：腸管炎症性疾患、酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

(1) 潰瘍性大腸炎やクローン病などの炎症性腸疾患 (IBD) は慢性・再発性の腸管炎症性を主体とする疾患群であり、若年者に多く罹患率が増加する傾向にある。その病因としては、細菌抗原や自己抗原

に対する免疫寛容破綻が慢性持続性炎症につながるかとされているものの、その発症機序は未だ明確ではない。このため、根本的な治療法は確立しておらず、対症的治療に終始することが多く、的確に病気の進み具合（病勢）を把握するマーカー

も十分ではない。

(2) 酸化ストレスと疾患との関係は、アルツハイマー病などの神経変性疾患などで研究されているが、IBDと酸化修飾蛋白質に関する研究としてはcarboxymethyllysine 修飾蛋白質による慢性炎症持続機構に関するものだけであり (Am J Pathol 2006, 169:1223)、系統的研究はなされていない。さらにこのような酸化修飾を受けた蛋白質を処理する機構としてのオートファジー機能が低下することが腸管自己免疫炎症の契機となりうる可能性も報告された (Nature 2008 Oct5, on-line)。

(3) 研究代表者らはIBDにおける新規治療標的分子・病勢マーカーの探索のため、潰瘍性大腸炎モデルマウスの大腸粘膜を試料とした蛋白質発現量解析を行った。正常マウスにおける大腸粘膜と比較した結果、ペルオキシレドキシシン6 (Prx-6) の発現が大腸粘膜において特異的に低下していることが明らかになった。研究代表者らはIBDを対象とした酸化修飾プロテオミクス研究の推進による新規治療標的分子の探索を提唱しており

(JGastroenterol 2007, 42:787)、本研究計画もその延長線上にある。

2. 研究の目的

(1) Prx-6は細胞質に局在し、酸化ストレスに対する防御やリン脂質の代謝回転を制御する蛋白質であり、チオレドキシシン (TRX) 依存的に過酸化水素を消去する役割を担っている (J. Biol. Chem. 2003, 278:25179)。Prx-6蛋白質はシステイン残基Cys47を有しており、Prx-6は酸化されると分子内ジスルフィド結合が形成される (J. Biol. Chem. 1998 273:6303)。酸化ストレス下で、蛋白質のシステイン残基はスルフェン酸を形成し、さらに酸化が進むとスルフィン酸やスルフォン酸を形成する。二次元電気泳動ではDTT (Dithiothreitol) を用いるため、DTT-sensitive なスルフェン酸は検出され

ない。一方、スルフィン酸やスルフォン酸はDTT-resistant でありスポットが酸性側にシフトした状態で検出される (Biochem J. 2002 366:777)。したがって、二次元電気泳動において、Prx-6はしばしばダブルスポットで検出されることが明らかとなっている (Biochem J. 2002 366:777、J. Bio. Chem. 2002 277:19396)。またシロイナズナ由来のPeroxioredoxin II E が一酸化窒素によりチオール基が修飾されるニトロシル化を受けており、Peroxioredoxin II E の機能阻害がチロシン残基のニトロ化を促進しているという報告もされている (Plant Cell 2007 19:4120)。(2) これらのことから実験的腸炎モデルにおける大腸粘膜検体を用いた二次元電気泳動でのPrx-6発現の低下は、過剰な酸化ストレスにより還元型Prx-6のCys残基においてスルフィン酸やスルフォン酸が増加した結果、酸化型Prx-6が増え還元型Prx-6が減少したことを反映しているものと推測された。また、Prx-6が活性酸素種によって酸化されたのち、ニトロ化、ブロモ化や活性アルデヒド付加体により安定化した修飾蛋白に変性し、その結果、抗酸化防御機能の低下、アポトーシス誘導等が惹起され、IBDの病態に深く関与する可能性も示唆される。IBDにおいて、酸化ストレスによるタンパク質の翻訳後修飾が疾患の発症、持続炎症、炎症性発癌などに関与する可能性が示唆されており、抗酸化酵素であるPrx-6は疾患組織の酸化ストレスに関与しているのではないかと考えられる。

本研究は、Prx-6に焦点をあて、Prx-6のIBD炎症制御における役割を解明し、IBDの新規治療標的分子として提案することを目的としている。

3. 研究の方法

(1)マウス大腸上皮細胞 (YAMC 細胞) での検討

①YAMC細胞においてPrx-6のシステイン残基の酸化状態を検討するために過酸化水素を投与し、培養後、蛋白質を回収し酸化型Prx-6の検出をウェスタンブロッティングを用いて行った。

②Prx-6の創傷治癒効果の検討を行うために、Prx-6 si RNAの導入によりPrx-6の発現を抑制したYAMC細胞を培養し、人為的に細胞を傷つけ、創傷治癒の観察を行った。

(2)潰瘍性大腸炎患者、大腸粘膜での検討

①潰瘍性大腸炎患者の非病変部、病変部におけるPrx-6の発現量変化、システイン残基の酸化型の検出を行った。

②炎症の原因となる顆粒球を除去する顆粒球吸着療法 (GCAP) を行った患者の大腸粘膜においてPrx-6の発現を検出した。

4. 研究成果

(1)マウス大腸上皮細胞 (YAMC 細胞) での検討

①Prx-6のシステイン残基の酸化状態の検討
研究代表者らは、YAMC細胞に過酸化水素を投与することにより、Prx-6のシステイン残基の酸化状態を調べた。

酸化ストレスにさらされると、Prx-6のシステイン残基にあるチオール基がスルフィン酸型 (SO₂H)、スルホン酸型 (SO₃H) へと酸化される。これらを検出する抗酸化型

Prx-6抗体を用いて、ウェスタンブロッティングを行った。図1 (左) において、四角に囲まれた部位にあるバンドがトータルPrx-6であり、図1 (右) の図が、酸化型Prx-6を検出した結果である。過酸化水素投与量に依存して、酸化型Prx-6が増加していた。

さらに、蛋白質を分子量と等電点の差で分離する二次元電気泳動において、同様の抗体を用いたウェスタンブロッティングを行

った (図2)。等電点電気泳動において、Prx-6は還元型Prx-6、酸化型Prx-6の二つの分離したスポットとして検出され、酸化型は酸性側 (図2では左側) へと移動する。図2、上段のトータルPrx-6の検出で、過酸化水素を投与していない細胞と比較して投与した細胞において酸性側へ移動した酸化型スポットが増加していることがわかった。また、図2、下段の抗酸化型Prx-6抗体の検出においても、過酸化水素を投与した細胞で酸化型が増加していた。

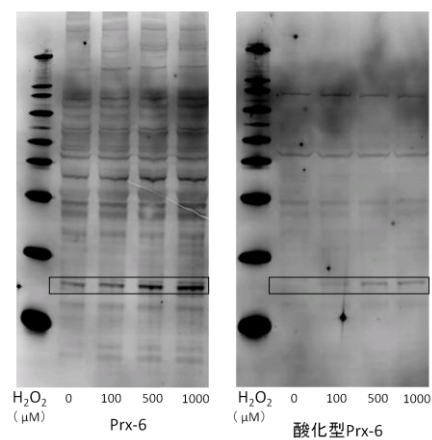


図1

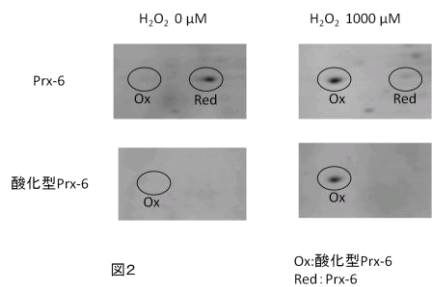


図2

②Prx-6の創傷治癒効果の検討

また、Prx-6-siRNAの導入によりPrx6の発現を抑制したYAMC細胞を用いてWound healing assayを行った。細胞に人為的に傷を作り、12時間培養した後、傷の開存率を測定した。その結果、Prx-6-siRNAの導入細胞では創傷治癒が遅延した (図3)。

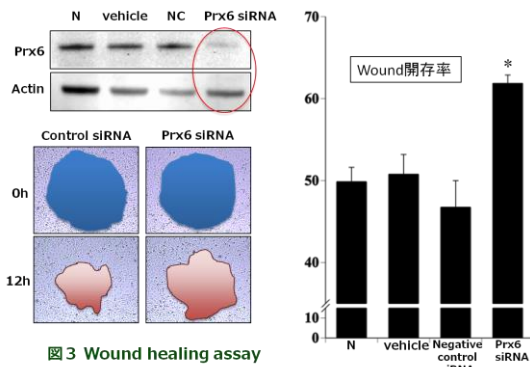


図3 Wound healing assay

これにより、Prx-6 は細胞保護作用・創傷治癒作用を発揮している可能性が示唆された。

。

(2) 潰瘍性大腸炎患者、大腸粘膜での検討

①非病変部、病変部におけるPrx-6、酸化型Prx-6の検出

YAMC細胞での実験と同様に、潰瘍性大腸炎患者の大腸粘膜を用いてPrx-6の酸化型の検出を行った。図4において、非病変部(左)に比べ、病変部(右)ではPrx-6の酸性側(左側)へのスポットの移動が見られた。このことから、病変部ではPrx-6のシステイン残基の酸化が促進されていることがわかった。

。

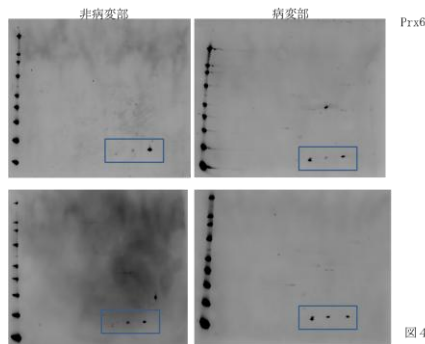
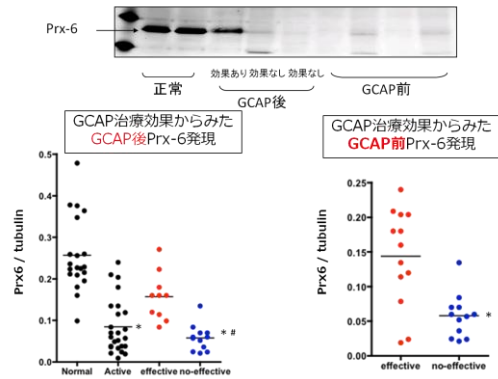


図4

②潰瘍性大腸炎に対する顆粒球吸着療法(GCAP)後のPrx-6の変動

ヒト潰瘍性大腸炎において、炎症の原因となる顆粒球を除去する顆粒球吸着療法(GCAP)を行った患者の大腸粘膜において、Prx-6の発現を検出した結果、治療効果のあった患者の大腸粘膜ではPrx-6の発現が治療前より増加していた(図5)。

図5 GCAP治療前後におけるPrx6発現変動



まとめ

- ・YAMC細胞において細胞保護作用・創傷治癒作用を発揮しているということが示唆された。

- ・潰瘍性大腸炎患者の大腸粘膜における検討においても、Prx-6の発現変動・酸化型Prx-6の増加があり、GCAP治療前後でのPrx-6の発現変動が起こっていた。

これらの結果は、Prx-6はIBD炎症制御に深く関与しており、さらに詳細なIBDにおけるメカニズムの検討・IBD患者での検討が必要ではあるが、Prx-6はIBDの治療効果を測るマーカーとなる可能性を示している。

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1件)

内藤裕二、高木智久、岡田ひとみ、藤分秀司、吉川敏一、Identification of inflammation-related proteins in a murine colitis model by 2D fluorescence difference gel electrophoresis and mass spectrometry、Journal of Gastroenterology and Hepatology、査読有、Suppl. 1、2010年、S144

[学会発表] (計1件)

高木智久、岡田ひとみ、炎症性腸疾患における抗酸化酵素 Peroxiredoxin-VI の役割、第63回日本酸化ストレス学会学術集会、平成22年6月24日、横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡田 ひとみ (OKADA HITOMI)
京都府立医科大学・医学研究科・助教 (寄附講座)

研究者番号：60533023

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：