

平成 28 年 10 月 24 日現在

機関番号：37107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460037

研究課題名(和文) 磁気共鳴法を用いたNO動態に基づく潰瘍性大腸炎制御機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of mechanism that nitric oxide positively regulate pathology of ulcerative colitis using magnetic resonance technique

研究代表者

安川 圭司 (Yasukawa, Keiji)

第一薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：80372738

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、潰瘍性大腸炎において産生する一酸化窒素(NO)が大腸粘膜の炎症に関与する機序について、磁気共鳴法を用いて解析した。大腸炎を誘発するデキストラン硫酸ナトリウムをマウスに飲水させると、大腸組織内に浸潤してきたマクロファージから産生したNOがSTAT3の活性化を介してCD14の発現を誘導することでTLR4-NF-κB経路を活性化すること、NF-κBの活性化によりIL-6濃度が上昇し、更なるSTAT3の活性化を惹起すること、同じくNF-κBの活性化により接着分子の発現が上昇し、好中球の大腸粘膜内への浸潤が起こり、好中球から活性酸素が産生し、大腸粘膜傷害を惹起することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, mechanism that excess amount of nitric oxide (NO) produced in ulcerative colitis is involved in the inflammation of colonic mucosa was investigated using the magnetic resonance technique. The scheme was proposed as follows; 1) NO produced from activated macrophages infiltrating into the colonic tissue would trigger the activation of TLR4-NF-κB pathway, which was brought by the CD14 expression enhanced by STAT3 activation. 2) The increase of IL-6 level induced by the activated NF-κB would lead to the further activation of STAT3. 3) The increase of expression of adhesion molecules induced by the activated NF-κB would cause the infiltration of neutrophils producing reactive oxygen species leading to the mucosal injury.

研究分野：物理系薬学

キーワード：一酸化窒素 潰瘍性大腸炎

1. 研究開始当初の背景

潰瘍性大腸炎は大腸特異的に発症する炎症性腸疾患であり、活動期には重篤な下痢、血便、貧血等を伴い著しいQOLの低下を招く。病因について未だ不明な点が多く、多くは活動期と寛解期を反復し慢性化すると大腸ガンに至る可能性が高まる。そのため、活動期の沈静化と慢性化防止が重要と考えられ、病態機序の解明及び治療薬の開発は急務である。

一方、潰瘍性大腸炎やその病態モデルであるデキストラン硫酸ナトリウム(DSS)モデルの発症や進展における活性酸素種(ROS)や一酸化窒素(NO)の関与が示唆されている。これまでに、iNOSより産生したNOを消去するとToll様受容体4(TLR4)発現とその下流に在るNF- κ B活性化の抑制を介してROS産生が低下し病態も改善することを初めて見出した¹⁾。しかし、NO自体がTLR4発現制御に関与するのか、またはその代謝過程で生じる活性中間体が関与するのか、その機序は不明である。

NOとスーパーオキシド(O₂⁻)との反応により生じるパーオキシナイトライト(ONOO⁻)の大腸炎への寄与も報告されている²⁾。ONOO⁻はNOとO₂の共存下で速やかに生成し(二次反応速度定数 $5 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)、タンパク質やDNA等を強力にニトロ化し高傷害性を示す。我々はONOO⁻産生の指標であるニトロチロシンがDSS5日目より増加しNO捕捉剤処置で低下することを明らかにしており、DSS大腸炎におけるONOO⁻の産生を示唆している。

以上、DSS飲水により過剰産生したNOまたはその活性中間体がTLR4発現制御に関与するタンパクへの修飾を介して大腸組織TLR4発現を増強させるのではないかと仮説を立てた。これら活性酸素・活性窒素産生を解析するには、ラジカル特異的に計測できるESRや高感度イメージングが可能なオーバーハウザーMRI(OMRI)等の磁気共鳴装置を用いた解析が非常に有効である。

2. 研究の目的

本研究は、生体計測ESR、OMRIやESR/スピントラップ法等の磁気共鳴法を用いてラジカル産生を詳細に解析し、作業仮説を検証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 大腸炎モデルの作成

DSS大腸炎は雄性6週齢のICRマウスに5%DSSを7日間自由飲水させることで作成した。ただし、NO放出剤の検討では、DSS飲水開始4日目に5%から2%に変更し、7日目まで継続した。薬剤処置について、NO捕捉剤c-PTIO(12 mg/kg/day)あるいはNO放出剤NOC-18(5 mg/kg/day)をDSS飲水4日目より1日2回皮下投与した。

(2) 磁気共鳴装置を用いた検討

生体計測ESR/ニトロキシルプローブ法やOMRIを用いた検討では、DSS飲水5,7日目にマウス大腸内ROS産生を低侵襲計測し、NO捕捉剤c-PTIO処置による影響を検討した。プローブ剤は大腸炎モデルで最もROS産生を鋭敏に捉える³⁾ carbamoyl-PROXYLを用いた。計測前日に絶食し、当日に麻酔下carbamoyl-PROXYL(2 mM, 500 μ l)を直腸内投与し、経時的にスペクトルまたは画像を計測した。ESRの場合はスペクトル強度の片対数プロットの傾きを算出し、OMRIの場合はピクセル毎に傾きを算出してマッピングした。

ESR/スピントラップ法を用いた検討では、DSS飲水開始から7日目にスピントラップ試薬DTCS鉄錯体(約20 mM)を麻酔下で500 μ l直腸内投与し、その30分後に安楽死処置して大腸を摘出した。大腸粘膜サンプル、DTCS鉄錯体、50 mM Tris-HCl(pH 7.4)とNOR1(10, 30, 50 μ M)を混合し、室温にてX-band ESR計測を行った。阻害剤の検討では、NOR1添加前に、VIPER(10 mM)あるいはBMS-345541(10 mM)を添加した。

(3) RAW264.7細胞を用いた検討

RAW264.7をLPS(3 ng/ml)で刺激し、2時間後にNOC-18(1, 3, 10 μ M)を添加した。その2時間後にSTAT3, p-STAT3, CD14, TLR4, iNOSと核内NF- κ B p65をWestern blot法で調べた。

(4) 免疫染色

DSS飲水開始から7日目に大腸を摘出し、4%パラホルムアルデヒドで16時間固定した。10%ショ糖溶液で一晩置換し、液体窒素で凍結後、クライオスタットで厚さ10 μ mの凍結切片を作成した。3%H₂O₂およびブロッッキング処理後、一次抗体、蛍光標識二次抗体の順に反応させ、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

(5) Western Blot法

大腸組織の場合、100 mM benzylsulfonyl fluoride、プロテアーゼ阻害剤カクテル、500 mM sodium orthovanadateを含むlysis buffer(組成: 1 M Tris-HCl(pH 7.5), 5 M NaCl, 10% SDS, 10% Triton-X, 10% デオキシコール酸)中でホモジネートを調製した。細胞の場合、 1×10^7 cell/100 mm dishからRIPA Lysis Buffer System中にてホモジネートを調製した。ホモジネートを超音波処理し遠心分離(15,000g, 4, 30分)で得られた上清にSample buffer(組成: 54.1% グリセロール、0.05%プロモフェノールブルー、159 mM Tris-HCl(pH 6.8)、4.76% SDS)を加えたものをWestern blotのサンプルとした。Sampleは10% SDS-ポリアクリルアミドゲルで分離し、PVDF膜に転写、ブロッッキング処理後、一次抗体、HRP標識二次抗体の順に反応させた。EzWestLumi plusで化学発光させ、LAS4000にて目的タンパク質バンドを検出した。バンド強度は画像解析ソフトImageJにて解析した。

4. 研究成果

(1) 活性酸素産生に対する NO 捕捉剤の効果

生体計測 ESR/ニトロキシルプローブ法では、プローブ(フリーラジカル)の常磁性消失などに伴う ESR 信号強度の減少は擬一次反応に従い、その擬一次反応速度定数を「シグナル減衰速度」として評価している。本法を DSS 誘発大腸炎マウスに適用した場合、シグナル減衰速度は水道水群と比べて有意に亢進し、その亢進は活性酸素産生に起因することが明らかとなっている³⁾。

そこで、本法を用いて活性酸素の産生を低侵襲計測し、NO 捕捉剤 c-PTIO 処置による影響を検討した。大腸組織の iNOS 発現、亜硝酸塩・硝酸塩は DSS 飲水 5 日目に有意な増加が認められたことから、DSS 飲水 4 日目より c-PTIO 処置を開始した。

その結果、5 日目と 6 日目に亢進した活性酸素産生は、c-PTIO 処置により水道水群レベルにまで抑制された(図 1)。

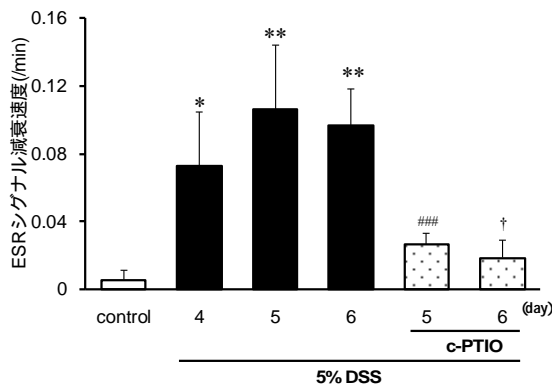


図 1 生体計測 ESR 法による DSS 飲水マウス大腸の活性酸素計測結果

Mean ± S.D., n = 3-5, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 水道水群, ### $P < 0.005$ vs DSS 5 日群, † $P < 0.05$ vs DSS 6 日群

同様に、OMRI 装置を用いて、DSS 誘発大腸炎マウスの大腸管腔における活性酸素産生をイメージングし、c-PTIO 処置による影響を検討した。その結果、DSS 飲水 7 日目には大腸管腔全体にわたって活性酸素が産生し、c-PTIO 処置により抑制されることが明確に示された(図 2)。

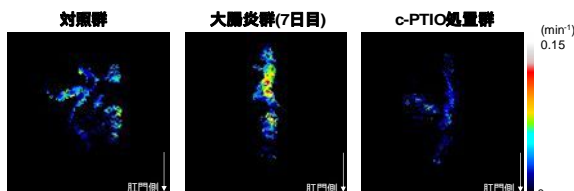


図 2 OMRI 法による DSS 誘発大腸炎マウスの大腸管腔における活性酸素イメージング

(2) TLR4-NF-kB シグナルに対する NO 放出剤の効果

Western blot 法にて、大腸組織中の TLR4 や iNOS の発現、核画分中の NF-kB p65 局在に

対する NO 放出剤の影響を調べた。その結果、TLR4 発現や NF-kB p65 の核内移行、iNOS の発現はさらに増加した。

これまでの NO 消去剤を用いた検討と合わせると、NO は TLR4-NF-kB シグナルを正に制御していることを確認した。

(3) ESR/スピントラップ法を用いた検討

実際に DSS 誘発大腸炎マウスの大腸で NO が産生し、TLR4-NF-kB シグナル経路を活性化しているかどうか、ESR/スピントラップ法を用いて検討した。DSS 飲水開始 7 日目に、マウスに DTCS 鉄錯体を直腸内投与し、大腸を摘出後、NOR1 を添加し ESR 計測を行った。その結果、スピントラップ試薬と NO との反応付加体の ESR 信号強度は水道水群と比べて増強した(図 3A)。あらかじめ TLR4 阻害剤 VIPER または NF-kB 活性化阻害剤 BMS-345541 を処置すると、この ESR 信号強度の増大は抑制された(図 3B)。以上より、DSS 誘発大腸炎マウスの大腸で、NO は TLR4-NF-kB シグナル活性化に関与することが明らかとなった。

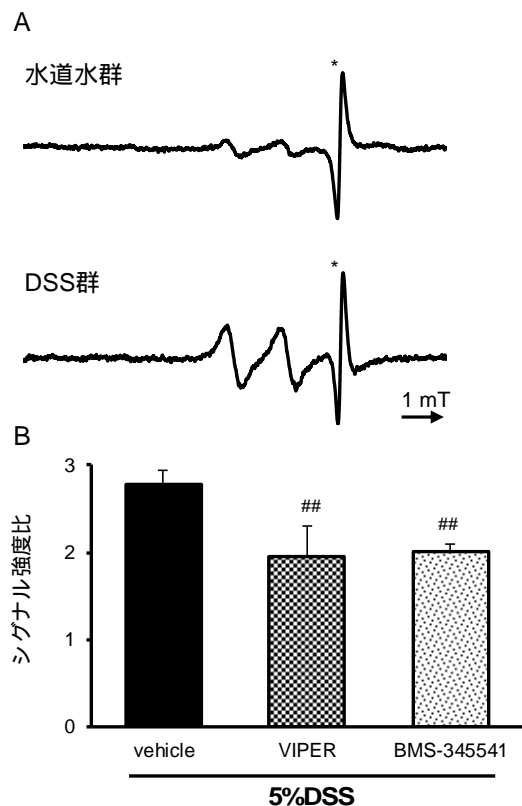


図 3 ESR/スピントラップ法による DSS 誘発大腸炎マウスの大腸組織 NO の検出

(A) (DTCS)₂-Fe-NO の ESR スペクトル (B) VIPER あるいは BMS-345541 前処置の ESR シグナルへの影響

A の*は外標準物質 Mn²⁺ の ESR シグナルを表す。B の縦軸は水道水群の ESR シグナル強度に対する比を表す。Mean ± S.D., n = 3-6, ## $P < 0.01$ vs DSS 群

(4) NO の CD14 発現への関与

CD14 は TLR4 による LPS の認識に必須のタンパク質である。まず LPS は LPS 結合タンパク質と結合して CD14 と会合し、その複合体が TLR4 と会合すると種々のアダプター分子が集合し、シグナル伝達を開始される。そこで、NO の CD14 への関与を検討したところ、c-PTIO 処置により CD14 発現は抑制されたのに対して、NOC18 処置によりさらに増加した。以上より、NO は CD14 の発現増強を介して TLR4-NF-kB シグナルの活性化に関与することを明らかにした(図 4)。

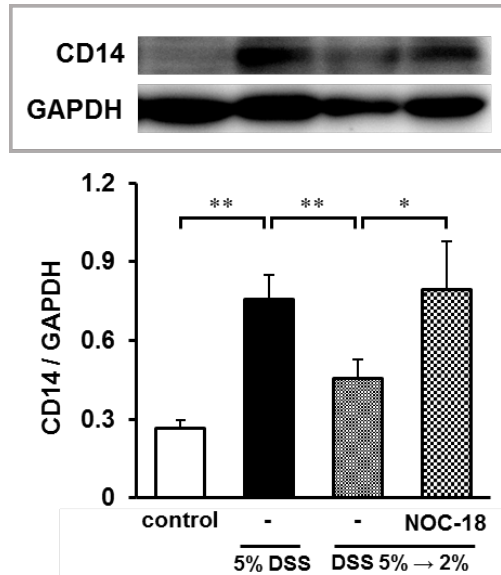


図 4 NOC18 処置の CD14 発現に及ぼす効果
Mean ± S.D., n = 4-5, *P<0.05, **P<0.01

(5) RAW264.7 細胞を用いた検討

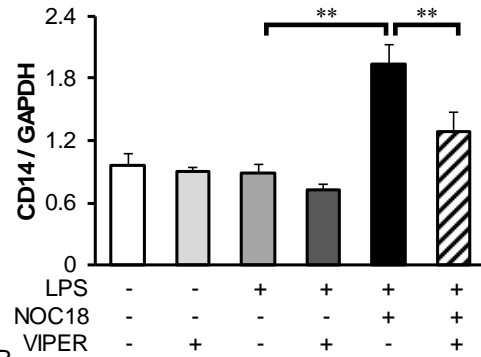
免疫染色法にて、DSS 飲水 7 日目の大腸組織における CD14 の発現部位を検討した結果、CD14 は大腸組織中に浸潤してきたマクロファージ F4/80 の局在と一致した。さらに、ニトロチロシンの産生部位を検討した結果、ニトロチロシンと F4/80 の局在が一致した。そこで、マウス腹腔マクロファージ細胞である RAW264.7 細胞を用いて検討を行った。

LPS(3 mg/ml)を処置した RAW264.7 細胞に NOC18 を添加後の TLR4-NF-kB シグナル活性化を検討した結果、CD14 や iNOS の発現、核画分中の NF-kB p65 局在は NOC18 濃度依存的に増加していた。また、これらの増加は TLR4 阻害剤 VIPER や NF-kB 活性化阻害剤 BMS-345541 の処置により有意に抑制された(図 5)。

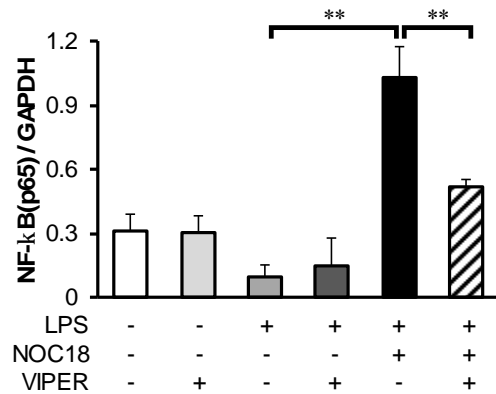
以上より、DSS 誘発大腸炎マウスにおける NO の TLR4-NF-kB シグナル活性化に、マクロファージが部分的に関与している可能性が示唆された。

しかしながら、NO が TLR4-NF-kB シグナルを活性化するメカニズムについては不明

A



B



C

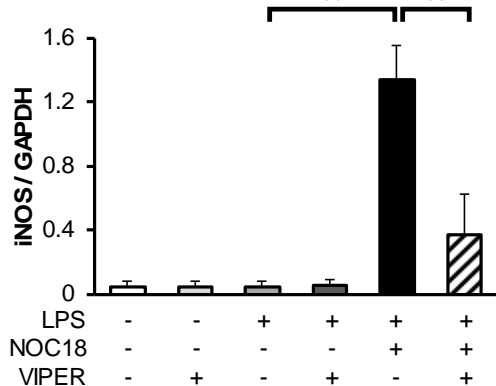


図 5 LPS/NOC18 で刺激した RAW264.7 細胞の TLR4-NF-kB シグナル活性化に対する VIPER 前処置の影響

Mean ± S.D., n = 4, **P<0.01

なままであったため、肝 Kupffer 細胞を LPS で刺激すると STAT3 の活性化を介して CD14 の発現が上昇することを報告した先行研究に着目した。STAT3 活性化は主に IL-6 が gp130 受容体に結合することで誘導されることが知られており、DSS 誘発大腸炎においても STAT3 の活性化や IL-6 増加が報告されている。そこで、LPS/NOC18 で刺激した RAW264.7 細胞において、培地中の IL-6 濃度や細胞溶解液中のリン酸化 STAT3 についても調べたところ、有意な上昇が認められた。

これらの結果より、以下のメカニズムが示唆された。

1) DSS 飲水により大腸組織内に浸潤してき

た活性化マクロファージから産生した NO は STAT3 の活性化を介して CD14 の発現を誘導することで CD14-TLR4-NF-kB シグナル経路を活性化する。

2) NF-kB の活性化により IL-6 濃度が上昇し、さらなる STAT3 の活性化を引き起こす。

3) 同じく NF-kB の活性化により ICAM-1 などの接着分子の発現が上昇し、好中球の大腸粘膜内への浸潤が起こり、活性化好中球から ROS が産生し、大腸粘膜傷害を引き起こす。

<引用文献>

1) Tun X, Yasukawa K, Yamada K., Involvement of nitric oxide with activation of Toll-like receptor 4 signaling in mice with dextran sodium sulfate-induced colitis, *Free Radic. Biol. Med.*, 74:108-117 (2014)

2) Yue G Lai PS, Yin K, Sun FF, Nagele RG, Liu X, Linask KK, Wang C, Lin KT, Wong PY., Colon epithelial cell death in 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitis is associated with increased inducible nitric-oxide synthase expression and peroxynitrite production., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 297(3):915-925 (2001)

3) Yasukawa K, Miyakawa R, Yao T, Tsuneyoshi M, Utsumi H., Non-invasive monitoring of redox status in mice with dextran sodium sulphate-induced colitis, *Free Radic. Res.*, 43(5):505-513 (2009)

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)

X. Tun, K. Yasukawa, and K. Yamada, Involvement of nitric oxide with activation of Toll-like receptor 4 signaling in mice with dextran sodium sulfate-induced colitis, *Free Radic. Biol. Med.*, Vol. 74, 2014, pp. 108-117 doi:10.1016/j.freeradbiomed.2014.06.020

[学会発表](計7件)

安川圭司、トンシン、山田健一、DSS 誘発大腸炎マウスにおける STAT3 活性化を介した CD14-TLR4-NF-kB シグナル活性化への NO の関与、第 32 回日本薬学会九州支部大会、2015 年 11 月 28 日～11 月 29 日、宮崎県延岡市

K. Yasukawa, X. Tun, K. Yamada, Involvement of nitric oxide with activation of CD14-TLR4-NF-kB signaling in mice with dextran sodium sulfate-induced colitis, *Society for Free Radical Biology and Medicine* 2015, 2015 年 11 月 19 日～11 月 23 日、Boston (USA)

安川圭司、トンシン、山田健一、DSS 誘発大腸炎マウスの TLR4-NF-kB シグナル活性化

における NO の役割、第 15 回日本 NO 学会学術集会、2015 年 6 月 26 日～6 月 27 日、大阪府豊中市

トンシン、安川圭司、山田健一、DSS 大腸炎マウスにおける CD14-TLR4-NF-KB シグナル活性化への NO の関与、日本薬学会第 135 年会、2015 年 3 月 26 日～3 月 28 日、神戸市

X. Tun, K. Yasukawa, and K. Yamada, Nitric oxide mediates TLR4-NF-kB signaling in mice with DSS-induced colitis, *APES-IES-SEST* 2014, 2014 年 11 月 12 日～11 月 16 日、奈良市

トンシン、安川圭司、山田健一、DSS 大腸炎マウスにおける NO の CD14-TLR4 シグナル増強への関与、日本薬学会第 134 年会、2014 年 3 月 28 日～3 月 30 日、熊本市

トンシン、安川圭司、山田健一、DSS 大腸炎マウスにおいて、CD14 は NO が誘導した TLR4-NF-kB シグナル増強に関与する、第 30 回日本薬学会九州支部大会、2013 年 12 月 7 日～12 月 8 日、長崎県佐世保市

6 . 研究組織

(1)研究代表者

安川 圭司 (YASUKAWA, Keiji)

第一薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：80372738