

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：34306

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460110

研究課題名(和文) 腸管マクロファージに発現するNOX1の機能および消化管炎症の病態との関連の解明

研究課題名(英文) Understanding for the pathogenic mechanisms of NOX1 expressed in macrophages in intestinal inflammation

研究代表者

加藤 伸一 (Kato, Shinichi)

京都薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：90281500

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、消化管炎症の病態におけるNOX1の役割を明らかにする目的で検討を行った。1) TNBS誘起大腸炎の病態およびそれに付随する種々炎症反応にNOX1が関与していることを明らかにした。2) NOX1は腸管上皮細胞のみならず、腸管固有粘膜層に局在するマクロファージにも発現しており、大腸炎の病態に関与していることを明らかにした。3) マクロファージに発現するNOX1は、炎症時における種々のサイトカインおよびケモカインの発現増大に関与していることが判明した。以上より、消化管炎症の病態に、腸管マクロファージに発現するNOX1が関与していることが判明した。

研究成果の概要(英文)：The aim of the present study is to clarify the pathogenic role of NOX1 in colonic inflammation. We showed that 1) NOX1 plays detrimental roles in the pathogenesis of TNBS-induced colitis accompanied by various inflammatory responses; 2) NOX1 is expressed in macrophages located in lamina propria of colon; 3) NOX1 expressed in macrophages regulates the expression of cytokines and chemokine in response to inflammatory stimuli. These findings suggest that NOX1 expressed in colonic macrophages is involved in the pathogenesis of colonic inflammation via up-regulation of inflammatory cytokines and chemokines.

研究分野：消化器・炎症薬理

キーワード：NOX1 活性酸素 マクロファージ 消化管炎症 サイトカイン ケモカイン

1. 研究開始当初の背景

NADPH oxidase (NOX1) はマクロファージなどの食細胞における活性酸素 (ROS) 産生酵素である gp91^{phox} (NOX2) の非食細胞型アイソフォームとして同定された。NOX1 は血管内皮や平滑筋、さらには消化管などに発現していることが知られているが、これまでマクロファージには発現していないものと考えられてきた。最近、肺胞マクロファージや破骨細胞などに NOX1 が発現していることを示唆する報告が散見されるようになってきたが、その機能や種々の病態との関連についてはほとんど明らかになっていない。

NOX1 は特に下部消化管の粘膜上皮細胞に高発現していることが知られており、これまで上皮機能の調節・維持に関与していると考えられてきた。一方、下部消化管の固有粘膜層には多くのマクロファージが局在しており、腸管免疫の調節・維持に寄与しているものと考えられているが、腸管マクロファージにおける NOX1 発現の有無については不明である。

また、腸管には生体内のセロトニンの約 98% を生合成する腸クロム親和性細胞が存在しており、腸管運動や分泌などの機能調節に加えて、炎症・免疫応答との関連が注目されている。

2. 研究の目的

消化管炎症の病態における NOX1、特に腸管マクロファージに発現する NOX1 の役割について、各種腸管炎症の動物実験モデルを用いて検討した。さらに、最近明らかになってきた消化管炎症制御におけるセロトニン/5-HT₃ 受容体シグナルとの関連についても併せて検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 実験動物：実験には、雄性 NOX1 遺伝子欠損 (NOX1KO) マウスおよびその野生型 (C57BL/6) マウスを用いた。

(2) トリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) 誘起大腸炎

マウスに TNBS (3 mg/mouse を 50% エタノール溶液に溶解) 100 μ l を直腸内に投与することにより大腸炎を惹起した。TNBS 投与後経日的に体重および下痢の変化を観察し、4

日目に大腸を摘出し、大腸炎の程度を肉眼的におよび組織学的に、好中球浸潤の指標であるミエロペルオキシダーゼ (MPO) 活性は o-dianisidine により、各種サイトカイン、ケモカインおよび誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) 発現は定量 RT-PCR により、ROS 産生は L-012 により測定した。

(3) デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘起大腸炎

マウスに 2% DSS 溶液を 10 日間自由飲水することにより大腸炎を惹起した。DSS 投与期間中の体重、下痢・下血を経日的に観察し、10 日目における大腸炎の程度は肉眼的および組織学的に測定した。また、MPO 活性およびサイトカイン発現は上述と同様な方法により測定した。

また、セロトニン 5-HT₃ 受容体遮断薬であるラモセトロン (0.01~0.1 mg/kg) およびオンダンセトロン (5 mg/kg) は 1 日 2 回連続的に経口投与した。

(4) マウス腹腔および大腸固有粘膜層マクロファージの単離

腹腔マクロファージは、チオグリコレート腹腔内投与 3 日目に PBS による腹腔洗浄液から単離した。一方、大腸固有粘膜層マクロファージは、酵素的に抽出し、Percoll による密度勾配により単離・精製した。いずれも 2 時間培養後にディッシュに付着している細胞をマクロファージとして以後の検討を行った。

(5) 腹腔および大腸固有粘膜層マクロファージにおける NOX1 発現

腹腔および大腸固有粘膜層マクロファージから全 RNA を抽出し、NOX1 および NOX2 mRNA 発現を RT-PCR により定性的に観察した。

(6) 腹腔マクロファージにおける LPS 刺激サイトカイン、ケモカインおよび iNOS 発現の変化

WT および NOX1KO マウスから単離した腹腔マクロファージを D-MEM 培地で培養し、LPS (100 ng/mL) を添加した。6 時間後に全 RNA を抽出し、各種サイトカイン、ケモカインおよび iNOS mRNA 発現を定量 RT-PCR に

より測定した。

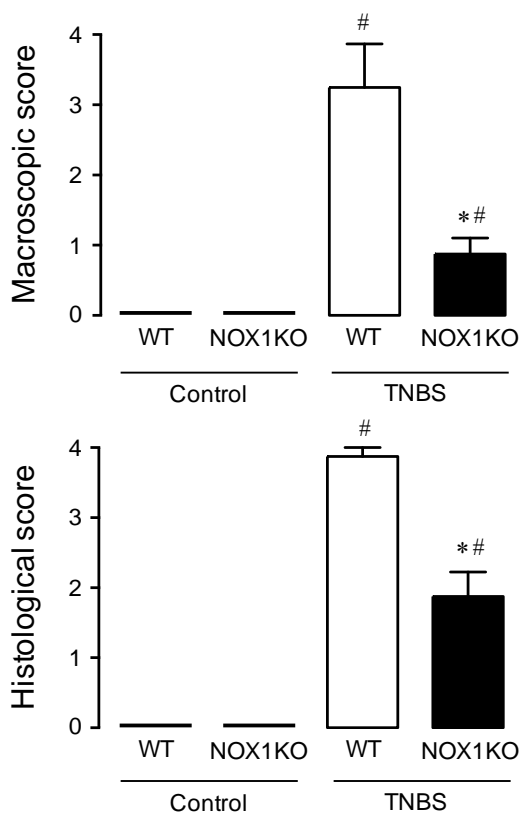
4. 研究成果

(1) TNBS 誘起大腸炎における NOX1 の関与

WT マウスにおいて、TNBS の直腸内投与は、体重減少および下痢を伴う重篤な大腸炎を惹起した。これに対して、NOX1KO マウスでは TNBS 直腸内投与により誘起される体重減少および下痢は軽度であり、さらに大腸炎の程度も肉眼的および組織学的評価のいずれにおいても有意に抑制された (図 1)。

TNBS 直腸内投与は、WT マウスでは顕著な大腸 MPO 活性および ROS 産生の増大を誘起したが、NOX1KO マウスではこれらの増大はいずれも有意に抑制された。

図 1. WT および NOX1KO マウスにおける TNBS 誘起大腸炎の比較



大腸炎：肉眼的 (上段) および組織学的 (下段)。N=8, *P<0,05 vs WT mice; #P<0.05 vs control.

TNBS の直腸内投与は、大腸粘膜 TNF- α 、IL-1 β 、CXCL1、CXCL2 および iNOS mRNA 発現を著明に増大させたが、これらの増大はいずれも NOX1KO マウスでは有意に抑制された。

これらの結果より、NOX1 は TNBS 誘起大腸炎の病態に関与していることが判明した。おそらく、NOX1 は炎症性サイトカイン、ケモカインおよび iNOS などの炎症性メディエーター発現の増大に寄与しているものと推察される。

(2) DSS 誘起大腸炎の病態における NOX1 の関与

DSS の投与は、体重減少、下痢・下血を誘起し、7 日目には大腸粘膜 MPO 活性の増大を伴う重篤な大腸炎を惹起した。DSS 誘起大腸炎を WT と NOX1KO マウスで比較検討したところ、両者に何ら差は認められなかった。

以上より、NOX1 は DSS 誘起大腸炎の病態には関与していないものと推察される。

次に、DSS 誘起大腸炎に対するセロトニン 5-HT₃ 受容体遮断薬の効果を検討したところ、いずれも大腸炎を有意に抑制した。また、DSS 処置により誘起される MPO 活性および TNF- α をはじめとする炎症性サイトカイン発現の増大もまた 5-HT₃ 受容体遮断薬の投与により有意に抑制された。

以上の結果より、DSS 誘起大腸炎の病態にはセロトニン/5-HT₃ 受容体が関与していることが判明した。NOX1 は大腸炎発症時におけるセロトニンの放出あるいは炎症性サイトカイン発現の増大過程に関与している可能性が推察される。

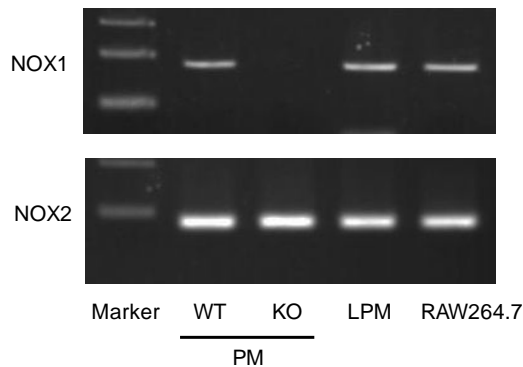
(3) マクロファージにおける NOX1 発現

一般に、TNBS はハプテンとして作用し、マクロファージなどの炎症性細胞を直接活性化させることで大腸炎を惹起するものと考えられる。一方、DSS は大腸上皮バリアを破壊し、腸内細菌依存性に大腸炎を惹起することが知られている。すなわち、TNBS 誘起大腸炎モデルでのみ NOX1 の関与が認められたことは、NOX1 がマクロファージなどの炎症性細胞レベルで炎症応答を制御している可能性が推察される。そこで、マクロファージにおける NOX1 発現を RT-PCR により確認した。

腹腔および大腸固有粘膜層マクロファージおよび RAW264.7 のいずれにおいても NOX2 のみならず明らかな NOX1 mRNA 発現が観察された。当然のことながら、NOX1KO マウスでは NOX1 mRNA 発現は消失してい

た(図2)。

図2. 腹腔および大腸固有粘膜層マクロファージおよびRAW264.7におけるNOX1およびNOX2 mRNA発現



PM: 腹腔マクロファージ

LPM: 大腸固有粘膜層マクロファージ

以上より、大腸上皮のみならず、腸管マクロファージにもNOX1が発現していることが判明した。

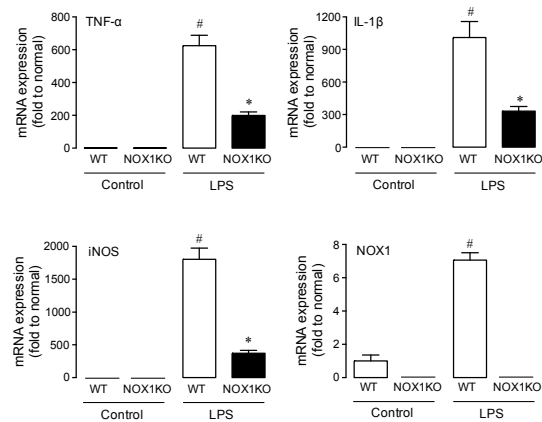
(4) 腹腔マクロファージ LPS 刺激サイトカインおよび iNOS 発現における NOX1 の関与

腹腔マクロファージにおいて、LPS 処置は著明な TNF- α 、IL-1 および iNOS mRNA 発現の増大が観察された。これらの増大はいずれも NOX1KO マウスから単離した腹腔マクロファージでは有意に低下していた。興味深いことに、NOX1 mRNA 発現もまた LPS 刺激により有意に増大し、当然のことながら NOX1KO マウスでは NOX1 発現は検出されなかった(図3)。

以上より、NOX1 はマクロファージにおけるサイトカイン、ケモカインおよび iNOS などの炎症性メディエーター発現の調節に関与していることが判明した。

ゆえに、TNBS 誘起大腸炎の病態には、腸管マクロファージに発現している NOX1 が関与していることが明らかになった。NOX1 はマクロファージレベルで炎症性メディエーター発現の調節に寄与しているものと推察される。一方、DSS 誘起大腸炎では NOX1 の関与は検出されなかったが、NOX1 は大腸上皮細胞に高発現し、大腸粘膜ホメオスタシスの調節に関与していることが知られており、おそらくこれら相反する NOX1 の作用により相殺されたことによるものと考えられる。

図3. 腹腔マクロファージにおける LPS 刺激炎症性メディエーター発現における NOX1 の関与



N = 8, *P < 0.05 vs WT mice; #P < 0.05 vs control.

(5) 結論

大腸炎の病態において、腸管マクロファージに発現している NOX1 由来 ROS が関与していることが明らかになった。NOX1/ROS はマクロファージレベルでサイトカイン、ケモカインおよび iNOS などの炎症性メディエーター発現増大に寄与しているものと推察される。

ゆえに、マクロファージに発現している NOX1 は大腸炎をはじめとする炎症性疾患の治療標的になり得ることが期待される。

今後、マクロファージレベルでの NOX1/ROS のサイトカイン発現増大の分子メカニズムならびにセロトニン/5-HT₃ 受容体シグナルとの関連などについて、さらに詳細な検討を行い、治療標的として有用性を検証していく予定である。

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3件)

加藤伸一. 消化管炎症の病態における NADPH オキシダーゼ 1(NOX1)の役割. 日本薬理学雑誌 147: 18-22 (2016). 査読有. DOI:http://doi.org/10.1254/fpj.147.18

Utsumi D, Kato S et al. Serotonin/5-HT₃ receptors promote colonic inflammation via activation of substance P/neurokinin-1 receptors in dextran sulfate sodium-induced

murine colitis. Br J Pharmacol 173: 1835-1849 (2016). 査読有.

DOI: 10.1111/bph.13482

Kato S et al., Saireito (TJ-114), a Japanese traditional herbal medicine, reduces 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice by inhibiting cytokine-mediated apoptosis in intestinal crypt cells. PLoS One 10: e0116213 (2015). 査読有.

DOI: 10.1371/journal.pone.0116213

〔学会発表〕(計6件)

續木彩香、加藤伸一他. 炎症性腸疾患の病態における NOX1/NADPH oxidase の役割. 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 201. 2015年8月29日, 東京大学(東京).

Utsumi D., Kato S et al., Serotonin/5-HT3 receptor and substance P/NK1 receptor pathways contribute to the pathogenesis of colonic inflammation in mice. Digestive Disease Week 2015. 2015年5月19日, Washington DC (USA).

Yokota H., Utsumi D., Kato S et al. NADPH oxidase1 (NOX1) expressed in colonic macrophages plays a crucial role in trinitrobenzene sulfonic acid-induced colonic inflammation in mice. Digestive Disease Week 2014. 2014年5月5日. Chicago (USA).

加藤伸一. 炎症性腸疾患における NADPH oxidase 1 (NOX1)の役割. 第88回日本薬理学会年会シンポジウム 24(招待講演). 2015年3月19日. 名古屋国際会議場(愛知).

今井梓嵯、横田 遥、加藤伸一他. トリニトロベンゼンスルホン酸(TNBS)誘起大腸炎における NADPH oxidase 1 (NOX1)の役割. 生体機能と創薬シンポジウム 2014. 2014年8月28日. 近畿大学(大阪).

加藤伸一他. トリニトロベンゼンスルホン酸誘起大腸炎の病態における NADPH oxidase 1 (NOX1)の役割. 第41回日本潰瘍学会. 2013年12月6日. 阪急エキスポパーク(大阪).

6. 研究組織

(1)研究代表者

加藤 伸一 (KATO Shinichi)
京都薬科大学・薬学部・教授
研究者番号: 90281500

(2)研究分担者

岩田 和実 (IWATA Kazumi)
京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師
研究者番号: 60305571