

平成21年 4月30日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19580340  
 研究課題名（和文） 炎症性腸疾患におけるプロテアーゼ活性化受容体脱感作の分子メカニズム  
 研究課題名（英文） Downregulatory mechanism of protease activated receptor in inflammatory bowel disease.  
 研究代表者  
 佐藤 晃一（SATO KOICHI）  
 山口大学・農学部・准教授  
 研究者番号：90205914

## 研究成果の概要：

本研究の目的は、消化管運動機能障害を伴う炎症性消化管疾患の新たな治療法ならびに管理法開発の基盤研究として、炎症性腸疾患における消化管平滑筋プロテアーゼ活性化受容体（PAR-2）の脱感作機構を分子レベルで解明することにある。本研究において、申請者は、腸炎発症に伴い増加する炎症性サイトカイン IL-1 $\beta$  と TNF- $\alpha$  が協調して PAR-2 mRNA 発現を減少させること。また、この減少には NF- $\kappa$ B の活性化が関与し、責任分子として少なくとも一酸化窒素（NO）とプロスタグランジン E2（PGE2）が関与することを明らかとした。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

## 研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 ・ 基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：消化管炎症、PAR-2、消化管運動、平滑筋

## 1. 研究開始当初の背景

クローン病や潰瘍性大腸炎はヒトの炎症性腸疾患として難病に指定されており、QOLが極めて低いことから、早急に治療法を確立すべき疾患の一つである。獣医小動物分野においても、感染性や薬剤性以外にも特発性炎症性腸疾患の増加が問題となっている。このような炎症性腸疾患においては、消化管運動機能障害により疾患が増悪することが知られているが、研究はまだ始まったばかりであり、その障害発生機構については多くの解決すべき点が残っている。

一方、本研究のターゲットである PAR-2 は、神経系、呼吸器系、消化器系、循環器系など生体の様々な組織に分布しており、特に病態生理における役割の重要性が認識されている。消化管組織においては、粘膜上皮細胞、壁内神経細胞、平滑筋細胞に分布しており、消化性外分泌、消化管粘膜保護、消化管運動、痛みの伝達など非常に多様な機能に関与している。また、PAR-2 活性化は腸炎を制御する可能性が示唆されていることから、PAR-2 作動薬あるいは拮抗薬は、過敏性腸症候群、炎症性腸疾患などの治療にも利用でき

る可能性があり、臨床応用の面における研究の進歩が期待されている。

PAR-2 は、肥満細胞に含まれるトリプターゼ、血管凝固因子、トリプシンなどの生理活性物質による細胞外 N 末端の切断により活性化される。つまり、一度活性化された受容体は、新たな受容体が細胞膜へ発現しないかぎり、再度活性化されることはない。このように PAR-2 は、病態生理における重要性ならびに受容体活性化様式の特異性から、国内外を問わずその病態生理的機能に関し、非常に多くの研究が精力的になされている。しかし、受容体の脱感作ならびにダウンレギュレーションについて、サイトカインが関与する炎症性病態の観点から詳細に研究した報告はなされていない。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、消化管運動機能障害を伴う炎症性消化管疾患の新たな治療法ならびに管理法開発の基盤研究として、炎症性腸疾患における消化管平滑筋プロテアーゼ活性化受容体 (PAR-2) の脱感作機構を分子レベルで解明することにある。そこで、具体的には下記を目標として研究を行った。

- (1) 腸炎発症に伴う PAR-2 脱感作に関与するサイトカイン等の責任分子を特定する。
- (2) サイトカインによる PAR-2 の脱感作と再発現への作用を明らかにする。
- (3) サイトカインによる PAR-2 mRNA 発現減少のならびに PAR-2 脱感作の分子機構を解明する (特に NF- $\kappa$ B 活性化の観点から)。

## 3. 研究の方法

### (1) 腸炎モデルラット作成法

腸炎モデルラットは、7~11 週齢の雄性 SD ラットへ 5%デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) を 0-7 日間自由飲水させることで作成した (DSS 投与ラット)。DSS 投与ラットでは、投与後 4-5 日目から下痢が観察され、投与後 6-7 日目には下血を呈した。7 日間 DSS 投与ラットの外貌は削痩し、体重増加率も有意に減少した。また、結腸起始部から直腸までの長さを比較すると、有意な短縮が認められた。実験に使用するラットは、エーテルで麻酔した後、頸動脈を切断し放血致死させた。腹部を開き結腸を摘出した後、遠位結腸部を実験に使用した。

### (2) 器官培養法

正常ラットより無菌的に摘出した遠位結腸の脂肪組織および結合組織を除去し、粘膜を剥離した筋層標本を、Hanks Balanced Salt Solution (Invitrogen) 40ml で 4 回洗浄し、シリコンディッシュの上に適度な張力をかけてピンで固定した。固定した筋層を 40% Antibiotic-Antimycotic (Invitrogen) を含

む Medium 199 (Invitrogen) に 10 分間浸し殺菌した後、1% Antibiotic-Antimycotic (Invitrogen) を含む Medium 199 を用い、37°C に保った 5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 24 時間培養した。

### (3) 張力測定法

摘出遠位結腸より作製した平滑筋層標本の輪走筋方向の両端をそれぞれ糸で結び、栄養液で満たした容量 10ml のマグヌス管中で、標本的一方をガラスホルダーに、もう一方をトランスデュサ (TB611T, 日本光電) につなぎ、標本を固定した。標本に 1g 重の静止張力を負荷し、発生する等尺性収縮張力を、ペンレコーダーを用いて記録した。収縮張力は、Scion Image software (Scion corporation) を用いて面積を測定し、area under the curve (AUC) として数値化した。実験終了後に標本の湿重量を測定し、数値化した収縮を湿重量当たりの絶対張力として評価した。

### (4) RT-PCR 法

摘出遠位結腸より作成した平滑筋層標本および器官培養を行った標本より、Trizol 法により total RNA を作成した。得られた RNA サンプルを用いて RT-PCR (Access Quick RT-PCR System, Promega) を行った。RT-PCR 反応は、Gene Amp PCR System (ABI2700, Applied Biosystem) を用い、各種プライマーならびに至適条件に従って行った。PCR 産物は 2%アガロースゲルを用いて電気泳動した後、ethidium bromide で染色し、ゲル撮影装置 (DigiDog-It System, フナコシ) で可視化した。各バンドはイメージスキャナーで取り込んだ後、Scion Image Software を用いて密度を測定し、数値化した。

### (5) ウェスタン・ブロッティング法

正常ラットまたは DSS 投与ラットより摘出した遠位結腸平滑筋層、および器官培養を行った遠位結腸平滑筋標本を液体窒素で急速に凍結し、凍結標本破砕機 SK ミル (トッケン) にセットし 1 分間振盪粉碎した。その後、直ちにタンパク抽出溶液によりタンパク質を変性し可溶化した。こうして得たホモジネートを 4°C、15,000 g で 30 分間遠心した後、上清を採取しタンパク質サンプルとした。10  $\mu$ g のタンパク質サンプルを SDS ポリアクリルアミドゲル (15%) で泳動し分離した後、転写装置 (AE6677, ATTO) を用いて PVDF 膜に転写した。その後、PVDF 膜を 5% ウシ血清アルブミンを加えたリン酸緩衝液により室温で 1 時間ブロッキング処置した後、各種一次抗体を 4°C で振とうしながら一晩処置した。その後、至適二次抗体を室温で 1 時間処置し、BCIP/NBT solution で発色させ観察した。

#### (6) 免疫染色法

アセトンで5分固定した遠位結腸標本をリン酸緩衝液(PBS)で洗浄した後、OCT compoundに包埋し、液体窒素で急速に凍結した。6~7  $\mu\text{m}$ の凍結切片を作成した後、PBSで洗浄し、10% ロバ血清を加えたPBSで1時間ブロッキング処置した。10% ロバ血清で希釈した各一次抗体を4°Cで一晩処置した後、PBSで洗浄し、至適二次蛍光抗体を室温で1時間処置した。封入後、倒立蛍光顕微鏡(TE2000-S, Nikon)で観察した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 誘導される炎症性サイトカインと生理活性物質

DSS マウスの結腸平滑筋層における各種サイトカイン発現量変化の測定を RT-PCR 法ならびにウェスタン・ブロッティング法により行った。DSS 投与による炎症の進展に伴い、平滑筋層における IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  および IL-6 のメッセンジャーおよびタンパク量は増加した(図1; mRNAの増加例)。また、責任分子の候補として考えられた一酸化窒素(NO)および抑制性プロスタグランジン(PG)の各合成酵素の発現量を測定したところ、誘導型NO合成酵素(iNOS)ならびに誘導型PG合成酵素(COX-2)の発現量は共に増加していた。

##### (2) サイトカインによる PAR-2 脱感作と発現の変化

###### 1) 器官培養法を用いた PAR-2 の機能と発現の解析

IL-1 $\beta$  および TNF- $\alpha$  を器官培養法で抽出遠位結腸平滑筋組織へ暴露することにより、PAR-2 の機能ならびに発現の変化について検討した。IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  または両サイトカインの同時処置により、PAR-2 刺激による弛緩の有意な減弱が確認された。弛緩の強度によるバイオアッセイから、PAR-2 の機能減弱は、サイトカインの濃度ならびに処置時間に依存していることが明らかとなった(図2)。さらに、PAR-2 発現量を、RT-PCR によりメッセンジャーレベルで、またウェスタンブロット法によりタンパク質レベルで解析したところ、この機能減弱は PAR-2 発現量の減少を伴っていることが明らかとなった。

###### 2) PAR-2 発現の空間的解析

免疫組織学的検索により、サイトカイン暴露による PAR-2 の endocytosis や再発現などの局在の変化を検討した。特に、細胞内局在部位を解明するために、lysosome および Golgi の特異的マーカーとの2重染色による局在部位の検討を行った。PAR-2 が平滑筋細胞および筋線維芽細胞に発現していることは確認された。しかし、lysosome および Golgi への

局在、ならびに DSS 投与ラット結腸標本との比較による、腸炎発症動物における PAR-2 局在の変化については、現時点では大きな差が認められていない。今後、更なる検討が必要である。

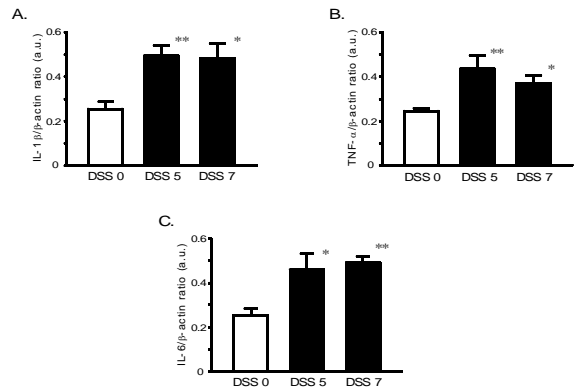


図1. DSS 投与ラットにおける IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  および IL-6 の mRNA 発現量の変化

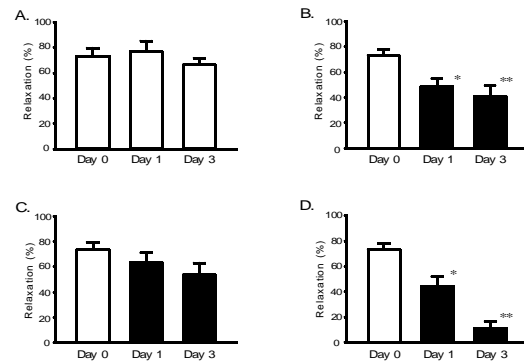


図2. IL-1 および TNF- $\alpha$  またはその両方の長時間暴露における trypsin 弛緩の変化

(A) サイトカイン非処置、(B) IL-1 $\beta$  の存在下、(C) TNF- $\alpha$  の存在下、(D) TNF- $\alpha$  と IL-1 $\beta$  両方の存在下

##### (3) サイトカインによる PAR-2 mRNA 発現減少の分子機構

###### 1) NF- $\kappa$ B 関与の検討(器官培養を用いた検討)

NF- $\kappa$ B 阻害薬(ammonium pyrrolidine dithiocarbamate 100mg/kg と sulfasalazine 200mg/kg)を投与した個体より抽出した消化管標本を用いた器官培養では、IL-1 $\beta$  および TNF- $\alpha$  による PAR-2 弛緩抑制ならびに PAR-2 mRNA 発現減少が解除されることが確認された。また、器官培養法により、NF- $\kappa$ B 阻害薬 BMS-345541 存在下での両サイトカインの作用について検討したところ、同様に PAR-2 の機能および発現への抑制が解除された。

###### 2) サイトカインによる PAR-2 脱感作の分子機構における責任分子

###### 1) 器官培養法を用いた解析

DSS 投与ラットでは、iNOS ならびに COX-2 の発現が増加していた。サイトカインによる PAR-2 脱感作ならびに mRNA 減少に、これらのタンパク質の関与を調べるため、IL-1 $\beta$  および TNF- $\alpha$  による器官培養による、iNOS および COX-2 発現の変化を検討した。サイトカイン存在下での器官培養により、iNOS および COX-2 発現は増加した。そこで、iNOS により産生される NO、および COX-2 により産生される PGE2 存在下での器官培養を行ったところ、PAR-2 の機能と発現は抑制された。

#### 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 2 件)

1. Sato, K., Ohkura, S., Kinoshita, K., Kitahara, Y., Ohama, T., Hori, M., Sato, M., Kobayashi, S., Sasaki, Y., Hayashi, T., Nasu, T., Ozaki, H., (2007). Involvement of CPI-17 Downregulation in the Dysmotility of the Colon from Dextran Sodium Sulphate-Induced Experimental Colitis in a Mouse Model. *Neurogastroenterol Motil*, 19, 504-514.

2. Sato, K., Torihashi, S., Hori, M., Nasu, T., Ozaki, H., (2007). Phagocytotic Activation of Muscularis Resident Macrophages Inhibits Smooth Muscle Contraction in Rat Ileum. *J Vet Med Sci*, 69, 1053-60.

[学会発表] (計 4 件)

1. 佐藤晃一, 堀江あい, 小松浩之, 大藏信亮, 那須哲之. (2008.9.30). 腸炎発症ラットの protease activated receptor-2 発現変化における炎症性サイトカインの役割. 第 7 回日本 Neurogastroenterology (神経消化器病) 学会. 東京都文京区.

2. 佐藤晃一, 堀江あい, 小松浩之, 大藏信亮, 那須哲之. (2008.11.28). 腸炎発症ラットの PAR-2 発現減少には炎症性サイトカインによる iNOS および COX-2 の誘導が関与する. 第 61 回日本薬理学会西南部会. 鳥取県米子市.

3. 佐藤晃一, 鳥橋茂子, 堀正敏, 那須哲之, 博, 尾. (2007.11.27). 異物食食による常在型マクロファージの消化管運動制御機構. 第 60 回日本薬理学会西南部会. 宮崎県宮崎市.

4. 佐藤晃一, 長井和樹, 堀江あい, 大藏信亮, 那須哲之. (2007.9.3). 腸炎発症ラットの protease activated receptor-2 機能変化における炎症性サイトカインの役割. 第 144 回日

本獣医学会学術集会. 北海道江別市.

[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  
なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

佐藤 晃一 (SATO KOICHI)  
山口大学・農学部・准教授  
研究者番号：90205914

##### (2) 研究分担者 (平成 19 年度)

那須 哲之 (NASU TETSUYUKI)  
山口大学・農学部・教授  
研究者番号：70035559

##### (3) 連携研究者 (平成 20 年度)

那須 哲之 (NASU TETSUYUKI)  
山口大学・農学部・教授  
研究者番号：70035559