

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：34401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15765

研究課題名(和文) ERストレスプレコンディショニング法によるNSAIDs起因性小腸潰瘍治療戦略

研究課題名(英文) The ER stress preconditioning as a therapeutic strategy for NSAIDs-induced intestinal ulcer.

研究代表者

小嶋 融一 (Kojima, Yuichi)

大阪医科大学・医学部・特別職務担当教員(講師)

研究者番号：10747744

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ERストレス、オートファジー等のストレス応答反応を標的としたNSAIDs誘因性小腸傷害の予防、及び治療法の開発を目的とした。本研究を通して、我々は、オートファジー誘導に注目した。ラパマイシン等既知のオートファジー誘導因子が、細胞モデルでIndomethacin (IM)誘因性的小腸傷害を効果的に減弱させることを見出した。その中で、糖代謝阻害剤物質Xが最も効果的にERストレスと同時にオートファジーを誘導し、且つ、細胞傷害を抑制する事を見出した。マウス小腸潰瘍モデルでもその治療効果を確認している。この分子は、がん治療薬としても注目されている分子で、ヒトへの応用も可能だと考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NSAIDsは、世界中で汎用されている薬物である。代表的な有害作用である胃粘膜傷害は、胃酸分泌阻害薬、あるいは、胃粘膜保護薬で予防、治療可能であるが、未知な点が多い小腸傷害では、未だに確立された治療法は存在しない。オートファジーを標的とした治療は、神経変性疾患、循環器疾患等で注目されており、本研究において、忍容性の高い物質によるオートファジー/ERストレスの人為的な誘導がNSAIDs誘因性小腸傷害治療につながる可能性が示唆されたことは、大きな学術的及び社会的な意義を持つ。

研究成果の概要(英文)：We aimed to find out therapies to prevent or cure NSAIDs-induced small intestine ulcer. To achieve this, we eventually focused on autophagy induction through experiments in this project. We evaluated effects of various molecules which have been known to induce autophagy, such as mTOR inhibitor, rapamycin on IM induced small intestine ulcer, and noticed that these molecules alleviated IM-induced toxicity on rat small intestine epithelial cell line, IEC6 cells in a dose-dependent manner. Among these molecules, a glycolytic pathway inhibitor, X, has induced autophagy as well as autophagy and suppressed cell injury, most efficiently. X has successfully alleviated small intestine ulcer in mouse model with IM. X was already focused as a cancer therapeutics, and we believe that X will be applicable to real-world human therapy.

研究分野：小腸傷害

キーワード：オートファジー ERストレス

### 1. 研究開始当初の背景

非ステロイド系抗炎症薬 (NSAIDs) は抗炎症・解熱・鎮痛・抗血小板凝集作用等の作用を持ち様々な場面で用いられている。その反面、消化管粘膜に、びらん・出血・穿孔を伴う潰瘍など多様な病変の原因ともなり、臨床的に大きな問題である。近年、カプセル内視鏡 (video capsule endoscopy : VCE) やダブルバルーン内視鏡 (double balloon endoscopy: DBE) の発達により、NSAIDs が胃のみならず小腸および大腸にも粘膜傷害を惹起することが知られるようになった。VCE を用いたコントロール群との比較試験に於いて、コントロール群の 0-7 % に対し、41-51 % の NSAIDs 服用者が小腸病変を合併していた。NSAIDs による粘膜傷害は、上部消化管においては粘膜に存在する H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase (プロトンポンプ、PP) より分泌される酸が傷害に大きく関与しているため、発生抑制には PP インヒビター (PPI) やヒスタミン H<sub>2</sub> 受容体拮抗薬 (H<sub>2</sub> receptor antagonist : H<sub>2</sub>RA) などの酸分泌抑制療法が非常に有効である。小腸粘膜では酸の分泌はないにも関わらず、粘膜傷害が引き起こされるため、胃粘膜とは全く異なる病態生理の関与が考えられている。ER (小胞体) ストレスは、異常タンパク質の蓄積等による ER に対するストレスであり、細胞は ER ストレスに対し適応のため様々な応答 (ER ストレス応答) をする事が知られている。NSAIDs による細胞傷害に対する ER ストレスとアポトーシスの関連性も報告されている。NSAIDs が ER ストレスを誘導することは研究代表者ら (J Gastroenterol, 2015, 50, 541-554) を含め複数の研究室から報告されている。また、過剰な ER ストレスは小腸病変の直接原因であるアポトーシスを誘導することから ER ストレス応答の破綻は NSAIDs 起因性小腸傷害のトリガーになっている可能性がある。2016 年、大隅教授 (東工大) のノーベル賞受賞で話題となったオートファジーは、元々、飢餓時に自己成分を分解して、栄養とするための自己食反応として見出されたが、現在では、ガン、心疾患、そして炎症性腸疾患 (クローン病および潰瘍性大腸炎) など様々な病態との関連が示唆されてきている。酸化ストレス、ER ストレス、そして脂肪滴の蓄積等の細胞ストレスに対する防御反応と考えられており、細胞内ストレスの増加がオートファジー反応のトリガーとなっている。このように NSAIDs 起因性小腸傷害の機序は徐々に解明されてきているが、実際にこれらの知見が治療に応用されるまでは至っていない。

### 2. 研究の目的

ER ストレス応答は生体防御反応である。NSAIDs 起因性小腸傷害においても傷害初期にはオートファジーを誘導して細胞傷害に対して防御的に働くと考えられている。ER ストレス応答はその後に来るストレスに対して保護的オートファジーを起こすか、あるいは傷害につながるアポトーシスを引き起こすかを決定する分岐点にある現象であるとも考えられる。このことは、ER ストレスを人為的に制御し、適度且つ保護的なオートファジーのみを誘導することができれば細胞傷害を制御出来る可能性を示唆している。また、直接的に、オートファジーを誘導することも細胞傷害を低減することが考えられる。そこで、本研究の目的は ER ストレスあるいはオートファジー誘導の前処理による人為的な保護的オートファジー誘導による NSAIDs 起因性小腸傷害予防・治療法を検証することである。

### 3. 研究の方法

( In vitro )

細胞傷害アッセイ

対象細胞：ラット小腸上皮細胞 IEC6

前処理薬：タブシガルギン ( TG ) ( SERCA 阻害薬、ER ストレス誘因薬 ) 、ラパマイシン ( mTOR 阻害薬、オートファジー誘因薬 ) 糖代謝阻害薬 X 等

測定法：WST-8 アッセイ ( 450 nm 吸光度測定、和光純薬 )

タンパク質発現：ウェスタンブロット法

細胞を  $1 \times 10^4$  /well で 96 ウェルプレートに播種。翌日、前処理薬を含んだ培地に変更、24 時間培養後、インドメタシン ( IM ) を  $200 \mu\text{M}$  含んだ培地に変更、24 時間後に WST-8 アッセイ。

同じ細胞密度で 12 ウェルプレートに播き、同様の処理をしたサンプルをウェスタンブロット法により解析。オートファジ マーカー ( Microtubule associated protein light chain 3, LC3 ) あるいは、ER ストレスマーカー ( Glucose regulated protein 78, GRP78 ) 等を検出及び分析。

( In vivo )

IM 起因性小腸傷害モデル

対象：マウス ( B6j、オス、8-12 週、体重 25g 以上 )

前処理：24 時間絶食、ラパマイシン、糖代謝阻害薬 X 等

前処理方法：IM 処理前に腹腔内投与、投与量は体重に合わせて調整

IM 処理：50-100mg/kg で腹腔内、あるいは、ゾンデによる経口投与

測定法：安楽死後、小腸摘出。顕微鏡下で、肉眼的、潰瘍数、総潰瘍面積 Ulcer Index、( UI ) 測定。

測定後、サンプルは、液体窒素急速凍結後、Real-time PCR、及び、ウェスタンブロット法にて解析。オートファジー、ER ストレス関連分子、そして炎症性サイトカインの測定および分析。

#### 4 . 研究成果

本研究は、NSAIDs 起因性小腸傷害における ER ストレスの役割を、オートファジーおよびアポトーシスとの関連を中心に詳細に検討し、ER ストレスの人為的制御【ER ストレスのプレコンディショニング ( 前処理 )】による NSAIDs 起因性小腸潰瘍治療の可能性を詳細に検討することである。最初に、ER ストレス誘因薬である TG による前処理が、IM による小腸細胞の傷害を抑制する事を見出した。しかし、TG 等の汎用型ストレス誘因薬は、薬物としての応用を考えた場合に、毒性、安定性等、全く十分ではない。また、様々な検討の中から、ER ストレスがオートファジ を誘導することから、オートファジ 誘導能を指標にした。文献的に、オートファジ を誘導し、且つ、臨床及び動物実験レベルで安全に使用されている薬物を選択し、結果的に、ある解糖系阻害薬 ( これ以降、X と呼ぶ ) が効果的であることを見出した。X は、ガン治療等への応用が検討されている物質であり、ヒトにも応用可能と考えられた。X をラット小腸細胞 IEC6 に 24 時間前処理を行うと、濃度依存的に IM による細胞傷害が抑制された。細胞増殖抑制、細胞毒性等、X による毒性は、殆ど観察されず、培養細胞レベルでは、高い忍容性をもって IM による傷害を抑制する事が観察された。同時に、オートファジーの亢進、且つ、ER ストレス関連分子の亢進がウェスタンブロット法により観察された。これまでに、この物質が、AMPK の活性化を介して、IM による細胞傷害を抑制していることが分かっていたが、直接、オートファジーの効果を検討するため、オートファジー誘導物質、mTOR 阻害薬、ラパマイシンの効果も同時に検討した。ラパマ

イシンは、濃度依存的に mTOR を阻害し、同時に、オートファジーの亢進も観察された。同様に、IM による細胞傷害からの保護作用が観察された。このことから、X がオートファジーの活性化を介して、IM による傷害から細胞を保護していることがさらに裏付けられた。マウス小腸傷害モデルにおいては、24 時間絶食の前処理を最初に行った。絶食は、オートファジーを誘導する重要な環境因子である。このモデルでは、有意に小腸潰瘍数、UI ともに減少していた。同時に炎症性サイトカイン遺伝子発現の低下、及び、組織学的な炎症の抑制が観察された。X の前投与を行った場合も、絶食時と同様に、小腸潰瘍の抑制が観察された。絶食モデルにおいて時折観察された胃潰瘍の上昇が、X 前投与では見られず、高い安全性が示唆された。ラパマイシンも抑制効果は見られたが、投与量による変化が大きく、現在も最適な投与量、投与方法の検討を行っている。このように、概ね、In vivo においても、In vitro と同様の結果が認められ、現在、論文の準備中である。研究代表者らは、本研究課題において、物質 X、ラパマイシン等、ヒトにも忍容性があり且つ、NSAIDs 誘因性小腸傷害の予防、治療薬として応用可能な具体的物質を見出すことが出来た。さらに、オートファジーの活性化を促す薬物は、NSAIDs 誘因性小腸傷害の保護・治療薬として利用できることが示唆され、より安全、且つ効果的な薬物をスクリーニングする上での理論的基盤を確立することが出来た。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ota, K. Takeuchi, T. Kojima, Y. Harada, S. Hirata, Y. Sugawara, N. Nouda, S. Kakimoto, K. Kuramoto, T. Higuchi, K.	4. 巻 19
2. 論文標題 Preventive effect of ecabet sodium on low-dose aspirin-induced small intestinal mucosal injury: a randomized, double-blind, pilot study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Gastroenterol	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12876-018-0923-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 中川孝俊、小島融一、樋口和秀、朝日通雄	4. 巻 33(7)
2. 論文標題 オートファジーとER ストレス応答の制御を標的とした NSAIDs 起因性小腸潰瘍治療戦略	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BIO Clinica	6. 最初と最後の頁 690-696
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nishida Shinya, Ota Kazuhiro, Hattori Kimiaki, Iwatsubo Taro, Kawaguchi Shimpei, Kojima Yuichi, Takeuchi Toshihisa, Maeda Tamaki, Sakaguchi Masahiro, Higuchi Kazuhide	4. 巻 20
2. 論文標題 Investigation of the clinical significance and pathological features of lanthanum deposition in the gastric mucosa	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 390-396
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12876-020-01545-z	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Naka Yutaka, Okada Toshihiko, Nakagawa Takatoshi, Kobayashi Eiko, Kawasaki Yuka, Tanaka Yasuyoshi, Tawa Hideki, Hirata Yuki, Kawakami Ken, Kakimoto Kazuki, Inoue Takuya, Takeuchi Toshihisa, Fukunishi Shinya, Hirose Yoshinobu, Uchiyama Kazuhisa, Asahi Michio, Higuchi Kazuhide	4. 巻 20
2. 論文標題 Enhancement of O-linked N-acetylglucosamine modification promotes metastasis in patients with colorectal cancer and concurrent type 2 diabetes mellitus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 1171 ~ 1178
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2020.11665	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------