

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K11474

研究課題名（和文）適度な自発運動は、炎症性大腸炎を予防できるか？

研究課題名（英文）Does moderate voluntary exercise have any prevent effect on inflammatory bowel disease？

研究代表者

松本 綾子（Matsumoto, Ayako）

順天堂大学・大学院スポーツ健康科学研究科・特任助教

研究者番号：20833825

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、運動による炎症性大腸炎（IBD）の抑制効果をタンパク質レベルで明らかにすることを目的として研究を進めてきたが、当初の予想に反して、運動による明らかな炎症抑制効果を確認することができなかった。そこで、計画を変更して、運動に関係なくIBD誘発マウスで、発現量と翻訳後修飾に差があるタンパク質を二次元電気泳動で調べた。その結果、差は小さいものの発現量に変化の見られるタンパク質が複数観察された。また、翻訳後修飾についても、リン酸化、およびニトロ化タンパク質を網羅的に同定することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、炎症性大腸炎（IBD）の発症、および病態形成への関与が期待されるリン酸化、およびニトロ化タンパク質を網羅的に同定することができた。特にニトロトリプトファンは新規の翻訳後修飾であり、優れた炎症、及び酸化ストレスマーカーである。さらに、最近の研究では、ニトロトリプトファン修飾による酵素活性阻害効果など新たな働きも明らかになりつつある。本研究で同定したニトロ化タンパク質は、IBD早期発見のマーカーとしての活用や、発症メカニズムのさらなる解明への手がかりとなることが期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to clarify the inhibitory effect of exercise on inflammatory bowel inflammation (IBD) at the protein level. However, contrary to our original expectation, we could not confirm it. Therefore, we changed our plan. We performed two-dimensional electrophoresis to examine protein with differential expression level and with post-translational modifications in exercise-irrelevant IBD-induced mice. As a result, we observed several proteins whose transcription level slightly but significantly changes. We further identified phosphorylated proteins as well as nitrated ones by proteomics.

研究分野：運動生理学

キーワード：炎症性大腸炎 自発運動 酸化ストレス ニトロトリプトファン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

炎症性大腸炎(IBD)は、潰瘍性大腸炎とクローン病に代表される慢性炎症性疾患であり、国から難病指定されている。特に潰瘍性大腸炎は、大腸粘膜にびらんや潰瘍ができる腸疾患で、平成 25 年の患者数は約 17 万人とされ、毎年 5000 人程度増加している。原因として、腸内細菌の関与や自己免疫機能の異常、食生活の変化、さらには遺伝子の関与も示唆されているが、原因の特定には至っていない。

一方で、適度な運動には炎症抑制効果があることが疫学的に示されているが、IBD 誘発マウスやラットを用いた動物実験では、運動による症状の改善や炎症性マーカーの発現低下が報告されているものの、その抑制機序について詳細な解析は進んでいない。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、運動による IBD の予防効果とその仕組みを、タンパク質レベルで明らかにすることである。実験には IBD 誘発マウスを用い、運動効果の指標としてタンパク質の量的・質的(タンパク質翻訳後修飾)変化に着目した。IBD を含む炎症性疾患では、これまで様々な炎症性・抗炎症性サイトカインの関与が報告されているが、それ以外のタンパク質の発現変化に関して網羅的に解析した事例は少ない。本研究では、網羅的なプロテオーム解析を行うことで、IBD 発症、および運動による IBD 発症抑制に関わる新規タンパク質の同定と新規のタンパク質翻訳後修飾の発見を目指した。

また、本研究では、我々が新たに見出したタンパク質翻訳後修飾、ニトロトリプトファンに着目した。ニトロトリプトファンは、優れた炎症、及び酸化ストレスマーカーであり、IBD 発症や病態形成に関して新規メカニズムの解明につながることを期待できる。

### 3. 研究の方法

#### (1) 実験動物および実験デザイン

##### 運動による潰瘍性大腸炎予防効果の検証

生後 4 週齢の雄性 C57BL/6 マウスを 1~2 週間予備飼育した後、無作為に 1) 対象群、2) 運動群、3) DSS 処理群、4) 運動 + DSS 処理群に振り分け、ランニングホイール有り、または無しの個別ケージに移した。個別ケージに移して 8 週間後に、3% DSS (デキスト硫酸ナトリウム)を含む、または含まない水を 5 日間飲水させることで潰瘍性大腸炎を誘発した。DSS 投与開始から 6 日目、または 8 日目に大腸を摘出し、長さおよび湿重量を測定後、3 つ(盲腸側、中央部、直腸側)に分けて回収した。なお、各群 5 個体以上で解析を行った。

##### 潰瘍性大腸炎モデルマウスの作出

生後 4 週齢の雄性 C57BL/6 マウスを 3 週間予備飼育した後、ランニングホイール無しの個別ケージに移した。10 週齢から 0%(6 個体)、2%(5 個体)、3%(5 個体)、4%(6 個体)の DSS を含む水を 5 日間自由飲水させ、潰瘍性大腸炎の誘発を行った。DSS 投与開始から 8 日目に大腸を摘出し、長さおよび湿重量を測定した後、3 つ(盲腸側、中央部、直腸側)に分けて回収した。

#### (2) 炎症評価の方法

炎症の評価は、体重減少、糞の状態(下痢・血便有無のスコア)、腸管長の短縮、さらにサイトカインなど炎症マーカーの mRNA の発現量変化を定量的 PCR で調べることにより行った。

下痢・血便有無のスコアは、下痢と血便の程度を 4 段階に分けて評価し、合計スコアを算出した。

炎症マーカーは、炎症性、抗炎症性サイトカインとして TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6、IL-10 の発現を調べると共に、iNOS についても測定した。

#### (3) マイクロアレイ解析

大腸中央部の一部から抽出、精製した total RNA を用いて、マイクロアレイ解析を行った。解析には、Agilent 社 SurePrint G3 Mouse Gene Expression v2 8x60k Microarray Kit を使用した。

#### (4) プロテオーム解析

大腸中央部を細胞溶解液中(7 M 尿素、2 M チオ尿素、3% CAPS、1% Triton X-100)でホモジナイズし、Bradford でタンパク質量を定量した。

発現量解析では、各個体から抽出したタンパク質を、0%と 3% DSS 処理群ごとに等量ずつ混合し使用した。それぞれを別々の蛍光色素で標識した後に混合し、同一ゲル上で二次元電気泳動を行った。標識には、Refraction-2D Labeling Kit(funakoshi)を使用した。蛍光シグナルは Typhoon 9400(GE Healthcare)を用いて検出し、DeCyder 2D(GE Healthcare)を用いて解析した。

翻訳後修飾の検出は、個体ごと、または、0%と 3% DSS 処理群ごとに混合したサンプルを用いて、SDS-PAGE、または二次元電気泳動後に Western blot を行うことにより解析した。一次抗体

には、抗リン酸化抗体として、ホスホセリン(p-Ser)、ホスホスレオニン(p-Thr)、ホスホチロシン抗体(p-Tyr)を、抗ニトロ化抗体として、ニトロチロシン抗体とニトロトリプトファン抗体を使用した。また、リン酸化については、特異的蛍光色素 Phos-tag (NARD) を用いた解析も行った。シグナルの検出には、ChemiDoc Touch (BIO-RAD) を使用した。また、メンブレン、またはゲル上の全タンパク質を、メンブレンの場合は SYPRO Ruby Protein Blot Stain で、ゲルの場合は CBB 染色することにより検出した。

発現量、または翻訳後修飾に差が見られたタンパク質は、別途同じ条件で電気泳動し CBB 染色したゲルから目的のタンパク質に該当するバンド、またはスポットを切り出し、トリプシン処理後、質量分析装置 (nanoLC-MS/MS, Thermo SPECTIFIC) により解析した。データベース検索には MASCOT (Matrix Science) を使用した。

#### (5) 倫理

全ての動物実験は、順天堂大学動物実験委員会の承認を受けた計画(19-01)に沿って実施した。

### 4. 研究成果

#### (1) 運動による潰瘍性大腸炎予防効果(自由飲水時)

潰瘍性大腸炎に対する運動効果を、体重変化、糞の状態、腸管長の短縮を指標に比較したところ、いずれも運動群で炎症の悪化が示唆された。また、サイトカインなど炎症マーカーの mRNA 量についても比較を行ったが、運動群で炎症の悪化、若しくは変化なしの結果であった。原因を調べたところ、運動群は非運動群に比べ、有意に飲水量の増加が見られることが分かった。そこで、運動群の飲水量を制限することで非運動群と飲水量を揃えた条件で、再度運動の有無による影響を調べた。

#### (2) 運動による潰瘍性大腸炎予防効果(制限飲水時)

自由飲水時の実験と同様に、体重変化、糞の状態、腸管長の短縮を指標に運動による潰瘍性大腸炎予防効果を調べた。体重の減少を除き運動群で炎症の悪化は見られなくなったが、非運動群と比較して明らかな炎症抑制効果も観察できなかった。炎症マーカーの mRNA の発現量の比較においても、運動群で iNOS の発現に減少傾向がみられたものの、運動による明らかな炎症抑制効果は見られなかった。

以上のように、本研究では、運動による IBD の予防効果を予想して研究を進めてきたが、予想に反して、運動による明らかな炎症抑制効果は認められなかった。その原因として、自由飲水時には運動群での飲水量の増加が、制限飲水時には運動群での体重減少が考えられた。いずれも運動群で相対的に DSS 摂取量が増加したことを示唆しており、運動群で十分な炎症抑制効果が見られなかった原因の1つであると考えられた。また、このような状況下での運動の有無によるタンパク質の発現量の差は極めて小さいことが推測された。そこで、高感度、かつ網羅的に発現量を調べることが必要であると判断し、当初予定になかった mRNA を用いたマイクロアレイ解析を追加で行った。

#### (3) マイクロアレイ解析

各群から2個体を選択して、大腸 RNA のマイクロアレイ解析を行った。その結果、運動群で発現量に変化があった遺伝子の約 70 %が DSS 処理群と同様の発現変化を示すことが分かった。両者のターゲットの多くは共通で、特に免疫関連遺伝子群への関与が顕著であった。また、DSS 処理群と運動 + DSS 処理群で運動の有無による mRNA の発現を比較したところ、DSS 単独での効果を運動が打ち消す方向への変化が生じていることが分かった。この結果は、潰瘍性大腸炎の抑制には至らないまでも、遺伝子発現レベルでは運動が DSS の影響を抑制している可能性を示唆していた。

マイクロアレイの結果から、当初の予想に反して、運動で顕著な炎症抑制効果が見られない原因の一端として、運動と DSS とで影響を被るターゲット遺伝子が共通していることが明らかになった。また、DSS 処理群と運動 + DSS 処理群との比較では、各群2個体ずつの比較において、共通して発現量に1.5倍以上の差が見られた遺伝子の数が約100個と予想外に少なく、さらにその発現量の差も比較的小さいことが示唆された。よって、当初の計画通りに、運動の有無で発現量、及び翻訳後修飾に変化が見られるタンパク質を同定するという方法では、運動による IBD 抑制効果に繋がるタンパク質を同定するのは困難であると判断した。そこで、予定を変更し、まずは IBD 誘発によってどのようなタンパク質が発現変動し、翻訳後修飾を受けるかを、運動をさせないマウスで網羅的に調べることにした。

#### (4) 潰瘍性大腸炎モデルマウスにおける炎症の再確認

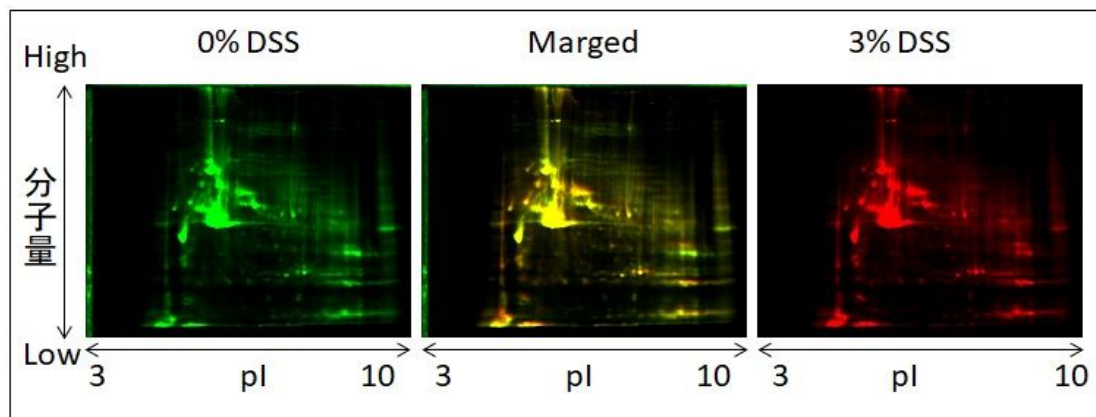
ランニングホイール無しの個別ケージで飼育したマウスに、DSS 濃度 0%、2%、3%、4%の条件で潰瘍性大腸炎を誘発し、これまでと同様の方法で、体重変化、糞の状態、腸管長の短縮、炎症マーカーの mRNA の発現量比較を行った。その結果、一部の指標で、4%で頭打ちの現象がみられたものの DSS 濃度依存的に炎症の悪化が確認できた。

### (5) 潰瘍性大腸炎モデルマウスの腸を用いたプロテオーム解析

解析には、(4)の実験で採取した大腸(中央部)から抽出したタンパク質を用いた。

#### 発現量の解析

まずは、0% DSS 処理サンプルを G-Dye200 で、3% DSS サンプルを G-Dye300 でそれぞれ標識した。その後、両サンプルを混合し、同一ゲル上で二次元電気泳動を行い、それぞれの蛍光強度を比較することで発現量の違いを検出した(下図)。その結果、発現量に違いのあるタンパク質を複数検出することができた。特に違いの大きい一部のタンパク質について質量分析装置でタンパク質の同定を行ったところ、その一つは、Carbonic anhydrase 1 であることが分かった。

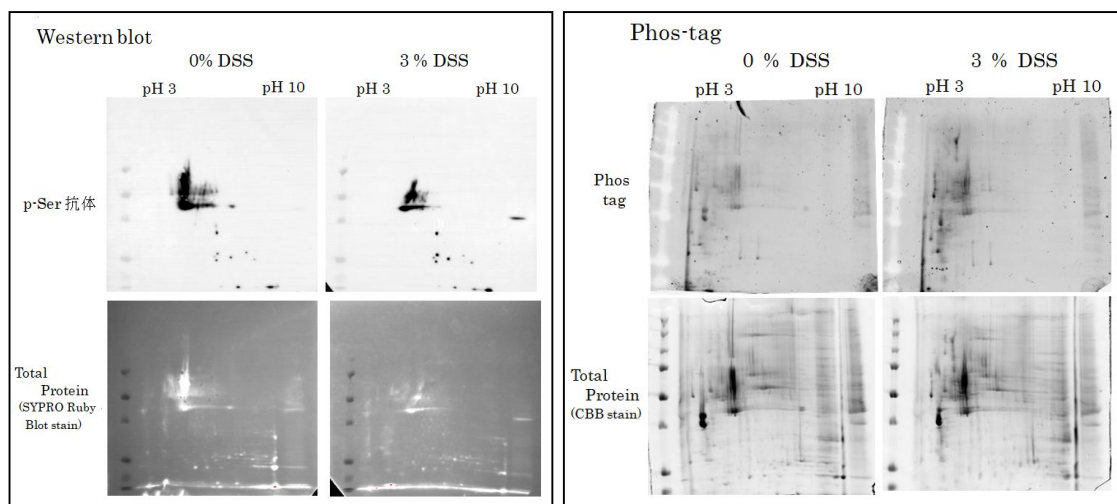


#### リン酸化の解析

続いて、翻訳後修飾について解析を行った。0%と3% DSS サンプルで、一次抗体に、ホスホセリン(p-Ser)、ホスホスレオニン(p-Thr)、ホスホチロシン(p-Tyr)抗体を用いた Western blot 解析を行った。その結果、p-Ser 抗体(左下図)と p-Tyr 抗体ではポジティブスポットが確認できたが、p-Thr 抗体ではスポット自体が検出できなかった。

次に、ポジティブスポットと SYPRO Ruby Protein Blot Stain で検出した全タンパク質スポットとの比較を行ったところ、p-Ser 抗体では対応するスポットを同定できたが、p-Tyr 抗体では対応スポットを同定することができなかった。この結果から、p-Tyr 抗体ポジティブスポットは non-specific なスポットである可能性が高いと推測された。

よって、解析に使用できた抗体は p-Ser 抗体のみで、特異的抗体だけでは網羅的な検出が難しかったため、リン酸化を特異的に検出する蛍光色素 Phos-tag を用いた解析を行った(右下図)。0%と3% DSS サンプルでリン酸化を比較したところ、タンパク量当たりのリン酸化は変わらないが、3%で発現が強いことが示唆された。



次に、それらポジティブスポットに該当するスポットを切り出し質量分析装置で解析した。その結果、リン酸化部位まで同定できたタンパク質は少なかったものの、同定できたタンパク質の多くで、すでにリン酸化部位が報告されており、IBD においても同様の部位のリン酸化の可能性が推測できた。

## ニトロ化の解析

同様に、ニトロ化についても解析を行った。まずは、個体ごとのサンプルを SDS-PAGE し、抗ニトロトリプトファン抗体を用いて Western blot 解析を行った。その結果、約 40kDa のタンパク質で DSS 濃度依存的にニトロ化が増加していることが分かった。その他、13 本のポジティブバンドが確認できた。そこで、これらポジティブバンドに該当するバンドを切り出し、質量分析装置で解析した。その結果、約 40kDa のタンパク質は Actin であることが判明した。上記の表は、SDS-PAGE で同定したニトロ化タンパク質の一覧である。

質量分析で同定されたニトロ化タンパク質

Protein	Mass (Mr)	Calculated pI	Sequence coverage (%)	Accession No.
Alpha-actinin-1	103631	5.23	50	Q7TFP4
Alpha-actinin-4	105368	5.25	51	P57780
Lipoma-preferred partner homolog	67387	7.19	33	Q8BFW7
Prelamin-A/C	74478	6.54	64	P48678
Keratin, type II cytoskeletal 8	54531	5.70	81	P11679
Tubulin beta-4B chain	50255	4.79	72	P68372
Tubulin beta-4A chain	50010	4.78	61	Q906F9
Tubulin beta-5 chain	50095	4.78	72	P99024
Tubulin beta-2A chain	50274	4.78	72	Q7TMM9
Alpha-enolase	47453	6.37	60	P17182
Actin, aortic smooth muscle	42381	5.23	70	P62737
Actin, alpha skeletal muscle	42366	5.23	70	P68134
Beta-actin-like protein2	42319	5.30	32	Q8BF23
Actin, cytoplasmic 1	42052	5.29	65	P60710
Actin, gamma-enteric smooth muscle	42249	5.31	64	P63268
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	36072	8.44	48	P16858
Calponin-1	48367	8.14	7	O64467
Calponin-2	33506	9.05	62	Q09091
Galectin-4	36405	9.13	52	Q8K419
Carbonic anhydrase 1	28370	6.44	79	P13634
Transgelin	22618	8.85	84	P37804
UMP-CMP kinase	22379	5.68	57	Q9DBP5

次に、二次元電気泳動で Western blot を行った。0%と3% DSS サンプルでニトロ化を比較したところ、タンパク量当たりのニトロ化は3%でより強いことが分かった(下図)。この結果は、3%でより強い炎症反応、または酸化が起きている可能性を示唆している。これらポジティブスポットに該当するスポットを質量分析装置で解析した結果、SDS-PAGE ですでに確認されたタンパク質を含む7個のタンパク質でニトロトリプトファン残基が検出できた。

ニトロチロシンについても、同様に、二次元電気泳動後、Western blot 解析を行ったが、ポジティブスポットは確認できたものの該当するタンパク質スポットを同定することができなかった。

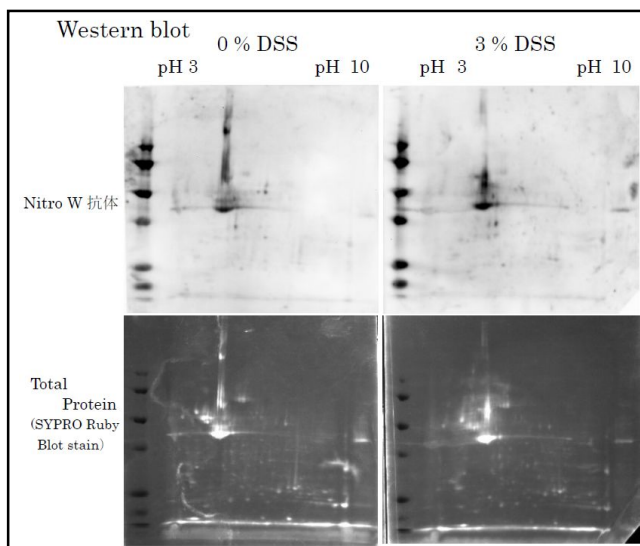
## 新規ニトロ化タンパク質と IBD との関係

本実験で IBD との関係が推測される複数のニトロ化タンパク質を同定することができた。

中でも、ガレクチン 4 は、ニトロトリプトファン残基が糖認識部位に位置しており、ニトロ化によって糖との結合が阻害される可能性が考えられる。ガレクチン 4 は、結腸で多く発現しており、大腸がんで発現が抑制される。IBD においても、ニトロ化によるガレクチン 4 の機能障害が、IBD 発症、または病態形成に関して何らかの影響を与えているかもしれない。

以上のように、「適度な自発運動が、IBD を予防できるか？」という課題に対しては、マイクロアレイ解析の結果から、遺伝子発現レベルでは運動が DSS の影響を抑制している可能性が示されたものの、その他、糞の状態、腸管長の短縮、炎症性サイトカインの発現増加など IBD の実態を表す指標においては顕著な抑制効果が認められず、「運動による IBD 予防効果の仕組みをタンパク質レベルで明らかにする」という当初の目的を果たすことは叶わなかった。

一方で、IBD の発症、または病態形成への関与が期待されるリン酸化、およびニトロ化タンパク質については、本研究で網羅的に同定することができた。本研究で検出されたタンパク質の中には、今回で初めてニトロ化タンパク質として同定されたものが複数含まれており、今後は、これらのニトロ化タンパク質に着目することで、IBD 発症、または病態形成に関して新規メカニズムの解明に繋がると期待できる。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
研究分担者	飯泉 恭一  (Iizumi Kyoichi)  (30439351)	柴田学園大学・生活創生学部・准教授    (31102)	
研究分担者	川崎 広明  (Kawasaki Hiroaki)  (40531380)	昭和女子大学・生活科学部・講師    (32623)	
研究分担者	栗 寿喜  (Natsume Toshiharu)  (90761841)	東海大学・医学部・特任助教    (32644)	

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