

機関番号：34306
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20590550
 研究課題名（和文） 非ステロイド性抗炎症薬による小腸傷害における腸管マクロファージの役割に関する研究
 研究課題名（英文） Role of intestinal macrophages in the pathogenesis of intestinal lesions induced by non-steroidal anti-inflammatory drugs.
 研究代表者
 加藤 伸一（KATO SHINICHI）
 京都薬科大学・薬学部・准教授
 研究者番号：90281500

研究成果の概要(和文):消化管傷害における腸管マクロファージの役割に関する研究を行った。

1. 非ステロイド性抗炎症薬(NSAID)による小腸傷害において、マクロファージの $\alpha 7$ ニコチン受容体($\alpha 7nAChR$)が保護的に作用していることを明らかにした。
2. ドパミンD2受容体遮断薬が $\alpha 7nAChR$ 受容体を介してNSAID誘起小腸傷害を抑制することを見出した。
3. 関節炎発症時におけるNSAID誘起胃損傷の増悪にはiNOS/eNOS発現の増大が関与していることを明らかにした。
4. プロトンポンプ阻害薬であるランソプラゾールがヘムオキシゲナーゼ(HO)-1の誘導を介してNSAID誘起小腸傷害を抑制することを見出した。
5. 慢性胃潰瘍の治癒において、マクロファージはシクロオキシゲナーゼ(COX)-2/血管内皮増殖因子(VEGF)発現の増大を介して促進的に寄与していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：In the present study, we investigated the role intestinal macrophages in the pathogenesis of gastrointestinal diseases.

1. The activation of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor ($\alpha 7nAChR$) suppresses the severity of intestinal lesions induced by non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID).
2. Dopamine D2 receptor antagonists significantly prevent NSAID-induced intestinal lesions through activation of $\alpha 7nAChR$.
3. The aggravation of NSAID-induced gastric damage during arthritis is attributable to the upregulation of iNOS and eNOS.
4. Lansoprazole, a proton pump inhibitor, protects NSAID-induced intestinal lesions through induction of heme oxygenase (HO)-1.
5. Macrophages play a beneficial role in the healing of chronic gastric ulcers mediated by increase in neovascularization through upregulation of cyclooxygenase (COX)-2 and vascular endothelial growth factor (VEGF).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200	360	1,560
2009年度	1,200	360	1,560
2010年度	1,200	360	1,560
年度			
年度			
総計	3,600	1,080	4,680

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学

キーワード：非ステロイド性抗炎症薬 (NSAID)、マクロファージ、消化管傷害

$\alpha 7$ ニコチン性アセチルコリン受容体、内皮型 NO 合成酵素、一酸化窒素 (NO)

1. 研究開始当初の背景

NSAIDは現在臨床において最も頻繁に使用される薬剤の一つであるが、消化管傷害などの副作用を有することが知られており、その使用が制限される要因となっている。NSAIDの消化管傷害は主として胃などの上部消化管に特徴的に認められるものと考えられてきた。しかし近年、カプセル内視鏡やDouble balloon内視鏡などが開発され、小腸を簡便かつ詳細に観察することが可能となり、NSAIDによる小腸傷害が予想以上に多いことが明らかになり、臨床において大きな問題となっている。

我々は以前よりインドメタシンなどのNSAIDにより誘起される小腸傷害について実験動物レベルで様々な検討を行い、内因性プロスタグランジン(PG)産生の低下に加えて、腸内細菌、好中球などの炎症性細胞、さらには誘導型一酸化窒素合成酵素(iNOS)由来の一酸化窒素(NO)や種々の炎症性サイトカインなどの関与を明らかにしてきた。なかでも腸内細菌はNSAID誘起小腸傷害の発生に深く関与しており、腸内細菌自体、またはそれらから産生されるリポ多糖(LPS)などがその後の炎症および傷害反応を引き起こすものと推察されているが、詳細については不明である。

マクロファージは細菌などの外来抗原に対する自然免疫の主な担当細胞であり、感染防御において重要な役割を担っている。腸管では多数の腸内細菌が存在していることから、種々の消化管疾患における腸管マクロファージの役割は特に重要であると考えられている。実際、腸管マクロファージと潰瘍性大腸炎やクローン病などの炎症性腸疾患(IBD)との関連が近年注目されているが、NSAID誘起小腸傷害との関連性についてはほとんど知られていない。我々は以前、アジュバント関節炎ラットではNSAID誘起小腸傷害が著明に増悪すること、またその機序として関節炎ラットにおける小腸粘膜に浸潤したマクロファージのTLR4発現の増大が関与していることを報告した。ゆえに、NSAID誘起小腸傷害の病態に腸管マクロファージが関与している可能性が推察される。

2. 研究の目的

本研究では、NSAID誘起小腸傷害における腸管マクロファージの関与について種々の検討を行った。さらに、一旦発生した傷害の修復過程におけるマクロファージの関与についても併せて検討を行った。

3. 研究の方法

(1) NSAID誘起小腸傷害における $\alpha 7$ ニコチン性アセチルコリン受容体($\alpha 7$ nAChR)の関与

C57BL/6マウスにインドメタシン(10 mg/kg)を皮下投与し、24時間後に小腸を摘出し、傷害面積を測定した。ニコチン(0.3-3 mg/kg)およ

び $\alpha 7$ nAChR作動薬であるPNU-282987(1-10 mg/kg)はインドメタシン投与30分前および8時間後に、また $\alpha 7$ nAChR拮抗薬であるメチリカコニチン(10 mg/kg)はニコチン投与30分前にそれぞれ腹腔内投与した。インドメタシン投与8時間後における小腸粘膜ミエロペルオキシダーゼ活性は α -ジアニシジンにより、またiNOSおよびTNF- α mRNA発現はリアルタイムRT-PCRにより測定した。さらに、傷害部位における $\alpha 7$ nAChRおよびマクロファージ発現は免疫組織化学的に観察した。

(2) NSAID誘起小腸傷害に対するドパミンD2受容体拮抗薬の効果

内因性アセチルコリンによる腸管マクロファージの $\alpha 7$ nAChR活性化の影響を検討するため、ドパミンD2受容体拮抗薬であるドンペリドンおよびメトクロプラミドの効果について検討した。ドンペリドン(0.1-10 mg/kg)およびメトクロプラミド(0.03-0.3 mg/kg)はインドメタシン投与30分前および8時間後にそれぞれ腹腔内投与した。各種パラメータの測定は先述の方法により行った。

(3) 関節炎発症時におけるNSAIDにより誘起される胃損傷の増悪における内皮型NO合成酵素(eNOS)の関与

雄性DA系ラットにフロイト完全アジュバントを右足踵に投与することにより関節炎を発症させた。アジュバント投与2週間後にインドメタシン(30 mg/kg)を絶食下に経口投与し、4時間後に胃を摘出し、損傷を評価した。iNOS阻害薬である1400W(10 mg/kg)およびeNOS阻害薬であるL-NIO(30 mg/kg)はインドメタシン投与18および1時間前に皮下投与した。また、正常および関節炎ラット胃粘膜におけるiNOSおよびeNOS発現をWestern blotおよび免疫組織学的に検討した。

(4) NSAID誘起小腸傷害におけるプロトンポンプ阻害薬であるランソプラゾールの効果

ランソプラゾール(30-100 mg/kg)はインドメタシン投与30分前に経口投与した。ヘムオキシゲナーゼ(HO)阻害薬であるSnPP(30 mg/kg)はランソプラゾール投与30分前に静脈内投与した。各種パラメータの測定は先述の方法により行った。また、HO-1発現はenzyme-immunoassayおよび免疫組織学的に検討した。

(5) 慢性胃潰瘍の治癒におけるマクロファージの関与

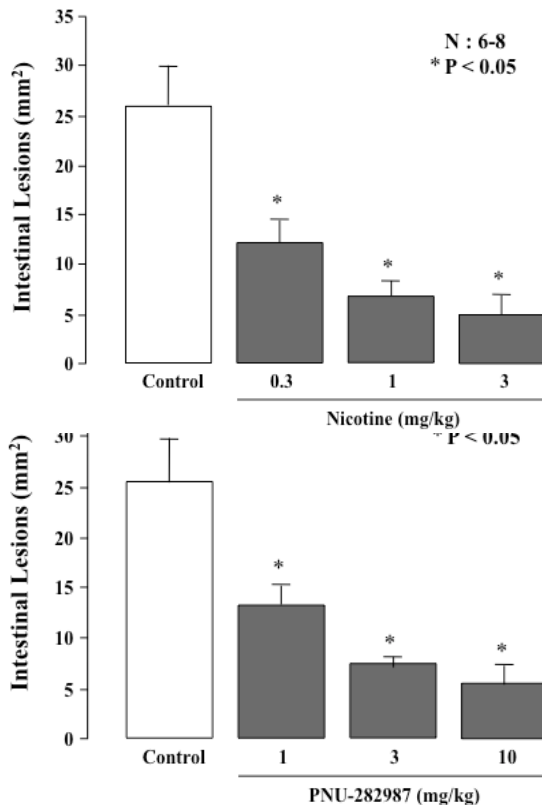
M-CSF変異(op/op)マウスおよびその野生型マウスの胃に70°Cに熱した金属製コテを30秒間押し当てることにより慢性胃潰瘍を惹起し、その後経日的に治癒を観察した。マク

ロファージおよび血管新生は免疫組織学的に検討した。また、シクロオキシゲナーゼ (COX)-2、TNF- α および血管内皮増殖因子 (VEGF) mRNA 発現はリアルタイム RT-PCR により測定した。

4. 研究成果

(1) NSAID 誘起小腸傷害における $\alpha 7$ ニコチン性アセチルコリン受容体 ($\alpha 7$ nAChR) の関与

- ① インドメタシンの投与は空回腸粘膜に重篤な出血性損傷を惹起した。
- ② インドメタシンによる小腸傷害はニコチンおよび PNU-282987 の投与により用量依存的かつ有意に抑制された。

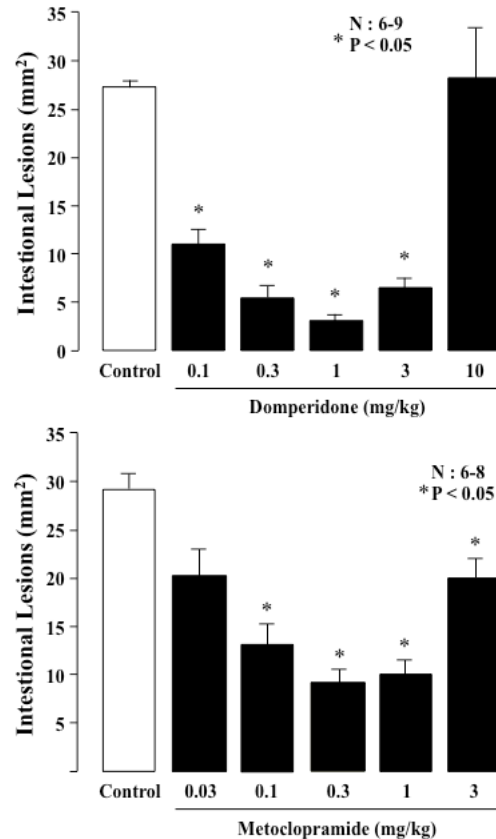


- ③ インドメタシンの投与は8時間後から著明な MPO 活性の上昇ならびに iNOS および TNF- α 発現の増大を誘起したが、これらいずれもニコチンおよび PNU-282987 の投与により有意に抑制された。
- ④ ニコチンによる小腸傷害抑制作用はメチリカコニチンの前処置によりほぼ完全に消失した。
- ⑤ 小腸傷害部位では $\alpha 7$ nAChR 発現が著明に増大しており、その一部は傷害部位に集積した CD68 陽性マクロファージであった。

以上の結果より、NSAID 誘起小腸傷害の発生にはマクロファージに誘導された iNOS が関与しているが、一方でマクロファージに発現している $\alpha 7$ nAChR の活性化を介して傷害に対して抑制的に作用していることが判明した。

(2) NSAID 誘起小腸傷害に対するドパミン D2 受容体拮抗薬の効果

- ① インドメタシン誘起小腸傷害はドンペリドンおよびメトクロプラミドの投与により用量依存的かつ有意に抑制された。
- ② ドンペリドンおよびメトクロプラミドによる小腸傷害抑制効果はいずれも $\alpha 7$ nAChR 拮抗薬の前処置により有意に減弱した。



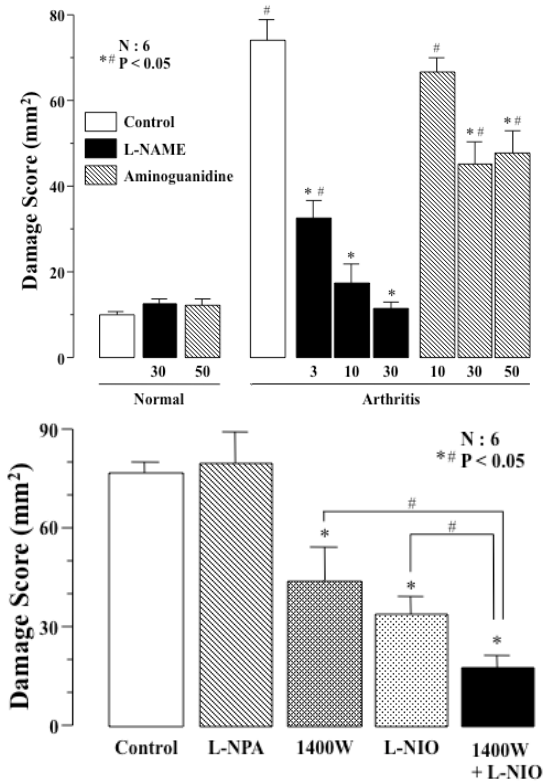
- ③ インドメタシンによる小腸粘膜 MPO 活性の上昇ならびに iNOS および各種ケモカイン発現の増大もまたドンペリドンおよびメトクロプラミドの投与により有意に抑制された。

以上の結果より、ドパミン D2 受容体拮抗薬が NSAID 誘起小腸傷害に対して抑制効果を発揮することが判明した。この作用は内因性 ACh 遊離増大による腸管マクロファージの $\alpha 7$ nAChR の活性化に起因しているものと推察される。

(3) 関節炎発症時における NSAID により誘起される胃損傷の増悪における内皮型 NO 合成酵素 (eNOS) の関与

- ① インドメタシンの投与は胃体部に出血性の損傷を惹起したが、その程度は正常ラットに比較して関節炎ラット (アジュバント投与 2 週間後) では著明に増悪していた。

- ② 関節炎ラットにおけるインドメタシン誘起胃損傷の増悪は 1400W および L-NIO の前処置によりいずれも有意に抑制され、さらに両阻害薬の併用投与によりほぼ完全に消失した。

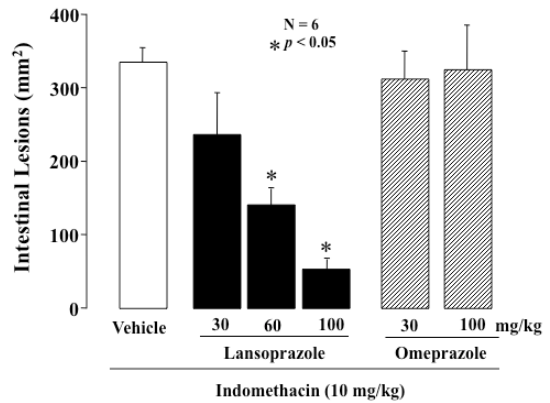


- ③ 関節炎ラット胃粘膜では、平常時においても iNOS のみならず eNOS 発現の増大が mRNA およびタンパクレベルで観察された。
- ④ 関節炎ラット胃粘膜上皮では、平常時においてもニトロチロシン (NO とスーパーオキシドラジカルから生成される傷害性の高いペルオキシナイトライトによりタンパクのチロシン残基がニトロ化されたもの) 陽性染色の著明な増大が認められた。
- ⑤ 関節炎ラット胃粘膜における iNOS 発現は好中球やマクロファージなどの炎症性細胞であったが、eNOS 発現は主として血管内皮に認められた。
- ⑥ 関節炎ラット胃粘膜では内因性抗酸化物質であるグルタチオン含量が有意に低下していた。

以上の結果より、関節炎ラットにおけるインドメタシン誘起胃損傷の増悪には、iNOS のみならず eNOS 発現の増大による NO の過剰産生が関与していることが判明した。元来、eNOS/NO は生体において防御的に作用するものと考えられてきたが、関節炎発症時のような重篤な炎症時には内因性グルタチオンが低下しており、このような条件下では eNOS/NO も傷害性に作用するものと推察される。

- (4) NSAID 誘起小腸傷害におけるプロトンポンプ阻害薬であるランソプラゾールの効果

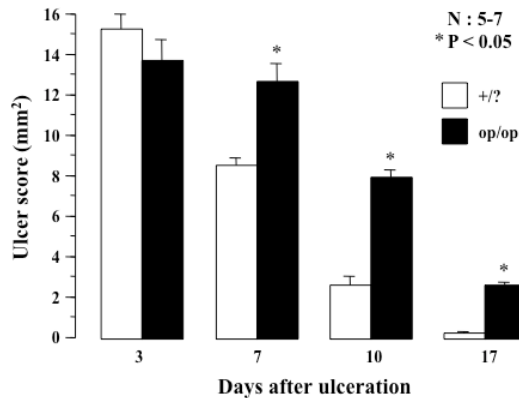
- ① インドメタシンにより誘起される小腸傷害は、ランソプラゾールの投与により用量依存かつ有意に抑制されたが、もう 1 つの代表的な PPI であるオメプラゾールによるは何ら影響を受けなかった。



- ② ランソプラゾールによる小腸傷害抑制効果は SnPP の前処置により有意に減弱した。
- ③ ランソプラゾールの投与は、インドメタシンによる小腸粘膜 MPO 活性の上昇ならびに iNOS 発現の増大を有意に抑制したが、これらの作用は SnPP の前処置により消失した。
- ④ ランソプラゾールの投与は小腸粘膜における HO-1 発現を有意に増大させたが、オメプラゾールの投与はそのような作用は認められなかった。
- ⑤ 一酸化炭素遊離分子(CORM)-2 の投与はランソプラゾールと同様にインドメタシンによる小腸傷害の発生および小腸粘膜 iNOS 発現の増大を有意に抑制した。
- 以上の結果より、ランソプラゾールはインドメタシン誘起小腸傷害を抑制することが判明した。この作用には HO-1 誘導が関与しており、HO-1 から産生される一酸化炭素 (CO) がマクロファージにおける iNOS 発現の増大および好中球の活性を抑制したことによるものと推察される。

- (5) 慢性胃潰瘍の治癒におけるマクロファージの関与

- ① 70°C に熱した金属製コテを胃体部漿膜に 20 秒間押し当てることにより、胃粘膜に重篤な胃潰瘍が惹起され、その胃潰瘍は 3 日目を最大として、その後治癒縮小した。
- ② M-CSF 変異 (op/op) マウスでは胃潰瘍の治癒は野生型マウスと比較して有意に遅延していた。
- ③ 野生型マウス胃粘膜には CD68 陽性マクロファージの存在が確認されたが、op/op マウスではその数は有意に少なかった。
- ④ 野生型マウスの胃潰瘍部位では、CD68 陽性マクロファージの顕著な集積が観察されたが、マクロファージの集積は op/op マウスでは著明に減少していた。



- ⑤ 野生型マウスの胃潰瘍部位では、TNF- α 、COX-2 および VEGF 発現の著明な増大と多数の新生血管の存在が認められたが、op/op マウスでこれらの現象はいずれも有意に低下していた。

以上の結果より、op/op マウスでは慢性胃潰瘍の治癒が有意に遅延しており、この現象はマクロファージの減少に伴うサイトカイン、COX-2 および VEGF 発現の低下による血管新生の低下によるものと推察される。ゆえに、M-CSF 依存性マクロファージは慢性胃潰瘍の治癒において重要な役割を演じているものと考えられる。

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 5 件)

- ① Kawahara R, Yasuda M, Hashimura H, Amagase K, Kato S, Takeuchi K. Activation of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors ameliorates indomethacin-induced small intestinal ulceration in mice. *European Journal of Pharmacology* 査読有, 650: 248-261, 2011.
- ② Takeuchi K, Tanaka A, Kato S, Amagase K, Satoh H. Roles of COX inhibition in pathogenesis of NSAID-induced small intestinal damage. *Clinica Chimica Acta* 査読有, 411: 459-466, 2010.
- ③ Yoda Y, Amagase K, Kato S, Tokioka S, Murano M, Kakimoto K, Nishio H, Umegaki E, Takeuchi K, Higuchi K. Prevention by lansoprazole, a proton pump inhibitor, of indomethacin-induced small intestinal ulceration in rats. *Journal of Physiology and Pharmacology* 査読有 61: 287-294, 2010.
- ④ Kato S, Ohkawa F, Ito Y, Takeuchi K. Role of endothelial nitric oxide synthase in aggravation of indomethacin-induced gastric damage in adjuvant arthritic rats. *Journal of Physiology and Pharmacology* 査読有, 60: 147-155, 2009.
- ⑤ Kato S, Kawahara R, Yasuda M, Amagase K, Takeuchi K. Aggravation of cold-restraint stress-induced gastric lesions in adjuvant arthritic rats: pathogenic role of inducible and

endothelial nitric oxide. *Journal of Pharmacological Sciences* 査読有, 111: 244-252, 2009.

[学会発表] (計 3 件)

- ① 河原良治、安田 仁、橋村 寛、天ヶ瀬紀久子、加藤伸一、竹内孝治. $\alpha 7$ ニコチン受容体活性化によるインドメタシン誘起小腸傷害の抑制. 第7回日本消化管学会学術集会 2011.2.18 (京都).
- ② Yoda Y, Amagase K, Kato S, Tokioka S, Murano M, Kakimoto K, Takeuchi K, Higuchi K. Different mechanisms of effective PPIs or H2-blockers for prevention of NSAID-induced small intestinal damage. 米国消化器病学会 2010.5.3. (米国ニューオーリンズ).
- ③ 河原良治、安田 仁、天ヶ瀬紀久子、加藤伸一、竹内孝治. $\alpha 7$ ニコチン受容体活性化によるインドメタシン誘起小腸傷害の抑制効果. 第 83 回日本薬理学会年会 2010.3.18 (大阪).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 伸一 (KATO SHINICHI)

研究者番号 : 90281500