

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19698

研究課題名（和文）小腸におけるレナラーゼの発現調節メカニズムと生理的作用の検証

研究課題名（英文）Regulation of Renalase expression in small intestine

研究代表者

竹越 一博（TAKEKOSHI, KAZUHIRO）

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：40261804

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：レナラーゼ（RNLS）は、Xuらによって2005年に発見され（Xu et al., J Clin Invest）、発見当初は、腎臓や心臓において循環カテコールアミン代謝による血圧調節因子としての働きに関する研究が進められていた。しかし、近年の研究成果から、RNLSには、受容体を介した細胞増殖作用や、RNLS自体の抗酸化作用を持つことが明らかになり、従来の考え方からのパラダイムシフトが起こっている。このような背景の中、身体の中にもありながらも外界からの様々なストレスを受ける臓器である腸管に焦点を当て、その生理的意義の解明は腸疾患のメカニズムや治療のための基礎的知見になりうると考えた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RNLSは腸管においては、酸化ストレス生成自体を低下させ、抗炎症、細胞増殖に関わっているのではないかと考えられた。これらは腸管の加齢の機序としても重要と思われる。

研究成果の概要（英文）：Renalase (RNLS) is a monoamine oxidase that has attracted much attention recently owing to its antioxidant and anti-inflammatory effects. In our previous study, we found that NLS expression increased in the intestinal tract of mice subjected to oxidative stress, and here we hypothesized that RNLS might function as an antioxidant in intestinal cellular senescence and examined its expression changes upon doxorubicin treatment using the Caco-2 cell line. We found that RNLS and IL-6 were significantly increased in doxorubicin, whereas gene expression of Gpx2 was decreased, suggesting that RNLS expression was induced as a protective response in cellular senescence when the antioxidant function is impaired and may contribute to intestinal health during aging.

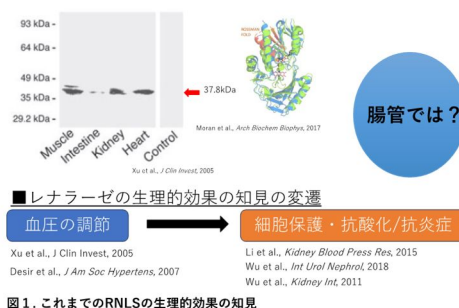
研究分野：運動生理

キーワード：レナラーゼ 腸管

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

レナラーゼ (RNLS) は、Xu らによって 2005 年に発見され (Xu et al., *J Clin Invest*) 発見当初は、腎臓や心臓において循環カテコールアミン代謝による血圧調節因子としての働きに関する研究が進められていた。しかし、近年の研究結果から、RNLS には、受容体を介した細胞増殖作用や、RNLS 自体の抗酸化作用を持つことが明らかになり、従来の考え方からのパラ



ダイムシフトが起こっている。このような背景の中、身体の中にあいながらも外界からの様々なストレスを受ける臓器である腸管に焦点を当て、その生理的意義の解明は腸疾患のメカニズムや治療のための基礎的知見になりうると考え本研究の着想に至った。

### 2. 研究の目的

**腸管における RNLS 発現の変動と調節因子:** 腸管は体内にありながらもその管腔内は外界に接しており、食事由来の刺激物、食事に付着した病原体や腸内細菌由来の毒素など、様々なストレスにさらされている。必然的に酸化ストレスや炎症にさらされることも多いため、それらに対する防御機構が発達しており、加えて修復機構も存在している。酸化ストレスに対する防御機構はスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) やグルタチオンペルオキシダーゼ (GPX) などが挙げられるが、RNLS もそれらと同様の働きをする可能性が考えられる。実際に RNLS は腸管で恒常的に発現しており、絶食誘導性の酸化ストレスで SOD や GPX 発現が低下する際に発現が増加し、抗酸化機能により細胞を保護している可能性が申請者等により報告されている。よって、そのようなストレス状況下における RNLS の発現変動や調節メカニズムを明らかにすることで RNLS の生理的意義の一端を明らかにできると考えられる。

### 3. 研究の方法

多くの先行研究で使用されるデキストラン硫酸ナトリウム塩 (DSS) を用いて薬剤誘導性の腸炎モデルを作成した。具体的には 3%DSS 溶液を 1 週間自由飲水させた。その際、対照群には蒸留水を飲用させた。飲水 7 日後に解剖し、腸管における RNLS 発現がどのように変動するかを WB 法により測定した。

一方、Caco-2 細胞を用いて細胞レベルでの RNLS の抗炎症効果を検証した。Caco-2 細胞に RNLS を過剰発現させるアデノウイルス (RNLS-AdV) を感染させ RNLS の過剰発現状態を作り出した。その後、10ng/mL のインターフェロン  $\gamma$  を 24 時間、ついで 100ng/mL の腫瘍壊死因子  $\alpha$  を 24 時間培地中に添加し、培養上清中、細胞中の炎症因子を ELISA 法と WB 法により測定した。

Caco-2 細胞を用いた RNLS の抗炎症効果の詳細な関与経路を探索するため、RNLS-AdV により RNLS を過剰発現させた際の遺伝子の網羅的解析 (RNA-sequence 解析) を行なった。その後エンリッチメント解析によりどのような遺伝子群が特に関与しているかを同定した。

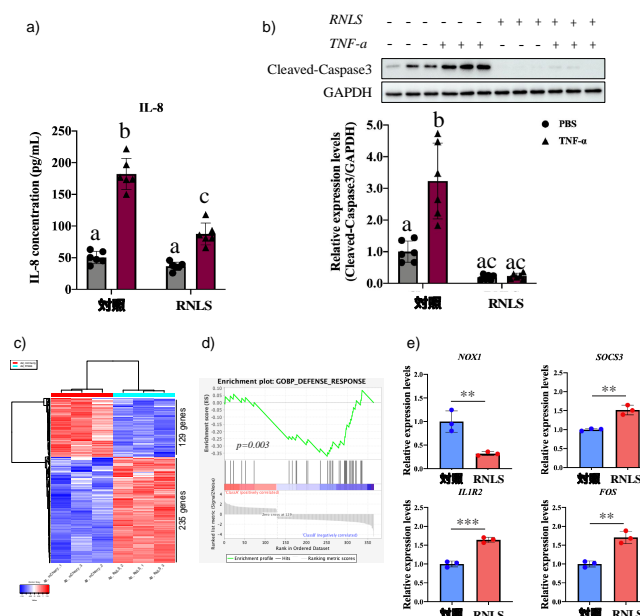
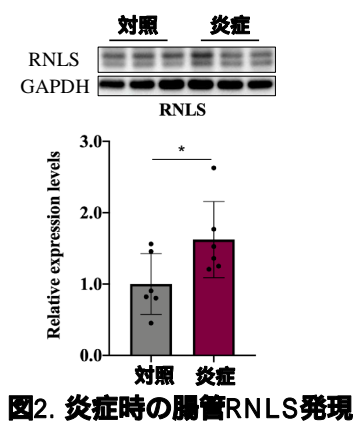
### 4. 研究成果

**研究代表者らにより、RNLS は腸管の炎症時に発現が上昇し、抗酸化・抗炎症機能を発揮する可能性が示された (図 2, 図 3):** 他の臓器では酸化ストレス・炎症時に RNLS の発現が誘導されることが報告されている。腸管でも同様に酸化ストレスで発現が誘導されると明らかになっている。

そこで、腸管において酸化ストレスと炎症を誘導した際にはどのような変化が見られるかを検討した。炎症は酸化ストレスも同時に誘発するため、腸炎モデルを作成し、RNLS 発現を測定したところ、有意にその発現が上昇していた(図 2)。次にその発現がどのような効果をもたらすのかを詳細に検討するため、腸管上皮細胞モデルに利用される Caco-2 細胞を使用し検討を行なった。TNF- $\alpha$  により炎症を誘導する炎症モデルを作成し、さらにアデノウイルスを用いて RNLS を過剰発現させ、表現系の解析を行なった。その結果、対照ウイルスを感染させた群では TNF- $\alpha$  により細胞培養上清中の炎症性ケモカインである IL-8 濃度が上昇していた。それに対し、RNLS 過剰発現群では IL-8 の上昇が大幅に抑制されていた(図 3a)。炎症を誘導した際の細胞内活性型 Caspase3 発現を測定したところその発現も RNLS 過剰発現により大きく抑制されていた(図 3b)。このことから、腸管の炎症時の RNLS の上昇は抗炎症と細胞保護のための生体内での防御反応である可能性が示唆された。

次に RNLS による防御反応がどのような経路を介して行われたかを明らかにするため RNA-sequence 解析とエンリッチメント解析を行い、関与経路を探索した。RNLS を Caco-2 細胞に過剰発現させると有意に低下した遺伝子は 129 個、上昇した遺伝子は 235 個存在し、そこからエンリッチメント解析を行うと防御反応に関わる遺伝子群が同定された(図 3c,d)。特に関与の深い遺伝子を抽出すると、酸化ストレス生成に関与する NOX1 が低下し、抗炎症に関与する SOCS3、IL1R2 が上昇しており、さらに細胞増殖に関わる FOS が上昇していた(図 3e)。以上のことより、RNLS は酸化ストレス生成自体を低下させ、抗炎症、細胞増殖に関わっているのではないかと推察される。

当初特異的遺伝子欠損マウスを使用する予定であったが、正確なデータ取得のために戻し交配を行う必要があり、本期間中に詳細な検討を行うことができなかったが、今後確立した特異的遺伝子欠損マウスを用いて、腸管における RNLS の生理的意義の解明に努めていく予定である。



## 図2. 炎症時の腸管 RNLS 発現

RNLS 発現は炎症状況下で増加していた。

## 図3. 腸管上皮細胞モデル細胞株における RNLS 過剰発現と炎症の影響

1. 細胞培養上清中の炎症性ケモカインである IL-8 濃度と細胞内活性型 Caspase3 発現が RNLS 過剰発現により大幅に減少した。
2. RNA-sequence 解析とエンリッチメント解析により RNLS の効果は生体防御経路を介している

ことが同定された。

論文

なし

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0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 Aoki Kai, Yanazawa Koki, Tokinoya Katsuyuki, Sugasawa Takehito, Suzuki Takuji, Yoshida Yasuko, Nakano Takuro, Omi Naomi, Kawakami Yasushi, Takekoshi Kazuhiro	4. 巻 267
2. 論文標題 Renalase is localized to the small intestine crypt and expressed upon the activation of NF- $\kappa$ B in mice model of fasting-induced oxidative stress	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Life Sciences	6. 最初と最後の頁 118904 ~ 118904
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.lfs.2020.118904	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 Aoki Kai, Suzuki Takuji, Hui Fang, Nakano Takuro, Yanazawa Koki, Yonamine Masato, Fujita Shinichiro, Sugasawa Takehito, Yoshida Yasuko, Omi Naomi, Kawakami Yasushi, Takekoshi Kazuhiro	4. 巻 13
2. 論文標題 Acute Low-Intensity Treadmill Running Upregulates the Expression of Intestinal Glucose Transporters via GLP-2 in Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 1735 ~ 1735
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/nu13051735	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
研究分担者	麻見 直美  (omi naomi)  (10300005)	筑波大学・体育系・教授   (12102)	
研究分担者	鈴木 拓史  (suzuki takuji)  (50587110)	同志社女子大学・生活科学部・准教授   (34311)	

6. 研究組織（つづき）

	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	菅澤 威仁  (sugasawa takehito)  (60821840)	筑波大学・医学医療系・助教     (12102)	

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