

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月10日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590085

研究課題名（和文） 消化管障害モデルを用いた腸管セロトニン代謝異常における一酸化窒素の役割解明

研究課題名（英文） Studies on the role of nitric oxide in abnormal intestinal serotonin metabolism using a model rat of intestinal damage

研究代表者

平藤 雅彦 (HIRAFUJI MASAHIKO)

北海道医療大学・薬学部・教授

研究者番号：20142987

研究成果の概要（和文）：作用機序の異なる各種制癌剤投与による消化管障害モデルラットを用いて、腸管セロトニン代謝異常における一酸化窒素(NO)の役割を検討し、葉酸代謝拮抗薬であるメトトレキサートが特異的に回腸のNO合成酵素発現及びNO産生を増加させ、このNOが回腸粘膜のエンテロクロマフィン細胞の過増殖と、セロトニン産生系の亢進を引き起こすことを明らかとした。また小腸におけるNO産生系の亢進は、制癌剤による催吐性や回腸粘膜での起炎症作用とは関連しないことも明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The roles of nitric oxide (NO) in abnormal intestinal serotonin metabolism have been investigated using a model rat of intestinal damage induced by anti-cancer drugs. Among four drugs tested, methotrexate (MTX) specifically caused an increase in NO synthesis, which in turn induced a hyperplasia of ileal enterochromaffin cells and an increase in serotonin synthesis. The stimulation of intestinal NO production did not correlate with the emetogenicity and pro-inflammatory property of anti-cancer drugs.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2010年度 | 2,200,000 | 660,000   | 2,860,000 |
| 2011年度 | 700,000   | 210,000   | 910,000   |
| 2012年度 | 700,000   | 210,000   | 910,000   |
| 年度     |           |           |           |
| 年度     |           |           |           |
| 総計     | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：セロトニン (5-HT)、一酸化窒素 (NO)、NO合成酵素、消化管障害、抗がん剤、エンテロクロマフィン細胞

## 1. 研究開始当初の背景

## (1) 消化管の5-HT代謝

生体内のセロトニン (5-hydroxytryptamine: 5-HT) の約90%は腸管に分布しており、その95%以上は腸管エンテロクロマフィン(EC)細胞に局在し、一部はセロトニ

ン作動性腸管神経系に局在する。5-HT合成経路の律速酵素はトリプトファン水酸化酵素(TPH)であり、前駆物質のトリプトファンは、TPHにより5-ヒドロキシトリプトファン(5-HTP)に変換され、ついで芳香族L-アミノ酸脱炭酸酵素により5-HTに変換さ

れる。この 5-HT は EC 細胞への種々の受容体刺激や機械的刺激によって遊離されるが、多くは基底膜側から遊離され、粘膜下神経叢や筋間神経叢の内在性の腸管神経系や自律神経系、平滑筋を刺激し、消化管の分泌、吸収、運動機能を調節する。一部は管腔に遊離される。

遊離された 5-HT は、上皮細胞、神経系、平滑筋細胞などに発現するセロトニントランスポーター (SERT) により取り込まれ、多くはモノアミン酸化酵素 (MAO) により 5-ヒドロキシインドール酢酸 (5-HIAA) に分解されるが、循環系に吸収される。神経細胞ではシナプス小胞にも再取り込みされる (Gershon & Tack, *Gastroenterology* 132, 397-414, 2007)。消化管における 5-HT 動態はこれら多くの因子により複雑に調節されている (Hirafuji et al., *Biog Amines* 16, 29-52, 2000)。

## (2) 消化管 5-HT 代謝異常と疾患

EC 細胞から遊離される 5-HT は、消化管の消化、吸収機能や、ぜん動運動に深く関与しており、生理的にも極めて重要な生理活性物質である。そのため、腸管における 5-HT 代謝異常は、炎症性腸疾患、過敏性腸症候群などの消化管疾患に深く関与している (Spiller, *Neuropharmacology*, 55, 1072-1080, 2008)。さらに、抗癌剤など細胞傷害性の薬物による嘔吐や下痢などの副作用の発生機序にも深く関与している (Minami et al., *Pharmacol Ther*, 99, 149-165, 2003)。

上述のように 5-HT 代謝には多くの因子が関与し、それぞれの疾患について、EC 細胞数、5-HT 含量、5-HT 遊離、TPH 発現、TPH 活性、SERT 発現などの現象的な変化が、ヒトあるいは動物実験を用いた研究により観察されているが、その結果は報告により様々であり、その機序についても不明な点が多い (Mawe et al., *Aliment Pharmacol Ther*, 23, 1067-1076, 2006)。

## (3) 消化管 5-HT 代謝異常と NO 産生系

消化管の機能維持にアラキドン酸代謝物が関与することは良く知られており、我々は、抗癌剤であるシスプラチン投与による腸管の TPH 誘導と MAO 活性抑制などの 5-HT 代謝異常にシクロオキシゲナーゼ (COX) -2 誘導が関与することを明らかにした (Ju et al., *Eur J Pharmacol*, 589, 281, 2008)。しかし近年、一酸化窒素 (NO) が消化管機能維持と共に病態にも深く関与していることが明らかになってきた (Vallance et al., *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 287, G865-G874, 2004; Takeuchi et al.,

*Life Sci*, 80, 329-336, 2007)。

腸管の誘導型 NO 合成酵素 (iNOS) 発現には、ヘルパー T 細胞由来の Th2 サイトカインが関与することは以前より報告されている (Kolios et al., *Gut*, 43, 56-63, 1998; Dijkstra et al., *Inflamm Bowel Dis*, 13, 1467-1474, 2007)。一方、EC 細胞過増殖と 5-HT 合成の亢進には Th2 細胞の関与が近年明らかとなった (Wang et al., *Gut*, 56, 949-957, 2007)。しかし 5-HT 代謝異常と、NO 及び Th2 サイトカインの 3 者の関連性については未だ不明である。

我々は最近、ラットへのメトトレキサート (MTX) 投与が消化管障害を誘発し、さらに遅延性に腸管 5-HT 含量の増加と iNOS 発現を誘導することを報告した (第 60 回日本薬理学会北部会)。

## 2. 研究の目的

本研究では抗癌剤投与による消化管障害モデルラットを用いて、腸管 5-HT 代謝異常における NO の役割を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 使用動物

実験動物として、7-8 週齢の雄性ウィスター系ラットを使用した。なお、本研究の動物実験は「北海道医療大学動物実験の指針」に基づいて行われた。

### (2) 使用薬物及び試薬

実験に使用した MTX は日本ワイスレダリー (株) より、シスプラチンは日本化薬 (株) より、シクロホスファミド (CPA) は塩野義製薬 (株) より、5-フルオロウラシル (5-FU) は協和発酵キリン (株) より購入した。これらはすべて腹腔内投与 i. p. し、生理食塩液を投与したものを対照群とした。

### (3) RT-PCR 法による mRNA 発現解析

ラットを麻酔下、放血致死させ、回腸を摘出し、TRI<sup>®</sup>・Reagent を用いて常法により total RNA を抽出した。mRNA 発現量はそれぞれの特異的プライマーを用いて reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 反応を行った。発現量は、各 mRNA 発現量を GAPDH mRNA 発現に対する相対比で示した。

### (4) 標的蛋白質の検出

摘出した腸管可溶化してタンパク質を抽出し、SDS-PAGE による分離後、Western blot 法により標的タンパク質発現を解析した。それぞれのバンドはデンシトメトリーにより

定量的解析を行い、蛋白質発現量は $\beta$ -actin 発現量に対する相対比として定量解析した。

#### (5) 腸管 5-HT 及び 5-HIAA 含量の測定

摘出した腸管をホモジナイズし、遠心分離した。上清を遠心分離式ディスプレイ限外ろ過器を用いて遠心ろ過し、ろ液と電気化学検出器付高速液体クロマトグラフィー (HPLC-ECD) を用いて、既報に従って 5-HT 及び 5-HIAA の測定を行った。

#### (6) NO 含量の測定

摘出した腸管にメタノールを加えてホモジナイズし、遠心分離後の上清を用いて、Griess 法を利用した酸化窒素測定システム (ENO-10、エイコム、京都) により測定を行った。

#### (7) 抗 TPH 抗体陽性細胞の免疫組織化学 (酵素抗体法)

摘出した腸管を縦方向に切開し、10%中性緩衝ホルマリン液 (pH 7.4) に浸し固定した。固定した組織をパラフィン処理して薄切切片を作成し、酵素抗体法により目的蛋白質を免疫染色した。なお本工程は、株式会社モルフオテクノロジー (札幌) に依頼して行われた。

#### (8) ラット異味症発現の測定

ラットにおける異味症発現は、小動物用摂餌量測定装置 (FDM700S、メルクエスト) を用いてカオリンペレットの摂取量として経時的に観察、記録した。

#### (9) 統計学的処理

すべての測定値を平均値 $\pm$ 標準誤差 (Mean  $\pm$  S.E.) で示した。対応しない 2 群間の比較には Student's *t*-test を用い、多重間の比較は ANOVA を用いて有意差検定を行った。危険率 5%未満 ( $p < 0.05$ ) をもって統計学的に有意とした。

### 4. 研究成果

#### (1) 回腸粘膜組織形態に及ぼす MTX 投与の影響

制癌剤である MTX をラットに投与し、4 日 (96 時間) 後に回腸を摘出して、粘膜組織形態に及ぼす MTX 投与の影響について検討した。その結果、MTX 50 mg/kg の腹腔内投与は対照群と比較して、絨毛先端上皮細胞の空胞化、上皮細胞の乱れ及び萎縮などの組織障害が観察された。

次に、MTX 投与による回腸粘膜組織形態の変化に及ぼす抗炎症薬及び NOS 阻害薬投与の影響を HE 染色にて検討した。対照群と比較し、MTX 投与群で観察された上皮細胞配列の乱れ及び絨毛の萎縮などの細胞傷害は、COX 阻害薬のメロキシカム 3 mg/kg, s.c. 及びス

テロイド性抗炎症薬のデキサメタゾン 1 mg/kg, s.c. 投与の影響を受けなかったが、M<sup>o</sup>-nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME) 20 mg/kg, s.c. 投与によって改善される傾向がみられた。

#### (2) 回腸組織の 5-HT 動態に及ぼす MTX 投与の影響

MTX 投与 96 時間後、回腸組織の 5-HT 動態に及ぼす MTX 10-50 mg/kg 投与の影響について検討した。その結果、MTX 50 mg/kg 投与は 5-HT 及び 5-HIAA 含量を有意に増加させた。

同様に、作用機序の異なる制癌剤であるシスプラチン 5 mg/kg、CPA 120 mg/kg、5-FU 100 mg/kg 投与 72 時間後の 5-HT 動態を検討したところ、シスプラチンと CPA も有意な回腸組織 5-HT 含量の増加作用を示した。

次に、MTX 投与による回腸 5-HT 含量増加に及ぼす抗炎症薬及び NOS 阻害薬投与の影響を検討した。その結果、MTX 投与群で有意に増加した回腸組織 5-HT 含量は、メロキシカム投与の影響を受けなかったが、デキサメタゾン及び L-NAME 投与によって対照群レベルまで有意に減少した。

#### (3) 5-HT 代謝関連遺伝子発現に及ぼす MTX の影響

MTX 投与により、5-HT 生合成系の律速酵素である TPH<sub>1</sub> mRNA 発現が有意に亢進し、SERT mRNA 発現は低下する傾向が観察された。

同様にシスプラチン、CPA、5-FU 投与の影響を検討した所、これらの制癌剤はすべて TPH<sub>1</sub> mRNA 発現の有意な亢進作用を示した。

そこで、TPH 及び SERT 蛋白質の発現をウエスタンブロット法で検討したが用いた市販の抗 TPH 抗体、抗 SERT 抗体では十分な結果が得られず、これについては今後の検討課題として残された。

#### (4) 回腸粘膜 EC 細胞数に及ぼす MTX の影響

MTX 投与 96 時間後、回腸組織のパラフィン切片を作成し、抗 TPH 抗体を用いて免疫組織化学に回腸粘膜上皮の抗 TPH 抗体陽性細胞、すなわち EC 細胞数を計測したところ約 3 倍の有意な増加が認められた。

同様にシスプラチン、CPA、5-FU 投与の影響を検討し、これらの制癌剤も回腸粘膜において EC 細胞数を増加する結果を得た。

次に、MTX 投与による EC 細胞数増加に及ぼす抗炎症薬及び NOS 阻害薬投与の影響を免疫組織化学的に検討した。MTX 投与による EC 細胞の増加は、メロキシカム投与の影響を受けなかったが、デキサメタゾン及び L-NAME 投与によって対照群レベルまで減少した。

#### (5) 回腸組織の COX 及び NOS 発現に及ぼす MTX の影響

MTX投与96時間後の摘出回腸組織における誘導型酵素であるCOX-2及び構成型酵素のCOX-1のmRNA及び蛋白質発現に対する影響を検討したが、それらには有意な影響が認められなかった。

次に同じく誘導型NOSであるiNOS mRNA及びiNOS蛋白質発現を検討した所、MTX投与はそれらを有意に増加させることが明らかになった。しかし、構成型NOSであるeNOS及びnNOSについては、mRNA及び蛋白質発現についても有意な影響が認められなかった。

また、回腸組織のNO産生に及ぼす影響を検討した所、MTX投与は回腸組織内のNOの酸化代謝物NOx含量を増加させた。

同様にシスプラチン、CPA、5-FU 投与の影響を検討したが、これらの制がん剤はiNOS mRNA 発現への有意な亢進作用は認められなかった。

次に、摘出回腸のパラフィン切片を用いて、免疫組織化学的な検討によりiNOSの局在とMTX投与による発現への影響を検討しようと試みたが、抗iNOS抗体の特異性の問題が満足いく結果が得られず、これについても今後の検討課題として残された。

#### (6) ラット異味症に及ぼすMTXの影響

一方、ラットにおける嘔吐類似行動である異味症(pica)に及ぼすMTX投与の影響を検討した。その結果、MTX投与による急性期(24時間以内)の異味症増加は観察されなかった。しかし、遅延性期の72-96時間での弱い異味症発現が観察された。これに対し、L-NAMEは有意な影響を示さなかった。

#### (7) 回腸組織のサブスタンス P 代謝に及ぼすMTXの影響

EC細胞に5-HTと共存し、5-HTの生理活性との関連が示唆されているサブスタンスPの動態に及ぼすMTXの影響を検討した。

MTX投与96時間後の摘出回腸におけるサブスタンスP前駆体のプレプロタキキニン-A(PPT-A)あるいはタキキニンNK<sub>1</sub>受容体のmRNA発現を検討したが、対照群に比べて有意な変化は認められなかった。また、血漿中のサブスタンスP濃度をELISAにより測定したが有意な変化はなかった。しかし、摘出回腸のパラフィン切片を作製し、抗サブスタンスP抗体を用いて免疫組織化学的な検討をしたところ、MTXはサブスタンスP含有細胞数を著明に増加することが観察された。そこで、5-HTとサブスタンスPの両抗体を用いて二重染色した所、これらは多くが同一細胞、すなわちEC細胞内に共存することが確認された。

#### (8) 本研究の意義と今後の課題

本研究により、制癌剤であるMTXはラット

小腸において特異的にiNOS発現を誘発し、それによるNO産生依存性に軽度の組織障害、著明なEC細胞数の増加、5-HT産生の増加を起こすことが初めて明らかになった。これらの作用は、シスプラチン、CPA、5-FUには認められず、MTXに特異的な作用であった。

さらに本研究により、MTX投与後の遅延性期において、サブスタンスP含有のEC細胞の過増殖が起こっているが、血漿サブスタンスP濃度は増加しなかったことからその遊離は亢進していないことが示唆された。PPT-A mRNA発現は96時間以前に亢進しているものと推察され、NK1受容体mRNA発現とともに時間依存的な変化を検討する必要があると考えられた。

また、これらの制癌剤は程度に違いがあるものの、臨床的に急性或は遅延性の悪心・嘔吐を誘発し、本研究においてすべて小腸でのEC細胞数を増加させることも明らかになった。従って、悪心・嘔吐の誘発と消化管でのEC細胞発現とは強く関連していると考えられる。しかし現在、制癌剤がどのような機序でEC細胞の過増殖を誘発するのかについては不明な点が多い。本研究はその因子の一つとして消化管粘膜でのNO産生亢進を明らかにし、さらに消化管におけるNOの新たな役割を明らかにした点で大きな意義があると考えられる。

今後の課題としては、今回明らかに出来なかったTh2サイトカインなど、EC細胞過増殖を誘発するNO以外の因子を明らかにすることと、増加したEC細胞に含有される5-HT及び共存するサブスタンスPがどのような機序で急性あるいは遅延性の悪心・嘔吐に関わっているのかの詳細を解明することである。

#### 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3件)

- ① Machida T, Iizuka K, Hirafuji M, 5-Hydroxytryptamine and its receptors in systemic vascular walls, Biological & Pharmaceutical Bulletin, 査読有, in press, 2013.
- ② Machida T, Ohta M, Onoguchi A, Iizuka K, Minami M, Hirafuji M, 5-Hydroxytryptamine induces cyclooxygenase-2 in rat vascular smooth muscle cells: Mechanisms involving Src, PKC and MAPK activation, European Journal of Pharmacology, 査読有, 656, 19-26, 2011. Doi: 10.1016/j.ejphar.2010.12.044
- ③ Hamaue, N, Ogata A, Terado M, Tsuchida

S, Yabe I, Sasaki H, Hirafuji M, Togashi H, Aoki T, Entacapone, a catechol-O-methyltransferase inhibitor, improves the motor activity and dopamine content of basal ganglia in a rat model of Parkinson's disease induced by Japanese encephalitis virus, Brain Research, 査読有, 1309, 110-115, 2010. Doi: 10.1016/j.brainres.2009.10.055

[学会発表] (計 30 件)

- ①高塚千恵、町田麻衣子、町田拓自、平藤雅彦、メトトレキサート投与による遅延性嘔吐発現における末梢サブスタンスPの役割、日本医療薬学会第23回年会、平成25年9月21-22日、仙台
- ②工藤冨、丸山康介、高木美奈子、町田拓自、飯塚健治、平藤雅彦、嘔吐誘発に関連する末梢および中枢のセロトニン、サブスタンスP動態に及ぼす抗がん剤の影響、日本薬学会北海道支部第140回例会、平成25年5月18-19日、札幌
- ③町田拓自、加藤夏希、加藤信太郎、関谷沙希、伊藤舞、飯塚健治、平藤雅彦、制がん剤投与によるラット pica 発現における回腸サブスタンスP動態の役割、第86回日本薬理学会年会、平成25年3月21-23日、福岡
- ④町田拓自、平野めぐみ、加藤信太郎、浜上尚也、飯塚健治、平藤雅彦、ラットにおける回腸5-HT、サブスタンスP代謝、異味症発現に及ぼす5-フルオロウラシル投与の影響、第63回日本薬理学会北部会、平成24年9月14日、新潟
- ⑤町田拓自、紙谷章基久、平野めぐみ、加藤信太郎、加藤夏希、浜上尚也、飯塚健治、平藤雅彦、ラット回腸での5-HT、サブスタンスP代謝に及ぼすシクロホスファミド及び5-フルオロウラシル投与の影響、第16回活性アミンに関するワークショップ、平成24年8月24日、札幌
- ⑥加藤夏希、加藤信太郎、関谷沙希、伊藤舞、町田拓自、飯塚健治、平藤雅彦、各種制癌剤投与によるラット腸管におけるサブスタンスP動態について、日本薬学会北海道支部第138回例会、平成24年6月16-17日、札幌
- ⑦町田拓自、紙谷章基久、平野めぐみ、加藤信太郎、浜上尚也、飯塚健治、平藤雅彦、シスプラチン及びシクロホスファミド投与によるラット回腸での遅延性5-HT、サブスタンスP代謝及び炎症反応の比較検討、第62回日本薬理学会北部会、平成23年9月

29-30日、仙台

- ⑧深井雄太、紙谷章基久、加藤信太郎、佐々木彩加、町田拓自、飯塚健治、平藤雅彦、シクロホスファミド投与によるラット回腸セロトニン代謝亢進機序の検討、日本薬学会北海道支部第136回例会、平成23年5月21-22日、札幌
- ⑨紙谷章基久、平野めぐみ、町田拓自、浜上尚也、飯塚健治、平藤雅彦、シクロホスファミドはラットパイカ行動及び回腸セロトニン代謝異常を誘導する、第84回日本薬理学会年会、平成23年3月22-24日、横浜
- ⑩紙谷章基久、平野めぐみ、小原祐介、町田拓自、浜上尚也、飯塚健治、平藤雅彦、シスプラチン投与によるラット回腸での遅延性5-HT代謝亢進機序の検討、第61回日本薬理学会北部会、平成22年9月10日、札幌
- ⑪Hirafuji M, Takano Y, Hirano M, Kamiya A, Machida T, Hamaue N, Iizuka K, Role of nitric oxide in methotrexate-induced abnormal 5-hydroxytryptamine metabolism and damage in the rat small intestine, 16th World Congress on Basic and Clinical Pharmacology, 17-23, July, 2010, Copenhagen (Denmark)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

平藤 雅彦 (HIRAFUJI MASAHIKO)  
北海道医療大学・薬学部・教授  
研究者番号：20142987

### (2) 研究分担者

町田 拓自 (MACHIDA TAKUJI)  
北海道医療大学・薬学部・講師  
研究者番号：90433424