

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860060

研究課題名(和文) タイトジャンクションを標的としたアスピリン起因性小腸粘膜傷害の予防・治療薬の開発

研究課題名(英文) Drug development targeting tight junction for the prevention and treatment of Acetyl salicylic acid-induced small intestinal injury.

研究代表者

福居 顕文 (Fukui, Akifumi)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：60725307

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：高齢化社会に伴い、脳・心血管イベント二次予防に低用量アスピリンが長期処方されるようになった。一方、アスピリンは、副作用として胃だけでなく小腸粘膜にも傷害を生じることがわかり、大きな臨床的問題となっている。我々は、アスピリンが小腸上皮細胞内のミトコンドリアで活性酸素を生じ、細胞と細胞とを接着させる役割を持っている装置のうちのひとつであるタイトジャンクションに酸化修飾をひき起こすことにより、腸管粘膜の透過性が亢進する機序を本研究を通して解明した。また、本研究で得られた知見を元に、既存の実臨床で広く用いられる安全性の確立した抗酸化作用を有する薬剤を用いて、新たな「腸薬」の可能性を探った。

研究成果の概要(英文)：Acetyl salicylic acid (ASA) is a commonly used drug for secondary prevention of cardiovascular and cerebrovascular events. In addition to its antiplatelet effect, small intestinal injury caused by ASA is an important issue. However, there is as yet no effective prevention.

In this study, we clarified that non-toxic concentrations of ASA can increase small intestinal epithelial cell permeability via a mechanism that depends on reactive oxygen species (ROS) and ROS-modified zonula occludens-1 (ZO-1) protein, a major tight junction (TJ) protein, in an in vitro study. In a clinical study, we reported that rebamipide reduced ASA-induced mucosal injury in the human small intestine via unknown mechanisms. In the present study, the mechanism by which rebamipide (with anti-oxidative properties) suppresses ASA-induced small intestinal mucosal injury was clarified.

研究分野：消化器内科学

キーワード：アスピリン 小腸粘膜傷害 タイトジャンクション 酸化ストレス ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

(1)非ステロイド性抗炎症薬 (NSAID) の一種であるアスピリンは低用量で抗血小板作用を有し、脳・心血管イベントの二次予防目的に世界中で広く用いられている薬剤である¹⁾。

(2)その一方、近年、バルーン型小腸内視鏡やカプセル内視鏡の普及によりアスピリンは胃だけでなく、小腸粘膜傷害を引き起こすことが明らかになった(図1)。時に重大な消化管出血から生命予後の悪化に至ることがあり、その機序解明ならびに予防薬の確立は急務であるが、精力的な研究が各施設で行われているにもかかわらず、その発症の機序解明ならびに予防・治療法はいまだ確立されていない²⁾。

図1: カプセル内視鏡によるアスピリン起因性小腸粘膜傷害



(3)これまでにアスピリン起因性小腸粘膜傷害の発症機序としては、粘膜防御作用をもつプロスタグランジンの合成阻害³⁾、上皮細胞のアポトーシス⁴⁾、腸内細菌の関与⁵⁾などが報告されているが、その詳細はいまだ明らかでなく、新たな視点での機序解明ならびに予防・治療薬の創生につながる探索研究が必要である。

2. 研究の目的

(1)我々は、代表的な NSAID の1つであるインドメタシンが小腸粘膜傷害をひき起こす機序について実験的検討を行い報告してきた。これらの機序をアスピリンによる小腸上皮細胞傷害にも適用し、その傷害の本態には小腸上皮細胞のミトコンドリア依存性アポトーシスが関与している可能性を報告してきた⁴⁾。

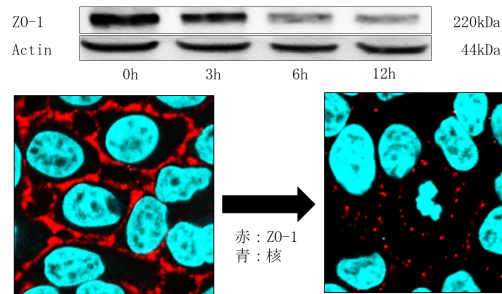
我々は、本研究を開始するにあたり、細胞毒性のない低濃度アスピリンが小腸上皮細胞内で酸化ストレス産生をひき起こすことを予備検討で見出しており、アスピリン起因性小腸粘膜傷害と酸化ストレスとの関連が示唆された。

(2)近年、アスピリン内服患者では、腸管粘膜の透過性が亢進していることが明らかになった⁶⁾。従来型 NSAID 同様に、アスピリン起因性小腸粘膜傷害の初段階には、小腸上皮細胞間透過性亢進の関与が示唆されるが、その機序はいまだ明らかでない。

上皮細胞間透過性を規定する重要な細胞間接合の1つにタイトジャンクションが知られているが、我々は、これまでに、アスピリンが小腸上皮細胞間のタイトジャンクシ

ン裏打ち蛋白質である zonula occludence-1 (ZO-1)蛋白質の構造変化をひき起こし、粘膜透過性が亢進することを確認している(図2)⁷⁾。

図2: アスピリン刺激によるZO-1蛋白質の発現、構造変化



(3)本研究は、上皮細胞間透過性を制御するタイトジャンクションを標的としたアスピリン起因性小腸粘膜傷害の予防・治療薬開発を目的とし、特に酸化ストレスとタイトジャンクション構成蛋白質との関連性に着目し、検討を行った。

低濃度のアスピリン刺激により上皮細胞内で産生された酸化ストレスが、タイトジャンクション裏打ちタンパク質である ZO-1 蛋白質を酸化修飾し、その機能障害から透過性亢進がひき起こされる機序を解明し、新たな視点でのアスピリン起因性小腸粘膜傷害の機序解明ならびに予防・治療薬の創生につながる探索研究を行った。

3. 研究の方法

【研究計画】

本研究は3年で4つの研究計画を予定した。
(1)アスピリン刺激により、小腸上皮細胞内でミトコンドリア機能障害依存的に酸化ストレス産生が亢進することを証明する。

(2)アスピリン起因性の酸化ストレスが、タイトジャンクション裏打ち蛋白質である ZO-1 蛋白質の構造変化ならびに上皮細胞間透過性亢進をひき起こすことを証明する。

(3)アスピリン起因性の酸化ストレスが、タイトジャンクション裏打ち蛋白質である ZO-1 蛋白質を酸化修飾することを証明する。

(4)酸化修飾を受けた ZO-1 蛋白質を標的としたアスピリン起因性小腸粘膜傷害の予防・治療薬のスクリーニングを行う。

【実験方法】

(1) *in vitro*: ヒト大腸上皮癌培養細胞株 Caco-2 を分化させ、小腸上皮細胞モデルとして用いた。

酸化ストレスの検出: アスピリン添加により生じる酸化ストレスを、酸化ストレス反応性蛍光色素を用い、ミトコンドリア選択性蛍光色素と共染色し、共焦点顕微鏡で細胞内局在の評価を行った。また、蛍光強度計で経時的

な蛍光強度の変化を定量し、主たる活性酸素種の同定を行った。

上皮細胞間透過性の検討：アスピリンを、0.4 μm の多孔を有するメンブレン上に培養した Caco-2 に添加し、FITC 標識 Dextran の透過、trans epithelial electrical resistance (TEER) を用いて上皮細胞透過性を測定した。また western blotting、免疫染色法を用いて、タイトジャンクション構成蛋白質の発現、構造変化を評価した。

酸化ストレスと透過性との関連性：抗酸化剤（過酸化水素を除去するカタラーゼや、スーパーオキシドを除去するスーパーオキシドディスムターゼの類似薬）を用い、アスピリン起因性小腸上皮細胞透過性亢進と酸化ストレスの関連を評価した。

酸化ストレス修飾蛋白質の検出：酸化ストレスの攻撃を最も受けやすいアミノ酸のひとつにシステイン残基がある。蛋白質のシステイン残基は酸化を受けるとスルフェン酸が生じ、本来もっているその蛋白質の機能障害がおきることが知られている。本研究では、スルフェン酸の抗体を用いてアスピリン刺激を受けた Caco-2 内の酸化修飾蛋白質の検出を行った。

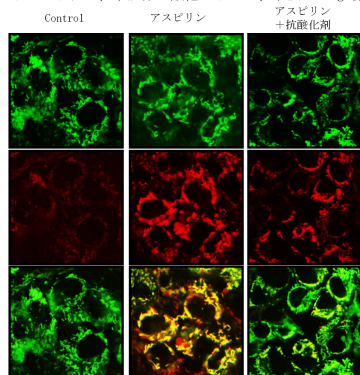
(2) *in vivo*: 9 週齢 SD 系雄性ラットを用い、アスピリン小腸粘膜傷害ラットモデルを作成した。

抗酸化作用を有する胃粘膜保護薬レバミピドを用いて、アスピリン投与群とアスピリン + レバミピド群とで Evans blue を用いた小腸粘膜傷害の比較、FITC 標識 Dextran を用いた腸管透過性の比較、western blotting を用いて ZO-1 蛋白質の発現を比較検討した。

4. 研究成果

(1) アスピリン刺激により、小腸上皮細胞内でミトコンドリア機能障害依存的に酸化ストレス（スーパーオキシド）産生が亢進することが明らかになった（図3）。

図3: アスピリン刺激による小腸上皮細胞内ミトコンドリアでの酸化ストレス産生 (上段緑: ミトコンドリア、中段赤: 酸化ストレス、下段: merge 像)



(2) 抗酸化剤を併用することにより、アスピリン起因性の酸化ストレス（スーパーオキシド）が、タイトジャンクション裏打ち蛋白質である ZO-1 蛋白質の発現の変化、構造変化をひき起こしていること、上皮細胞間透過性亢進に参与していることが明らかになった。

(3) スルフェン酸の抗体を用い、アスピリン起因性の酸化ストレスが、タイトジャンクション裏打ち蛋白質である ZO-1 蛋白質を酸化修飾することを証明した。

(4) 我々のグループは、低用量アスピリン内服患者を対象とした多施設臨床研究で、胃粘膜保護薬レバミピドが、アスピリン起因性小腸粘膜傷害を抑制することを報告した⁸⁾。本研究は、*in vivo*, *in vitro* モデルを用いて、抗酸化作用を有する胃粘膜保護薬レバミピドがアスピリン起因性小腸粘膜傷害の予防に有用であることを基礎的見地から証明した。

引用文献

1. Cornell J. Aspirin in the primary prevention of vascular disease. *Lancet* 374:878-879. (2009)
2. Smecuol E, Pinto Sanchez MI, Suarez A et al. Low-dose aspirin affects the small bowel mucosa: results of a pilot study with a multidimensional assessment. *Clin Gastroenterol Hepatol* 7:524-29. (2009)
3. Vane JR. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol* 231(25):232-35. (1971)
4. Qin Y, Naito Y, Handa O, Fukui A. et al. Heat shock protein 70-dependent protective effect of polaprezinc on acetylsalicylic acid-induced apoptosis of rat intestinal epithelial cells. *J clin Biochem Nutr* 49:174-181. (2011)
5. Takeuchi K, Miyazawa T, Kunikata T. et al. Pathogenic importance of intestinal hypermotility in NSAID-induced small intestinal damage in rats. *Digestion* 66(1):30-41. (2002)
6. Maiden L, Thjodleifsson B, Birgisson S et al. Long-term effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cyclooxygenase-2 selective agents on the small bowel: a cross-sectional capsule enteroscopy study. *Clin Gastroenterol Hepatol* 5:1040-1050. (2007)
7. Fukui A, Naito Y, Handa O et al. Acetylsalicylic acid induces damage to intestinal epithelial cells by

oxidation-related modifications of ZO-1. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 303(8):G927-36. (2012)

8. Watanabe T, Takeuchi T, Handa O, Sakata Y, Tanigawa T, Shiba M, Naito Y, Higuchi K, Fujimoto K, Yoshikawa T, Arakawa T. A multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial of high-dose rebamipide treatment for low-dose aspirin-induced moderate-to-severe small intestinal damage. *PLoS One*. 2015 Apr 15;10(4):e0122330. doi: 10.1371/journal.pone.0122330. eCollection 2015.

5. 主な発表論文等 (研究代表者には下線)

[雑誌論文](計7件)

Majima A, Handa O, Naito Y, Suyama Y, Onozawa Y, Higashimura Y, Mizushima K, Morita M, Uehara Y, Horie H, Iida T, Fukui A, Dohi O, Okayama T, Yoshida N, Kamada K, Katada K, Uchiyama K, Ishikawa T, Takagi T, Konishi H, Yasukawa Z, Tokunaga M, Okubo T, Itoh Y. Real-time monitoring of trans-epithelial electrical resistance in cultured intestinal epithelial cells: the barrier protection of water-soluble dietary fiber. *J Dig Dis*. 2017 Mar;18(3):151-159. doi:10.1111/1751-2980.12456. 査読有.

Higashimura Y, Naito Y, Takagi T, Tanimura Y, Mizushima K, Harusato A, Fukui A, Yoriki H, Handa O, Ohnogi H, Yoshikawa T. Preventive effect of agaro-oligosaccharides on non-steroidal anti-inflammatory drug-induced small intestinal injury in mice. *J Gastroenterol Hepatol*. 2014 Feb;29(2):310-7. doi:10.1111/jgh.12373. 査読有.

Handa O, Majima A, Onozawa Y, Horie H, Uehara Y, Fukui A, Omatsu T, Naito Y,

Yoshikawa T. The role of mitochondria-derived reactive oxygen species in the pathogenesis of non-steroidal anti-inflammatory drug-induced small intestinal injury. *Free Radic Res*. 2014 Sep;48(9):1095-9. doi: 10.3109/10715762.2014.928411. Epub 2014 Jul 21. 査読有.

Handa O, Naito Y, Fukui A, Omatsu T, Yoshikawa T. The impact of non-steroidal anti-inflammatory drugs on the small intestinal epithelium. *J Clin Biochem Nutr*. 2014 Jan;54(1):2-6. doi: 10.3164/jcbn.13-84. 査読有.

半田 修、向井理英子、陶山遥介、間嶋 淳、福居顕文、内藤裕二、【小腸潰瘍発症メカニズムはどこまで明らかになったか】NSAIDs 起因性小腸粘膜傷害の発生メカニズム 基礎的見地から、*G.I. Research*、査読無、24 巻 5 号、2016、342-347.

陶山遥介、半田 修、間嶋 淳、小野澤由里子、福居顕文、内藤裕二、薬剤性消化管傷害とタイトジャンクション、*G.I. Research*、査読無、23 巻 6 号、2015、494-500.

福居顕文、半田 修、岡山哲也、堅田和弘、鎌田和浩、内山和彦、石川 剛、高木智久、内藤裕二、【薬剤起因性小腸粘膜傷害に対する予防・治療法をめぐって】アスピリン起因性小腸傷害の発症機序と予防薬の検討、消化器の臨床、査読無、17 巻 6 号、2014、574-578.

[学会発表](計5件)

陶山遥介、半田 修、向井理英子、平井泰子、間嶋 淳、福居顕文、水島かつら、岡山哲也、堅田和弘、鎌田和浩、内山和彦、石川 剛、高木智久、内藤裕二、第 35 回 サイトプロテクション研究会、ラットのアスピリン起因性小腸粘膜傷害モデルにおける粘液の重要性 と予防薬の検討、2017、メルパルク京都、京都.

福井勇人、玄 泰行、福居顕文、第 102 回 日本消化器病学会近畿支部例会 シンポジウム「消化管出血に対する診療」：当院における高齢者上部消化管出血の現状、2015、京都テルサ、京都.

福居顕文、半田修、内藤裕二、第 100 回 日本消化器病学会総会 パネルディスカッション「薬剤起因性下部消化管粘膜傷害 基礎と臨床の Update」福居顕文 他：Aspirin 起因性小腸粘膜傷害の機序 解明ならびに予防薬の検討、2014、東京

国際フォーラム、東京.

Yin Q, Yuji N, Osamu Handa, Katsura Mizushima, Yasuki Higashimura, Akifumi Fukui, Yukiko Uehara, Ryusuke Horie, Tomohisa Takagi, Kazuhiko Uchiyama, Kazuhiro Katada, Toshikazu Yoshikawa. Rebamipide increases trefoil factor 3 expressions in human goblet-like cells. SFRR1,2014, Kyoto international conference center, Kyoto, Japan.

Akifumi Fukui, Yuji Naito, Osamu Handa, Kazuhiro Kamada, Kazuhiro Katada, Kazuhiko Uchiyama, Tomohisa Takagi, Nobuaki Yagi, Yoshito Itoh, Toshikazu Yoshikawa. Protective effect of rebamipide on acetyl salicylic acid-induced decrease of small intestinal integrity. SFRR1,2014, Kyoto international conference center, Kyoto, Japan.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/syokanai/researches/shokakan-02.html>

6. 研究組織

研究代表者

福居 顕文 (Fukui Akifumi)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号: 60725307