

氏名	江戸川 祥子
(ふりがな)	(えどがわ しょうこ)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲 第 号
学位審査年月日	平成 26 年 7 月 30 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題名	Down-regulation of collagen I biosynthesis in intestinal epithelial cells exposed to indomethacin: a comparative proteome analysis (プロテオーム解析によって明らかになったインドメタシンによる小腸上皮細胞内コラーゲン I の減少)
論文審査委員	(主) 教授 内 山 和 久 教授 朝 日 通 雄 教授 花 房 俊 昭

## 学 位 論 文 内 容 の 要 旨

### 《背景と目的》

カプセル内視鏡やダブルバルーン内視鏡の発達に伴い、非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) による小腸粘膜傷害の存在が明らかになってきた。しかしながら、NSAIDs による胃粘膜傷害と異なり、胃酸分泌の無い環境下における小腸粘膜傷害では、根本的に異なる機序が想定され、そのために治療法も定まっていないのが現状である。プロスタグランジン合成の阻害以外に、局所の小胞体ストレスや活性酸素によるミトコンドリア機能障害、腸内細菌の関与など様々な機序が想定されてきたが、一定の見解は得られていない。そこで本研究は、NSAIDs による小腸粘膜傷害の機序を解明するために、NSAIDs による細胞傷害で重要な働きをする蛋白質をプロテオーム解析によって同定し、細胞傷害過程におけるそれらの蛋白質の役割を探ることを目的とした。

### 《材料と方法》

ラット小腸上皮細胞である IEC-6 細胞に種々の濃度・時間のインドメタシンを作用させて cell viability を測定し、細胞傷害を起こすインドメタシン処理の条件を 200  $\mu$ M、24 時間と定めた。インドメタシン処理・未処理の細胞を回収し蛋白質を抽出し、再現性と添加

量を改良した改良型等電点 2 次元電気泳動を行い、ゲルをクマジーブルー染色した。Prodigy SameSpots 解析ソフトを用い、統計学的に有意かつ平均強度が 1.5 倍以上変化したスポットについて、質量分析によって蛋白質を同定した。同定した蛋白質について、ラットの NSAIDs 小腸粘膜傷害 *in vivo* モデルにおいてその増減を Western blot 法で確認した。さらに、同定した蛋白質のうちコラーゲン I については、免疫染色、コラーゲン合成阻害剤、siRNA を用いてその細胞傷害に与える影響を調べた。

#### 《結 果》

インドメタシンによって、発現が減少したスポットを 14、増加したスポットを 20 検出した。質量分析による解析で、発現が減少した蛋白質 8 個と発現が増加した蛋白質 18 個を同定した。発現が減少した蛋白質には、コラーゲン I と、4 種類のコラーゲン I 合成に関係する蛋白質が含まれていた。これらの蛋白質のインドメタシン処理による減少は、IEC-6 細胞および *in vivo* モデルの両方において Western blot 法により確かめられた。また、*in vivo* モデルにおいて免疫染色を行うと、コラーゲン I の減少は小腸粘膜細胞の apical 側で著明であった。

次に、コラーゲン I 合成の減少が細胞傷害に与える影響を調べるために、コラーゲン I でコートされた培養皿で IEC-6 細胞を培養し cell viability を測定すると、コラーゲン I のみでは細胞増殖に影響しないが、インドメタシンによる細胞傷害をコラーゲン I が打ち消す効果を認めた。次に、コラーゲン合成阻害剤である *cis*-4-hydroxy-L-proline を用いると、cell viability は容量依存的に減少した。また、上皮細胞内コラーゲン I を siRNA によってノックダウンすると、時間依存的に cell viability が減少した。

#### 《考 察》

NSAIDs 起因性小腸粘膜傷害の機序は、NSAIDs によるプロスタグランジン合成の阻害が主原因と考えられているが、小胞体ストレスやミトコンドリア機能障害、活性酸素などの局所的な因子も重要と考えられている。この実験系では、局所的な粘膜傷害（細胞死）と粘膜治癒（再生）に働く蛋白質の変化が同時に認められると考えられ、プロテオーム解析によって同定された 18 個の増加蛋白質と 8 個の減少蛋白質が厳密にどちらを反映しているかを推定することは困難である。しかしながら、8 個の減少蛋白質のうち 5 個が、コラーゲン I とその合成に関する蛋白質であることは特筆すべきことであると考えられる。コラーゲン I は小胞体で合成されたのち、様々な翻訳後修飾を受けて 3 本鎖の安定した型になってから分泌される。コラーゲン I 産生細胞に特異的に発現している、合成過程に必須の HSP47 の発現がインドメタシン投与で変化しないことから、IEC-6 細胞はコラーゲン I を産生するが、その修飾に関与する酵素や分子シャペロンが減少した結果、安定したコラーゲン I の維持が障害されると考えられた。外因性にコラーゲン I を投与するとインドメタシンの細胞傷害性が減少したことから、コラーゲン I の減少は粘膜傷害の結果ではなく、原因となっていることが強く示唆された。さらに、IEC-6 細胞にコラーゲン合成阻害剤を投与すると容量依存的に細胞傷害が増加し、コラーゲン I の発現をノックダウンす

ると時間依存的に細胞傷害が増加することから、上皮細胞内のコラーゲン I が細胞の生存に重要であり、インドメタシンによるその低下が細胞傷害を引き起こしている可能性が示唆された。

本研究で明らかになった細胞傷害機序の新しい知見は、今後の NSAIDs 小腸粘膜傷害に対する治療のターゲットを探る上で重要であると期待される。

(様式 甲6)

## 論文審査結果の要旨

非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) による胃粘膜傷害については、以前より知られており、胃酸抑制・粘膜保護剤の投与により症状改善が期待出来ることが分かっているが、近年のカプセル内視鏡やダブルバルーン内視鏡の発達に伴い、小腸粘膜にも 50%以上の粘膜傷害が存在することが明らかになってきた。しかしながら、酸分泌のない環境下での NSAIDs 起因性小腸粘膜傷害の機序については不明な点が多く、治療法も定まっていない。従って、NSAIDs の細胞傷害性に関係する蛋白質を解析することは、粘膜傷害の機序の解明および予防・治療法の開発につながることを期待される。

本研究は、ラット正常小腸上皮細胞である IEC-6 細胞に対して NSAIDs の一種であるインドメタシンを投与し、プロテオーム解析を行うことによって、インドメタシン投与によりコラーゲン I とその合成に関係する蛋白質が減少することを初めて同定した。さらに、ラットの NSAIDs 小腸粘膜傷害 *in vivo* モデルにおいても、特に **apical** 側においてコラーゲン I が減少していることを同定した。申請者は、コラーゲン I を外因性に与えるとインドメタシンの細胞傷害が回復し、コラーゲン合成阻害剤によってインドメタシンと同様に細胞が傷害されることを見出した。また、細胞内のコラーゲン I をノックダウンすると細胞傷害が起こることから、上皮細胞内のコラーゲン I の合成が重要であり、インドメタシンによるその合成低下が細胞傷害を引き起こしている可能性が示唆された。本論文に示された NSAIDs 傷害機序についての新しい知見は、今後の NSAIDs 小腸粘膜傷害に対する治療のターゲットを探る上で重要であると考えられる。

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 条第 1 項に定めるところの博士 (医学) の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Journal of Proteomics 103: 35-46, 2014