

氏名	原田 智
(ふりがな)	(はらだ さとし)
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28年1月13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	Autophagy deficiency diminishes indomethacin-induced intestinal epithelial cell damage through activation of the ERK/Nrf2/HO-1 pathway (オートファジーの欠損は ERK/Nrf2/HO-1 経路の亢進を介し、インドメタシン起因性小腸粘膜傷害を抑制する)
論文審査委員	(主) 教授 内 山 和 久 教授 高 井 真 司 教授 林 道 廣

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

《背 景》

近年、非ステロイド系消炎鎮痛薬(NSAIDs)は胃・十二指腸のみならず小腸にも粘膜傷害を惹起することが知られるようになってきているが、その病態は、未だ不明な点が多い。特に小腸では胃・十二指腸と異なり酸の影響が無いいため酸分泌抑制による予防や治療が困難であり、その治療法の確立のため NSAIDs 起因性小腸粘膜傷害の機序の解明が望まれている。一方、NSAIDs の投与はオートファジーとアポトーシスを誘導することが知られている。オートファジーは飢餓状態・酸化ストレス・小胞体ストレスに対する細胞のホメオスタシス維持に重要な役割を果たす作用であるが、細胞死の一形態として現在注目され、ア

オートファジーとはそれぞれ相互に作用し、各々が細胞死および細胞生存に関与している。オートファジーは飢餓下での蛋白質のリサイクルが本来の目的であり、生存にとっては有利な機構であると考えられ、オートファジー自体を完全にノックアウトすると生存出来なくなる。今回、我々はオートファジーを遺伝子レベル(*Atg5*)で小腸限局性にノックアウトしたマウスを用いて、NSAIDs 起因性小腸粘膜傷害をオートファジーの観点から検討した。また、その分子機序を明らかにするため、ラット正常小腸上皮細胞株である IEC-6 を用いて検討を行った。

《方 法》

・ *in vivo* : *Atg5 flox* マウスと *villin-Cre* 発現マウスを交配することで、小腸上皮特異的に *Atg5* をノックアウトしたマウスを作製した。生後 8 週に、正常マウス、ノックアウトマウスともに非絶食下でインドメタシンを経口投与し、24 時間後に全身麻酔下に安楽死させた後に全小腸を摘出し傷害面積を測定した。また小腸粘膜における ERK のリン酸化および Nrf2、HO-1 の発現レベルをウエスタンブロット法で検討した。

・ *in vitro* : 正常 IEC-6 および *Atg5* をノックダウンした IEC-6(*shAtg5IEC-6*)培養液中にインドメタシンを添加し、24 時間後の cell viability を測定した。また、その際の Extracellular signal-regulated kinase(ERK)のリン酸化、Microtubule-associated protein light chain 3(LC3)、Poly ADP-ribose polymerase-1(PARP1)、NF-E2-related factor 2(Nrf2)、Heme oxygenase-1(HO-1)の発現を時系列にウエスタンブロット法で検討した。同時に、酸化ストレスおよびミトコンドリア傷害の検討のため、各々の Reactive oxygen species(ROS)、スーパーオキシド、ミトコンドリア膜電位の測定を行った。また、ROS のスカベンジャーである MnTMPyP を同時に投与した際の ERK のリン酸化、LC3、PARP1、Nrf2、HO-1 の発現もウエスタンブロット法で検討した。

《結 果》

Atg5 ノックアウトマウスでは正常マウスに比べインドメタシンによる小腸粘膜傷害面積は有意に少なく、**Atg5** をノックアウトすることで傷害が軽減されることが示された。**shAtg5 IEC-6** においても、正常 **IEC-6** に比べ **cell viability** は高く、**in vivo** と同様にインドメタシンによる細胞傷害が抑制されていた。**shAtg5 IEC-6** ではインドメタシン投与の際に **LC3** の増加および **PARP1** の断片化はいずれも認められず、オートファジーの欠損によりアポトーシスも抑制されることが示された。**ROS** 及びスーパーオキシドは正常 **IEC-6**、**shAtg5 IEC-6** ともインドメタシン投与による増加が見られたが、投与前の時点で **shAtg5 IEC-6** は正常 **IEC-6** に比べて多く、インドメタシン投与による増加率は正常 **IEC-6** に比べ小さかった。ミトコンドリア膜電位も同様にインドメタシン投与前には **shAtg5 IEC-6** で正常 **IEC-6** に比べ低かったが、インドメタシン投与により正常 **IEC-6** では認められた膜電位低下が **shAtg5 IEC-6** では認められなかった。**Atg5** ノックアウトマウス及び **shAtg5 IEC-6** ともに、インドメタシン投与前、投与後とも正常に比べ **ERK** のリン酸化、**Nrf2**、**HO-1** の全ての発現増加が見られ、**in vivo**、**in vitro** とも **ERK/Nrf2/HO-1** 経路の亢進が示された。**MnTMPyP** 投与下で正常 **IEC-6** にインドメタシンを投与すると、**MnTMPyP** 非投与下では発現が増加した **ERK** のリン酸化、**Nrf2**、**HO-1**、**LC3**、**PARP1** の断片化のいずれも増加が認められなくなった。

《考 察》

本研究の結果から、オートファジーの欠損は **ERK/Nrf2/HO-1** 経路を亢進することでインドメタシン起因性小腸粘膜傷害を抑制することが示された。インドメタシン起因性小腸粘膜傷害においては、ミトコンドリア傷害による酸化ストレスが要因となっており、オートファジーの進行不全による細胞死やアポトーシスにより傷害が惹起される。正常細胞では、これらから細胞を保護すべく **ERK/Nrf2/HO-1** 経路が働いているが、オートファジー欠損下では、定常状態において酸化ストレスが亢進しているため、既に **ERK/Nrf2/HO-1** 経路が亢進しており、インドメタシン投与による酸化ストレスに対してより効果的に細胞保護作用を発揮していると考えられる。

論文審査結果の要旨

本研究において、オートファジーの遺伝子レベルでの欠損は ERK/Nrf2/HO-1 経路を亢進することでインドメタシン起因性小腸粘膜傷害を抑制することが示された。NSAIDs 起因性小腸粘膜傷害の病態については不明な点が未だ多い一方、疼痛緩和や心血管イベントの予防のため NSAIDs の服用患者は増加しており NSAIDs 起因性小腸粘膜傷害への対策の早急な確立が求められている。本研究においては、ノックアウトマウスを作製し実験が行われているが、オートファジー関連遺伝子である Atg5 を全身性にノックアウトするとマウスは胎生死することが知られているため、*in vivo* でオートファジーを遺伝子レベルで完全に抑制した研究はなされていなかった。この問題を解決するため Atg5 flox マウスと villin-Cre 発現マウスを交配することで、小腸上皮特異的に Atg5 をノックアウトしたマウスを作製し、更に *in vitro* においては、IEC-6 で Atg5 をノックダウンすることで *in vivo*、*in vitro* とも遺伝子レベルでオートファジーを欠損させた状況での検討が行われている。その結果、オートファジーの遺伝子レベルでの欠損がアポトーシスを抑制し、インドメタシンによる細胞傷害に対して保護的に作用すること、またその機序としてオートファジー欠損下では、定常状態で酸化ストレスが亢進しているため、既に ERK/Nrf2/HO-1 経路が亢進しており、このためインドメタシン投与による酸化ストレスに対してより効果的な細胞保護作用を発揮することが示されている。

本研究において、NSAIDs 起因性小腸粘膜傷害におけるオートファジーの細胞傷害における分子学的な機序の解明が進められた。

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)

The Journal of pharmacology and experimental therapeutics
355(3): 353-361, 2015