

# 一酸化窒素によるDSS惹起大腸炎マウスの病態悪化機構の解明

岡, 鑫

<https://hdl.handle.net/2324/1654809>

---

出版情報：九州大学, 2015, 博士（創薬科学）, 課程博士  
バージョン：  
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（3）

## 一酸化窒素による DSS 惹起大腸炎マウスの病態悪化機構の解明

機能分子解析学分野 3PS12013R 園 鑫

### 【序論】

潰瘍性大腸炎は、主に直腸の粘膜下層に特発性、非特異的に発症する炎症性疾患で厚生労働省の特定疾患研究対象に指定されている。その病因は、腸内細菌の関与や免疫的異常、遺伝的要因、環境因子等の関与が示唆されている。しかし、病態の発症・進展にどのような因子が関わっているのか、その詳細は未だ不明である。

一酸化窒素 (NO) は、生体の恒常性維持に重要な役割を担っている一方で、過剰に産生されることで組織障害を引き起こす。ヒト潰瘍性大腸炎や大腸炎モデル動物においても、その発症や進展に NO の関与が報告されている。我々はこれまで、デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 惹起大腸炎マウスを用いて、iNOS から産生した NO が TNF- $\alpha$ 、接着分子の発現を介して好中球浸潤を誘発し、大腸炎を増悪することを明らかにしてきた<sup>1</sup>。しかし、iNOS から産生された NO が、どのように炎症性シグナル経路を活性化するのか、詳細な機序は不明であった。

以上の背景より、本研究では、炎症性シグナル経路の活性化機構に着目し、大腸炎の増悪に NO がどのように関与しているのか、その作用機序を明らかにすることを目的とした。まず、DSS 惹起大腸炎マウスを作製して、iNOS 発現に関わる NF- $\kappa$ B 経路の上流および下流に存在する因子と NO との関連性を解析した。次に、マウス腹腔マクロファージ細胞を用いて LPS 刺激下における NO の炎症性シグナル経路活性化機構について解析し、タンパク質のニトロ化修飾を介した DSS 惹起大腸炎増悪の可能性について検討した。

### 【方法】

#### 大腸炎モデルの作成および試薬投与

大腸炎は、5% (w/v) DSS 水溶液を ICR マウス (雄性、5 週齢) に自由飲水させることで作成し、体重・大腸長・Disease Activity Index (下痢と血便をそれぞれ 0~3 でスコア化し、両者の合計) により病態を評価した。DSS は水道水に溶解し、自由飲水させた。iNOS から産生した NO が DSS 惹起大腸炎の腸管炎症性反応に与える影響を調べるため、iNOS 阻害剤アミノグアニジン (AG) や NO 消去剤 c-PTIO を用いて検討した。AG は 5% DSS 水溶液で 6 g/L になるよう調製し、DSS 飲水開始日より 1 日 2 回、経口ゾンデを用いて経口投与 (40 mg/kg/day) した。Carboxy-PTIO (c-PTIO) は DSS 飲水 4, 5, 6 日目に 1 日 1 回皮下注射 (12 mg/kg/day) した。NO 放出剤 NOC-18 (半減期 21 時間 (37°C, pH7.4)) の投与は以下の要領で行った。NO の効果を明確にするため、5% DSS 飲水の 4 日目から 2% DSS に切り替え、DSS 飲水 4, 5, 6 日目に NOC-18 (5 mg/kg/day) を 1 日 1 回皮下に注射した。大腸組織中 NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub> はグリース法で測定し、大腸組織中ニトロチロシン、NF- $\kappa$ B の p65 サブユニット、CD14、TLR4、ICAM-1、P-selectin、TNF- $\alpha$ 、iNOS の発現量は ELISA 法または western blot 法を用いて測定した。

## 細胞培養および試薬投与

マウス腹腔マクロファージ細胞 (RAW264.7 細胞) は、10% FBS 含有 DMEM 培地を用いて CO<sub>2</sub> インキュベーター内 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) で培養した。LPS は PBS で 1 mg/ml に調製し、DMEM 培地を用いて必要な濃度に希釈した。3 ng/ml LPS で細胞を刺激し、2 時間後に NOC-18 を添加し、4 時間後に細胞を回収して NOC-18 の炎症性シグナル活性化への影響を RT-PCR 法および Western blot 法にて調べた。また、LPS 刺激 1 時間前に TLR4 阻害剤 VIPER (5 μM)、IKK 阻害剤 BMS-345541 (50 μM)、または STAT3 阻害剤 S3I-201 (50 μM) を添加し、その影響を検討した。

## 【結果】

### DSS 飲水マウスの大腸組織における炎症性メディエーターの変動

DSS 飲水開始 2 日目から disease activity index (DAI) スコアが上昇し、病態の悪化が 7 日目まで持続した。DSS 飲水開始 3 日目に TLR4 と NF-κB、4 日目に炎症性サイトカイン TNF-α、5 日目には NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub>、ニトロロチロシンと接着分子 (P-selectin、ICAM-1) が有意に増加し、それらの上昇は 7 日目まで続いた (Fig. 1)。

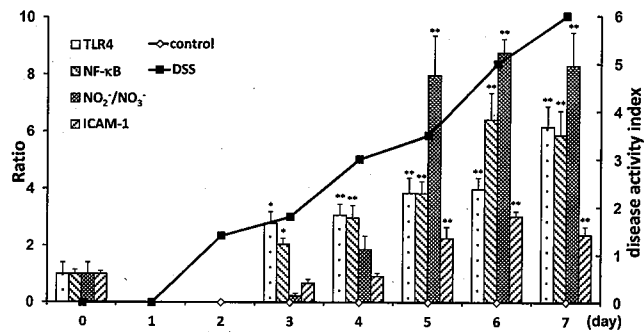


Fig. 1 DSS による TLR4, NF-κB, NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub>、ICAM-1 の変動と病態形成との関連  
mean±S.D., \*P<0.05, \*\* P<0.01, n = 4

### NO が TLR4-NF-κB シグナル経路に与える影響

次に、5% DSS 飲水 5 日目から大腸組織中 NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub> 産生が有意に増加していることから、DSS 飲水 4 日目より NO 消去剤 c-PTIO を皮下注射した。その翌日 (5 日目) には TLR4 や NF-κB の活性化が抑制され TNF-α や P-selectin、ICAM-1、iNOS も NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub> と同様に減少した (Fig. 2)。一方、2% DSS 切替時に NO 放出剤 NOC-18 を処置したところ、CD14 や TLR4、NF-κB 発現は有意に増加した (Fig. 3)。したがって、DSS 飲水により誘発された CD14 から NF-κB へのシグナル伝達の増強に、NO が直接または間接的に関与する可能性が示唆された。

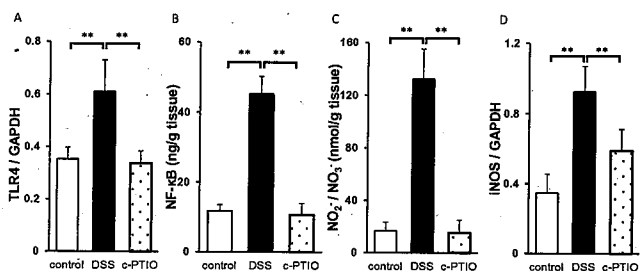


Fig. 2 DSS 惹起大腸炎マウスの大腸組織における c-PTIO の TLR4, NF-κB, NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub>、iNOS 発現に及ぼす影響  
(A) TLR4, (B) 核内 NF-κB (p65), (C) NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub>, (D) iNOS.  
Mean±S.D., \*\*P<0.01, n = 3~5

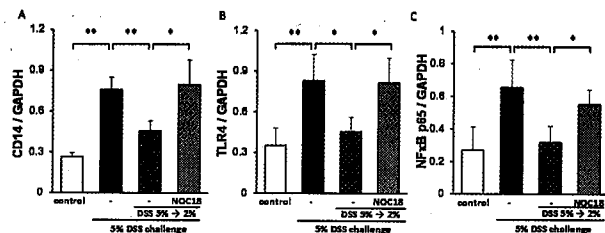


Fig. 3 DSS 惹起大腸炎マウスの大腸組織における NOC-18 の TLR4-NF-κB シグナルに及ぼす影響  
(A) CD14, (B) TLR4, (C) 核内 NF-κB (p65).  
Mean±S.D., \*P<0.05, \*\*P<0.01, n = 3~5

## LPS 刺激 RAW264.7 細胞への NOC-18 処置が CD14-TLR4-NF- $\kappa$ B 経路に与える影響

DSS 惹起大腸炎マウスの大腸組織における CD14 の局在を蛍光免疫染色法で解析したところ、マクロファージに発現していることがわかった。そこで、以降はマウス腹腔マクロファージ RAW264.7 細胞を用いて検討した。LPS 刺激 RAW264.7 細胞に NOC-18 を添加し、NO の CD14-TLR4-NF- $\kappa$ B 経路に対する影響を調べた。LPS 刺激下 10  $\mu$ M NOC18 添加することで CD14, iNOS, IL-6 発現及び核内 NF- $\kappa$ B (p65) 発現量が有意に亢進した。一方、NOC18 添加のみでは変化しなかった (Fig. 4)。したがって、LPS 刺激下 NOC18 添加により、CD14-TLR4-NF- $\kappa$ B シグナル経路が活性化されることがわかった。

## TLR4 阻害剤、IKK 阻害剤および STAT3 阻害剤処置による効果

LPS 刺激下 NOC18 添加によって上昇した CD14, iNOS 及び NF- $\kappa$ B の活性化は VIPER によって有意に抑制された (Fig. 5 A, B, C)。BMS-345541 でも同様の結果が得られた (data not shown)。また、肝 Kupffer 細胞で STAT3 活性化により CD14 が発現増加するとの報告がある<sup>2</sup>。そこで CD14-TLR4-NF- $\kappa$ B 経路阻害によるリン酸化 STAT3 の変動を調べた。その結果、STAT3 のリン酸化は CD14 と同様に LPS 刺激下 NOC18 添加により上昇し、VIPER によって抑制された (Fig. 5 D)。BMS-345541 でも同様の結果が得られた (data not shown)。よって、NOC18 が CD14-TLR4-NF- $\kappa$ B 経路を活性化し、さらに STAT3 シグナル経路の活性化を介して、CD14 の発現を増強することが示唆された。

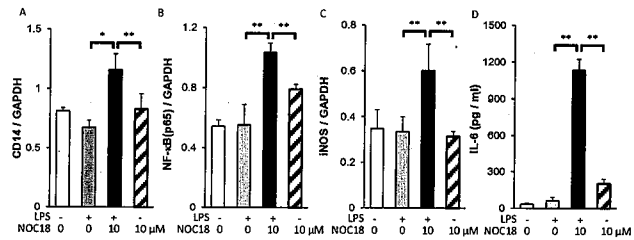


Fig. 4 LPS 刺激 RAW264.7 細胞への NOC18 添加による CD14-TLR4-NF- $\kappa$ B シグナル活性化 (A) CD14, (B) 核内 NF- $\kappa$ B (p65), (C) iNOS, (D) IL-6. Mean $\pm$ S.D., \*P<0.05, \*\*P<0.01, n=4

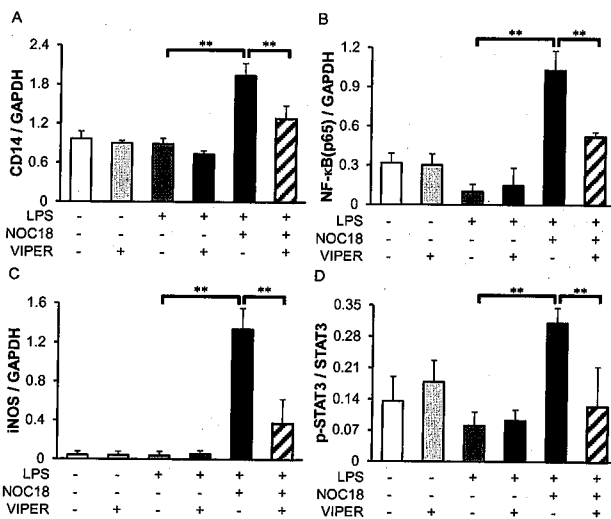


Fig. 5 TLR4 阻害剤 (VIPER) 前処置による CD14-TLR4-NF- $\kappa$ B シグナル阻害 (A) CD14, (B) 核内 NF- $\kappa$ B (p65), (C) iNOS, (D) p-STAT3/total STAT3. Mean $\pm$ S.D., \*P<0.05, \*\*P<0.01, n=4

## DSS 惹起大腸炎の CD14-TLR4-NF- $\kappa$ B 経路活性化に SHP2 のニトロ化修飾が関与する

SHP2 はチロシン脱リン酸化酵素の一つである。gp130 によるリン酸化で活性化されると、STAT3 を脱リン酸化し、IL-6 誘発のシグナル伝達を抑制する<sup>3</sup>。そこで、本研究では LPS で刺激した RAW264.7 に NOC-18 を添加し、SHP2 のリン酸化(p-SHP2)を調べた。LPS 刺激 2 時間後に p-SHP2 が上昇し、その上昇は NOC-18 の添加により有意に抑制された (Fig. 6 A)。p-SHP2 が減少した原因を調べるために、抗ニトロチロシン抗体で免疫沈降を行った。その

結果、LPS 刺激により SHP2 のバンドは増強し、NOC-18 添加によりさらに増加した (Fig. 6B)。大腸組織についても同様に検討した結果、5% DSS 群および 2% DSS 切替時に NOC-18 処置した群において SHP2 のバンドが検出された (Fig. 6C)。

#### 【考察】

本研究より、DSS 惹起大腸炎マウスにおいて産生する NO の CD14-TLR4-NF- $\kappa$ B シグナル活性化機構について、

以下の機構が考えられる。まず、腸内細菌由来の LPS が CD14 を介して TLR4-NF- $\kappa$ B シグナル経路を活性化し、iNOS や IL-6、TNF $\alpha$ などの炎症性サイトカイン、接着分子の発現を増強する。IL-6 は炎症性サイトカイン受容体 gp130 と結合して STAT3 経路を活性化する。iNOS から過剰に産生した NO は、STAT3 経路の負のフィードバックの一つである SHP2 のチロシン残基をニトロ化修飾し、SHP2 の STAT3 脱リン酸化を抑制することでリン酸化 STAT3 が増加し、さらに STAT3 を活性化する。STAT3 の活性化により CD14 の発現が上昇し、TLR4 のシグナル伝達がさらに増す。CD14-TLR4-NF- $\kappa$ B シグナル経路下流の炎症性サイトカインや接着分子の産生が亢進することで、浸潤好中球からの活性酸素種の産生が増加し、大腸炎の病態が悪化したと考えられる。

本研究によって、NO が急性潰瘍性大腸炎の症状悪化に関与することがわかった。さらに生体内の NO 産生あるいは SHP2 ニトロ化を抑制することより、大腸炎の悪化を軽減できる可能性が示された。したがって本研究結果は、大腸炎の発症・進展メカニズム解析のみならず創薬研究に大きく貢献できるものと確信している。

#### 【引用文献】

1. Yasukawa K, Miyakawa R, Yao T, *et al. Free Radic Res.* 2009;43(5):505-513.
2. Imajo K, Fujita K, Yoneda M, *et al. Cell Metabolism.* 2012;16(1):44-54.
3. Ohtani T, Ishihara K, Atsumi T, *et al. Immunity.* 2000;12(1):95-105.

#### 【発表論文】

- Yasukawa, K.; Tokuda, H.; **Tun, X.**; Utsumi, H.; Yamada, K. The detrimental effect of nitric oxide on tissue is associated with inflammatory events in the vascular endothelium and neutrophils in mice with dextran sodium sulfate-induced colitis. *Free Radic Res.* 2012;46(12):1427-1436.
- **Tun, X.**; Yasukawa, K.; Yamada, K. Involvement of nitric oxide with activation of Toll-like receptor 4 signaling in mice with dextran sodium sulfate-induced colitis. *Free Radic Biol Med.* 2014;74:108-117.
- **Tun, X.**; Yasukawa, K.; Yamada, K. Nitration of tyrosine residues of SHP2 promotes the Toll-like receptor 4 signaling in mice with DSS-induced colitis. (In preparation)

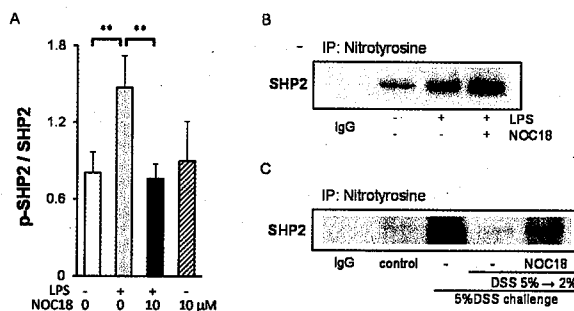


Fig. 6 LPS 刺激 RAW264.7 細胞への NOC18 添加による (A) SHP2 のリン酸化、(B) RAW264.7 細胞内 SHP2 とニトロチロシンニトロチロシンとの共免疫沈降、(C) 大腸組織内 SHP2 とニトロチロシンとの共免疫沈降。Mean $\pm$ S.D., \*\*P<0.01, n=3-4