

博士論文

制吐剤による 5-FU 誘発小腸上皮アポトーシス抑制作用機序の解明

三河 翔馬

目次

要旨	4
【第1章 緒言】	9
1-1 制吐剤と抗炎症.....	9
1-2 セロトニン3受容体 (5-HT ₃ R)	9
1-3 セロトニンと炎症	10
1-4 ドラッグリポジショニング	11
1-5 5-フルオロウラシル誘発性小腸上皮アポトーシス	11
1-6 炎症とアポトーシス	12
1-7 目的	13
【第2章 実験材料及び実験方法】	16
2-1 実験動物	16
2-2 小腸上皮アポトーシスモデル	16
2-3 アポトーシスの評価.....	17
2-4 骨髄移植	17
2-5 フローサイトメトリー (FACS).....	18
2-6 小腸クリプトの単離およびオルガノイドの培養	19
2-7 免疫蛍光染色.....	19
2-8 オルガノイド細胞死誘導実験	21
2-9 血漿 5-HT 濃度測定	22
2-10 統計処理	22
【第3章 5-FU 誘発性アポトーシスに対する 5-HT₃R シグナルの影響】	23
3-1 目的	23
3-2 実験成績	23
3-2-1 5-HT ₃ R 阻害薬の影響	23
3-2-2 α 7nAChR 作動薬の影響.....	25

3-2-3	5-HT ₃ R 作動薬の影響	27
3-2-4	5-HT _{3A} R-KO マウスでの影響	29
3-3	考察	31
【第4章 5-FU 誘発性アポトーシスに関与する 5-HT₃R シグナル標的細胞の探索①：骨髄移植モデルによる検討】		33
4-1	目的	33
4-2	実験成績	33
4-2-1	骨髄移植モデルにおける免疫細胞置換率の検討 (末梢血).....	33
4-2-2	骨髄移植モデルにおける免疫細胞置換率の検討 (腸管)	35
4-2-3	骨髄移植モデルにおける 5-FU 誘発性アポトーシスの影響	37
4-3	考察	39
【第5章 5-FU 誘発性アポトーシスに関与する 5-HT₃R シグナル標的細胞の探索②：5-HT_{3A}R-EGFP レポーターマウスでの検討】		40
5-1	目的	40
5-2	実験成績	40
5-2-1	5-HT _{3A} R-EGFP レポーターマウスの小腸組織切片の観察.....	40
5-2-2	神経細胞における 5-HT _{3A} R-EGFP の発現	42
5-2-3	マクロファージにおける 5-HT _{3A} R-EGFP の発現	44
5-2-4	共焦点顕微鏡によるマクロファージと 5-HT _{3A} R-EGFP 陽性細胞の観察	46
5-2-5	粘膜上皮細胞における 5-HT _{3A} R-EGFP の発現.....	48
5-3	考察	50
【第6章 5-FU 誘発性アポトーシスに関与する 5-HT₃R シグナル標的細胞の探索③：EC細胞についての検討】		52
6-1	目的	52
6-2	実験成績	52
6-2-1	5-HT _{3A} R-EGFP レポーターマウスでの小腸オルガノイド作製	52

6-2-2 小腸オルガノイドでの 5-FU 細胞死誘導実験	54
6-2-3 5-FU 投与マウスにおける血漿 5-HT 濃度の検討	57
6-3 考察	59
【第 7 章 総合考察】	61
【第 8 章 引用文献】	67
謝辞	75

要旨

【背景および目的】

制吐剤として用いられているセロトニン3受容体 (5-HT₃R) 阻害薬は、腸管神経および中枢神経の 5-HT₃R を阻害することで嘔吐中枢を抑制し、制吐作用を発揮する。近年、5-HT₃R 阻害薬には抗炎症作用および抗アポトーシス作用が存在することが示唆されているが、その詳しいメカニズムは明らかになっていない。このメカニズムが明らかとなれば、5-HT₃R 阻害薬が制吐剤だけではなく、抗炎症薬・抗アポトーシス薬としてのドラッグリポジショニングに資すると考えられる。そこで本研究では、抗癌剤である 5-フルオロウラシル (5-FU) による腸管上皮細胞 (IEC) のアポトーシスモデルを用い、5-HT₃R 阻害薬によるアポトーシス抑制作用機序を解明することとした。

本研究では、①5-FU 誘発性アポトーシスに対する 5-HT₃R シグナルの影響を検証し、②5-FU 誘発小腸上皮アポトーシス抑制作用を示す 5-HT₃R シグナルの標的細胞を同定することを目的とした。

【実験結果】

①5-FU 誘発性アポトーシスに対する 5-HT₃R シグナルの影響

5-FU 誘発性小腸上皮アポトーシス誘導モデルは、マウスに 5-FU (50 mg/kg, i.p.) を投与することで作製した。5-FU 投与 24 時間後に小腸を摘出し、組織切片を作製し、活性型カスパーゼ 3 の免疫染色で陽性を示すアポトーシス細胞の数を評価した。5-FU 投与の 30 分前および 6 時間後に、5-HT₃R 阻害薬であるトロピセトロン (5 mg/kg, p.o.) またはオンダンセトロン (5 mg/kg, p.o.)、 $\alpha 7$ ニコチン性アセチルコリン受容体 ($\alpha 7$ nAChR) 作動薬である PNU-282987 (5 mg/kg, i.p.)、そして 5-HT₃R 作動薬である m-CPBG (3 mg/kg, i.p.) を投与した。まず、正常な小腸ではアポトーシスを起こしている細胞はほとんど観察されなかったが、5-FU の投与は腸陰窩の IEC にアポトーシスを引き起こした。次に 5-HT₃R 阻害薬を併

用して投与すると、5-FU 誘発性アポトーシスを軽減する傾向があった。特にオンダンセトロン[®]の併用投与は十二指腸と空腸で、5-FU 単独投与に比べ有意にアポトーシス細胞の数が減少した。トロピセトロンは $\alpha 7nAChR$ の部分作動薬として働くことが知られているが、 $\alpha 7nAChR$ 作動薬の投与は 5-FU 誘発性アポトーシスに影響しなかった。一方、5-HT₃R 作動薬の投与は 5-FU 誘発性アポトーシスを増強する傾向が見られ、特に空腸では有意に 5-FU 誘発性アポトーシスが増強された。しかし、5-HT₃R 作動薬の単独投与はアポトーシスを引き起こさなかった。また、5-HT_{3A}R 欠損マウスを用いて、5-FU 誘発性アポトーシスモデルを作製すると、野生型マウスに比べて IEC のアポトーシスが十二指腸と回腸で有意に減少し、また空腸でも減少する傾向が見られた。

これらの結果を総合すると、5-HT₃R 阻害薬の投与および 5-HT_{3A}R 欠損マウスでは、5-FU 誘発性アポトーシスが減少する傾向が、5-HT₃R 作動薬の投与は 5-FU 誘発性アポトーシスを増強する傾向を示した。すなわち、5-HT₃R シグナルの活性化は 5-FU 誘発性アポトーシスを促進する作用を持つことが示唆された。

②5-FU 誘発小腸上皮アポトーシス抑制作用を示す 5-HT₃R シグナル標的細胞の探索

次に、5-FU 誘発小腸上皮アポトーシスに関与する 5-HT₃R シグナルの標的細胞の同定を試みた。5-HT₃R 阻害薬の抗炎症作用が、免疫細胞に発現する 5-HT₃R を介して発揮されている可能性がこれまでに報告されているため、骨髄移植モデルマウスを用いることで免疫細胞について検討を行った。野生型マウスと 5-HT_{3A}R 欠損マウスを用いて骨髄移植モデルを作製し、5 週間後に 5-FU によるアポトーシスを評価した。その結果、骨髄由来細胞特異的に 5-HT_{3A}R を欠損させたマウスにおいて、5-FU によるアポトーシス細胞数は減少しなかったが、骨髄由来細胞以外の全ての細胞を 5-HT_{3A}R 欠損させたマウスでは 5-FU によるアポトーシスが減少し、この結果は骨髄移植を行っていない 5-HT_{3A}R 欠損マウスと同じであった。以上の成績から、骨髄由来免疫細胞は 5-FU による IEC アポトーシス誘導には関

与しないことが示唆された。

次に、免疫細胞以外の 5-HT_{3A}R シグナルの標的細胞を探索することとした。5-HT_{3A}R は神経細胞に発現していることは広く知られているが、5-HT_{3A}R を発現するそのほかの細胞に関する情報は乏しい。そこで、5-HT_{3A}R-EGFP レポーターマウスを用いて消化管における 5-HT_{3A}R の発現細胞を観察すると、5-HT_{3A}R は粘膜下組織である絨毛間を走行する繊維状の神経細胞と思われる細胞と、粘膜神経叢および筋間神経叢と思われる部位に発現していた。また、粘膜上皮細胞の一部の細胞にも 5-HT_{3A}R 発現細胞が確認でき、そのうちいくつかは腸陰窩にも分布していた。この切片を用い、神経細胞を PGP9.5 で免疫染色すると、ほとんどの 5-HT_{3A}R 陽性細胞と PGP9.5 が一致した。しかし、粘膜上皮の 5-HT_{3A}R-EGFP 陽性細胞と PGP9.5 は一致しなかった。粘膜上皮の 5-HT_{3A}R-EGFP 陽性細胞を同定するために、エンテロクロマフィン細胞 (EC 細胞) のマーカーであるセロトニン (5-HT) で免疫染色を行ったところ、一部の 5-HT_{3A}R-EGFP 陽性上皮細胞と EC 細胞が一致した。しかし、すべての EC 細胞が 5-HT_{3A}R-EGFP 陽性ではなく、その割合は約 50%だった。

小腸薄層切片を用いた形態学的解析により、5-HT_{3A}R-EGFP 陽性 EC 細胞が腸陰窩部に確認できたため、次に小腸オルガノイドでの同受容体の発現について解析した。5-HT_{3A}R-EGFP レポーターマウスで小腸オルガノイドを作製すると、オルガノイド中に 5-HT_{3A}R-EGFP 陽性細胞が確認でき、また EC 細胞の発現も確認できた。これらを二重染色すると一部の細胞は 5-HT_{3A}R-EGFP および 5-HT の両方に陽性を示し、小腸オルガノイドにおいても *in vivo* の消化管粘膜組織と同様に 5-HT_{3A}R 発現細胞が維持されていることが確認された。次に、野生型マウスと 5-HT_{3A}R 欠損マウスからそれぞれ小腸オルガノイドを作製し、5-FU による細胞死を評価した。その結果、5-FU は濃度依存的に野生型マウスと 5-HT_{3A}R 欠損マウスから作成した小腸オルガノイドに細胞死を誘導したが、その細胞死の割合に野生型マウスと 5-HT_{3A}R 欠損マウスで差は見られなかった。最後に、5-FU を投与したマウスにおける血漿中 5-HT 濃度を測定した。その結果、野生型マウスでは 5-FU の投与により

血漿中 5-HT 濃度は有意に上昇し、その上昇率は約 3 倍だった。一方、5-HT_{3A}R 欠損マウスでは 5-FU を投与しても血漿中 5-HT 濃度の増加は認められなかった。

これらの結果より、5-FU 誘発性アポトーシスに関与する 5-HT₃R シグナルの標的細胞は免疫細胞ではないことが示唆された。5-HT_{3A}R は神経細胞および EC 細胞に発現しており、標的細胞はこのどちらかと考えられたが、*in vivo* による血漿中 5-HT 濃度が野生型マウスで有意に上昇したのに対し、5-HT_{3A}R 欠損マウスでは変動しないことから、EC 細胞が 5-FU 誘発性アポトーシスに関与する 5-HT₃R シグナルの標的細胞であり、5-FU による 5-HT 放出を促進している可能性が示唆された。ただし、小腸オルガノイドでの実験結果から、5-HT_{3A}R を発現する EC 細胞自体は、5-FU による IEC アポトーシスを直接的に誘導しないと考えられた。

【考察】

5-HT₃R 阻害薬の抗炎症作用は、これまで免疫細胞に発現する 5-HT₃R を介した炎症性サイトカイン産生の抑制によると考えられてきたが、本研究において、骨髄移植を用いた機能的評価および 5-HT_{3A}R-EGFP レポーターマウスを用いた形態学的評価の両側面から、その可能性は低いと考えられた。また EC 細胞に 5-HT_{3A}R が発現していることを 5-HT_{3A}R-EGFP レポーターマウスを用いて形態学的に証明した。さらに、血漿中 5-HT 濃度の測定により、5-HT₃R シグナルの活性化が 5-FU による 5-HT 放出を増強する可能性が示唆された。本研究では、上昇した血漿中 5-HT がどのような機序で IEC のアポトーシスを増強するのか、その分子機構までは明らかにできなかった。しかし、5-HT が炎症を促進するといういくつかの報告から、炎症性サイトカインの産生を介していると考えられた。

以上を要するに、5-FU によって刺激を受けた EC 細胞は 5-HT を放出し、放出された 5-HT が EC 細胞上の 5-HT₃R にオートクラインまたはパラクラインとして働き、5-HT 放出をさらに増強し、血漿中 5-HT 濃度を上昇させる。この増加した 5-HT が免疫細胞や神経細胞

の 5-HT 受容体 (但し、免疫細胞においては 5-HT_{3A}R を除く)、またはセロトニントランスポーター (SERT) を介して免疫反応を活性化し、炎症性サイトカインの産生が促進され、アポトーシスが增強されると考えられた。以上の機構により、5-HT₃R シグナルの活性化は間接的に 5-FU 誘発性アポトーシスを增強すると考えられた。更なる研究でこのメカニズムがより詳細に解明されれば、5-HT₃R 阻害薬は様々な炎症性疾患に対する抗炎症・抗アポトーシス治療薬としての適応拡大につながる可能性が考えられた。

【第1章 緒言】

1-1 制吐剤と抗炎症

嘔吐は様々な要因により、嘔吐中枢(VC)が刺激されることで生じる。そのため嘔吐を防ぐために、VC や VC へ伝わる神経の活性化を阻害することを目的に制吐剤が用いられる[1]。代表的な制吐剤として、セロトニン 3 受容体 (5-HT₃R) 阻害薬、ニューロキニン 1 受容体 (NK₁R) 阻害薬、ドパミン受容体阻害薬、ヒスタミン 1 受容体などが用いられているが、近年いくつかの制吐剤に抗炎症作用があるのではないかとということが示唆されている[2-8]。中でも 5-HT₃R 阻害薬に関する報告が多く、本研究では 5-HT₃R 阻害薬に着目し検討を行った。

1-2 セロトニン 3 受容体 (5-HT₃R)

5-HT 受容体は 1 型~7 型のサブファミリーからなり、さらにいくつかのサブタイプが存在する。5-HT 受容体は 5-HT₃R を除いてすべてが G タンパク質共役受容体であるが、5-HT₃R は Na⁺、K⁺、Ca⁺⁺を透過するカチオンチャネルを形成するイオンチャネル型受容体であり[9]、受容体の活性化によってイオンの流入を生じる (5-HT₃R シグナル)。5-HT₃R は五つのサブユニットによって形成される五量体構造で、サブユニットには 5-HT_{3A}R~5-HT_{3E}R の 5 種類が存在する。しかし単独で機能的なチャネルを構成できるのは 5-HT_{3A}R のみである[10]。5-HT₃R は末梢神経と中枢神経の両方に存在している。末梢神経では腸管に広く分布しており、腸の運動や分泌、知覚神経の活性化などに関与している[10-12]。中枢神経では脳の様々な部位に発現しており[13]、特に脳幹の化学受容器引き金帯 (CTZ) や嘔吐中枢 (VC) において嘔吐反応に重要な役割を果たしている[10]。そのため 5-HT₃R 阻害薬は制吐剤として臨床で広く用いられている[14, 15]。

In vitro の研究では、5-HT₃R が単球や T-cell といった免疫細胞に発現していることが示唆

されている[8, 16]。これをもとにいくつかの報告では、これらの細胞において 5-HT₃R 阻害薬がインターロイキン 1 β (IL-1 β)、IL-6、腫瘍壊死因子 α (TNF- α)、インターフェロン γ (INF- γ)、ならびに誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) などの各種炎症メディエーターの産生を直接抑制することで抗炎症作用を発揮する可能性が示唆されているが[4, 6, 8]、その詳しいメカニズムは明らかになっていない。

1-3 セロトニンと炎症

5-Hydroxytryptamine (serotonin, 5-HT) は、中枢神経系の神経伝達物質として働くモノアミンの一種で、脳機能の調節において重要な役割を果たしているが、生体内の約 95%は末梢に存在し、そのほとんどが腸管に存在している[17, 18]。生体内の 5-HT は必須アミノ酸である L-トリプトファンからトリプトファン水酸化酵素 (tryptophan hydroxylase, TPH) という酵素によって合成される[18]。TPH には TPH1 と TPH2 の二種類のアイソフォームが存在し、TPH1 が末梢で、TPH2 が中枢での 5-HT 合成に関与する。TPH1 を含有し、末梢での 5-HT 合成を担っているのが腸クロム親和性細胞 (enterochromaffin cell, EC 細胞) である[17]。TPH1 欠損マウスでは中枢におけるセロトニン濃度は正常だが、末梢血中のセロトニン濃度は約 95%低下する[19, 20]。

近年 TPH1 欠損マウスを用いて、デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘発性腸炎の評価を行った研究で、野生型マウスに比べ TPH1 欠損マウスで炎症が抑制されることが明らかになった[20]。この研究によって、5-HT が腸管の炎症において重要な役割を果たしていることが示唆され、その後、各 5-HT 受容体を標的とした腸炎に関する研究が行われるようになった。特にセロトニン 3 型受容体 (5-HT₃R) 阻害薬を用いた研究が数多くあり、5-HT₃R 阻害薬の投与が、術後イレウス[4]、酢酸誘発性大腸炎[5]、DSS 誘発性腸炎[6]、膵炎[7]、5-FU 誘発粘膜炎[8]などを改善したという報告がある。またセロトニン 7 型受容体 (5-HT₇R) を欠損したマウスでは DSS 誘発性腸炎が改善したという報告もある[21]。これらの結果は 5-

HT が存在しない、またはある特定の 5-HT 受容体を阻害することで腸炎が改善するということを示している。しかし一方で、セロトニン 4 型受容体 (5-HT₄R) の作動薬の投与が DSS 誘発性腸炎を改善し、5-HT₄R を欠損したマウスではその作用が消失することを報告する研究も存在する[22]。これは 5-HT が 5-HT₄R を介して逆に腸を保護する作用を有することを示唆している。このように 5-HT と炎症との関連は疾患モデルや、5-HT 受容体のサブタイプにより作用が異なる可能性が高く、統一した見解に至っていないのが現状である。

1-4 ドラッグリポジショニング

ドラッグリポジショニングとは既存の医薬品が有する未知の薬効を発見し、別の疾患に適応を拡大するという試みである (図 1)。新薬が作られるまでには、開発候補化合物を選択する基礎研究の後、有効性・安全性を確認する前臨床試験、投与量や副作用を検討する臨床試験を経て、初めて承認・上市される。そのため開発から上市までには 10 年以上の時間がかかり、また開発費も数百億円に上ることもある。しかし、既に上市されている医薬品であれば、安全性や体内動態が明らかになっているため、速やかにかつ安価に異なる疾患治療に応用できるという利点がある。5-HT₃R 阻害薬は現在、制吐剤および過敏性腸症候群の治療薬として上市されている。そのため、5-HT₃R 阻害薬の抗炎症作用について詳細なメカニズムが明らかとなれば、新たに抗炎症薬としてのドラッグリポジショニングに寄与することができ、臨床的意義も高いと考えられる。

1-5 5-フルオロウラシル誘発性小腸上皮アポトーシス

本研究では 5-フルオロウラシル (5-fluorouracil, 5-FU) による小腸上皮アポトーシスモデルを用いて、検討を行った。5-FU は代謝拮抗薬に分類される抗悪性腫瘍薬の一つで、RNA および DNA の合成を阻害することで抗癌作用を発揮する[23]。しかしそのため、分裂増殖が盛んな腸管上皮細胞 (IEC) も傷害してしまい、アポトーシスを引き起こすことが知られ

ている[24]。5-FUによる化学療法を受けた患者の50~80%に下痢が、25~45%に悪心・嘔吐が見られることが報告されている[25, 26]。5-FUによる下痢は腸陰窩のアポトーシスによる絨毛長の短縮が、腸管腔内の表面積の低下に伴う水分吸収量の低下を引き起こすために生じると考えられている[27, 28]。また化学療法に伴う嘔吐は、一般的に腸管のEC細胞から5-HTが放出され、その5-HTが求心性神経の5-HT₃RおよびCTZ・VCの5-HT₃Rに作用することで引き起こされると考えられている[10, 29, 30]。このような副作用を抑える目的で、5-HT₃R阻害薬が制吐剤として、化学療法とともに使用されている[31]。近年、5-HT₃R阻害薬の投与が炎症性サイトカインの産生を抑制し、5-FUによるアポトーシスを改善したという報告があるが[8]、その詳しいメカニズムは不明である。

1-6 炎症とアポトーシス

アポトーシスは様々なシグナルによって制御されているが、大きく二つの経路が存在する[32]。一つは放射線障害や化学療法などのDNA障害によるミトコンドリアを介した内部経路と、もう一つはTNF- α など炎症性サイトカインがデスレセプターを介する外部経路である(図2)。どちらの経路も最終的に細胞質内に存在するカスパーゼ3を活性化することで、アポトーシスを引き起こす。5-FUによる小腸上皮アポトーシスは、その作用機序から内部経路を介するものと考えられるが、以前の研究では5-HT₃R阻害薬が炎症性サイトカインの産生を抑えることで外部経路を抑制し、抗アポトーシス作用を示していると報告している[8]。炎症とアポトーシスは厳密には異なる現象だが、後者のデスレセプターを介する経路では炎症性サイトカインがアポトーシスを引き起こすため、5-HT₃R阻害薬による5-FU小腸上皮アポトーシスの抑制作用機序の解明は、5-HT₃R阻害薬の抗炎症作用について詳細なメカニズムの解明にも一助となる可能性がある。

1-7 目的

本研究では、制吐剤である 5-HT₃R 阻害薬による 5-FU 誘発小腸上皮アポトーシス抑制作用機序を解明するために、①5-FU 誘発性アポトーシスに対する 5-HT₃R シグナルの影響を解明し (3 章)、②5-FU 誘発小腸上皮アポトーシス抑制作用を示す 5-HT₃R シグナルの標的細胞を探索する (4, 5, 6 章) ことを目的とした。

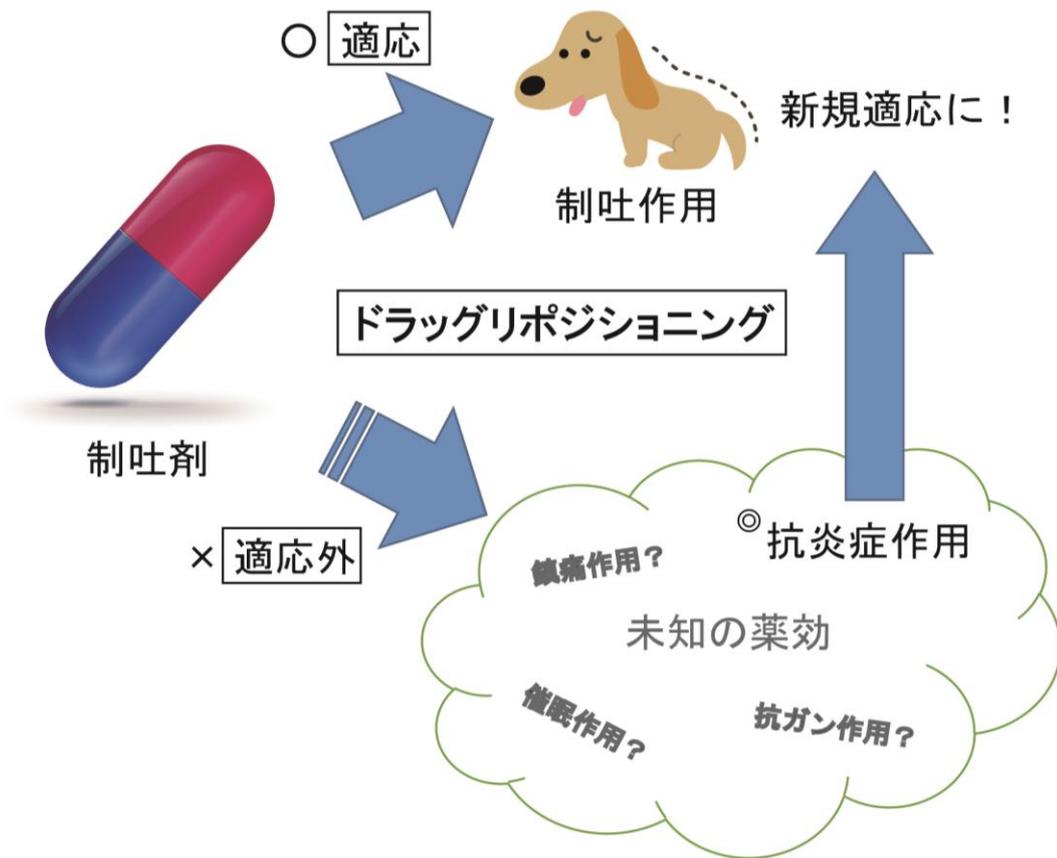


図 1. ドラッグリポジショニング概要

既に上市されている薬剤の未知の薬効を見つけ出すことで、その薬剤の適応疾患を拡張することができる。

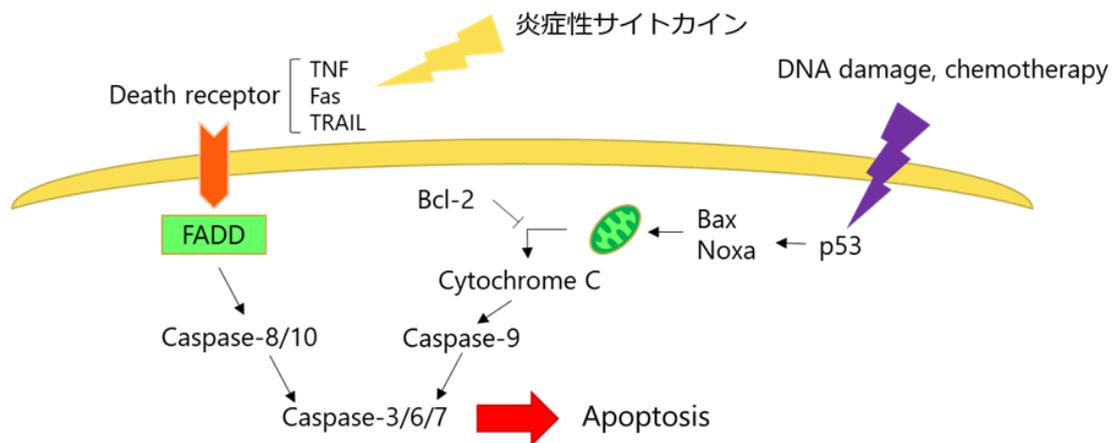


図 2. アポトーシス経路

アポトーシス経路には DNA 障害によるミトコンドリアを介する内部経路 (右側) と、炎症性サイトカインがデスレセプターを介する内部経路 (左側) の大きく二つが存在する。どちらの経路も最終的にカスパーゼ 3 の活性化によってアポトーシスを引き起こす。

【第2章 実験材料及び実験方法】

2-1 実験動物

実験には、野生型マウスとして C57BL/6J マウス (WT ; SLC 株式会社、静岡) を用いた。また遺伝子改変動物として C57BL/6J マウスを背景に持つ、5-HT_{3A}R ノックアウトマウス (5-HT_{3A}R-KO ; Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, USA)、Tg(CAG-EGFP)マウス (GFP ; SLC 株式会社、静岡)、そして 5-HT_{3A}R-EGFP レポーターマウス (5-HT_{3A}R-EGFP ; Mutant Mouse Regional Resource Center, University of California, Davis, CA, USA) を用いた。すべてのマウスは 8-12 週齢の雄を用い、標準的なケージ内で自由摂食、飲水の条件下で飼育し、飼育室の明暗周期は 12 時間毎とした。動物の扱いは東京大学動物実験実施マニュアルに従い、すべての実験は東京大学農学生命科学研究科動物実験委員会の実験動物計画書の承認を得て実施した。

2-2 小腸上皮アポトーシスモデル

小腸上皮アポトーシスモデルはマウスに 5-FU (5 mg/mL, 50 mg/kg ; 和光純薬工業株式会社、大阪) を腹腔内投与 [i.p.] することで作製した。マウスは、5-HT_{3R} 阻害薬であるトロピセトロン (1 mg/mL, 5 mg/kg, 経口投与 [p.o.] ; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA) またはオンダンセトロン (1 mg/mL, 5 mg/kg, p.o. ; Sigma-Aldrich, Inc., St Louis, MO, USA)、5-HT_{3R} 作動薬である 1-(3-Chlorophenyl)biguanide hydrochloride (m-CPBG, 0.6 mg/mL, 3 mg/kg, i.p. ; Sigma-Aldrich)、あるいは $\alpha 7$ ニコチン性アセチルコリン受容体 ($\alpha 7$ nAChR) 作動薬である PNU-282987 (1 mg/mL, 5 mg/kg, i.p. ; Sigma-Aldrich) を、5-FU 投与の 30 分前および 6 時間後に投与された。すべての試薬は生理食塩水を溶媒として用い、対照群には生理食塩水を投与した。

2-3 アポトーシスの評価

5-FU 投与の 24 時間後、マウスを犠死し小腸上皮のアポトーシスを評価した。マウスから小腸を摘出し、十二指腸、空腸、回腸の 3 部位を 10% 中性緩衝ホルマリン液 (和光純薬工業株式会社) で固定した。サンプルはパラフィン包埋の後、回転式マイクローム (大和光機工業株式会社、埼玉) を用い短軸横断面で 4 μm に薄切した。組織切片は 0.01 M クエン酸緩衝液 (pH 6.0) 中で、95~100°C、30 分煮沸することで再賦活化を行った。空冷の後、0.3% 過酸化水素を含むメタノールで室温 30 分処理し、内因性ペルオキシダーゼを不活化した。その後、0.2% Nonidet P-40 および 3% ウシ血清アルブミン (BSA) を含む Tris 緩衝生理食塩水 (TBS) で室温 10 分間の脱膜化処理、3% BSA 含有 TBS で室温 30 分間のブロッキング処理を行った。切片を 1 次抗体であるウサギ由来抗活性型カスパーゼ 3 抗体 (1:150, No. #9664 ; Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA) で 37°C 16 時間インキュベートし、2 次抗体はビオチン化抗ウサギ IgG 抗体 (1:300, No. BA-1000 ; Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA) で室温 1 時間インキュベートした。発色にはアビジン-ビオチン複合体法 (VECTASTAIN Elite ABC Kit, Vector Laboratories, Inc.) および DAB (同仁化学研究所、熊本) を用いた。ヘマトキシリンで対比染色を行い、光学顕微鏡下 (Nikon Optiphot-2 Microscopes with ACT-1C software for the DXM1200C digital camera ; 株式会社ニコン、東京) で、活性型カスパーゼ 3 陽性細胞の数を計測した。陽性細胞は、同一サンプルから 2 切片計測し、腸管横断面上の数を平均して用いた。

2-4 骨髄移植

7 週齢の WT および 5-HT_{3A}R-KO ドナーマウスから上腕骨、大腿骨、脛骨を採取し、内腔を還流することで骨髄細胞を採取した。同じく 7 週齢の WT および 5-HT_{3A}R-KO レシピエントマウスは、9.0 Gy の X 線照射により骨髄細胞を焼灼し、8~10 時間以内に 2.0×10^6 個の骨髄細胞を懸濁した 200 μL の 100 U/mL ペニシリンおよび 100 $\mu\text{g/mL}$ ストレプトマイシ

ン (PS ; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) 含有 RPMI (Sigma-Aldrich) をマウスの眼窩静脈叢より投与した[33]。骨髄移植の 5 週間後、マウスに 5-FU を投与し、アポトーシスを評価した。

2-5 フローサイトメトリー (FACS)

骨髄移植による免疫細胞置換率を検討するために、骨髄移植を行ったマウスの末梢血と腸管細胞を用いて FACS を実施した。末梢血は骨髄移植後の 1 週間毎にマウスの眼窩静脈叢より毛細ガラス管で採血し、ヘパリンで抗凝固処理を行った。腸管細胞は、骨髄移植後 5 週間後にマウスから小腸を摘出し、内容物をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) でフラッシュした後、1.5 cm 片に細断して 5% ウシ胎児血清 (FBS) および 2 mM EDTA を含んだ Ca^{++} , Mg^{++} フリーの Hank's 平衡塩溶液 (CMF-HBSS) に入れ、37°C で 20 分間 250 rpm で水平に攪拌した。同様の操作を 2 回行った後、1.5 mg/mL コラゲナーゼタイプ II (Worthington Biochemical Corporation., Lakewood, NJ, USA)、40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DNase I (Roche Diagnostics 株式会社、東京) を含んだ 5% FBS/CMF-HBSS で 37°C 15 分 200 rpm で水平に攪拌した。100 μm セルストレーナーを通し、4°C 5 分 1500 rpm で遠心分離した後 5% FBS/CMF-HBSS による洗浄を 2 回行った。上清を捨て、5% FBS/PBS に懸濁し、1.5 mL チューブに分注し、抗体を反応させた。抗体は、PE-Cyanine7 標識抗 CD45 抗体 (1 h, 1:130, No.25-0451-82 ; Thermo Fisher Scientific) および 7-ADD (10 min, 1:20, No.559925 ; BD Biosciences Japan, 東京) を用いた。2 mM EDTA/PBS で 2 回洗浄し、30 μm メッシュを通した後、BD FACSVerser™ (BD Biosciences Japan) を用いて FACS を実施した。デブリの識別のため前方散乱光 (FSC) および側方散乱光 (SSC) によるゲーティングを行った後、各蛍光でのゲーティングを実施した。ゲーティングはネガティブコントロールとポジティブコントロールを用いて実施した。最終ゲートに該当する細胞数が 1.0×10^5 個になるまで測定を行い、その割合を求めた。

2-6 小腸クリプトの単離およびオルガノイドの培養

小腸クリプトの採取とオルガノイドの培養は、以前の報告の方法[34]に独自の改良を用いて行った。WT、5-HT_{3A}R-KO および 5-HT_{3A}R-EGFP マウスから小腸を摘出し、長軸方向に切開し、PS 含有氷冷 PBS 中で内容物を洗浄した。組織を 5 mm 程度に細断し、10 mL の PBS を含んだ 50 mL チューブに集め、10 mL ピペットで上下させることで洗浄を行った。2~3 回の洗浄後、上清を捨て、2 mM EDTA を含んだ PBS を 25 mL 加え、氷上で 45 分間振盪した。その後上清を捨て、再び PBS で上清が透明になるまで洗浄を繰り返した。クリプトを基底膜から分離するため、10 mL の PBS を含んだチューブを激しく攪拌し、上清を 70 μ m のセルストレーナーで濾すことで絨毛を除いた。クリプトは 200 \times g で 4 $^{\circ}$ C 5 分遠心分離し、PBS による洗浄を 2~3 回行った。その後、Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12 ; Sigma-Aldrich) 培地で懸濁し、クリプト数を計測した。200 個のクリプトをマウス腸管オルガノイド用培地 (IntestiCultTM Organoid Growth Medium, Stemcell Technologies, Inc., Vancouver, Canada) とマトリゲル (Corning Incorporated, Corning, NY, USA) を等量混合したもので懸濁し、予め 37 $^{\circ}$ C に保温したプレートに、96 ウェルプレートでは 7 μ L、24 ウェルプレートでは 50 μ L をドーム状になるように播種した。37 $^{\circ}$ C で 15 分インキュベートした後、マウス腸管オルガノイド用培地を 96 ウェルプレートでは 70 μ L、24 ウェルプレートでは 150 μ L 加えた。単細胞の生存率を上昇させるために、10 μ M Y-27632 (和光純薬工業株式会社) を始めの 3 日間加えた。培地は 3 日毎に交換した。

2-7 免疫蛍光染色

マウスから小腸を摘出し、内腔を還流することで内容物を除去した。サンプルは 4% パラフォルムアルデヒド (PFA) に浸漬し、4 $^{\circ}$ C で一晚固定した。サンプルを水洗し、10%、20% および 30% のスクロース含有 PBS で 2 時間毎に置換し、Tissue-Tek O.C.T. コンパウンド (サクラファインテックジャパン株式会社、東京) で包埋した。サンプルは 10 μ m で薄

切し、PBS で洗浄後、上述と同様に脱膜化およびブロッキング処理を行った。1 次抗体は、ウサギ由来抗 GFP 抗体 (1:500, No. A11122 ; Thermo Fisher Scientific)、ニワトリ由来抗 GFP 抗体 (1:500, No. ab13970 ; Abcam, Cambridge, UK)、ラット由来抗 CD68 抗体 (1:250, No. MCA1957 ; Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA)、ウサギ由来抗 PGP9.5 抗体 (1:250, No. ADI-905-520-1 ; Enzo Life Sciences, Inc., Farmingdale, NY, USA)、あるいはマウス由来抗 5-HT 抗体 (1:100, No. M0758 ; Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA) を用い、3% BSA とともに 4°C で一晩インキュベートした。2 次抗体には、Alexa Fluor 488 標識ロバ由来抗ウサギ IgG 抗体 (1:1000, No. A21206 ; Thermo Fisher Scientific)、Alexa Fluor 488 標識ヤギ由来抗ニワトリ IgG 抗体 (1:1000, No. A11039 ; Thermo Fisher Scientific)、Alexa Fluor 594 標識ヤギ由来抗ラット IgG 抗体 (1:1000, No. A11007 ; Thermo Fisher Scientific)、Alexa Fluor 594 標識ロバ由来抗ウサギ IgG 抗体 (1:1000, No. A21207 ; Thermo Fisher Scientific)、あるいは Alexa Fluor 568 標識ヤギ由来抗マウス IgG 抗体 (1:1000, No. A11004 ; Thermo Fisher Scientific) を用い、室温で 1 時間インキュベートした。核染色には 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI ; Sigma-Aldrich) を用いた。

オルガノイドのホールマウント染色は Tuveson lab (Cold Spring Harbor Laboratory, Long Island, NY, USA) のプロトコールを基に実施した[35]。オルガノイドは 8 ウェルチャンバシステム (No. 177445 ; Thermo Fisher Scientific) のスライドに 3 日間培養した。2% PFA 含有 PBS で室温で 20 分間固定し、その後 PBS/グリシン溶液 (130 mM NaCl, 13.2 mM Na_2HPO_4 , 2.6 mM NaH_2PO_4 , 100 mM glycine, pH 7.4) および蛍光染色洗浄液 (130 mM NaCl, 13.2 mM Na_2HPO_4 , 3.6 mM NaH_2PO_4 , 0.05% sodium azide, 0.1% BSA, 0.2% Triton-X-100, 0.005% Tween-20, pH 7.4) で洗浄した。ブロッキングには 3% BSA を用い、1 次抗体および 2 次抗体は上述の通り反応させた。対比染色として、DAPI および Alexa Fluor 594 標識抗フアロイジン抗体 (1:200, No. A12381 ; Thermo Fisher Scientific) を用いた。

蛍光染色サンプルは共焦点蛍光顕微鏡 (ECLIPSE Ti-E Confocal Microscope with EZ-C1 software ; 株式会社ニコン、および LSM 700 Confocal Microscope with ZEN software ; Carl Zeiss AG., Oberkochen, Germany) を用いて観察した。

2-8 オルガノイド細胞死誘導実験

オルガノイドを用いた細胞死誘導実験は以前の報告と同様に行った[36]。マウスからクリプトを採取し、オルガノイドを培養して3日目に5-FUを培地に加え培養することで、オルガノイドの細胞死を誘導した。5-FU添加の2日後に光学顕微鏡 (TS100 Inverted Microscope with DS-Fi2 ; 株式会社ニコン) を用いて、発芽の有無および生死を形態学的に評価した。オルガノイドは“Ⓐ：発芽ありかつ生存”、“Ⓑ：発芽なしかつ生存”、“Ⓒ：死亡”に分類し、オルガノイド死亡率 = $\text{Ⓒ} / (\text{Ⓐ} + \text{Ⓑ} + \text{Ⓒ})$ 、発芽率 = $\text{Ⓐ} / (\text{Ⓐ} + \text{Ⓑ})$ として求めた。より初期の死亡率を比較するために、MTTアッセイを実施した。96ウェルプレートに培養した1日後のオルガノイドに5-FUを添加し、細胞死を誘導した。標準化のために5-FU添加と同時に1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ calcein-AM (Thermo Fisher Scientific) を加え、1時間後に485 nm 励起時の535 nm 蛍光量をマルチプレートリーダー (Wallac 1420 ARVO SX multilabel counter, Perkin-Elmer Co., Ltd., Rodgau, Germany) で測定した。5-FU添加の2日後、培地を除去し、MTT溶液 (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide ; Sigma-Aldrich) を最終濃度500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ になるように加えたDMEM/F12培地で、37°Cで3時間、5% CO₂ 下でインキュベートした。培地を除去後、20 μL の2% SDSを加え、37°Cで2時間インキュベートし、マトリゲルを溶解させた。その後、ホルマザン色素を溶解させるために、100 μL のジメチルスルホキシドを加え、37°Cで1時間振盪した。プレートはマルチプレートリーダーを用い、490 nm の吸光度を測定した。すべての吸光度は対応するウェルのcalcein-AMの蛍光量で標準化した。対照群として生理食塩水を添加したウェルを100%生存とし、その割合から細胞死亡率を算出した。

2-9 血漿 5-HT 濃度測定

5-FU を投与してから 24 時間後の WT および 5-HT_{3A}R-KO マウスから採血を行った。溶血を防ぐために、マウスは 50 mg/kg ペントバルビタールによる深麻酔下で、ヘパリンを通した毛細ガラス管を用いて、眼窩静脈叢から採血を行った。採取した血液は、0.1% EDTA-Na (同仁化学研究所) で抗凝固処理を行い、1000×g で 4°C 15 分遠心分離した。血漿を分注し、測定まで -80°C で保存した。5-HT 濃度の測定には酵素免疫法を用いた (No. EIA IM1749 ; Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA)。

2-10 統計処理

実験成績は平均±標準誤差 (SEM) で示した。2 群間検定には Student's *t*-検定を用い、3 群以上の平均値の比較には、one-way analysis of variance (ANOVA) を用いた後、Tukey's 検定で群間比較を行った。*P* 値が 0.05 未満の場合を統計学的有意とみなした。統計解析には、統計ソフト EZR on R commander (Ver. 1.24、自治医科大学附属さいたま医療センター、埼玉) を用いた[37]。

【第3章 5-FU 誘発性アポトーシスに対する 5-HT₃R シグナルの影響】

3-1 目的

5-HT₃R 阻害薬による 5-FU 誘発小腸上皮アポトーシス抑制作用機序をより詳細に解明するために、各種薬剤を用い 5-FU 誘発小腸上皮アポトーシスに対する 5-HT₃R シグナルの影響を明らかにすることを目的とした。

3-2 実験成績

3-2-1 5-HT₃R 阻害薬の影響

初めに、5-HT₃R 阻害薬が 5-FU 誘発小腸上皮アポトーシスを抑制するかを確かめるために、5-HT₃R 阻害薬であるトロピセトロン (1 mg/mL, 5 mg/kg, p.o.) またはオンダンセトロン (1 mg/mL, 5 mg/kg, p.o.) を 5-FU (5 mg/mL, 50 mg/kg, i.p.) 投与の 30 分前および 6 時間後に投与した。まず、対照群として生理食塩水を投与したマウスでは、腸陰窩にアポトーシス細胞はほとんど確認されなかった (図 3A)。次に 5-FU の投与は、腸陰窩の IEC にアポトーシスを引き起こした (黒矢頭、図 3A)。5-HT₃R 阻害薬であるトロピセトロンまたはオンダンセトロンの併用投与は、5-FU 誘発性アポトーシスを減少させる傾向があった (図 3A および B)。特にオンダンセトロンの併用投与は十二指腸と空腸で、5-FU 単独投与に比べ有意にアポトーシス細胞の数が減少した (十二指腸 ; Control : 1.1 ± 0.4 cells/slice, 5-FU : 87.0 ± 13.0 cells/slice, 5-FU+Tropisetron : 60.8 ± 14.1 cells/slice, 5-FU+Ondansetron : 40.9 ± 8.1 cells/slice、空腸 ; Control : 0.5 ± 0.2 cells/slice, 5-FU : 65.5 ± 15.5 cells/slice, 5-FU+Tropisetron : 51.0 ± 8.8 cells/slice, 5-FU+Ondansetron : 26.9 ± 5.0 cells/slice、回腸 ; Control : 0.4 ± 0.2 cells/slice, 5-FU : 43.9 ± 11.6 cells/slice, 5-FU+Tropisetron : 23.3 ± 5.1, 5-FU+Ondansetron : 24.1 ± 5.8 cells/slice、n=13)。

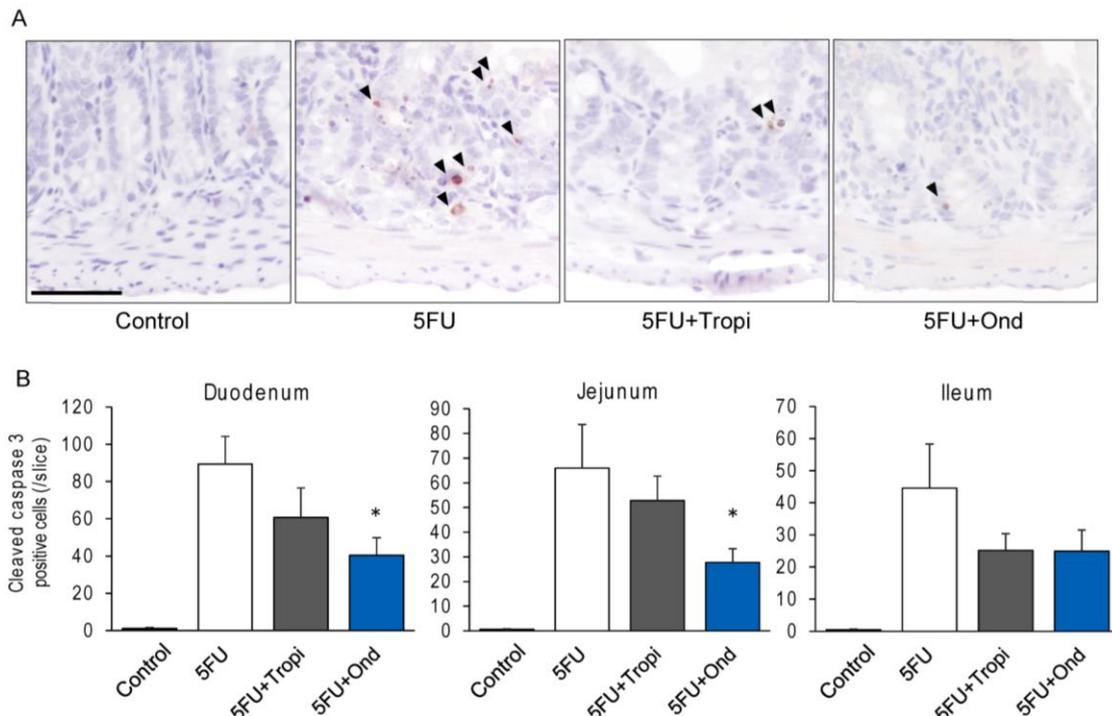


図 3. 5-HT₃R 阻害薬の 5-FU 誘発性アポトーシスに対する影響

A) 空腸における活性型カスパーゼ 3 陽性細胞の典型写真。アポトーシスを起こしている細胞が茶褐色に染色されている (黒矢頭)。スケールバーは 50 μm を示す。

B) 横断面切片における活性型カスパーゼ 3 陽性細胞数の定量図。5-HT₃R 阻害薬であるトロピセトロンまたはオンダンセトロンの併用投与は、5-FU 誘発性アポトーシスを減少させる傾向があった。データは平均 \pm SEM (n=13)。* $p < 0.05$ vs. 5FU。

Control ; 対照群、Tropi ; トロピセトロン、Ond ; オンダンセトロン。

3-2-2 $\alpha 7$ nAChR 作動薬の影響

トロピセトロンは $\alpha 7$ nAChR の部分作動薬として働くことが知られている[38]。そこで、5-HT₃R 阻害薬の抗アポトーシス作用が $\alpha 7$ nAChR と関連しているかを明らかにするために、 $\alpha 7$ nAChR 作動薬である PNU-282987 (1 mg/mL, 5 mg/kg, i.p.) を 5-FU (5 mg/mL, 50 mg/kg, i.p.) 投与の 30 分前および 6 時間後に投与し、5-FU 誘発性アポトーシスを評価した。その結果、PNU-282987 を 5-FU と併用投与しても、アポトーシス細胞の数は減少しなかった (図 3A および B)。また、PNU-282987 自身にアポトーシス誘導作用はなかった (十二指腸 ; Control : 2.1 ± 0.5 cells/slice, PNU-282987 : 2.0 ± 1.1 cells/slice, 5-FU : 53.1 ± 10.8 cells/slice, 5-FU+PNU-282987 : 50.8 ± 14.5 cells/slice、空腸 ; Control : 2.0 ± 0.8 cells/slice, PNU-282987 : 1.8 ± 0.5 cells/slice, 5-FU : 71.0 ± 17.5 cells/slice, 5-FU+PNU-282987 : 42.5 ± 10.6 cells/slice、回腸 ; Control : 0.1 ± 0.1 cells/slice, PNU-282987 : 1.1 ± 0.9 cells/slice, 5-FU : 25.2 ± 6.5 , 5-FU+PNU-282987 : 30.2 ± 5.1 cells/slice、n=5)。

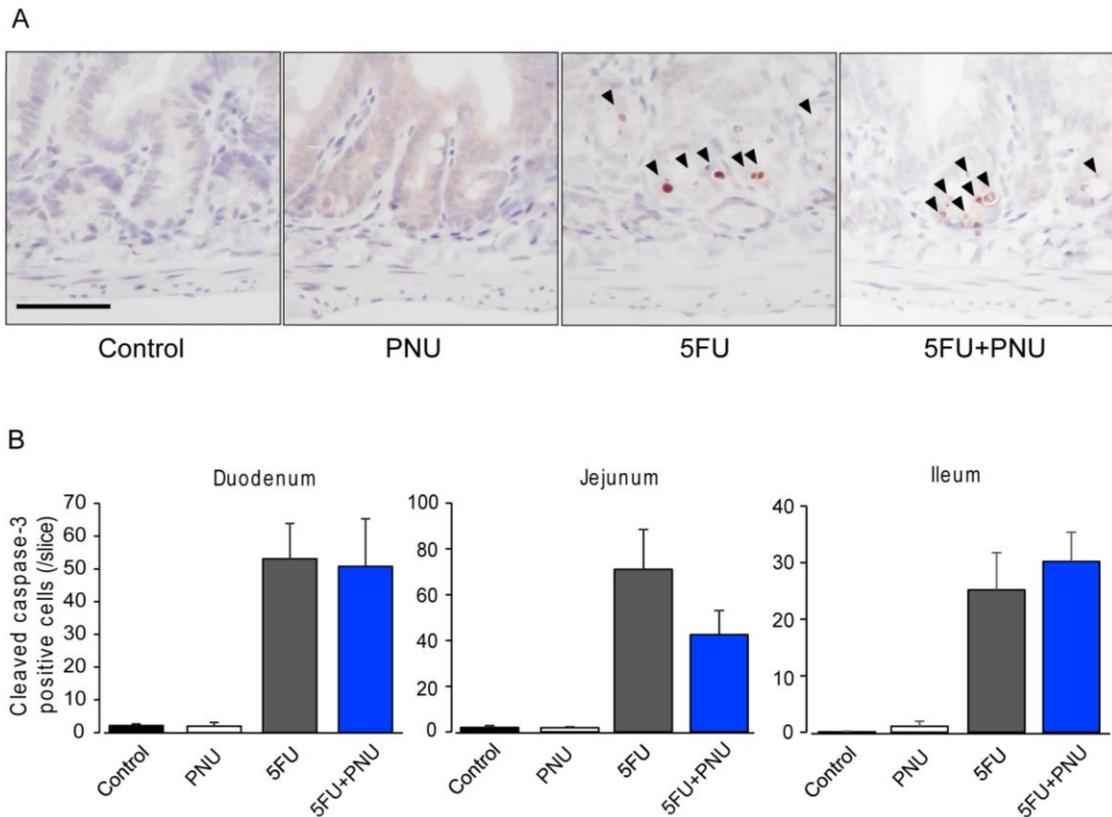


図 4. $\alpha 7nAChR$ 作動薬の 5-FU 誘発性アポトーシスに対する影響

A) 空腸における活性型カスパーゼ 3 陽性細胞の典型写真。アポトーシスを起こしている細胞が茶褐色に染色されている (黒矢頭)。スケールバーは $50 \mu m$ を示す。

B) 横断面切片における活性型カスパーゼ 3 陽性細胞数の定量図。 $\alpha 7nAChR$ 作動薬である PNU-282987 の併用投与は、5-FU 誘発性アポトーシスを減少させなかった。データは平均 \pm SEM (n=5)。

Control ; 対照群、PNU ; PNU-282987。

3-2-3 5-HT₃R 作動薬の影響

次に 5-FU によって誘発される IEC のアポトーシスにおける 5-HT₃R 作動薬である m-CPBG の影響について検討した。m-CPBG (0.6 mg/mL, 3 mg/kg, i.p.) を 5-FU (5 mg/mL, 50 mg/kg, i.p.) 投与の 30 分前および 6 時間後に投与すると、5-FU によるアポトーシス細胞の数が増加する傾向が確認された (図 5A および B)。特に空腸では 5-FU 単独投与に比べ、有意に 5-FU 誘発性アポトーシスが增強された (図 5B)。しかし、m-CPBG の単独投与では腸陰窩の IEC にアポトーシスを引き起こさなかった (十二指腸 ; Control : 1.6 ± 0.5 cells/slice, m-CPBG : 3.0 ± 1.0 cells/slice, 5-FU : 37.6 ± 7.2 cells/slice, 5-FU+m-CPBG : 52.7 ± 15.5 cells/slice、空腸 ; Control : 2.1 ± 0.8 cells/slice, m-CPBG : 3.6 ± 0.5 cells/slice, 5-FU : 19.2 ± 3.0 cells/slice, 5-FU+m-CPBG : 33.4 ± 5.7 cells/slice、回腸 ; Control : 0.8 ± 0.4 cells/slice, m-CPBG : 2.5 ± 1.3 cells/slice, 5-FU : 15.3 ± 5.4 , 5-FU+m-CPBG : 20.7 ± 7.8 cells/slice、n=5)。

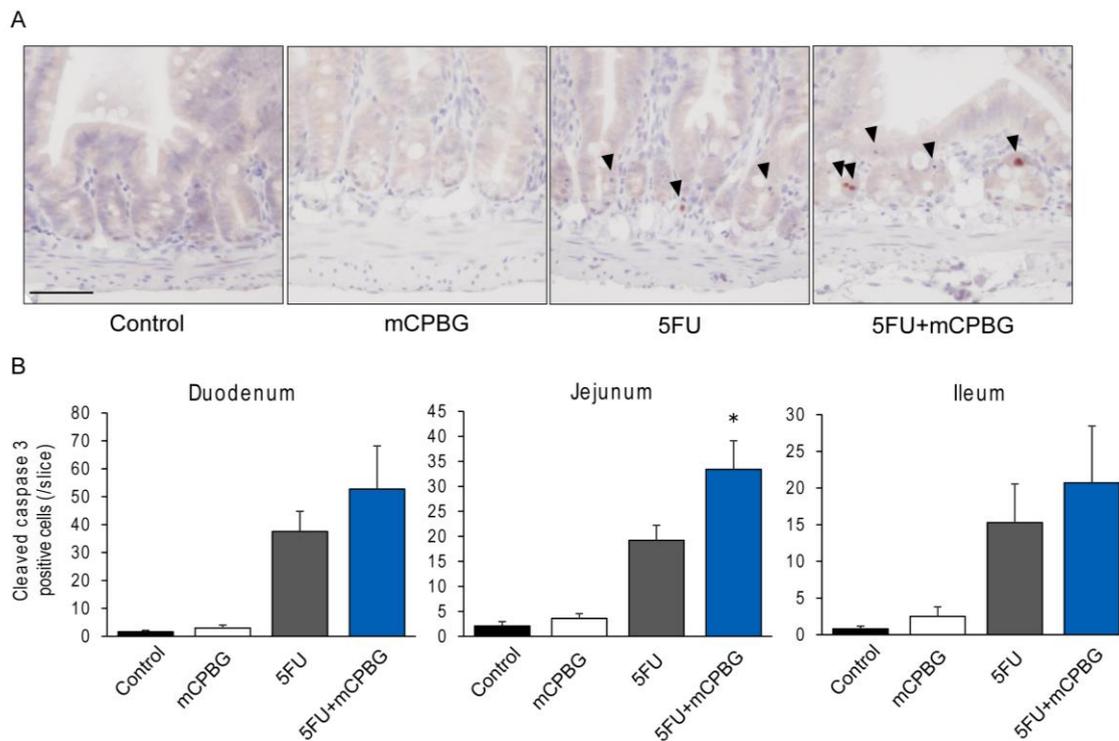


図 5. 5-HT₃R 作動薬の 5-FU 誘発性アポトーシスに対する影響

A) 空腸における活性型カスパーゼ 3 陽性細胞の典型写真。アポトーシスを起こしている細胞が茶褐色に染色されている (黒矢頭)。スケールバーは 50 μm を示す。

B) 横断面切片における活性型カスパーゼ 3 陽性細胞数の定量図。5-HT₃R 作動薬であるト m-CPBG の併用投与は、5-FU 誘発性アポトーシスを増加させる傾向があった。データは平均 \pm SEM (n=5)。* $p < 0.05$ vs. 5FU。

Control ; 対照群、mCPBG ; m-CPBG, 1-(3-Chlorophenyl)biguanide hydrochloride。

3-2-4 5-HT_{3A}R-KO マウスでの影響

次に、WT マウスに 5-HT₃R 阻害薬を投与した時に観察された抗アポトーシス作用と同様の現象が、5-HT_{3A}R-KO マウスにおいて観察されるかを検討した。WT マウスと 5-HT_{3A}R-KO マウスに 5-FU (5 mg/mL, 50 mg/kg, i.p.) を投与し、24 時間後に 5-FU 誘発性アポトーシスを評価した。その結果、WT マウスと比較して、5-HT_{3A}R-KO マウスでは 5-FU によるアポトーシス細胞の数が減少する傾向が見られた (図 6A および B)。特に十二指腸と回腸では有意に減少していた (十二指腸 ; WT-Control : 1.5 ± 0.4 cells/slice, WT-5FU : 67.6 ± 12.4 cells/slice, KO-Control : 2.1 ± 0.7 cells/slice, KO-5FU : 31.3 ± 10.4 cells/slice、空腸 ; WT-Control : 2.8 ± 1.6 cells/slice, WT-5FU : 47.1 ± 15.3 cells/slice, KO-Control : 1.1 ± 0.5 cells/slice, KO-5FU : 22.8 ± 7.1 cells/slice、回腸 ; WT-Control : 3.9 ± 2.1 cells/slice, WT-5FU : 49.5 ± 13.5 cells/slice, KO-Control : 1.1 ± 0.4 cells/slice, KO-5FU : 19.3 ± 3.4 cells/slice、n=9)。

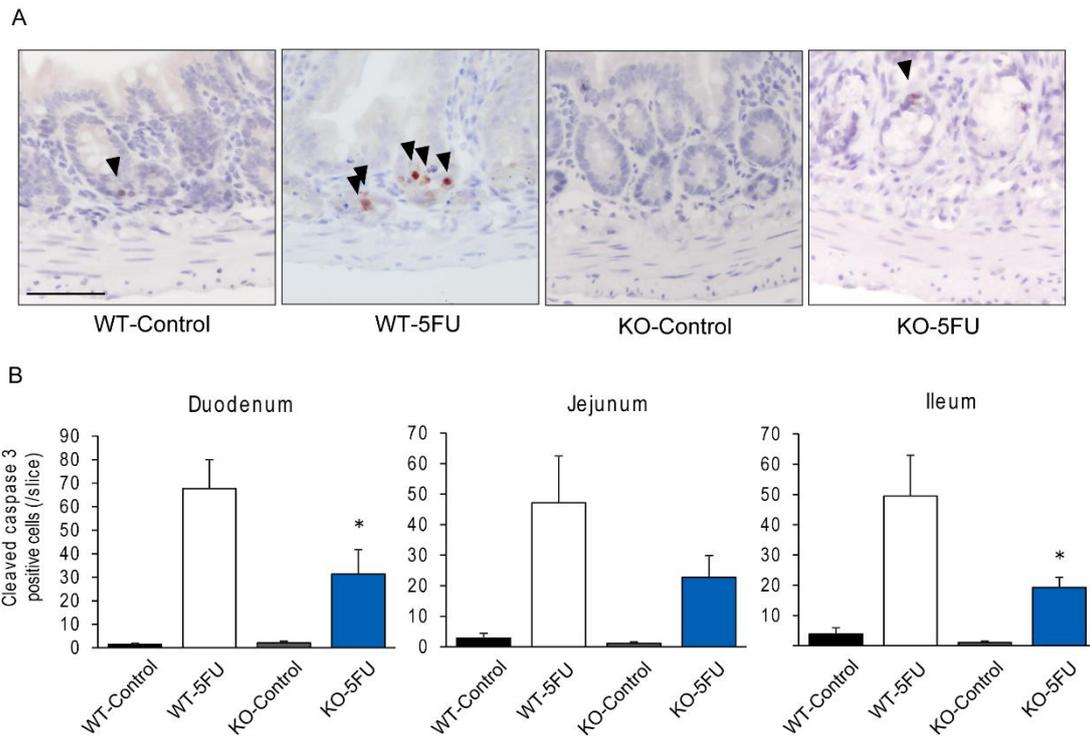


図 6. WT マウスおよび 5-HT_{3A}R-KO マウスにおける 5-FU 誘発性アポトーシスに対する影響の比較

A) 空腸における活性型カスパーゼ 3 陽性細胞の典型写真。アポトーシスを起こしている細胞が茶褐色に染色されている (黒矢頭)。スケールバーは 50 μ m を示す。

B) 横断面切片における活性型カスパーゼ 3 陽性細胞数の定量図。5-HT_{3A}R-KO マウスでは WT マウスに比べ、5-FU 誘発性アポトーシス細胞の数が減少する傾向があった。データは平均 \pm SEM (n=9)。* $p < 0.05$ vs. WT-5FU。

Control ; 対照群、WT ; 野生型マウス、KO ; 5-HT_{3A}R-KO マウス。

3-3 考察

本章では 5-FU 誘発性アポトーシスに対する 5-HT₃R シグナルの影響を明らかにするために、各受容体作動薬および阻害薬を用いて、IEC のアポトーシスを評価した。また、5-HT_{3A}R-KO マウスを用いることで、5-HT₃R シグナルを確実に遮断することで生じる影響も確認した。

2013 年に Yasuda らが、5-HT₃R 阻害薬に 5-FU 誘発性アポトーシスを改善する作用があることを報告している[8]。彼らは 5-HT₃R 阻害薬であるラモセトロンとオンダンセトロンを用い、5-FU 投与による体重減少と下痢が軽減し、その現象が腸陰窩の IEC アポトーシス抑制による絨毛長維持によるものと述べている。彼らは TNF- α や IL-1 β などの炎症性サイトカインの産生が抑制されていること、カスパーゼ 3 および 8 のタンパク発現が抑制されていることから、デスレセプターを介する経路が 5-HT₃R 阻害薬の抗アポトーシス作用に関与していると考察している。5-HT₃R 阻害薬が炎症性サイトカインの産生を抑制するという報告は 2004 年頃から報告されている。Fiebich らはヒト単球を用いた *in vitro* 実験で初めてトロピセトロンとオンダンセトロンが炎症性サイトカインの産生を抑制することを明らかにした[16]。その後、*in vivo* 実験で 5-HT₃R 阻害薬の抗炎症作用を示す結果が 2009 年頃から報告されている[5]。しかしこれらの報告では炎症性サイトカインの産生が抑制される詳しいメカニズムは不明のままであり、また 5-HT₃R 阻害薬の標的となっている細胞は明らかにできていない。さらに、トロピセトロンには α 7nAChR の部分作動薬としての作用があることが明らかになった[38]。 α 7nAChR 作動薬には抗炎症作用があることが知られており[39]、いくつかの報告ではトロピセトロンの抗炎症作用は α 7nAChR シグナルを介して示されていると結論付けている[40, 41]。しかし、オンダンセトロンには α 7nAChR の部分作動薬としての作用はないことが証明されており[42]、ほかの 5-HT₃R 阻害薬も α 7nAChR 作動薬として働くアザビシクロ環構造を持っていないことから[43]、5-HT₃R シグナルが抗炎症作用に関与しているのは間違いないと考えられる。今回の結果では、オンダンセトロ

ンが 5-FU 誘発性アポトーシスを抑制したのに対し、 $\alpha 7nAChR$ 作動薬である PNU-282987 は抗アポトーシス作用を示さなかった。さらに、5-HT_{3R} 作動薬である m-CPBG の投与は 5-FU 誘発性アポトーシスを増強したことから、5-HT_{3R} シグナルが 5-FU 誘発性アポトーシスを促進すると考えられた。また、5-HT_{3A}R-KO マウスを用いた実験成績からも、5-HT_{3R} シグナルが関与していることが示された。

本研究では十二指腸、空腸、回腸の三か所でアポトーシスを評価したが、部位によって有意差が認められる場合と認められない場合があった。この原因の可能性として、部位による細胞周期が影響を与えていると考えられる。5-FU は DNA 合成阻害によってアポトーシスを引き起こすため、細胞周期が早いほどアポトーシスが引き起こされる。実際に、十二指腸の方が回腸に比べ細胞周期が早いことが知られており [44]、本研究の結果も十二指腸でアポトーシス細胞が多く観察された。そのため、回腸ではアポトーシス細胞の数の差が小さく、統計学的に有意でなかった可能性も考えられる。そのため、本研究では各部位の全体的な傾向により、薬剤の影響を評価した。

以上の結果より、5-HT_{3R} シグナルが 5-FU 誘発性アポトーシスに関与することが明らかになり、5-HT_{3R} シグナルの活性化は 5-FU 誘発性アポトーシスを促進する作用を持つことが確認された。また、5-HT_{3R} シグナルの活性化のみではアポトーシスは誘導されないことが明らかになった。

【第4章 5-FU 誘発性アポトーシスに関与する 5-HT₃R シグナル標的細胞の探索① :

骨髄移植モデルによる検討】

4-1 目的

いくつかの報告では免疫細胞に 5-HT₃R が発現しており、5-HT₃R シグナルの活性化が免疫細胞からの炎症性サイトカインの産生を抑制することを示唆している[4, 6, 8]。そこで 5-FU 誘発性アポトーシスを促進する 5-HT₃R シグナルの標的細胞が免疫細胞であるという仮説のもと、WT マウスと 5-HT_{3A}R-KO マウスを用い、骨髄移植モデルによる実験を行った。骨髄移植を行うことにより、骨髄由来免疫細胞のみ 5-HT_{3A}R を欠損したマウスを作製することで、免疫細胞における 5-HT₃R シグナルが 5-FU 誘発性アポトーシスに関与するかどうかを明らかにすることを目的とした。

4-2 実験成績

4-2-1 骨髄移植モデルにおける免疫細胞置換率の検討 (末梢血)

初めに、骨髄移植によってどの程度の骨髄由来免疫細胞が置換されるかを検討するために、C57BL/6-Tg(CAG-EGFP)マウス (GFP マウス) を用い予備検討を行った。GFP マウスから骨髄を採取し、X 線照射した WT マウスに眼窩内静脈叢より投与することで骨髄を移植した。マウスから 1 週間毎に採血し、FACS にて FSC と SSC から白血球分画をゲーティングし (P1、図 7A)、GFP 陽性細胞の割合を求めた (図 7B)。その結果、骨髄移植 1 週間後では 22.1% だった置換率が、2 週間後以降では約 80% で維持されていた (図 7E、1 week : 22.1 ± 5.4%, 2 week : 85.3 ± 4.0%, 3 week : 83.2 ± 3.6%, 4 week : 83.7 ± 3.3%, 5 week : 79.1 ± 2.6%、n=4)。

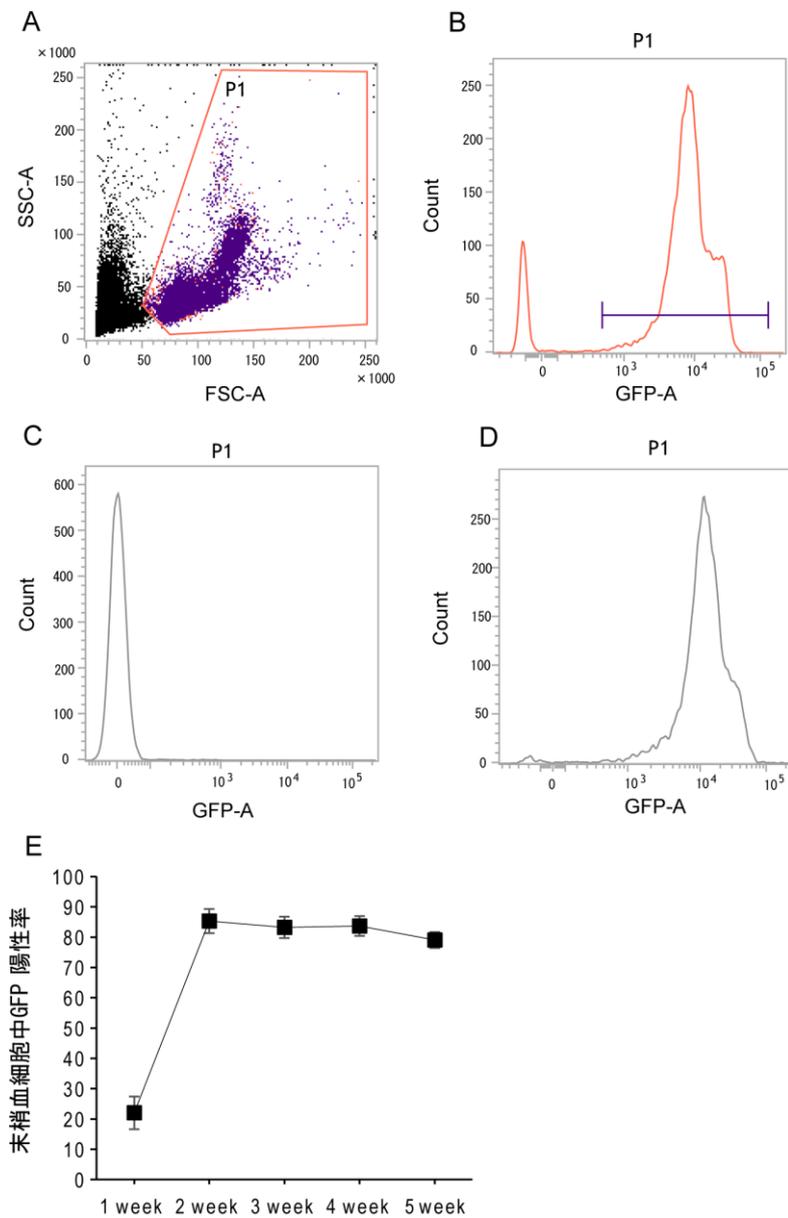


図 7. FACS による末梢血中免疫細胞置換率の検討

A) FSC による白血球分画のゲーティング (P1)。

B) 骨髄移植を行ったマウスにおける GFP 陽性細胞と陰性細胞の割合。P1 の全細胞のうち、バーの範囲の GFP 陽性細胞割合を置換率とした。

C) WT マウスの場合 (ネガティブコントロール)。

D) GFP マウスの場合 (ポジティブコントロール)。

E) 末梢血中 GFP 陽性細胞の割合の遷移。データは平均±SEM (n=4)。

4-2-2 骨髄移植モデルにおける免疫細胞置換率の検討 (腸管)

次に、4-2-1 で用いたマウスから小腸を骨髄移植後 5 週間後にサンプリングし、サンプル中に含まれる GFP 陽性白血球の割合を算出した。FSC よりデブリを除外し (P1、図 8A)、死細胞マーカーである 7-ADD が陰性である細胞 (P2、図 8B) のうち、白血球マーカーである CD45 陽性細胞分画をゲーティングし (P3、図 8C)、その細胞の GFP 陽性率を腸管における置換率とした (図 8D)。その結果、腸管における GFP 置換率は $68.4 \pm 5.9\%$ (n=4) だった。

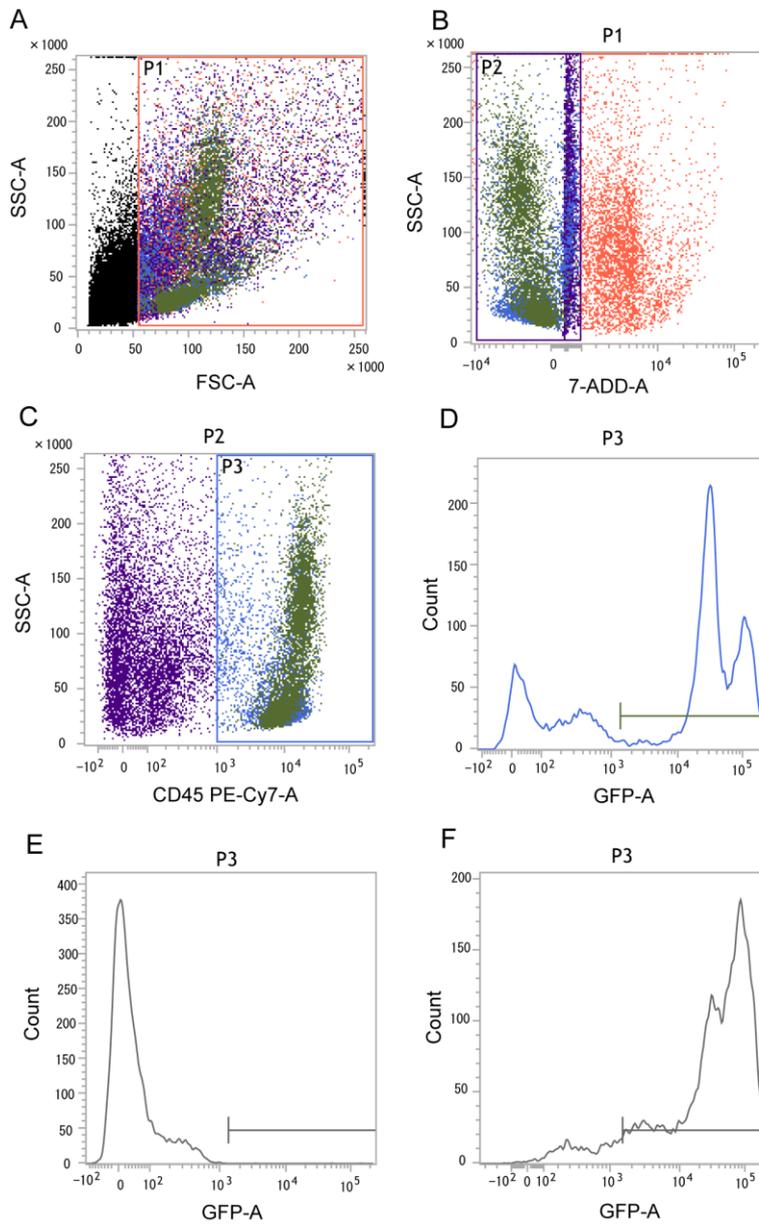


図 8. FACS による腸管における免疫細胞置換率の検討

A) FSC によるゲーティング (P1)。 B) 7-ADD による死細胞の除外 (P2)。

C) CD45 陽性白血球分画のゲーティング (P3)。

D) 骨髄移植を行ったマウスにおける GFP 陽性細胞と陰性細胞の割合。P3 の全細胞のうち、バーの範囲の GFP 陽性細胞割合を置換率とした。

E) WT マウスの場合 (ネガティブコントロール)。

F) GFP マウスの場合 (ポジティブコントロール)。

4-2-3 骨髄移植モデルにおける 5-FU 誘発性アポトーシスの影響

GFP マウスを用いた予備検討より、骨髄移植による免疫細胞の置換が十分に行われていると判断し、次に、WT マウスと 5-HT_{3A}R-KO マウスを用いて骨髄移植モデルを作製し、骨髄移植 5 週間後に 5-FU (5 mg/mL, 50 mg/kg, i.p.) によるアポトーシスを評価した (図 9A および B)。まずそれぞれのキメラマウスに生理食塩水を投与した Control 群では、腸陰窩の IEC にアポトーシスは見られず、X 線照射の影響は 5 週間で完全に見られなくなっていることが明らかとなった。次に、KO マウスから骨髄を移植した、すなわち免疫細胞のみ 5-HT_{3A}R を欠損したキメラ WT マウスでは、5-FU によるアポトーシス細胞の数は減少しなかった。一方、WT マウスの骨髄を移植した、すなわち免疫細胞以外の細胞が 5-HT_{3A}R を欠損したキメラ KO マウスでは、5-FU によるアポトーシスが有意に改善した。この結果は骨髄移植を行っていない KO マウスの結果と同様だった (図 6B、十二指腸 ; KO^{BM}→WT Control : 5.0 ± 0.4 cells/slice, KO^{BM}→WT 5FU : 83.3 ± 17.0 cells/slice, WT^{BM}→KO Control : 1.4 ± 0.4 cells/slice, WT^{BM}→KO 5FU : 15.8 ± 7.8 cells/slice、空腸 ; KO^{BM}→WT Control : 2.9 ± 1.5 cells/slice, KO^{BM}→WT 5FU : 71.8 ± 16.7 cells/slice, WT^{BM}→KO Control : 0.6 ± 0.5 cells/slice, WT^{BM}→KO 5FU : 19.1 ± 10.0 cells/slice、回腸 ; KO^{BM}→WT Control : 1.4 ± 0.3 cells/slice, KO^{BM}→WT 5FU : 24.3 ± 5.3 cells/slice, WT^{BM}→KO Control : 1.4 ± 0.4 cells/slice, WT^{BM}→KO 5FU : 8.0 ± 3.2 cells/slice、n=4-6)。

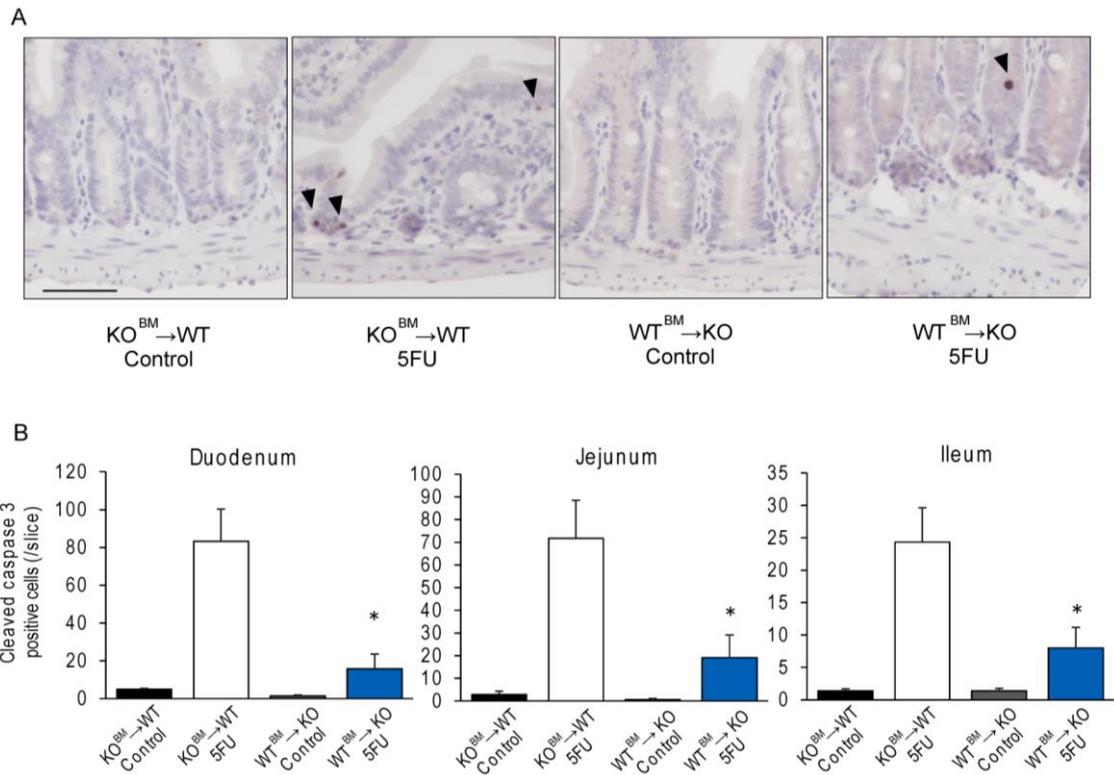


図 9. 骨髄移植モデルにおける 5-FU 誘発性アポトーシスの影響

A) 空腸における活性型カスパーゼ 3 陽性細胞の典型写真。アポトーシスを起こしている細胞が茶褐色に染色されている (黒矢頭)。スケールバーは 50 μm を示す。

B) 横断面切片における活性型カスパーゼ 3 陽性細胞数の定量図。キメラ WT マウス (KO^{BM}→WT) では 5-FU によるアポトーシス細胞の数が減少しなかったが、キメラ KO マウス (WT^{BM}→KO) では 5-FU によるアポトーシス細胞の数が減少した。データは平均 \pm SEM (n=4-6)。* $p < 0.05$ vs. KO^{BM}→WT 5FU。

Control ; 対照群、WT ; 野生型マウス、KO ; 5-HT_{3A}R-KO マウス。

4-3 考察

免疫細胞は骨髄で産生されるため、骨髄移植を行うことで骨髄由来の免疫細胞特異的に遺伝子欠損させたマウスが作製でき、免疫研究の分野では広く用いられている手法である[45]。しかし一方で、腸管に存在する白血球は骨髄移植を行っても40%程度しか置換されないという報告もあり[46]、小腸上皮のアポトーシスを評価するうえで事前検討が必要と考えた。骨髄移植を成功させるためには、移植する骨髄細胞を的確に投与する必要がある。一般的には尾静脈投与が行われているが、今回は眼窩静脈叢投与を採用した。この方法は、尾静脈投与に比べて手技が容易であり、また血中動態も尾静脈投与と変わらない、近年確立された投与方法である[33]。実際にこの方法を用いて骨髄移植を行ったマウスでは、血中白血球の置換率は80%以上に達し、これは以前の報告と同様である[46]。さらに、腸管での置換率は移植後5週間に70%近くに達し、以前の報告よりも高い結果となった。以前の報告では、移植後3週間までしか確認していないため単純に比較はできないが、少なくとも本モデルで移植後5週間目に5-FUによるアポトーシスを評価するにあたり、十分な置換率が得られていると考え、WTマウスと5-HT_{3A}R-KOマウスでの骨髄移植実験を行った。

これまで5-HT_{3R}阻害薬の抗炎症作用は免疫細胞に発現する5-HT_{3R}を介して発揮されている可能性が示唆されていた[4, 6, 8]。しかし今回、WTマウスに5-HT_{3A}R-KOマウスの骨髄を移植することで、免疫細胞での5-HT_{3R}シグナルを遮断したにもかかわらず、5-FUによるアポトーシスは改善されなかった。一方で、5-HT_{3A}R-KOマウスにWTマウスの骨髄を移植し、免疫細胞のみで5-HT_{3R}シグナルが働くようにしたキメラマウスでは、5-FUによるアポトーシスは有意に改善した。第3章において5-HT_{3R}シグナルが5-FU誘発性アポトーシスを促進する作用を持つことが明らかになっていることから、5-FU誘発性アポトーシスに骨髄由来免疫細胞は関与せず、免疫細胞以外の体細胞に発現する5-HT_{3R}が関与していることが明らかになった。

【第5章 5-FU 誘発性アポトーシスに關与する 5-HT₃R シグナル標的細胞の探索②：

5-HT_{3A}R-EGFP レポーターマウスでの検討】

5-1 目的

第4章では、5-FU 誘発性アポトーシスに關与する 5-HT₃R シグナルの標的細胞が免疫細胞ではないことが明らかになった。一般的に 5-HT₃R は神経細胞に発現していることが知られているが[11]、そのほかの細胞に關しての情報は乏しい。その原因として、同受容体を認識する市販の抗体の特異性に問題があることが挙げられる。そこで、5-HT₃R を発現するそのほかの標的細胞を探索するために、5-HT_{3A}R-EGFP レポーターマウスを用いて免疫組織化学的に検討を行うこととした。

5-2 実験成績

5-2-1 5-HT_{3A}R-EGFP レポーターマウスの小腸組織切片の観察

まず 5-HT_{3A}R-EGFP レポーターマウスの小腸の凍結切片を作製し、EGFP (緑色) を観察することで 5-HT_{3A}R を発現する細胞を観察した。その結果、5-HT_{3A}R は絨毛間および粘膜下組織に多く発現していた (赤矢印、図 10A および D)。また、粘膜上皮細胞の一部の細胞にも 5-HT_{3A}R 発現細胞が確認でき、そのうちいくつかは腸陰窩にも分布していた (赤矢頭、図 10C および F)。

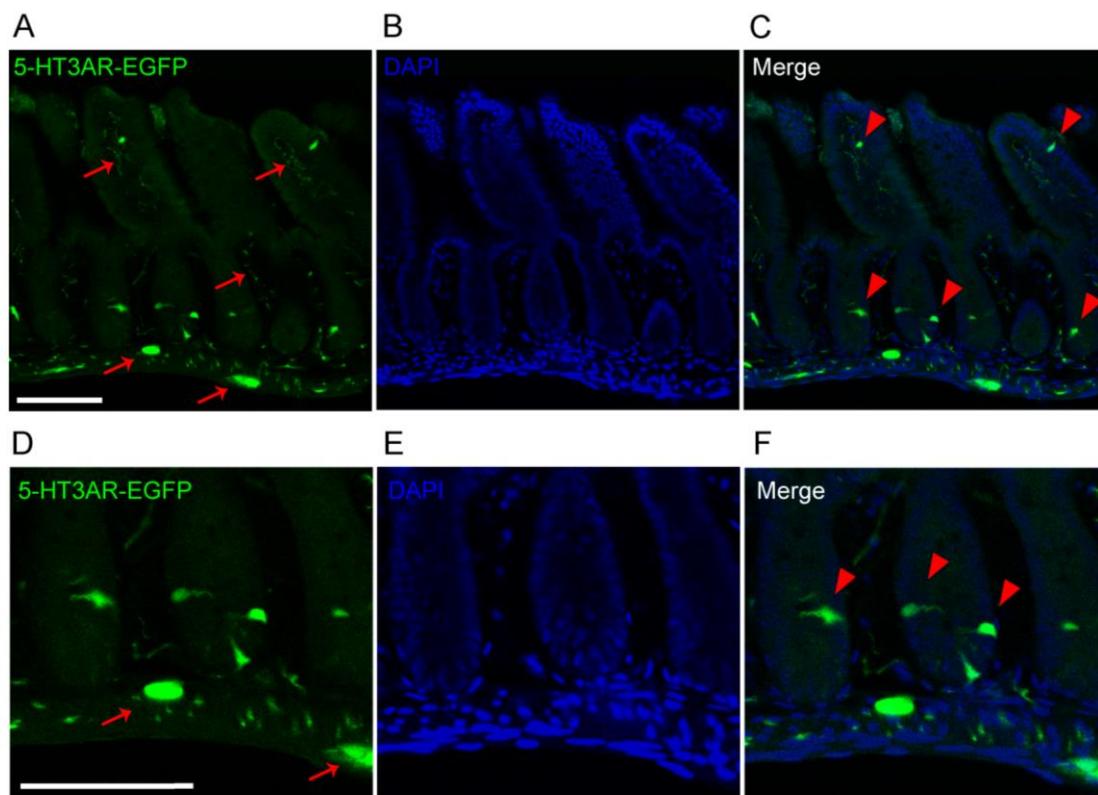


図 10. 5-HT_{3A}R-EGFP レポーターマウスの小腸組織切片

A) 5-HT_{3A}R-EGFP 発現細胞 (緑色) は絨毛間と粘膜下織に多く発現している (赤矢印)。

B) DAPI による核染色 (青色)。

C) 粘膜上皮細胞の一部にも 5-HT_{3A}R-EGFP 発現細胞が確認される (赤矢頭)。

D~F) A~C の拡大図。

スケールバーは 100 μm を示す。

5-2-2 神経細胞における 5-HT_{3A}R-EGFP の発現

5-2-1 で 5-HT_{3A}R は神経細胞と思われる細胞に発現していた。そこで神経細胞のマーカ一である PGP9.5 抗体を用いて免疫染色を行い、5-HT_{3A}R-EGFP との二重染色を行った。予想通り、絨毛間および神経叢に発現していた 5-HT_{3A}R-EGFP (緑色) は PGP9.5 (赤色) と完全に一致した (白矢印、図 11C および F)。しかし、粘膜上皮細胞に発現していた 5-HT_{3A}R-EGFP 陽性細胞は PGP9.5 では染色されなかった (赤矢頭、図 11C および F)。これらの結果より、粘膜下組織に存在している 5-HT_{3A}R は神経細胞に発現されていることが明らかになった。しかし粘膜上皮に発現している 5-HT_{3A}R は神経細胞由来ではないことが明らかになった。

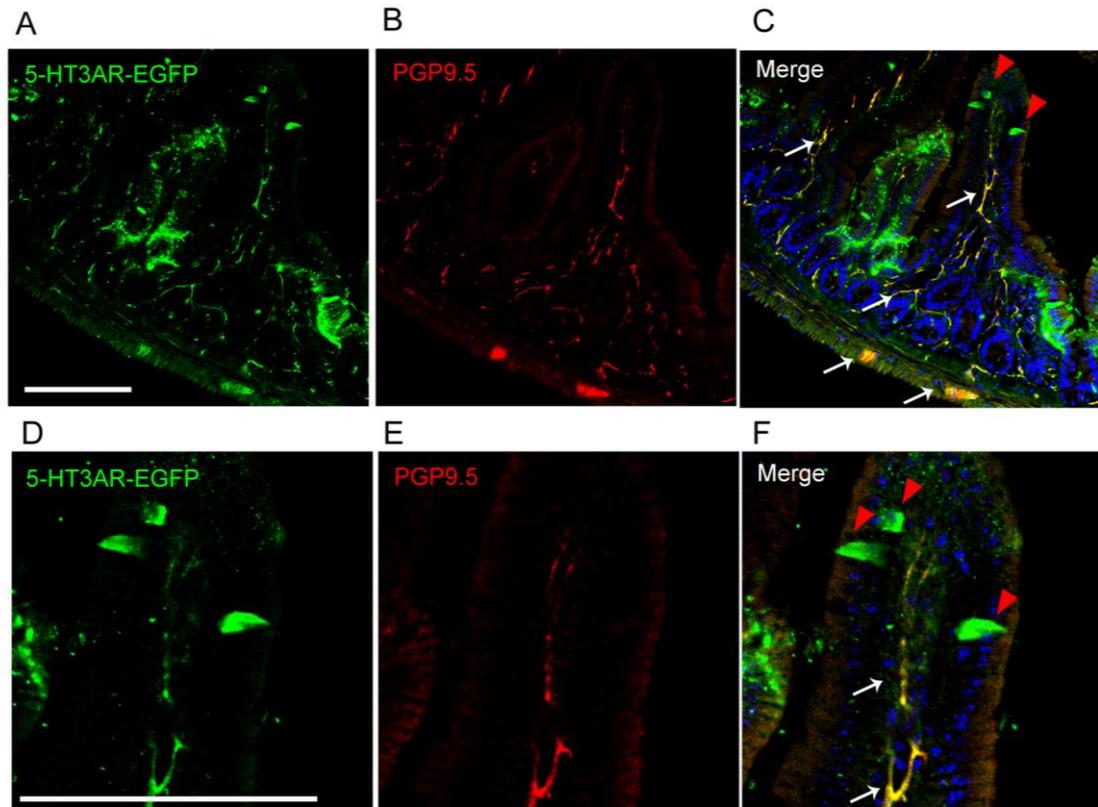


図 11. PGP9.5 と 5-HT_{3A}R-EGFP の二重染色

A) 5-HT_{3A}R-EGFP は粘膜下組織と粘膜上皮細胞の一部に確認される (緑色)。

B) PGP9.5 抗体により神経細胞が染色されている (赤色)。

C) 粘膜下組織の 5-HT_{3A}R-EGFP は PGP9.5 と完全に一致している (白矢印)。粘膜上皮細胞の一部の 5-HT_{3A}R-EGFP 陽性細胞は PGP9.5 陰性だった (赤矢頭)。DAPI (青色)。

D~F) A~C の拡大図。

スケールバーは 100 μm を示す。

5-2-3 マクロファージにおける 5-HT_{3A}R-EGFP の発現

第4章で5-FU誘発性アポトーシスに免疫細胞は関与しないことが明らかになったが、腸管の免疫細胞に5-HT₃Rが発現していないためなのか、あるいは5-HT_{3A}Rが発現しているがアポトーシスには関与しなかったのかは明らかではない。そこで、免疫細胞としてマクロファージをCD68抗体によって免疫染色し、5-HT_{3A}R-EGFPとの二重染色を行った。その結果CD68陽性細胞(赤色)であるマクロファージ(白矢印)は、5-HT_{3A}R-EGFP(緑色)とほとんど一致しなかった(図12CおよびF)。しかしごく一部、5-HT_{3A}R-EGFPとCD68が一致する部分が存在した(白矢頭、図12F)。粘膜上皮細胞の一部の5-HT_{3A}R-EGFP陽性細胞はCD68陰性だった(赤矢頭、図12C)。

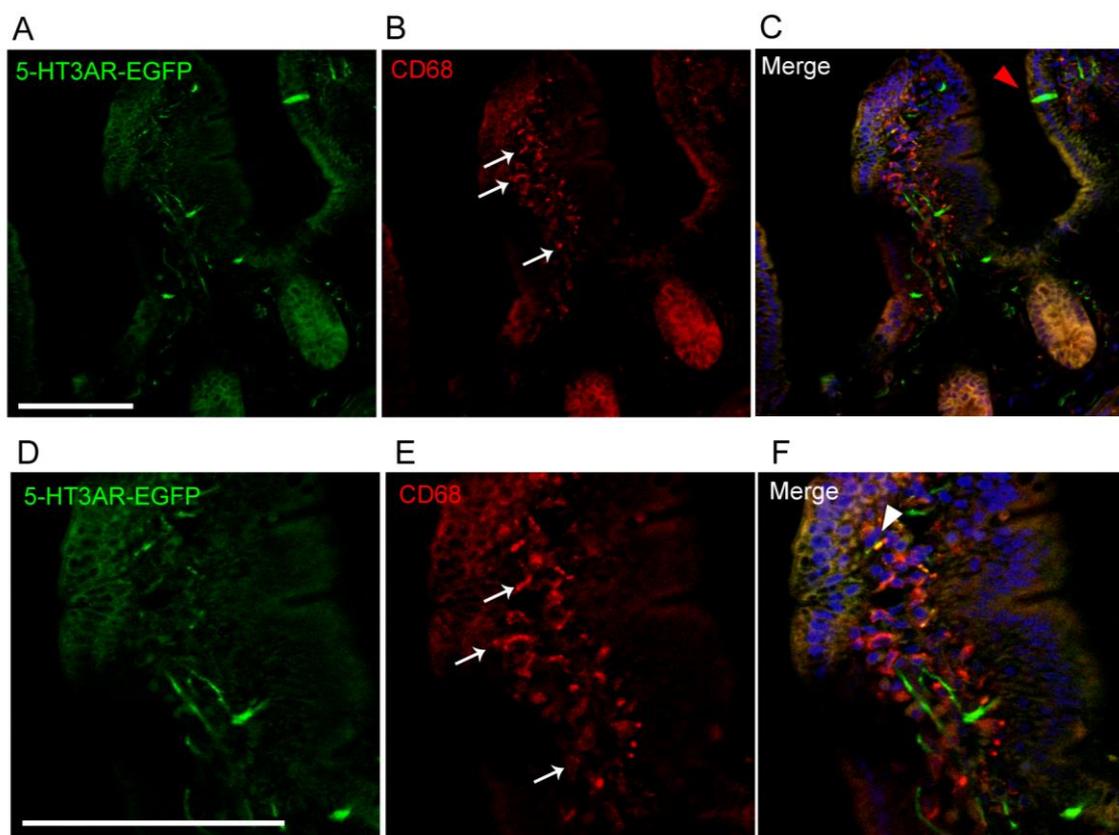


図 12. CD68 と 5-HT_{3A}R-EGFP の二重染色

A) 5-HT_{3A}R-EGFP は粘膜下組織と粘膜上皮細胞の一部に確認される (緑色)。

B) CD68 抗体により絨毛間のマクロファージが染色されている (赤色、白矢印)。

C) 粘膜下組織の 5-HT_{3A}R-EGFP は CD68 と一致しなかった。また粘膜上皮細胞の一部の 5-HT_{3A}R-EGFP 陽性細胞も CD68 陰性だった (赤矢頭)。DAPI (青色)。

D~F) A~C の拡大図。5-HT_{3A}R-EGFP と CD68 が一致する箇所が 1 箇所存在した (白矢頭)。

スケールバーは 100 μm を示す。

5-2-4 共焦点顕微鏡によるマクロファージと 5-HT_{3A}R-EGFP 陽性細胞の観察

5-2-3 で 5-HT_{3A}R-EGFP と CD68 はほとんど一致しなかったが、ごく一部一致している部分も存在した。そこでマクロファージにおける 5-HT_{3A}R の発現をより詳細に観察するために、5-HT_{3A}R-EGFP マウスで CD68 を免疫染色したサンプルを、共焦点顕微鏡を用いて三次元的に観察を行った。まず、二次元的に得られた免疫染色画像では、一部 CD68 陽性マクロファージ (赤色) が、5-HT_{3A}R-EGFP (緑色) と共発現しているように観察できる画像が得られた (白矢印、図 13A)。しかし、この画像を三次元的に解析すると、5-HT_{3A}R-EGFP 陽性の神経線維に隣接してマクロファージが存在していることが確認できた (白矢頭、図 13B)。また角度によっては、マクロファージは神経細胞と一致するように観察できる画像も存在した (青矢頭、図 13B)。

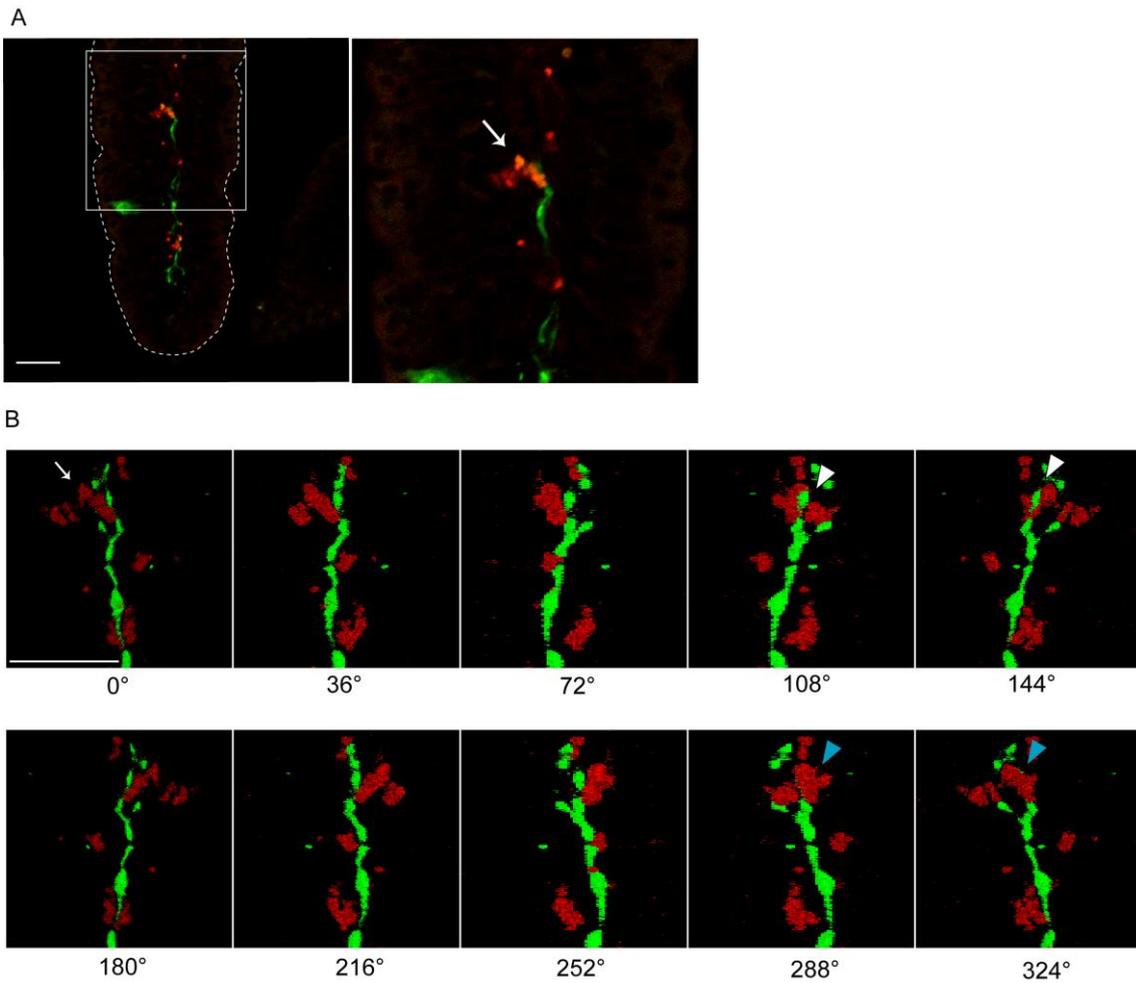


図 13. 共焦点顕微鏡による CD68 と 5-HT_{3A}R-EGFP 発現細胞の観察

A) CD68 (赤色) と 5-HT_{3A}R-EGFP (緑色) の 2D 画像。一部一致しているように観察できる (白矢印)。

B) CD68 と 5-HT_{3A}R-EGFP の 3D 画像。時計回りに回転させた回転角度で示す。CD68 と 5-HT_{3A}R-EGFP は角度によっては神経線維を取り囲むように存在している (白矢頭) が、その 180 度反対から見ると一致しているように観察できる (青矢頭)。

スケールバーは 20 μm を示す。

5-2-5 粘膜上皮細胞における 5-HT_{3A}R-EGFP の発現

粘膜上皮細胞の一部の 5-HT_{3A}R-EGFP 陽性細胞を同定するために免疫染色を行った。粘膜上皮細胞のすべてが染まっているわけではなくまばらで、一部紡錘形の形態が観察されたことから腸管内分泌細胞と推察し、EC 細胞のマーカーである 5-HT 抗体で免疫染色を行った。すると予想通り、粘膜上皮細胞の 5-HT_{3A}R-EGFP 陽性細胞 (緑色) と 5-HT 陽性細胞 (赤色) が一致した (白矢頭、図 14C および F)。しかし、すべての 5-HT_{3A}R-EGFP 陽性上皮細胞が 5-HT 陽性ではなく、5-HT_{3A}R-EGFP のみ陽性の細胞 (黄矢印) や 5-HT のみ陽性の細胞 (白矢印) も観察され、全体的にそれぞれ約 50% ずつの細胞が一致していた。

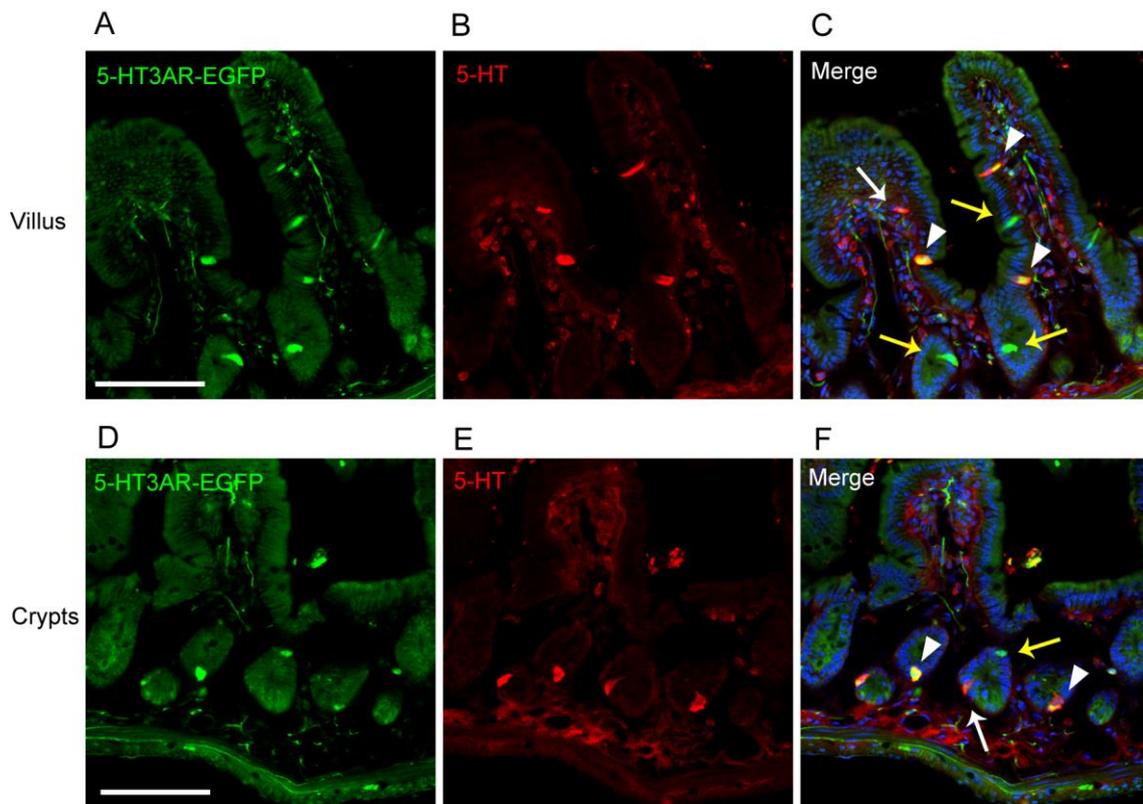


図 14. 5-HT と 5-HT_{3A}R-EGFP の二重染色

A~C) 絨毛部における 5-HT_{3A}R-EGFP (緑色)、EC 細胞 (5-HT、赤色)、DAPI (青色) の染色像。

D~F) 腸陰窩部における 5-HT_{3A}R-EGFP (緑色)、EC 細胞 (5-HT、赤色)、DAPI (青色) の染色像。

5-HT_{3A}R-EGFP 陽性細胞の一部と EC 細胞の一部が一致している (白矢頭) が、5-HT_{3A}R-EGFP のみ陽性細胞 (黄矢印) および 5-HT のみ陽性細胞 (白矢印) も存在する。

スケールバーは 50 μm を示す。

5-3 考察

今回、5-HT_{3A}R-EGFP レポーターマウスを入手することができたため、より詳細に免疫組織化学的に5-HT_{3A}Rの局在を調査することができた。これまで知られていたように、5-HT_{3A}Rは腸管神経のほぼ全域に発現しており、PGP9.5ともほぼ一致した。これらの結果は腸の分泌、血流調節、運動、知覚に関するほとんどの神経に5-HT_{3R}が発現しているという報告と一致する[11]。一方、これまで腸管のマクロファージに5-HT_{3R}が発現していると示唆されていたが[8, 47]、本研究では5-HT_{3A}R-EGFP陽性細胞とCD68は一致しなかった。しかしこの結果は、第4章で骨髄移植を行っても5-FU誘発性アポトーシスに影響がなかったという結論を支持する結果である。上述の研究では、抗5-HT_{3R}抗体を用いて免疫染色によってマクロファージにおける局在を見ている。これらの抗体はIgGをアイソタイプとするものであるが、マクロファージは細胞表面上にFcレセプターを発現しており[48]、しばしばFcレセプターと抗体が非特異的に結合してしまうことで、評価が難しいことがある。今回は5-HT_{3A}R-EGFPレポーターマウスを用いたため、抗体に影響されることなく局在を見ることができたため、より信頼性の高い結果を得られたと考えている。また、共焦点顕微鏡で観察すると、マクロファージは神経細胞に密着するように存在しており、三次元解析での角度によっては共局在を示しているようにも観察できる。このようなことから、マクロファージは5-HT_{3R}を発現していると考えられてきたが、今回の結果は、マウスの小腸に存在するマクロファージは5-HT_{3R}を発現しない可能性を強く示唆するものである。また、EC細胞に5-HT_{3R}が発現していることを5-HT_{3A}R-EGFPマウスを用いて明らかにした。これまで、EC細胞が5-HT_{3R}を発現している可能性は、モルモットの摘出回腸での5-HT放出を確認した*in vitro*の報告しかなく[49-51]、EGFPレポーターマウスを用いてEC細胞に5-HT_{3A}Rが発現していることを形態学的に証明したのは本研究が初めてである。

これらの結果より、5-FU 誘発性アポトーシスに関与する 5-HT₃R シグナルの標的細胞は、神経細胞または EC 細胞である可能性が示唆された。

【第 6 章 5-FU 誘発性アポトーシスに関与する 5-HT₃R シグナル標的細胞の探索③ :

EC 細胞についての検討】

6-1 目的

第 5 章では 5-FU 誘発性アポトーシスに関与する 5-HT₃R シグナルの標的細胞は、神経細胞または EC 細胞である可能性が明らかとなった。特に EC 細胞は、5-FU によってアポトーシスが誘導される腸陰窩にも存在が確認された。一方、神経細胞に発現する 5-HT₃R は腸管神経のほぼ全域に発現しており、その下流で分泌されるメディエーターは計り知れない。そこで EC 細胞についての検討を優先して実施することとした。

6-2 実験成績

6-2-1 5-HT_{3A}R-EGFP レポーターマウスでの小腸オルガノイド作製

EC 細胞についての検討を、小腸オルガノイドを用いた *in vitro* 実験で行うこととした。まず、5-HT_{3A}R-EGFP レポーターマウスの小腸を用いて、小腸オルガノイドを作製し、小腸オルガノイドに 5-HT₃R が発現しているかを確認した。その結果、小腸から分離してきたクリプトの状態でも 5-HT_{3A}R-EGFP 陽性細胞 (緑色) が確認でき、オルガノイドを形成してからもその発現が維持されていることが明らかになった (図 15A)。またオルガノイド中の EC 細胞の発現も確認できた (図 15B)。これらを二重染色すると一部の細胞は 5-HT_{3A}R-EGFP および 5-HT (赤色) の両方に陽性を示した (白矢頭、図 15C)。

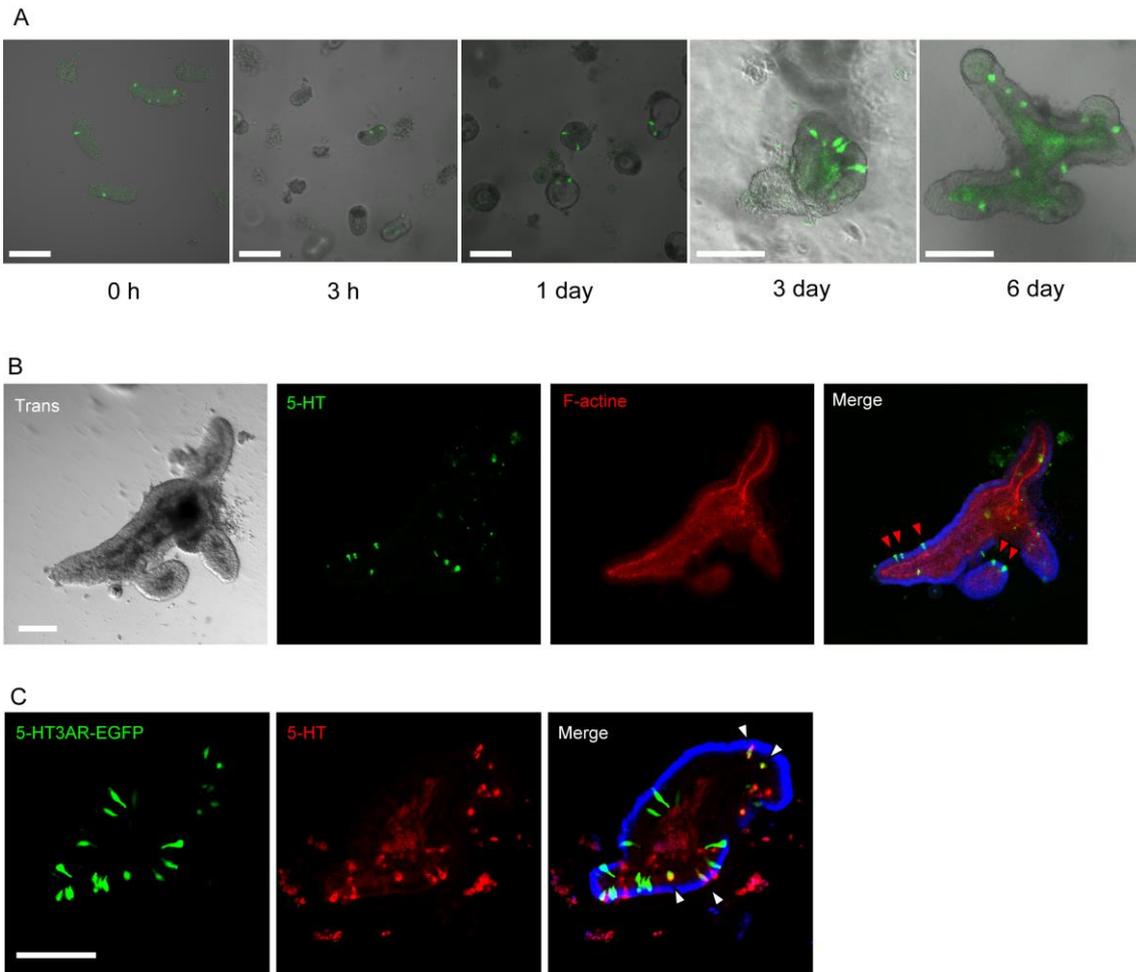


図 15. 5-HT_{3A}R-EGFP レポーターマウスから作製した小腸オルガノイド

A) 分離したクリプトからオルガノイド培養中の 5-HT_{3A}R-EGFP 陽性細胞の確認 (緑色)。

B) 小腸オルガノイドにおける 5-HT 陽性細胞 (赤矢頭、緑色)、微絨毛 (F-actin、赤色)、DAPI (青色)。

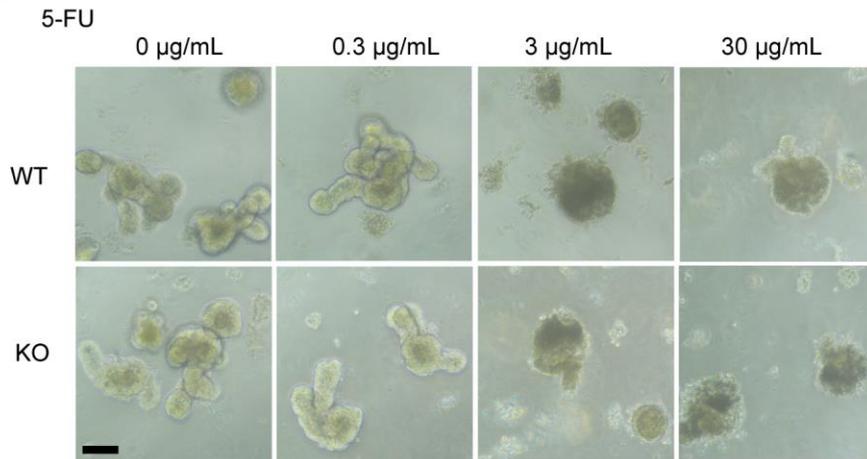
C) 小腸オルガノイドにおける 5-HT_{3A}R-EGFP (緑色)、5-HT (赤色)、DAPI (青色)。一部の細胞が 5-HT_{3A}R-EGFP および 5-HT の両方に陽性を示した。

スケールバーは 100 μm を示す。

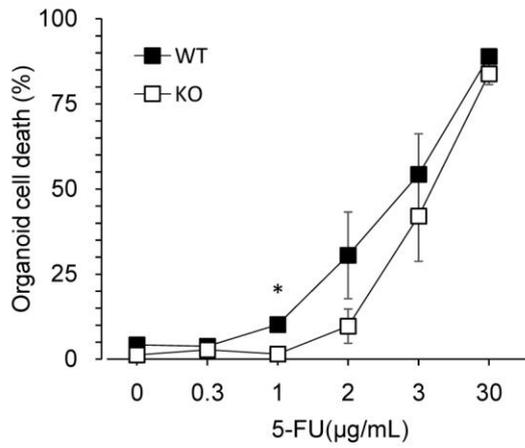
6-2-2 小腸オルガノイドでの 5-FU 細胞死誘導実験

小腸オルガノイドに 5-HT_{3A}R を発現する EC 細胞が存在することが確認できたため、オルガノイドを用いた *in vitro* 実験を行うこととした。WT マウスと 5-HT_{3A}R-KO マウスからそれぞれ小腸オルガノイドを作製し、5-FU を培養液中に加えることで細胞死を誘導した。まず、5-FU を 0.3 µg/mL で添加した場合は、5-FU 無処置群と比べて小腸オルガノイドの形態に大きな変化は認められなかった。しかし 5-FU を 3 µg/mL 以上の濃度で加えると、オルガノイドの発芽が減少し、細胞死が誘導されるためオルガノイドの管腔構造も崩壊していた (図 16A)。これらを顕微鏡により形態学的に定量すると図 16B および C のようになった。5-FU を 1 µg/mL の濃度で加えたときには、WT マウスよりも 5-HT_{3A}R-KO マウスの小腸オルガノイドで有意に改善が見られたが、全体的にみると大きな差は見られなかった。また MTT アッセイによって評価した場合には、1 µg/mL の濃度でも差はなく、また 5-HT_{3R} 作動薬である m-CPBG を加えても死亡率に変化はなかった (図 16D)。これらの結果より、オルガノイドに発現する 5-HT_{3A}R 陽性細胞はオルガノイドの細胞死には直接影響しないことが明らかになった。

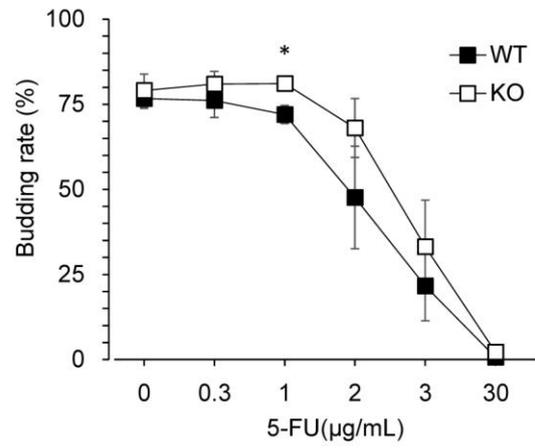
A



B



C



D

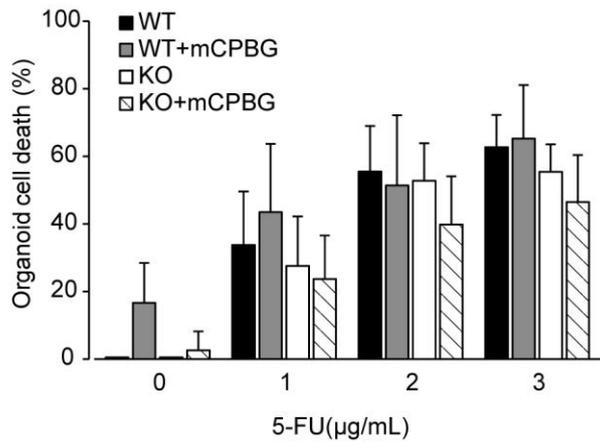


図 16. 小腸オルガノイドを用いた *in vitro* 細胞死誘導実験

A) WT マウスおよび 5-HT_{3A}R-KO マウスから作製した小腸オルガノイドに 5-FU で細胞死を誘導させたときの典型写真。細胞死が誘導されるとオルガノイドの管腔構造が崩壊する。スケールバーは 100 μ m を示す。

B, C) オルガノイドを、発芽あり生存、発芽なし生存、死亡の三つに分類し、オルガノイドの死亡率および発芽率を定量した。濃度依存的に死亡率が上昇し、発芽率が減少した。データは平均 \pm SEM (n=5-8) で示す。* $P < 0.05$; WT vs. KO。

D) MTT アッセイによるオルガノイド細胞死の評価。m-CPBG は細胞死に影響しなかった。データは平均 \pm SEM (n=4)。

WT ; 野生型マウス、KO ; 5-HT_{3A}R-KO マウス。

6-2-3 5-FU 投与マウスにおける血漿 5-HT 濃度の検討

EC 細胞は 5-FU によって 5-HT を放出することが知られているが[29]、小腸オルガノイドを用いた検討では、WT マウスと 5-HT_{3A}R-KO マウスから作製した小腸オルガノイドで 5-FU による細胞死に差は見られなかった。そこで、*in vivo* では変化があるのではないかと考え、5-FU を投与したマウスで血中の 5-HT 濃度を測定することとした。すると WT マウスでは 5-FU を投与することで、5-FU を投与しなかった対照群のマウスと比較して、血漿中 5-HT 濃度が有意に上昇したのに対し、5-HT_{3A}R-KO マウスでは 5-FU を投与しても対照群のマウスと比較して、血漿中 5-HT 濃度が大きく変動しないことが明らかになった (図 17A、WT-Control : 21.4 ± 2.0 nM, WT-5FU : 62.2 ± 11.9 nM, KO-Control : 31.7 ± 2.8, KO-5FU : 25.7 ± 2.4 nM、n=6-8)。WT マウスでは 5-FU の投与により血漿中 5-HT 濃度は約 3 倍上昇した (図 17B)。

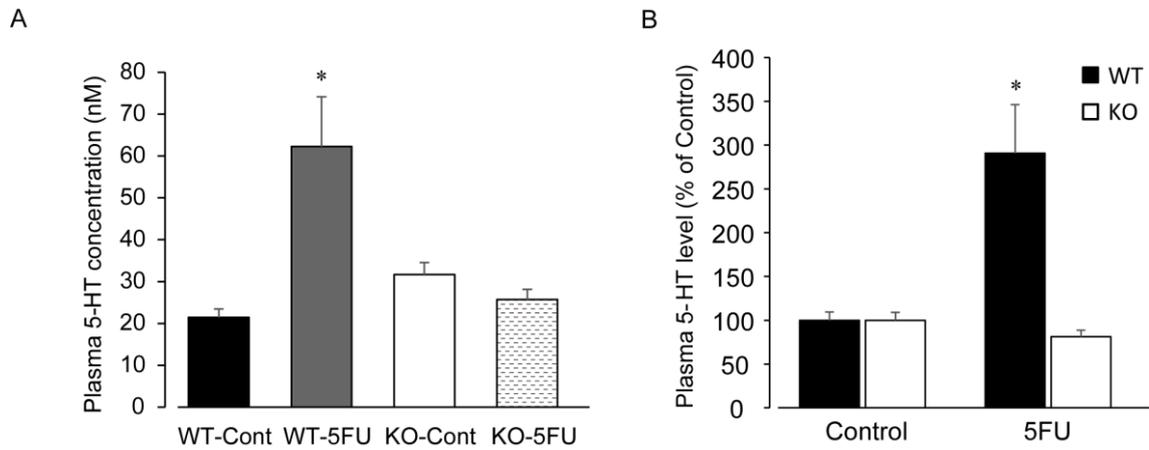


図 17. 5-FU 投与による血漿中 5-HT 濃度の変化

A) 血漿中 5-HT 濃度の絶対値。

B) 対照群を 100%としたときの 5-FU 投与による 5-HT 濃度の変化率。

データは平均±SEM (n=6-8)。* $P < 0.05$ vs. Control。

Cont, Control ; 対照群 WT ; 野生型マウス KO ; 5-HT_{3A}R-KO マウス。

6-3 考察

今回私は、小腸オルガノイドという培養系を用いて検討を行った。小腸オルガノイドは2009年に Sato ら[34]によって開発された方法で、腸管からクリプトを分離し、細胞外マトリックス基質であるマトリゲル中で培養することで、管腔構造を維持したオルガノイドを形成させることができ、これまで困難だった腸粘膜の培養系として確立された実験法である。また、小腸オルガノイドには幹細胞[34]以外に、パネート細胞[52]や EC 細胞を含む腸管内分泌細胞[53]が存在していることが明らかとなっており、より生体内に近い環境を再現できるため、多くの腸管研究で用いられている。この方法を用いれば、神経細胞を含まない腸粘膜のみの影響を検討できると考えた。

まず、前提条件として小腸オルガノイドに 5-HT₃R が存在していなければ実験が成り立たないため、5-HT₃A R-EGFP マウスを用いて小腸オルガノイドを作製し、5-HT₃A R の発現を確認した。予想通り、分離してきたクリプトに 5-HT₃A R は発現しており、発現数も組織切片で確認したものと同程度だった。また培養を数日間行っても 5-HT₃A R の発現は維持され、むしろ発現細胞の数は増加しており、幹細胞から分裂・分化したものと考えられる。このオルガノイドを 5-HT 抗体で免疫染色すると、一部の 5-HT₃A R-EGFP 陽性細胞が、一部の 5-HT 陽性細胞と一致した。これは組織切片で観察された結果と一致している。オルガノイドに含まれる 5-HT₃A R-EGFP 陽性細胞は紡錘形を呈し、これはオルガノイドで腸管内分泌細胞を観察した結果に酷似している[53]。すなわち、5-HT₃R は EC 細胞だけではなく、D 細胞や L 細胞といったほかの腸管内分泌細胞にも発現している可能性もある。一方で、5-HT₃A R-EGFP 陰性の 5-HT 陽性 EC 細胞も観察された。EC 細胞は非常に複雑な分泌調節を受けており、アドレナリン受容体、アセチルコリン受容体、GABA 受容体、そしてプリン受容体など多数の受容体による調整機構を持つ[50]。そして以前に、カルシウムイメージングで EC 細胞のノルエピネフリンに対する反応を観察した研究でも、ノルエピネフリンに反応した 5-HT 陽性細胞は約 40%だったという報告もあり[54]、本研究の結果に類似している。したがって、EC

細胞にも発現する受容体が異なる複数のサブタイプが存在しているのかもしれないが、そのような報告は今のところ存在しない。

今回私は、小腸オルガノイドを 5-FU と共培養することで細胞死を誘導した。この手法は 2014 年に Grabinger ら[36]が提唱した実験法であり、5-FU 濃度も彼らの報告を参考に決定した。今回の結果でも 5-FU は濃度依存的にオルガノイドに細胞死を引き起こし、モデルとして確立できていると考えられた。しかし、WT マウスと 5-HT_{3A}R-KO マウスから作製した小腸オルガノイドで、5-FU による細胞死は同程度に引き起こされた。本研究では小腸オルガノイド培養系で、5-FU による 5-HT 放出を確認できていない。これは二つの制限によるもので、一つは小腸オルガノイドがマトリゲルという細胞外マトリックス基質に包まれているために上清中の 5-HT 濃度が正確に測定できない可能性があること、もう一つは IEC 自身がセロトニントランスポーター (SERT) を持っているため[55]、放出された 5-HT を IEC が逐次回収してしまうため正確に測定できないためである。しかし EC 細胞はプリン受容体も発現しており、細胞死によって放出される ATP にも反応して 5-HT を放出することが知られている[56]ため、5-FU による細胞死が確認できた本研究でも、オルガノイドから 5-HT 放出されていると考えられる。実際に 5-FU を投与したマウスでの血漿中 5-HT 濃度を測定すると、WT マウスと 5-HT_{3A}R-KO マウスで 5-FU 投与による血漿中 5-HT 濃度の上昇に差が見られた。よって 5-HT₃R シグナルは EC 細胞からの 5-HT 放出に関与していることが明らかとなった。小腸オルガノイドで 5-FU による細胞死に差が見られなかったのは、EC 細胞から分泌された 5-HT が IEC に直接働いているのではなく、小腸オルガノイド培養系に含まれない細胞群、すなわち免疫細胞や神経細胞の 5-HT 受容体を介して間接的にアポトーシスに関与しているものと考えられる。

【第7章 総合考察】

本研究は制吐剤である 5-HT₃R 阻害薬が持つ 5-FU 誘発小腸上皮アポトーシスの抑制作用機序を解明することを目的に実施された。5-HT₃R 阻害薬が 5-FU 誘発性アポトーシスを改善するという事は以前に報告されているが[8]、本研究では 5-HT_{3A}R-KO マウスでも同様の結果が得られ、5-HT₃R シグナルを介した抗アポトーシス作用が存在することを確認し、また 5-HT₃R 作動薬は逆にアポトーシスを促進することを明らかにした。このことより 5-HT₃R シグナルにアポトーシスを促進する作用があることを明らかになった。

本研究ではさらに、5-HT₃R シグナルによるアポトーシス促進作用の中心的役割を果たす 5-HT₃R を持つ標的細胞の探索を主に行った。これまで 5-HT₃R 阻害薬の抗炎症作用は免疫細胞に発現する 5-HT₃R を介し、炎症性サイトカインの産生を抑制するためという報告が多かった[4, 6, 8]。しかし本研究では、骨髄移植を用いた機能的評価および 5-HT_{3A}R-EGFP レポーターマウスを用いた形態学的評価の両側面からその可能性は低いと考えられた。このことは、これまでの 5-HT₃R 阻害薬の抗炎症作用に関する研究に一石を投じるものである。また今回 EC 細胞に 5-HT_{3A}R が発現しており、5-HT₃R シグナルが 5-FU による 5-HT 放出を増強する可能性を示唆した。1991 年のモルモットの摘出小腸を用いた *in vitro* の実験では EC 細胞上に 5-HT₃R が発現しており、5-HT 放出を促進する可能性を報告しているが[51]、それ以降 5-HT₃R シグナルと EC 細胞について検討された研究はなく、*in vivo* で 5-HT₃R シグナルが血漿中 5-HT 濃度を上昇させたことを報告した研究は本研究が初めてである。これは、これまで 5-HT₃R 阻害薬の制吐作用が、①EC 細胞から放出された 5-HT が求心性神経に発現する 5-HT₃R に結合するのを防ぐことと、②脳幹で求心性神経末端が放出する 5-HT が CTZ および VC の 5-HT₃R に結合するのを防ぐことで発揮されていると考えられているが、さらに③EC 細胞からの 5-HT 放出自体の抑制、④血漿中 5-HT 濃度の上昇を防ぐことで血流から CTZ および VC への 5-HT 移行減少をもたらすことでも制吐作用が発揮されている可能性を

示唆する発見である。

本研究では上昇した血漿中 5-HT が、どのようにアポトーシスを増強しているかまでは明らかにできなかった。しかしこれまでの報告で、TNF- α などの炎症性サイトカインの産生調整が 5-FU 誘発性アポトーシスに関与していることが示唆されている[8]。また 5-HT₃R 阻害薬の抗炎症作用を検討した研究[4, 6, 8]で、共通してみられるのは炎症性サイトカインの産生が抑制されているということからも、5-HT₃R シグナルの 5-FU 誘発性アポトーシス増強に炎症性サイトカインが関与している可能性は高いと考えられる。5-FU によるアポトーシスは核酸合成阻害による DNA 障害を起因とする内部経路によるものであると考えられる。実際に 5-FU は細胞での p53 タンパクの発現を上昇させることが知られている[57, 58]。しかし、5-HT₃R 阻害薬によってもたらされる抗アポトーシス作用は、TNF- α などの炎症性サイトカインの産生を抑え、その結果デスレセプターを介する外部経路が遮断されるためと考えられる。すなわち、5-FU によるアポトーシスの引き金は飽くまで p53 を介した内部経路で、その後炎症性サイトカインが産生されることで外部経路が助長的に働くということである。このことはいくつかの事実からも説明できる。まず、5-HT₃R 阻害薬に抗アポトーシス作用があるということは、5-FU の持つ本来の抗腫瘍効果も減少させてしまうのではないかという疑念が生じる。しかし以前の研究において、マウスに腫瘍細胞を移植し、5-FU と 5-HT₃R 阻害薬を同時投与した時の腫瘍サイズについて検討すると、5-HT₃R 阻害薬を投与しない場合と抗腫瘍効果に差はないという結果が得られている[8]。もし、5-HT₃R 阻害薬が内部経路を介して抗アポトーシス作用を示していれば、抗腫瘍作用も減弱するはずである。また今回の結果でも、5-HT₃R 作動薬の単独投与ではアポトーシスを誘導しなかったことから、5-HT₃R シグナルが直接アポトーシスシグナルに関与していることは考えにくい。また、5-HT_{3A}R-KO マウスで完全にアポトーシスが阻害されなかったこともこれを支持する結果である。よって、EC 細胞から分泌された 5-HT が IEC に直接働いているのではなく、免疫細胞や神経細胞の 5-HT 受容体を介して間接的にアポトーシスに関与しているものと考えら

れ、そしてそれは炎症性サイトカインの産生調整がなされているものと考えられる。実際に、血中 5-HT 濃度が 95%低下している TPH1 欠損マウスでは DSS 誘発性腸炎が改善され、炎症性サイトカインの産生も抑制されると報告されている[20]。さらに近年の総説では、腸管の樹状細胞に発現している 5-HT₇R が炎症性サイトカインの産生カスケードを開始することや、T 細胞や B 細胞といったリンパ球に発現する SERT が 5-HT を取り込むことで免疫反応を活性化するということが報告されている[55]。本研究では 5-HT₃R シグナルによって放出が増強された 5-HT がどの細胞に働き、アポトーシスに関与しているかまでは明らかにできなかったが、これらの細胞が候補になると考える。また、本研究では 5-FU 誘発性アポトーシスに関与する 5-HT₃R を発現する標的細胞として神経細胞を除外できていない。しかし、血漿中 5-HT 濃度の変化が大きいことと、これまでの報告から総合して考え、EC 細胞が関与しているのが妥当と判断した。

5-HT が炎症性サイトカインを増加させる働きを持つという報告[20]がある一方、5-HT が抗炎症に働くという報告も存在する。5-HT₄R シグナルは DSS 誘発性腸炎を改善し、腸管保護機能があることが報告されている[22]。また脳では TPH2 に由来する 5-HT は神経保護作用を持つことが報告されている[59]。このように 5-HT には炎症を促進するという報告と炎症を抑制するという、相反する報告が存在する。これは Gershon の剣と盾理論[60]といわれており、5-HT は腸管において攻撃にも防御にも働くというものである。しかし、どのような機構で、剣と盾が使い分けられているのかは未だ明らかになっておらず、5-HT/炎症研究の大きな謎の一つである。しかし、今回発見したことはこの剣と盾理論に一つの可能性を提唱することができる。5-HT は正常時すなわち非炎症時にも常に存在している。正常時にその 5-HT が 5-HT₄R に働き粘液産生や抗酸化作用を発揮し腸管保護機能に働いている[22]のは想像に難くない。それが炎症などの病態時になったとき、5-HT が剣として働くようになる。その引き金になるのが EC 細胞とは考えられないだろうか。EC 細胞は様々な刺激によって 5-HT を放出する、いわばセンサーのような役割をしている[56, 61]。炎症時には、腸内

細菌叢が変化したり、細胞のネクロシスや障害が生じることで ATP が放出されたりし、そのような刺激でも EC 細胞は 5-HT を放出する[55]。そこで働くのが 5-HT₃R である。5-HT₃R は EC 細胞から放出された 5-HT がオートクラインまたはパラクラインとして働くことで、EC 細胞からの 5-HT 放出をさらに増強させる。このような機構が働くことで、正常時と炎症時の 5-HT 濃度の差が大きくなることで、剣と盾の ON と OFF が切り替えられているのではないだろうか。実際にいくつかの研究では、DSS の投与でマウスの大腸組織中の 5-HT 量が上昇することが報告されており[62, 63]、ヒトでもクローン病や炎症性腸疾患患者の腸管で 5-HT の上昇が見られることがあることが知られている[64]。さらに、腸管での異常な 5-HT の増加が腸炎における炎症促進や血管新生に働いていることを示唆する報告もある[65]。よって 5-HT₃R シグナルの間接的な炎症およびアポトーシス促進作用は、EC 細胞からの 5-HT 放出を増強することで 5-HT 濃度を上昇させ、5-HT の盾としての働きを剣に切り替えることで生じている可能性がある。残念ながら、各 5-HT 受容体の 5-HT に対する濃度親和性について行われた研究はまだなく、今後 5-HT 受容体のサブタイプによって反応する 5-HT 濃度が異なることが明らかとなり、さらに 5-HT₄R などの保護作用に働く受容体では低い 5-HT 濃度で反応し、5-HT₇R などの炎症促進に働く受容体では高い 5-HT 濃度でなければ反応しないことなどが明らかとなれば、この仮説の説得性は上がるかもしれない。このような意味で本研究の結果が、混迷を極めている 5-HT/炎症研究に一石を投じるものと期待する。

本研究では 5-HT₃R 阻害薬による抗アポトーシス作用のメカニズムを完全に明らかにすることはできなかったが、EC 細胞の 5-HT₃R を介して間接的に抑制する可能性を示唆した。このメカニズムは 5-HT₃R 阻害薬による抗炎症作用にも共通する可能性があり、本研究の成果は 5-HT₃R 阻害薬のドラッグリポジショニングに向けて、有益な結果であると考えられる。実際に膝炎[7]や術後イレウス[4]などの病態モデルを用いた研究で 5-HT₃R 阻害薬の有効性が示唆されている。しかし本研究ではマウスの免疫細胞に 5-HT₃R は発現していないことを明

らかにしたが、ヒトの単球には 5-HT₃R が発現しているという報告もあり[16]、受容体発現には種差があることも考えられるため、5-HT₃R 阻害薬のドラッグリポジショニングには更なる研究が必要となる。また本研究では 5-HT₃R 阻害薬に着目したが、NK1R 阻害薬やドパミン受容体阻害薬といったそのほかの制吐剤にも抗炎症作用があることを示唆する報告もあり[2, 3]、制吐剤の抗炎症薬/抗アポトーシス薬としてのドラッグリポジショニングに向けた研究は今後も活発に行われると考えられ、本研究はその一助となると考える。

結論として、5-FU によって刺激を受けた EC 細胞は 5-HT を放出し、放出された 5-HT が EC 細胞上の 5-HT₃R にオートクラインまたはパラクラインとして働き、5-HT 放出をさらに増強し、血漿中 5-HT 濃度を上昇させる。この増加した 5-HT が免疫細胞や神経細胞の 5-HT 受容体または SERT を介し、炎症性サイトカインの産生を促進することで、アポトーシスが増強されると考えられる (図 18)。この際に働くと考えられる 5-HT 受容体の種類は 1 型~7 型までのすべての可能性が考えられるが、骨髄移植の結果より免疫細胞では少なくとも 5-HT₃R 以外であると考えられる。よって 5-HT₃R シグナルは間接的に 5-FU 誘発性アポトーシスを増強している可能性がある。

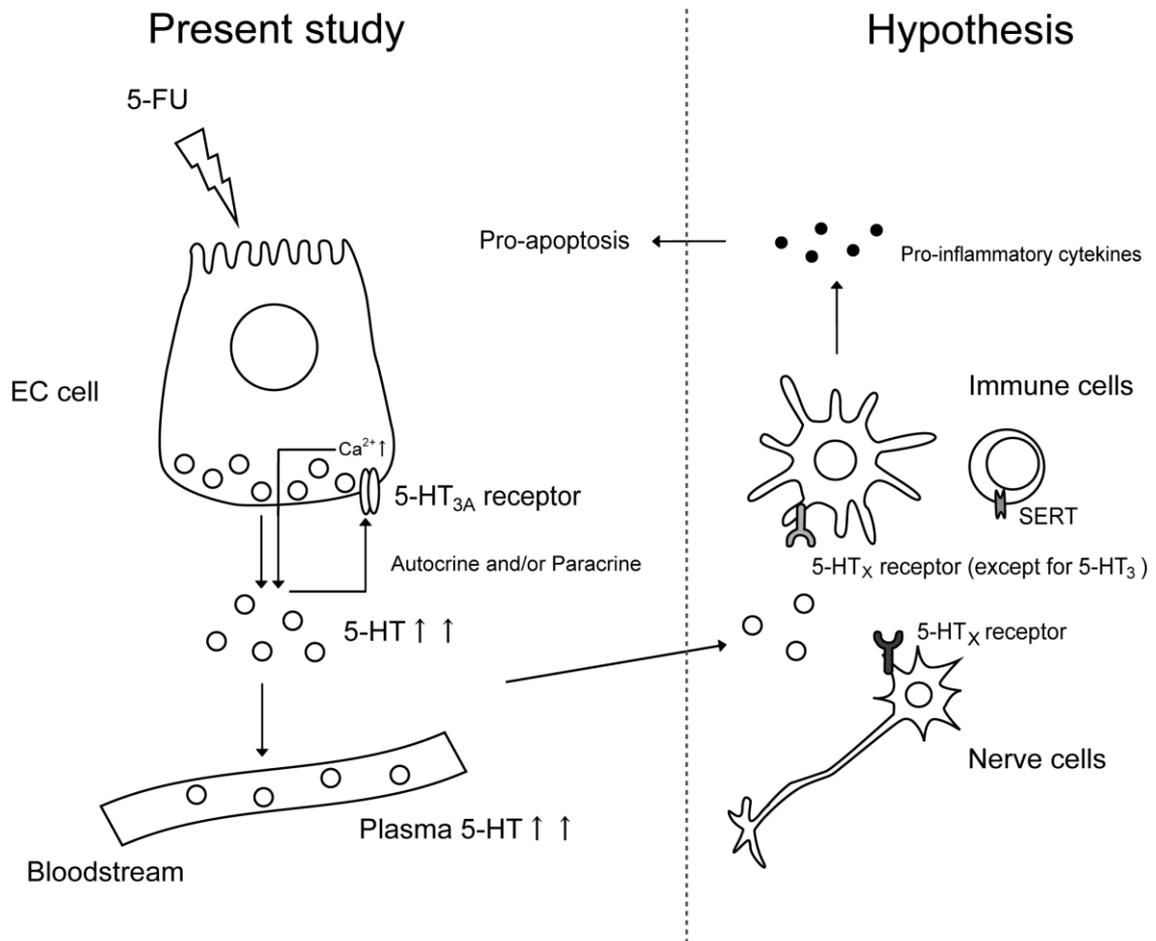


図 18. 5-HT₃R シグナルによる 5-FU 誘発性アポトーシス増強作用の概要図

5-HT₃R シグナルは 5-HT 放出を介して間接的に 5-FU 誘発性アポトーシスを増強している可能性がある。

【第 8 章 引用文献】

1. Becker, D.E., *Nausea, vomiting, and hiccups: a review of mechanisms and treatment*. *Anesth Prog*, 2010. **57**(4): p. 150-156; quiz 157.
2. Bendele, A.M., S.M. Spaethe, D.N. Benslay, and H.U. Bryant, *Anti-inflammatory activity of pergolide, a dopamine receptor agonist*. *J Pharmacol Exp Ther*, 1991. **259**(1): p. 169-175.
3. Spitsin, S., P. Tebas, J.S. Barrett, V. Pappa, D. Kim, D. Taylor, D.L. Evans, and S.D. Douglas, *Antiinflammatory effects of aprepitant coadministration with cART regimen containing ritonavir in HIV-infected adults*. *JCI Insight*, 2017. **2**(19).
4. Maehara, T., K. Matsumoto, K. Horiguchi, M. Kondo, S. Iino, S. Horie, T. Murata, H. Tsubone, S. Shimada, H. Ozaki, and M. Hori, *Therapeutic action of 5-HT₃ receptor antagonists targeting peritoneal macrophages in post-operative ileus*. *Br J Pharmacol*, 2015. **172**(4): p. 1136-1147.
5. Mousavizadeh, K., R. Rahimian, G. Fakhfouri, F.S. Aslani, and P. Ghafourifar, *Anti-inflammatory effects of 5-HT receptor antagonist, tropisetron on experimental colitis in rats*. *Eur J Clin Invest*, 2009. **39**(5): p. 375-383.
6. Utsumi, D., K. Matsumoto, K. Amagase, S. Horie, and S. Kato, *5-HT₃ receptors promote colonic inflammation via activation of substance P/neurokinin-1 receptors in dextran sulphate sodium-induced murine colitis*. *Br J Pharmacol*, 2016. **173**(11): p. 1835-1849.
7. Tsukamoto, A., T. Sugimoto, Y. Onuki, H. Shinoda, T. Mihara, M. Hori, and T. Inomata, *The 5-HT₃ Receptor Antagonist Ondansetron Attenuates Pancreatic Injury in Cerulein-Induced Acute Pancreatitis Model*. *Inflammation*, 2017. **40**(4): p. 1409-1415.

8. Yasuda, M., S. Kato, N. Yamanaka, M. Iimori, K. Matsumoto, D. Utsumi, Y. Kitahara, K. Amagase, S. Horie, and K. Takeuchi, *5-HT₃ receptor antagonists ameliorate 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis by suppression of apoptosis in murine intestinal crypt cells*. *Br J Pharmacol*, 2013. **168**(6): p. 1388-1400.
9. Pytliak, M., V. Vargova, V. Mechirova, and M. Felsoci, *Serotonin receptors - from molecular biology to clinical applications*. *Physiol Res*, 2011. **60**(1): p. 15-25.
10. Thompson, A.J. and S.C. Lummis, *5-HT₃ receptors*. *Curr Pharm Des*, 2006. **12**(28): p. 3615-3630.
11. Mawe, G.M. and J.M. Hoffman, *Serotonin signalling in the gut--functions, dysfunctions and therapeutic targets*. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2013. **10**(8): p. 473-486.
12. Maricq, A.V., A.S. Peterson, A.J. Brake, R.M. Myers, and D. Julius, *Primary structure and functional expression of the 5HT₃ receptor, a serotonin-gated ion channel*. *Science*, 1991. **254**(5030): p. 432-437.
13. Koyama, Y., M. Kondo, and S. Shimada, *Building a 5-HT_{3A} Receptor Expression Map in the Mouse Brain*. *Sci Rep*, 2017. **7**: p. 42884.
14. Navari, R.M. and M. Aapro, *Antiemetic Prophylaxis for Chemotherapy-Induced Nausea and Vomiting*. *N Engl J Med*, 2016. **374**(14): p. 1356-1367.
15. Camilleri, M. and G. Boeckxstaens, *Dietary and pharmacological treatment of abdominal pain in IBS*. *Gut*, 2017. **66**(5): p. 966-974.
16. Fiebich, B.L., R.S. Akundi, M. Seidel, V. Geyer, U. Haus, W. Muller, T. Stratz, and E. Candelario-Jalil, *Expression of 5-HT_{3A} receptors in cells of the immune system*. *Scand J Rheumatol Suppl*, 2004. **119**: p. 9-11.
17. Gershon, M.D. and J. Tack, *The serotonin signaling system: from basic understanding to drug development for functional GI disorders*. *Gastroenterology*, 2007. **132**(1): p. 397-414.

18. Mohammad-Zadeh, L.F., L. Moses, and S.M. Gwaltney-Brant, *Serotonin: a review*. J Vet Pharmacol Ther, 2008. **31**(3): p. 187-199.
19. Walther, D.J., J.U. Peter, S. Bashammakh, H. Hortnagl, M. Voits, H. Fink, and M. Bader, *Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform*. Science, 2003. **299**(5603): p. 76.
20. Ghia, J.E., N. Li, H. Wang, M. Collins, Y. Deng, R.T. El-Sharkawy, F. Cote, J. Mallet, and W.I. Khan, *Serotonin has a key role in pathogenesis of experimental colitis*. Gastroenterology, 2009. **137**(5): p. 1649-1660.
21. Kim, J.J., B.W. Bridle, J.E. Ghia, H. Wang, S.N. Syed, M.M. Manocha, P. Rengasamy, M.S. Shajib, Y. Wan, P.B. Hedlund, and W.I. Khan, *Targeted inhibition of serotonin type 7 (5-HT₇) receptor function modulates immune responses and reduces the severity of intestinal inflammation*. J Immunol, 2013. **190**(9): p. 4795-4804.
22. Spohn, S.N., F. Bianco, R.B. Scott, C.M. Keenan, A.A. Linton, C.H. O'Neill, E. Bonora, M. Dickey, B. Lavoie, R.L. Wilcox, W.K. MacNaughton, R. De Giorgio, K.A. Sharkey, and G.M. Mawe, *Protective actions of epithelial 5-hydroxytryptamine 4 receptors in normal and inflamed colon*. Gastroenterology, 2016. **151**(5): p. 933-944 e933.
23. Longley, D.B., D.P. Harkin, and P.G. Johnston, *5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(5): p. 330-338.
24. Inomata, A., I. Horii, and K. Suzuki, *5-Fluorouracil-induced intestinal toxicity: what determines the severity of damage to murine intestinal crypt epithelia?* Toxicol Lett, 2002. **133**(2-3): p. 231-240.
25. Boussios, S., G. Pentheroudakis, K. Katsanos, and N. Pavlidis, *Systemic treatment-induced gastrointestinal toxicity: incidence, clinical presentation and management*. Ann Gastroenterol, 2012. **25**(2): p. 106-118.

26. Lee, C.S., E.J. Ryan, and G.A. Doherty, *Gastro-intestinal toxicity of chemotherapeutics in colorectal cancer: the role of inflammation*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(14): p. 3751-3761.
27. Siber, G.R., R.J. Mayer, and M.J. Levin, *Increased gastrointestinal absorption of large molecules in patients after 5-fluorouracil therapy for metastatic colon carcinoma*. Cancer Res, 1980. **40**(10): p. 3430-3436.
28. Stein, A., W. Voigt, and K. Jordan, *Chemotherapy-induced diarrhea: pathophysiology, frequency and guideline-based management*. Ther Adv Med Oncol, 2010. **2**(1): p. 51-63.
29. Cubeddu, L.X., *Serotonin mechanisms in chemotherapy-induced emesis in cancer patients*. Oncology, 1996. **53 Suppl 1**: p. 18-25.
30. Smith, H.S., L.R. Cox, and E.J. Smith, *5-HT₃ receptor antagonists for the treatment of nausea/vomiting*. Ann Palliat Med, 2012. **1**(2): p. 115-120.
31. Rao, K.V. and A. Faso, *Chemotherapy-induced nausea and vomiting: optimizing prevention and management*. Am Health Drug Benefits, 2012. **5**(4): p. 232-240.
32. Cuda, C.M., R.M. Pope, and H. Perlman, *The inflammatory role of phagocyte apoptotic pathways in rheumatic diseases*. Nat Rev Rheumatol, 2016. **12**(9): p. 543-558.
33. Yardeni, T., M. Eckhaus, H.D. Morris, M. Huizing, and S. Hoogstraten-Miller, *Retro-orbital injections in mice*. Lab Anim (NY), 2011. **40**(5): p. 155-160.
34. Sato, T., R.G. Vries, H.J. Snippert, M. van de Wetering, N. Barker, D.E. Stange, J.H. van Es, A. Abo, P. Kujala, P.J. Peters, and H. Clevers, *Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche*. Nature, 2009. **459**(7244): p. 262-265.
35. Tuveson, D. *Whole Mount Immunofluorescence for Organoids*. Available from: <http://tuvesonlab.labsites.cshl.edu/links/>.

36. Grabinger, T., L. Luks, F. Kostadinova, C. Zimmerlin, J.P. Medema, M. Leist, and T. Brunner, *Ex vivo culture of intestinal crypt organoids as a model system for assessing cell death induction in intestinal epithelial cells and enteropathy*. Cell Death Dis, 2014. **5**: p. e1228.
37. Kanda, Y., *Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics*. Bone Marrow Transplant, 2013. **48**(3): p. 452-458.
38. Macor, J.E., D. Gurley, T. Lanthorn, J. Loch, R.A. Mack, G. Mullen, O. Tran, N. Wright, and J.C. Gordon, *The 5-HT₃ antagonist tropisetron (ICS 205-930) is a potent and selective alpha₇ nicotinic receptor partial agonist*. Bioorg Med Chem Lett, 2001. **11**(3): p. 319-321.
39. Wang, H., M. Yu, M. Ochani, C.A. Amella, M. Tanovic, S. Susarla, J.H. Li, H. Yang, L. Ulloa, Y. Al-Abed, C.J. Czura, and K.J. Tracey, *Nicotinic acetylcholine receptor alpha₇ subunit is an essential regulator of inflammation*. Nature, 2003. **421**(6921): p. 384-388.
40. Tasaka, Y., D. Yasunaga, T. Kiyoi, M. Tanaka, A. Tanaka, K. Suemaru, and H. Araki, *Involvement of stimulation of alpha₇ nicotinic acetylcholine receptors in the suppressive effect of tropisetron on dextran sulfate sodium-induced colitis in mice*. J Pharmacol Sci, 2015. **127**(3): p. 275-283.
41. Stegemann, A., A. Sindrilaru, B. Eckes, A. del Rey, A. Heinick, J.S. Schulte, F.U. Muller, S.A. Grando, B.L. Fiebich, K. Scharffetter-Kochanek, T.A. Luger, and M. Bohm, *Tropisetron suppresses collagen synthesis in skin fibroblasts via alpha₇ nicotinic acetylcholine receptor and attenuates fibrosis in a scleroderma mouse model*. Arthritis Rheum, 2013. **65**(3): p. 792-804.
42. Papke, R.L., J.K. Porter Papke, and G.M. Rose, *Activity of alpha₇-selective agonists at nicotinic and serotonin 5HT₃ receptors expressed in Xenopus oocytes*. Bioorg Med Chem Lett, 2004. **14**(8): p. 1849-1853.

43. Walker, D.P., D.G. Wishka, D.W. Piotrowski, S. Jia, S.C. Reitz, K.M. Yates, J.K. Myers, T.N. Vetman, B.J. Margolis, E.J. Jacobsen, B.A. Acker, V.E. Groppi, M.L. Wolfe, B.A. Thornburgh, P.M. Tinholt, L.A. Cortes-Burgos, R.R. Walters, M.R. Hester, E.P. Seest, L.A. Dolak, F. Han, B.A. Olson, L. Fitzgerald, B.A. Staton, T.J. Raub, M. Hajos, W.E. Hoffmann, K.S. Li, N.R. Higdon, T.M. Wall, R.S. Hurst, E.H. Wong, and B.N. Rogers, *Design, synthesis, structure-activity relationship, and in vivo activity of azabicyclic aryl amides as alpha7 nicotinic acetylcholine receptor agonists*. *Bioorg Med Chem*, 2006. **14**(24): p. 8219-8248.
44. Thrasher, J.D., N.B. Berg, and E. Hauber, *Natural variation in the S-phase of renewing epithelia of the pouchless opossum, Marmosa mitis*. *Cell Tissue Kinet*, 1971. **4**(2): p. 185-192.
45. Spangrude, G.J., *Assessment of lymphocyte development in radiation bone marrow chimeras*. *Curr Protoc Immunol*, 2008. **Chapter 4**: p. Unit 4 6.
46. Garg, S., W. Wang, B.G. Prabath, M. Boerma, J. Wang, D. Zhou, and M. Hauer-Jensen, *Bone marrow transplantation helps restore the intestinal mucosal barrier after total body irradiation in mice*. *Radiat Res*, 2014. **181**(3): p. 229-239.
47. Matsumoto, K., T. Nakajima, H. Sakai, S. Kato, A. Sagara, K. Arakawa, K. Tashima, M. Narita, and S. Horie, *Increased expression of 5-HT3 and NK 1 receptors in 5-fluorouracil-induced mucositis in mouse jejunum*. *Dig Dis Sci*, 2013. **58**(12): p. 3440-3451.
48. Dorrington, K.J., *Properties of the Fc receptor on macrophages*. *Immunol Commun*, 1976. **5**(4): p. 263-280.
49. Gebauer, A., M. Merger, and H. Kilbinger, *Modulation by 5-HT3 and 5-HT4 receptors of the release of 5-hydroxytryptamine from the guinea-pig small intestine*. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 1993. **347**(2): p. 137-140.
50. Racke, K., A. Reimann, H. Schworer, and H. Kilbinger, *Regulation of 5-HT release from enterochromaffin cells*. *Behav Brain Res*, 1996. **73**(1-2): p. 83-87.

51. Schworer, H., K. Racke, and H. Kilbinger, *Cisplatin increases the release of 5-hydroxytryptamine (5-HT) from the isolated vascularly perfused small intestine of the guinea-pig: involvement of 5-HT₃ receptors*. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 1991. **344**(2): p. 143-149.
52. Fatehullah, A., P.L. Appleton, and I.S. Nathke, *Cell and tissue polarity in the intestinal tract during tumorigenesis: cells still know the right way up, but tissue organization is lost*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2013. **368**(1629): p. 20130014.
53. Bohorquez, D.V., L.A. Samsa, A. Roholt, S. Medicetty, R. Chandra, and R.A. Liddle, *An enteroendocrine cell-enteric glia connection revealed by 3D electron microscopy*. *PLoS One*, 2014. **9**(2): p. e89881.
54. Satoh, Y., Y. Habara, K. Ono, and T. Kanno, *Carbamylcholine- and catecholamine-induced intracellular calcium dynamics of epithelial cells in mouse ileal crypts*. *Gastroenterology*, 1995. **108**(5): p. 1345-1356.
55. Spohn, S.N. and G.M. Mawe, *Non-conventional features of peripheral serotonin signalling - the gut and beyond*. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2017. **14**(7): p. 412-420.
56. Cooke, H.J., J. Wunderlich, and F.L. Christofi, *"The force be with you": ATP in gut mechanosensory transduction*. *News Physiol Sci*, 2003. **18**: p. 43-49.
57. Ju, J., J.C. Schmitz, B. Song, K. Kudo, and E. Chu, *Regulation of p53 expression in response to 5-fluorouracil in human cancer RKO cells*. *Clin Cancer Res*, 2007. **13**(14): p. 4245-4251.
58. Sun, X.X., M.S. Dai, and H. Lu, *5-fluorouracil activation of p53 involves an MDM2-ribosomal protein interaction*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(11): p. 8052-8059.
59. Liu, M.T., Y.H. Kuan, J. Wang, R. Hen, and M.D. Gershon, *5-HT₄ receptor-mediated neuroprotection and neurogenesis in the enteric nervous system of adult mice*. *J Neurosci*, 2009. **29**(31): p. 9683-9699.

60. Gershon, M.D., *5-Hydroxytryptamine (serotonin) in the gastrointestinal tract*. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes, 2013. **20**(1): p. 14-21.
61. Braun, T., P. Volland, L. Kunz, C. Prinz, and M. Gratzl, *Enterochromaffin cells of the human gut: sensors for spices and odorants*. Gastroenterology, 2007. **132**(5): p. 1890-1901.
62. Kim, J.J., H. Wang, J.D. Terc, B. Zambrowicz, Q.M. Yang, and W.I. Khan, *Blocking peripheral serotonin synthesis by telotristat etiprate (LX1032/LX1606) reduces severity of both chemical- and infection-induced intestinal inflammation*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2015. **309**(6): p. G455-465.
63. Shajib, M.S., H. Wang, J.J. Kim, I. Sunjic, J.E. Ghia, E. Denou, M. Collins, J.A. Denburg, and W.I. Khan, *Interleukin 13 and serotonin: linking the immune and endocrine systems in murine models of intestinal inflammation*. PLoS One, 2013. **8**(8): p. e72774.
64. Manocha, M. and W.I. Khan, *Serotonin and GI Disorders: An Update on Clinical and Experimental Studies*. Clin Transl Gastroenterol, 2012. **3**: p. e13.
65. Regmi, S.C., Y. Kang, S. Park, S.Y. Park, and J.A. Kim, *Role of serotonin in the pathogenesis of inflammatory bowel disease*. Faseb Journal, 2012. **26**.

謝辞

本論文をまとめるにあたり、終始多大なるご指導、ご鞭撻を頂きました東京大学大学院農学生命科学研究科獣医薬理学教室准教授 堀正敏先生に深く御礼申し上げます。思えば4年前、臨床系の研究室出身の私を迎え入れてくださり、基礎研究のいろはさえ分からない私に研究の面白さと難しさを教えていただき、無事にこのような形で博士論文を書き上げることができたのも偏に堀正敏先生のご指導のおかげであります。また、直接実験手技や動物の世話などのご指導を頂き、うまくデータが出ない時も真摯にご相談に乗ってくださり苦楽を共にした、先輩であり、現在では東京大学大学院農学生命科学研究科獣医薬理学教室助教の梶典幸先生に厚く御礼申し上げます。また現在では退官されてしまいましたが、私の研究や進路についての的確なご助言とご配慮を頂きました、東京大学大学院農学生命科学研究科獣医薬理学教室教授 尾崎博先生に厚く御礼申し上げます。本研究を行う上で、非常に重要なデータを得ることができた 5-HT_{3A}R-KO マウスおよび 5-HT_{3A}R-EGFP マウスをご提供いただき、また直接ご助言も賜りました大阪大学大学院医学系研究科神経細胞生物学教室教授 島田昌一先生、および准教授 近藤誠先生に深謝いたします。骨髄移植モデルマウスを製作する際には、東京大学大学院農学生命科学研究科獣医外科学教室教授 西村亮平先生、准教授 中川貴之先生、および大学院生 吉竹涼平君に多大なるご協力を頂きました。厚く御礼申し上げます。5-HT の ELISA 測定には北里大学東洋医学総合研究所臨床研究部上級研究員 遠藤真理さん、および東京大学大学院農学生命科学研究科獣医薬理学教室大学院生 三原大輝君に貴重なご助言を賜りました。厚く御礼申し上げます。また研究生活において心身ともに支えてくださった研究室の村田三知さん、曾川千鶴さん、楊群輝さん、黒澤珠希さん、長谷川乃映瑠さん、槇郁風さん、山崎貴子さん、加田浩大君、愛清哲君、伊賀千紘さん、花方敦紀君、そして行きつけのお店である本郷三丁目のアンモナイトコーヒーマーケットさん、池袋東口の beer pub カムデンさんに厚く御礼申し上げます。最後にいつまでも私を支えてくださる家族と我が家の猫たちに感謝申し上げます。

本研究は日本学術振興会科研費特別研究員奨励費 JP 16J05803 の助成を受けたものです。

本件研究で犠牲になったすべての動物たちにこの場を借りて哀悼の意を表します。