

論文の内容の要旨

獣医学専攻

平成26年度博士課程入学

氏名：三河 翔馬

指導教員名：堀 正敏

論文題目 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

【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ク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 α 7nAChR の部分作動薬として働くことが知られているが、 α 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-HT₃R シグナルの標的細胞を探索することとした。5-HT₃R 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-HT₃R 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-HT_{3R} 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-HT_{3R} 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、アポトーシスが増強されることが考えられた。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増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。