

炎症性腸疾患の抑制に関わる分子の探索

—動物モデルを用いた運動の効果—

飯泉 恭一*・重永 綾子**・都築 孝允***・川崎 広明†
山倉 文幸††・久保原 禪**

Search for molecules involved in the suppression of inflammatory bowel disease:
focusing on exercise using animal model

Kyoichi IIZUMI, Ayako SHIGENAGA, Takamasa TSUZUKI
Hiroaki KAWASAKI, Fumiyuki YAMAKURA, Yuzuru KUBOHARA

Key words : 炎症性腸疾患 Inflammatory bowel disease
運動 Exercise
二次元電気泳動 Two-dimensional electrophoresis
動物モデル Animal model

1. 緒言

炎症性腸疾患 (Inflammatory bowel disease: IBD) は潰瘍性大腸炎 (Ulcerative colitis: UC) やクローン病 (Crohn's disease: CD) を代表とする難治性疾患である。近年、IBD の患者数は増加しており、効果的な予防法や治療法の開発が期待されている^{1) 2)}。

一方、適度な運動は様々な炎症を抑制することが報告されている。IBD に関しても、動物モデルを用いた研究により、運動による炎症抑制効果が報告されている^{3) 4) 5)}。しかし、抑制の機序やそれに関わる分子については十分に解明されていない。そこで本研究では、動物モデル (マウス) を用いて、運動による IBD の抑制に関与する分子を探索することにした。具体的には、大腸に含まれるタンパク質を対象として、IBD 発症と運動によるその含有量の違いを網羅的に調べ、そこから

IBD 発症抑制の機序に関わる可能性のある分子を特定することにした。

2. 方法

2.1 動物

実験には BALB/c マウスの雄を使用した。3 週齢のマウスを日本 SLC より購入し、明暗サイクルに馴化させた (3 週間)。マウスは 1 ケージあたり 5~6 匹で飼育し、水と餌は自由に摂取させた。本研究では運動の有無と IBD 誘導の有無による違いを確認するため、それぞれを組み合わせた 4 群を設定した (図 1)。各群の動物は 4~12 匹で構成し、無作為に選択した。

2.2 運動

運動はトレッドミル (45 min/day; 10 m/min; 7° grade) による強制走行により実施した。各回、運動開始前の 5 分は低速 (5 m/min) で装置を駆動し、装置に慣れさせた後に運動を開始した。運動は週に 6 日実施し、

* 東北女子大学 ** 順天堂大学大学院
*** 名城大学 † 昭和女子大学
†† 順天堂大学

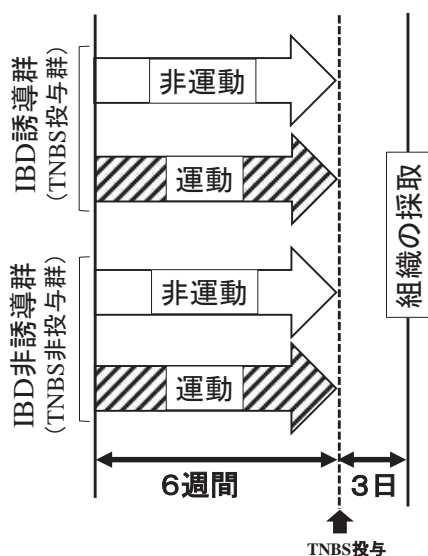


図1 実験群と実験日程の模式図
 運動の有無とIBD誘導の有無による違いを確認するため、4群を設定した。運動の期間は6週間として、期間終了後にTNBS (1.5 mg) の投与を実施した。TNBS非投与群には溶剤である50%エタノールのみを投与した。TNBSを投与して3日後に動物を安楽死させ、大腸組織を採取した。

6週間実施した。対照となる非運動マウスは、運動を実施するマウスと常に同じ環境に置き、運動の有無以外に差異が生じないようにした。

2.3 IBDの誘導

IBDは2, 4, 6-トリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS, Wako, Japan) を大腸に投与することで発症させた^{6) 7)}。6週間の運動を終了後、マウスは12時間絶食させ、イソフルランにより麻酔を行った。麻酔の効果を確認後、薬剤 (TNBS) 投与を実施した (図1)。投与には直径1 mmのポリエチレンチューブを用い、チューブの先端を肛門から4 cm挿入して投与した。TNBSの投与量は1匹あたり1.5 mgとし、50%エタノールに溶解して用いた。対照マウスは50%エタノールのみを投与した。投与液量はそれぞれ100 μ lとした。

2.4 大腸の採取

IBDを誘導してから3日後、動物をイソフルランで麻酔し、全採血による安楽死を実施した。大腸は肛門から5 cmの位置で切断し採取した。採取した大腸は液体窒素により急速凍結し、 -80°C のフリーザーで使用するまで保存した。

2.5 大腸組織に含まれるタンパク質の分析

大腸組織に含まれるタンパク質を比較するため、蛍光標識二次元ディファレンスゲル電気泳動法 (2D Difference Gel Electrophoresis: 2D-DIGE) を実施した。大腸組織を溶解液中 (30 mM Tris-HCl, 7M 尿素, 2M チオ尿素, 4% CHAPS) でホモジナイズし、Protein Assay kit (Bio-Rad, USA) によりタンパク質の濃度を測定した。各個体から得たサンプルは群ごとに等量ずつ混合し蛍光標識した。混合した各群の個体数は、TNBS投与・運動群が $n = 12$ 、TNBS投与・非運動群が $n = 5$ 、TNBS非投与・運動群が $n = 10$ 、TNBS非投与・非運動群が $n = 4$ である。標識にはCyDye DIGE Fluors (minimal dyes) for 2D-DIGE (GE Healthcare, UK) 試薬を用いた。標識したサンプルは等電点電気泳動法およびSDS-ポリアクリルアミド電気泳動法を実施して分離した。蛍光シグナルはTyphoon 9400 (GE Healthcare, USA) 用いて検出した。

2.6 タンパク質の同定

2D-DIGEにより含有量に差があると思われるスポットに関しては、そのタンパク質の同定を試みた。非蛍光標識タンパク質を二次元電気泳動し、クマシーブリアントブルーで染色後、対応するスポットを切り出した。ゲルからタンパク質を抽出後、トリプシン消化し、LC-ESI-MS/MS (Liquid Chromatography-ElectroSpray Ionization-Tandem Mass Spectrometry) 分析を実施し

炎症性腸疾患の抑制に関わる分子の探索
—動物モデルを用いた運動の効果—

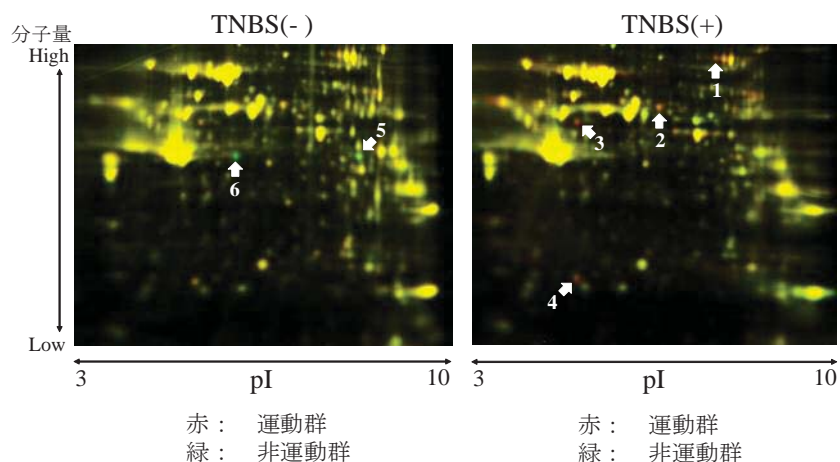


図2 2D-DIGE法を用いた大腸含有タンパク質の分析

蛍光標識したタンパク質は等電点（横軸）と分子量（縦軸）の違いにより分離した。左側のTNBS(-)はTNBS非投与群を、右側のTNBS(+)はTNBS投与群の結果を示している。どちらも運動群は赤色のシグナルで示され、非運動群は緑色のシグナルで示されている。代表的な赤色および緑色スポット（6個）を矢印で示した。

た (LXQ mass spectrometer, Thermo Fisher Scientific, USA)⁸⁾。データベース検索は MASCOT search engine (Matrix Science, UK) を利用した。

2.7 倫理

すべての動物実験は順天堂大学動物実験委員会の承認を受けた計画 (H29-06) に沿って実施した。

3. 結果

図2は 2D-DIGE の結果である。左側の TNBS(-)は TNBS を投与しなかった運動群と非運動群のタンパク質スポットを重ねて示している。右の TNBS(+)は TNBS を投与した運動群と非運動群の結果である。どちらも運動群のタンパク質は赤色のシグナルで示され、非運動群のタンパク質は緑色のシグナルで示されている。したがって、あるタンパク

質の含有量が両群で同等の場合、黄色のシグナルとして観察される。一方、赤色または緑色のシグナルが観察されるタンパク質は両群において含有量に違いがあることを示している。

図2右 (TNBS(+)) では、赤色と緑色の複数のスポットが確認された。図2左 (TNBS(-)) においても、緑および薄い赤のスポットが確認された。特にシグナル強度に差があると思われたスポットを矢印で示している。

存在量に違いがあると思われたタンパク質のスポット6個（図2において矢印と数字で示している）に関しては、LC-ESI-MS/MS 分析によるタンパク質の同定を試みた（表1）。ここではスポットごとにスコア（同定タンパク質の確からしさ）の高かった2種類のタンパク質名を記している。

表1 LC-ESI-MS/MS分析によって同定されたタンパク質

Spot No.	Protein	Nominal mass (Da)	Calculated pI value	Sequence coverage (%)	Accession No.
1	MICOS complex subunit Mic60	84247	6.18	59	Q8CAQ8
	Serotransferrin	78841	6.94	28	Q92111
2	Keratine, typeII cytoskeletal 8	54531	5.70	48	P11679
	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	57347	6.12	21	Q61753
3	Keratine, typeII cytoskeletal 8	54531	5.70	71	P11679
	Fibrinogen gamma chain	50044	5.54	48	Q8VCM7
4	Apolipoprotein A-I	30597	5.51	65	Q00623
	Ras-related protein Rab-11A	24492	6.12	39	P62492
5	Creatine kinase M-type	43246	6.58	71	P07310
	Fumarylacetoacetase	46488	6.70	36	P35505
6	Actin, cytoplasmic I	42052	5.29	63	P60710
	Keratine, typeI cytoskeletal 19	44515	5.28	83	P19001

2D-DIGEにより存在量に差があると思われた6カ所のスポットを質量分析し、タンパク質を同定した。それぞれ、MASCOT searchにより最もスコアの高いタンパク質と2番目にスコアの高いタンパク質を記した。

4. 考察

本研究では、運動によるIBDの抑制に関与する分子を探索するため、2D-DIGE法を実施した。その結果、それらに関与する可能性のある複数のタンパク質を同定することができた。これらのうち、Spot No. 2のKeratine, typeII cytoskeletal 8は、その遺伝子欠損マウスにおいて大腸炎を引き起こすことが報告されている⁹⁾。また、Spot No. 4のRas-related protein Rab-11Aに関しても、腸上皮細胞における同遺伝子のコンディショナルノックアウトにより、炎症性サイトカインの発現量が増加することが報告されている¹⁰⁾。TNBS(+)¹¹⁾の運動群では、非運動群と比較してそれらのタンパク質含有量が多く、運動がIBDを抑制する機序の一つである可能性が示唆された。今後、これらのタンパク質とUC、CDなどとの関連が詳細に分析されることが期待される。

5. 謝辞

本研究は「中富健康科学振興財団」および「順天堂大学学内共同研究」の助成を受けて実施したものです。

6. 参考文献

- 1) Nishida, A., Inoue, R., Inatomi, O., Bamba, S., Naito, Y., Andoh, A., (2018) Gut microbiota in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Clin J Gastroenterol.* 11(1): 1–10.
- 2) Ananthkrishnan, A. N., Bernstein, C. N., Iliopoulos, D., Macpherson, A., Neurath, M. F., Ali, R., et al. (2018) Environmental triggers in IBD: a review of progress and evidence. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 15(1), 39–49.
- 3) Narula, N., & Fedorak, R. N., (2008). Exercise and inflammatory bowel disease. *Canadian journal of gastroenterology. Journal canadien de gastroenterologie*, 22(5), 497–504.
- 4) Szalai, Z., Szász, A., Nagy, I., Puskás, L. G., Kupai, K., Király, A., et al. (2014). Anti-inflammatory effect of recreational

炎症性腸疾患の抑制に関わる分子の探索
—動物モデルを用いた運動の効果—

- exercise in TNBS-induced colitis in rats: role of NOS/HO/MPO system. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2014, 925981.
- 5) Bilski, J., Mazur-Bialy, A. I., Brzozowski, B., Magierowski, M., Jasnos, K., Krzysiek-Maczka, G., et al. (2015) Moderate exercise training attenuates the severity of experimental rodent colitis: the importance of crosstalk between adipose tissue and skeletal muscles. *Mediators of inflammation*, 2015, 605071. <https://doi.org/10.1155/2015/605071>
- 6) Wirtz, S., Neufert, C., Weigmann, B., & Neurath, M. F. (2007). Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. *Nature protocols*, 2(3), 541–546.
- 7) Scheiffele, F., & Fuss, I. J. (2002). Induction of TNBS colitis in mice. *Current protocols in immunology*, Chapter 15, .
- 8) Kawasaki, H., Tominaga, M., Shigenaga, A., Kamo, A., Kamata, Y., et al. (2014). Importance of tryptophan nitration of carbonic anhydrase III for the morbidity of atopic dermatitis. *Free radical biology & medicine*, 73, 75–83.
- 9) Liu, C., Liu, E. D., Meng, Y. X., Dong, X. M., Bi, Y. L., Wu, H. W., et al. (2017) Keratin 8 reduces colonic permeability and maintains gut microbiota homeostasis, protecting against colitis and colitis-associated tumorigenesis. *Oncotarget*, 8(57), 96774–96790.
- 10) Yu, S., Nie, Y., Knowles, B., Sakamori, R., Stypulkowski, E., Patel, C., et al. (2014) TLR sorting by Rab11 endosomes maintains intestinal epithelial-microbial homeostasis. *The EMBO journal*, 33(17), 1882–1895.