

研究ノート

Indomethacin 誘発性腸管傷害ラットにおける
血漿 α -1 酸性糖タンパク質 (AGP) の変動菊地 優子^{1)*}, 熊井 まどか¹⁾, 南 久則²⁾¹⁾長崎国際大学 健康管理学部 健康栄養学科、²⁾熊本県立大学 環境共生学部 食健康科学科、*連絡対応著者)Change of Alpha-1 Acid Glycoprotein in Indomethacin-induced
Small Intestinal UlcersYuko KIKUCHI^{1)*}, Madoka KUMAI¹⁾ and Hisanori MINAMI²⁾¹⁾Dep. of Health and Nutrition, Faculty of Health Management, Nagasaki International University, ²⁾Dep. of Food & Health Sciences, Faculty of Environmental & Symbiotic Sciences, Prefectural University of Kumamoto, *Corresponding author)

Abstract

A large number of injections of indomethacin (Indo) leads to acute mucosal lesions similar to Crohn's disease. Previously, using sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), we found increased proteins after injections of Indo. In the present study, we identified these proteins and investigated their relationship with inflammation. Intestinal inflammation was induced in male Sprague-Dawley rats by administration of two subcutaneous injections of Indo. Components of plasma and protein extracts of liver and intestinal mucosa were separated by SDS-PAGE, and proteins were detected by Coomassie Brilliant Blue and periodic acid-Schiff (PAS) staining, which stains glycoproteins, and identified by western blotting. The macroscopic inflammation score was highest 3 days after the injections of Indo. Protein bands of 37–50 kDa detected by PAS staining were increased 2 or 3 days of injection. We expected that one of the proteins would be alpha-1 acid glycoprotein (AGP), which is related to inflammation, and this was confirmed by western blot. AGP was increased in the liver, intestinal mucosa, and plasma. These results suggested that AGP could be used as an index of the degree of inflammatory diseases.

Key words

Indomethacin, Alpha-1 acid glycoprotein, Crohn's disease

要 旨

ラットに Indomethacin (Indo) を投与するとクローン病 (CD) 様の腸管傷害がみられる。本モデルにおいて血漿タンパク質の SDS-PAGE 解析をおこなったところ、増加するタンパク質が認められた。そこで本研究ではこれらのタンパク質を同定し、炎症との関連を検討することを目的とした。Indo 投与後の経日的変化を観察した結果、腸管傷害は投与 2、3 日目で重篤となり、同時に 37~50kDa のタンパク質に増加がみられた。これらのタンパク質は PAS 染色陽性であり、糖タンパク質であった。これらの特徴より推測し、ウエスタンブロッティングを行った結果、 α -1 酸性糖タンパク質 (AGP) であることを明らかにした。また、AGP は血中のみならず、肝臓や小腸においても増加しており、炎症による産生亢進が示唆された。AGP は CRP に比べて血中濃度が高く、CBB 染色で容易に判別できるため、実験動物等における炎症状態の判定にも利用できると考えられる。

キーワード

インドメタシン、 α -1 酸性糖タンパク質、クローン病

I. 緒 言

炎症性腸疾患のひとつであるクローン病 (Crohn's disease; CD) は原因不明の難治性疾患である。主に若年者に発症し、口腔から肛門に至る消化管のあらゆる部位に病変が生じ、下痢、腹痛などの消化管症状に加え、発熱や栄養障害などの全身症状がみられる¹⁾。患者数は食の欧米化とともにここ20年で急激に増加しており、発症の要因として遺伝学的因子、食事や環境衛生などの環境因子、腸内細菌、免疫応答の破綻などがあげられているが、原因特定されておらず、完治させる方法もみつかっていない^{2, 3)}。CDの診断は、慢性的な下痢、腹痛や貧血、低タンパク質、高度炎症などの血液検査結果を根拠とし、縦走潰瘍や敷石像などの特異的所見を内視鏡検査、X線造影などにより確認する^{1, 4)}。CDは寛解と再発を繰り返す疾患であるため、診断後も活動性の判定や治療効果のモニタリングを行う上で内視鏡検査やX線検査が必要となることが多い⁵⁾。しかし、このような検査は患者にとっては侵襲が大きく、負担となる。そのため、CDの診断やモニタリングに利用できる非侵襲的かつ簡便なバイオマーカーの開発が求められている。

CDなどの炎症性腸疾患の実験モデルとしてはSAMP1/Yitマウスなどの自然発症モデルやIL-10ノックアウトマウスなどの遺伝子操作モデル、化学物質により誘発するモデルなどがある⁶⁻⁸⁾。非ステロイド系消炎鎮痛薬 (nonsteroidal anti-inflammatory drugs; NSAIDs) である Indomethacin (Indo) は化学物質誘発性腸炎モデルに用いられる薬剤のひとつである。NSAIDsは、炎症を引き起こすPGE2などのプロスタグランジンの合成に必要な酵素であるシクロオキシゲナーゼを阻害することにより、抗炎症作用を発揮する⁹⁾。しかしながら、ラットにIndoを5-30mg/kg投与することにより、腸細胞間ジャンクションの崩壊と透過性の亢進や、上皮バリアの機能の変化により小腸管腔内細菌の過成長やバクテリアルトランスロケーションが

促され、小腸に潰瘍を生じることが報告されている^{10, 11)}。

我々はこれまでにIndo投与による腸管傷害ラット (CDモデルラット) において抗体産生能の変化や腸管透過性に関する研究を行い、その研究の過程において血漿タンパク質のSDS-PAGEを行ったところ、Indo投与後に増加するタンパク質の存在を認めた。そこで本研究では、Indo投与時に増加したタンパク質を同定し、腸管傷害との関連を検討した。

II. 方 法

1. CDモデルラットの作製およびサンプルの採取

実験には九動株式会社より入手した7週齢Sprague-Dawley系雌性ラット18匹 (0、1、2日目解剖群4匹、3日目解剖群5匹、7日目1匹) を用い、12時間の明暗サイクルの飼育室で個別ケージにて飼育を行なった。飼育期間中は自由摂食、自由飲水とし、毎日定時に体重と摂食量を記録した。Indomethacin (SIGMA) は5%NaHCO₃溶液に溶解し、馴化後のラットに2日間連続皮下注射 (9 mg/kg BW) して小腸傷害を惹起させ、CDモデルラットとした。Indo投与前に解剖を行った群 (Indo非投与群) を投与0日目とし、投与1、2、3、7日目に解剖を行い、血液、肝臓、小腸粘膜を採取した。血液は腹部下大静脈より採取し、3,000rpmで15分間遠心後血漿を得た。小腸は内腔をリン酸緩衝食塩水で洗浄後切開し、スクラップして粘膜を採取した。サンプルは分析まで-30°Cで保存した。また、開腹時にChenらの方法¹²⁾ (表1) に基づいた肉眼的評価と小腸全長の測定を行った。

なお、本研究の実施にあたっては、熊本県立大学生命倫理審査委員会の承認 (No.25-03) を得た。

表1 小腸傷害スコア

	Score	Abbreviation
腸間膜の癒着傷害	0	None
	1	Minimal
	2	Involving several bowel loops
小腸壁の厚さ	0	<1 mm
	1	1-3 mm
	2	>3 mm
充血	0	None
	1	Recognized
潰瘍	0	None
	1	Single ulcer
	2	Multiple (<10cm)
	3	Multiple (>10cm)

2. Coomassie brilliant blue (CBB) 染色および PAS 染色

各サンプルのタンパク質濃度はプロテインアッセイ (BIO-RAD) を用いた Bradford 法により測定した。サンプル間のタンパク量が一定となるように試料を調製し、等量の 2 × サンプルバッファーを加え 95°C で 5 分間熱変性させた。調製後のサンプルは 10% アクリルアミドゲルを用い、SDS-PAGE を行った後、Bio-Safe Coomassie (BIO-RAD) を用いてタンパク質の染色を行った。また、Pierce Glycoprotein Staining Kit (Thermo scientific) を用いて PAS 染色を行い、糖タンパク質を検出した。染色後のゲルはルミノイメーリアナライザー LAS-1,000plus および Image Reader LAS-1000 Life (FUJIFILM) を用いて撮影し (Digitizing mode)、Science Lab 99 Image Gauge (FUJIFILM) を用いて画像を処理した。

3. α -1-酸性糖タンパク質 (α -1-acid glycoprotein; AGP) のウエスタンブロッティング

2 の手順で試料を SDS-PAGE で分離後、PVDF メンブレン (BIO-RAD) に転写し、ウエスタンブロッティングを行った。一次抗体として Rabbit anti-rat α -1-acid glycoprotein

(Life diagnostics) を用い、二次抗体として Goat anti-Rabbit IgG Polyclonal Antibody, HRP conjugate (Assay designs) を用いた。ECL Plus (GE Healthcare) により化学発光、Image Reade LAS-1000 Life (FUJIFILM) を用いてバンドを検出した後、ImageJ (Rasband, W.S., Image J, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2016) を用いてバンドの濃さを数値化した。

4. 統計処理

小腸全長および傷害スコアは、一元配置分散分析の後、Dunnett T3 の多重比較検定により比較した。なお、Indo 投与 7 日目のデータに関しては、1 匹分のみのデータであるため、解析からは除外した。

III. 結果

1. Indo 投与後の小腸傷害スコアおよび小腸全長

Indo 投与後、ラットの摂食量および体重は減少した。また、解剖時には小腸の出血、癒着などが観察され、それらを点数化した小腸傷害スコアは Indo 投与後増加し、投与前 (0 日目)、1 日目に対し、投与 2、3 日目において有意な上

昇がみられた。また、小腸全長は癒着などにより短縮がみられ、0日目に対し、投与2、3日目において有意な低下がみられた(図1)。

2. CBB 染色および PAS 染色

血漿タンパク質を SDS-PAGE により分離し、

CBB 染色を行った結果、Indo 投与後、2～3日目に分子量 37～50kDa のタンパク質の増加が認められた。(図2-A)。また、PAS 染色においてもそれらのタンパク質が検出され、増加したタンパク質が糖タンパク質であることが示された(図2-B)。

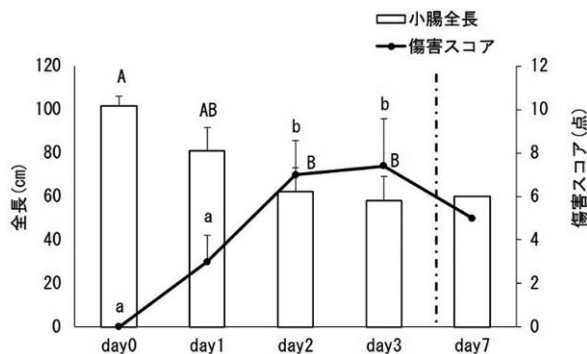


図1 Indo 投与後の小腸全長および傷害スコアの経日的変化

Indo 投与0、1、2、3、7日目の小腸全長および表1に基づく傷害スコアを示した(平均±標準偏差)。小腸全長は腸管傷害に伴い短縮した。傷害スコアにおいてもIndo投与後経日的に上昇し、3日目で最も高い値となった(A-B、a-b異なる文字間に有意差あり)。

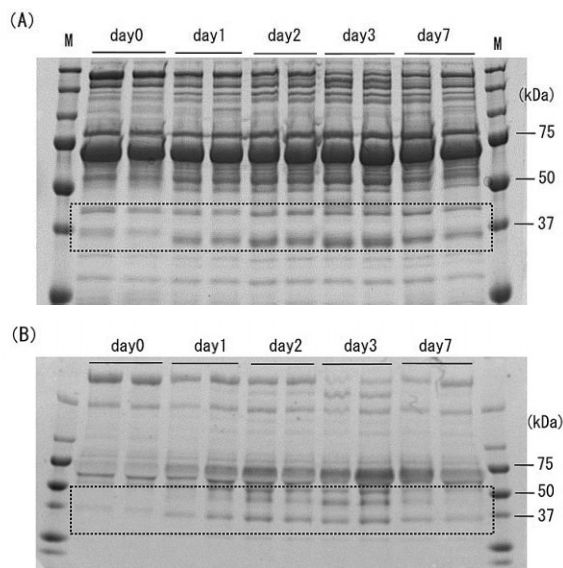


図2 Indo 投与後のラット血漿タンパク質 SDS-PAGE

Indo 投与前を day 0 とし、投与 1、2、3、7 日目の血漿タンパク質を SDS-PAGE で分離後、CBB 染色および PAS 染色を行った。Indo 投与後に 37～50kDa 付近のタンパク質の増加がみられた。

3. ウェスタンブロッティング

分子量や PAS 染色による染色性から、Indo 投与時に増加したタンパク質が AGP であることが推察されたため抗-ラット AGP 抗体を用いたウェスタンブロッティングを行ったところ、増加したバンド付近のタンパク質が抗ラット AGP 抗体により検出された。さらに、肝臓や小腸粘膜における AGP の変化を検討したとこ

ろ、血漿同様に Indo 投与 2～3 日目に増加した (図 3)。

IV. 考 察

本研究では Indo 投与後に増加する血漿タンパク質を同定し、Indo 投与に伴う腸管傷害との関連を検討した。Indo 投与後の腸管傷害の重症度を傷害スコアおよび小腸全長により経日的に

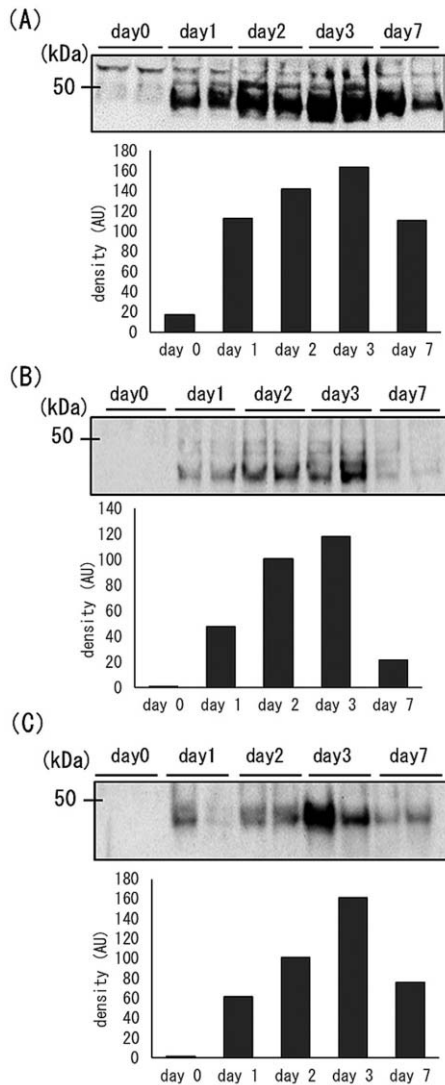


図 3 Indo 投与ラットにおける AGP のウェスタンブロッティング

Indo 投与後のラット血漿タンパク質を SDS-PAGE により分離した後、AGP のウェスタンブロッティングを行ったところ、Indo 投与後の群においてバンドが検出され、AGP が増加したことが示された(A)。また、肝臓(B)や小腸粘膜(C)においても Indo 投与後に AGP が増加した。

評価した結果、小腸傷害スコアは Indo 投与 3 日目にピークとなり、小腸全長も投与 3 日目に最も短かった。小腸全長の短縮は Indo 投与による腸管の癒着や萎縮が生じた結果であると考えられる。これらの結果より、Indo 投与による腸管傷害は投与 2、3 日目に重症度が高くなることが示された。次に血漿タンパク質の SDS-PAGE を行い、タンパク質を分離したところ腸管傷害の重篤となる 2、3 日目において、分子量 37~50kDa 付近のタンパク質増加がみられた。また、糖タンパク質を染色する PAS 染色においてもそれらのタンパク質は検出された。増加したタンパク質は 37~50kDa であり、炎症に関連する糖タンパクであることから、本タンパク質が AGP であると推測されたため、ウエスタンブロッティングを行い、AGP であることを明らかにした。AGP は主に肝臓において産生され、肝細胞により分泌される血漿タンパク質であるが、肝臓以外の様々な組織においても産生されることが報告されている¹³⁾。そのため、AGP の主な産生部位である肝臓と、実際に炎症を生じている部位である小腸における AGP の発現を検討したところ、いずれの組織においても血漿と同様に、症状が重篤となる Indo 投与 2、3 日目において増加することが示された。このことから、腸管傷害時の血漿 AGP の増加は、肝臓だけでなく、炎症部位である小腸においても炎症のピーク時にみられ、これらの組織が AGP の産生に寄与していることが示された。

炎症状態の指標として用いられているもののひとつに、C反応性タンパク質 (C-reactive protein ; CRP) がある。CRP は IL-6 などのサイトカインの作用により肝細胞において産生される急性期タンパク質であり、炎症発生後 48 時間でピークの値となるため、短期的な炎症状態を反映する^{14, 15)}。健常者の CRP 濃度の中央値は 0.08 mg/dL であり、0.3mg/dL が基準値である¹⁵⁾。一方、AGP の血中濃度は約 50mg/dL であり、炎症時には 2~5 倍に増加する¹⁶⁾。AGP は CRP に比べて血中濃度が高いことから、SDS

-PAGE で分離後、CBB 染色で容易に判別できるため、実験動物等における炎症状態の判定にも利用できると考えられる。また、AGP はその 45% がシアル酸を多量に含む炭水化物であり、5 個の N 結合型糖鎖を持つ酸性タンパク質である^{17, 18)}。急性応答として、炎症時には AGP などの急性タンパク質のグリコシレーションが変化することが知られており、枝分かれの程度、糖鎖のフコシル化やシアリル Lewisix エピトープ発現の構造が変化することが報告されている¹⁷⁾。そのため、今後、発症前後や組織間での AGP の構造の違いを明らかにすることで、炎症時における AGP の変化をより詳細に検討できる。

しかしながら、本研究における AGP の変化はウエスタンブロッティングによる半定量のデータであるため、今後、ELISA 法を用いた定量を行うとともに、例数を増やすことでより詳細にラットの症状と AGP との関連を検討することが必要である。このような限界点はあるものの、AGP は腸管傷害や炎症状態を示すために有効なバイオマーカーになり得ると考える。また、CD 患者においても AGP 濃度の変化のみならず、重症度、病変部位等の病状と AGP 糖鎖の分岐やフコシル化の程度といった構造の変化を検討することにより、CD の病態を判定するマーカーとしての活用が期待される。

文 献

- 1) 厚生労働省科学研究費補助金 難治性疾患等政策研究事業「難治性炎症性腸管障害に関する調査研究」(鈴木班)(2018)「潰瘍性大腸炎・クローン病診断基準・治療方針」<http://www.ibdjapan.org/pdf/doc01.pdf> (2018年11月9日閲覧)
- 2) 日比紀文, 小林拓, 久松理一 (2017)「炎症性腸疾患の病態」『日本臨床』第75巻3号, 364-369頁.
- 3) Okumura R, Takeda K. (2016) Maintenance of gut homeostasis by the mucosal immune system.' *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 92(9), PP. 423-435.
- 4) 鈴木康夫 (2017)「炎症性腸疾患の診断基準・鑑

- 別診断」『日本臨床』第75巻3号, 371-375頁.
- 5) 井上卓也, 能田貞治, 樋口和秀 (2016) 「炎症性腸疾患診療におけるバイオマーカーの有用性」『医学のあゆみ』第256巻10号, 1044-1047頁.
- 6) Ernst PB, Wiznerowicz EB, Feldman SH., et al. (2011) Pathogenesis of gastritis in ileitis-prone SAMP1/Yit mice.' *Keio J Med.* 60(2), PP. 65-68.
- 7) Kühn R, Löhler J, Rennick D., et al. (1993) Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis.' *Cell.* 75(2), PP. 263-274
- 8) Randhawa PK, Singh K, Singh N., et al. (2014) A review on chemical-induced inflammatory bowel disease models in rodents.' *Korean J Physiol Pharmacol.* 18(4), PP. 279-288.
- 9) Suemasu S, Tanaka K, Namba T., et al. (2009) A Role for HSP70 in Protecting against Indomethacin-induced Gastric Lesions.' *J Biol Chem.* 284(29), PP. 19705-19715.
- 10) Porras M, Martin MT, Yang PC., et al. (2006) Correlation between cyclical epithelial barrier dysfunction and bacterial translocation in the relapses of intestinal inflammation.' *Inflamm Bowel Dis.* 12(9), PP. 843-852.
- 11) Natividad JM, Huang X, Slack E., et al. (2009) Host responses to intestinal microbial antigens in gluten-sensitive mice.' *Plos One.* 4(7), PP. e6472.
- 12) Chen K, Nezu R, Inoue M., et al. (1997) Beneficial effects of growth hormone combined with parenteral nutrition in the management of inflammatory bowel disease: an experimental study.' *Surgery.* 121, PP. 212-218.
- 13) Fournier T, Medjoubi-N N, Porquet D. (2000) Alpha-1-acid glycoprotein.' *BBA Clin.* 1482(1-2), PP. 157-171.
- 14) Meuwis MA, Vernier-Massouille G, Grimaud JC., et al. (2013) Serum calprotectin as a biomarker for Crohn's disease.' *J Crohns Colitis.* 7(12), PP. e678-683.
- 15) Pepys MB, Hirschfield GM. (2003) C-reactive protein: a critical update.' *J Clin Invest.* 111(12), PP. 1805-1812.
- 16) Komori H, Watanabe H, Shuto T., et al. (2012) α ₁-Acid glycoprotein up-regulates CD163 via TLR4/CD14 protein pathway: possible protection against hemolysis-induced oxidative stress.' *J Biol Chem.* 281(36), PP. 30668-30700.
- 17) Van Dijk W, Brinkman-Van der Linden EC, Havenaar EC. (1998) Glycosylation of α ₁-acid glycoprotein (orosomuroid) in health and disease: occurrence, regulation and possible functional implications.' *Trends Glycosci Glycotechnol.* 10(53), PP. 235-245.
- 18) Yoshima H, Matsumoto A, Mizuochi T., et al. (1981) Comparative study of the carbohydrate moieties of rat and human plasma alpha 1-acid glycoproteins.' *J Biol Chem.* 256(16), PP. 8476-8484.