

腸炎発症に伴うプロテアーゼ受容体の機能変化に関する研究

Study of the functional changes in protease-activated receptor 2 after intestinal inflammation

佐藤 晃一 ・ 二宮 弘通 ・ 大蔵 信亮 ・ 那須 哲之
(Koichi Sato) (Hiromichi Ninomiya) (Shinsuke Ohkura) (Tetsuyuki Nasu)

山口大学農学部獣医学科家畜薬理学教室



はじめに

炎症性腸疾患にみられる消化管運動機能の低下は、腸内フローラの乱れや栄養障害を引き起こし、疾患をさらに悪化させることから、病態を理解するうえで非常に重要な意味をもつ。これまで、消化管の運動機能障害は、平滑筋の電位依存性Ca²⁺チャネルの抑制やK⁺チャネルの活性化¹⁾²⁾、活性化酸素の産生³⁾、神経系の構造や機能変化⁴⁾などさまざまな機構が関与することが示唆されている。一方、炎症時に増加するトリプターゼや血液凝固因子ならびにトリプシンにより活性化されるプロテアーゼ受容体2 (protease-activated receptor 2; PAR2)は、消化管にも多数発現しており、消化管分泌のみならずその運動性もPARの調節下に置かれている⁵⁾。しかし、腸炎発症時の消化管平滑筋におけるPAR2発現と機能変化については明らかにされていない。本研究では、デキストラン硫酸ナトリウム (dextran sodium sulfate; DSS) 投与により作製した実験的大腸炎モデルラットを使用し、結腸平滑筋におけるPAR2の変化について検討した。



実験材料および方法

1. 実験的大腸炎モデルラットの作製

雄性SDラット(7~10週齢)へ、5%DSSを5~

7日間自由飲水させることで作製した(DSS投与ラット)。対照として、水道水を自由飲水させたラットを用いた(コントロールラット)。

2. MPO活性測定法

組織炎症の指標であるmyeloperoxidase (MPO)活性は、Bradleyら⁶⁾の方法を一部改変して測定した。摘出した遠位結腸部の脂肪組織および結合組織を除去し、縦走筋方向に切開してシート状にした。ピンセットで筋層と粘膜を分離し、それぞれのMPO活性をU/mg proteinで算出した。

3. 張力測定法

摘出した遠位結腸部の筋層と粘膜を分離し、筋層の輪走筋方向に発生する収縮張力を等尺性に記録した。実験終了後に標本の湿重量を計測し、数値化した収縮を湿重量あたりの絶対張力として評価した。

4. PAR2発現量測定

摘出した遠位結腸部の筋層と粘膜を分離し、筋層標本より得られたRNAサンプルを用いて半定量的RT-PCR(reverse transcriptase-polymerase chain reaction)を行った。2%アガロースゲルを用いて電気泳動した後、エチジウムブロマイドで可視化した。各バンドはイメージスキャナーで取り込んだ後に数値化した。



結果および考察

DSSを7日間投与したラット(7日間DSS投与ラット)では、消化管からの出血、体重減少、結腸の短縮が認められ、組織学的検討からは筋層の肥厚が明らかとなった。MPO活性は粘膜層標本においてのみ増加し、DSS処置日数に依存して遠位結腸粘膜層における炎症が増大していることが示唆された。コントロールラットの摘出遠位結腸輪走筋標本におけるKClおよびcarbachol収縮に対して、トリプシンおよび選択的PAR2活性化ペプチドのSLIGRL-NH₂の適用は、強い弛緩を引き起こした。これらの弛緩は、一酸化窒素合成酵素(nitric oxide synthase; NOS)の非選択的遮断薬であるL-NMMA、各種神経伝達阻害薬(tetrodotoxin, hexamethonium, propranolol hydrochloride)前処置による影響を受けなかったが、small conductance Ca²⁺-activated K⁺(SK_{Ca})チャンネルの選択的遮断薬であるapaminの前処置により、PAR2活性化を介する弛緩は有意に減弱したことから、この弛緩機構はSK_{Ca}チャンネルを介することが示唆された。

DSS投与ラットの平滑筋標本において、トリプシンによるPAR2の活性化を介する弛緩はDSS処置日数に依存して減弱した。一方、SK_{Ca}チャンネルの選択的活性化薬であるL-EBIOの適用により、コントロールラットとDSS投与ラットの平滑筋標本はともに同程度の弛緩を起こしたことから、DSS投与ラットにおいてSK_{Ca}チャンネルに機能的な変化は起こっていないことが示唆された。次にPAR2 mRNA発現量を測定したところ、DSS投与ラットにおいてDSS処置期間に依存して減少していることが認められた。



結論

以上の結果より、ラット摘出遠位結腸輪走筋標

本の収縮時におけるPAR2活性化は、apamin感受性SK_{Ca}チャンネル活性化を介して弛緩を起こすことが明らかになった。この弛緩は実験的大腸炎モデルのDSS投与ラットにおいて減弱し、消化管運動に影響を及ぼすことが示唆された。DSS投与ラットにおいて、SK_{Ca}選択的活性化薬による弛緩は変化せず、PAR2 mRNA発現量が有意に低下したことより、この減弱は弛緩機構自体が変化しているのではなく、PAR2のdown-regulationによるためと考えられる。これは炎症や出血という病態生理学的状況下におけるPAR2の慢性的な活性化に起因し、結果として消化管運動制御の低下を起こし、下痢や炎症を増悪していることが推察された。

文献

- 1) Akbarali HI, Pothoulakis C, Castagliuolo I : Altered ion channel activity in murine colonic smooth muscle myocytes in an experimental colitis model. *Biochem Biophys Res Commun* **275** : 637-642, 2000
- 2) Kinoshita K, Sato K, Hori M, et al : Decrease in activity of smooth muscle L-type Ca²⁺ channels and its reversal by NF- κ B inhibitors in Crohn's colitis model. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **285** : G483-G493, 2003
- 3) Gonzalez A, Sarna SK : Different types of contractions in rat colon and their modulation by oxidative stress. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **280** : G546-G554, 2001
- 4) Sanovic S, Lamb DP, Blennerhassett MG : Damage to the enteric nervous system in experimental colitis. *Am J Pathol* **155** : 1051-1057, 1999
- 5) Hollenberg MD : Protease-activated receptors ; PAR-4 and counting ; How long is the course. *Trends Pharmacol Sci* **20** : 271-273, 1999
- 6) Bradley PP, Priebat DA, Christensen RD, et al : Measurement of cutaneous inflammation ; Estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol* **78** : 206-209, 1982