

厚生労働科学研究研究費補助金

萌芽的先端医療技術推進研究事業

医薬品等の毒性試験に用いるストレス遺伝子チップの開発

平成14年度～16年度 総合研究報告書

主任研究者 水島 徹

平成17（2005）年 3月

## 目次

I. 総括研究報告	
医薬品等の毒性試験に用いるストレス遺伝子チップの開発	-----1
II. 研究成果に刊行に関する一覧表	-----14
III. 研究成果の刊行物・別刷	-----17

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）  
（総合）研究報告書

医薬品等の毒性試験に用いるストレス遺伝子チップの開発

主任研究者 水島 徹 熊本大学大学院医学薬学研究部教授

研究要旨

大腸菌で 12、酵母で 15、ヒトで 63 の新しいストレス遺伝子を単離した。またこれまで我々が同定してきた遺伝子を含む、ヒトの全てのストレス遺伝子を網羅した改良型ストレス遺伝子チップを作成した。またこれを用いて、臨床現場で問題になっている NSAIDs の副作用である、NSAIDs 潰瘍の発症機構の解明を行った。具体的には、NSAIDs 潰瘍の発症に、NSAIDs による細胞傷害作用（NSAIDs による CHOP 遺伝子の誘導による）が関与していること、及びそれが NSAIDs の膜傷害性に依存していることを明らかにした。

また、ある物質（医薬品の候補化合物など）に対して細胞を耐性化する遺伝子を同定することにより、その物質の細胞毒性の分子機構を解明するという方法で、NSAIDs の細胞毒性に与る新しい遺伝子、TPO1 を発見した。さらにそのヒトホモログである TETRAN を同定し、それがヒト細胞を NSAIDs に耐性化することを見出した。またそのメカニズムとして、TETRAN が細胞外へ NSAIDs を排出していることを発見した。

## A. 研究目的

細胞は様々なストレスに対し、適切な遺伝子（ストレス遺伝子）を発現し自らの生存を保っている。従って、細胞がある物質（医薬品の候補化合物など）に対して誘導するストレス遺伝子を解析することにより、その物質がどのような種類のストレスとして細胞に作用しているか、即ちその物質の細胞毒性の分子機構を解明することができる。このような目的のためには、DNAチップ技術を活かして、ストレス遺伝子の網羅的な解析を可能にするストレス遺伝子チップ（全てのストレス遺伝子を乗せたDNAチップ）の開発が必要である。本研究提案は、様々なストレス遺伝子を様々な生物種において同定してきたという我々の実績の基に（ヒトに関しては既にストレス遺伝子チップの試作品を開発している）、様々な生物種において様々な方法でストレス遺伝子を同定し、ストレス遺伝子チップを各生物種において作成することを目標としている。本研究の特徴は、ヒトだけでなく、様々な生物種でストレス遺伝子を同定することである。これは、ストレス遺伝子が種を越えてよく保存されていること、及び最近多くの生物種でゲノム情報が明らかになっていることを利用した独自の研究戦略である。即ち、ある生物種で新しいストレス遺伝子を同定した場合には、ゲノム情報を使って他の生物種でそのホモログを取るといった研究戦略が本研究提

案の特徴である。このような方法で得た全てのストレス遺伝子をチップ化し、それを指定研究（種々の毒性物質による遺伝子発現変化のデータベースを作成する）において使って頂くのが、本研究提案の最終目標である。また大腸菌、及び酵母などを使うことによって、単にストレスによって誘導される遺伝子だけでなく、細胞をストレス耐性化する遺伝子を遺伝学的手法を用いて網羅的に検索するのも本研究の特徴の一つである。それら遺伝子（及びそのホモログ）をストレス遺伝子チップに使用するだけでなく、このシステムを用いた全く新しい毒性試験の確立も本研究で目指したい。即ち、ある物質（医薬品の候補化合物など）に対して細胞を耐性化する遺伝子を同定することにより、その物質の細胞毒性の分子機構を解明するという方法を本研究において確立したいと考えている。

## B. 研究方法

各生物種（ヒト、マウス、イネ、酵母、大腸菌）でなるべく多くのストレス遺伝子を同定し、各生物種のストレス遺伝子チップを作成する。

ストレスとしては、アルコール、活性酸素、高塩濃度、膜傷害性物質、及びDNA合成阻害剤などを使用した。各生物種の細胞に各ストレスを与えた時に誘導される遺伝子を、既存のDNAチップ（ゲノム情報からランダムに遺伝子をチップ

化したもの) を使って検索した。尚ヒトに関しては、我々が既に作成しているストレス遺伝子チップも用いた。一方未知の遺伝子の発見を目指して、ディファレンシャルディスプレイ法でも検索を行った。更に大腸菌、酵母に関しては、発現ライブラリーを用いて、細胞内で発現させた時、各ストレスに細胞を耐性化することを指標にした検索も行った。

#### 耐性遺伝子を利用した、毒性試験法の確立を行う。

我々は、ある物質に対して細胞を耐性化する遺伝子を解析することによって、その物質の細胞毒性の分子機構を予想することが可能であると考えているので、そのような毒性試験法の評価を行った。使用する毒性物質は、インドメタシンなどの非ステロイド系抗炎症薬(NSAIDs)である。NSAIDsは、リウマチなどの患者に大変有効な薬であるが、胃粘膜障害という副作用のためその使用を制限しなくてはならない大きな問題がある。これまでNSAIDsによる胃粘膜障害は、胃粘膜防御因子プロスタグランジンの低下によると考えられてきたが、我々を含む数グループの論文から、NSAIDsが直接細胞を障害する作用もこの副作用の原因になっていることが明らかになった。しかしその細胞障害機構は不明であった。そこで、酵母を用いて、多量発現によってインドメタシン耐性を導く遺伝子を検索し

た。

#### NSAIDs誘導性遺伝子の検索

昨年度までの本研究で開発したストレス遺伝子チップを使って、NSAIDs誘導性遺伝子の検索を行った。

#### NSAIDs潰瘍発症機構の解明

ラットを用いて、新しい実験動物モデルを確立し、動物実験を行った。

#### NSAIDsによるアポトーシス誘導機構

モルモット胃粘膜初代培養細胞を用いて、各種阻害剤の効果などを調べた。

### C. 研究結果

#### ストレス遺伝子の同定

エタノールによって誘導される遺伝子

大腸菌

ftsE

proA

flaR

damA

relA

recA

metG

酵母

PRP4

PDR3

Sec31

ARP3

PRP4

MET25	glucosidase, beta; acid (includes gluco
STE24	sylceramidase) AF0232682.01010705
RadA	4
PGK	prostate differentiation factor A
ICL	B000584 2.001359773
TopA	
ヒト	DNA合成阻害によって誘導される遺伝
nuclear interacting protein 1	子
H2A histone family, member L	大腸菌
transgelin 2	dnaA
transcription termination factor	dnaC
tumor necrosis factor (ligand) superfamily,	recA
member 12	thyA
matrix metalloproteinase 23A	supE
eukaryotic translation initiation factor 3,	酵母
subunit 2 (beta, 36kD)	Cdc45
ubiquinol-cytochrome c reductase (6.4kD)	Hsp104
subunit	Isa1
AW1630022.134732705	Tpo1
Incyte EST 02.108920122	ヒト
interferon induced transmembrane prot	syntaxin 11
ein 3 (1-8U)X573522.101902535	nucleolar protein 4
conserved hypothetical protein	receptor-interacting serine-threonine
AAF96700 2.067803834	kinase 2
KIAA0316 gene product AB002314	SWI/SNF related, matrix associated, actin
2.062464711	dependent regulator of chromatin, subfamily
Sequence 100 from Patent WO99517	a, member 5
27.	regulator of G-protein signalling 5
AX015425 2.028429387	pre-mRNA splicing factor similar to S.
ribosomal protein S28 AW161288	cerevisiae Prp18
2.027208876	uridine monophosphate synthetase (orotate
zinedinAF2129402.010433205	phosphoribosyl transferase and orotidine-5'-

decarboxylase)		ribosomal protein S21BE2214082.3392
TIA1 cytotoxic granule-associated RNA-binding protein-like 1	01379	chromobox homolog 4 (Drosophila P c class) AF0139562.29998834
ES1 (zebrafish) protein, human homolog RNA guanylyltransferase and 5'-phosphatase	4	keratin 8 X74929 2.29013874
tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13	8	dopa decarboxylase (aromatic L-amino acid decarboxylase)M761802.270581792
RuvB (E coli homolog)-like 1		Human genomic DNA, chromosome 22q11.2, BCRL2 region, clone:KB1440D3.AP000553 2.23204468
vav 2 oncogene	4	syndecan 4 (amphiglycan, ryudocan) D13292 2.221370746
tubulin, beta polypeptide		predicted using Genefinder; preliminary prediction CAB608922.17594025
tryptase, alpha	4	S100 calcium-binding protein P X65614 2.155072182
small nuclear ribonucleoprotein polypeptides B and B1	5	basigin X64364 2.14576871
pim-1 oncogene M24779 2.51813998		tumor necrosis factor alpha-induced protein 6 M31165 2.13628328
9		NSAIDs (膜傷害性物質) によって誘導される遺伝子
procollagen-proline, 2-oxoglutarate 4-dioxygenase (proline 4-hydroxylase), beta polypeptide (protein disulfide isomerase; thyroid hormone binding protein p55) J02783 2.49578561	2	ヒト
tissue factor pathway inhibitor 2NM_006528 2.46381741		Human chromosome 21 segment HS21C004. AL1632045.820879849
cathepsin D (lysosomal aspartyl protease) M11233 2.397615848		CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), betaW93514 4.761084522
ATPase, H+ transporting, lysosomal (vacuolar proton pump) 21kD A I5674772.390568889		
keratin 8AI9789322.372110171		
immediate early response 3 A I022951 2.357425546		

Human low density lipoprotein receptor gene, exon 18. L00352 3.42883164  
 3  
 solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 5  
 M802443.002677003  
 cytochrome c oxidase subunit VIII J  
 04823 2.89536847  
 Human urokinase-type plasminogen receptor, exon 7. U09937 2.80687624  
 9  
 low density lipoprotein receptor (familial hypercholesterolemia) NM\_00052  
 7 2.748060893  
 CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta X52560 2.65794148  
 epithelial protein lost in neoplasmbeta  
 AA594624 2.578110619  
 claudin 4  
 AK0266512.544981486

活性酸素によって誘導される遺伝子  
 ヒト

Arginine-rich protein AA582041  
 2.0001823  
 transcription factor-like 1 AA705337  
 1.983229372  
 ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 6 (putative function) A  
 F0399161.976892726  
 phosphatidylinositol transfer protein, membrane-associated AI8052461.9562918

82  
 a disintegrin and metalloproteinase domain 15 (metargidin) U417671.954849542  
 calpain 4, small subunit (30K) A  
 Y007141 1.941214035  
 Rho GTPase activating protein 1 U  
 02570 1.940837133  
 Human melanoma growth stimulatory activity beta (MGSA beta) gene, partial cds. U03019 1.931748436  
 U2 small nuclear ribonucleoprotein auxiliary factor (65kD) AA936430 1.  
 931253285  
 alpha2,8-sialyltransferase U91641 1.  
 919789645  
 Homo sapiens clone 23929 mRNA sequence AF0521221.918846265  
 tumor suppressing subtransferable candidate 3 AF0354441.91593511

#### ストレス遺伝子チップの開発

以上40のヒトストレス遺伝子、昨年度我々が同定した23のヒトストレス遺伝子など、これまで我々が同定してきたヒトストレス遺伝子120を含む、既知の全てのストレス遺伝子(920)を網羅した改良型ストレス遺伝子チップを作成した。そしてアルコールによるHSP誘導、NSAIDSによるGRP78誘導など、これまでに見出されているストレスによる遺伝子発現変化をこのDNAチップを使って確認することに成功した。



## タイトジャンクション関連遺伝子に関する解析

NSAIDs によって誘導される遺伝子の中で我々が注目したのが、claudin 4 などのタイトジャンクション関連遺伝子である。NSAIDs が抗癌作用を持つことはよく知られているが、そのメカニズムはよく分かっていない。一方、タイトジャンクションの機能亢進は、癌細胞の浸潤を抑え、その転移を抑制する。実際に最近、claudin 4 の多量発現により、癌細胞の浸潤/転移が抑制されるという報告があった。そこで、NSAIDs による claudin 4 誘導は、NSAIDs の抗癌作用において重要な役割を果たしていると考え、その誘導機構の解析を行った。NSAIDs は、COX 阻害、MAP キナーゼ活性化、PPAR- $\gamma$  活性化、細胞内カルシウム上昇など様々な作用を示す。我々はこれらの作用の内どの作用が claudin 4 誘導に関与しているかを調べ、細胞内カルシウム上昇により claudin 4 が誘導されていることを初めて示した。

## 耐性遺伝子を利用した、毒性試験法の確立

多量発現した場合、酵母をインドメタシン (NSAIDs の一種) に耐性化する酵母の遺伝子として、TPO1 を発見した。TPO1 の多量発現は、他の NSAIDs (イブプロフェン、ジクロフェナク) に対し

ても、細胞を耐性化した。

TPO1 は、TPO1~5 からなる膜蛋白質からなるファミリーに一種で、様々な分子の排出に関与していると考えられている。我々は、TPO1~5 のそれぞれの変異株のインドメタシンに対する耐性を調べた。その結果、TPO1 変異株は野生株に比べ顕著にインドメタシンに対し感受性を示したが、他の変異株は野生株と同程度であった。

さらに我々は、TPO1 のヒトホモログ (TETTRAN) を同定し、それを胃粘膜由来培養細胞 (AGS 細胞) で多量発現させると細胞がインドメタシンに耐性化することを発見した。

TETTRAN過剰発現細胞と野生型細胞から反転膜小胞を調製し、NSAIDs排出活性を比較したところ、TETTRAN過剰発現細胞から調製した反転膜小胞の方が、3倍以上高い排出活性を示した。この結果は、TETTRANがNSAIDs排出活性を有することを初めて示すものである。

## NSAIDs誘導性遺伝子の検索

胃粘膜細胞を NSAIDs で処理し、誘導される遺伝子をストレス遺伝子チップを使って網羅的に解析した。その結果 GRP78 など、小胞体ストレス応答 (小胞体が傷害を受け小胞体内に変性した蛋白質が蓄積すると誘導されるストレス応答) に関与する遺伝子を複数同定し、NSAIDs が小胞体ストレス応答を誘導す

ることが初めて分かった。最近小胞体ストレス応答誘導により、アポトーシス誘導性を持つ転写因子 CHOP が誘導されることが報告された。そこで我々は NSAIDs によるアポトーシス誘導が CHOP を介する可能性を考え実験を行った。まず我々は、mRNA、及び蛋白質レベルで、種々の NSAIDs が CHOP を誘導することを確認した。CHOP の誘導には、ATF6、ATF4、及び XBP-1 という3種の転写因子が関与することが知られているが、我々は種々の NSAIDs によりこれら全ての転写因子が活性化されることを示した。さらにこの NSAIDs による CHOP 誘導が NSAIDs によるアポトーシス誘導に関与していること以下の二つの実験で示した。まず CHOP のドミナントネガティブ変異蛋白質を発現することにより、NSAIDs によるアポトーシス誘導が抑制されることを見出した。さらに、CHOP のノックアウトマウスから調製した細胞では、NSAIDs によるアポトーシス誘導が全く見られないことを示した。以上の結果は、NSAIDs は小胞体ストレス応答 (CHOP) を誘導することにより、アポトーシスを起こすことを示唆している。

次に NSAIDs による CHOP 誘導メカニズムについて検討した。我々は細胞内カルシウム濃度上昇の関与を考えた。それはカルシウムイオノフォアなどにより細胞内カルシウム濃度を上昇させた時、

小胞体ストレス応答が誘導されることを根拠としている。実際に我々は調べた限り全ての NSAIDs により細胞内カルシウム濃度が上昇すること、及び細胞内でカルシウムをキレートしその効果を消失させる BAPTA-AM により、NSAIDs によるアポトーシス誘導が抑制されることを見出した。以上の結果は、NSAIDs によるアポトーシス誘導に、細胞内カルシウム濃度の上昇が関与していることを示している。

次に我々は NSAIDs による細胞内カルシウム濃度の上昇メカニズムを検討した。我々は、我々は NSAIDs が膜リン脂質と相互作用するという論文に注目し、NSAIDs が膜傷害性を持ち、これが細胞内カルシウム濃度の上昇の原因ではないかと考えた。そこで 10 種類以上の NSAIDs を用いて、その膜傷害性とアポトーシス誘導性 (細胞内カルシウム濃度の上昇) の相関性を調べた。その結果、調べた限り全ての NSAIDs はアポトーシスを誘導するだけでなく、赤血球からのヘモグロビンの漏出を促進し膜傷害性を持つことが分かった。さらに蛍光物質であるカルセインを封入したリポソーム (リン脂質のみから成る) を用いて、カルセインの漏出を指標とした膜傷害試験を行った。その結果、全ての NSAIDs がカルセインを漏出させ、NSAIDs はリン脂質 (細胞膜上の蛋白質ではなく) をターゲットとして、膜傷害を起こすことが

分かった。さらに、これら NSAIDs による膜傷害性と細胞内カルシウム濃度の上昇は大変よく相関しており、NSAIDs はその膜傷害性を介して、細胞内カルシウム濃度の上昇させることが強く示唆された。

#### NSAIDs 潰瘍発症機構の解明

それでは、この NSAIDs による直接細胞傷害（胃粘膜細胞死）は、胃潰瘍発症に本当に関与しているのだろうか？我々は、NSAIDs が胃潰瘍を導くためには、胃粘膜で COX を阻害し PG を低下させることに加え、NSAIDs による胃粘膜細胞死が必要であるという新しい仮説を考えた。この仮説を証明するために我々は、新しい NSAIDs 潰瘍に関する動物モデルを考案した。それは低用量インドメタシンの静脈注射と、細胞傷害性のある COX-2 選択的 NSAIDs の経口投与を組み合わせるモデルである。前述のように細胞傷害に必要な濃度に比べ、インドメタシンの COX を阻害するために必要な濃度は低い。そのため低用量インドメタシンの静脈注射により、胃粘膜で COX を阻害し PG を低下させながら、細胞傷害は起こらないようにすることが出来る。逆に細胞傷害性のある COX-2 選択的 NSAIDs の経口投与では、経口投与なので胃内での NSAIDs の濃度はかなり高くなり細胞傷害は起こしながら、胃粘膜の PG を低下させないようにすることが出

来る（胃粘膜で主に発現している COX-1 は阻害しないため）。そこで仮に我々の仮説が正しく、即ち NSAIDs が胃潰瘍を導くためには、胃粘膜で COX を阻害し PG を低下させることに加え、NSAIDs による胃粘膜細胞死が必要であるならば、低用量インドメタシンの静脈注射、及び細胞傷害性のある COX-2 選択的 NSAIDs の経口投与、それぞれ単独では潰瘍は起こさないが、両者を同時に投与すると胃潰瘍が発症することが予想される。実際、低濃度インドメタシンの静脈注射、及びセレコキシブ（最も細胞傷害性の強い COX-2 選択的 NSAIDs）の経口投与を同時に行ったときのみ、胃潰瘍の発症が見られた。またセレコキシブの代わりにロフェコキシブ（ほとんど細胞傷害性を持たない）を用いた場合には、ほとんど胃潰瘍が発症しなかった。以上の結果は我々の仮説の妥当性、即ち NSAIDs が胃潰瘍を導くためには、胃粘膜で COX を阻害し PG を低下させることに加え、NSAIDs による胃粘膜細胞死が必要であることを示唆している。

#### D. 考察

以上の我々の研究から、胃潰瘍を起こさない NSAIDs を開発するためには、膜傷害性（細胞傷害性）のない NSAIDs、あるいは胃粘膜で PG を低下させない NSAIDs を開発すればいいことが分かる。後者、即ち胃粘膜で PG を低下させない

NSAIDsが、COX-2 選択的 NSAIDs である。しかし前述のように最近、COX-2 選択的 NSAIDs は心筋梗塞を誘発するという衝撃的な論文が相次いで発表された。血液凝固調節系において、COX-1 によって合成されるトロンボキサン A<sub>2</sub> が血液凝固を促進するのに対し、COX-2 によって合成されるプロスタサイクリンは血液凝固を阻害する。そこで、COX-2 だけを阻害する COX-2 選択的 NSAIDs は、血液凝固を阻害するプロスタサイクリンだけを減少させるために、血栓を出来やすくするのである。実際、COX-2 選択性のない従来の NSAIDs を使用している患者に比べ、COX-2 選択的 NSAIDs を使用している患者の心筋梗塞を起こす危険性は5倍以上であるという臨床試験の結果が公表されている。また最近北米では、「心筋梗塞を起こす可能性のある患者には、COX-2 選択的 NSAIDs を使用しないように」という注意文書が配布された。さらにごく最近、代表的な COX-2 選択的 NSAIDs であるロフェコキシブがその心筋梗塞誘発副作用のために販売停止となった。そこで COX-2 選択性を高める以外の方法で、NSAIDs 潰瘍を起こさない NSAIDs を開発する必要がある。そこで注目されるのが膜傷害作用のない NSAIDs である。即ち、COX-2 に対する選択性がなく、かつ膜傷害性のない NSAIDs は、胃潰瘍誘発副作用、及び心筋梗塞誘発副作用のない真に安全な

NSAIDs になる。我々はこのような NSAIDs の発見を目指して現在そのスクリーニングを行っている。

#### E. 結論

本研究により、医薬品により誘導される遺伝子の解析が医薬品の副作用機構の解明、及び副作用のない新しい医薬品開発に役立つことが示された。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

- 論文発表
1. Tsutsumi, S., Haruna, R., Tomisato, W., Takano, T., Hoshino, T., Tsuchiya, T. and Mizushima, T. (2002) Effects of prostaglandins on spontaneous apoptosis in gastric mucosal cells. *Dig. Dis. Sci.* 47, 84-89.
2. Tsutsumi, S., Tomisato, W., Takano, T., Rokutan, K., Tsuchiya, T. and Mizushima, T. (2002) Gastric irritant-induced apoptosis in guinea pig gastric mucosal cells in primary culture. *Biochim. Biophys. Acta* 1589, 168-180.
3. Tsutsumi, S., Tomisato, W., Hoshino, T., Tsuchiya, T. and Mizushima, T. (2002) Transforming growth factor- $\beta$ 1 is responsible for maturation-dependent spontaneous apoptosis of gastric pit cells

- in primary culture. *Exp. Biol. Med.* 227, 402-411.
4. Takano, T., Tsutsumi, S., Tomisato, W., Hoshino, T., Tsuchiya, T. and Mizushima, T. (2002) Geranylgeranylacetone protects guinea pig gastric mucosal cells from gastric stressor-induced apoptosis. *Dig. Dis. Sci.* 47, 1546-1553.
  5. Tomisato, W., Hoshino, T., Tsutsumi, S., Tsuchiya, T. and Mizushima, T. (2002) Maturation-associated increase in sensitivity of cultured guinea pig gastric pit cells to hydrogen peroxide. *Dig. Dis. Sci.* 47, 2125-2133.
  6. Hoshino, T., Takano, T., Tsutsumi, S., Tomisato, W., Tsuchiya, T. and Mizushima, T. (2002) Effects of prostaglandin E<sub>2</sub> on gastric irritant-induced apoptosis. *Dig. Dis. Sci.* 47, 2370-2379.
  7. Hoshino, T., Takano, T., Tomisato, W., Tsutsumi, S., Hwang, H-J., Koura, Y., Nishimoto, K., Tsuchiya, T. and Mizushima, T. (2003) Effects of sucralfate on gastric irritant-induced necrosis and apoptosis in cultured guinea pig gastric mucosal cells. *Biol. Pharm. Bull.* 26, 24-27.
  8. Hoshino, T., Tsutsumi, S., Tomisato, W., Hwang, H-J., Tsuchiya, T. and Mizushima, T. (2003) Prostaglandin E<sub>2</sub> protects gastric mucosal cells from apoptosis via EP<sub>2</sub> and EP<sub>4</sub> receptor activation. *J. Biol. Chem.* 278, 12752-12758.
  9. Mizushima, T., Tsutsumi, S., Hoshino, T., and Tomisato, W. (2003) Protection of gastric mucosal cells from apoptosis and necrosis by induction of HSP and PGE<sub>2</sub>. *Jpn. J. Hyperthermic Oncol.* 19, 67-78.
  10. Tsutsumi, S., Mima, S., Tomisato, W., Hoshino, T., Tsuchiya, T. and Mizushima, T. (2003) Molecular mechanism of adaptive cytoprotection induced by ethanol in human gastric cells. *Exp. Biol. Med.* 228, 1089-1095.
  11. Tomisato, W., Tsutsumi, S., Hoshino, T., Hwang, H-J., Mio, M., Tsuchiya, T. and Mizushima, T. (2004) Role of direct cytotoxic effects of NSAIDs in the induction of gastric lesions. *Biochem. Pharmacol.* 67, 575-585.
  12. Tanaka, K., Nishimoto, K., Tomisato, W., Tsutsumi, S., Hoshino, T., Tsuchiya, T. and Mizushima, T. (2004) Adaptive cytoprotection induced by pre-treatment with ethanol protects against gastric cell damage by NSAIDs. *Dig. Dis. Sci.* 49, 210-217.
  13. Tsutsumi, S., Gotoh, T., Mima, S., Tomisato, W., Hoshino, T., Hwang, H-J., Mori, M., Tsuchiya, T. and Mizushima, T. (2004) NSAIDs induce apoptosis through endoplasmic reticulum stress

- response in gastric mucosal cells. *Cell Death Differ.* 11, 1009-1016.
14. Tanaka, K., Tomisato, W., Tsutsumi, S., Hoshino, T., Tsuchiya, T. and Mizushima, T. (2004) Cytotoxic synergy between indomethacin and hydrochloric acid in gastric mucosal cells. *Biol. Pharm. Bull.* 27, 1188-1192.
  15. Tomisato, W., Tanaka, K., Katsu, T., Kakuta, H., Sasaki, K., Tsutsumi, S., Hoshino, T., Aburaya, M., Li, D., Tsuchiya, T., Suzuki, K., Yokomizo, K., and Mizushima, T. (2004) Membrane permeabilization by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 323, 1032-1039.
  16. Mima, S., Tsutsumi, S., Ushijima, H., Takeda, M., Fukuda, I., Yokomizo, K., Suzuki, K., Sano, T., Nakanishi, T., Tomisato, W., Tsuchiya, T. and Mizushima, T. (2004) Induction of claudin-4 by non-steroidal anti-inflammatory drugs and its contribution to their chemopreventive effect. *Cancer Res.* in press.
  17. Arai, Y., Tanaka, K., Ushijima, H., Tomisato, W., Tsutsumi, S., Aburaya, M., Hoshino, T., Yokomizo, K., Suzuki, K., Katsu, T., Tsuchiya, T. and Mizushima, T. (2004) Low direct cytotoxicity of nabumetone on gastric mucosal cells. *Dig. Dis. Sci.* in press.
  18. Tomisato, W., Tanaka, K., Tsutsumi, S., Hoshino, T., Yokomizo, K., Suzuki, K., Katsu, T., and Mizushima, T. (2005) Low direct cytotoxicity and cytoprotective effects of nitric oxide-releasing indomethacin. *Dig. Dis. Sci.* in press.
  19. Sone, M., Hayashi, H., Yamamoto, H., Hoshino, T., Mizushima, T., and Nakashima, T. (2005) Upregulation of HSP by geranylgeranylacetone protects the cochlear lateral wall from endotoxin-induced inflammation. *Hearing Research* in press.
- 学会発表 (招待講演のみ)
1. 水島徹 NSAIDs による胃粘膜障害と HSP による保護 シンポジウム (2002) (千葉) (本人主催)
  2. 水島徹 ストレス蛋白質と疾患 熊本大学での招待講演 (2002) (熊本)
  3. 水島徹 NSAIDs による胃潰瘍発症機構と HSP による保護 日本消化器外科学会ランチョンセミナー (2002) (京都)
  4. 水島徹 HSP 誘導による臓器保護メカニズム 日本ハイパーサーミア学会ランチョンセミナー (2002) (名古屋)
  5. 水島徹 NSAIDs 潰瘍と GGA-

- HSP による保護作用 GGA・HSP 研究会 (2002) (東京)
6. 水島徹 NSAIDs 潰瘍発症の分子機構と HSP の保護効果 バイオロンジル会 (2002) (岡山)
  7. 水島徹 NSAIDs 潰瘍克服への戦略 LIT 研究所での招待講演 (2002) (東京)
  8. 水島徹 胃粘膜傷害副作用のない非ステロイド系抗炎症薬開発の戦略 日本薬学会中国四国支部例会 (2003) (徳島)
  9. 水島徹 NSAIDs 潰瘍克服への戦略 聖マリアンナ医科大学での招待講演 (2003) (川崎)
  10. 水島徹 HSP 誘導による胃粘膜保護と、HSP 誘導薬の将来 日本消化器外科学会ランチョンセミナー (2003) (東京)
  11. 水島徹 GGA-HSP と PG による胃粘膜保護作用の比較 GGA・HSP 研究会 (2003)
  12. 水島徹 直接細胞傷害作用に着目した新しい NSAIDs 開発への戦略 日本炎症・再生医学会 シンポジウム (2003)
  13. 水島徹 NSAIDs 研究の新展開 岡山大学医学部での招待講演 (2004) (岡山)
  14. 水島徹 NSAIDs 潰瘍発症の分子機構と HSP 誘導薬による保護 Heart Protection Forum 特別講演 (2004) (佐賀)
  15. 水島徹 NSAIDs 潰瘍発症の分子機構と HSP 誘導薬による保護 実験潰瘍学会イブニングセミナー (2004) (大津)
  16. Tohru Mizushima Mechanism of NSAID-induced gastric lesions and its protection by HSP inducers. International Symposium in Biohealth Products Research Center (2004) (Pusan)
  17. 水島徹 NSAIDs 潰瘍発症の分子機構と HSP 誘導薬による保護 熊本大学医学部麻酔科研究会特別講演 (2004) (熊本)
  18. 水島徹 NSAIDs 研究の新展開 愛媛県病院薬剤師会学術講演会 (2005) (愛媛)
  19. 水島徹 NSAIDs 研究の新展開 北海道大学での特別講演 (2005) (札幌)
  20. 水島徹 NSAIDs 研究の新展開 大正富山製薬 (株) 研究所での特別講演 (2005) (さいたま)
- C. 知的財産権の出願・登録状況  
該当なし

研究成果に刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Tsutsumi, S., Haruna, R., Tomisato, W., Takano, T., Hoshino, T., Tsuchiya, T. and Mizushima, T.	Effects of prostaglandins on spontaneous apoptosis in gastric mucosal cells.	<i>Dig. Dis. Sci.</i>	47	84-89	2002
Tsutsumi, S., Tomisato, W., Takano, T., Rokutan, K., Tsuchiya, T. and Mizushima, T.	Gastric irritant-induced apoptosis in guinea pig gastric mucosal cells in primary culture.	<i>Biochim. Biophys. Acta</i>	1589	168-180	2002
Tsutsumi, S., Tomisato, W., Hoshino, T., Tsuchiya, T. and Mizushima, T.	Transforming growth factor-β1 is responsible for maturation-dependent spontaneous apoptosis of gastric pit cells in primary culture.	<i>Exp. Biol. Med.</i>	227	402-411	2002
Takano, T., Tsutsumi, S., Tomisato, W., Hoshino, T., Tsuchiya, T. and Mizushima, T.	Geranylgeranylacetone protects guinea pig gastric mucosal cells from gastric stressor-induced apoptosis.	<i>Dig. Dis. Sci.</i>	47	1546-1553	2002
Tomisato, W., Hoshino, T., Tsutsumi, S., Tsuchiya, T. and Mizushima, T.	Maturation-associated increase in sensitivity of cultured guinea pig gastric pit cells to hydrogen peroxide.	<i>Dig. Dis. Sci.</i>	47	2125-2133	2002
Hoshino, T., Takano, T., Tsutsumi, S., Tomisato, W., Tsuchiya, T. and Mizushima, T.	Effects of prostaglandin E <sub>2</sub> on gastric irritant-induced apoptosis.	<i>Dig. Dis. Sci.</i>	47	2370-2379	2002
Hoshino, T., Takano, T., Tomisato, W., Tsutsumi, S., Hwang, H-J., Koura, Y., Nishimoto, K., Tsuchiya, T. Mizushima, T.	Effects of sucralfate on gastric irritant-induced necrosis and apoptosis in cultured guinea pig gastric mucosal cells.	<i>Biol. Pharm. Bull.</i>	26	24-27	2003
Hoshino, T., Tsutsumi, S., Tomisato, W., Hwang, H-J., Tsuchiya, T.	Prostaglandin E <sub>2</sub> protects gastric mucosal cells from apoptosis via EP <sub>2</sub> and EP <sub>4</sub> receptor activation.	<i>J. Biol. Chem.</i>	278	12752-12758	2003



<u>Mizushima T.</u>					
Mizushima T., Tsutsumi, S., Hoshino, T., Tomisato, W.	Protection of gastric mucosal cells from apoptosis and necrosis by induction of HSP and PGE <sub>2</sub> .	<i>Jpn. J. Hyperthermic Onco.</i>	19	67-78	2003
Tsutsumi, S., Mima, S., Tomisato, W., Hoshino, T., Tsuchiya, T. <u>Mizushima T.</u>	Molecular mechanism of adaptive cytoprotection induced by ethanol in human gastric cells.	<i>Exp. Biol. Med.</i>	228	1089-1095.	2003
Tomisato, W., Tsutsumi, S., Hoshino, T., Hwang, H-J., Mio, M., Tsuchiya, T. <u>Mizushima T.</u>	Role of direct cytotoxic effects of NSAIDs in the induction of gastric lesions.	<i>Biochem. Pharmacol.</i>	67	575-585	2004
Tanaka, K., Nishimoto, K., Tomisato, W., Tsutsumi, S., Hoshino, T., Tsuchiya, T. <u>Mizushima T.</u>	Adaptive cytoprotection induced by pre-treatment with ethanol protects against gastric cell damage by NSAIDs.	<i>Dig. Dis. Sci.</i>	49	210-217	2004
Tsutsumi, S., Gotoh, T., Mima, S., Tomisato, W., Hoshino, T., Hwang, H-J., Mori, M., Tsuchiya, T. <u>Mizushima T.</u>	NSAIDs induce apoptosis through endoplasmic reticulum stress response in gastric mucosal cells.	<i>Cell Death Differ.</i>	11	1009-1016	2004
Tanaka, K., Tomisato, W., Tsutsumi, S., Hoshino, T., Tsuchiya, T. <u>Mizushima T.</u>	Cytotoxic synergy between indomethacin and hydrochloric acid in gastric mucosal cells.	<i>Biol. Pharm. Bull.</i>	27	1188-1192	2004
Tomisato, W., Tanaka, K., Katsu, T., Kakuta, H., Sasaki, K., Tsutsumi, S., Hoshino, T., Aburaya, M., Li, D., Tsuchiya, T., Suzuki, K., Yokomizo, K., <u>Mizushima T.</u>	Membrane permeabilization by non-steroidal anti-inflammatory drugs.	<i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i>	323	1032-1039	2004
Mima, S., Tsutsumi, S., Ushijima, H., Takeda, M., Fukuda, I., Yokomizo, K., Suzuki, K., Sano, T., Nakanishi, T., Tomisato, W., Tsuchiya, T. <u>Mizushima T.</u>	Induction of claudin-4 by non-steroidal anti-inflammatory drugs and its contribution to their chemopreventive effect.	<i>Cancer Res.</i>	in press.		2005

Arai, Y., Tanaka, K., Ushijima, H., Tomisato, W., Tsutsumi, S., Aburaya, M., Hoshino, T., Yokomizo, K., Suzuki, K., Katsu, T., Tsuchiya, T., Mizushima, T.	Low direct cytotoxicity of nabumetone on gastric mucosal cells.	<i>Dig. Dis. Sci.</i>	in press.		2005
Tomisato, W., Tanaka, K., Tsutsumi, S., Hoshino, T., Yokomizo, K., Suzuki, K., Katsu, T., Mizushima, T.	Low direct cytotoxicity and cytoprotective effects of nitric oxide-releasing indomethacin.	<i>Dig. Dis. Sci.</i>	in press.		2005

# Effects of Prostaglandins on Spontaneous Apoptosis in Gastric Mucosal Cells

SHINJI TSUTSUMI, BS,\* REIKO HARUNA, BS,\* WATARU TOMISATO, BS,\*  
TATSUNORI TAKANO, BS,\* TATSUYA HOSHINO, BS,\* TOMOFUSA TSUCHIYA, PhD,\* and  
TOHRU MIZUSHIMA, PhD\*†

Prostaglandins have cytoprotective effects on gastric mucosa via the influence of various mechanisms. The purpose of this study is to examine the effects of prostaglandins on maturation-dependent spontaneous apoptosis in gastric mucosal cells *in vitro*, which mimics the apoptosis of gastric mucosal cells related with a rapid cell turnover rate *in vivo*. Both prostaglandin E<sub>1</sub> and E<sub>2</sub> inhibited spontaneous apoptosis in a dose-dependent manner and increased the viability of gastric mucosal cells in culture. A number of antiulcer drugs presently in clinical use were shown to increase the concentrations of prostaglandins in cells. All of the drugs tested clearly inhibited the spontaneous apoptosis in a dose-dependent manner. Based on these results, we propose that the cytoprotective effects of prostaglandins on gastric mucosa *in vivo* can be partially explained by an increase in the number of gastric mucosal cells present as a result of the inhibition of maturation-dependent spontaneous apoptosis.

**KEY WORDS:** spontaneous apoptosis; gastric mucosal cells; anti-ulcer drugs; prostaglandins.

Prostaglandins (PGs), one of the major groups of chemical mediators in the mammalian body, are involved in numerous physiological reactions, such as inflammation and cellular differentiation (1). PGs, especially PGE<sub>1</sub> and PGE<sub>2</sub>, also have cytoprotective effects on gastric mucosa as a consequence of various physiological mechanisms that include increased epithelial mucus secretion (2) and amelioration of mucosal blood flow (3). Cyclooxygenase, the first enzyme in the pathway of PG synthesis from arachidonic acid, exists in both constitutive (cyclooxygenase-1) and inducible (cyclooxygenase-2) isoforms (4). While PGs

produced by cyclooxygenase-2 (cox-2) seem to be involved in inflammation and cellular differentiation, PGs produced by cyclooxygenase-1 (cox-1) may be involved in cytoprotective effects on gastric mucosa (5).

Gastric mucosal cells (gastric pit cells) have a rapid rate of turnover *in vivo*. This short turnover cycle is the result of rapid proliferation of progenitor cells at the isthmus, cell maturation that occurs during the upward migration of cells, and rapid cell death at the gastric surface (6). In the normal mammalian stomach, there is a balance between the proliferation of progenitor cells and the death of mature cells at the gastric surface. Alterations in this balance due to various pathological conditions in gastric mucosa have been reported (7, 8). For example, changes in the balance between the proliferation and death of the gastric pit cells by *Helicobacter pylori* was suggested to be involved in the development of atrophic gastritis associated with *H. pylori* infection (9). Thus, the control mechanism of this short turnover cycle of

Manuscript received April 23, 2001; revised manuscript received July 30, 2001; accepted August 6, 2001.

From the \*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Okayama University, Okayama 700-8530, Japan, and †PRESTO, Japan Science and Technology Corporation, Okayama 700-8530, Japan.

This work was supported by Grants-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan.

Address for reprint requests: Dr. Tohru Mizushima, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Okayama University, Tsushima-naka, Okayama 700-8530, Japan.

## PROSTAGLANDINS AND SPONTANEOUS APOPTOSIS

gastric mucosal cells (and thus rapid cell death at the gastric surface) should be revealed if researchers are to more fully understand the processes associated with gastric physiology and gastric diseases. It has been suggested that PGs affect the short turnover cycle of gastric mucosal cells *in vivo* (10). However, the precise mechanism of this effect has remained unknown due to the lack of a suitable *in vitro* model that can adequately reproduce the cycle of turnover of gastric mucosal cells *in vivo*.

The primary culture of guinea pig gastric mucosal cells has been established and well characterized (11). Recently, we reported that guinea pig gastric mucosal cells in primary culture undergo spontaneous apoptosis (12). Since this spontaneous apoptosis was found to be maturation-dependent (12), it is thought to mimic the rapid cell death at the gastric surface associated with the short turnover cycle of gastric mucosal cells *in vivo*. In the present study, we have examined the effects of PGE<sub>1</sub> and PGE<sub>2</sub> on maturation-dependent spontaneous apoptosis in guinea pig gastric mucosal cells in primary culture and found that they inhibited the apoptosis in a dose-dependent manner. We also found that clinically used antiulcer drugs, which increase the concentrations of PGs in gastric mucosal cells, also inhibited the spontaneous apoptosis. These results suggest that PGs partially protect the gastric mucosa by inhibiting the rapid cell death and thus increase the number of gastric mucosal cells present when the gastric mucosa is damaged by exposure to applied stresses.

### MATERIALS AND METHODS

**Chemicals and Media.** RPMI 1640 was obtained from Nissui Pharmaceutical Co. (Tokyo, Japan). Fetal calf serum (FCS), trypsin solution, and trypan blue were purchased from Gibco (Grand Island, New York, USA). Pronase E and type I collagenase were purchased from Kaken Pharmaceutical Co. (Kyoto, Japan) and Nitta Gelatin Co. (Osaka, Japan), respectively. Sodium-*N*-lauroylsarcosinate was obtained from Wako Co. (Tokyo, Japan), while Proteinase K and RNase A were from Sigma Co. (Tokyo, Japan). Plaunotol, rebamipide, ornoprostil, and ecabet sodium were kindly donated by Sankyo Co. (Tokyo, Japan), Otsuka Pharmaceutical Co. (Osaka, Japan), Ono Pharmaceutical Co. (Osaka, Japan), and Tanabe Co. (Osaka, Japan), respectively.

**Preparation and Culture of Gastric Mucosal Cells.** Male guinea pigs (4 weeks of age) were purchased from Shimizu Co. (Kyoto, Japan). Gastric mucosal cells were isolated from guinea pig fundic glands as described previously (11). Isolated gastric mucosal cells ( $1 \times 10^6$  cells/dish) were precultured for 6 hr in RPMI 1640, containing 10% FCS, 100 U/ml penicillin, and 100  $\mu$ g/ml streptomycin in the presence or absence of PGs or antiulcer drugs in an atmo-

sphere of 5% CO<sub>2</sub>/95% air at 37°C. After removing nonadherent cells by washing with RPMI 1640, cells that were attached to the plate at about 50% confluence were further incubated in the same medium for various periods of time as described below. Guinea pig gastric mucosal cell preparations have been previously characterized under these conditions, with the majority (about 90%) of cells being identified as pit cells (11).

**Cell Viability Assay.** Cell viability was examined by the trypan blue exclusion test. After incubation in the culture medium as described above, cells were treated with 1% trypsin and collected by centrifugation. Cells were resuspended in phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.2% trypan blue dye and observed under a light microscope. All values are expressed as the mean  $\pm$  SEM. A Student's *t* test for paired results was performed for the evaluation of differences between the groups. Differences were considered to be significant for values of  $P < 0.05$ .

**DNA Fragmentation Assay.** Apoptotic DNA fragmentation was monitored as previously described (13). Cells were collected with a rubber policeman and suspended in 20  $\mu$ l of lysis buffer, consisting of 50 mM Tris HCl (pH 7.8), 10 mM EDTA, and 0.5% sodium-*N*-lauroylsarcosinate. Proteinase K was added to a final concentration of 1 mg/ml and the lysate was incubated at 50°C for 2 hr. RNase A was then added to a final concentration of 0.5 mg/ml and the lysate incubated at 50°C for 30 min. These samples were analyzed by 2% agarose gel electrophoresis in the presence of 0.5  $\mu$ g/ml ethidium bromide.

### RESULTS AND DISCUSSION

**Effects of PGE<sub>1</sub> and PGE<sub>2</sub> on Spontaneous Apoptosis in Cultured Gastric Mucosal Cells.** In order to detect maturation-dependent spontaneous apoptosis of gastric mucosal cells *in vitro*, prepared cells should first be preincubated in culture medium for 6 hr so that appropriate cells are able to adhere to the culture dish (preincubation step). Culture dishes should then be washed in order to remove nonadherent cells. The cells still attached after the washing procedure are then incubated in readiness for the detection of apoptosis (incubation step) (12). For the examination of the effects of PGE<sub>1</sub> and PGE<sub>2</sub> on the spontaneous apoptosis, PGs were consequently added the culture medium both at the preincubation and the incubation steps. We observed clear spontaneous apoptotic DNA fragmentation in untreated control cells after 4 hr of incubation (Figure 1, lane 2), as reported previously (12). As shown in Figure 1A and 1B, both PGE<sub>1</sub> and PGE<sub>2</sub> clearly inhibited the spontaneous apoptotic DNA fragmentation in a dose-dependent manner. The concentrations of PGE<sub>1</sub> and PGE<sub>2</sub> required for the inhibition of spontaneous apoptosis are about 1  $\mu$ M, being much the same as dosages previously reported for other PG-dependent cellular responses (14, 15).