

分担研究報告書

Ah リガンドが腸上皮に与える影響

研究分担者 鳥巢 剛弘 九州大学病態機能内科 講師

研究要旨 ダイオキシン類は Ah 受容体を介し、様々な生理活性を持つことが油症の一因として知られている。Ah 受容体シグナルによる過剰な活性酸素が中心的な役割を果たすとされている。油症の症状として消化器症状が生じるため、Ah 受容体が腸上皮にどのような影響を及ぼすかについて検討した。腸上皮細胞における Ah 受容体を刺激したところ転写因子の Nrf2 の核内移行を認めた。また Ah 受容体の活性化により Nrf2 の転写産物である HO-1 などの抗酸化遺伝子の上昇を認めた。H₂O₂ による細胞死には差を認めなかったが、細胞内の活性酸素の産生が著明に低下していることが示され、Ah 受容体の活性酸素に対する生理的な重要性が明らかとなった。

A 研究目的

油症に関連する症状に腹痛や下痢などの消化器症状も含まれている。油症患者では約半数の患者に消化器症状が生じ、長期経過した後においても約 3 分の 1 の患者に症状が持続すると報告されている。(1)。油症において消化器症状の出現するメカニズムはまだ不明であるが、油症の全体的なメカニズムとして活性酸素の亢進が示されている。ダイオキシン類は生体内に取り込まれたのち芳香族炭化水素受容体(Ah)受容体に結合する。刺激を受けた Ah 受容体は ARNT と 2 量体を形成し核内へ移行することにより転写活性を有し CYP1A2 や CYP1B1 などの転写産物が生成される。ダイオキシン類はその他の自然界のリガンドと比べると、分解を受けにくいいため、Ah 受容体と強固に結合する。その結果 Ah 受容体シグナルが強く入ることにより大量の活性酸素が作られ、毒性が発揮されると考えられている(2)。

活性酸素に対する生体応答は様々であるが、NRF2 は中心的な役割を果たす転写因子であり、HO-1 などの転写により酸化ストレスに防御的に働くことが知られている(3)。そこで今回、腸上皮細胞における Ah 受容体の活性

化による活性酸素とその防御反応について明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

Caco2 細胞を培養し腸上皮モデルとして使用した。CaCo2 細胞を Ah リガンドで刺激し 6 時間後の細胞を回収した。N-PER(Thermo Fischer Science)により核分画を抽出し anti-NRF2 antibody (ab137550; Abcam)によるウェスタンブロットで NRF2 の核移行を評価した。12 時間後の mRNA を TB Green Premix EX Taqtm II (Takara Bio)で祖久江地下。Real-timePCR で評価した。24 時間後の H₂O₂ 添加し 48 時間後に細胞死について viable cell counting(Nacalai Tesqu)を用いて評価した。ROS の産生を DCFH-DA(Dojindo)で測定した。

C. 研究結果

まず活性酸素ストレスに対して Nrf2 は中心的な役割を果たすため Ah リガンド刺激による Nrf2 の核移行をウェスタンブロットで評価したところ、核移行がみられた(Fig. 1)。Nrf2 の転写活性を探索するために転写産物として代表的な HO-1 の mRNA レベルを調べ

た。腸上皮において HO-1 の増加がみられた (Fig. 2)。酸化ストレスに防御力が増加していると予想され H₂O₂ 刺激による細胞死を調査したが、有意な差は見出されなかった (Fig. 3)。一方、細胞内の ROS については Ah リガンドにより抑制され、栄養飢餓における ROS 産生亢進時には顕著であることが示唆された (Fig. 4)

D. 考察

腸上皮における Ah 受容体の活性化により細胞内 ROS を軽減することが示された。そのメカニズムについて Nrf2 の核内移行と転写亢進が示された。

Ah 受容体は様々な臓器に存在し腸管においては腸管の自然リンパ球を誘導しリンパ濾胞形成に重要であることが知られている (4)。またこのリンパ球は IL-22 産生を介して腸上皮保護に働く。一方、腸上皮における Ah 受容体の欠損は Goblet 細胞の減少やムチン産生の低下を生じる (5)。そのためバリア機構の低下による細菌の侵入や引き続く高サイトカイン血症や慢性腸炎を生じる (5)。すなわち生理的な Ah 受容体は腸管のバリア機構を高める方向に関与する。

本研究における Ah 受容体の活性化による ROS の低下は炎症などの条件下では腸管障害やバリア機構に保護的に働くと考えられる。このことは油症においては極めて過剰な Ah 受容体の活性化であり異なる働きを示すのであろう。生理的な Ah リガンドが腸管バリア保護に働く別の例としてはウロリチンや類似化合物でも示され (6)、Nrf2 による転写産物によるタイトジャンクションの増加が報告されている。ROS はタイトジャンクションを傷害することも知られており、本研究で示した ROS の抑制はタイトジャンクションを保護することで腸管バリアに寄与するのかもしれない。油症においても過剰な Ah 受容体の活性化が腸管バリアに影響を与え消化器症状を

きたすのかは今後検討する必要がある。

E. 結論

腸上皮において Ah 受容体の活性化は活性酸素の制御に重要であることを示した。

参考文献

(1) Akahane M, Matsumoto S, Kanagawa Y, Mitoma C, Uchi H, Yoshimura T, Furue M, Imamura T. Long-Term Health Effects of PCBs and Related Compounds: A Comparative Analysis of Patients Suffering from Yusho and the General Population. *Arch Environ Contam Toxicol*. 2018 Feb;74(2):203-217.

(2) 古江増隆, 石井祐次, 月森清己, 辻学. Aryl hydrocarbon receptor からみた油症の病態と治療開発 2020. *福岡医誌* 112(2):61-89. 2021

(3) Loboda A, Damulewicz M, Pyza E, Jozkiewicz A, Dulak J. Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism. *Cell Mol Life Sci*. 2016 Sep;73(17):3221-47.

(4) Elina A Kiss 1, Cedric Vonarbourg, Stefanie Kopfmann, Elias Hobeika, Daniela Finke, Charlotte Esser, Andreas Diefenbach. Natural aryl hydrocarbon receptor ligands control organogenesis of intestinal lymphoid follicles. *Science*. 2011 Dec 16;334(6062):1561-5.

(5) Amina Metidji, Sara Omenetti, Stefania Crotta, Ying Li, Emma Nye, Ellie Ross, Vivian

Li, Muralidhara R Maradana, Chris Schiering, Brigitta Stockinger. The Environmental Sensor AHR Protects from Inflammatory Damage by Maintaining Intestinal Stem Cell Homeostasis and Barrier Integrity. *Immunity*. 2018 Aug 21;49(2):353-362.e5.

(6)Rajbir Singh, Sandeep Chandrashekarappa, Sobha R Bodduluri, Becca V Baby, Bindu Hegde, Niranjana G Kotla, Ankita A Hiwale, Taslimarif Saiyed, Paresh Patel, Matam Vijay-Kumar, Morgan G I Langille, Gavin M Douglas, Xi Cheng, Eric C Rouchka, Sabine J Waigel, Gerald W Dryden, Houda Alatassi, Huang-Ge Zhang, Bodduluri Haribabu, Praveen K Vemula, Venkatakrishna R Jala. Enhancement of the gut barrier integrity by a microbial metabolite through the Nrf2 pathway. *Nat Commun*. 2019 Jan 9;10(1):89.

Fig1

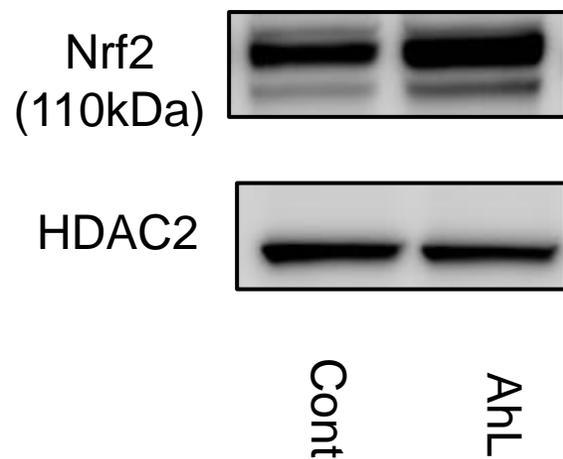


Fig.1 :AhリガンドによるNrf2の核移行を示す。HDAC2は核分画のコントロール。

Fig2

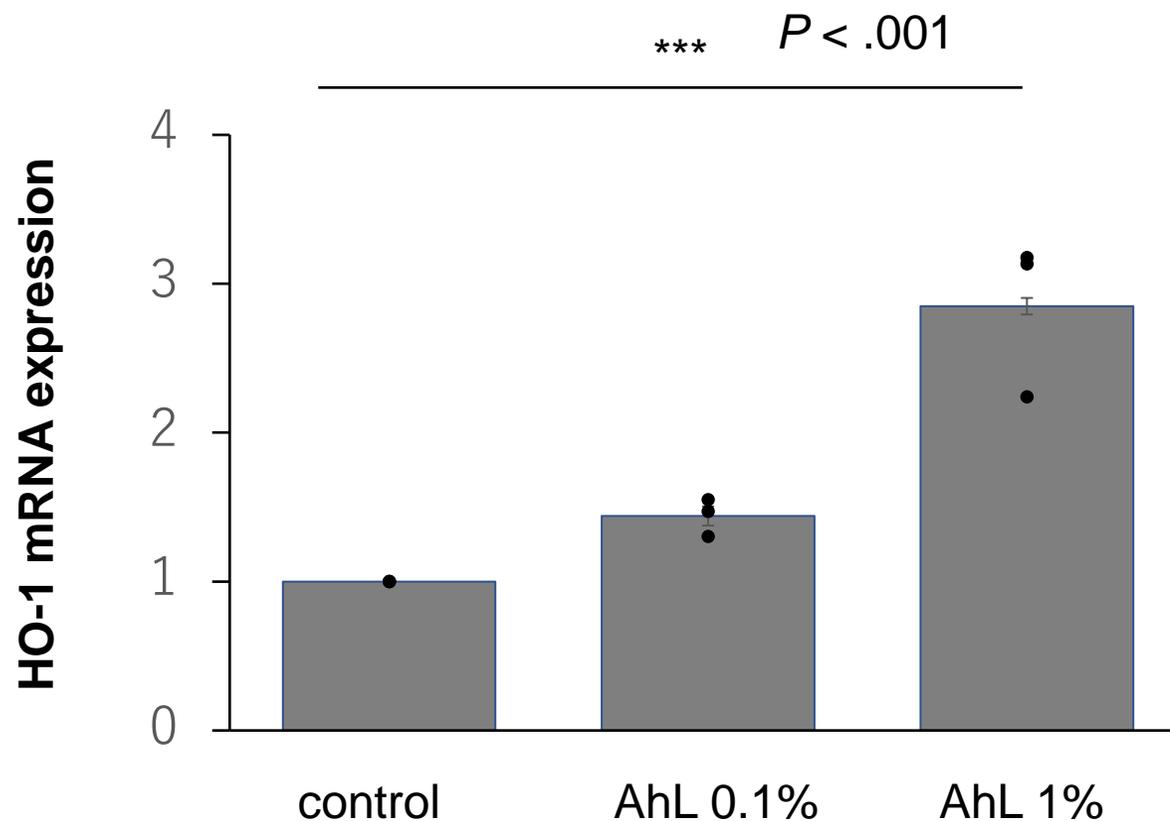


Fig.2 :AhリガンドによるNrf2の転写産物であるHO-1のmRNAが増加することを示す。

Fig3

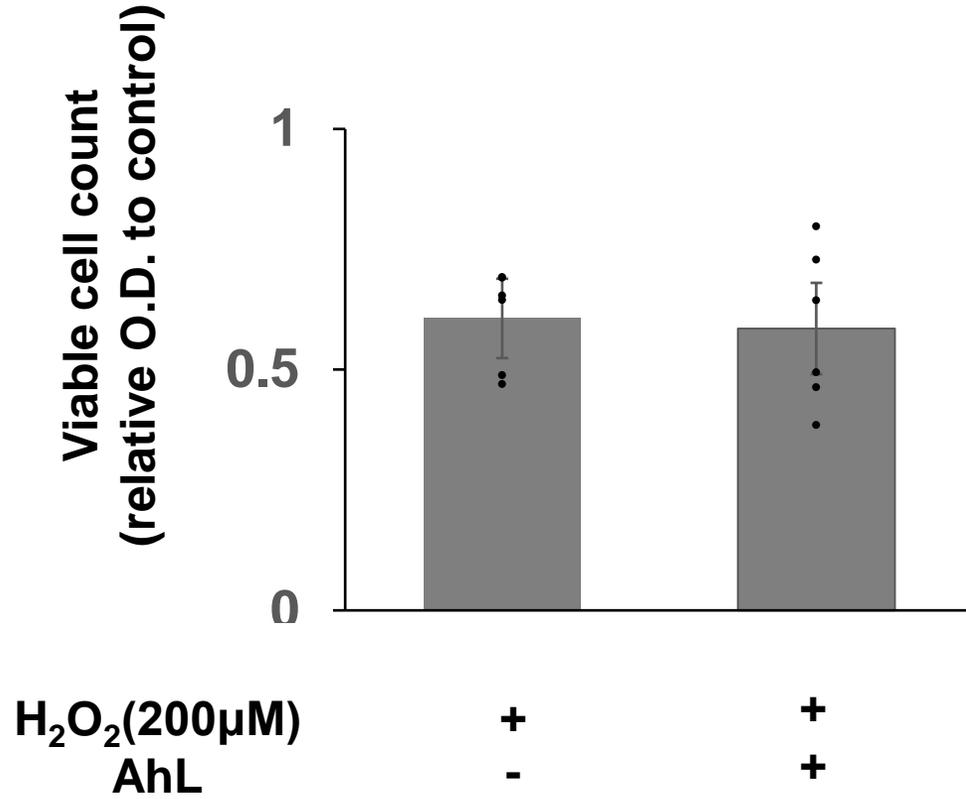


Fig.3: H₂O₂による細胞死に対するAhLの影響を示す。

Fig4

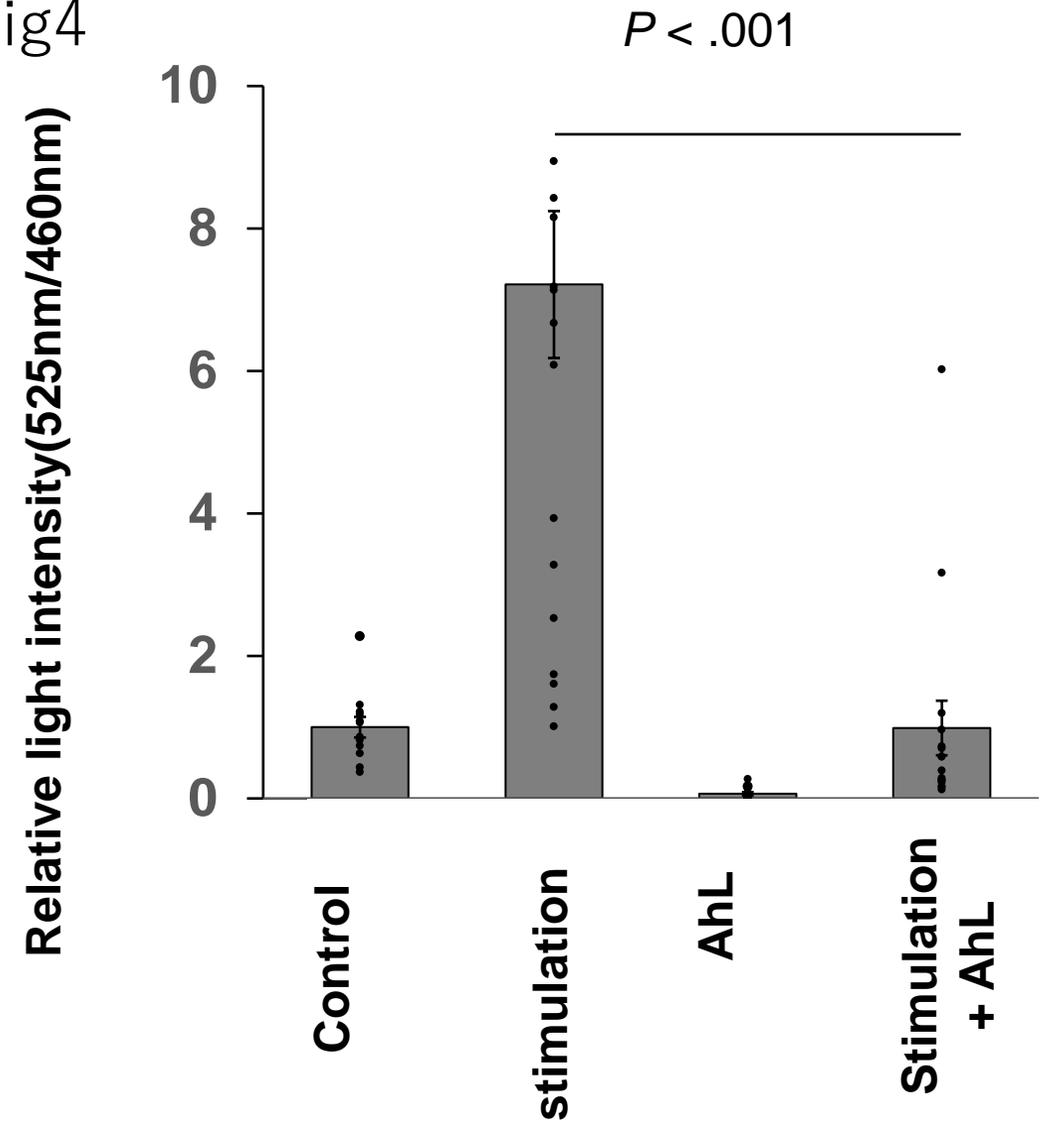


Fig.4: AhLによるROS産生の抑制を示す。