NSAIDs によるヘムオキシゲナーゼ -1 誘導とその役割

水島 徹

要約：非ステロイド系抗炎症薬 (NSAIDs) の副作用である胃潰瘍誘発作用が臨床現場で大きな問題となっている。最近我々は、NSAIDs が胃粘膜細胞死を引き起こすことが NSAIDs 潰瘍の原因の一つであることを見出し報告した。我々は NSAIDs によりヘムオキシゲナーゼ (HO)-1 が誘導されること、およびこの誘導により NSAIDs 依存の細胞死が抑制され、NSAIDs 潰瘍の発症が抑制される可能性を考え研究を開始した。我々はモルモット胃粘膜初代培養細胞を用いて、毒性を示さない低濃度の種々の NSAIDs によって、HO-1 が誘導されることを見出した。この HO-1 誘導は COX 非依存であり、NSAIDs による p38 MAPK の活性化、およびそれによる Nrf2 (HO-1 の転写因子) の核内移行に依存していた。一方我々は、HO-1 阻害剤 (SnMP) により、NSAIDs による胃粘膜細胞死 (アポトーシス) が促進されることを見出した。一方 *in vivo* において我々は、インドメタシンにより形成された潰瘍周辺部位で HO-1 が誘導されていること、およびアポトーシスが起きていることを見出した。さらにラットに SnMP を前投与する事により、インドメタシンによるアポトーシス誘導、および胃潰瘍の形成が促進されることを明らかにした。以上の結果は、NSAIDs によって誘導された HO-1 が、アポトーシスを抑制することにより胃潰瘍の抑制に関与していることを示している。

非ステロイド系抗炎症薬 (non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs) の胃潰瘍副作用が臨床現場で大きな問題になっている。近年胃潰瘍副作用の少ない NSAIDs として、COX-2 選択的 NSAIDs が開発されたが、最近これにはその COX-2 選択性を原因とする新たな副作用 (血栓を起こしやすくし心筋梗塞を誘発

する) があることが分かり、多くの COX-2 選択的 NSAIDs が販売 (開発) 中止となった。

これまで NSAIDs はシクロオキシゲナーゼ (COX) を阻害し、胃粘膜保護因子であるプロスタグランジン (PG) を低下させることにより胃潰瘍を導くと考えられてきた。しかし最近では、NSAIDs 潰瘍の発症が PG 低下作用のみでは説明できないことが分かってきた。例えばインドメタシンをラットに経口投与する場合、胃潰瘍を発症させるために必要なインドメタシンの濃度は、胃粘膜の PG 合成を完全に抑制するのに必要な濃度に比べ、10 倍以上も高いことが知られている。このように NSAIDs 潰瘍の発症には、COX 阻害以外の別の作用も関与していることが明らかになってきたが、この別の作用が何であるかは不明であった。我々は、NSAIDs が胃粘膜細胞を直接傷害する (胃粘膜細胞死を導く) ことが、この別の作用の実体ではないかと考え、研究を開始した。

1. NSAIDs の直接細胞傷害作用 (1, 2)

最初に我々は、モルモット胃粘膜初代培養細胞を用いて、NSAIDs による細胞死を *in vitro* で再現することを試みた。種々の濃度のインドメタシンで胃粘膜細胞を 1 時間または 16 時間処理すると、濃度依存的な細胞死が観察され、インドメタシンによる細胞死を *in vitro* で再現することに成功した。処理時間の違いにより細胞死に必要なインドメタシン濃度が異なっていたため、それぞれどのような細胞死が起きているのかを検討した。その結果、アポトーシスの特徴の一つであるカスパーゼの活性化は、16 時間処理した細胞では検出されたが、1 時間処理した細胞では検出されなかった。従ってインドメタシンは、低濃度長時間処理時にはアポトーシスを、高濃度短時間処理時にはア

キーワード：NSAIDs, ヘムオキシゲナーゼ -1, アポトーシス, 胃潰瘍, p38 MAPK
熊本大学大学院医学薬学研究部 創薬研究センター (〒862-0973 熊本県熊本市大江本町 5-1)
e-mail: mizu@gpo.kumamoto-u.ac.jp 原稿受領日：2007 年 6 月 12 日, 依頼原稿

Title: Induction of HO-1 by NSAIDs and its role in NSAID-induced gastric ulcers. Author: Tohru Mizushima

ポトーシス以外の細胞死、即ちネクローシスを誘導して胃粘膜細胞を直接傷害することが分かった。

次に我々はこの細胞死が NSAIDs の COX 阻害作用とは無関係（非依存）であることを確認するために実験を行い以下に述べる 2 つの結果を得た。一つは、培地中にかなりの高濃度の PG を添加しても、この NSAIDs によるアポトーシス、およびネクローシスが抑制されないという結果、もう一つは、アポトーシス、およびネクローシスを誘導するために必要な NSAIDs の濃度は、COX を阻害するために必要な濃度に比べ 10 倍以上高いという結果である。以上の結果は、NSAIDs によるアポトーシス、およびネクローシス誘導が、COX 阻害作用には依存していないことを示している。

2. NSAIDs 潰瘍発症機構 (3, 4)

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、およ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を起こさないが、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、およびセレコキシブ（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。

3. NSAIDs によるヘムオキシゲナーゼ(HO)-1 の誘導 (5)

NSAIDs が胃潰瘍を導くために NSAIDs による胃粘

図 1

モルモット胃粘膜初代培養細胞を種々の濃度のインドメタシンで種々の時間処理し、HO-1、HSP72、GRP78 の誘導をイムノブロット法で (A, B)、細胞の生存率を MTT 法で測定した (C)。(文献 5 より改変引用)

膜細胞死が必要であることから、この胃粘膜細胞死を抑制するタンパク質は NSAIDs 潰瘍に対して胃粘膜を保護することが考えられる。我々はそのようなタンパク質の候補として、HO-1 を考えた。HO-1 はヘム代謝の律速酵素であり、細胞傷害性の高いフリーのヘムを分解すること、および細胞保護作用の強い一酸化炭素、およびビリベルジンを産生することにより強力な細胞保護作用を持っている。我々は NSAIDs により胃粘膜で HO-1 が誘導され、この誘導が NSAIDs 潰瘍の発症に対し抑制的に働いているのではないかと考え研究を行った。

まず胃粘膜初代培養細胞を用いてインドメタシンが HO-1 を誘導するのかを調べた。その結果図 1 に示すようにインドメタシンは用量依存的、かつ時間依存的に HO-1 を誘導することが分かった。熱ショックタンパク質 (HSP) や小胞体シャペロン (GRP78 など) が NSAIDs により誘導されることを我々は報告しているが(6-9)、図 1 に示すようにこれらのタンパク質の誘導に比べ HO-1 の誘導は、より短時間の内に、より低濃度 (細胞傷害を起こさない濃度) のインドメタシンで起こることが分かった。また調べた限り全ての NSAIDs が HO-1 を誘導した。

次に我々は NSAIDs による HO-1 誘導機構の解析を行った。まず培地中に PG を加えてもこの誘導が抑制されないことから、NSAIDs は HO-1 を COX 非依存的に誘導することを示した。

Nrf2 はリン酸化されることにより活性化され細胞質から核内に移動し、HO-1 遺伝子のプロモーター領域に結合することにより HO-1 遺伝子の発現を誘導する転写因子である。我々は NSAIDs により核内の Nrf2 の量が顕著に増加することを見出した。Nrf2 のリン酸化は種々の MAP キナーゼや PI3 キナーゼなど様々なリン酸化酵素によって触媒されることが報告されている。そこで我々これら酵素の阻害剤を用いて、

NSAIDs による Nrf2 のリン酸化に関与する酵素の同定を試み、p38 MAPK の阻害剤が、NSAIDs による HO-1 の誘導、NSAIDs による Nrf2 の核内移行、および NSAIDs による p38 MAPK の活性化を抑制することを見出した。以上の結果から NSAIDs は、p38 MAPK の活性化、Nrf2 のリン酸化、Nrf2 の核内移行、HO-1 遺伝子の発現誘導を介して HO-1 を誘導することが考えられる。

4. NSAIDs による HO-1 誘導の役割 (5)

次に我々は NSAIDs による HO-1 の誘導が、NSAIDs による胃粘膜細胞死を抑制し、胃粘膜を NSAIDs 潰瘍から保護しているという可能性を検証した。まず試験管内で、NSAIDs による細胞死に対する HO 阻害剤 (SnMP) の効果を調べた。図 2 に示すように SnMP は種々の NSAIDs による細胞死を顕著に促進した。この結果は、NSAIDs による HO-1 の誘導が、NSAIDs による細胞死に対し抑制的に働いていることを示している。

次に *in vivo* での解析を行った。まず NSAIDs 投与により胃粘膜で HO-1 が誘導されるかを組織免疫染色法により調べた。図 3A に示すように、インドメタシンの経口投与により胃粘膜で HO-1 が顕著に誘導された。またこの誘導は HE 染色で明らかになった潰瘍部位、およびその周辺部位で顕著であった。さらに我々は胃粘膜での細胞死を TUNEL 法により検出した。図 3B に示すように、インドメタシンの経口投与により胃粘膜で TUNEL 陽性細胞 (細胞死) が検出され、さらにこの細胞死は SnMP を同時に投与することにより顕著に促進された。やはり潰瘍部、およびその周辺部位で細胞死が顕著であった。以上の結果から、NSAIDs は *in vivo* でも (胃粘膜でも) HO-1 を誘導し、この誘導が NSAIDs による胃粘膜細胞死を抑制していることが考えられる。

図 2

モルモット胃粘膜初代培養細胞を、SnMP (HO の阻害剤) 存在下 (黒丸)、および非存在下 (白丸)、種々の NSAIDs で処理し細胞の生存率を MTT 法で測定した。(文献 5 より改変引用)

図 3 ラットに SnMP を前投与し (B のみ)、さらにインドメタシンを経口投与した。4 時間後に胃を提出し組織切片を作成した。組織免疫染色法により HO-1 の誘導を (A)、TUNEL 染色により細胞死を (B)、HE 染色により組織傷害を調べた。また胃を提出し潰瘍の大きさを計測した (C)。(文献 5 より改変引用)

最後に我々は、NSAIDs による HO-1 の誘導が、NSAIDs 潰瘍から胃粘膜を保護しているのかを検討するために、NSAIDs 潰瘍に対する SnMP の効果を調べた。図 3C に示すようにインドメタシン依存の潰瘍形成は、SnMP を前投与することにより顕著に促進された。この結果は、NSAIDs による HO-1 の誘導が、NSAIDs 潰瘍に対して抑制的に働いていることを示唆している。

まとめ

以上の結果から、NSAIDs 潰瘍の発症に NSAIDs による胃粘膜細胞死が必須であること、NSAIDs は Nrf2 の活性化を介して HO-1 を *in vitro*、および *in vivo* で誘導すること、およびこの誘導により NSAIDs 依存の

胃粘膜細胞死が抑制され、それにより NSAIDs 潰瘍の発症も抑制されることが分かった。これらの結果を受けて我々は毒性のない HO-1 の誘導剤が抗潰瘍薬として有望であると考え、現在そのスクリーニングを行っている。

文 献

- 1) Tomisato W, et al. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2001;281:G1092-1100.
- 2) Tanaka K, et al. J Biol Chem. 2005;280:31059-31067.
- 3) Tomisato W, et al. Biochem Biophys Res Commun. 2004; 323:1032-1039.
- 4) Tomisato W, et al. Biochem Pharmacol. 2004;67:575-585.
- 5) Aburaya M, et al. J Biol Chem. 2006;281:33422-33432.
- 6) Tanaka K, et al. Mol Pharmacol. 2007;71:985-993.
- 7) Tsutsumi S, et al. Oncogene 2006;25:1018-1029.
- 8) Tsutsumi S, et al. Cell Death Differ. 2004;11:1009-1016.
- 9) Namba T, et al. Mol Pharmacol. in press.