

Ph.D. Thesis of Medicine

**薬剤起因性消化管粘膜傷害における  
粘膜損傷および防御関連因子の動態に関する研究**

Study on mucosal damage and defense related factors  
in drug-induced gastrointestinal mucosal injury

香 渡 優 [DM16016]

北里大学大学院医療系研究科医学専攻博士課程

指導教授：小泉 和三郎

2020 年 1 月

### 【著者の宣言】

本学位論文は、著者の責任において実験を遂行し、得られた真実の結果に基づいて正確に作成したものに相違ないことをここに宣言する。

【本博士論文を構成する論文】

1. Kodo M, Kawashima R, Tamaki S, Kawakami F, Maekawa T, Koizumi W, Ichikawa T : Altered expression of amino acid transporter LATs of intestinal cells in 5-fluorouracil-induced intestinal mucosal inflammation. The Kitasato Medical Journal, 50(1), 2020. (in press)
2. Maekawa T, Tsushima H, Kawakami F, Kawashima R, Kodo M, Imai M, Ichikawa T : Leucine-rich repeat kinase 2 is associated with activation of the paraventricular nucleus of the hypothalamus and stress-related gastrointestinal dysmotility. Frontiers in Neuroscience, 13, Article905, 2019.
3. Ooka S, Kobayashi K, Kawagishi K, Kodo M, Yokoyama K, Sada M, Tanabe S, Koizumi W : Roles of Capsule Endoscopy and Single-Balloon Enteroscopy in Diagnosing Unexplained Gastrointestinal Bleeding. Clinical Endoscopy. 49(1): 56–60. 2016.

## 【要旨】

近年の癌治療において化学療法の進歩が目覚ましく、癌の種類やステージ（病期）によっては外科的治療と変わらない効果が認められおり、外科的処置、放射線療法と化学療法の併用により、治療成績は格段に上がっている。一方で、抗癌剤は吐き気・嘔吐を伴う腸管粘膜傷害が副作用として大きな問題となっている。この副作用が患者の QOL を著しく低下させることが問題視されるようになり、その対策が急務になっている。

このように、薬剤による消化管傷害は多岐に渡り、一貫した治療法がないのが現状であることから、本研究では、粘膜防御の観点から粘膜傷害に対する基礎的知見を積み上げることを目標とした。

本研究においてまず消化管の栄養素吸収機能に着目し、特に、必須アミノ酸を含む広範で非選択的なアミノ酸を輸送する栄養吸収にとって重要な消化管トランスポーターである LAT (L-type amino acid transporter) の病態依存的な発現変動を検証した。抗腫瘍剤（フルオロウラシル; 5-FU）により抗癌剤起因性腸管粘膜傷害モデルマウスを作成し、粘膜炎の重篤度と LAT 発現を評価・比較検討した。

その結果、5-FU 投与により、小腸長および絨毛高の短縮が見られ、組織学的変化を伴う小腸粘膜損傷が観察された。5-FU の持続的な粘膜傷害により PAS 陽性細胞の減少が見られ、上皮細胞の防御的機能の低下が想定された。5-FU 投与により、パイエル板数および浸潤細胞数の増加に加え、IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  の mRNA 発現上昇が見られたことから、炎症性サイトカイン産生を伴う免疫応答の亢進が示唆された。

また、小腸組織における LAT1,2 の mRNA およびタンパク質発現を検討したところ、LAT1 発現は、5-FU 投与後に有意に増加し、一方で、LAT2 発現は低下するといった相反する結果が得られた。この LAT1 の発現上昇については二つ



の解釈ができる。

一つは、侵襲を受けた粘膜が、傷口を修復するために、LAT1 を介する各種アミノ酸を必要としている結果と考える。その場合、不足のアミノ酸を補ってやれば、LAT1 を高発現させて取り込みを促す必要が無くなり、結果として LAT1 は発現誘導されないと考えることができる。しかしながら、本研究は 5-FU の連続投与による傷害モデルであり、この発現が修復過程のイベントとして生じたとは考えにくい。加えて、通常餌を制限無く与えていた状態での飼育であったため、摂餌量が減少したとはいえ、必須アミノ酸が極めて不足した状態であったとは言い難い。

2 つ目として、炎症反応が LAT1 発現を上昇させるといった機序であり、我々は後者を支持する。なぜなら、IL-1 $\beta$  などの炎症性サイトカインの発現は小腸後部にいくにつれて顕著となり、LAT1 発現上昇も同様の傾向を示したことから、LAT1 発現は、粘膜傷害の程度、すなわち炎症の程度と相関関係にあると判断できるからである。ただ、サイトカインが傷害部位に適度に産生され作用することは、組織修復には不可欠であり、本モデルのような継続的な軽度侵襲状態が、既に浸潤しているリンパ球などを活性化して組織修復を促すといったことも考慮すると、LAT1 誘導はそれに付随した現象と考えることもできる。つまり、粘膜障害を生じた生体の免疫応答として、生体がある時おかれている状態で必要なアミノ酸を選択し、その吸収量を調整している可能性も示唆していると考えられる。どちらにせよ、LAT1 発現上昇かつ LAT2 発現低下は、抗癌剤起因性消化管粘膜傷害時に生じた現象であり、LAT1 が消化管傷害の指標となる可能性を提案する。

癌の原因として、遺伝的原因、食生活などの生活習慣、ホルモンの暴露などによる化学的環境、局所での持続的な炎症があげられる。LAT1 は癌の発生機序にも深く関わりがあり、各種癌において LAT1 が発現上昇し、癌マーカーとなる可能性が示唆されている。今回の結果より、癌の前段階の一つとも考えられる炎

症部位でも LAT1 が発現上昇することが考えられ、LAT1 は消化管炎症のマー  
カーとなる可能性があることを示唆しており、炎症から発癌に至るメカニズム  
解明や前癌病変の状態での早期発見の為に LAT1 が有用である可能性が考えら  
れた。最後に、本実験の結果は、粘膜傷害時の体内のアミノ酸バランスの変化が  
想定されるものであり、この偏(かたよ)りは、粘膜治癒に必要とされるアミノ酸  
を優先的に取り込むということを意味している。従って、本研究が臨床現場にお  
いて、粘膜治癒のために必要なアミノ酸を考慮し優先的に投与するといった、よ  
り進んだ栄養療法を実践するための一助となるものと考えられる。

## 【目次】

1. 著者の宣言	ii
2. 本学位論文を構成する論文	iii
3. 要旨	iv - vi
4. 目次	vii - viii
5. 背景および目的	1-3
1) 癌化学療法による副作用	
2) 生体におけるアミノ酸の役割	
3) アミノ酸の吸収輸送	
4) アミノ酸トランスポーターと疾患との関連性	
5) 抗癌剤起因性消化管粘膜傷害におけるアミノ酸トランスポーター	
6. 方法	4-7
1) 薬物投与によるモデル動物の作成	
2) 組織学的分析	
3) ジアミノオキシダーゼ (DAO) 活性	
4) 腸管上皮透過性試験	
5) 定量的リアルタイム逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-qPCR)	
6) ウェスタンブロッティング	
7) 統計分析	
7. 結果	8-12
1) 5-FU 投与後の生体変動	
2) 5-FU 投与による小腸の組織学的変化	
3) 5-FU 投与が及ぼす小腸機能への影響	
4) 小腸局所における免疫応答への影響	
5) 5-FU 投与によるアミノ酸トランスポーター発現の変化	

8. 考察	13-17
9. 参考文献	18-23
10. 謝辞	24
11. 利益相反 (COI) 開示	25
12. 図表 (添付)	Attachment file 1-21

## 【背景および目的】

### 1. 癌化学療法による副作用

近年、癌罹患患者数及び癌死亡者数は増加傾向にあり[1]、その治療法が盛んに研究され、実臨床に生かされてきた。治療法の一つとして、新たな抗癌剤の開発や様々な抗癌剤の新たな組み合わせが検討され、患者の治療に還元されており、従来と比較すると、食道癌、胃癌、大腸癌など多くの癌種で中間生存期間(median survival time)が延長してきている[2、3]。しかし、抗癌剤が多く使用されるようになったことに伴い、その副作用で苦しむ患者も増加してきている。抗癌剤の副作用としては消化管粘膜障害(下痢、便秘、嘔気、嘔吐、食思不振など)、血球減少、脱毛など様々なものがあげられるが、特に、抗癌剤起因性腸管粘膜傷害は、時として患者から食べる楽しみを奪い、著しい栄養状態の悪化を招き、ひいてはADL及びQOLの低下、生存期間の短縮にもつながっており、その対策が臨床現場で求められている[4、5]。

### 2. 生体におけるアミノ酸の役割

一方、栄養の消化吸収に目を向けると、糖、脂肪、アミノ酸の吸収が消化管で行われており、中でもアミノ酸は、生体を構成するタンパク質構成要素であるとともに、生体反応を制御するシグナルとしての働きを持つことが近年明らかになってきている。例えば肥満の病態では肝臓を含めた各臓器のアミノ酸含量は増加し、その下流のmTOR(mammalian target of rapamycin)経路が活性化していることがすでに報告されており[6、7]、アミノ酸が生命現象の維持に必要な蛋白合成や、オートファジーにつながる重要な細胞内シグナル伝達経路を担う役割を果たすと考えられている[8、9]。

### 3. アミノ酸の吸収輸送

そして、アミノ酸トランスポーターはアミノ酸輸送系（amino acid transport system）として、1960年代から研究が始まり、アミノ酸分子の多様性を反映してさまざまな分子が記載されてきた[10]。LAT1、2は必須アミノ酸を含む中性アミノ酸を透過し、基質選択性が広いことから、栄養吸収にとって重要な消化管トランスポーターであると考えられる為、この分子に着目し、研究対象とした。これら LATs はナトリウムイオン依存性の 12 回膜貫通型タンパク質であり、4F2hc を補助サブユニットとして、ヘテロ二量体を形成している[11]。LAT1 は、Val、Leu、Ile、Phe、Tyr、Trp、Met などの大型アミノ酸を輸送する[12]。一方、LAT2 は、LAT1 が輸送するアミノ酸以外に更に Gly、Ala、Ser、Thr、Cys、Asn、Gln の 7 種類の小型のアミノ酸を含む、より多くの種類のアミノ酸を輸送するという特徴がある[11、13]。

#### 4. アミノ酸トランスポーターと疾患との関連性

近年、B 細胞に発現するヒスチジントランスポーターが炎症を制御することや[14]、グルタミン酸トランスポーター機能異常が精神神経疾患の発症に関わるなどの報告がなされ[15]、アミノ酸トランスポーターの傷害過程への関与が指摘され始めている。また、癌の早期発見、病勢把握の一助とする為に、検査法の一つとして様々な腫瘍マーカーも開発されてきており、実際に臨床現場においても大いに活用されている[16-18]。その中でも近年、LAT1 は癌との相関が検討されており、腫瘍細胞に必須アミノ酸を供給する主要なトランスポーターとも考えられている[10]。ヒト腫瘍細胞では肝癌、骨髓異形成症候群、食道癌、肺癌、胃癌等において、その発現上昇と腫瘍の悪性度や生命予後との相関が示唆されており、腫瘍マーカーとしての可能性が指摘されている[19、20]。

#### 5. 抗癌剤起因性消化管粘膜傷害におけるアミノ酸トランスポーター

従って、消化管への影響が大きい抗癌剤を使用することにより、LAT1、2 の



発現がどのように変化するかを明らかにすることは、消化管粘膜傷害時のアミノ酸取り込み状況を捉えることに直結する。今後臨床において LAT1 を腫瘍マーカーとして測定する際に、また、傷害が生じた粘膜局所での LAT 発現を明らかにできれば、抗癌剤起因性腸管粘膜傷害の治療を行っていく上で、アミノ酸トランスポーターそのものが治療標的になる可能性がある。そこで本研究では、抗癌剤起因性消化管粘膜傷害モデルを用いて、小腸におけるアミノ酸トランスポーターLATs 動態の解析を行った。

## 【方法】

### 1. 薬物投与によるモデル動物の作成

7 週齢の雄 BALB/cAJcl マウス（各実験群で  $n=6\sim 10$ ）を CLEA-Japan（東京、日本）から入手し実験に使用した。北里大学医療衛生学部実験動物施設内の特定病原体が存在しない飼育室において、12 時間の明暗サイクルで  $23\pm 3^{\circ}\text{C}$  の条件で飼育した。食餌（CRF-1、オリエンタル酵母株式会社、東京、日本）と水は自由摂取させた。動物実験は、北里大学動物実験委員会の管理とガイドラインに従って、北里大学倫理委員会の承認を得て実施された。抗癌剤の 1 つである 5-フルオロウラシル（5-FU）を用いて、安定した腸粘膜損傷モデルを作成した[21、22]。5-FU 誘発腸粘膜炎症動物モデルは炎症性サイトカインのレベルの増加と重度の下痢および体重減少を引き起こすことが、これまでの報告において実証されている[23-25]。5-FU は 0.5%カルボキシメチルセルロース（CMC）溶液に懸濁した。調製した薬剤は、ゾンデを用いて強制的に 1 日 1 回（50 mg/kg/day）、4 日間経口投与した。対照動物としてのコントロールマウスには、5-FU の代わりに 0.5%CMC を投与した。投与後 0~4 日目に、体重、便量、摂餌量および摂水量を 5-FU を投与する前に 1 日 1 回測定した。経口投与や標本収集などのすべての動物実験は、マウスの取り扱いに熟練した研究者が実施した（各研究者は、解剖学、消化器病学、動物実験の専門家である）。さらに、10 年以上の経験を持つ専門研究者が標本の観察と遺伝子発現分析を実施した。

### 2. 組織学的分析

マウスを頸椎脱臼により安楽死させ、小腸を採取し、小腸長とパイエル板数を測定した。その後、空腸（小腸上部）と回腸（小腸下部）に分割した。採取した組織は、4%パラホルムアルデヒド/PBS に直ちに浸し、 $4^{\circ}\text{C}$ 、24 時間固定した。パラフィン包埋後、 $\phi 4\mu\text{m}$  のパラフィン切片を作成し、ヘマトキシリン-エオシ



ン (H&E) 染色を施した。H&E 染色像から絨毛高を測定した。絨毛高は、クリプト上部から頂端部までとし、各マウスの組織切片絨毛 10 本の平均値として算出した。H&E 染色像から浸潤細胞数をカウントした。各マウスの組織切片の陰窩 10 個に存在する浸潤細胞をカウントし、平均値として算出した。組織切片を過ヨウ素酸シッフ (PAS) 染色で染色した。PAS 染色は、中性ムチン (赤紫色) 検出する方法である。各マウスの粘膜の PAS 染色像から一定エリア分の PAS 陽性細胞を画像解析ソフトウェア (Image J、米国国立衛生研究所、米国) を用いて粘膜上皮全面積に対する PAS 陽性面積として割合 (%) で算出し、エリア 10 箇所 の平均値で表した。パラフィン切片を用いて免疫組織化学染色を行った。各種栄養トランスポーター関連抗体を用いて検出した。脱パラ後、0.3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  で内因性ペルオキシダーゼの失活を行い、Protein Block (Agilent Technologies、カリフォルニア州、米国) を用いて非特異的タンパク質のブロッキングを行った。一次抗体は、抗 LAT1 (Trans Genic Inc.、福岡、日本)、抗 LAT2 (Abcam、ケンブリッジ、英国) および抗 SGLT1 (Abcam) を用いた。抗体の希釈には抗体希釈剤 (Agilent Technologies)、二次抗体には VECTASTAIN Elite ABC Kit (Vector Laboratories、Inc.、カリフォルニア州、米国) を用い、ImmPACT DAB Substrate (Vector Laboratories、Inc.) を用いて検出した。光学顕微鏡 (オリンパス株式会社、東京、日本) を用いて観察と撮影を行った[26]。

### 3. ジアミノオキシダーゼ (DAO) 活性

血中 DAO 活性は小腸粘膜の完全性と成熟度の指標となる。マウスから採取した血漿に西洋ワサビペルオキシダーゼ、ジアニシジンおよびカダベリンを添加し、完全に混合してから、37°C で 30 分間インキュベートした。436 nm で吸光度を測定した[27]。

### 4. 腸管上皮透過性試験

バリア機能を評価するため in vivo 腸管上皮透過性試験を行った。マウスに透過性トレーサー (FITC 標識デキストラン 60 mg / 100 gB.W., MW 4000; Sigma-Aldrich) を経口投与した。4 時間後に眼窩採血を行った。各サンプルの蛍光強度 (励起、492 nm、発光、525 nm) から FITC-デキストランの濃度を割り出した。濃度算出には FITC-デキストランの連続希釈によって作成された標準曲線から決定した[28]。

#### 5. 定量的リアルタイム逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-qPCR)

TRIzol RNA 抽出試薬 (Thermo Fisher Scientific、マサチューセッツ州、米国) を用いて組織から全 RNA を抽出した。PrimeScript RT 試薬キット (Takara Bio Inc., 滋賀、日本) を用いて逆転写反応により一本鎖 cDNA を合成した。SYBR Select Master Mix (Thermo Fisher Scientific) を用いてリアルタイム逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) を行った。インターロイキン (IL) -1 $\beta$ 、IL-4、IL-6、IL-10、IL-13、腫瘍壊死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、LAT1、LAT2、4F2hc、SGLT1、およびグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) の mRNA 発現を解析した。各遺伝子の特異的プライマーを表 1 に示した。データは各サンプルの GAPDH 値で補正した[26]。

#### 6. ウェスタンブロッティング

組織を溶解バッファー (150 mM NaCl、0.1% Triton X-100、0.5% デオキシコール酸ナトリウム、0.1% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、50 mM Tris-HCl (pH 8.0) およびプロテアーゼ阻害剤) に浸し、ホモジナイザーで粉砕した。さらに、ホモジネートを 4°C で 2 時間攪拌し、4°C、12,000 rpm で 20 分間遠心分離し、上清を回収した。BCA タンパク質アッセイキット (Thermo Fisher Scientific) を用いてタンパク質濃度を推定した。タンパク質濃度 10  $\mu$ g 分のサンプルに等量の 2X SDS-PAGE サンプルバッファーを加え、100°C で 5 分間煮沸した。サン

プルを 5~20%勾配ゲル (ATTO CORPORATION、東京、日本) にアプライし泳動した。次いで、トランスブロッタースystem (Bio-Rad Laboratories、Inc.、カリフォルニア州、米国) を使用して PVDF 膜に転写し、PVDF ブロッキング試薬 (Toyobo Co.、Ltd.、大阪、日本) で非特異的タンパク質をブロッキングした。抗 LAT1 (1 : 500 希釈) (Trans Genic Inc.) および抗 LAT2 (1 : 1000 希釈) (Abcam) でした。一次抗体を Can Get Signal 免疫反応エンハンサー溶液 (東洋紡績株式会社、大阪、日本) で希釈し、一晚 4°C で反応させた。二次抗体は、VECTASTAIN Elite ABC Kit (Vector Laboratories、Inc) を使用した。HRP 基質 (Luminata cresendo; Merck Millipore、マサチューセッツ州、米国) でシグナルを発光させ、Odyssey Infrared スキャナー (LI-COR。Inc.、NE、USA) を用いて検出し、ImageJ ソフトウェアを使用して定量化した[29]。

## 7. 統計分析

データは平均値±標準偏差 (SD) として表記した。GraphPad Prism バージョン 6.0 (GraphPad Software、Inc.、カリフォルニア州、米国) を使用してデータを分析した。連続変数の分布の正規性は、コルモゴロフ-スミルノフ検定を使用して評価し、反復比較分散分析とスチューデントの両側 t 検定を用いて統計比較を行った ( $p < 0.05$ ) 実験群の n 数は、コントロール群対 5-FU 群 : n = 6 対 n = 6、n = 8 対 n = 10、n = 4 対 n = 4 で行った (分析ごとに異なる)。

## 【結果】

### 1. 5-FU 投与後の生体変動

5-FU 投与による全身への影響を検討するため、飼育中、経時的に、体重、糞便量、摂餌量、摂水量を測定した。コントロール群（C）の体重は、飼育期間中を通して約 30g とほぼ変動しなかった。一方、5-FU 群では投与前に比べ投与 4 日後、約 26g となり 13% の減少が見られ、C 群と 5-FU 群間で有意差が見られた（図 1）。糞便量は C 群ではほとんど変化はみられなかったが、5-FU 群では投与 4 日後に 53% の減少が見られ両群間で有意差が見られた（図 2）。摂餌量および摂水量は、C 群ではほとんど変化は見られなかったが、5-FU 群では投与 4 日後 30% 前後の減少が見られ、両群間で有意差が見られた（図 3, 4）。以上より、5-FU 投与により、摂餌量、摂水量減少と共に糞便量減少が生じて、結果的に体重減少を伴う全身への影響が見られたと考えられた。

### 2. 5-FU 投与による小腸の組織学的変化

伸縮性に富む消化管は、傷害を受けると浮腫や線維化などの影響を容易に受け、全体として腸管が短縮する傾向にあるため、腸管長は、粘膜傷害の重症度の指標として用いられる。そこで、まずマクロな変化を検討するために、C 群および 5-FU 群の小腸全体の長さを計測し比較検討した。C 群では 41cm であるのに対し、5-FU 群では 37cm と、有意に減少した（図 5）。

次に、詳細な組織学的変化を確認するために、組織切片を作製し、H&E 染色により形態観察を行った。C 群と比較すると 5-FU 群では、5-FU 投与により空腸絨毛の上皮細胞の組織構築の不均一性が増しており、大部分のクリプト形態が崩壊していた（図 6）。回腸においても、同様の変化が観察された。さらに、絨毛高を測定し比較したところ、5-FU 群は C 群に比べ、空腸、回腸それぞれ約 17%、66% の短縮が観察された（図 7）。以上より、5-FU 投与により小腸粘膜の



上皮細胞が損傷を受けている可能性が考えられた。

粘膜損傷度検討のひとつとして PAS 染色を行った。空腸・回腸ともに C 群と比較すると 5-FU 群で PAS 陽性杯細胞の減少がみられた(図 8)。空腸では C 群では一絨毛あたり PAS 陽性細胞が 10%であったのに対し、5-FU 群では 4%まで低下した。空腸においても、5-FU 投与により PAS 陽性細胞が 18%から 4%まで有意に減少した(図 9)。以上より、5-FU による持続的な粘膜損傷が、杯細胞の減少を伴う上皮細胞の防御的機能の低下を引き起こしていると考えられた。

### 3. 5-FU 投与が及ぼす小腸機能への影響

腸管粘膜バリアの破綻は、粘膜下組織への抗原の侵入を許し、炎症反応と上皮損傷を誘発する。マウスに FITC-デキストランを強制摂取させ、FITC-デキストラン投与の 4 時間後に血清中の蛍光を定量化した。4 日目では対照マウスと比較して 5-FU 群で FITC-デキストランレベルが約 4 倍増加し、これらのマウスのバリア機能の低下が示唆された(図 10)。腸粘膜恒常性を評価するため、腸の DAO 活性を測定した。DAO 値は、C 群より 5-FU 群で有意に低下した(図 11)。

### 4. 小腸局所における免疫応答への影響

パイエル板は腸管関連リンパ組織の構成要素の一つであり、腸内細菌など腸管内物質に対する免疫応答の制御に関わっている。そこで、小腸のパイエル板の数を C 群と 5-FU 群で比較したところ、C 群が平均 5 個であったのに対し 5-FU 群は約 7 個と増加しており、有意差が見られた(図 12)。また、H&E 染色像を用いて、細胞増殖帯の浸潤細胞数を比較検討した。3 絨毛エリアを一カ所として十カ所計測し平均化した。空腸において、C 群では 32 個であったのに対し 5-FU 群では 74 個とおおよそ二倍に増加した。回腸でも、C 群では 32 個であったのに対し F 群では 55 個と、空腸同様、有意に増加した(図 13)。粘膜の透過性亢進

は、管腔抗原の粘膜下組織への移動を引き起こし、粘膜固有層の免疫細胞をこれらの抗原にさらし、炎症反応および上皮損傷を誘発する。マウスに FITC-デキストランを投与し、FITC-デキストラン投与の 4 時間後に血清中の蛍光を定量化した。図 10 に示すように、4 日目には、コントロールマウスと比較して 5-FU 群で FITC-デキストランレベルが約 4 倍増加し、これらのマウスのバリア機能の低下が示唆された。腸粘膜の恒常性を評価するために、腸の DAO 活性を測定した。DAO 値は、対応するコントロールより 5-FU グループで有意に低く、空腸より回腸で低くなる傾向があった（図 11）。

さらに、採取した小腸を口腔側から肛門側にかけて 8 カ所に均等割し、それぞれの組織を用いてリアルタイム PCR 法による遺伝子発現解析を行った。5-FU 投与により、パイエル板の増加および細胞浸潤が見られたことから（図 12, 13）、何らかの生体防御反応が生じていることが示唆されたため、炎症関連物質であるサイトカイン動態に着目し、それらの mRNA 発現変動を検討した。IL-1 $\beta$  の mRNA 発現は、C 群においては、小腸部位に関わらず、わずかに検出されたが、5-FU 群では、数倍から 10 倍前後の発現上昇を認めた。この発現は、特に、小腸後半である回腸で有意に上昇した（図 14）。IL-6 および TNF $\alpha$  の mRNA 発現は、IL-1 $\beta$  と同様に C 群では小腸部位に関わらず一定の発現が見られたが、5-FU 群では数十倍に上昇し、特に小腸後半にいくにつれて上昇する傾にあった（図 14）。一方、IL-4、IL-10、IL-13 の mRNA 発現は、5-FU を投与しても、変動しなかった（図 14）。

以上より、5-FU 投与後の小腸粘膜において、パイエル板数増加および浸潤細胞数増加とともに、炎症性サイトカインである IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF $\alpha$  の発現が上昇したことから、5-FU 投与により、小腸に炎症を伴う粘膜傷害が生じていると示唆された。また、小腸後半にいくにつれて、サイトカイン発現が上昇する傾向にあることから、空腸よりも回腸において炎症反応が増大すると考えられた。

## 5. 5-FU 投与によるアミノ酸トランスポーター発現の変化

消化管上皮細胞には、栄養物質や薬物を輸送するトランスポーターが発現しており、栄養吸収や薬物取り込み以外にも、生体応答などの様々な役割が想定される。アミノ酸は、生体反応を制御する機能物質としての側面もあり、その輸送系にも重要な役割があると考えられている。今回の実験では、そのなかでも、広範な基質選択性を持つ LAT シリーズに着目した。採取した小腸組織を用いて、リアルタイム PCR 法により、アミノ酸トランスポーターLATs の mRNA 発現解析を行った。定常状態 (C 群) の小腸粘膜において、LAT1 は部位に関わらず一定の発現が見られ (図 15A)、一方、LAT2 は、小腸中央部に行くにつれて徐々に高値を示し、後半に行くにつれて低値を示す傾向にあった (図 16A)。5-FU を投与した場合、LAT1 発現は、数倍から 20 倍前後の発現上昇を認めた。この発現は、特に、小腸下部である回腸で有意に上昇した (図 17)。一方で、LAT2 の発現は、5-FU 群では C 群に比べて顕著に減少した。これは、どの部位においても有意な減少であった (図 17)。また、LATs の補助サブユニットである 4F2hc の発現は、C 群において小腸部位による発現量に明確な傾向は認められなかったが、5-FU 投与により、全小腸にわたり数倍程度の発現低下が見られた (図 17)。

また、mRNA 発現変動がみられた LATs のタンパク質発現に関して、ウェスタンブロッティングを用いて検討した。検討には、両群間で mRNA 発現差異が顕著な部位を用い、LAT1 は No.7 を、LAT2 には No.3 を実験に使用した。5-FU 投与により、小腸組織における LAT1 発現は 1.5 倍程度上昇した (図 18A,B) のに対し、LAT2 は五分の 1 程度にまで減少した (図 19A,B)。また、LATs 発現の局在を調べるため、LATs 抗体を用いた免疫組織染色により検討をおこなった。正常マウス (C 群) の小腸粘膜において、LAT1 の発現は、上皮細胞内かつ核外縁に発現を認め、特に、絨毛の下半分に発現が確認された (図 15B)。5-FU を投与すると、予想通り、LAT1 発現が増強した (図 18C)。一方、正常マウス (C 群) の小腸粘膜において、LAT2 の発現は、空腸では、上皮細胞の側細胞膜および基

底膜で強く発現し、下部である回腸になるにつれて、側細胞膜での発現が弱くなり、代わりに刷子縁および頂側膜に強く発現していた(図 16B)。予想通り、5-FU を投与すると、LAT2 発現は、空腸および回腸ともに減少した(図 19C)。

チミジル酸シンターゼ阻害効果により DNA 合成が停止し、細胞増殖が抑制されることが 5-FU の作用機序である。ターンオーバーが早い腸管上皮細胞にも 5-FU が作用し、上皮細胞自体が崩壊する、これが、いわゆる抗癌剤の副作用である。本実験でのアミノ酸トランスポーター発現への影響が、単なる上皮組織の欠落によるものでないことを証明するため、他の栄養素トランスポーターの発現を検証した。代表的な栄養素であるグルコースを輸送するグルコーストランスポーターである SGLT1 の発現を検討したところ、5-FU を投与しても、mRNA 発現および IHC によるタンパク質発現に変化は見られなかった(図 20)。

以上より、5-FU により上皮細胞が傷害を受けると、LATs を介する多くの中性アミノ酸の輸送に影響が及ぶこと、特に、LAT2 のみを輸送路とするアミノ酸 (Gly、Ala、Ser、Thr、Cys、Asn、Gln) の取り込みが低下すると予想された。同時に、炎症時において LAT1 発現が有意に増加し、一方で、LAT2 発現が低下するといった相反する結果が得られたことから、LATs 発現の増減が、消化管粘膜炎症の指標になる可能性があるとし唆された。



## 【考察】

消化器癌化学療法において、腸管粘膜傷害などの副作用がたびたび引き起こされ、口内炎や潰瘍の発症にとどまらず、栄養・代謝障害などの機能的症状が伴う。さらに、味覚変化や消化管疼痛などからくる食欲不振が長く続くと、栄養状態が悪化し、治療の妨げになる場合も少なくない。そのため、臨床においては、癌に対する治療成績を上げながらも、副作用をできるだけ軽減する方法が模索されているのが現状である。これまでに、アミノ酸が抗癌効果の増強や[23、24]、粘膜傷害を改善するといった報告が数多くされている一方で[25、26]、抗癌剤による粘膜傷害の発症機序に迫った報告はそれほど多くない。また、我々のグループはこれまでに、経腸栄養剤が抗癌剤起因性消化管傷害を軽減するといった論文を報告していることから[27、2]、腸管の栄養摂取障害が副作用による粘膜傷害の一因であると予想している。そこで、本研究では、抗癌剤の作用起点から考えるよりも、むしろ栄養吸収機構に関わる分子に着目することが重要であると考えた。

5-FU 起因性消化管粘膜傷害モデルを作製したところ、体重が減少したが、その一因として低栄養状態となっている可能性が考えられた。それを裏付ける事象として、5-FU 投与により、絨毛の短縮および小腸絨毛の組織構築の崩壊が見られたことから、栄養摂取機構に何らかの弊害が生じて消化吸収不良が起こり、結果として食欲不振による摂餌量減少が見られたと解釈できる。

抗癌剤投与による消化管傷害の要因としては、物理的刺激を除けば、免疫応答異常、粘膜防御機能の低下、腸内フローラの悪化などが考えられる。事実、5-FU 投与により、クリプト形態が崩壊し、上皮細胞増殖の機能低下が生じて、これが、絨毛の短縮につながった。同時に、杯細胞も消失したことから、ムチン産生の減少し、粘膜保護機能の低下が引き起こされている状態であると考えられた。これは、我々がこれまでに報告したラットを用いた 5-FU による粘膜傷害モデルにお

いても同様の結果が得られている[27]。本実験系は、5-FU を経口で投与しており、物理的には口腔側が先行して接触すること、さらに、5-FU の薬理的感受性は回腸よりも空腸の方が高いことから[29]、本来であれば、回腸よりも空腸の方が重症となるはずである。しかしながら、このような組織損傷を引き起こしたモデルでの小腸局所において、IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF $\alpha$  の上昇を伴う炎症は、小腸後半にいくにつれて大きくなる傾向にあった(図 14)。この理由として、回腸は空腸に比べて、パイエル板などの免疫系器官が発達していることから、組織損傷に対する免疫応答性が比較的高く、IL-1 $\beta$  などの急性炎症性タンパク質の産生亢進が顕著に認められたと言える。

消化管上皮細胞は外界と直接接する細胞として栄養物質や薬物を頻繁にやり取りしなければならないため、さまざまな物質を輸送するためのトランスポーターが発現している。本研究においては、広範に必須アミノ酸を取り入れる LAT をターゲットとし、まずは、正常マウス小腸組織の mRNA 発現解析を行ったところ、LAT2 発現が小腸中央部で高いことから、必須アミノ酸を含む中性アミノ酸は、特に小腸中央部で LAT2 を介して取り込まれる傾向にあると予想できる。また、5-FU により組織に傷害を与えるとその発現は低下したため、LAT2 を介して透過するアミノ酸の取り込みが削減されたと考えることができる。一方で、LAT1 は 5-FU を投与するとその発現が上昇した。そもそも、LAT1 は誘導型のアイソフォームであり、リンパ球の活性化、ホルモンによる刺激などにより高度に発現が誘導されることから、細胞の需要に見合ったアミノ酸の供給を達成するために発現が調節されるトランスポーターであると考えられている[12]。これより、本研究結果は、LAT2 を介して流入するアミノ酸の減少を補完するために、LAT1 の発現が上昇したと解釈することができる。しかしながら、LAT1 および LAT2 が、粘膜上の全く同じ部位に発現しているわけではないことは、IHC の結果から明らかであり、LAT1 誘導は LAT2 の完全なる代償ではなく、腸管粘膜全体としてのアミノ酸量を調節していると考えられる。加えて、我々の以前

の研究において、5-FU 起因性消化管粘膜傷害ラットに必須アミノ酸を含むアミノ酸製剤を与えると副作用が緩和されたことから、腸管の創傷治癒に対してアミノ酸動態が関与することが改めて示唆された結果となった[27]。ただし、LAT1 の基質結合部位はアミノ酸以外に甲状腺ホルモンやメルファランのような大型の側鎖を持つアミノ酸類似化合物も受け入れることから[30]、本研究における LAT1 誘導は、アミノ酸供給を促す為だけの結果と断定することはできないことをここで申し添えたい。

傷害を受けてもグルコースを輸送する SGUT1 発現は変動しなかった。これは、生命維持に最も重要なグルコースに関しては、相当過酷な状況でない限り、影響を受けない物質であることが明らかとなり、組織崩壊状態であるにもかかわらず、LAT1 発現が上昇したことは大変興味深く、アミノ酸変動が炎症下において特異的に起こる可能性を改めて示唆したものであった。

これまでに各種アミノ酸を輸送するトランスポーターは現在のところ 30 種類以上報告されており、確かに TAT、BAT などは LAT と同様に広範な基質選択性をもつトランスポーターである。しかしながら、LATs は、特に必須アミノ酸を輸送すること[31]、血液脳関門および胎盤関門にも発現していることから薬物トランスポーターとしての役割があること[32]、また、腫瘍細胞に発現していることから癌治療の分子標的になりうるトランスポーターであることから[33]、様々な物質を取り込みうる腸管を対象とし、抗癌剤を用いた傷害誘導という実験系という理由から、LATs を本実験のターゲット分子とした。

また、4F2hc の発現に多少の発現低下を認めた。これは、両 LAT に共通に用いられる補助サブユニットであるため、相反する双方の LATs の発現を相殺した形の発現量となった。

先にも述べた様に、アミノ酸は様々な代謝シグナルなど生理現象に深く関わることが明らかになりつつある。例えば、アミノ酸誘導体であるシスチンが体温上昇抑制および炎症抑制すること[33、34]、ヒスチジンが腸炎を抑制すること



[35]、また、分岐鎖アミノ酸 BCAA が炎症や ER ストレスに関与すること[36] などアミノ酸自体が多くの生体現象を制御することからも、本研究のターゲットである LAT を介するアミノ酸においても、生体内環境に応じてそれぞれ機能的な役割を果たす可能性も示唆される。

また、この LAT1 の発現上昇については二つの解釈ができる。一つは、侵襲を受けた粘膜が、傷口を修復するために、LAT1 を介する各種アミノ酸を必要としている結果と考える。その場合、不足のアミノ酸を補ってやれば、LAT1 を高発現させて取り込みを促す必要が無くなり、結果として LAT1 は発現誘導されないと考えることができる。しかしながら、本研究は 5-FU の連続投与による傷害モデルであり、この発現が修復過程のイベントとして生じたとは考えにくい。加えて、通常餌を制限無く与えていた状態での飼育であったため、摂餌量が減少したとはいえ、必須アミノ酸が極めて不足した状態であったとは言い難い。2 つ目として、炎症反応が LAT1 発現を上昇させるといった機序である。我々は、後者を支持する。なぜなら、IL-1 $\beta$  などの炎症性サイトカインの発現は小腸後部にいくにつれて顕著となり、LAT1 発現上昇も同様の傾向を示したことから、LAT1 発現は、粘膜傷害の程度、すなわち炎症の程度と相関関係にあると判断できるからである。ただ、サイトカインが傷害部位に適度に産生され作用することは、組織修復には不可欠であり、本モデルのような継続的な軽度侵襲状態が、既に浸潤しているリンパ球などを活性化して組織修復を促すといったことも考慮すると、LAT1 誘導はそれに付随した現象と考えることもできる。つまり、粘膜障害を生じた生体の免疫応答として、生体がある時おかれている状態で必要なアミノ酸を選択し、その吸収量を調整している可能性も示唆していると考えられる。どちらにせよ、LAT1 発現上昇かつ LAT2 発現低下は、抗癌剤起因性消化管粘膜傷害時に生じた現象であり、少なくとも傷害の指標となることは明らかである。加えて、我々は、腸管において、サイトカイン等の炎症性タンパク質そのものが、LATs 発現を制御しているかどうかに興味を持ったが、炎症粘膜での

LAT1 発現上昇が大変意義のある現象と考え、いち早くここで報告することを先決とした。

今回の研究で 5-FU 起因性小腸粘膜傷害に伴い、アミノ酸の小腸からの吸収のバランスに変化を認めたが、例えば、全アミノ酸が不足するような飢餓状態での LAT1 および LAT2 の動きとしては、アミノ酸の血中濃度を上昇させるため、LAT1,2 共に発現が上昇する可能性は否定できないものの、エネルギー不足の状態での第一段階としては、食物からアミノ酸を積極的に取り込むというよりも、むしろ、アミノ酸代謝を抑えるといった救済措置がまず行われるのが妥当であろう。あるいは、他の疾患モデルや他の抗癌剤による炎症下での発現に関しては、今後の検討事項ではあるが、少なくとも、今回得られた LATs 動態は、臨床において汎用されている 5-FU による組織損傷における重要な基礎的知見になったであろう。

癌の原因として、遺伝的原因、食生活などの生活習慣、ホルモンの暴露などによる化学的環境、局所での持続的な炎症があげられる。前述のとおり LAT1 は癌の発生機序にも深く関わりがあり、各種癌において LAT1 が発現上昇し、腫瘍マーカーとなる可能性が示唆されている[19、20]。今回の結果より、癌の前段階の一つとも考えられる炎症部位でも LAT1 が発現上昇することが考えられ、LAT1 は消化管炎症のマーカーとなる可能性があることを示唆しており、炎症から発癌に至るメカニズム解明や前癌病変の状態での早期発見の為に LAT1 が有用である可能性が考えられた。最後に、本実験の結果は、粘膜傷害時の体内のアミノ酸バランスの変化が想定されるものであり、この偏(かたよ)りは、粘膜治癒に必要とされるアミノ酸を優先的に取り込むということを意味している。従って、本研究が臨床現場において、粘膜治癒のために必要なアミノ酸を考慮し優先的に投与するといった、より進んだ栄養療法を実践するための一助となるものと考えられる。

### 【参考文献】

1. Fitzmaurice C, Akinyemiju TF, Al Lami FH, Barregard L, Bhutta ZA, Brenner H, et al. Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 29 cancer groups, 1990 to 2016: a systematic analysis for the global burden of disease study. *JAMA Oncol.* 2018;4:1553-68.
2. Tomasello G, Ghidini M, Barni S, Passalacqua R, Petrelli F. Overview of different available chemotherapy regimens combined with radiotherapy for the neoadjuvant and definitive treatment of esophageal cancer. *Expert Rev Clin Pharmacol.* 2017;10:649-60.
3. Desiderio J, Chao J, Melström L, Warner S, Tozzi F, Fong Y, et al. The 30-year experience-A meta-analysis of randomised and high-quality non-randomised studies of hyperthermic intraperitoneal chemotherapy in the treatment of gastric cancer. *Eur J Cancer.* 2017;79:1-14.
4. Benson III AB, Ajani JA, Catalano RB, Engelking C, Kornblau SM, Martenson Jr JA, et al. Recommended guidelines for the treatment of cancer treatment-induced diarrhea. *J Clin Oncol.* 2004;22:2918-26.
5. Cabilan CJ, Hines S. The short-term impact of colorectal cancer treatment on physical activity, functional status and quality of life: a systematic review. *JBIC Database System Rev Implement Rep.* 2017;15:517-66.
6. Chakrabarti P, Kandror KV. The role of mTOR in lipid homeostasis and diabetes progression. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2015;22:340-6.

7. Khamzina L, Veilleux A, Bergeron S, Marette A. Increased activation of the mammalian target of rapamycin pathway in liver and skeletal muscle of obese rats: possible involvement in obesity-linked insulin resistance. *Endocrinology*. 2005;146:1473-81.
8. Alejo Efeyan A, Comb WC, Sabatini DM. Nutrient Sensing Mechanisms and Pathways. *Nature*. 2015;517:302-10.
9. Jewell JL, Russell RC, Kun-Liang Guan KL. Amino acid signalling upstream of mTOR. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2013;14:133-9.
10. Christensen HN. Role of amino acid transport and countertransport in nutrition and metabolism. *Physiol Rev*. 1990;70:43-77.
11. Segawa H, Fukasawa Y, Miyamoto K, Takeda E, Endou H, Kanai Y. Identification and functional characterization of a Na<sup>+</sup>-independent neutral amino acid transporter with broad substrate selectivity. *J Biol Chem*. 1999;274:19745-51.
12. Kanai Y, Segawa H, Miyamoto K, Uchino H, Takeda E, Endou H. Expression cloning and characterization of a transporter for large neutral amino acids activated by the heavy chain of 4F2 antigen (CD98). *J Biol Chem*. 1998;273:23629-32.
13. Pineda M, Fernandez E, Torrents D, Estévez R, López C, Camps M, et al. Identification of a membrane protein, LAT-2, that co-expresses with 4F2 heavy chain, an L-type amino acid transport activity with broad specificity for small and large zwitterionic amino acids. *J Biol Chem*. 1999;274: 19738-44.
14. Kobayashi T, Shimabukuro-Demoto S, Yoshida-Sugitani R, Furuyama-



- Tanaka K, Karyu H, Sugiura Y, et al. The histidine transporter SLC15A4 coordinates mTOR-dependent inflammatory responses and pathogenic antibody production. *Immunity*. 2014;41:375-88.
15. O'Donovan SM, Sullivan CR, McCullumsmith RE. The role of glutamate transporters in the pathophysiology of neuropsychiatric disorders. *NPJ Schizophr*. 2017;3:32.
  16. Uchiyama K, Naito Y, Yagi N, Mizushima K, Higashimura Y, Hirai Y, et al. Peptidomic analysis via one-step direct transfer technology for colorectal cancer biomarker discovery. *J Proteomics Bioinform*. 2015;S5:005.
  17. Hamm A, Prenen H, Van Delm W, Di Matteo M, Wenes M, Delamarre E, et al. Tumour-educated circulating monocytes are powerful candidate biomarkers for diagnosis and disease follow-up of colorectal cancer. *Gut*. 2016;65:990-1000.
  18. Gros A, Parkhurst MR, Tran E, Pasetto A, Robbins PF, Ilyas S, et al. Prospective identification of neoantigen-specific lymphocytes in the peripheral blood of melanoma patients. *Nat Med*. 2016;22:433-8.
  19. Ohkame H, Masuda H, Ishii Y, Kanai Y. Expression of L-type amino acid transporter 1 (LAT1) and 4F2 heavy chain (4F2hc) in liver tumor lesions of rat models. *J Surg Oncol*. 2001;78:265-71; discussion 271-2.
  20. Kaira K, Oriuchi N, Imai H, Shimizu K, Yanagitani N, Sunaga N, et al. Prognostic significance of L-type amino acid transporter 1 (LAT1) and 4F2 heavy chain (CD98) expression in stage I pulmonary adenocarcinoma. *Lung Cancer*. 2009;66:120-6.



21. Kawashima R, Kawamura YI, Kato R, Mizutani N, Toyama–Sorimachi N, Dohi T. IL-13 receptor alpha2 promotes epithelial cell regeneration from radiation-induced small intestinal injury in mice. *Gastroenterology*. 2006;131:130-41.
22. Purlyte E, Dhekne HS, Sarhan AR, Gomez R, Lis P, Wightman M, et al. Rab29 activation of the Parkinson's disease-associated LRRK2 kinase. *EMBO J*. 2018;37:1-18.
23. Wang S, Wang L, Zhou Z, Deng Q, Li L, Zhang M, et al. Leucovorin enhances the anti-cancer effect of bortezomib in colorectal cancer cells. *Sci Rep*. 2017;7:682.
24. Hamam R, Ali D, Vishnubalaji R, Alsaaran ZF, Chalisserry EP, Alfayez M, et al. Enhanced efficacy of 5-fluorouracil in combination with a dual histone deacetylase and phosphatidylinositide 3-kinase inhibitor (CUDC-907) in colorectal cancer cells. *Saudi J Gastroenterol*. 2017;23:34-8.
25. Rubenstein EB, Peterson DE, Schubert M, Keefe D, McGuire D, Epstein J, et al. Clinical practice guidelines for the prevention and treatment of cancer therapy-induced oral and gastrointestinal mucositis. *Cancer*. 2004;100:2026-46.
26. Sonis ST, Elting LS, Keefe D, Peterson DE, Schubert M, Hauer - Jensen M, et al. Perspectives on cancer therapy-induced mucosal injury: pathogenesis, measurement, epidemiology, and consequences for patients. *Cancer*. 2004;100:1995-2025.
27. Kawashima R, Kawakami F, Maekawa T, Yamamoto H, Koizumi W, Ichikawa T. Elemental diet moderates 5-fluorouracil-induced gastrointestinal

- mucositis through mucus barrier alteration. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2015;76:269-77.
28. Kawashima R, Fujimaki M, Ikenoue Y, Danjo K, Koizumi W, Ichikawa T. Influence of an elemental diet on 5-fluorouracil-induced morphological changes in the mouse salivary gland and colon. *Support Care Cancer*. 2016;24:1609-16.
  29. Saegusa Y, Ichikawa T, Iwai T, Goso Y, Okayasu I, Ikezawa T, et al. Changes in the mucus barrier of the rat during 5-fluorouracil-induced gastrointestinal mucositis. *Scand J Gastroenterol*. 2008;43:59-65.
  30. Mastroberardino L, Spindler B, Pfeiffer R, Skelly PJ, Loffing J, Shoemaker CB, et al. Amino acid transport by heterodimers of 4F2hc/CD98 and members of permease family. *Nature*. 1998;395:288-91.
  31. Yanagawa O, Kanai Y, Chairoungdua A, Kim DK, Segawa H, Nii T, et al. Human L-type amino acid transporter 1 (LAT1): Characterization of function and expression in tumor cell lines. *Biochim Biophys Acta*. 2001;1514:291-302.
  32. Matsuo H, Tsukada S, Nakata T, Chairoungdua A, Kim DK, Cha SH, et al. Expression of a system L neutral amino acid transporter at the blood-brain barrier. *Neuroreport*. 2000;11:3507-11.
  33. Murakami S, Kurihara S, Koikawa N, Nakamura A, Aoki K, Yosigi H, et al. Effects of oral supplementation with cystine and theanine on the immune function of athletes in endurance exercise: randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2009;73:817-21.

34. Kawada S, Kobayashi K, Ohtani M, Fukusaki C. Cystine and theanine supplementation restores high-intensity resistance exercise-induced attenuation of natural killer cell activity in well-trained men. *J Strength Cond Res.* 2010;24:846-51.
35. Andou A, Hisamatsu T, Okamoto S, Chinen H, Kamada N, Kobayashi T, et al. Dietary histidine ameliorates murine colitis by inhibition of proinflammatory cytokine production from macrophages. *Gastroenterology.* 2009;136:564-74.
36. Burrill JS, Long EK, Reilly B, Deng Y, Armitage IM, Scherer PE, et al. Inflammation and ER stress regulate branched-chain amino acid uptake and metabolism in adipocytes. *Mol Endocrinol.* 2015;29:411-20.

## 【謝辞】

本研究を遂行するにあたり、多くのご支援とご指導を賜りました、本大学院医療系研究科教授 小泉 和三郎 先生に深く感謝申し上げます。また、実験指導および論文執筆まで終始ご指導いただきました本大学院医療系研究科 市川 尊文 教授、川島 麗 講師、川上 文貴 講師、前川 達則 講師に深く御礼申し上げます。また、実験の補助をしていただきました技術職員 菅原 節子さん、ならびに大学院生 玉木 竣さんに御礼申し上げます。また、主査および副査を快くお引き受けいただき、ご指導を賜りました、村雲 芳樹 教授、田邊 聡 教授、小林 清典 教授、天野 英樹 准教授に御礼申し上げます。最後に、本研究を進めるにあたり、多くのご助言いただきました先生方、研究室スタッフ皆様に深く感謝の意を表し、謝辞といたします。

### 【利益相反（COI）開示】

学位論文内容に関連し、著者には開示すべき COI 関係にある企業などはありません。

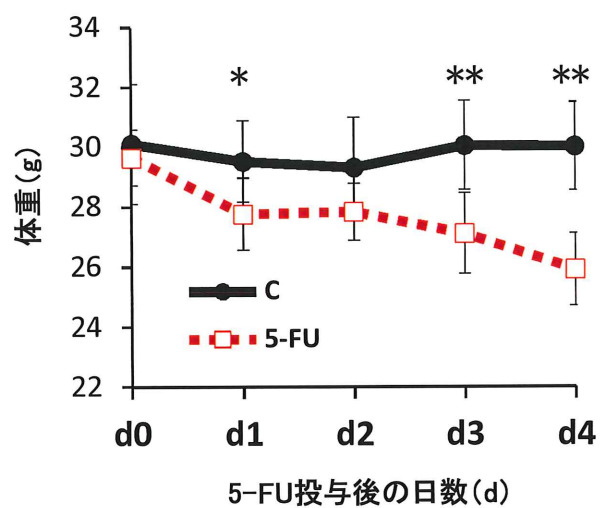


図 1 5-FU投与後の体重変動

7週齢 ♂BALB/cAJclマウス に5-FU投与群 (5-FU) として5-FUを1日1回 (50 mg / kg / day) 、4日間経口投与した。コントロール群 (C) には、5-FU溶解液である0.5%CMCを同量投与した。各測定値は、平均値±SD (C: n=6, 5-FU: n=6) で示した。統計学的有意差は、\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  で表記した。

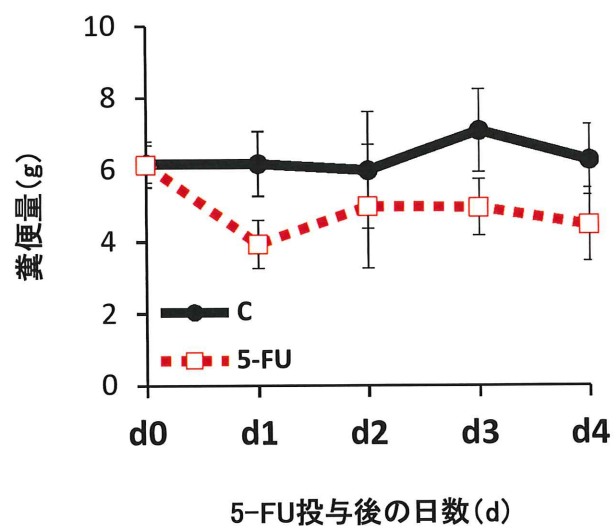


図 2 5-FU投与後の糞便量

7週齢 ♂BALB/cAJclマウス に5-FU投与群 (5-FU) として5-FUを1日1回 (50 mg / kg / day) 、4日間経口投与した。コントロール群 (C) には、5-FU溶解液である0.5%CMCを同量投与した。24時間あたりに排泄した糞便量を秤量した。各測定値は、平均値±SD (C: n=6, 5-FU: n=6) で示した。統計学的有意差は、\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  で表記した。

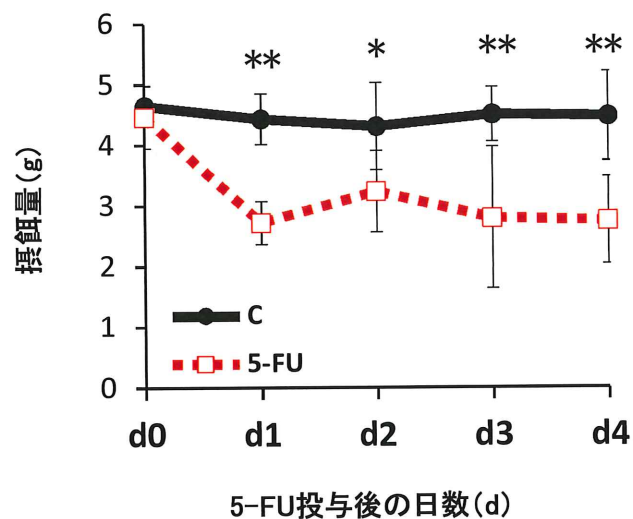


図 3 5-FU投与後の摂餌量

7週齢 ♂BALB/cAJclマウスに5-FU投与群 (5-FU) として5-FUを1日1回 (50 mg / kg / day) 、4日間経口投与した。コントロール群 (C) には、5-FU溶解液である0.5%CMCを同量投与した。24時間あたりに摂取した餌量を秤量した。各測定値は、平均値±SD (C: n=6, 5-FU: n=6) で示した。統計学的有意差は、\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  で表記した。



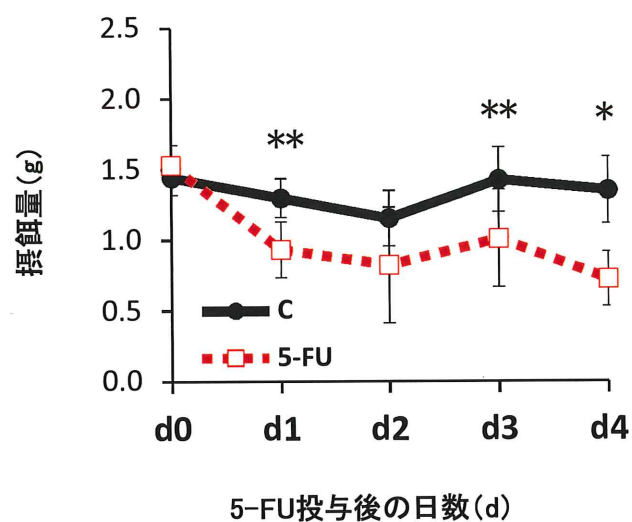


図 4 5-FU投与後の飲水量

7週齢 ♂BALB/cAJclマウスに5-FU投与群 (5-FU) として5-FUを1日1回 (50 mg / kg / day) 、4日間経口投与した。コントロール群 (C) には、5-FU溶解液である0.5%CMCを同量投与した。24時間あたりに飲水した水量を秤量した。各測定値は、平均値±SD (C: n=6, 5-FU: n=6) で示した。統計学的有意差は、\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  で表記した。

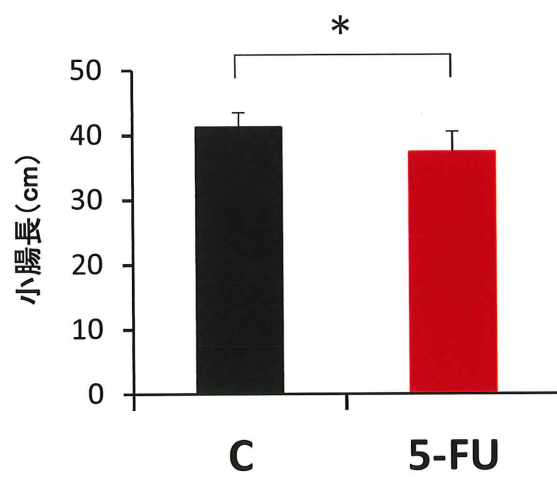


図 5 5-FU投与4日目における小腸長の比較

5-FU投与後4日目における5-FU投与群 (5-FU) およびコントロール群 (C) の小腸長を測定した。各測定値は、平均値±SD (C: n=6, 5-FU: n=6) で示した。統計学的有意差は、\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  で表記した。

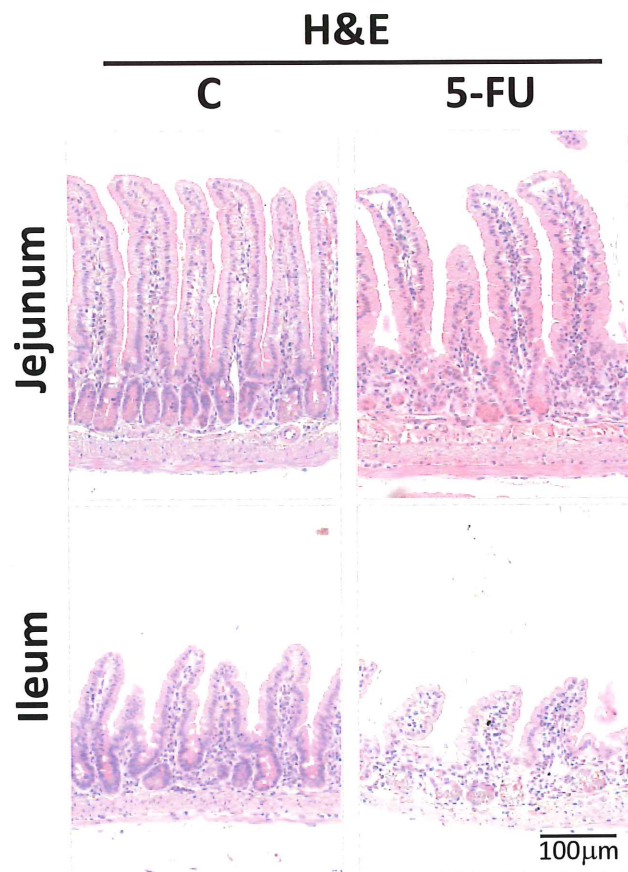


図 6 5-FU投与4日目における小腸組織像（H&E染色）

5-FU投与後4日目における5-FU投与群（5-FU）およびコントロール群（C）の小腸組織のH&E染色を行った。Jejunum（空腸）およびIleum（回腸）に分けて観察した。

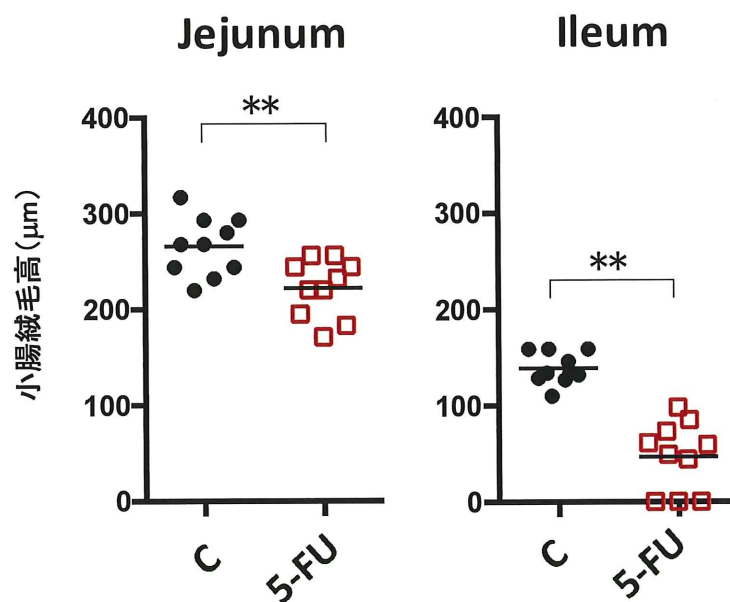


図 7 5-FU投与4日目における小腸絨毛高の比較

5-FU投与後4日目における5-FU投与群 (5-FU) およびコントロール群 (C) の小腸絨毛高を比較した。H&E染色を施した組織切片を用いて、陰窩上部から頂端部までを絨毛高とし、10本の合計平均を算出した。Jejunum (空腸) およびIleum (回腸) に分けて観察した。各測定値は、平均値±SD (C: n=6, 5-FU: n=6) で示した。統計学的有意差は、\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  で表記した。

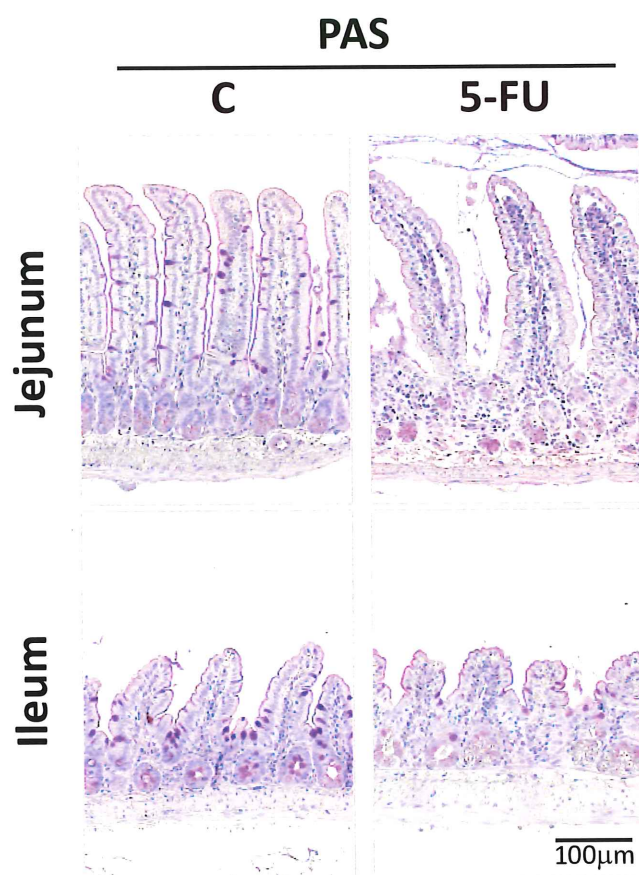


図 8 5-FU投与4日目における小腸組織像 (PAS染色)

5-FU投与後4日目における5-FU投与群 (5-FU) およびコントロール群 (C) の小腸組織のPAS染色を行った。Jejunum (空腸) およびIleum (回腸) に分けて観察した。



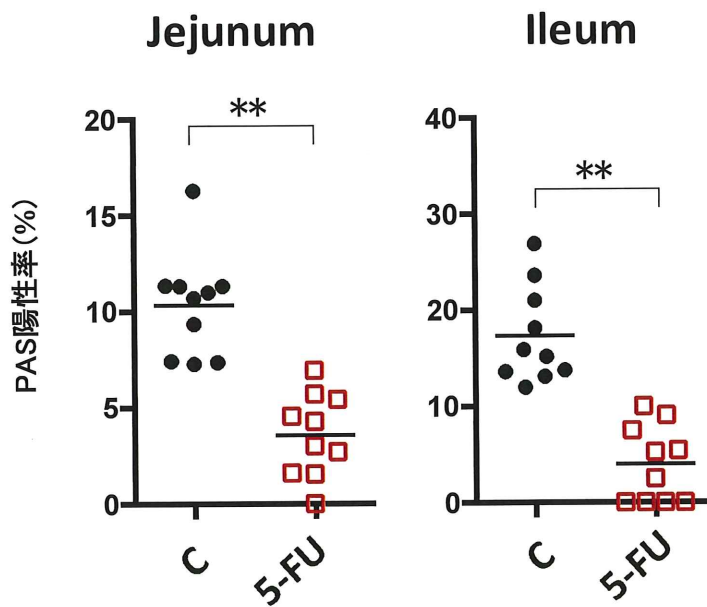


図 9 5-FU投与4日目におけるPAS陽性細胞の比較

5-FU投与後4日目における5-FU投与群 (5-FU) およびコントロール群 (C) のPAS陽性率を比較した。PAS染色を施した組織切片を用いて、粘膜組織一定領域内に存在するPAS陽性領域についてその%を割り出し、10箇所合計平均を算出した。Jejunum (空腸) およびIleum (回腸) に分けて観察した。各測定値は、平均値±SD (C: n=6, 5-FU: n=6) で示した。統計学的有意差は、\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  で表記した。

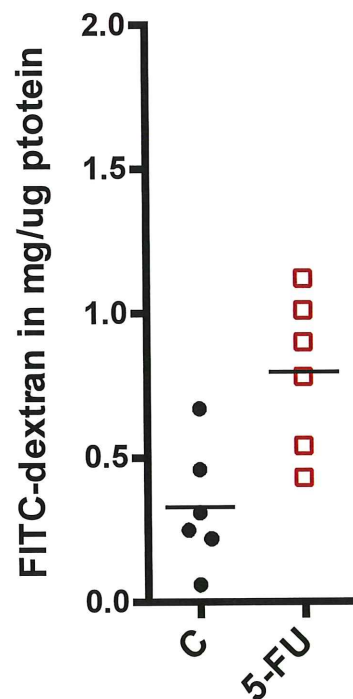


図 10 5-FU投与4日目における腸管上皮透過性試験

5-FU投与後4日目における5-FU投与群 (5-FU) およびコントロール群 (C) の腸管上皮透過性試験を行った。FITC標識デキストランを経口投与し、4時間後に眼底採血で得た血清中のFITC標識デキストラン濃度を測定した。各測定値は、平均値±SD (C: n=6, 5-FU: n=6) で示した。統計学的有意差は、\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  で表記した。

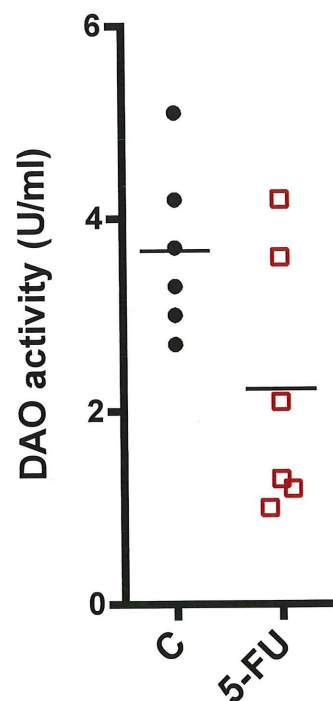


図 11 5-FU投与4日目におけるDAO活性試験

5-FU投与後4日目における5-FU投与群 (5-FU) およびコントロール群 (C) のDAO (ジアミンオキシダーゼ) 活性測定を行った。を測定した。各測定値は、平均値±SD (C: n=6, 5-FU: n=6) で示した。統計学的有意差は、\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  で表記した。

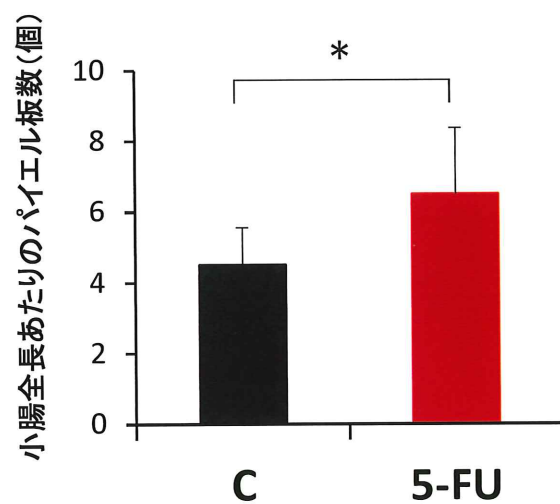


図 12 5-FU投与4日目におけるパイエル板数の比較

5-FU投与後4日目における5-FU投与群 (5-FU) およびコントロール群 (C) の小腸に存在するパイエル板数を肉眼的にカウントした。各測定値は、平均値±SD (C: n=6, 5-FU: n=6) で示した。統計学的有意差は、\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  で表記した。

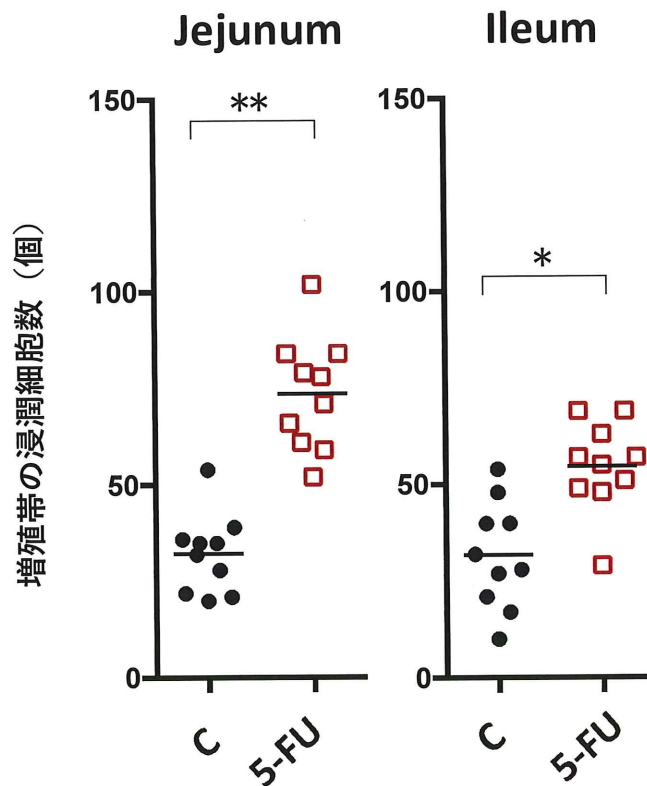


図 13 5-FU投与4日目における増殖帯（クリプト領域）の浸潤細胞数比較

5-FU投与後4日目における5-FU投与群（5-FU）およびコントロール群（C）の小腸増殖帯に浸潤する細胞を、H&E染色を施した組織切片を用いてカウントした。1絨毛あたりの領域を増殖帯の一定領域とし10箇所ので平均値で表した。各測定値は、平均値±SD（C: n=6, 5-FU: n=6）で示した。統計学的有意差は、\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  で表記した。



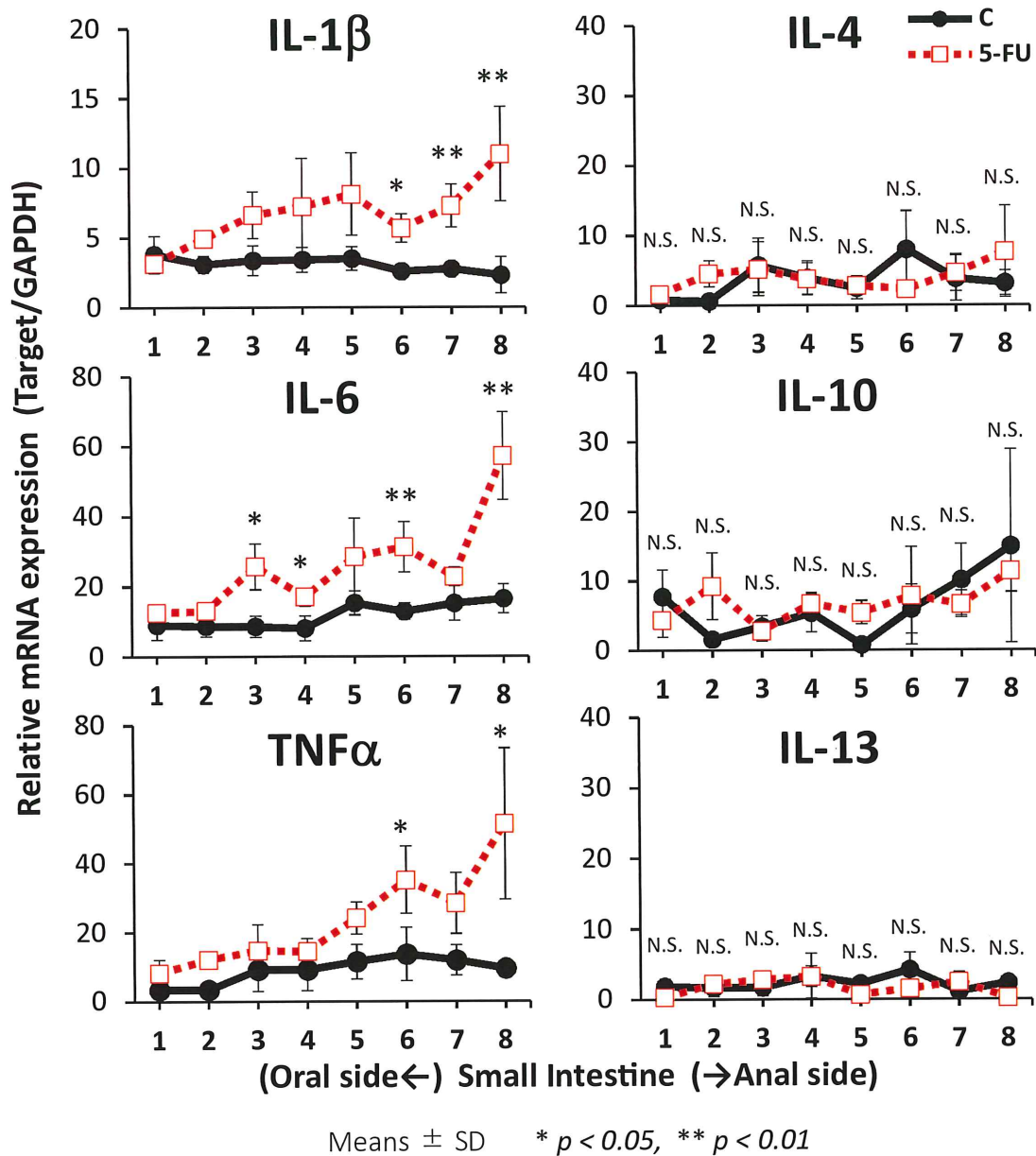
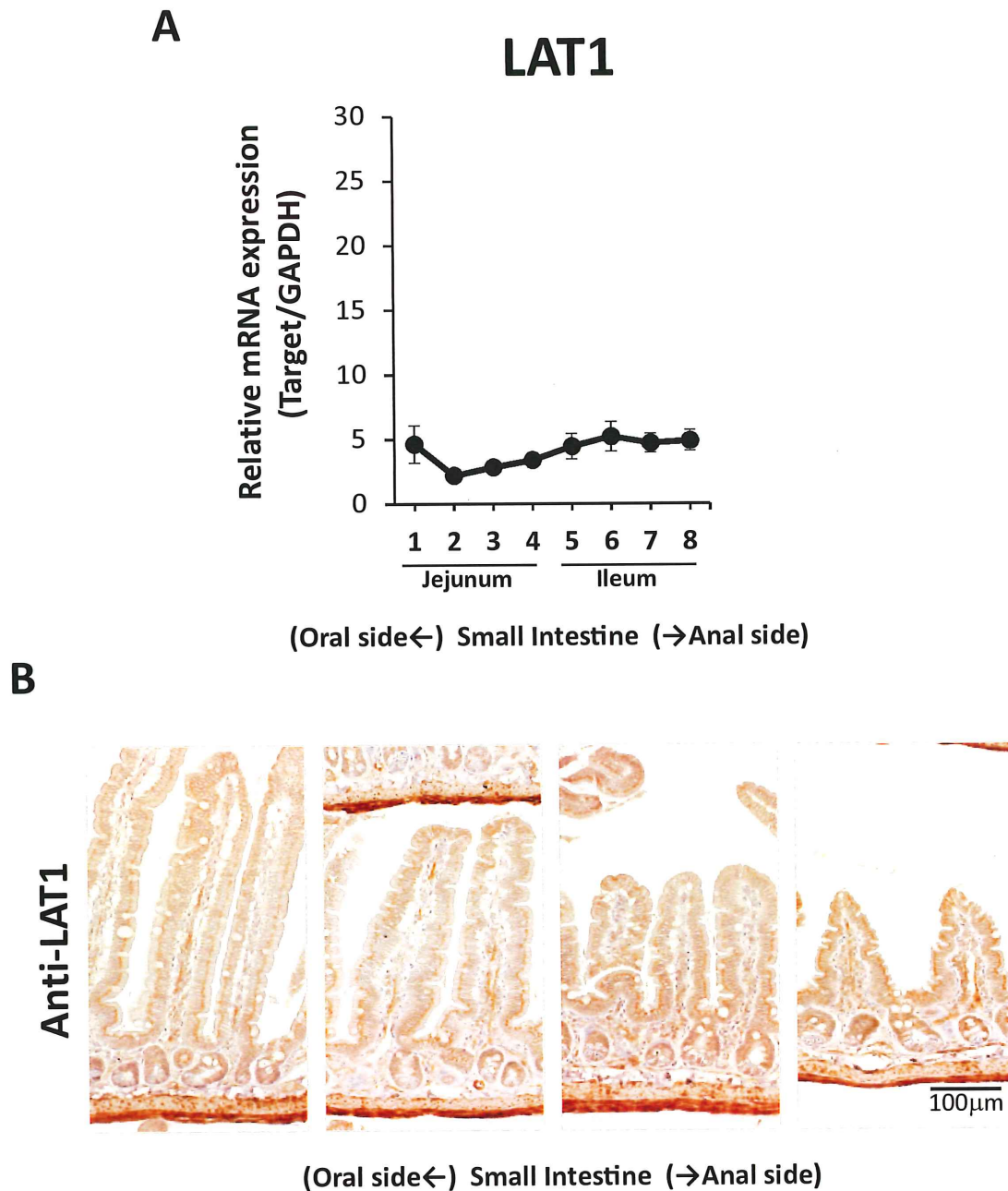


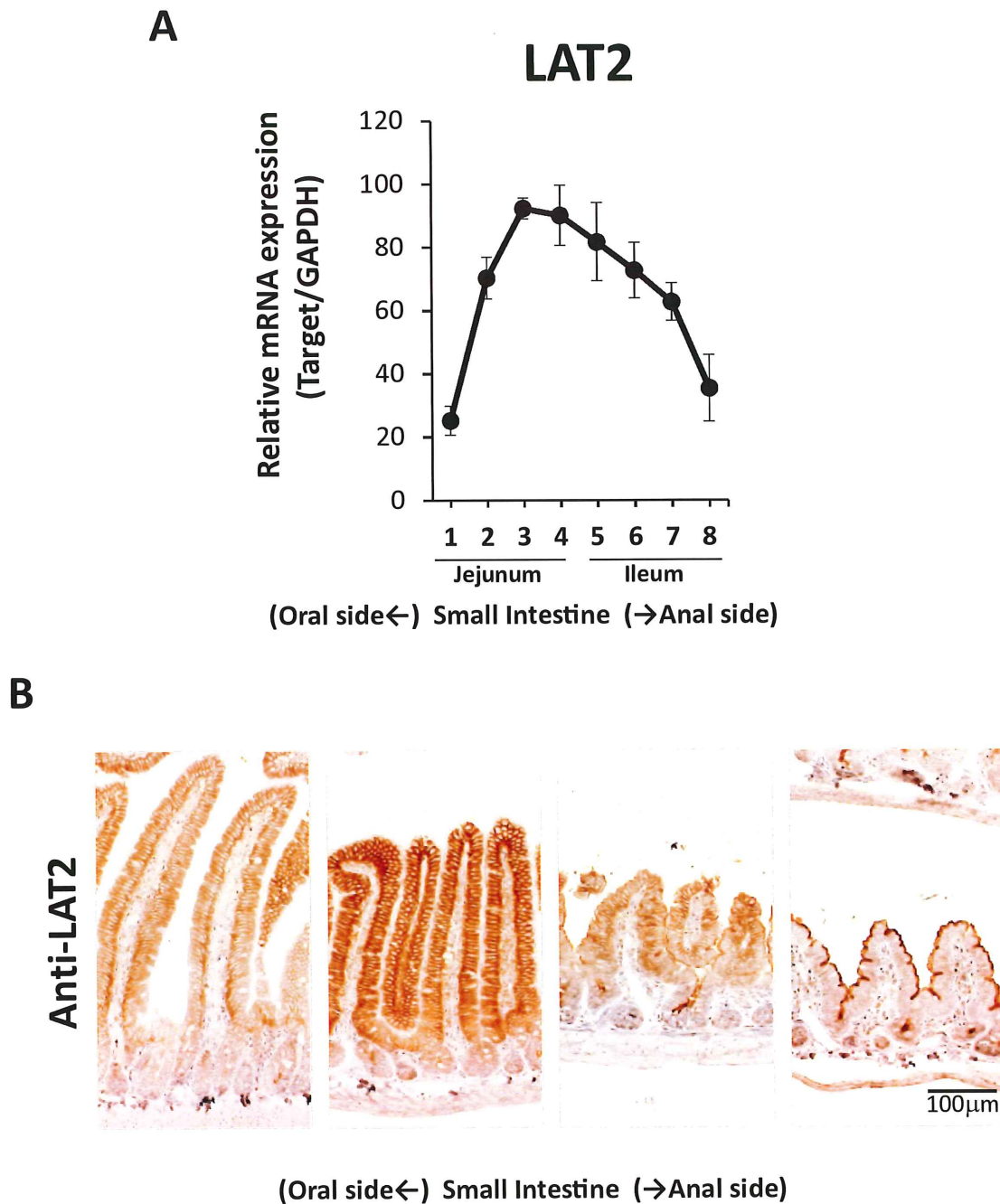
図 14 5-FU投与4日目における小腸組織のサイトカインmRNA発現

5-FU投与後4日目における5-FU投与群 (5-FU) およびコントロール群 (C) の小腸組織のサイトカインmRNA発現をRT-qPCR法にて測定した。小腸を8分割し、口腔側から肛門側にかけて番号を付与した (No. 1~4: 空腸, No. 5~8: 回腸)。各測定値は、平均値 $\pm$ SD (C: n=6, 5-FU: n=6) で示した。統計学的有意差は、\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  で表記した。



**図 15** 正常マウスの小腸組織におけるアミノ酸トランスポーターLAT1発現比較

BALB/c 正常マウスの小腸組織のアミノ酸トランスポーターLAT1について、mRNA発現をRT-qPCR法 (A)、タンパク質発現とその局在を免疫組織口腔側から肛門側にかけて部位別に番号を付与した (No. 1~4: 空腸、No. 5~8: 回腸)。RT-qPCR法におけるデータは各サンプルのGAPDH値で補正した。IHC法には、No. 2, 4, 6, 8の染色像を示した。各測定値は、平均値化学染色法(IHC法) (B)を用いて検討した。小腸を8分割し、 $\pm$ SD (n=6)で示した。統計学的有意差は、\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  で表記した。



**図 16 正常マウスの小腸組織におけるアミノ酸トランスポーターLAT2発現比較**

BALB/c 正常マウスの小腸組織のアミノ酸トランスポーターLAT1について、mRNA発現をRT-qPCR法 (A)、タンパク質発現とその局在を免疫組織化学染色法(IHC法) (B) を用いて検討した。小腸を8分割し、口腔側から肛門側にかけて部位別に番号を付与した (No. 1~4: 空腸、No. 5~8: 回腸)。RT-qPCR法におけるデータは各サンプルのGAPDH値で補正した。IHC法には、No. 2, 4, 6, 8の染色像を示した。各測定値は、平均値±SD (n=6) で示した。統計学的有意差は、\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  で表記した。

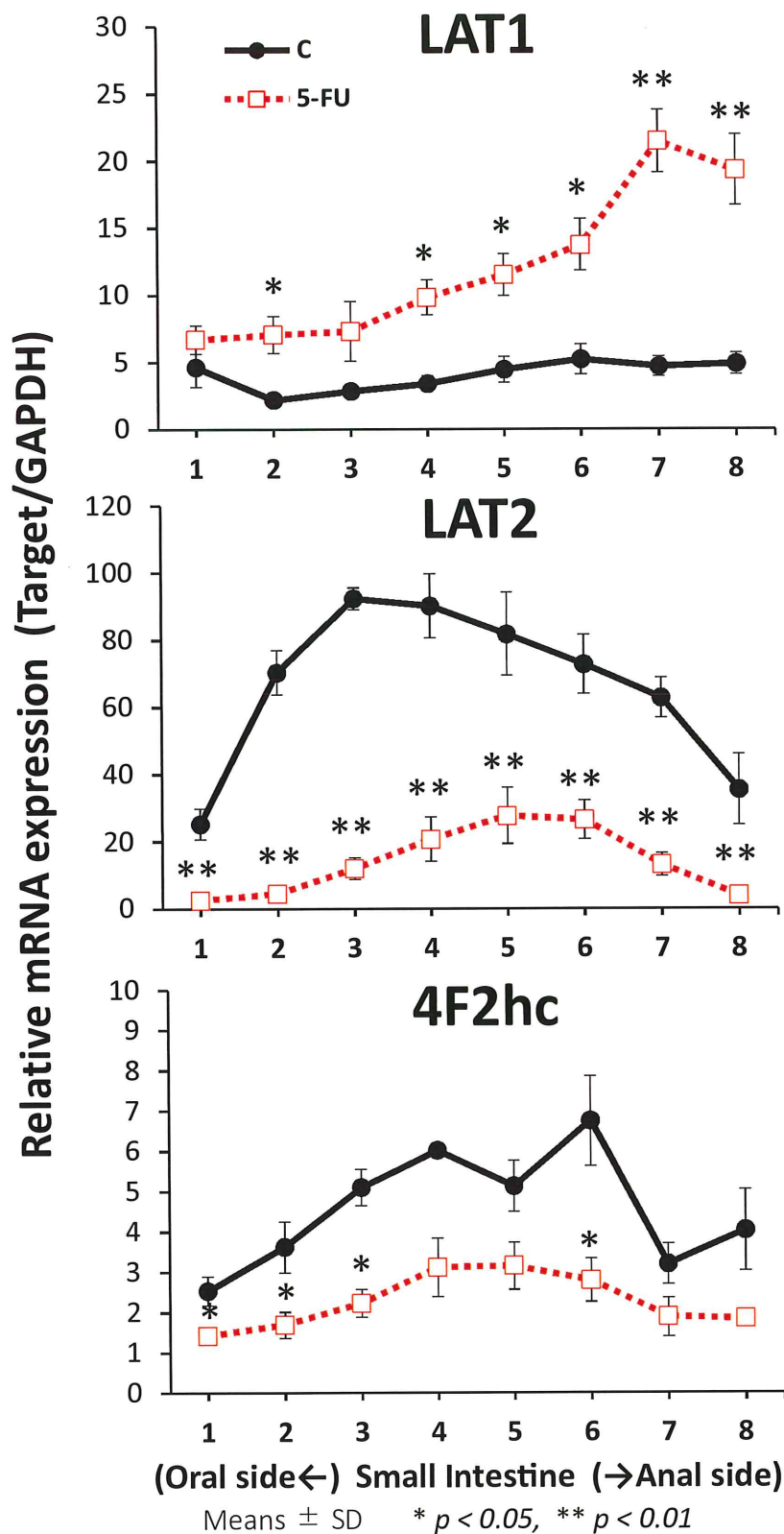


図 17 5-FU投与4日目における小腸組織のアミノ酸トランスポーターmRNA発現

5-FU投与後4日目における5-FU投与群 (5-FU) およびコントロール群 (C) の小腸組織のアミノ酸トランスポーターLAT1, LAT2, 4F2hc mRNA発現をRT-qPCR法にて測定した。小腸を8分割し、口腔側から肛門側にかけて部位別に番号を付与した (No. 1~4: 空腸, No. 5~8: 回腸)。RT-qPCR法におけるデータは各サンプルのGAPDH値で補正した。各測定値は、平均値±SD (C: n=6, 5-FU: n=6) で示した。統計学的有意差は、\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  で表記した。



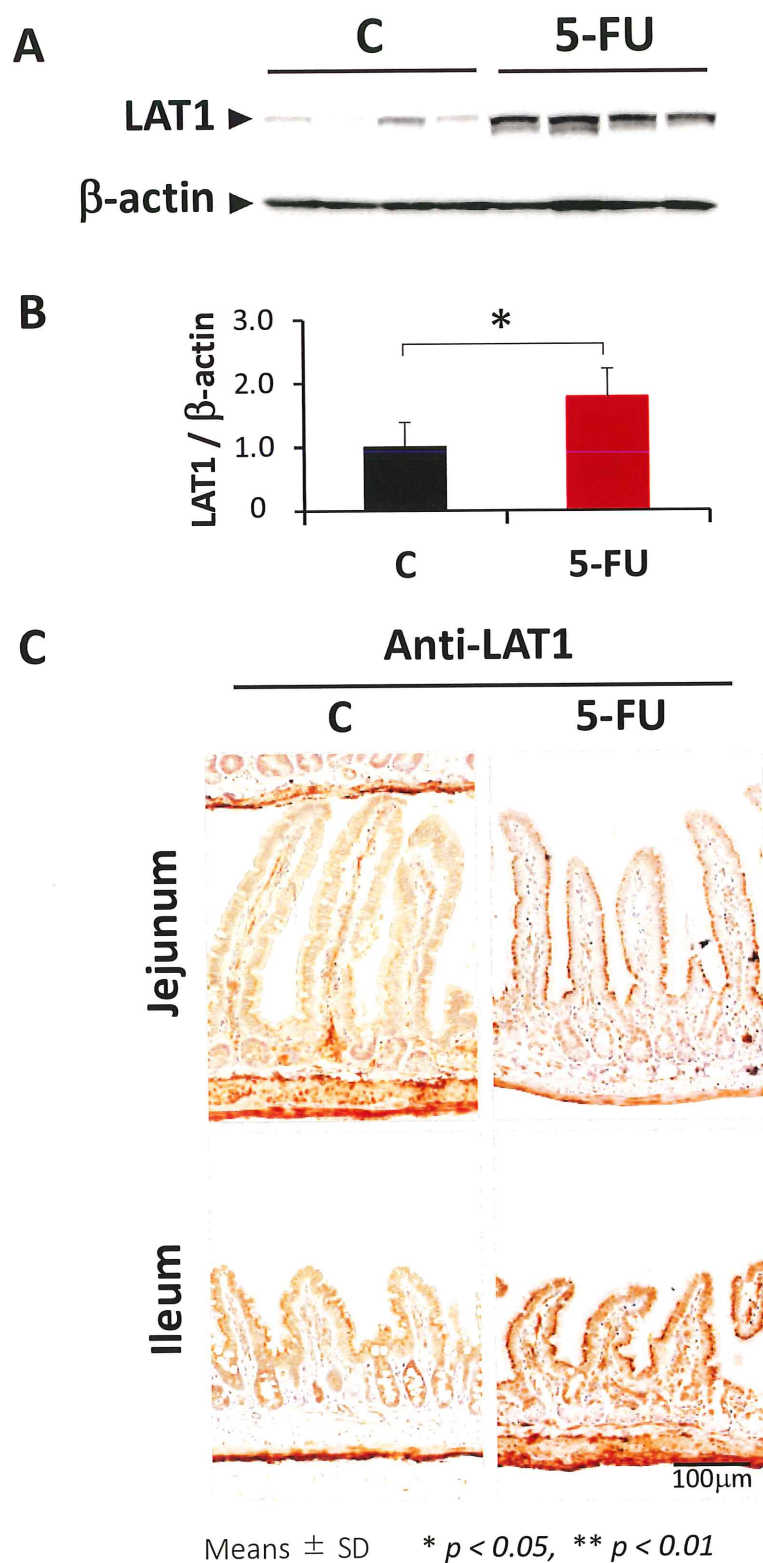
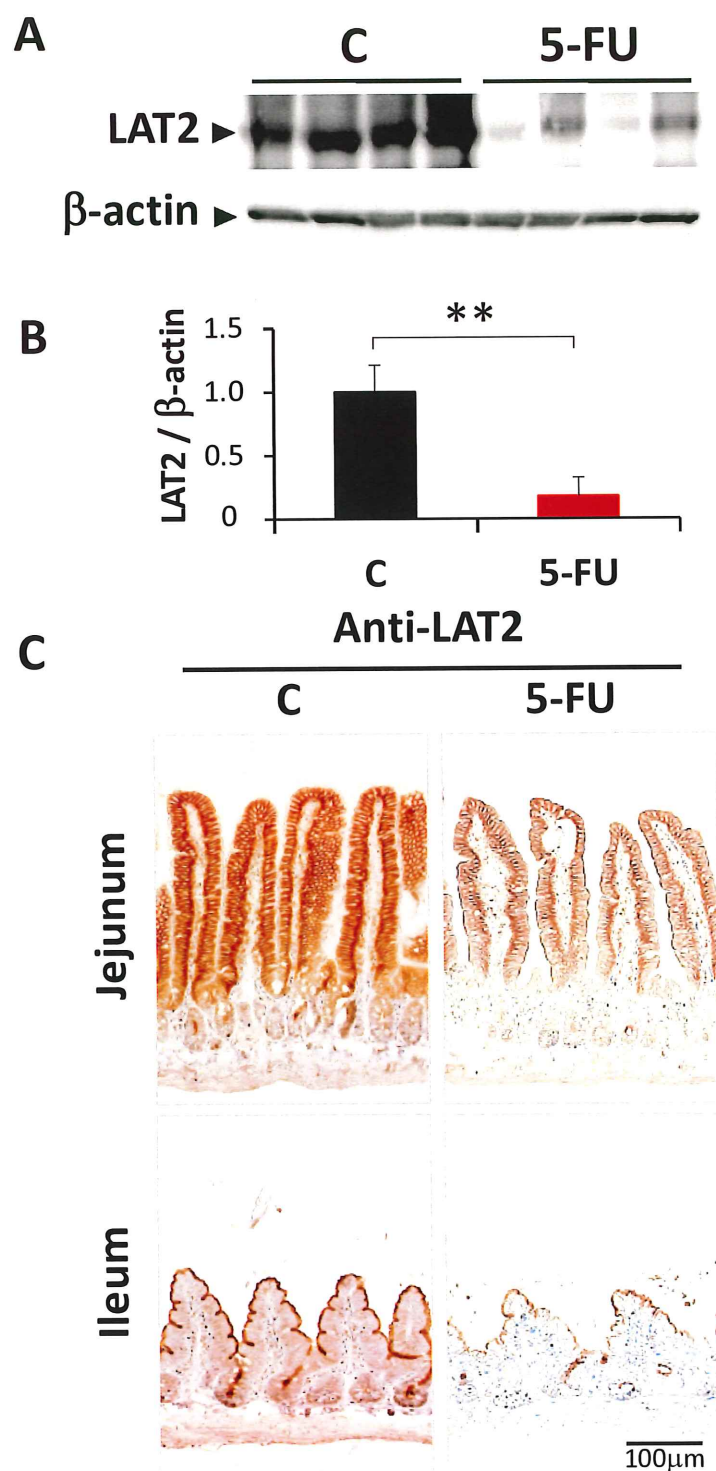


図 18 5-FU投与4日目における小腸組織のアミノ酸トランスポーターLAT1タンパク質発現

5-FU投与後4日目における5-FU投与群 (5-FU) およびコントロール群 (C) の小腸組織のアミノ酸トランスポーターLAT1発現をウエスタンブロッティング法 (A) およびデンストメトリーによる定量化 (B)、局在検討をIHC法 (C) にて検討した。ウエスタンブロッティング法に用いた組織部位は、RT-qPCR法で発現が強かった部位No. 7を用いた。各測定値は、平均値±SD (C: n=4, 5-FU: n=4) で示した。統計学的有意差は、\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  で表記した。



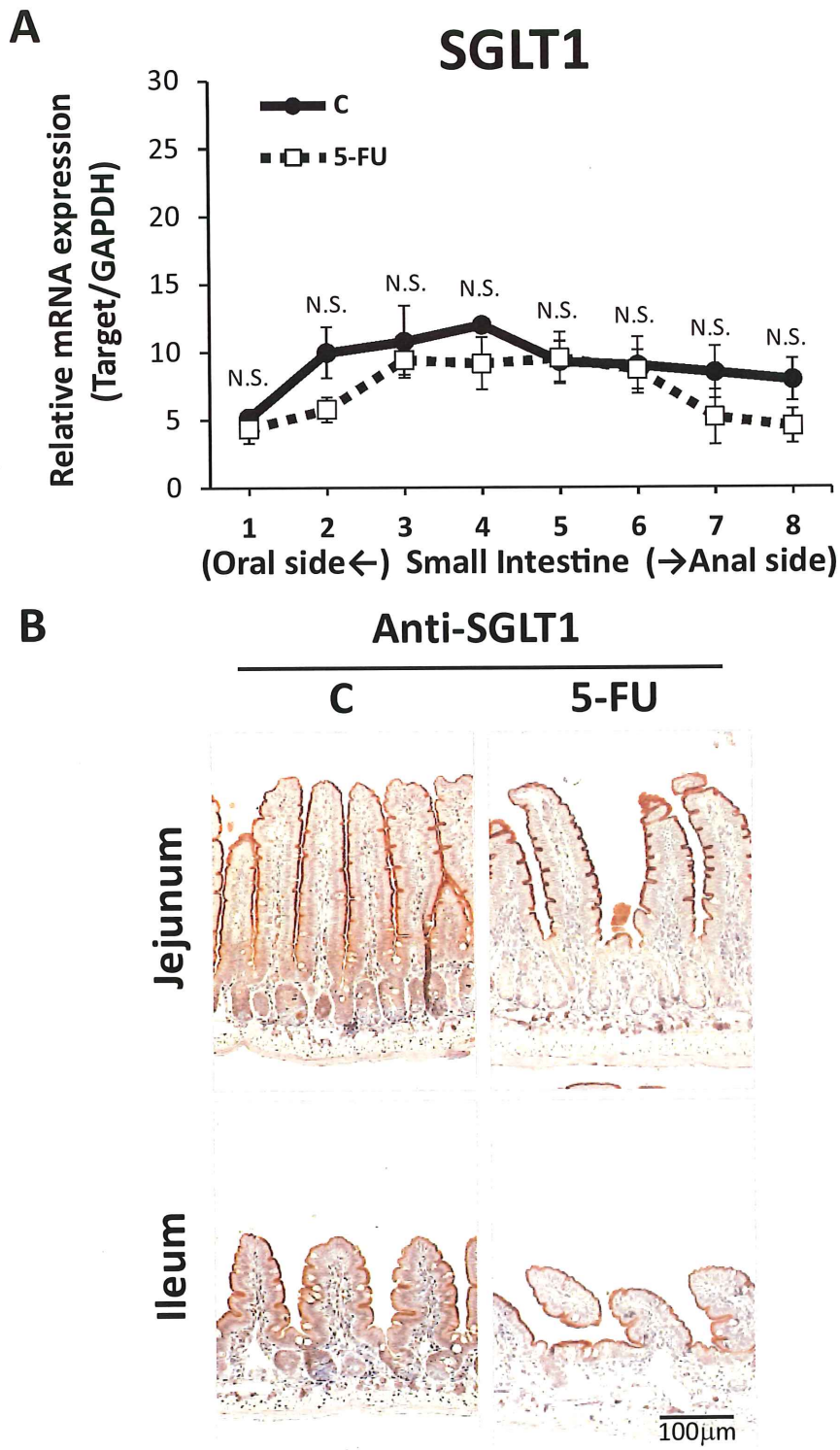


Means ± SD    \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$

**図 19** 5-FU投与4日目における小腸組織のアミノ酸トランスポーターLAT2タンパク質発現

5-FU投与後4日目における5-FU投与群 (5-FU) およびコントロール群 (C) の小腸組織のアミノ酸トランスポーターLAT1発現をウエスタンブロッティング法 (A) およびデンスitrometryによる定量化

(B)、局在検討をIHC法 (C) にて検討した。ウエスタンブロッティング法に用いた組織部位は、RT-qPCR法で発現が強かった部位No. 3を用いた。各測定値は、平均値±SD (C: n=4, 5-FU: n=4) で示した。統計学的有意差は、\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  で表記した。



**図 20** 5-FU投与4日目における小腸組織のグルコーストランスポーターSGLT1発現

5-FU投与後4日目における5-FU投与群 (5-FU) およびコントロール群 (C) の小腸組織のグルコーストランスポーターSGLT1発現をRT-qPCR法 (A) およびIHC法 (B) にて検討した。RT-qPCR法におけるデータは各サンプルのGAPDH値で補正した。各測定値は、平均値±SD (C: n=6, 5-FU: n=6) で示した。統計学的有意差が認められない場合は、N.S. (No Significant) で表記した。

表 1 RT-qPCR (定量的RT-PCR法) で用いたマウスプライマー配列

Gene name		5' -	Sequence	-3'
IL-1 $\beta$	F	5' -	gggctgcttccaaacctttg	-3'
	R	5' -	aagacacaggtagctgccac	-3'
IL-4	F	5' -	ccatatccacggatgcgaca	-3'
	R	5' -	aggacgttttggcacatccat	-3'
IL-6	F	5' -	agttgccttcttgggactga	-3'
	R	5' -	tccacgatttcccagagaac	-3'
IL-10	F	5' -	cagagaagcatggcccagaa	-3'
	R	5' -	gctccactgccttgctctta	-3'
IL-13	F	5' -	cagctccctggttctctcac	-3'
	R	5' -	ccacactccataccatgctg	-3'
TNF $\alpha$	F	5' -	gacgtggaactggcagaaga	-3'
	R	5' -	actgatgagagggaggccat	-3'
LAT1	F	5' -	cacctgccttctgtcctctc	-3'
	R	5' -	tgaatcggagccacatcata	-3'
LAT2	F	5' -	atcaaggtcagcctgctgtt	-3'
	R	5' -	ttgggtttgtgttgccagta	-3'
4F2hc	F	5' -	ctctctgttgcacggtgact	-3'
	R	5' -	tctcggaagttgagcaccac	-3'
SGLT1	F	5' -	ttccagacgtgcacctgtac	-3'
	R	5' -	gtcctctgggatgtcctcct	-3'
GAPDH	F	5' -	tgatgggtgtgaaccacgag	-3'
	R	5' -	agtgatggcatggactgtgg	-3'

NCBIデータベースを元にエクソンを含む配列において、Productサイズ100~150bp、オリゴサイズ20bpとなるように、Primer3ソフトを用いてデザインした。DNA合成は、株式会社Fasmacに外注した。