

博士論文

炎症性腸疾患における有機カチオン 膜輸送体の機能と役割

金沢大学大学院医薬保健学総合研究科
創薬科学専攻
分子薬物治療学研究室

学籍番号 1229012008

氏名 清水 卓也

主任指導教員 加藤 将夫

目次

第1章	序論	—3—
第2章	実験方法	—6—
第3章	結果	—18—
第4章	考察	—30—
第5章	結論	—34—
	引用文献	—35—
	謝辞	—40—
	参考論文	—41—

第一章 序論

Carnitine/organic cation transporter 1 (OCTN1/SLC22A4)は、ユビキタスな臓器に発現しており、肝臓の非実質細胞や腎臓の近位尿細管上皮細胞の刷子縁膜、そして小腸では上皮細胞の刷子縁膜に発現していることが明らかになっている (Tamai et al., 2003; Sugiura et al., 2010)。 *in vitro* の解析において、OCTN1 は有機カチオン性の種々の化合物や薬物 (tetraethylammonium, pyrilamine, quinidine, verapamil, donepezil, gabapentin, ipratropium, methimazole, oxaliplatin, metformin など) を基質として輸送することが示されている (Yabuuchi et al., 1999; Grundemman et al., 2005; Grigat et al., 2007; Urban et al., 2008; Nakamura et al., 2010; Jong et al., 2011; Nakamichi et al., 2013)。 これらいくつかの基質については、OCTN1 の薬物動態的役割がこれまでに明らかとなっている。例えば、ヒトにおいて OCTN1 は gabapentin の尿細管分泌を担っていることが示されており、この分泌が OCTN1 の遺伝子多型(SNP)の一つである L503F を持つヒトにおいて低下することが示されている (Urban et al., 2008)。 また、当研究室で作製した *octn1* 遺伝子欠損 (*octn1*^{-/-}) マウスにおいて、metformin の経口投与後の血漿中濃度推移が変化する一方で、静脈内投与には変化がなく、metformin の消化管吸収に OCTN1 が関与することが示唆されている (Nakamichi et al., 2013)。 しかしながら、大部分の基質薬物における薬物動態学的役割については未だに十分に解明されていない。

OCTN1 は、carnitine や ergothioneine (ERGO)、acetylcholine などの内因性および生体内基質も認識する (Peltekova et al., 2004; Grundemman et al., 2005; Pochini et al., 2012)。 これら基質の中で、Grundemman らは、*OCTN1* 遺伝子発現系を用いた解析により ERGO が OCTN1 の良好な基質であることを見出した (Grundemman et al., 2005)。 その一方で、当研究室では OCTN1 の内因性基質を探索するため、*octn1*^{-/-}マウスにおいてメタボローム解析を実施した。 その結果、測定した 112 化合物の中で ERGO のみが、*octn1*^{-/-}マウスの臓器及び血液において野生型マウスに比べ著しく低い値を示した (Kato et al., 2010)。 さらに、野生型マウスでは血液や全ての臓器に μM レベルで ERGO が存在するのに対し、*octn1*^{-/-}マウスでは定量限界以下であることも HPLC により確認しており (Kato et al., 2010)、ERGO が *in vivo* での OCTN1 基質であることを明らかにしている。 ERGO は菌類やマイコバクテリアによってのみ生合成されるため、哺乳類では食餌を介して体内に取り込まれる。 ERGO は水溶性が高く、膜透過性も低いことから、主に OCTN1 を介してほぼ完全に消化管吸収される (Sugiura et al., 2010)。 また、ERGO は生体内で代謝されにくく、腎臓の OCTN1 を介して尿細管再吸収されるため、循環血液中に長く存在する (Kato et al., 2010)。 つまり、ERGO の体内動態の大部分は OCTN1 の機能によって決定づけられている。 したがって、OCTN1 とその代謝を受けにくい生体内基質である ERGO の組み合わせは、適切なトランスポーター基質は生体内にお

けるトランスポーターの全体的な機能を明らかにするためのマーカー化合物として有用であるという考えの有用な例の一つになるかもしれない。

OCTN1 は慢性炎症性疾患に関連したトランスポーターとされている。Tokuhiro らは、日本人患者集団を対象とした大規模なケースコントロール関連解析により、初めて *OCTN1* 遺伝子が進行性の全身性自己免疫疾患である関節リウマチの関連遺伝子であることを同定し、この *OCTN1* の転写制御因子 runt-related transcription factor 1 (*RUNX1*) 遺伝子も関節リウマチと関連する可能性を示唆している (Tokuhiro et al. 2003)。その一方で、当研究室も含め OCTN1 と炎症性腸疾患 (Inflammatory Bowel Disease: IBD) との関連が多数報告されている。IBD は、小腸や大腸の粘膜に慢性の炎症または潰瘍を引き起こす原因不明の疾患で、主にクローン病 (Crohn's Disease: CD) と潰瘍性大腸炎 (Ulcerative Colitis: UC) に分類される。CD と UC はともに厚生労働省の特定疾患 (難病) に指定されている。ここ 10 年間で多くのゲノムワイド関連解析 (Genome-wide Association Study: GWAS) が行われ、IBD に対する感受性関連遺伝子座が多数同定された。そのうち第 5 染色体 q31 に位置する IBD5 遺伝子座には、*OCTN1* 遺伝子とそのホモログで L-carnitine や有機カチオン性化合物を基質とし全身性カルニチン欠乏症の原因遺伝子である *OCTN2/SLC22A5* 遺伝子が存在している。これまでに様々な人種の患者集団を対象としたケースコントロール研究において、OCTN1 の L503F (C1672T) と OCTN2 のプロモーター領域において塩基転換が起こる -207G→C の 2 つの SNP と CD や UC 発症リスクとの関係が調べられてきた (Fisher et al., 2006; Cucchiara et al., 2007; Lakner et al., 2009)。最近、15 のケースコントロール研究結果を用いたメタ解析が Xuan らによって行われ、白人においてこれら OCTN1/2 の SNP が CD 感受性関連 SNP であることが示されている (Xuan et al., 2012)。したがって、OCTN1 の SNP は、少なくとも CD の部分的なリスクファクターである可能性がある。

OCTN1 と炎症性疾患との関連は、さらに ERGO のような生体内 OCTN1 基質がこれら疾患時のバイオマーカー候補となる可能性によっても示されている。実際、関節リウマチ患者の白血球内 ERGO 濃度は、冠動脈心疾患や変形性関節症患者に比べ著しく高い (Taubert et al., 2006)。一方で、CD 患者の血液中 ERGO 濃度は、健常人や UC 患者よりも著しく減少する (Kato et al., 2010)。現在、CD の臨床での診断には血液や便の炎症マーカーが広く用いられているが、これらマーカーは CD 特異的ではなく、確定診断のためには内視鏡や組織化学的な検査を含む侵襲的な検査が必要である (Ueno et al., 2013)。そのため、CD の非侵襲的で簡便な診断バイオマーカーを見つけることは患者にとって有益であり、CD 患者の血液中 ERGO レベルの低下がバイオマーカーになり得るかもしれないと考えた。しかしながら、CD 患者での ERGO 体内動態の変化が生じるメカニズムは未だ解明されていない。これまで CD 患者の回腸粘膜

炎症部位における OCTN1 発現量と ERGO 濃度は、非炎症部位に比べ高いことが報告されている (Taubert et al., 2009)。これらの結果は、ERGO と CD に関連がある可能性を支持するものではあるが、ERGO は食餌由来の化合物であるため、腸管 ERGO 濃度が高いことは ERGO の消化管吸収が増加していることを意味しており、CD 患者の血中 ERGO 濃度の低下とは対応しない。したがって、CD 患者の ERGO 体内動態の変化のメカニズムを解明することが、バイオマーカーとしてのこの化合物の妥当性・有用性を調べるのに不可欠である。

そこで、本研究では CD の ERGO 体内動態の変化のメカニズムを調べるため、腸管炎症モデルマウスの一つであるデキストラン硫酸ナトリウム (dextran sodium sulfate: DSS) 誘発性大腸炎モデルを作製した。この病態モデルマウスは、免疫学的かつ組織病理学的にヒト IBD 同様の類似性を多くもつことから、IBD の病態研究に広く用いられている (Wirtz et al., 2007)。そして、変動メカニズムとして、免疫細胞、特に腸管の炎症部位に循環血液中から浸潤する単球由来のマクロファージに着目した。ERGO が腸管炎症部位のこれら免疫細胞に取り込まれるという仮説が証明されれば、循環血液中の ERGO 減少に少なくとも部分的に寄与する ERGO の初回通過取り込みが生じている可能性がある。この仮説を調べるため、本研究では、主に腸管の免疫細胞に相当する粘膜固有層単核球細胞 (lamina propria mononuclear cells; LPMCs) を炎症モデルマウスより単離し、OCTN1 の発現や ERGO の取り込みを調べた。また、腸管炎症時における OCTN1 と ERGO の病態生理学的な役割を解明するために、野生型と *octn1*^{-/-} マウスにおいて大腸炎モデルを作製し、重症度の比較を行った。

第二章 実験方法

試薬

Dextran sodium sulfate (DSS, MW 36,000-50,000 Da) は、MP Bio Medicals (Santa Ana, CA) より購入した。Deuterium-labeled L-(+)-ergothioneine (d_9 -ERGO) および deuterium-labeled creatinine (d_3 -creatinine) は Toronto Research Chemicals Inc. (Toronto, Canada) より購入した。 $[^3\text{H}]$ ERGO (293 Ci/mol) および $[^{14}\text{C}]$ mannitol (54.0 mCi/mmol) は Moravsek Biochemicals Inc. (Brea, CA)より購入した。抗 mouse F4/80 (clone; A3-1) および β -actin (clone; AC-15) モノクローナル抗体はそれぞれ AbD Serotec (Kidlington, UK) and Sigma-Aldrich Inc. (St. Louis, MO) より購入した。抗 mouse CD11b および caveolin-1 ポリクローナル抗体は Sigma-Aldrich Inc.より購入した。抗 OCTN1 抗体は金沢大学旧辻研究室で作製されたものを用いた (Tamai et al., 1997)。上記以外の試薬はすべて市販試薬特級を用いた。

動物

octn1 遺伝子欠損(*octn1*^{-/-})マウスは以前に作製し(Kato et al., 2010)、C57BL/6J 系統に少なくとも 6 世代戻し交配した(Ishimoto et al., 2014)。Male C57BL/6J wild-type および *octn1*^{-/-}マウスは 7-10 週齢のオスマウスを実験に用いた。動物はすべて標準食で飼育され、水及び食餌は自由摂取とした。動物実験は金沢大学動物実験指針に従って実施した。

マウスの genotyping

マウスゲノム DNA を抽出するため、採取したマウスの耳を lysis buffer (100 mM NaCl, 10 mM Tris, 20 mM EDTA, 0.5% SDS, 0.1 mg/mL Proteinase K, pH 8.0)、55°C で 3 時間インキュベートして溶解し、2-propanol を加えてタッピングした後、95 °C で 2 分間インキュベートした。10 mM Tris-HCl (pH8.0)を加えて混和したサンプル (マウスゲノム DNA) は PCR を行うまで室温で保存した。

抽出したマウスゲノム DNA を鋳型にし、下記に示すプライマーを用いて Emerald Amp™ PCR Master mix (TaKaRa Bio, Inc.) を用い、以下のように PCR 反応を行った。得られた PCR product を用いてアガロースゲル電気泳動を行い、遺伝子型を確認した。

《PCR 反応》

94°C, 1 min → [98°C, 10 sec → 60°C, 20 sec → 72°C, 20 sec] x 43 cycles → 72°C, 5 min → 4°C, ∞

PCR 反応には以下のプライマーを用いた。

Knockout 用

Forward 5'-gggtgtggtccagaggact-3'

Reverse 5'-tagttgccagccatctgttg-3'

Wild-type 用

Forward 5'-cctaggaagatcccctcagc-3'

Reverse 5'-agtgtcaggaaccaggcaac-3'

DSS 誘発性大腸炎モデルマウスの作製

マウスに、day 1 から 8 および day 22 から 29 まで 2% (w/v) DSS を含む滅菌済み飲用水を自由に摂取させ、day 8 から 22 までおよび 29 から 31 まで DSS を含まない滅菌水を与えた。体重の変化を測定した。Day 8, 12 および 31 にマウスから小腸および大腸を採取した。Hematoxylin and eosin (H&E) 染色および免疫組織染色のため、腸管の一部は PBS で洗浄後、4% paraformaldehyde/10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) で一晩固定した。

DSS 誘発性大腸炎マウスの血液、血漿、組織および尿の採取

Day 1, 5, 8, 12, 16, 20, 22, 26 および 31 に、尾静脈よりヘパリン処理済毛細管を用いて採血し、ヘパリン処理した 1.5 mL チューブに血液を入れ、一部を 5,000 rpm, 10 分間遠心後、血漿を得た。

Day 8, 12 および 31 に、マウスから採った小腸、大腸および肝臓の一部を定量に用いるまで -80°C 保存した。

24 時間の蓄尿を回収するため、day 8 にマウスを代謝ケージに入れた。

腸管上皮細胞および LPMCs の単離

腸管からの上皮細胞および LPMCs の単離は、以前に報告されている手法(Weigmann et al., 2007)を修正して用いた。エーテル麻酔後にマウスを断頭し脱血後、素早く小腸と大腸を取り出し、小腸の下半分と大腸を ice-cold PBS につけた。パイエル板を除いたあと、腸管を軸上に切り開き約 1 cm に切り、PBS で洗浄した。これらの組織を 5 mL の Predigestion solution (1×HBSS Ca, Mg 不含, 5 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol)に腸管を入れ、37°Cの恒温槽で 20 分間振とうした。振とう後、185 μm のナイロンメッシュでろ過し、メッシュ上に残った腸管を再び Predigestion solution に入れ、振とうとろ過を繰り返す。ろ過した細胞懸濁液（主に上皮細胞）は、すぐに 5% FBS-HBSS で希釈

した。遠心し上清を除いた後、5% FBS-HBSS で2回洗浄した。メッシュ上に残った腸管を1 mm に細かく切断し、37°Cに加熱した5 mL の Digestion solution(1×PBS, Collagenase, DNase I, Dispase II)に入れ、37°Cの恒温槽で20分間振とうする。70 μm のセルストレイナーでろ過し、セルストレイナー上の組織を新しい5 mL の Digestion solution に入れた。この操作をセルストレイナー上の組織が見えなくなるまで(約3回)繰り返した。コラゲナーゼ処理後のろ液は、すぐに5% FBS 含 HBSS で希釈し遠心後、上清を除いた。同様に、5% FBS 含 HBSS で細胞を2回洗浄した。3回分の細胞を集めて1200 rpm、4°Cで10分間遠心した。上清を除き得られた細胞を3 mL 100% Percoll 溶液で懸濁後、5% FBS 含 HBSS で10 mL までメスアップした。懸濁後1800 rpm、20°Cで20分間遠心した(ACCEL と DECEL は off)。上清を1 mL 残して除き、4.1 mL の100% Percoll 溶液を加えて5% FBS 含 HBSS で10 mL にメスアップした後、細胞をよく懸濁した(44%Percoll 溶液)。新たに遠沈管に準備した3 mL 70% Percoll 溶液の上に細胞懸濁液を重層し、1800 rpm、20°Cで20分間遠心した(ACCEL と DECEL は off)。44%と70% Percoll 層の境界面にあるLPMCsを回収し、5% FBS 含 HBSS で細胞を2回洗浄した。

○HBSS

	Conc.	HBSS(+)	HBSS(-)	10 x HBSS(+)
	mM	mg/1L	mg/1L	mg/100 mL
KCl	5.4	400	400	400
NaCl	137	8000	8000	8000
NaHCO ₃	4.16	350	350	—
KH ₂ PO ₄	0.44	60	60	60
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	0.39	142.68	142.68	142.68
D-Glucose	5.5	1000	1000	1000
CaCl ₂ · 2H ₂ O	1.26	185.45	—	185.45
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.4	100	—	100

○Predigestion solution (1×HBSS(-), 5 mM EDTA, 1 mM DTT)

1×HBSS Ca, Mg 不含 10 mL/Sample
 EDTA 18.6 mg/Sample
 Dithiothreitol (DTT) 1.54 mg/Sample

○5% FBS 含有 HBSS (+)

1×HBSS (+)	475 mL
非動化済み FBS	25 mL

○Digestion solution

1×PBS	100 mL
Collagenase (final 0.4 mg/mL)	0.04 g
DNase I (final 0.5 mg/mL)	0.05 g
Dispase II (final 3 mg/mL)	0.3 g

○100% Percoll(v/v) ※無菌的に調製

Percoll (d=1.124 g)	9 mL
10×HBSS (+)	1 mL

○70% Percoll(v/v)

100% Percoll	2.1 mL
1×HBSS (+)	0.9 mL

小腸および大腸組織切片の作製

ソムノペンチル皮下麻酔でマウスを仰向けに固定した後、すばやく小腸と大腸組織を摘出し、4%パラホルムアルデヒド固定液につけて一晩浸漬固定した。それらを 10 % sucrose/PBS 溶液に浸し、脱水を開始した。一日後に 20 % sucrose/PBS 溶液に置換し、さらに一日後に 30 % sucrose/PBS 溶液に置換した。30 % sucrose/PBS 溶液での脱水が完了した後に、その後、10%スクロース/PBS、20%スクロース/PBS、0.05%アジ化ナトリウム含有 30%スクロース/PBS で脱水処理をした。OCT compound で包埋しクリオスタットを用いて 10 μ m の厚さの小腸・大腸凍結切片を作製した。

○4%パラホルムアルデヒド固定液

8%パラホルムアルデヒド/H ₂ O	100 mL
0.2 M リン酸ナトリウム buffer (pH 7.4)	100 mL

○0.2 M リン酸ナトリウム buffer (pH 7.4)

NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	0.2 M
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	0.2 M

○10 x PBS

NaCl	40 g
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	14.5 g
KCl	1 g
KH ₂ PO ₄	1 g
H ₂ O	up to 500 mL

マウス組織切片の OCTN1 の免疫染色

免疫染色は以前の報告 (Sugiura et al., 2010) を基に、実験条件を改善し実験を行った。-80 °C で保存しておいたスライドガラスに貼付けた組織凍結切片を室温に戻した後に、ドライヤーで 30~60 分風乾させた。PBS で 2~3 回洗い、10 mM クエン酸緩衝液(pH 6.0) に 92°C, 5 分間浸し、抗原賦活化処理を行った。切片を湿潤箱の中で冷ました後、PBS で 2~3 回洗い、0.3% Tween 20 /PBS に切片を 30 分間インキュベーションした。PBS で 3 回洗い、余分な PBS を拭き取り、ブロッキング試薬(1.5% BSA/1.5% goat serum/PBS) を切片にのせ、湿潤箱の中で室温、30 分間放置した。切片に触らないようにブロッキング試薬を拭き取り、ブロッキング試薬で希釈した anti-OCTN1 antiserum 溶液を切片にのせ、湿潤箱の中で 4°C, 一晚反応させた。PBS で洗浄したあと、スライドガラスの残渣を拭き取り、PBS で 400 倍希釈した Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG conjugates (Molecular Probes Inc., Eugene, OR) を切片にのせ、室温で 30 分間放置した。PBS で洗浄後、最後に VECTASHIELD mounting medium with DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA) で封入と核染色を行い、カバーガラスをかけ、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM 710; Carl Zeiss, Jena, Germany) を使って切片を観察した。

マウス組織切片の F4/80 の免疫染色

免疫染色は以前の報告 (Shimizu et al., 2011) を基に、実験条件を改善し実験を行った。-80 °C で保存しておいたスライドガラスに貼付けた組織凍結切片を室温に戻した後に、ドライヤーで 30~60 分風乾させた。PBS で 2~3 回洗い、10 mM クエン酸緩衝液(pH 6.0) に 92°C, 5 分間浸し、抗原賦活化処理を行った。切片を湿潤箱の中で冷ました後、PBS で 2~3 回洗い、0.3 % H₂O₂/MeOH に切片を 5 分間インキュベーションした。PBS で 3 回洗い、余分な PBS を拭き取り、ブロッキング試薬 (5 % FBS/PBS) を切片にのせ、湿潤箱の中で室温、30 分間放置した。切片に触らないようにブロッキング試薬を拭き取り、ブロッキング試薬で希釈した抗 F4/80 抗体溶液を切片にのせ、湿潤箱の中で 4°C, 一晚反応させた。PBS で洗浄したあと、スライドガラスの残渣を拭き取り、PBS で 200 倍希釈した biotinylated anti-rat IgG (Vector Laboratories, Burlingame, CA) を切片にのせ、室温で 1 時間放置した。PBS で洗浄したあと、PBS で

希釈した VECTASTAIN Elite ABC Standard Kit (Vector Laboratories)を切片にのせ、室温で 30 分間放置した。3',3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)溶液(ImmPACT™ DAB diluent 1mL + chromogen concentrate 10 μ L; Vector Laboratories)に切片を浸した。切片が茶色になったらすばやく PBS で洗い、反応を止め、さらに PBS で 3 回洗った。その後、70 % Alcohol, 80 % Alcohol, 90 % Alcohol, 100 % Alcohol (2 回), Xylene (3 回)で順に脱水していき、最後に非水溶性封入剤で封入し、カバーガラスをかけた。顕微鏡 (BZ-9000; Keyence, Osaka, Japan) を使って切片を観察した。

Hematoxylin and Eosin (H&E) 染色

大腸切片を 30 - 60 分ドライヤーで風乾させた後、ヘマトキシリン染色液に 3 分つけた。流水洗を行ったあと、水道水で 10 分間洗浄した。水分を拭き取り、エオシン液に 1 分つけた後、水道水で洗浄した。70% Alcohol \rightarrow 80% Alcohol \rightarrow 90% Alcohol \rightarrow 95% Alcohol \rightarrow 100% Alcohol \rightarrow 100% Alcohol \rightarrow Xylene \rightarrow Xylene の順に 3 分ずつ浸し、脱水処理を行った。最後に封入剤で封入し、乾くまで 4 時間以上放置した。

<エオシン液調製>

○1.0%エオシン・アルコール溶液 Stock solution

95%アルコール	40 mL
エオシン Y	0.5 g
蒸留水	10 mL

○エオシン液

1.0%エオシン・アルコール溶液	30 mL
80%アルコール	90 mL
酢酸	0.6 mL (酢酸は混合液 100 mL に対して 0.5 mL)

細胞の Crude Membrane Fraction の作製

-80°C 保存しておいた細胞を homogenization buffer で洗いこみしながら、ダウンス型ホモジナイザーに移し、100 回ホモジナイズした。homogenization buffer で洗いこみながら、15 mL 遠沈管に移し、4°C、3,000 g (3970 rpm; Hitachi)、15 min 遠心を行った。上清を別の 15 mL チューブに回収し、再度 4°C、3,000 g、15 min で遠心を行った。上清を超遠心機用チューブに回収し、homogenization buffer で各チューブの重さを天秤で合わせた後、超遠心機 Optima L-90K およびスイングロータ SW32 Ti (BECKMAN) で 4°C、100,000g、30 min 遠心を行った。上清を完全に除いた後、残った pellet (crude membrane fraction) に 10 mM Tris-HCl (pH 7.5)を添加し、25G 注射針とシリンジを用い

て pellet を剥がして懸濁後、western Blot に用いた。

○Homogenization buffer

Final Content	M.W.	Stock Conc.	Dilution Rate	Stock solution の調製法
0.23 M sucrose	342.3	0.92 M	x 4	30 g/100 mL (dH ₂ O)
5 mM Tris-HCl (pH 7.5)	121.14	1M	x 200	1.211 g /100 mL (dH ₂ O)
2 mM EDTA	372.24	100 mM	x 50	3.722 g /100 mL (dH ₂ O)
0.1 mM PMSF	174.9	300 mM	x 3000	3.48 mg/ mL (DMSO)
1 μg/mL leupeptin	426.6	1 mg/mL	x 3000	DMSO ⇒-30°C
1 μg/mL pepstatin A	685.9	1 mg/mL	x 3000	DMSO ⇒-30°C

⇒dH₂O でメスアップ

マウス小腸・大腸上皮細胞の Western Blot 解析

上記方法によりマウスより単離した上皮細胞から crude membrane fraction を作製した。crude membrane fraction に RIPA-Y buffer (1 % Nonidet P-40, 75 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, protease inhibitor, pH 7.5)を加え、25G 注射針とシリンジに 5 回通し、4°C, 1 時間回転インキュベーションすることにより可溶化し、15000 rpm, 5 min, 4 °C で遠心した上清をサンプルとして用いた。Pierce Microplate BCA Protein Assay Kit を用いて、タンパク定量を行った後、最終泳動量が 10 μg/1well になるように希釈し、5 x SDS sampling buffer を加え、飽和するまで urea (MP Biomedicals, Inc.)を添加した。SDS-PAGE (12% polyacrilamide gel) にて電気泳動後、polyvinylidene difluoride membrane (PVDF; Millipore Corporation, Billerica, MA)を用いて、セミドライ方式により 2 mA/cm² で 60 分間転写した。PVDF membrane をブロッキング溶液 (4% Blockace / H₂O (DS ファーマバイオメディカル)) で室温 1 時間以上ブロッキングした後、一次抗体溶液 (against OCTN1, anti-β-actin, anti-caveolin 1 抗体) と 4°C, 一晩反応させた。TBST (137 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.1% Tween 20)で洗浄後、二次抗体溶液と室温で 1 時間反応させた。バンド検出は、Western lightning chemiluminescence reagent plus (Perkin Elmer, Massachusetts, USA)を用いて可視化した。

LC-MS/MS の定量条件

<血液および血漿試料の前処理>

蒸留水で 10 倍希釈した血液および 2 倍希釈した血漿を 10 μL とり、内標準物質

(d9-ERGO)を 10 μ L、蒸留水 10 μ L 加えて攪拌した。さらに、70 μ L の MeOH を加えて除タンパクを行い 3 分間攪拌し、15,000 rpm、4°C で 15 分間遠心した。上清 70 μ L を採り、15,000 rpm で 15 分間遠心した上清を LC-MS/MS によって定量を行った。

<組織試料の前処理 (ERGO、ERGO 代謝物) >

-80°C 保存組織を氷上に移し、秤量後 1mg tissue 当たり 20 μ L の水を添加し、ハサミで出来るだけ細かくした。ホモジナイザー(T10 basic ULTRA-TURRAX®, IKA)を用い、氷上でホモジナイズした (Speed Max, 30sec)。小腸、大腸および 10 倍希釈した肝臓ホモジネートを 50 μ L とり、内標準物質(d9-ERGO)を 10 μ L、蒸留水 10 μ L 加えて攪拌した。さらに、150 μ L の MeOH を加えて除タンパクを行い 3 分間攪拌し、15,000 rpm、4°C で 15 分間遠心した。上清 100 μ L を採り、15,000 rpm で 15 分間遠心した上清を LC-MS/MS によって定量を行った。

<尿試料の前処理 (ERGO) >

代謝ケージで回収した尿を 90 μ L とり、内標準物質(d9-ERGO)を 5 μ L、蒸留水 5 μ L 加えて攪拌した。さらに、900 μ L の AcCN を加えて除タンパクを行い 3 分間攪拌し、15,000 rpm、4°C で 15 分間遠心した。上清 100 μ L を採り、15,000 rpm で 15 分間遠心した上清を LC-MS/MS によって定量を行った。

<尿試料の前処理 (creatinine) >

代謝ケージで回収し、100 倍希釈した尿を 25 μ L とり、内標準物質(d3-creatinine)を 12.5 μ L、蒸留水 12.5 μ L 加えて攪拌した。さらに、200 μ L の AcCN を加えて除タンパクを行い 3 分間攪拌し、15,000 rpm、4°C で 15 分間遠心した。上清 150 μ L を採り、15,000 rpm で 15 分間遠心した上清を LC-MS/MS によって定量を行った。

<腸管粘膜固有層単核球細胞の前処理 (ERGO、ERGO 代謝物) >

単離した腸管粘膜固有層単核球細胞 (LPMCs) に蒸留水を 200 μ L 加え、氷上でチップソニケーターを用い、ソニケーションを行った。さらに、内標準物質(d9-ERGO)を 10 μ L、蒸留水 10 μ L 加えた後、400 μ L の MeOH を加えて攪拌し、15,000 rpm、4°C で 15 分間遠心した。上清 550 μ L を採り、40°C で一晩蒸発乾固を行った。乾固後、蒸留水を 40 μ L 加え攪拌し、4°C でソニケーションを行った。160 μ L の AcCN を加えて攪拌し、15,000 rpm で 15 分間遠心した上清を LC-MS/MS によって定量を行った。

<LC/MS/MS condition > (ERGO、creatinine、ERGO 代謝物)

Instrument : LCMS-8040 (Shimadzu, Kyoto, Japan)

Column : ACQUITY UPLC BEH Amide Column (130Å, 1.7 μm, 2.1 mm X 150 mm; Waters Corporation)

Mobile Phase : A) 0.1 % HCOOH

B) 0.1 % HCOOH in AcCN

Time (min)	% of A	% of B
0	5	95
0.5	5	95
3	35	65
3.5	60	40
4.0	60	40
4.1	5	95

Flow Rate: 0.4 mL/min

Column Temperature : 50°C

Ionization: Electrospray

Polarity: Positive

Multiple Reaction Monitors: m/z 230.36 to 126.95 (ERGO)

m/z 239.15 to 127.00 (d₉-ERGO, internal standard)

m/z 114.10 to 44.15 (creatinine)

m/z 117.00 to 47.15 (d₃-creatinine, internal standard)

m/z 278.00 to 95.10 (ERGO 代謝物)

単離 LPMCs による ERGO 取り込み試験

単離した LPMCs の細胞懸濁液を遠心し、上清を除いた後 Transport buffer (125 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 5.6 mM Glucose, 1.2 mM CaCl₂, 1.2 mM KH₂PO₄, 1.2 mM MgSO₄, 25 mM HEPES/NaOH, pH7.4)を加えて均一に懸濁した。さらに、遠心後、Transport buffer を加えて懸濁し、氷上で各 1.5 mL チューブに分注した。37 °C で 10 分間プレインキュベーションした後、あらかじめ 37 °C にした薬液 ([³H]ERGO かつ [¹⁴C]mannitol) を加えて反応を開始した。一定時間経過後、0.4 mL のチューブ (Assist) に 50 μL の 3N KOH が下層に、100 μL のシリコンオイル (比重 1.015、silicon oil : liquid paraffin = 10 : 3.3) が上清にある反応停止用チューブに細胞懸濁液を加えて、遠心することで反応を停止した。12 時間以上室温でインキュベーションした後、KOH 層を回収した。5N HCl で中和した後、液体シンチレーションカクテル (Cleasol I, Nacalai Tesque Inc.) を加え、液体シンチレーションカウンター (LSC-5100, Aloka, Tokyo, Japan) により放射活性を測定した。得られたカウントとクリアゾルのみを計測した際に得られたカウントとの

差を取り、これを真のカウントとした。得られたカウントを初期濃度(dpm / μL)と細胞数で除したものが $[^3\text{H}]\text{ERGO}$ の細胞内への蓄積量($\mu\text{L} / 10^6$ cells)となる。これらの値を平均した値を細胞内へ取り込まれた薬物の量(Mean)とした。 $[^{14}\text{C}]\text{mannitol}$ の分布容積は、 $[^3\text{H}]\text{ERGO}$ の分布容積から差し引くことで、非特異的な付着の補正を行った。

単離 LPMCs のフローサイトメトリー

単離した LPMCs の細胞懸濁液を遠心し、上清を除いた後、4%パラホルムアルデヒドで細胞を固定し、1% FBS/PBS で洗浄した。遠心後に上清を除き、ブロッキング試薬 (5% FBS/0.1% saponin/PBS) を添加し、室温で 30 分間インキュベーションした。さらに、遠心後に上清を除き、ブロッキング試薬で希釈した一次抗体溶液 (anti-OCTN1 antiserum, preimmune serum, anti-F4/80 antibody または isotype control IgG2b) を添加し、室温で 30 分間インキュベーションした。洗浄後、PBS で 200 倍希釈した二次抗体溶液 (Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit または rat IgG conjugates (Molecular Probes Inc., Eugene, OR)) を添加し、さらに室温で 30 分間インキュベーションした。洗浄後のサンプルは、FACSVerse flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA)で解析を行った。

ヒト単球細胞株 THP-1 の細胞培養

THP-1 細胞は理化学研究所より提供され、RPMI-1640 (Sigma)に 10% fetal bovine serum (FBS), 50 unit/mL benzylpenicillin, 50 ng/mL streptomycin を添加した培地中で、37 °C, 5% CO_2 インキュベーター中で培養した。実験に使用する前に、マクロファージ様細胞に分化させるため、 5×10^4 cells/cm² の密度で播き、phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA; 5 ng/ml)を添加した上記培地中で培養した。48 時間インキュベーション後に、分化したマクロファージ様細胞を培地で洗浄し、さらに LPS (100 ng/ml)を添加して 12 時間培養することで活性化させて、実験に用いた。

ヒト単球細胞株 THP-1 の定量 RT-PCR

Total RNA 抽出は、ISOGEN(Nippon Gene, Toyama, Japan)の標準プロトコル通りに行った。オリゴプライマー、deoxy nucleotide triphosphate (dNTP) mix、RT buffer、MultiScribe™ Reverse Transcriptase によって、cDNA を合成した。cDNA は、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO, Osaka, Japan)、5'-プライマー、3'-プライマーと混ぜ、Mx3005P (Agilent Technologies; Santa Clara, CA)により、増幅した。

○Primer の配列

Gene	Forward primer	Reverse primer
OCTN1	5'-CGGAATATTGCCATAATGACC-3'	5'-TTCAATCAAGGCAGAGAGGAA-3'
CD14	5'-GAGCTCAGAGGTTTCGGAAGA-3'	5'-CTTCATCGTCCAGCTCACAA-3'
CD11b	5'-AGAACAACATGCCCGAACC-3'	5'-TTCTCTGAGGCCGTGAAGTT-3'
TNF- α	5'-CAGCCTCTTCTCCTTCCTGAT-3'	5'-GCCAGAGGGCTGATTAGAGA-3'
β -actin	5'-CCAACCGCGAGAAGATGA-3'	5'-TCCATCACGATGCCAGTG-3'

PCR の反応条件は以下の通りに行った。

95 °C、15 分 → (95 °C、10 秒 → 60 °C、30 秒) x 40 サイクル

mRNA 発現量は、 β -actin によってサンプル間の標準化を行い、相対定量の $\Delta \Delta Ct$ 法を用いて定量した。

LPS 刺激 THP-1 マクロファージ様細胞の Western blot 解析

上記方法により、単球性細胞、マクロファージ様細胞、LPS 刺激マクロファージ様細胞からそれぞれ crude membrane fraction を作製した。さらに、上記マウス上皮細胞の western blot と同様の方法で実施した。

LPS 刺激 THP-1 マクロファージ様細胞の輸送試験

12well マルチディッシュにおいて培養した LPS 刺激マクロファージ様細胞を Transport buffer で洗浄後、Transport buffer を加えて、37°C、5 分間インキュベーションした。Transport buffer をアスピレーター除去した後、あらかじめ 37 °C にした [³H]ERGO を含む薬液を加えて反応を開始した。一定時間経過後、薬液を一部回収してから吸引し、ice-cold transport buffer で 3 回細胞を洗浄した。0.2 N NaOH 300 μ L を各 well に加え、細胞を可溶化した。細胞可溶化した Sample を回収し、5N HCl で中和した後、液体シンチレーションカクテル (Cleasol I, Nacalai Tesque Inc.) を加え、液体シンチレーションカウンター (LSC-5100, Aloka, Tokyo, Japan) により放射活性を測定した。得られたカウントとクリアゾルのみを計測した際に得られたカウントとの差を取り、これを真のカウントとした。また、各 well のタンパク量を Protein Assay Kit (Bio-Rad, Hercules, CA)を用いて測定した。得られたカウントを初期濃度(dpm / μ L)とタンパク量で除したものが細胞内への[³H]ERGO 蓄積量(μ L / mg protein)となる。これらの値を平均した値を細胞内へ取り込まれた薬物の量(Mean)とし、この平均蓄積量から標準誤差(S.E.M.)を求めた。時間依存性試験では、1, 60, 120, 240 min で実験を行った。濃度依存性試験は 0, 3, 10, 30, 100, 300 μ M の ERGO 入り薬液を用い、初速度取

り込みの見える 120 min で実験を行った。

大腸炎の組織化学的スコア評価

H&E 染色後の大腸組織切片を用い、DSS 誘発性大腸炎の程度を以下の項目で評価した。組織化学的スコアは、以前の報告 (Williams et al., 2001) を基に実施した。スコア評価には、少なくとも各グループ 4 マウスより画像を取得し、各マウスの大腸 3 箇所以上の顕微鏡画像を用いた。

Feature graded	Score	Description
Inflammation severity	0	None
	1	Mild
	2	Moderate
	3	Severe
Inflammation extent	0	None
	1	Mucosa
	2	Mucosa and submucosa
	3	Transmural
Crypt damage	0	None
	1	Basal 1/3 damaged
	2	Basal 2/3 damaged
	3	Crypt lost; surface epithelium present
	4	Crypts and surface epithelium lost

データ解析

有意差の検定は Student の t -検定及び one-way ANOVA with the Bonferroni test を用いて行い、 $p < 0.05$ で有意差があるとした。

第三章 結果

DSS 誘発性大腸炎モデルマウスにおける血液中および血漿中濃度推移

クローン病患者の血液中 ERGO 濃度が減少するメカニズムを調べるため、DSS 誘発性モデルマウスを作製し、血液中および血漿中 ERGO 濃度推移を調べた。このモデルマウスは、腸管上皮細胞への障害やマクロファージの活性化を示すことがこれまでに報告されているモデルである (Poritz et al., 2007; Alex et al., 2009)。ERGO はマウスの餌中に含まれることから、control マウスでは循環血液中 ERGO 濃度は次第に増加した一方で、DSS 投与マウスの濃度は、day 20 以降 control マウスよりも著しく低かった (Fig.1A)。この DSS 投与マウスでの血中 ERGO レベルの低下 (Fig. 1A) は、クローン病患者で以前に見られたことと一致した (Kato et al., 2010)。さらに、本研究ではより高感度な検出が可能な LC-MS/MS を用いたことで、循環血漿中 ERGO 濃度も測定を行った (Fig.1B)。ERGO の血漿中濃度は、血中濃度と同様に day26 以降で control マウスよりも低かった。DSS 誘発性モデルマウスの炎症評価には、体重推移、大腸の長さ、大腸組織の H&E 染色で確認した (Fig.1C, D, E)。DSS 投与マウスでは、control マウスに比べ、体重が著しく減少し (Fig.1C)、大腸の長さが短くなった (Fig.1D)。また、DSS 投与マウスの大腸では、上皮細胞および Crypt の脱落や免疫細胞の浸潤が広範囲で見られた (Fig.1E)。

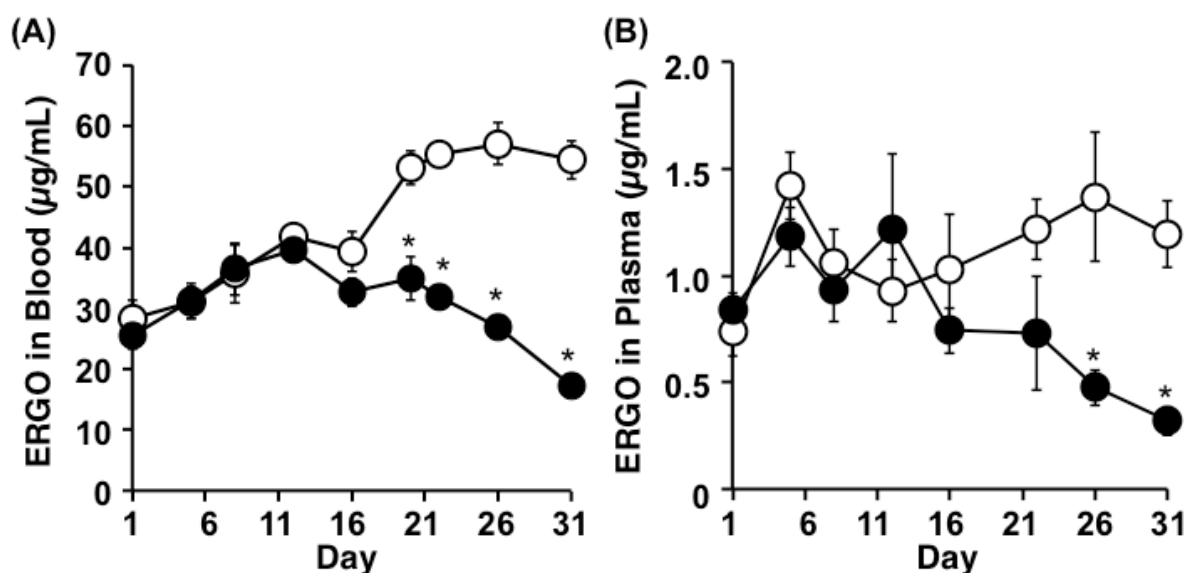


Fig.1A-B ERGO concentration profile in blood and plasma of DSS-induced colitis mice

(A) Blood and (B) plasma concentrations of food-derived ERGO were measured in wild-type mice given drinking water with (closed circles) or without (open circles) 2% (w/v) DSS. Each

value is the mean \pm SEM (n=4-10). *, Significantly different from control group ($p < 0.05$).

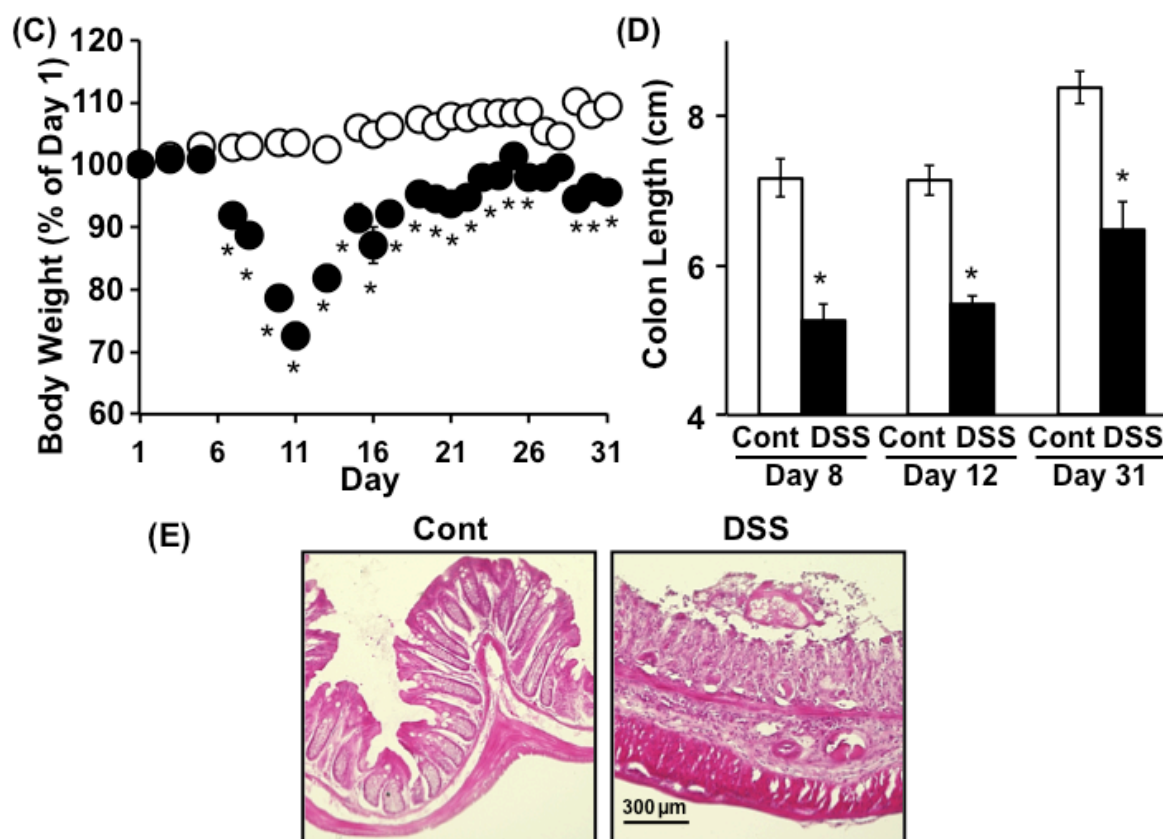


Fig. 1C-E Severity of intestinal inflammation in DSS-induced colitis mice

(C) Body weight of DSS-treated (closed circles) and control (open circles) mice was measured. Each value is the mean \pm SEM (n = 4-38). *, Significant difference from control mice ($p < 0.05$). (D) Colon length was determined at days 8, 12 and 31 in DSS-treated (closed bars) and control (open bars) mice. Each value is the mean \pm SEM (n = 7-37). *, Significant difference from control mice ($p < 0.05$). (E) H&E staining of colon tissue sections of DSS-treated and control mice at day 8. Representative results from at least three individual mice in each group are shown.

DSS 誘発性大腸炎モデルマウスの腸管における OCTN1 の発現変動

Fig.1 で見られた DSS 誘発性モデルの循環血中 ERGO 濃度の低下の原因として、以前に報告した (Sugiura et al., 2010) ERGO の消化管吸収を担っている腸管上皮細胞の刷子縁膜上の OCTN1 の発現レベルの変動が考えられる。そこで、OCTN1 の発現変動を調べるため、免疫組織染色と Western blot 解析を行った (Fig.2)。DSS 投与マウスにおける小腸刷子縁膜上の OCTN1 のシグナルは、day 8 や 12、31 において鮮明にみられた (Fig. 2A)。そして、Western blot 解析では、DSS 投与マウスから単離した小腸および大腸上皮細胞の粗膜画分における OCTN1 の発現は、control マウスに比べ高い

発現を示した (Fig. 2B)。また、 β -actin の発現は、DSS 投与マウスと control マウスで同等のレベルを示した一方で、caveolin-1 では、小腸と大腸共に control の方が DSS 投与マウスよりも濃いバンドが検出された (Fig. 2B)。

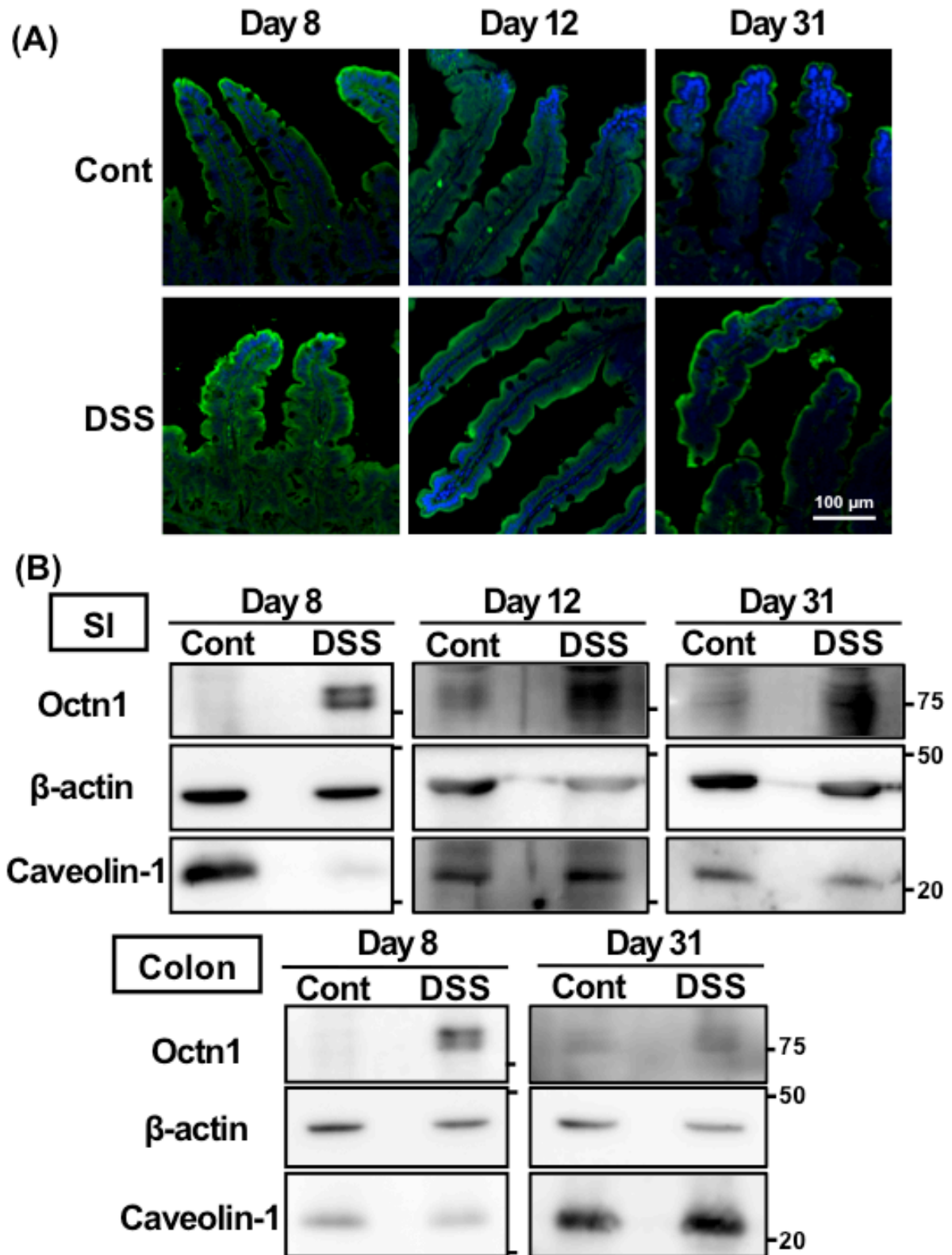


Fig. 2 Expression of Octn1 in small intestine and colon of DSS-induced colitis mice

(A) Cryosections of small intestine from control and DSS-induced colitis mice at days 8, 12 and 31 were incubated with antiserum against Octn1. Note that the density of the Octn1 signal on apical membranes in colitis mice was greater than that in control mice. (B) Lysate of crude membrane fraction of intestinal epithelial cells prepared from small intestine (SI) and colon of control and DSS-treated mice was subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, followed by western blot analysis using anti-OCTN1 antiserum, and β -actin and caveolin-1 antibodies.

腸管組織および単離 LPMCs における餌由来 ERGO 濃度

DSS 投与マウスの腸管上皮細胞における OCTN1 の発現の上昇 (Fig. 2) では Fig. 1 で見られた循環血液中の ERGO 濃度の低下を説明することはできない。そこで、新たな血中濃度低下メカニズムとして、炎症の起きた腸管組織固有層中に存在する活性化マクロファージなどの免疫細胞が、上皮細胞で吸収された ERGO を取り込む可能性を考えた。炎症性腸疾患では、T 細胞やマクロファージ、樹状細胞などの免疫細胞が腸管組織中の炎症部位に浸潤することが報告されている (Steinbach et al., 2014)。この可能性を調べるため、まず腸管組織全体における餌由来 ERGO の濃度を LC-MS/MS によって測定した。ERGO は、control および DSS 投与マウスの小腸と大腸共に検出された (Fig. 3A)。小腸の ERGO 濃度は、DSS 投与マウスで高い傾向が見られた (Fig. 3A) 一方で、大腸では control マウスよりも DSS 大腸炎マウスで著しく高かった (Fig. 3B)。さらに、小腸および大腸の免疫細胞内への餌由来 ERGO の蓄積を調べるため、LPMCs の単離を行った。餌由来 ERGO は、DSS 大腸炎マウスの小腸および大腸の LPMCs で検出され、小腸の方が大腸よりも高い濃度を示した (Fig 3C)。餌由来の ERGO は control マウスから単離した大腸 LPMCs では検出されなかった (data not shown)。一方で、control マウスでは免疫細胞の浸潤がおそらく少ないため、control マウスからは定量に必要な数の LPMCs を単離することはできなかった。また、*octn1*^{-/-} マウスより単離した小腸および大腸 LPMCs においても餌由来の ERGO は検出されなかった (Fig. 3C)。

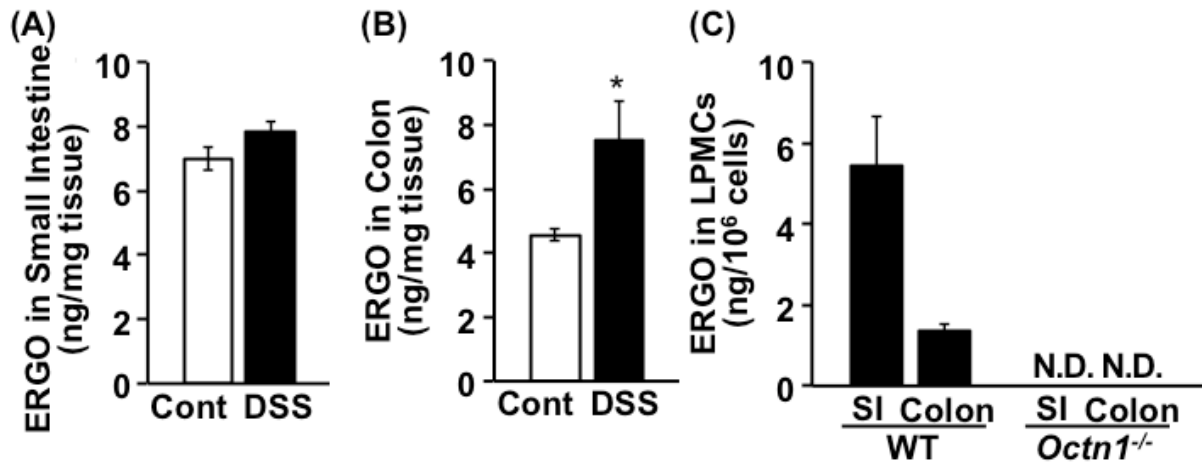


Fig. 3 Amount of ERGO in intestinal tissues (A, B) and LPMCs (C) of DSS-treated mice

(A, B) Food-derived ERGO was measured in small intestine (A) and colon (B) of control (open bar) and DSS-treated wild-type mice (closed bar) at Day 8. Each value is the mean \pm SEM (n=4). *, Significantly different from the control group (p <0.05). (C) Food-derived ERGO was measured in small-intestinal and colonic LPMCs isolated from DSS-treated wild-type and *octn1*^{-/-} mice at day 8. The detection limit of ERGO was 1.2 ng/10⁶ cells. Each value is the mean \pm SEM (n=4-10). *, Significantly different from the control group (p <0.05).

単離 LPMCs における ERGO の取り込みと OCTN1 の発現

炎症時の LPMCs により OCTN1 が取り込まれることを直接調べるため、³H]ERGO の取り込み試験を行った。DSS 大腸炎マウスの小腸と大腸の両方から単離した LPMCs において、時間依存的な³H]ERGO の取り込みが見られた (Fig. 3D)。小腸 LPMCs での³H]ERGO の取り込みは、大腸 LPMCs よりも高く (Fig. 3D)、これは、餌由来の ERGO 濃度が小腸の LPMCs で高い値を示したことと一致した (Fig. 3C)。また、LPMCs による³H]ERGO の取り込みは、100 μ M ERGO 存在下で著しく減少した (Fig. 3D)。さらに、OCTN1 の LPMCs での発現を調べるため、フローサイトメトリーを行った。単離小腸および大腸 LPMCs において、抗 OCTN1 抗体を用いた時の OCTN1 の免疫反応性は、control 抗血清に比べより顕著であった (Fig.3E)。同様に、マクロファージマーカーである F4/80 も抗 F4/80 抗体を使用した際に高い反応性が得られた (Fig. 3E)。

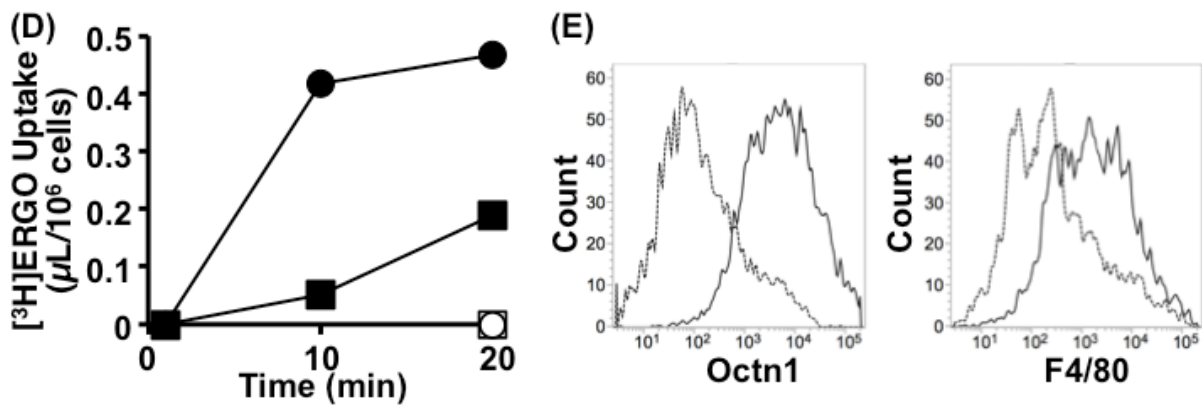


Fig. 3 Uptake of [³H]ERGO (D) and expression of OCTN1 (E) in LPMCs of DSS-treated mice

(D) Small-intestinal (circles) and colonic (squares) LPMCs isolated at day 8 were incubated with 2.6 μM [³H]ERGO at 37°C in the presence (open symbols) or absence (closed symbols) of 100 μM unlabeled ERGO. (E) Flow cytometry was performed with small-intestinal LPMCs isolated from DSS-treated mice using anti-OCTN1 antiserum (solid line) and preimmune serum (dotted line) or anti-F4/80 antibody (solid line) and isotype control (dotted line). Representative results from at least three individual experiments are shown. Similar results were also obtained for colonic LPMCs (data not shown).

炎症時における ERGO 代謝物の探索

炎症時に LPMCs に取り込まれた抗酸化物質 ERGO が別の物質に代謝されるかを調べるため、ERGO を生体内の活性酸素種の一つである過酸化水素と反応させ、その反応物に対し LC-MS/MS によるスキャンを行った。反応後は、ERGO のピークが減少し、プリカーサーイオン m/z 278.0 および 198.1 の反応物が検出された。これらのピークに対しさらに、プロダクトイオンスキャンを実施した結果、プリカーサーイオン m/z 278.0 からは m/z 60.4, 95.1, 154.2, 198.1 のプロダクトイオンが検出され、プリカーサーイオン m/z 278.0 からは、m/z 60.2, 95.1, 154.2 のプロダクトイオンが検出された。そこで、腸管組織と単離 LPMCs において、m/z 278.0 の候補代謝物を LC-MS/MS によって測定した。m/z 278.0 の物質は、control および DSS 投与マウスの小腸および大腸において検出されなかった (Table 1)。さらに、control マウスから単離した大腸 LPMCs では検出されなかった一方で、DSS 投与マウス由来の小腸および大腸 LPMCs では、m/z 278.0 の物質が検出された (Table 1)。

Table 1 ERGO metabolite (m/z 278.0) in intestinal tissues and LPMCs of DSS-treated mice at day 8

Mice	Sample		Control	DSS
Wild-type	Whole Tissues	Small Intestine	N.D.	N.D.
		Colon	N.D.	N.D.
	LPMCs	Small Intestine	— ^{a)}	Detected
		Colon	N.D.	Detected
<i>octn1</i> ^{-/-}	LPMCs	Small Intestine	—	N.D.
		Colon	—	N.D.

N.D. : Not detectable

a) Not determined because LPMCs could not be isolated.

DSS 誘発性大腸炎モデルマウスの肝臓中および尿中 ERGO 濃度

DSS 大腸炎マウスの血中濃度低下は、肝臓での ERGO の取り込みの上昇や ERGO の尿細管再吸収の減少によっても説明できる可能性がある。そこで、これらの可能性を調べるため、DSS 投与マウスの肝臓中および尿中 ERGO 濃度も測定した。DSS 投与マウスにおける肝臓中 ERGO 濃度は、control マウスに比べ、day 8 で低い傾向があり、day 31 では著しく低下した (Fig.4A)。また、尿中 ERGO 濃度は day 8 において測定し、creatinine によって補正を行った。DSS 投与マウスでの ERGO/creatinine 比は control マウスよりも低かった (Fig. 4B)。

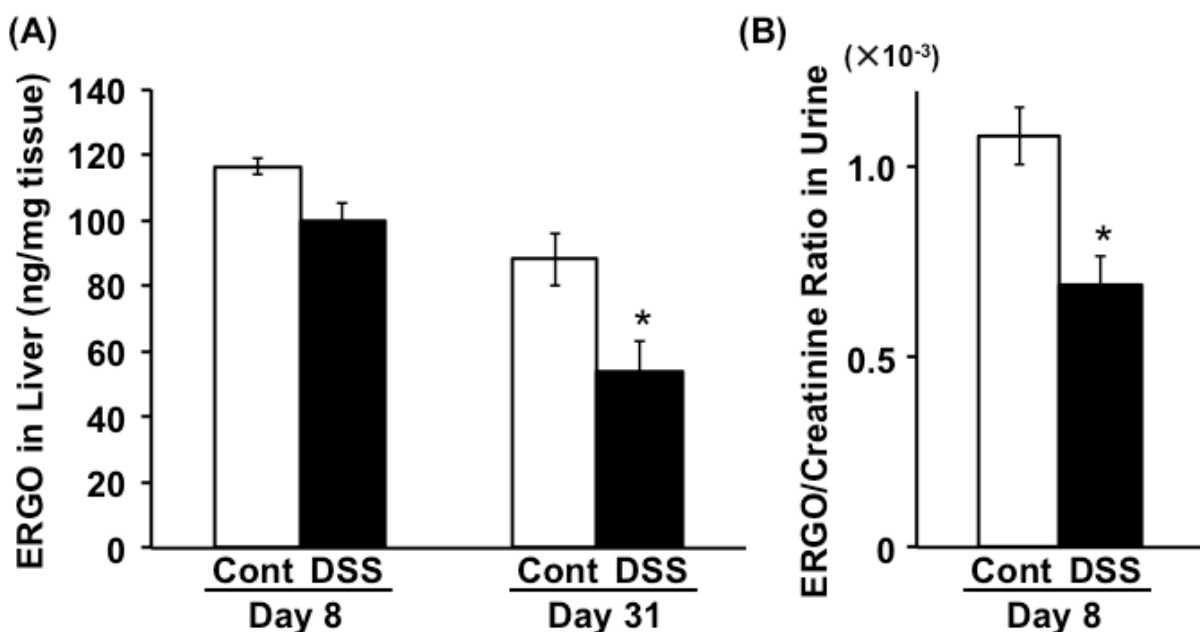


Fig. 4 ERGO concentration in liver (A) and urine (B) of DSS-induced colitis mice

(A) Food-derived ERGO was measured in liver of control (open bar) and DSS-treated wild-type mice (closed bar). Each value represents the mean \pm SEM (n=3-4). *, Significantly different from control group (p <0.05). (B) Urine was collected for 24 h at day 8, and ERGO concentration in the urine was measured and normalized by that of creatinine. Each value represents the mean \pm SEM (n=4). *, Significantly different from control group (p <0.05).

LPS 刺激後 THP-1 マクロファージ様細胞にのける OCTN1 の機能的な発現

炎症性マクロファージにおける OCTN1 の機能的な発現を調べるため、ヒト単球細胞株 THP-1 細胞を PMA によってマクロファージ様細胞に分化させ、さらに LPS によって刺激した。この細胞における OCTN1 の遺伝子発現は分化後さらには LPS 刺激後において上昇する傾向が見られた (Fig. 5A)。この時、ヒトマクロファージマーカーである CD11b や CD14 の遺伝子発現は、上昇した (Fig. 5A)。また、活性化マクロファージマーカーである TNF- α の発現は LPS 刺激によって増加した (Fig. 5A)。Western blot 解析では、これら細胞における OCTN1 および CD11b の発現が確認された (Fig. 5B)。さらに、LPS 刺激後の THP-1 マクロファージ様細胞において、時間依存的に [³H]ERGO の取り込みが見られた (Fig. 5C)。非標識 ERGO 濃度依存的に、この [³H]ERGO の取り込みの減少も見られた (Fig. 5D)。

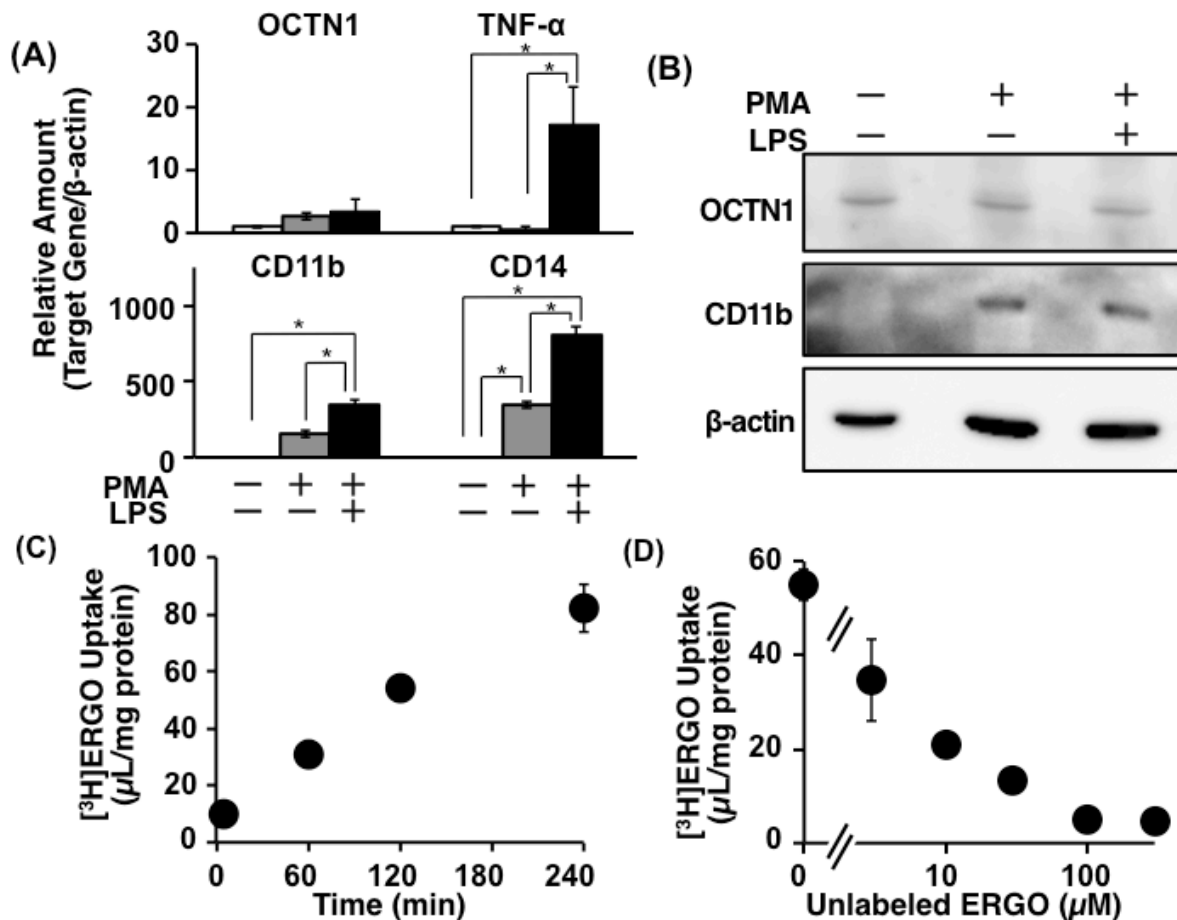


Fig. 5 Functional expression of OCTN1 in LPS-stimulated THP-1 macrophages

(A) Gene expression of OCTN1, TNF- α , CD11b and CD14 was measured in THP-1 monocytes (open bar), macrophage-like cells (closed gray bar) and LPS-activated macrophages cells (black bar) by real-time RT-PCR assay. Data were normalized by gene expression of 36B4, house keeping gene. Each value is the mean \pm SEM (n = 4-6). *, Significantly different between each cell (p < 0.05). (B) Expression of gene products of OCTN1, CD11b and β -actin in THP-1 monocytes, macrophage-like cells and LPS-activated macrophages was analyzed by western blotting. (C) Time course of [3 H]ERGO uptake by LPS-activated THP-1 cells. Uptake of [3 H]ERGO (1.3 μ M) was measured at pH 7.4, 37 $^{\circ}$ C. Each value is the mean \pm SEM (n = 3-6). (D) Concentration dependence of OCTN1-mediated uptake of ERGO by LPS-activated THP-1 cells. Uptake of [3 H]ERGO for 120 min was measured in the presence of various concentrations of unlabeled ERGO at pH 7.4, 37 $^{\circ}$ C. Each value is the mean \pm SEM (n = 3-8).

octn1 遺伝子欠損の DSS 誘発性大腸炎への影響

DSS 誘発性大腸炎における OCTN1 と ERGO の病態生理学的な役割への知見を得るため、野生型と *octn1*^{-/-} マウスにおいて DSS 誘発性大腸炎モデルを作製した。*octn1* 遺伝子欠損により、DSS 投与後の体重の減少が著しく悪化した (Fig. 6A)。DSS 投与による大腸の長さは、野生型に比べ *octn1*^{-/-} マウスの方がより短くなった (Fig. 6B)。大腸組織切片による組織化学的解析では、野生型よりも *octn1*^{-/-} マウスの方が Crypt 部分の上皮細胞が減少し、その一方で、浸潤した細胞が増加していた (Fig. 6C)。これらを炎症の重症度、炎症の範囲、Crypt 部分の損傷の 3 項目による組織化学的スコアで評価した結果、野生型よりも *octn1*^{-/-} マウスの方が高い値を示した (Fig. 6C)。さらに、免疫染色により粘膜固有層における F4/80 陽性細胞が、野生型に比べ *octn1*^{-/-} マウスにおいて多数検出された (Fig. 6E)。したがって、*octn1* 遺伝子欠損により、DSS 誘発性大腸炎が悪化した。

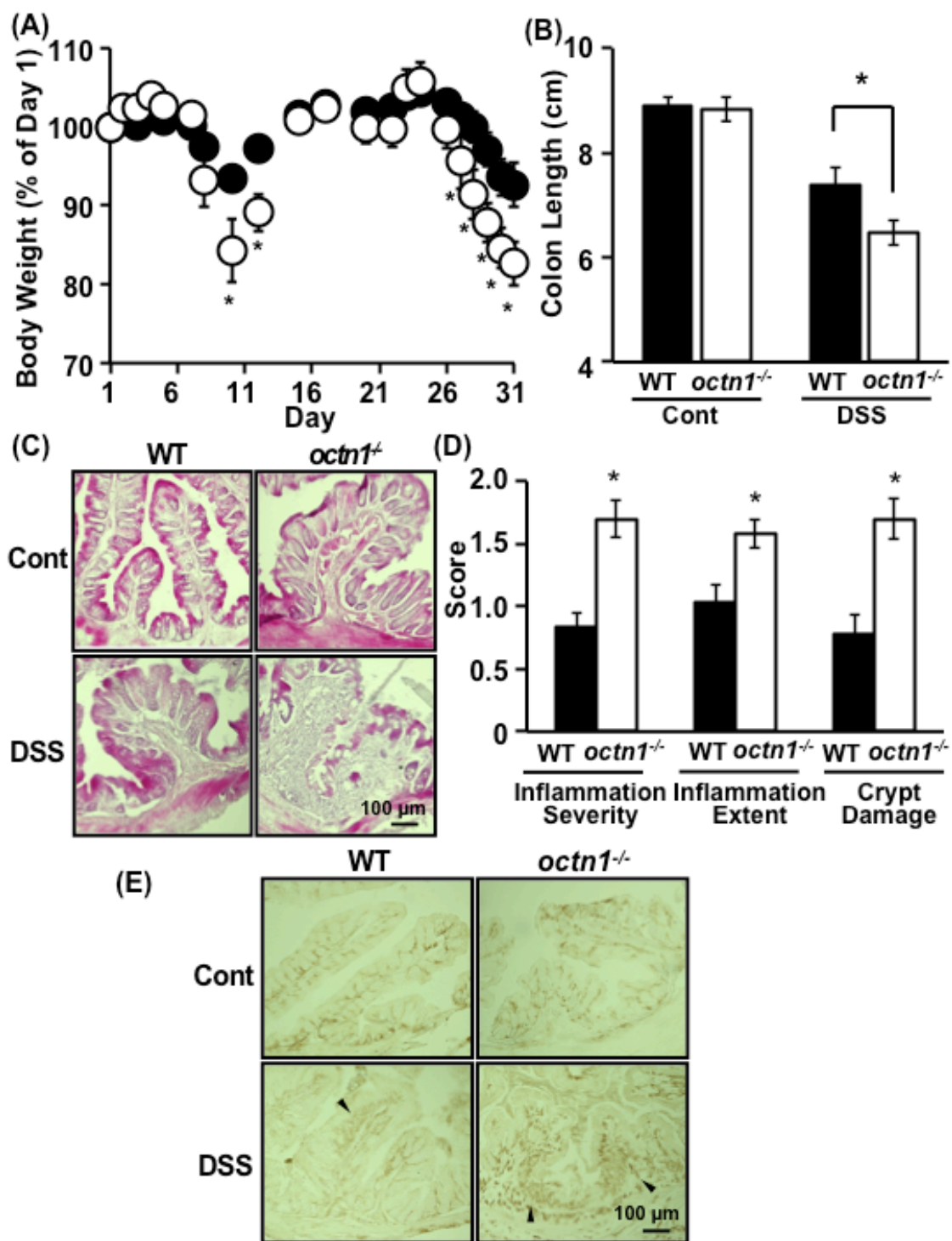


Fig. 6 Effect of deletion of *octn1* gene on DSS-induced colitis in mice

(A) Body weight of DSS-treated wild-type (closed circles) and *octn1*^{-/-} (open circles) mice was measured. Each value is the mean \pm SEM (n = 9-10). *, Significantly different from wild-type mice ($p < 0.05$). (B) Colon length was determined at day 31 in DSS-treated wild-type (black bars) and *octn1*^{-/-} (open bars) mice. Each value is the mean \pm SEM (n = 3-12). *, Significantly different from wild-type mice ($p < 0.05$). (C) H&E staining of colon tissue

sections of DSS-treated wild-type and *octn1*^{-/-} mice at day 31. Representative results from at least three individual mice in each group are shown. (D) Histological score in the colon was assessed at day 31. Each value is the mean \pm SEM (n = 5-6). Representative results from at least four regions in each mouse are shown. *, Significantly different from DSS-treated wild-type mice ($p < 0.05$). (E) Infiltration of macrophages in the colon at day 31 was assessed by immunostaining for F4/80. Immunoreactivity to anti-F4/80 antibody is indicated by arrowheads. Representative results from at least three individual mice in each group are shown.

第四章 考察

CD患者における血液中 ERGO 濃度は健常人や UC 患者よりもはるかに低く、このことは ERGO が CD のバイオマーカーになる可能性を示唆している (Kato et al., 2010)。しかしながら、血液中 ERGO 濃度の低下の病態生理学的な意義は解明されていない。ERGO は抗酸化物質であることから、炎症性疾患において抑制的な役割を果たしている可能性はある。そのため、本研究で見られた腸管上皮細胞の刷子縁上の OCTN1 の発現上昇 (Fig. 2) とそれに続く腸管組織中への ERGO の取り込み (Fig. 3A, 3B) は炎症を抑制するための体のフィードバックメカニズムであるかもしれない。一方で、Taubert らは、ERGO が腸管上皮細胞の増殖因子の一つであり、OCTN1 の SNP である L503F をもったヒトは ERGO の高い取り込みにより IBD のリスクが上昇することを示唆した (Taubert et al., 2005)。したがって、IBD における OCTN1 と ERGO の役割については、未だに議論を引き起こしたままである。本研究の結果は、それらの役割の可能性に新たな知見をもたらしている。すなわち、IBD 患者の炎症部位に循環血液から浸潤するマクロファージなどの腸管の免疫細胞に、ERGO が OCTN1 を介して取り込まれることである (Fig. 3, 5)。腸管の免疫細胞における OCTN1 の機能的発現については今回の研究結果により支持された。餌由来 ERGO が DSS 大腸炎モデルマウスの小腸と大腸から単離した LPMCs に存在しており (Fig.3C)、放射標識体 ERGO が単離小腸および大腸 LPMCs に取り込まれ、OCTN1 の発現が確認された (Fig. 3D, E)。さらに、THP-1 マクロファージ様細胞においても OCTN1 の発現 (Fig. 5A, B) と放射標識体 ERGO の取り込み (Fig. 5C, 5D) があることから、マクロファージにおいて OCTN1 が機能的に発現していることが支持された。また、これまでに Tokuhira らによって、ヒトにおいて CD4 や CD8 陽性細胞に比べ、単球やマクロファージのマーカーである CD14 陽性細胞に OCTN1 の mRNA 発現が高いことも報告されている (Tokuhira et al., 2003)。しかしながら、マクロファージにおける OCTN1 の機能的な発現に関する報告はこれまでになく、本研究が最初に証明した例となった。

本研究では、腸管固有層に浸潤した免疫細胞における炎症時特異的な ERGO の取り込みが、上皮細胞での消化管吸収後の ERGO の初回通過取り込みを行っている可能性を示した。このことが DSS 大腸炎モデルにおける血液中および血漿中濃度低下 (Fig. 1) に少なくとも一部寄与していることが考えられる。しかしながら、今回の結果では、CD 患者における血液中 ERGO 濃度の減少につながる他のメカニズムの可能性を排除することはできない。一つ目のメカニズムとして、ERGO の肝取り込みの変化が考えられる。これまでに当研究室では、ERGO が肝臓の非実質細胞に選択的に取り込まれること示している (Sugiura et al., 2010)。しかしながら、day 8 における DSS 投与マウスの肝臓中 ERGO 濃度は control マウスより低く (Fig. 4A)、肝取り込みの変化で

は DSS 大腸炎マウスの血中濃度低下 (Fig. 1) を説明することはできない。しかし、マウスにおける ERGO の肝取り込みは、肝血流速度に匹敵するほど大きいことから血流律速である。そのため、肝取り込みが著しく上昇した場合でも肝臓内濃度の変化は極めて小さく、DSS 大腸炎モデルにおける肝初回通過効果の変化を正確に推測することは難しいかもしれない。2つ目の可能性として、ERGO の尿細管再吸収もまた循環血液中 ERGO 濃度の維持に寄与していることから (Kato et al., 2010)、尿細管再吸収の変化が考えられる。しかしながら、ERGO の尿中排泄は DSS 投与マウスで減少しており (Fig. 4B)、この変化においても DSS 大腸炎マウスの血中濃度低下 (Fig. 1) を説明することはできない。最後のメカニズムは、ERGO の血球分配の変化である。当研究室の以前の報告で述べたように、ERGO は赤血球前駆細胞に発現する OCTN1 によって取り込まれるため、ERGO は赤血球への高い分布を示す (Kato et al., 2010)。IBD 患者や DSS 腸炎モデルではヘマトクリット値が低下することが知られているが (Voudoukis et al., 2013; Watts et al., 2014)、本研究で見られた DSS 投与マウスでの ERGO 濃度の減少は、血液と血漿の両方で同様の変化を示しており (Fig. 1)、腸管炎症時のヘマトクリット値の変化でも説明ができない。したがって、これら全てが、腸管における ERGO 体内動態の変化が血中 ERGO の減少につながっている可能性を支持しているかもしれない。

これまで ERGO は、生体内ではほとんど代謝されない化合物であるとされてきた。しかし、本研究において、抗酸化物質である ERGO が活性酸素種の過酸化水素と反応し、ERGO 代謝物と推測される物質に変化することを見出した。さらに、この物質は野生型の DSS 誘発性大腸炎マウスから単離した LPMCs でのみ検出され、control マウスや DSS を投与した *octn1*^{-/-}マウスの LPMCs では検出されなかった (Table 1)。これらの結果は、腸管固有層に浸潤した免疫細胞が ERGO の代謝に関与していることを示唆している。これは、*in vivo* で炎症時に ERGO が代謝されることを初めて示した例であり、CD 患者の血液中 ERGO が低下する要因の一つであるかもしれない。しかしながら、本研究の解析だけでは ERGO 代謝物を同定することはできない。今後、この ERGO 代謝物の単離・精製を行い、NMR や精密分子量の測定を実施することが不可欠である。また、ERGO は体内で合成されず食餌を介して体内に取り込まれる物質であるため、バイオマーカーとして用いるには食餌の摂取量の影響が問題となり得る。しかしながら、以前に報告した IBD 患者と健常人の血中濃度 (Kato et al., 2010) や本研究の DSS 誘発性大腸炎モデルの血中濃度 (Fig. 1) においては明確な食餌の影響は見られていない。その一方で、炎症時特異的な ERGO 代謝物が存在すれば、代謝物と ERGO の比を調べることで、食餌の影響を考慮する必要もなく、より炎症性疾患特異的なバイオマーカーになる可能性も考えられる。今後は、DSS 誘発性大腸炎モデルのみならず、CD や UC 患者の血液中代謝物についても調べる必要がある。

本研究では、腸管の炎症における OCTN1 と ERGO の役割に対し、新たな知見をもたらした。DSS 誘発性大腸炎における炎症の重症度は、野生型マウスに比べ *octn1*^{-/-} マウスの方が高かった (Fig. 6)。この結果は、OCTN1 が炎症を抑制する役割を果たしていることを示唆している。*octn1*^{-/-} マウスでは、血液および全ての臓器において ERGO 濃度が検出限界以下である (Kato et al., 2010)。今回の研究においても、野生型マウスより単離した LPMCs では ERGO が蓄積しているのに対し、*octn1*^{-/-} マウス由来 LPMCs では検出されなかった (Fig. 3C)。そのため、OCTN1 は ERGO を取り込むことで腸管炎症に対し抑制効果を発揮している可能性が考えられる。腸内細菌叢やその代謝物に対する免疫細胞の機能不全や異常な反応が IBD の病態に関与していると考えられており、抗酸化物質である ERGO が炎症性マクロファージの活性化を抑制しているかもしれない。しかしながら、ヒトにおける CD 感受性関連 SNP である OCTN1 のエクソンに位置する L503F は、tetraethylammonium や ERGO のような物質に対しては取り込み活性が上昇する一方で、carnitine のような生理学的化合物に対する取り込み活性は低下する (Peltekova et al., 2004; Taubert et al., 2005)。Peltekova らは、putrescine などのバクテリア異化によって生じる潜在的毒性が CD 感受性に関連する可能性があり、OCTN1 が腸管炎症を悪化させる作用を行っているかもしれないことを示唆している (Peltekova et al., 2004)。ヒトとマウスでは食餌や腸内細菌のような環境因子に大きな違いがある可能性があるため、OCTN1 と ERGO の IBD における正確な役割を明らかにするには、さらなる基礎研究や臨床研究が必要である。

OCTN1 は様々な治療薬だけでなく、内因性や食餌由来の化合物も基質として認識する (Yabuuchi et al., 1999; Grundemman et al., 2005; Grigat et al., 2007; Urban et al., 2008; Nakamura et al., 2010; Jong et al., 2011; Nakamichi et al., 2013)。しかしながら、OCTN1 の生理学的な役割は、未だにほとんど解明されていない。当研究室で作製し *octn1*^{-/-} マウスは、通常の生育・繁殖下においては、野生型マウスと比較した phenotype の違いは観察されなかったため、OCTN1 の生理学的な役割を理解することは難しい。一方で、DSS 投与により小腸上皮細胞の刷子縁膜上の OCTN1 の発現が上昇することが本研究で示された。さらに、ERGO は DSS 大腸炎マウスの LPMCs のみに検出されており (Fig. 3C)、OCTN1 が DSS 投与後の LPMCs においてもアップレギュレーションされていることが示唆された。*octn1* 遺伝子欠損は実際に DSS 誘発性大腸炎の炎症を悪化させており (Fig. 6)、この結果は以前に虚血再灌流による腸管炎症に対して *octn1*^{-/-} マウスの感受性が高いことも対応している (Kato et al., 2010)。これらの結果は、多特異的なトランスポーターである OCTN1 が腸管炎症を抑制させる生理学的な役割を持つことを示唆している。最近、Chen らの研究グループが、別の SLC22A トランスポーターファミリーである OCT1/SLC22A1 が thiamine を内因性基質として認識し、エネルギー代謝を調整することで肝臓脂肪症において重要な役割を果たしてい

ることを報告している (Chen et al., 2014)。したがって、異物トランスポーターの病態生理学的な役割の解明が様々な疾患の治療や診断の新たなターゲットを明らかにするかもしれない。

第五章 結論

本研究により、OCTN1 が活性化マクロファージに機能的に発現し、腸管炎症時に腸管粘膜固有層に浸潤する免疫細胞に ERGO が取り込まれることが明らかになった。さらには、これら免疫細胞に取り込まれた ERGO が代謝される可能性も示唆された。これらメカニズムが DSS 誘発性大腸炎モデルマウスにおける血液中および血漿中 ERGO 濃度低下に少なくとも一部寄与していることが考えられる。今後、CD 患者における ERGO の血中濃度低下にも同様のメカニズムが関与するかは患者サンプルを用いた更なる研究が必要である。また、本研究は、腸管炎症時において経口摂取された生体異物の体内動態変動に新たな知見をもたらしたかもしれない。

引用文献

- Ahmad T, Tamboli CP, Jewell D, Colombel JF. Clinical relevance of advances in genetics and pharmacogenetics of IBD. *Gastroenterology*. 126: 1533-1549. (2004).
- Alex P, Zachos NC, Nguyen T, Gonzales L, Chen TE, Conklin LS, Centola M, Li X. Distinct cytokine patterns identified from multiplex profiles of murine DSS and TNBS-induced colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 15: 341-352. (2009).
- Bene J, Magyari L, Talián G, Komlósi K, Gasztonyi B, Tari B, Várkonyi A, Mózsik G, Melegh B. Prevalence of SLC22A4, SLC22A5 and CARD15 gene mutations in Hungarian pediatric patients with Crohn's disease. *World J Gastroenterol*. 12: 5550-5553 (2006).
- Chen LG, Shu Y, Liang XM, Chen EC, Yee SW, Zur AA, Li S, Xu L, Keshari KR, Lin MJ, Chien HC, Zhang Y, Morrissey KM, Liu J, Ostrem J, Younger NS, Kurhanewicz J, Shokat KM, Ashrafi K, Giacomini KM. OCT1 is a high-capacity thiamine transporter that regulates hepatic steatosis and is a target of metformin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 111: 9983-9988. (2014).
- Cucchiara S, Latiano A, Palmieri O, Staiano AM, D'Inca R, Guariso G, Vieni G, Rutigliano V, Borrelli O, Valvano MR, Annese V. Role of CARD15, DLG5 and OCTN genes polymorphisms in children with inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol*. 13:1221-1229. (2007).
- Feng Y, Zheng P, Zhao H, Wu K. SLC22A4 and SLC22A5 gene polymorphisms and Crohn's disease in the Chinese Han population. *J Dig Dis*. 10: 181-187. (2009).
- Fisher SA, Hampe J, Onnie CM, Daly MJ, Curley C, Purcell S, Sanderson J, Mansfield J, Annese V, Forbes A, Lewis CM, Schreiber S, Rioux JD, Mathew CG. Direct or indirect association in a complex disease: the role of SLC22A4 and SLC22A5 functional variants in Crohn disease. *Hum Mutat*. 27: 778-785. (2006).
- Grigat S, Harlfinger S, Pal S, Striebinger R, Golz S, Geerts A, Lazar A, Schömig E, Gründemann D. Probing the substrate specificity of the ergothioneine transporter with methimazole, hercynine, and organic cations. *Biochem Pharmacol*. 7: 309-16. (2007).
- Grimm MC, Pullman WE, Bennett GM, Sullivan PJ, Pavli P, Doe WFJ. Direct evidence of monocyte recruitment to inflammatory bowel disease mucosa. *Gastroenterol Hepatol*. 10: 387-395. (1995)
- Gründemann D, Harlfinger S, Golz S, Geerts A, Lazar A, Berkels R, Jung N, Rubbert A, Schömig E. Discovery of the ergothioneine transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102: 5256-5261. (2005).
- Ishimoto T, Nakamichi N, Hosotani H, Masuo Y, Sugiura T, Kato Y. Organic cation

- transporter-mediated ergothioneine uptake in mouse neural progenitor cells suppresses proliferation and promotes differentiation into neurons. *PLoS One*, 9: e89434 (2014).
- Jong NN, Nakanishi T, Liu JJ, Tamai I, McKeage MJ. Oxaliplatin transport mediated by organic cation/carnitine transporters OCTN1 and OCTN2 in overexpressing human embryonic kidney 293 cells and rat dorsal root ganglion neurons. *J Pharmacol Exp Ther*. 338: 537-547. (2011).
- Kato Y, Kubo Y, Iwata D, Kato S, Sudo T, Sugiura T, Kagaya T, Wakayama T, Hirayama A, Sugimoto M, Sugihara K, Kaneko S, Soga T, Asano M, Tomita M, Matsui T, Wada M, Tsuji A. Gene knockout and metabolome analysis of carnitine/organic cation transporter OCTN1. *Pharm Res*. 27: 832-840. (2010).
- Kobayashi D, Aizawa S, Maeda T, Tsuboi I, Yabuuchi H, Nezu J, Tsuji A, Tamai I. Expression of organic cation transporter OCTN1 in hematopoietic cells during erythroid differentiation. *Exp Hematol*. 32:1156–1162. (2004).
- Lakner L, Csöngéi V, Sarlós P, Járomi L, Sáfrány E, Varga M, Orosz P, Magyar L, Bene J, Miheller P, Tulassay Z, Melegh B. IGR2096a_1 T and IGR2198a_1 C alleles on IBD5 locus of chromosome 5q31 region confer risk for Crohn's disease in Hungarian patients. *Int J Colorectal Dis*. 24: 503-507. (2009).
- Nakakariya M, Shimada T, Irokawa M, Maeda T, Tamai I. Identification and species similarity of OATP transporters responsible for hepatic uptake of beta-lactam antibiotics. *Drug Metab Pharmacokinet*. 23:347-55. (2008).
- Nakamichi N, Shima H, Asano S, Ishimoto T, Sugiura T, Matsubara K, Kusuhara H, Sugiyama Y, Sai Y, Miyamoto K, Tsuji A, Kato Y. Involvement of carnitine/organic cation transporter OCTN1/SLC22A4 in gastrointestinal absorption of metformin. *J Pharm Sci*. 102: 3407-3417. (2013).
- Nakamura T, Nakanishi T, Haruta T, Shirasaka Y, Keogh, JP, Tamai I. Transport of ipratropium, an anti-chronic obstructive pulmonary diseasedrug, is mediated by organic cation/carnitine transporters in human bronchial epithelial cells: implications for carrier-mediated pulmonary absorption. *Mol Pharm*. 7, 187-195. (2010).
- Peltekova VD, Wintle RF, Rubin LA, Amos CI, Huang Q, Gu X, Newman B, Van Oene M, Cescon D, Greenberg G, Griffiths AM, St George-Hyslop PH, Siminovitch KA. Functional variants of OCTN cation transporter genes are associated with Crohn disease. *Nat Genet*. 36: 471–475. (2004).
- Pochini L, Scalise M, Galluccio M, Pani G, Siminovitch KA, Indiveri C. The human OCTN1 (SLC22A4) reconstituted in liposomes catalyzes acetylcholine transport which is defective

- in the mutant L503F associated to the Crohn's disease. *Biochim Biophys Acta*. 1818: 559-565. (2012).
- Poritz LS, Garver KI, Green C, Fitzpatrick L, Ruggiero F, Koltun WA. Loss of the tight junction protein ZO-1 in dextran sulfate sodium induced colitis. *J Surg Res*. 140: 12-19. (2007).
- Rioux JD, Daly MJ, Silverberg MS, Lindblad K, Steinhart H, Cohen Z, Delmonte T, Kocher K, Miller K, Guschwan S, Kulbokas EJ, O'Leary S, Winchester E, Dewar K, Green T, Stone V, Chow C, Cohen A, Langelier D, Lapointe G, Gaudet D, Faith J, Branco N, Bull SB, McLeod RS, Griffiths AM, Bitton A, Greenberg GR, Lander ES, Siminovitch KA, Hudson TJ. Genetic variation in the 5q31 cytokine gene cluster confers susceptibility to Crohn disease. *Nat. Genet*. 29: 223–228. (2001).
- Shimizu T, Sugiura T, Wakayama T, Kijima A, Nakamichi N, Iseki S, Silver DL, Kato Y. PDZK1 regulates breast cancer resistance protein in small intestine. *Drug Metab Dispos*. 39: 2148-2154. (2011).
- Steinbach EC, Plevy SE. The role of macrophages and dendritic cells in the initiation of inflammation in IBD. *Inflamm Bowel Dis*. 20: 166-175. (2014).
- Sugiura T, Kato Y, Kubo Y, Tsuji, A. Mutation in an adaptor protein PDZK1 affects transport activity of organic cation transporter OCTNs and oligopeptide transporter PEPT2. *Drug Metab Pharmacokinet*. 21: 375-383. (2006).
- Sugiura T, Kato S, Shimizu T, Wakayama T, Nakamichi N, Kubo Y, Iwata D, Suzuki K, Soga T, Asano M, Iseki S, Tamai I, Tsuji A, Kato Y. Functional expression of carnitine/organic cation transporter OCTN1/SLC22A4 in mouse small intestine and liver. *Drug Metab Dispos*. 38: 1665-1672. (2010).
- Sugiura T, Otake T, Shimizu T, Wakayama T, Silver DL, Utsumi R, Nishimura T, Iseki S, Nakamichi N, Kubo Y, Tsuji A, Kato Y. PDZK1 regulates organic anion transporting polypeptide Oatp1a in mouse small intestine. *Drug Metab Pharmacokinet*. 25: 588-598. (2010).
- Tamai I, Nakanishi T, Kobayashi D, China K, Kosugi Y, Nezu J, Sai Y, Tsuji A. Involvement of OCTN1 (SLC22A4) in pH-dependent transport of organic cations. *Mol Pharm*. 1: 57-66. (2004).
- Taubert D, Grimberg G, Jung N, Rubbert A, Schömig E. Functional role of the 503F variant of the organic cation transporter OCTN1 in Crohn's disease. *Gut*. 54: 1505-1506. (2005).
- Taubert D, Jung N, Goeser T, Schömig E. Increased ergothioneine tissue concentrations in carriers of the Crohn's disease risk-associated 503F variant of the organic cation transporter OCTN1. *Gut* 58: 312-314. (2009).

- Taubert D, Lazar A, Grimberg G, Jung N, Rubbert A, Delank KS, Perniok A, Erdmann E, Schömig E. Association of rheumatoid arthritis with ergothioneine levels in red blood cells: a case control study. *J Rheumatol*. 33: 2139-2145. (2006).
- Tokuhiro S, Yamada R, Chang X, Suzuki A, Kochi Y, Sawada T, Suzuki M, Nagasaki M, Ohtsuki M, Ono M, Furukawa H, Nagashima M, Yoshino S, Mabuchi A, Sekine A, Saito S, Takahashi A, Tsunoda T, Nakamura Y, Yamamoto K. An intronic SNP in a RUNX1 binding site of SLC22A4, encoding an organic cation transporter, is associated with rheumatoid arthritis. *Nat Genet*. 35: 341-348. (2003).
- Ueno F, Matsui T, Matsumoto T, Matsuoka K, Watanabe M, Hibi T; Guidelines Project Group of the Research Group of Intractable Inflammatory Bowel Disease subsidized by the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan and the Guidelines Committee of the Japanese Society of Gastroenterology. Evidence-based clinical practice guidelines for Crohn's disease, integrated with formal consensus of experts in Japan. *J Gastroenterol*. 48: 31-72. (2013).
- Urban TJ, Brown C, Castro RA, Shah N, Mercer R, Huang Y, Brett CM, Burchard EG, Giacomini KM. Effects of genetic variation in the novel organic cation transporter, OCTN1, on the renal clearance of gabapentin. *Clin Pharmacol Ther*. 83: 416-421. (2008).
- Voudoukis E, Karmiris K, Oustamanolakis P, Theodoropoulou A, Sfiridaki A, Paspatis GA, Koutroubakis IE. Association between thrombocytosis and iron deficiency anemia in inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 25: 1212-1216. (2013).
- Watts MN, Harris NR. Anemia and retinal function in a mouse model of acute colitis. *Pathophysiology*. 21: 301-308. (2014).
- Weigmann B, Tubbe I, Seidel D, Nicolaev A, Becker C, Neurath MF. Isolation and subsequent analysis of murine lamina propria mononuclear cells from colonic tissue. *Nat. Protoc.*, 2: 2307-2311. (2007).
- Williams KL, Fuller CR, Dieleman LA, DaCosta CM, Haldeman KM, Sartor RB, Lund PK. Enhanced survival and mucosal repair after dextran sodium sulfate-induced colitis in transgenic mice that overexpress growth hormone. *Gastroenterology*, 120: 925-937, (2001).
- Wirtz S, Neurath MF. Mouse models of inflammatory bowel disease. *Adv Drug Deliv Rev*. 59: 1073-1083. (2007).
- Xuan C, Zhang BB, Yang T, Deng KF, Li M, Tian RJ. Association between OCTN1/2 gene polymorphisms (1672C-T, 207G-C) and susceptibility of Crohn's disease: a meta-analysis. *Int J Colorectal Dis*. 27: 11-19. (2012).
- Yabuuchi H, Tamai I, Nezu J, Sakamoto K, Oku A, Shimane M, Sai Y, Tsuji A. Novel membrane transporter OCTN1 mediates multispecific, bidirectional, and pH-dependent

transport of organic cations. *J Pharmacol Exp Ther.* 289: 768-773. (1999).

Yamazaki K, Takazoe M, Tanaka T, Ichimori T, Saito S, Iida A, Onouchi Y, Hata A, Nakamura Y. Association analysis of SLC22A4, SLC22A5 and DLG5 in Japanese patients with Crohn disease. *J Hum Genet.* 49: 664–668. (2004).

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始御懇篤なるご指導ならびに御鞭撻を賜りました金沢大学医薬保健研究域（薬学系）加藤 将夫 教授に謹んで謝意を表します。

また、本研究に関して、御指導と御助言ならびに御協力戴きました金沢大学医薬保健研究域（薬学系）分子薬物治療学研究室 中道 範隆 准教授に厚く感謝の意を表します。

さらに、本研究に関して、種々の有益な御指導と御助言を戴きました金沢大学医薬保健研究域（薬学系）分子薬物治療学研究室 増尾 友佑 助教に深く感謝の意を表します。

本研究に関して、ERGO 代謝物に関して有益な御指導と御助言を戴きました金沢大学医薬保健研究域（薬学系）機能性分子設計学 松尾 淳一 教授に厚く感謝致します。

また、本研究の遂行に積極的にご協力頂きました高橋 早紀氏に御礼申し上げるとともに、日々の研究生活において、有益な討論を行って頂きました分子薬物治療学研究室の諸氏に感謝致します。さらに、研究を滞りなく遂行できるよう御協力頂いた石田 利佳技術員に感謝致します。

そして、本研究に関わる実験の遂行のために用いた数多くの動物たちに深く感謝するとともに、御冥福をお祈り致します。

最後に、有意義な学生生活を送る上で経済的、精神的に支えて戴いた両親に深く感謝致します。

参考論文

主論文

1. **Shimizu T**, Masuo Y, Takahashi S, Nakamichi N, Kato Y. Organic Cation Transporter Octn1-mediated Uptake of Food-derived Antioxidant Ergothioneine into Infiltrating Macrophages during Intestinal Inflammation in Mice. *Drug Metab Pahrmacokinet. in press.*

副論文

1. Sugiura T, Kato S, **Shimizu T**, Wakayama T, Nakamichi N, Kubo Y, Iwata D, Suzuki K, Soga T, Asano M, Iseki S, Tamai I, Tsuji A, Kato Y.
Functional expression of carnitine/organic cation transporter OCTN1/SLC22A4 in mouse small intestine and liver.
Drug Metab Dispos. 38: 1665-1672. (2010).
2. Sugiura T, Otake T, **Shimizu T**, Wakaama T, Silver DL, Utsumi R, Nishimura T, Iseki S, Nakamichi N, Kubo Y, Tsuji A, Kato Y.
PDZK1 regulates organic anion transporting polypeptide Oatp1a in mouse small intestine.
Drug Metab Pharmacokinet. 25: 588-598. (2010).
3. **Shimizu T**, Sugiura T, Wakayama T, Kijima A, Nakamichi N, Iseki S, Silver DL, Kato Y.
PDZK1 regulates breast cancer resistance protein in small intestine.
Drug Metab Dispos. 39: 2148-2154. (2011).