

氏名 (生年月日)	ありあ あはめつど へるみー ふおあど Aliaa Ahmed Helmy Fouad (1992年11月29日)
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	博薬第209号
学位授与の日付	2021年9月30日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Study on the protective effects of TRPM8 against indomethacin-induced small intestinal injury in mice via the release of calcitonin gene-related peptide (インドメタシン誘起マウス小腸傷害に対する TRPM8 のカルシトニン遺伝子関連ペプチド遊離を介した保護的役割に関する研究)
論文審査委員	(主査) 教授 加藤 伸一 (副査) 教授 長澤 一樹 (副査) 教授 田中 智之

論文内容の要旨

Introduction

Transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8) is a member of the transient receptor potential (TRP) channel family. This channel is expressed in sensory neurons, including those in the somatic and visceral sensory nervous systems. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are prescribed for their antipyretic, analgesic, and anti-inflammatory properties; however, they seriously damage the stomach and small intestine. More than 50% of patients using NSAIDs have been reported to experience intestinal mucosal damage. Additionally, in terms of pathophysiological similarity, indomethacin-induced small intestinal injury in rodents may serve as a useful animal model for assessing NSAID-induced enteropathy as well as intestinal inflammation in Crohn's disease. In the gastrointestinal tract, TRP channels expressed in extrinsic sensory neurons are thought to modulate inflammatory responses. This modulation involves the release of neuropeptides, such as calcitonin gene-related peptide (CGRP) and substance P (SP), from the sensory neurons after the activation of TRP channels. In the current study, the role of TRPM8 in the pathogenesis of indomethacin-induced intestinal injury was investigated. Furthermore, the expression of TRPM8 in the small intestine and the role of neuropeptides, such as CGRP and SP, in the pathogenesis of indomethacin-induced intestinal injury were characterized using immunohistochemical analyses.

Chapter I: Role of TRPM8 in the pathogenesis of indomethacin-induced small intestinal injury

In this chapter, the role of TRPM8 in indomethacin-induced small intestinal injury was investigated using TRPM8-deficient (TRPM8KO) mice and a specific TRPM8 agonist WS-12. The animals were fasted for 18 h, subsequently provided with free access to food for 1 h, and then subcutaneously injected with a single dose of indomethacin (8 mg/kg). Indomethacin administration caused severe hemorrhagic injury in the small intestine of C57BL/6 wild-type (WT) mice after 48 h. The total area of macroscopic injury and severity of histological injury

were significantly higher in TRPM8KO mice than in WT mice. Indomethacin administration increased intestinal myeloperoxidase (MPO) activity, an index of neutrophil infiltration, and the expression of interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α at the mRNA level in WT mice. The increase in MPO activity was further enhanced in TRPM8KO mice, while further enhancement of inflammatory cytokine expression was not detected in TRPM8KO mice. In a subsequent experiment, the effect of WS-12 on indomethacin-induced intestinal injury was examined. Repeated intraperitoneal administration of WS-12 (3 and 10 mg/kg) reduced the severity of indomethacin-induced intestinal injury, and this reduction was significant at a dose of 10 mg/kg. Moreover, indomethacin-induced histological intestinal injury and intestinal MPO activity upregulation in WT mice were significantly attenuated following WS-12 treatment. In contrast, the protective effects of WS-12 against indomethacin-induced intestinal injury and MPO activity upregulation were completely abrogated in TRPM8KO mice, and no significant difference was observed with respect to the severity of intestinal lesions and MPO activity in TRPM8KO mice between the control and WS-12-treated groups. These findings strongly suggest that TRPM8 exerts protective effects against indomethacin-induced small intestinal injury.

Chapter II: Characterization of TRPM8 immunoreactivity in the small intestine based on the role of CGRP and SP in the pathogenesis of indomethacin-induced intestinal injury

In this chapter, TRPM8-enhanced green fluorescent protein (EGFP) transgenic mice, which express EGFP under the control of the TRPM8 promoter, were used because a specific anti-mouse TRPM8 antibody was not available for performing the immunohistochemical analyses. TRPM8-EGFP signaling in the small intestine was significantly upregulated following indomethacin administration. TRPM8 was highly co-localized with CGRP-immunopositive neurons and partially with SP-immunopositive neurons in the small intestine. Co-localization of TRPM8 with CGRP and SP in the dorsal root ganglia (DRG) was also observed. TRPM8 was expressed in CGRP- and SP-positive primary afferent neurons originating from the DRG. Indomethacin administration significantly increased the immunoreactivity and expression of CGRP in WT mice, but these responses were completely abrogated in TRPM8KO mice. In contrast, the immunoreactivity of SP in the intestinal mucosa was significantly upregulated following indomethacin administration in both the WT and TRPM8KO mice, with the expression of SP in WT and TRPM8KO mice being almost comparable. These findings suggest that TRPM8 contributes to the production of CGRP in injured intestinal mucosa and exert a protective effect against indomethacin-induced small intestinal injury. In contrast, SP expressed in sensory neurons, independent of TRPM8 expression, may play a role in the progression of small intestinal injury.

Conclusion

The current study demonstrated the protective and anti-inflammatory effects exerted by TRPM8 expressed in sensory afferent neurons against indomethacin-induced intestinal injury by using TRPM8KO mice, a specific TRPM8 agonist, and immunohistochemical analyses. It was hypothesized that the protective effect of TRPM8 may be mediated by the upregulation of CGRP expression rather than that of SP. In contrast, SP expressed in sensory neurons, independent of TRPM8, may play a role in the progression of small intestinal injury. Therefore, TRPM8 is a potential target for the treatment of NSAID-induced enteropathy and inflammatory bowel diseases.

審査の結果の要旨

《緒言》

Transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8) は 25~28°C の冷刺激やメントールなどにより活性化される非選択的陽イオンチャネルであり、知覚神経などに発現していることが知られている。非ステロイド性抗炎症薬 (NSAID) は、臨床で最も繁用される薬剤の 1 つであるが、胃および小腸に傷害を惹起することが報告されている。消化管において、知覚神経に発現する TRP チャネルは、カルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) やサブスタンス P (SP) などの神経ペプチドの遊離を介して、消化管炎症の制御に関与することが報告されている。

本研究では、代表的な NSAID の 1 つであるインドメタシンにより誘起される小腸傷害の病態における TRPM8 の役割について、特に CGRP および SP との関連を中心に検討した。

《審査結果の要旨》

第 1 章：インドメタシン誘起小腸傷害の病態における TRPM8 の役割

インドメタシン誘起マウス小腸傷害における TRPM8 の役割について、TRPM8 遺伝子欠損 (TRPM8KO) マウスおよび特異的 TRPM8 作動薬である WS-12 を用いて検討した。インドメタシン (8 mg/kg) の投与は、48 時間後には回腸を中心に重篤な出血性傷害を惹起した。この小腸傷害の程度は、野生型 (WT) と比較して TRPM8KO マウスでは顕著に増悪した。インドメタシンの投与は小腸粘膜ミエロペルオキシダーゼ (MPO) 活性の増大を誘起したが、この増大もまた WT マウスと比較して TRPM8KO マウスではより顕著に認められた。一方、TRPM8 特異的作動薬である WS-12 (3-10 mg/kg) の投与は、WT マウスにおけるインドメタシン誘起小腸傷害および MPO 活性の上昇を用量依存的かつ 10 mg/kg の用量で有意に抑制した。WS-12 による小腸傷害抑制効果は、TRPM8KO マウスではほぼ完全に消失した。以上の結果より、TRPM8 は、インドメタシン誘起小腸傷害の病態に対して保護的に機能していることが判明した。

第 2 章：TRPM8 を介したインドメタシン誘起小腸傷害に対する保護作用における CGRP および SP の役割

TRPM8 を介したインドメタシン誘起小腸傷害に対する保護作用における CGRP および SP の役割を明らかにするため、TRPM8KO マウスおよび TRPM-EGFP 強制発現マウスを用いて主に免疫組織学的手法により検討した。TRPM8-EGFP 強制発現マウスの小腸粘膜において、EGFP 発現は CGRP 陽性神経に高度に共局在し、また SP 陽性神経にも一部共局在していた。小腸粘膜における TRPM8-EGFP 発現および TRPM8 タンパク質発現は、インドメタシンの投与により顕著に増大した。また、WT マウスのインドメタシン誘起小腸傷害局所においては、CGRP および SP 陽性神経の増大が観察された。これに対して、TRPM8KO マウスでは、傷害局所における CGRP 陽性神経の増大は有意に抑制されたが、SP 陽性神経の増大は何ら影響を受けなかった。さらに、WT マウスの小腸傷害局所では神経栄養因子である Nerve growth factor (NGF) 発現の増大が観察され、この増大は TRPM8KO マウスでは有意に抑制された。以上の結果より、TRPM8 は NGF シグナルを介して CGRP 発現を増大させることで、インドメタシン誘起小腸傷害に対して保護的に機能していることが判明した。

《結論》

本研究において、インドメタシン誘起小腸傷害の病態における TRPM8 の保護的役割を明らかにした。TRPM8 による小腸傷害に対する保護作用は、CGRP の増大を介しており、一方 SP は TRPM8 非

依存的に傷害の進展・増悪に寄与しているものと推察される。ゆえに、本研究は、知覚神経に発現する TRP チャンネルを介した消化管炎症の制御機構の一旦を明らかにしたものであり、病態学的および臨床的にも興味ある知見であると考えられる。

学位論文とその基礎となる報文の内容を審査した結果、本論文は博士（薬学）の学位論文としての価値を有するものと判断する。