

炎症性腸疾患の病態におけるセロトニン/5-HT<sub>3</sub> 受容体  
およびサブスタンス P/NK1 受容体の役割の解明

2017 年

内海大知

本論文は、以下の報告内容を総括したものである。

1. 5-HT<sub>3</sub> receptors promote colonic inflammation via activation of substance P/neurokinin-1 receptors in dextran sulphate sodium-induced murine colitis. Daichi Utsumi, Kenjiro Matsumoto, Kikuko Amagase, Syunji Horie, Shinichi Kato. *Br. J. Pharmacol.* **2016**, 173, 1835-1849.

## 目次

序論 .....	1
第1章 デキストラン硫酸ナトリウム（DSS）誘起マウス大腸炎の病態における 5-HT <sub>3</sub> 受容 体拮抗薬の効果 .....	4
第1節 緒言 .....	4
第2節 実験材料および方法 .....	5
1. 実験動物 .....	5
2. 使用薬物 .....	5
3. デキストラン硫酸ナトリウム（DSS）誘起大腸炎モデルマウス .....	5
4. Disease activity index（DAI）スコアの評価 .....	5
5. Myeloperoxidase（MPO）活性の測定 .....	6
6. 各種サイトカイン mRNA 発現の定量 .....	6
7. 蛍光免疫組織染色 .....	7
8. 統計学的解析 .....	8
第3節 結果 .....	10
1. 5-HT <sub>3</sub> 受容体拮抗薬の投与による DSS 誘起大腸炎の抑制効果 .....	10
2. DSS 誘起大腸炎の病態における iNOS、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ および IL-17 mRNA の経日的 な発現変化 .....	14
3. 炎症性サイトカイン mRNA 発現増大に対する 5-HT <sub>3</sub> 受容体拮抗薬の効果 .....	15
4. 大腸炎粘膜における 5-HT 免疫陽性細胞の経日的な変化 .....	17
5. 大腸炎粘膜における 5-HT <sub>3</sub> 受容体の発現および発現同定 .....	18
第4節 考察 .....	23
第5節 小括 .....	26

第2章	デキストラン硫酸ナトリウム（DSS）誘起マウス大腸炎の病態における NK1 受容体拮抗薬の効果 .....	27
第1節	緒言 .....	27
第2節	実験材料および方法 .....	27
1.	実験動物 .....	27
2.	使用薬物 .....	27
3.	デキストラン硫酸ナトリウム（DSS）誘起大腸炎モデルマウス .....	27
4.	Disease activity index（DAI）スコアの評価 .....	27
5.	Myeloperoxidase（MPO）活性の測定 .....	27
6.	各種サイトカイン mRNA 発現の定量 .....	27
7.	蛍光免疫組織染色 .....	27
8.	大腸組織中のサブスタンス P 測定 .....	29
9.	統計学的解析 .....	29
第3節	結果 .....	30
1.	NK1 受容体拮抗薬の投与による DSS 誘起大腸炎の抑制効果 .....	30
2.	DSS 処置による SP 免疫陽性神経および 5-HT 免疫陽性細胞の発現増大に対するラモセトロンおよびアプレピタントの効果 .....	34
3.	DSS 誘起大腸炎の大腸粘膜における NK1 受容体の発現および発現同定 .....	37
第4節	考察 .....	39
第5節	小括 .....	41
総括	.....	42
引用文献	.....	44
謝辞	.....	52



## 略語表

DSS	Dextran sulfate sodium (デキストラン硫酸ナトリウム)
DAI	Disease activity index (病態活動性指数)
IBD	Inflammatory bowel disease (炎症性腸疾患)
IBS	Irritable bowel syndrome (過敏性腸症候群)
5-HT	5-hydroxytryptamine (serotonin; セロトニン)
TPH	Tryptophan hydroxylase (トリプトファンヒドロキシラーゼ)
SP	Substance P (サブスタンス P)
NK1 receptor	Neurokinin 1 receptor (ニューロキニン 1 受容体)
VACht	Vascular acetylcholine transporter (小胞アセチルコリントランスポーター)
iNOS	inducible nitric oxide synthase (誘導型一酸化窒素合成酵素)
IL	Interleukin (インターロイキン)
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor (腫瘍壊死因子)
IFN- $\gamma$	Interferon-gamma (インターフェロン- $\gamma$ )
MPO	Myeloperoxidase (ミエロパーオキシダーゼ)
EC	Enterochromaffin (腸クロム親和性細胞)

## 序論

炎症性腸疾患（Inflammatory bowel disease: IBD）は、主に大腸や小腸などの下部消化管における慢性炎症性疾患であり、潰瘍性大腸炎（Ulcerative colitis: UC）およびクローン病（Crohn's disease: CD）がその代表である。いずれも厚生労働省の指定難病となっている。従来、IBDは欧米に多く、日本を含むアジアでは少ないとされていたが、近年我が国でもIBDの患者数は増加の一途を辿っている [1]。2013年度の統計では、我が国のUC患者数は166,060人、CD患者数は39,799人で、IBD全体で既に20万人を超えており、これは指定難病のなかで最も患者数が多く、さらにUCの患者数は米国に次ぐ世界第2位となっている。

IBDの病因は依然として明らかとなっていないが、腸管免疫や上皮バリア機能の異常、さらには腸内細菌などが関与していることが想定されている [2]。近年、腫瘍壊死因子（Tumor necrosis factor- $\alpha$ : TNF- $\alpha$ ）に対するモノクローナル抗体などの生物学的製剤や各種免疫抑制薬などがIBDの治療において大きな効果を挙げ、病勢をコントロールすることが可能になってきた。しかし、これら生物学的製剤や免疫抑制薬に対する治療抵抗性の症例も多く、必ずしも治療法の確立は十分とは言えないのが現状である。

セロトニン（5-HT）は、L-トリプトファンからトリプトファンヒドロキシラーゼ（TPH）により生合成されるモノアミン神経伝達物質の1つである。5-HTは中枢神経や消化管で生合成されるが、特に消化管粘膜に存在する腸クロム親和性（Enterochromaffin: EC）細胞では生体内の約98%が生合成される [3-4]。5-HTの作用は、5-HT受容体を介するが、5-HT受容体には5-HT<sub>1</sub>～5-HT<sub>7</sub>の7つの主要なサブタイプが存在しており、さらにそれらは14のサブファミリーに分類される（Figure 1） [5]。5-HT受容体サブタイプの中で、5-HT<sub>3</sub>受容体だけがイオンチャンネル共役型受容体であり、その他はすべてGタンパク質共役型受容体である。5-HT受容体は、脳や脊髄、消化管など幅広く分布している [6]。消化管においても、多くの5-HT受容体サブタイプの発現が知られているが、なかでも5-HT<sub>3</sub>受容体は、蠕動運動、粘液分泌、知覚さらには嘔吐などの各種消化管機能と関連していることが明らかになっている [7-9]。実際、今日の臨床現場において、5-HT<sub>3</sub>受容体拮抗薬が抗がん剤の副作用として知られる悪心・嘔吐や下痢型の過敏性腸症候群（IBS）の治療に使用されている [10-12]。

Ghia et al. [13] は、TPH-1の遺伝子を欠損したマウスあるいはTPH阻害薬であるp-クロロフェニルアラニン（PCPA）の前処置により内因性5-HTを枯渇させたマウスでは、デキストラン硫酸ナトリウム（DSS）誘起大腸炎が有意に抑制されることを報告した。また、トリニトロベンゼンスルホン酸またはジニトロベンゼンスルホン酸（TNBSまたはDNBS）やDSS誘起大腸炎モデル、さらにはIBD患者において、EC細胞数や5-HT含量が増加することが示されている [14-16]。これらの知見から、IBDの病態に内因性5-HTが関与していることが推察されるが、5-HT受容体サブタイプとの関連やその機序に関しては不明である。

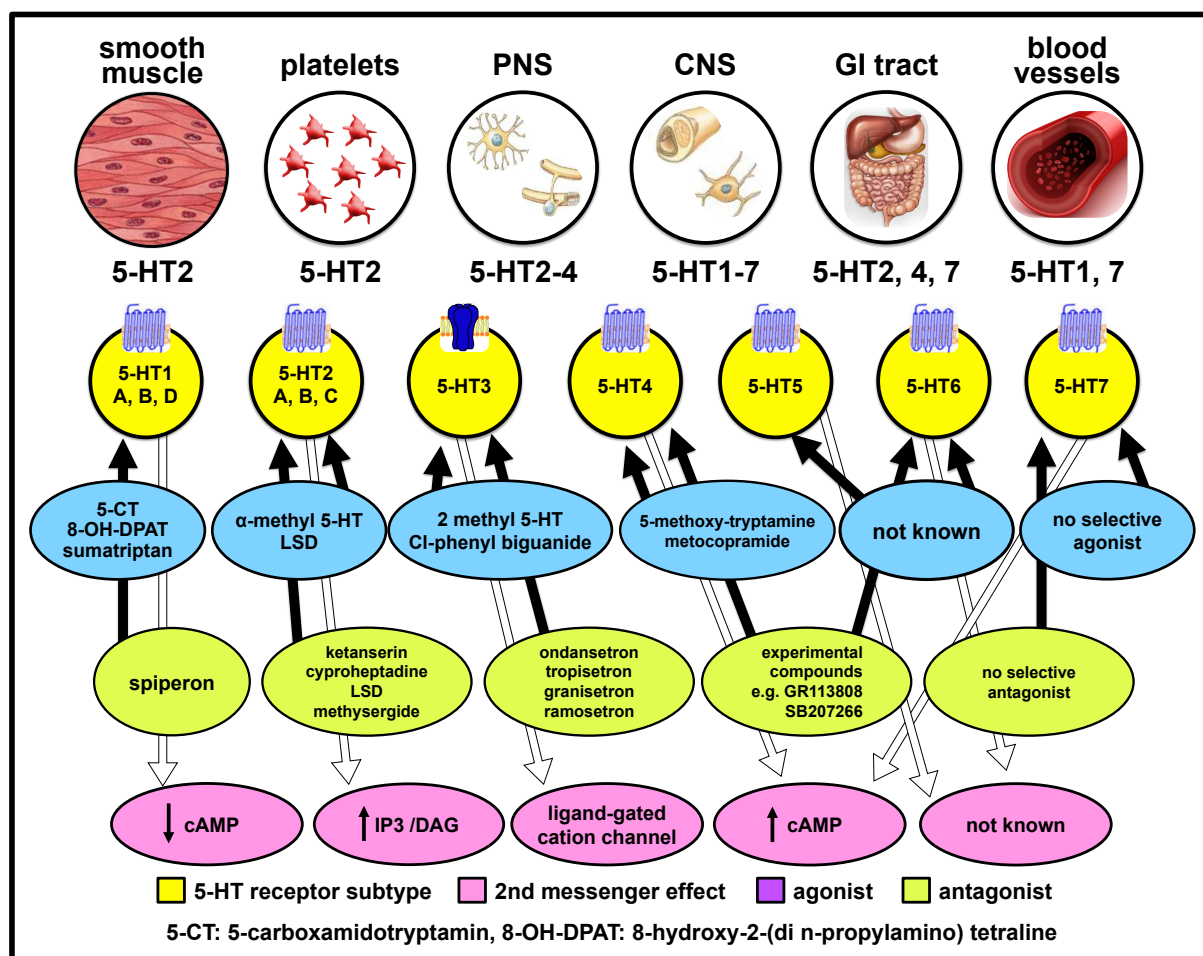


Figure 1. Schematic representation of the 5-HT cascade via 5-HT receptor.

Jason Hannon et al. Molecular biology of 5-HT receptors. *Behav. Brain. Res.* **2008**, 195, 198–213.

(一部改変)

当研究室では以前、非ステロイド性抗炎症薬であるインドメタシンにより誘起される小腸傷害および抗がん剤である5-フルオロウラシル誘起腸炎が、5-HT<sub>3</sub>受容体拮抗薬の投与により有意に抑制されることを明らかにした [17-18]。ゆえに、5-HT受容体サブタイプの中でも5-HT<sub>3</sub>受容体がIBDの病態に関与している可能性が推察されるが、5-HT<sub>3</sub>受容体に着目した研究はこれまで行われていなかった。

タキキニンファミリーに属するサブスタンスPは、11個のアミノ酸からなる神経ペプチドとして主に中枢および末梢神経系に存在している [19]。タキキニンの作用はニューロキニン(NK) 受容体を介している。NK受容体はGタンパク共役型受容体であり、NK<sub>1</sub>、NK<sub>2</sub>およびNK<sub>3</sub>受容体の3つのサブタイプが存在しており、SPは主にNK<sub>1</sub>受容体との親和性が高い [20-21]。消化管においてSPは、消化管運動、血管透過性の亢進や上皮細胞でのイオン輸送などに関与している [22-23]。また、中枢において嘔吐反射を活性化することも知られており、NK<sub>1</sub>受容体拮抗薬は5-HT<sub>3</sub>受容体拮抗薬と同様に抗がん剤の副作用による悪心・嘔吐の治療薬として使用されている [24-26]。SPは神経以外では、T細胞やマクロファージ、好酸球、樹状

細胞、肥満細胞などからも放出されることから、炎症・免疫応答にも関与していることも報告されている [27-28]。

SPもまた、5-HTと同様に消化管疾患の病態に関与している可能性が示唆されている。Engel et al. [29] は、SP遺伝子欠損マウスではWTマウスと比較して、TNBS誘起大腸炎の程度が軽度であることを報告した。また、NK1受容体拮抗薬の投与がIBD患者やマウス大腸炎モデルの病態を改善することも示されている [30-33]。消化管において、SPと5-HTは消化管運動機能の調節において協調的に機能していることが知られているものの [34-36]、IBDの病態における5-HT/5-HT3受容体およびSP/NK1受容体の関連については明らかになっていない。

本研究では、IBDの病態における5-HT/5-HT3受容体およびSP/NK1受容体の役割とそれらの関連について、IBDの代表的な動物実験モデルであるマウスDSS誘起大腸炎モデルを用いて検討した。5-HT/5-HT3受容体およびSP/NK1受容体は、これまで様々な疾患の病態に関連することが知られているものの、大腸炎の病態との関連については十分には解明されていない。したがって、IBDの病態における5-HT/5-HT3受容体およびSP/NK1受容体の役割とそれらの関連の詳細を解明することは、IBDの病態の理解に加えて、IBDの治療における新たな戦略の提案に繋がることが期待される。

## 第 1 章

# デキストラン硫酸ナトリウム（DSS）誘起マウス大腸炎の病態における 5-HT/5-HT3 受容体の役割

## 第 1 節 緒言

5-HT は、神経伝達や血小板凝集、消化管機能の調節において重要な役割を演じている生理活性アミンであり、生体内の 5-HT の約 98%が消化管粘膜に存在する腸クロム親和性（EC）細胞で合成され、その一部は血小板に移行するものの、90%以上が消化管粘膜に常時存在している [4]。これほど大量の 5-HT が消化管に存在しているにもかかわらず、消化管における 5-HT の役割については、運動や分泌機能の調節、嘔吐などとの関連が明らかになっているだけであり、種々の消化管疾患、特に IBD との関連については不明である。

Ghia et al. [13] は、5-HT 合成酵素である tryptophan hydroxylase-1（TPH-1）遺伝子欠損マウスでは実験的大腸炎が著明に抑制されることを報告した。この遺伝子欠損マウスでは、消化管における 5-HT は枯渇している。したがって、この結果は IBD の病態に内因性 5-HT が関与していることを示唆している。しかし、大腸炎の病態における 5-HT の役割の詳細については、5-HT 受容体サブタイプとの関連を含めて不明である。当教室では以前、非ステロイド性抗炎症薬（Non-steroidal anti-inflammatory drug: NSAID）により誘起される小腸傷害の発生が、TPH 阻害薬である p-chlorophenylalanine の前処置により内因性 5-HT を枯渇させた条件下では著明に抑制されることを報告した [17]。さらに、各種 5-HT 受容体拮抗薬の影響を検討したところ、5-HT3 受容体拮抗薬のみが NSAID 誘起小腸傷害を有意に抑制した。これらの結果は、NSAID 誘起小腸傷害の病態に内因性 5-HT および 5-HT3 受容体が関与していることを示唆している。抗がん剤である 5-フルオロウラシル（5-FU）誘起腸炎に対しても 5-HT3 受容体拮抗薬の投与は同様に抑制効果を発揮した [18]。しかし、IBD の病態における 5-HT/5-HT3 受容体の関与、さらには病態の進展・増悪の機序については不明である。IBD の病態における 5-HT の役割について、5-HT 受容体サブタイプとの関連を明らかにすることは、治療標的としての有用性を明らかにする点からも興味あるところである。

本章では、IBD の病態における 5-HT/5-HT3 受容体の関与について、代表的な IBD の病態モデルであるデキストラン硫酸ナトリウム（DSS）誘起マウス大腸炎を用いて、5-HT3 受容体拮抗薬の効果を中心に検討した。さらに、5-HT および 5-HT3 受容体の発現分布および大腸炎発症時における発現変化を免疫組織学的手法により解析することで、IBD の病態修飾における 5-HT/5-HT3 受容体の役割解明を試みた。

## 第2節 実験材料と方法

### 1. 実験動物

実験には9-12週齢の雄性C57BL/6Jマウス(20-24g)(SLC、静岡)を使用した。動物は標準的実験条件である温度 $22 \pm 1^\circ\text{C}$ および12時間毎に明暗となる環境下で飼育し、固形飼料および水道水を自由飲水させた。1週間以上予備飼育した後、無作為に群分けを行い、実験を行った。本研究における動物実験はすべて京都薬科大学動物実験委員会に申請し、承認を得た上で「京都薬科大学動物実験実施規程」に準じて実施した。また、動物実験はARRIVEガイドライン [5, 37] に則って、法令遵守している。

### 2. 使用薬物

デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)は、和光純薬(Molecular weight: 5,000; 大阪)より購入した。5-HT<sub>3</sub>受容体拮抗薬であるラモセトロンは、アステラス製薬(東京)よりご供与いただき、オンダンセトロンはLKT Laboratories (St. Paul, MN, USA)より購入した。カルボキシメチルセルロース(CMC)は、ナカライテスク(京都)より購入した。DSSは、終濃度が2%もしくは2.5%となるようにバイオサイエンスリサーチセンター(BSRC)のSpecific Pathogen Free (SPF)エリア内の滅菌済水道水で溶解して使用した。ラモセトロンは滅菌処理済0.5%CMC溶液に溶解、またオンダンセトロンは滅菌処理済0.5%CMC溶液で懸濁して使用した。これら5-HT<sub>3</sub>受容体拮抗薬は使用直前に調整し、0.1 mL/10 gの容量で経口投与した。

### 3. デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)誘起マウス大腸炎

DSS誘起大腸炎は、マウスに2.5%DSS溶液を10日間、給水ボトルを用いて自由飲水させることにより惹起させた。経日的に体重を測定し、下痢・下血を観察した。5-HT<sub>3</sub>受容体拮抗薬であるラモセトロン(0.01、0.03および0.1 mg/kg)およびオンダンセトロン(5 mg/kg)は1日2回経口投与を10日間行った。また、正常群(Normal群)および対照群であるDSS単独処置群(Control群)には、滅菌済水道水を自由飲水させ、同容量の0.5%CMCを経口投与した。

### 4. Disease activity index (DAI) スコアの評価

DAIはWirtz et al. [38] およびGhia et al. [39]の方法に準じて行った。すなわち、動物の体重減少率(0-4)、下痢(0-4)および下血(0-4)をそれぞれスコア化し合算した(Table 1)。糞便中の潜血は、Hemocult II SENS test (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA)を用いて検出した。DAIスコアの最低値は0、最大値は12である。DAIの評価は、2人の評価者が盲検で行い、平均値を算出した。

Table 1. Disease activity index (DAI)

Socre	Body weight loss	Diarrhea	Bleeding
0	< 5%	normal	no blood
1	5-10%	soft, but still formed	occult blood in stool
2	10-15%	very soft	traces of blood visible
3	15-20%	diarrhea	grossly blood stool
4	>20%	severe diarrhea	rectal bleeding

## 5. Myeloperoxidase (MPO) 活性の測定

大腸粘膜への好中球浸潤の指標である大腸粘膜 MPO 活性は、Bradley et al. [40] の方法を一部改変して測定した。すなわち、DSS 処置最終日に動物を炭酸ガスで致死させ、盲腸から結腸までを摘出した。氷冷したリン酸緩衝生理食塩水（PBS）で腸管内を洗浄し、組織の近位結腸から直腸に沿って一部をサンプリングした後、0.5%臭化ヘキサデチルトリメチルアンモニウム溶液（pH 6.0; 和光純薬、大阪）を含む 50 mM リン酸緩衝液中でガラス-ガラスホモジナイザーを用いて均質化した。均質化した各サンプルはアセトン・ドライアイスを用いて急速凍結と融解を 3 回繰り返した後、4℃、2,000 rpm で 10 分間遠心分離した。マイクロプレート（AGC テクノグラス、静岡）に、回収した上清 5  $\mu$ L と 10 mM リン酸緩衝液（pH 6.0）95  $\mu$ L および 1.5 M オルトジアニシジン塩酸塩（Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Luis, USA）を含む 0.0005%（w/v）過酸化水素水（和光純薬、大阪）50  $\mu$ L を添加し、各サンプルの 450 nm における吸光度変化をマイクロプレートリーダー（MULTISKAN GO; Thermo Fisher SCIENTIFIC, Massachusetts, USA）で測定した。MPO 活性は次式にしたがって算出した。

$$\text{MPO activity } (\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min mg protein}) = (\text{OD}/\text{min}) / (\text{OD}/\text{min H}_2\text{O}_2) \times \text{mg protein}$$

## 6. 各種サイトカイン mRNA 発現の定量

DSS 処置後、0、3、7 および 10 日目の大腸組織を摘出し、氷冷した PBS で洗浄した後、遠位結腸部位を切り取り、RNA later（Ambion, Austin, TX, USA）浸し、使用するまで 4℃で保存した。大腸組織中の全 RNA は、Sepasol RNA-I（ナカライテスク、京都）を用い、テフロン・ガラスホモジナイザーにより均質化した。Sepasol RNA-I の 1/5 容量のクロロホルムを添加して転倒混和した後、4℃、14,000 rpm で遠心分離した。回収した上清（水相）は予め 500  $\mu$ L のイソプロピルアルコールを入れたマイクロチューブに静かに重層し、室温で 10 分間静置した後、4℃、14,000 rpm で遠心分離した。上清を除去し、沈殿物（全 RNA）を 75%エタノール溶液で洗浄した後、風乾し、Diethylpyrocarbonate（DEPC）処理水に溶解した。逆転写反応

は、PrimeScript Reverse Transcriptase (タカラ、滋賀) を用いて行った。腫瘍壊死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ; MA097070)、誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS; MA063888)、インターフェロン- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ; MA025911)、インターロイキン-17A (IL-17A; MA086724) および IL-10 (MA029057) mRNA 発現量の測定は、リアルタイム逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (Real Time RT-PCR) により行った。反応液である SYBR Premix Ex Taq (タカラ、滋賀) により、Thermal Cycler Dice® Real Time System II (タカラ、滋賀) を用いて、95°C 30 秒を 1 サイクル後、95°C 5 秒、60°C 30 秒を 40 サイクル行い測定した。 $\beta$ -アクチン ( $\beta$ -actin; MA050368) 遺伝子をハウスキーピング遺伝子とし、 $\Delta\Delta C_t$  法により各遺伝子の発現を相対的に定量した。本研究において用いた各種プライマーは、TAKARA perfect Real Time Primer サポートシステムより作製した。各群におけるサイトカイン mRNA 発現量は、 $\beta$ -actin mRNA にて標準化し、正常群 (Normal 群) の mRNA 発現量に対する比として表示した。

## 7. 蛍光免疫組織染色

DSS 処置後 3、7 および 10 日目と DSS 未処置 (0 日目) の大腸組織を摘出し、氷冷 PBS で洗浄した後、4%パラホルムアルデヒド (和光純薬、大阪) で 4°C、2 時間固定した。PBS でさらに 4°C、2 時間処置した後、20%スクロース溶液に浸し、4°Cで一晩インキュベートした。遠位結腸組織をドライアイスと Optimal Cutting Temperature compound (Sakura Finetek, 東京) を用いて凍結包埋し、クライオスタット (Leica Instruments, Nussloch, Germany) を用いて厚さ 30  $\mu$ m の切片にし、MAS コーティングスライドガラス (松浪硝子、大阪) 上に薄切した。5-HT、5-HT3 受容体、CD11b (マクロファージマーカー)、Vesicular acetylcholine transporter (VACHT: コリン作動神経マーカー) およびサブスタンス P (SP) の蛍光免疫染色は Matsumoto et al. [41] の方法を参考に行った。以下に、本章で用いた一次抗体および二次抗体を示す (Table 2 および 3)。

Table 2. primary antibody

Target	Host	Consentration	Company
anti serotonin	goat	1:4000	Immunostar, Hudson, WI, USA
anti 5-HT3 receptor	rabbit	1:100	Calbiochem, Darmstadt, Germany
anti CD11b	rat	1:400	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
anti vesicular Ach transporter (VACHT)	goat	1:4000	Phonix, Burlingame, CA, USA
anti Substance P	guinea pig	1:4000	Abcam, Cambridge, UK



Table 3. secondary antibody

antibody	Concentration	Company
fluorescein isothiocyanate-labelled donkey anti-rabbit	1:400	invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
tetramethyl rhodamine isothiocyanate-labelled donkey anti-guinea pig	1:400	invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
tetramethyl rhodamine isothiocyanate-labelled donkey anti-goat	1:400	invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
tetramethyl rhodamine isothiocyanate-labelled donkey anti-rat	1:400	invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA

すなわち、二次抗体の非特異的結合を防ぐために、スライドガラス上の組織切片に 10% normal donkey serum を添加し、室温で 1 時間ブロッキングを行った。0.2% Triton X 含有 PBS (PBST) で 3 回洗浄後、一次抗体 (Table. 1) を添加し、室温で 40 時間インキュベートした。PBST で 3 回洗浄後、標的タンパクを可視化するため、各一次抗体に対する二次抗体 (Table. 2) を添加し、4 時間室温でインキュベートした。PBST で 3 回洗浄後、カバーガラスで固定および核染色 (DAPI) を行った (Hard Set Mounting Medium with DAPI; VECTOR LABORATORIES, California, USA)。蛍光免疫組織学的観察には、フルオレセインイソチオシアネート (488 nm) またはテトラメチルローダミンイソチオシアネート (543 nm) に適した励起波長に設定した共焦点顕微鏡 (FV-1000 ; オリンパスおよび A1R<sup>+</sup> ; ニコン、東京) を用いて、0.5  $\mu\text{m}$  の間隔で 50-60 枚の連続切片像を撮影した。その後、Fluoview バージョン 1.7a ソフトウェア (オリンパス、東京) の Z-スタックシステムにより複数の画像を単一平面に投影し再構成した。200 倍率の共焦点顕微鏡下で水平方向に切片した大腸粘膜中における 100  $\mu\text{m}^2$  あたりの免疫陽性細胞および神経線維の数を計数した。また、ImageJ1.48v ソフトウェアを用いて 200 倍率下、100  $\mu\text{m}^2$  における水平断面の粘膜組織中における免疫陽性神経線維の長さを測定した。全ての計測は 2 名の測定者により盲検で行い、平均値を算出した。

## 8. 統計学的検討

本研究におけるデータおよび統計学的検討は、薬理学における実験計画と解析に関する推奨事項に準拠する [42]。データは標準平均  $\pm$  標準誤差 (S.E.M.) として示した。統計解析には Graphpad Prism 6.0f (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) 解析ソフトを用いた。大腸の長さ、MPO 活性、神経の本数および長さ、そして細胞の数における統計学的有意性は one-way ANOVA により標本の平均を比較し、パラメトリック検定として Holm-Sidak の多重比較検定、もしくは Student の t 検定を用いて行った。一方、DAI スコア、組織学的評価および mRNA 発現量における統計学的有意性は Kruskal-Wallis の one-way ANOVA により標本の平均を比較し、ノンパラメトリック検定として Dunn の多重比較検定を用いて行った。いずれの統計学

的有意性も、 $P$  値 $<0.05$  の場合に有意であると判定した。

### 第3節 結果

#### 1. 5-HT<sub>3</sub> 受容体拮抗薬の投与による DSS 誘起大腸炎の抑制効果

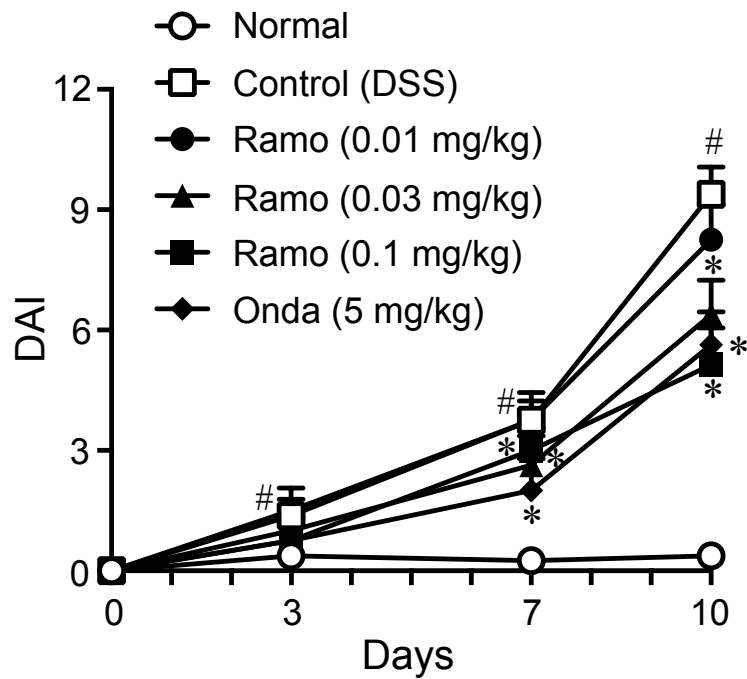
2.5%DSS 溶液の自由飲水投与は、Control 群において経日的な体重減少および下痢・下血を惹起し、10 日目における DAI は  $9.4 \pm 0.7$  に達し、Normal 群の DAI スコア ( $0.38 \pm 0.2$ ) と比較して有意に増大した (Fig. 1A)。5-HT<sub>3</sub> 受容体拮抗薬であるラモセトロン (0.01、0.03 および 0.1 mg/kg) の投与は、DSS 処置による体重減少および下痢・下血を抑制し、10 日目における DAI の増大は用量依存的かつ 0.03 mg/kg 以上の用量で有意に抑制され、0.03 および 0.1 mg/kg の用量における DAI はそれぞれ  $6.4 \pm 0.9$  および  $5.1 \pm 0.9$  であった。5-HT<sub>3</sub> 受容体拮抗薬の効果をさらに検証するため、他の 5-HT<sub>3</sub> 受容体拮抗薬であるオンダンセトロンについても同様な検討を行ったところ、DSS 処置による DAI の増大は、ラモセトロンと同様にオンダンセトロン (5 mg/kg) の投与有意に抑制され、DAI は  $5.6 \pm 0.8$  であった。

DSS 誘起大腸炎モデルにおいては、傷害の程度に依存して大腸の短縮が観察される。本研究においても、Normal 群における大腸の長さは  $8.7 \pm 0.2$  cm であったが、DSS 処置 10 日目には大腸の長さは  $6.4 \pm 0.1$  cm まで短縮した。ラモセトロン (0.01、0.03 および 0.1 mg/kg) の投与は、DSS 処置による大腸の短縮を用量依存的かつ 0.01 mg/kg の用量から有意に抑制し、大腸の長さはそれぞれ  $7.7 \pm 0.1$ 、 $7.9 \pm 0.2$  および  $8.4 \pm 0.2$  cm であった (Fig. 2B)。同様な DSS 処置による大腸の短縮の抑制効果は、オンダンセトロン (5 mg/kg) の投与によっても認められ、大腸の長さは  $8.2 \pm 0.2$  cm であった。

組織学的評価において、DSS 処置 10 日目の Control 群の大腸組織では、上皮の傷害、杯細胞の消失、粘膜の肥厚および高度の炎症性細胞の浸潤が確認でき、組織学的スコアは  $3.1 \pm 0.3$  であった (Fig. 2C および 2B)。ラモセトロン (0.01、0.03 および 0.1 mg/kg) の投与は、DSS 処置による組織学的傷害を用量依存的かつ 0.03 mg/kg の用量から有意に抑制し、0.03 および 0.1 mg/kg の用量における組織学的スコアはそれぞれ  $2.3 \pm 0.3$  および  $1.5 \pm 0.3$  であった。オンダンセトロン (5 mg/kg) の投与も同様に、DSS 処置による組織学的スコアを  $1.6 \pm 0.2$  まで有意に低下させた。

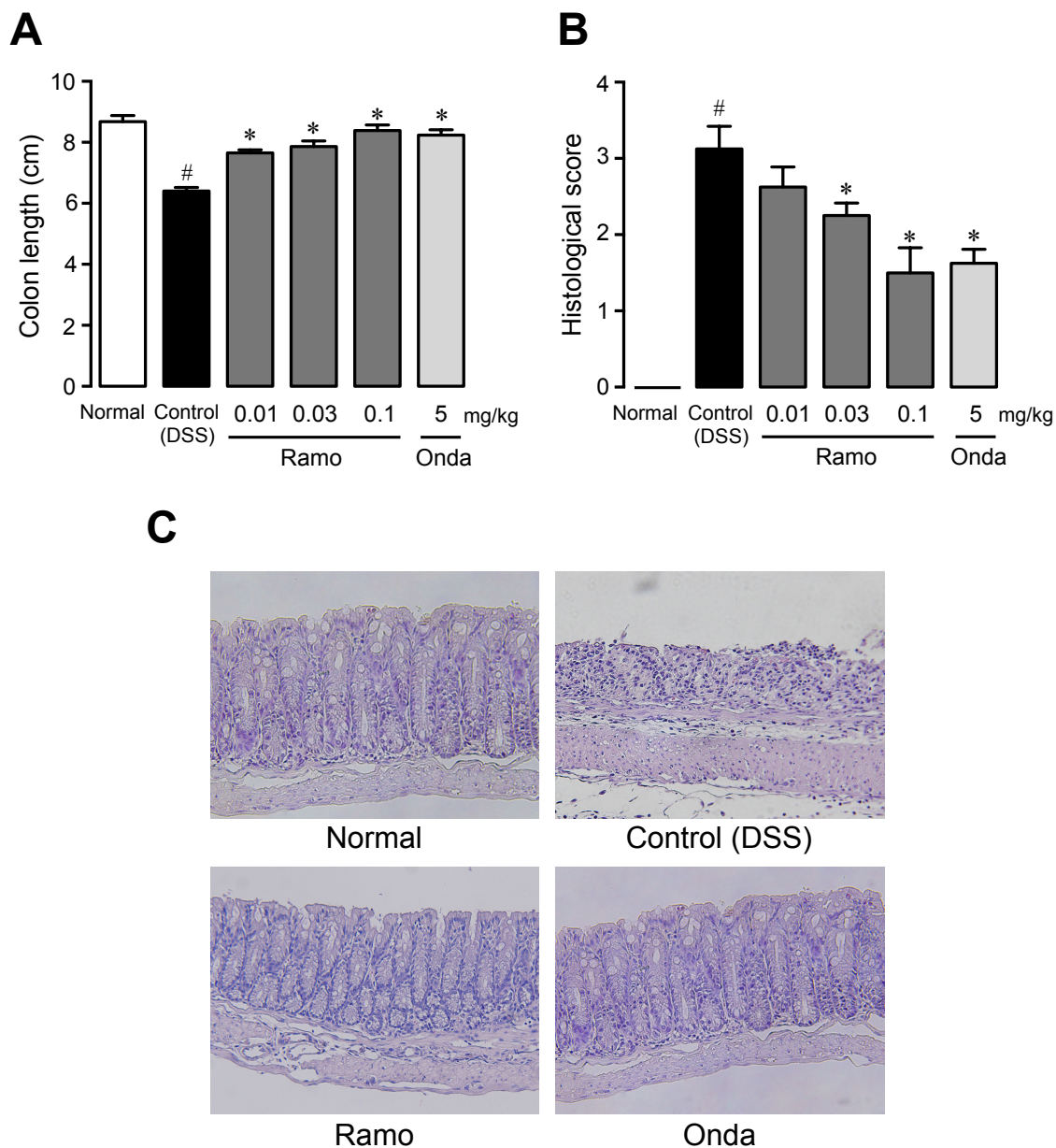
大腸粘膜への好中球浸潤の指標である大腸組織中 MPO 活性は、正常粘膜では  $0.03 \pm 0.01$   $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{mg protein}$  であったが、DSS 処置 10 日目には  $0.09 \pm 0.04$   $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{mg protein}$  まで著明に増大した。この増大はラモセトロン (0.1 mg/kg) およびオンダンセトロン (5 mg/kg) の投与により有意に抑制され、MPO 活性はそれぞれ  $0.03 \pm 0.02$  および  $0.04 \pm 0.01$   $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{mg protein}$  であった (Fig. 3)。

以上の結果より、DSS 誘起大腸炎における体重減少、下痢・下血、組織学的傷害および好中球浸潤などの炎症反応は、5-HT<sub>3</sub> 受容体拮抗薬であるラモセトロンおよびオンダンセトロンの投与により有意に抑制することが判明した。



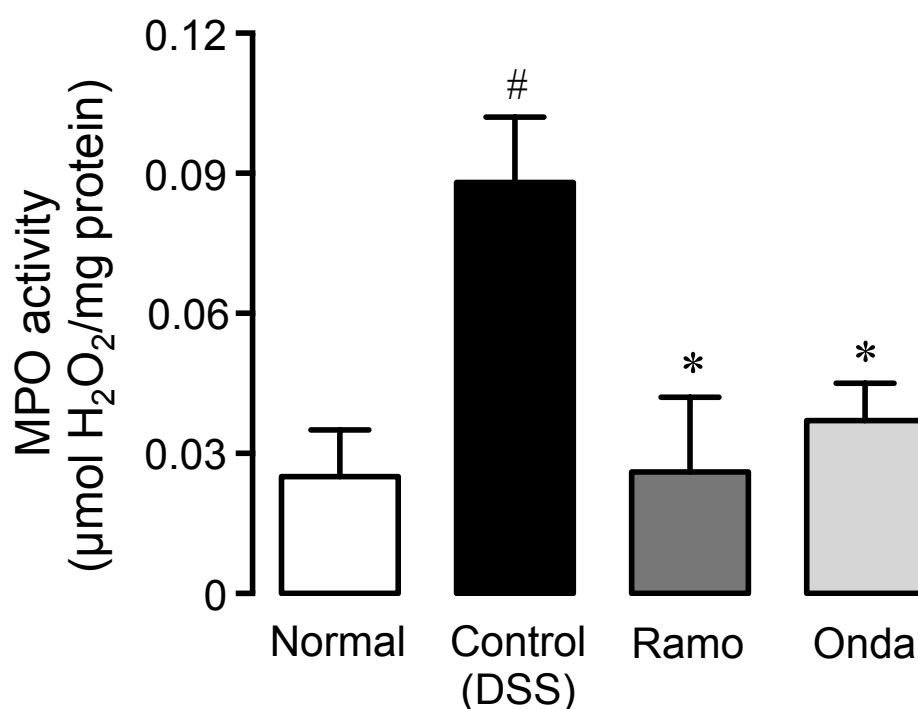
**Figure 1. Effects of ramosetron (Ramo) and ondansetron (Onda) on increase in DAI during DSS treatment.** Animals were exposed to 2.5% DSS for 10 days, while Ramo (0.01–0.1 mg/kg) and Onda (5 mg/kg) were administered p.o. twice daily. DAI was determined on days 0, 3, 7, and 10 following the onset of DSS treatment. Data are presented as the mean  $\pm$  S.E.M for 8 mice per group. \* $P < 0.05$  for the comparison with control mice (DSS); # $P < 0.05$  for the comparison with normal mice (DSS untreated).

Utsumi et al., *Br. J. Pharmacol.* **2016**, 173, 1835-1849.



**Figure 2. Effects of ramosetron (Ramo) and ondansetron (Onda) on DSS-induced shortening of colon length and histological damage.** Animals were exposed to 2.5% DSS for 10 days, while Ramo (0.01–0.1 mg/kg) and Onda (5 mg/kg) were administered p.o. twice daily. (A) Colon length and (C) histological score were examined on day 10. Data are presented as the mean  $\pm$  SEM for 8 mice per group. \* $P < 0.05$  for the comparison with control mice (DSS); # $P < 0.05$  for the comparison with normal mice (DSS untreated). (C) Representative images of DSS-induced histological damage in the colon.

Utsumi et al., *Br. J. Pharmacol.* **2016**, 173, 1835-1849.

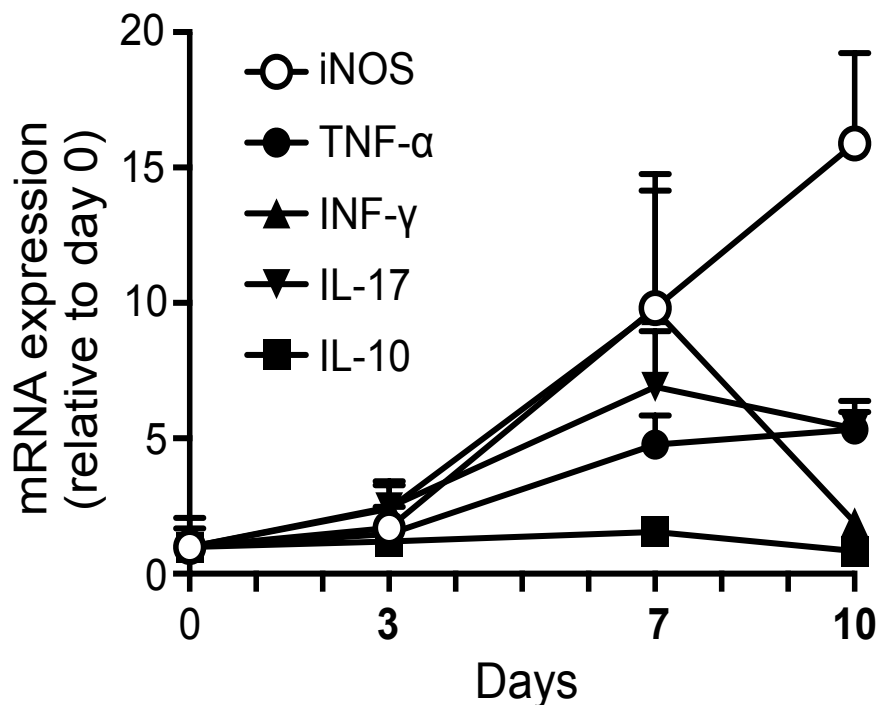


**Figure 3. Effects of ramosetron (Ramo) and ondansetron (Onda) on increase in MPO activity during DSS treatment.** Animals were exposed to 2.5% DSS for 10 days, while Ramo (0.1 mg/kg) and Onda (5 mg/kg) were administered p.o. twice daily. MPO activity was determined on days 10 following the onset of DSS treatment. Data are presented as the mean  $\pm$  S.E.M for 8 mice per group. \* $P < 0.05$  for the comparison with control mice (DSS); # $P < 0.05$  for the comparison with normal mice (DSS untreated).

Utsumi et al., *Br. J. Pharmacol.* **2016**, 173, 1835-1849.

## 2. DSS 誘起大腸炎の病態における炎症性メディエーター発現の経日的変化

2.5%DSS 溶液の自由飲水投与は、大腸組織中における IFN- $\gamma$  および IL-17 mRNA 発現を著明に増大し、その増大は7日目に最大に達し(それぞれ0日目の  $9.7 \pm 5.0$  および  $6.9 \pm 2.1$  倍)、それらの増大は10日目には減弱した (Fig. 4)。一方、iNOS および TNF- $\alpha$  mRNA 発現は DSS 処置により経日的に増大し、7日目以降もさらなる増大が観察された。DSS 処置7日目における iNOS および TNF- $\alpha$  mRNA 発現の増大はそれぞれ0日目の  $9.8 \pm 4.3$  および  $4.8 \pm 1.1$  倍であった。IL-10 mRNA 発現は DSS 処置により何ら変化は認められなかった。



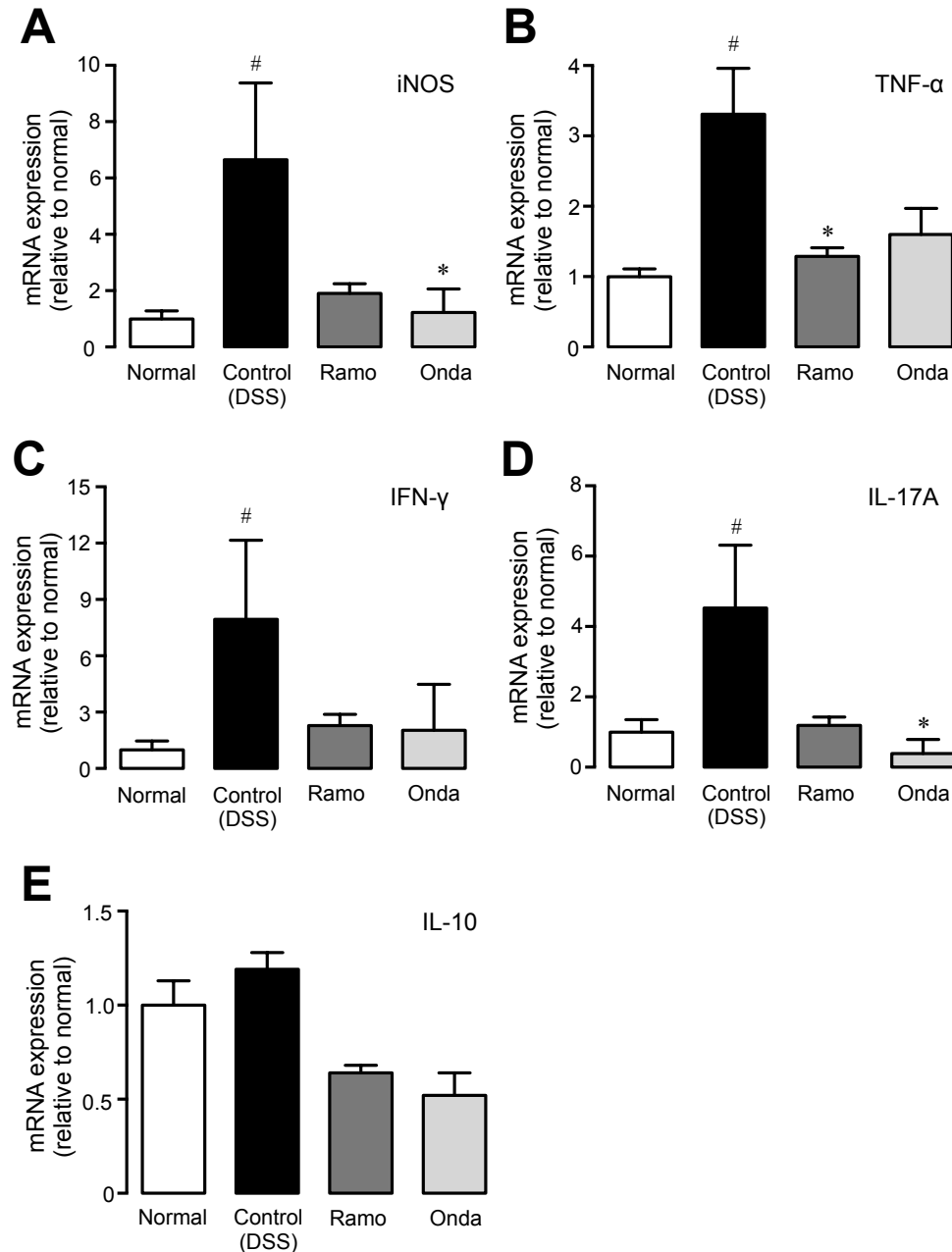
**Figure 4. Changes in expression levels of various inflammatory mediators during DSS treatment.** Animals were exposed to 2.5% DSS for 10 days. Expression levels of iNOS, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-17, and IL-10 mRNA were standardized to that of  $\beta$ -actin mRNA and normalized to the mean value for day 0 (DSS untreated) at each time point. Data are presented as the mean  $\pm$  S.E.M. for 8 mice per group.

Utsumi et al., *Br. J. Pharmacol.* **2016**, 173, 1835-1849.

### 3. 炎症性サイトカイン mRNA 発現増大に対する 5-HT3 受容体拮抗薬の効果

DSS 処置 7 日目の大腸組織における iNOS (Fig. 5A)、TNF- $\alpha$  (Fig. 5B)、IFN- $\gamma$  (Fig. 5C) および IL-17 (Fig. 5D) mRNA 発現はそれぞれ Normal 群の  $6.7 \pm 3.7$ 、 $3.3 \pm 0.6$ 、 $7.9 \pm 4.2$  および  $4.5 \pm 1.9$  倍に増大した。これらの増大は 5-HT3 受容体拮抗薬であるラモセトロン (0.1 mg/kg) の投与によりそれぞれ Normal 群の  $1.9 \pm 0.4$ 、 $1.3 \pm 0.1$ 、 $2.3 \pm 0.6$  および  $1.2 \pm 0.2$  倍まで抑制された。同様に、オンダンセトロン (5 mg/kg) の投与も DSS 処置によるこれら炎症性メディエーター発現の増大をそれぞれ Normal 群の  $1.2 \pm 0.8$ 、 $1.6 \pm 0.4$ 、 $2.0 \pm 2.5$  および  $0.4 \pm 0.4$  倍まで抑制した。IL-10 mRNA 発現は DSS 処置、さらにはラモセトロンおよびオンダンセトロンの投与によっても何ら変化は認められなかった (Fig. 5E)。これらの結果から、DSS 誘起大腸粘膜においては、各種炎症性メディエーター発現の増大が観察され、それらの増大はいずれも 5-HT3 受容体拮抗薬の投与により抑制されることが明らかになった。



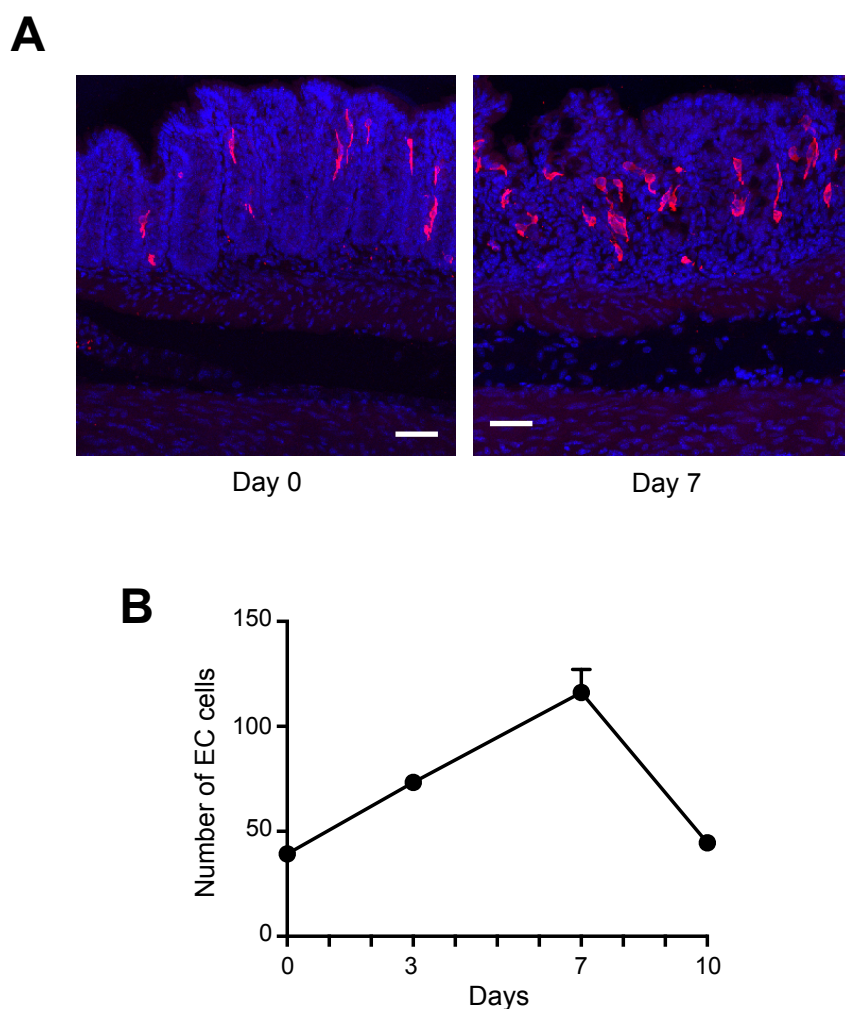


**Figure 5. Effect of ramosetron (Ramo) and ondansetron (Onda) on DSS-induced expression of inflammatory mediators in the colon.** Animals were exposed to 2.5% DSS for 7 days, while Ramo (0.01–0.1 mg/kg) or Onda (5 mg/kg) were administered p.o. twice daily. (A) iNOS, (B) TNF- $\alpha$ , (C) IFN- $\gamma$ , (D) IL-17 and (E) IL-10 mRNA expression were standardized to that of  $\beta$ -actin mRNA and normalized to the mean value for normal (DSS untreated) mice. Data are presented as the mean  $\pm$  S.E.M. for 8 mice per group. \* $P < 0.05$  for the comparison with control mice (DSS); # $P < 0.05$  for the comparison with normal mice (DSS untreated).

Utsumi et al., *Br. J. Pharmacol.* **2016**, 173, 1835-1849.

#### 4. 大腸炎粘膜における 5-HT 陽性細胞数の経日的変化

大腸粘膜における 5-HT 発現を免疫組織学的に検討した。正常大腸粘膜において 5-HT 発現のほとんどは広範かつ細胞様に認められ、5-HT 陽性細胞数は  $39.3 \pm 2.9$  個であった (Fig. 6A および 6B)。2.5%DSS 処置は、大腸粘膜における 5-HT 陽性細胞を経日的に増加させ、7 日目に最大に達したが ( $116.2 \pm 11.1$  個)、10 日目にはほぼ正常レベルにまで減少した。

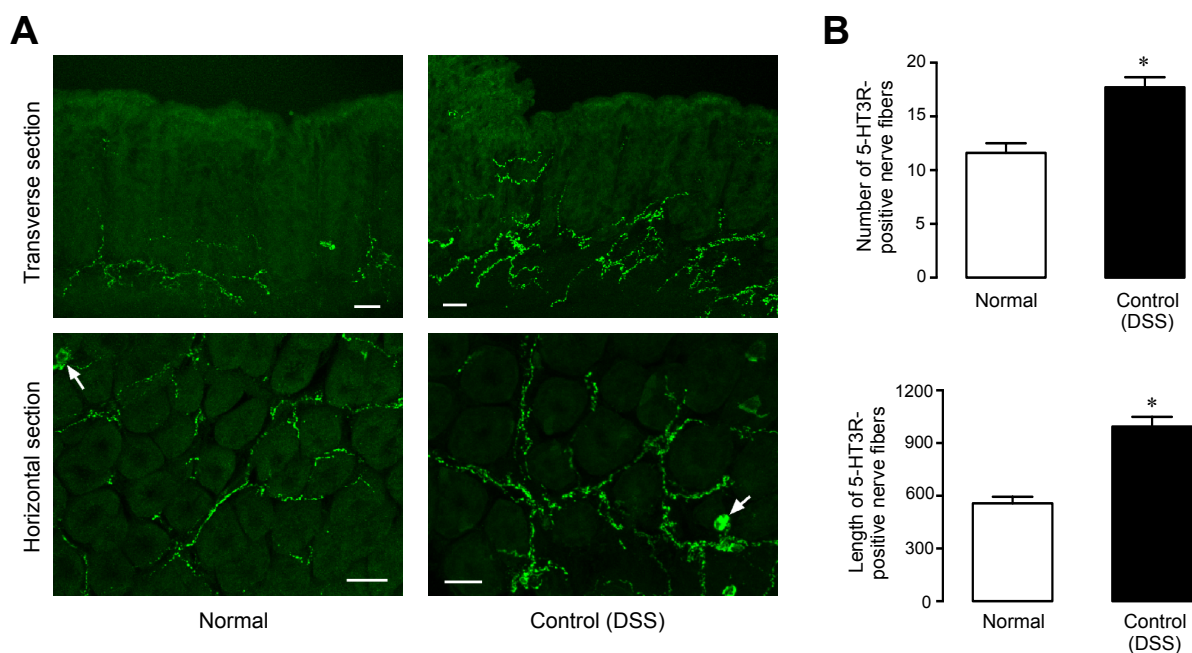


**Figure 6. Change in the number of 5-HT-immunoreactive cells in the mouse colonic mucosa during DSS treatment.** Animals were exposed to 2.5% DSS for 10 days, and the number of 5-HT-positive cells was determined immunohistochemically using an anti-5-HT antibody on days 0, 3, 7, and 10. (A) Representative images showing immunohistochemical detection of 5-HT-positive cells on day 0 and 7. Scale bars: 50  $\mu$ m. (B) Data are presented as the mean  $\pm$  S.E.M. for 8 mice per group.

Utsumi et al., *Br. J. Pharmacol.* **2016**, 173, 1835-1849.

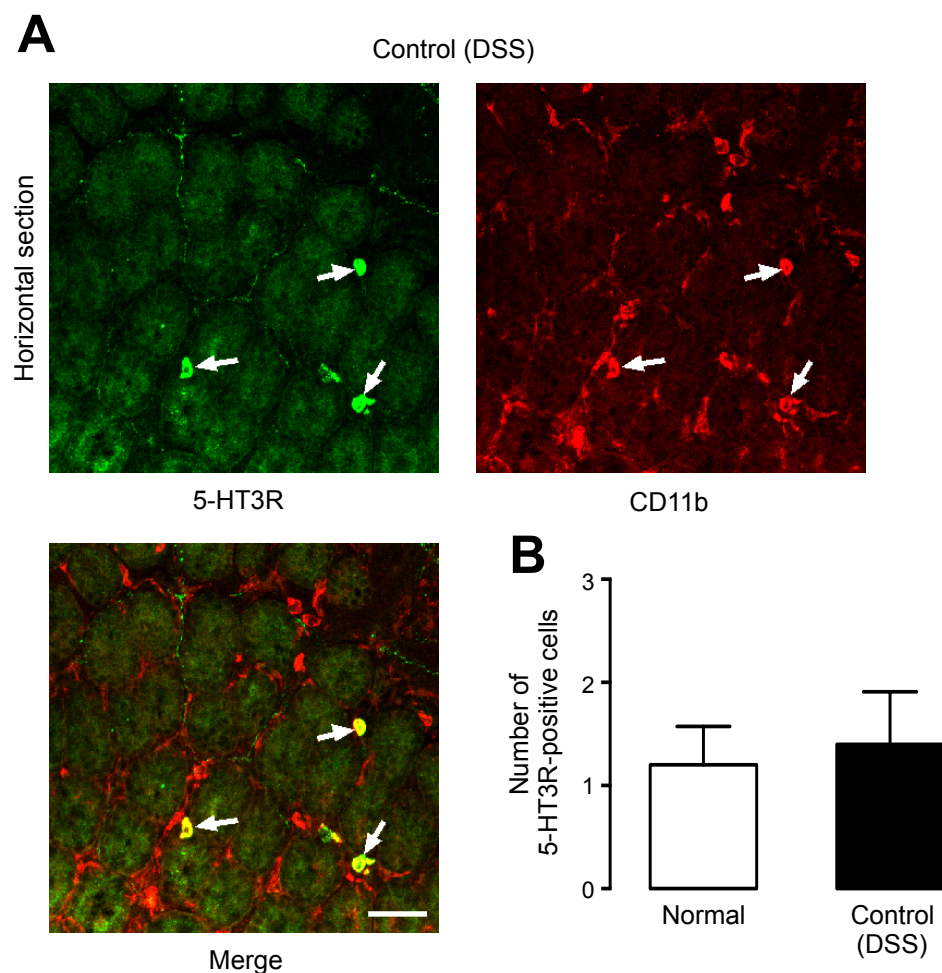
## 5. 大腸炎粘膜における 5-HT3 受容体発現の変化

大腸粘膜における 5-HT3 受容体の発現を免疫組織学的に検討した。正常大腸粘膜においては、5-HT3 受容体は主に粘膜下層の神経線維に、また一部細胞様に認められた (Fig. 7A)。正常大腸粘膜における 5-HT3 受容体陽性神経の数および長さは、それぞれ  $11.6 \pm 0.9$  本および  $556.8 \pm 37.7 \mu\text{m}$  であった。2.5%DSS 処置 7 日目には、大腸粘膜における 5-HT3 受容体陽性神経の数および長さは、それぞれ  $17.7 \pm 0.1$  本および  $994.0 \pm 55.0 \mu\text{m}$  にまで著明に増大した (Fig. 7A および 7B)。一方、5-HT3 受容体陽性細胞の多くはマクロファージなどの炎症性細胞のマーカーである CD11b と共局在したが、正常 ( $1.2 \pm 0.4$  個) および大腸炎粘膜における 5-HT3 陽性細胞数 ( $1.4 \pm 0.5$  個) の間に何ら変化は認められなかった (Fig. 8A および 8B)。



**Figure 7. Change in the number and length of 5-HT3 receptor (5-HT3R)-positive nerve fibers in the colonic mucosa with or without DSS treatment.** Animals were exposed to 2.5% DSS for 7 days, and the expression of 5-HT3R was examined immunohistochemically. (A) Representative images showing the expression of 5-HT3R in the colonic mucosa of normal (DSS untreated) and control (DSS) mice on transverse and horizontal sections. Scale bars: 20  $\mu\text{m}$ . Arrows indicate 5-HT3R-positive cells. (B) The numbers and lengths of 5-HT3R-positive nerve fibers were determined in 100  $\mu\text{m}$  squares on horizontal section. Data are presented as the mean  $\pm$  S.E.M. for 5 mice per group. \* $P < 0.05$  for the comparison between normal and control mice.

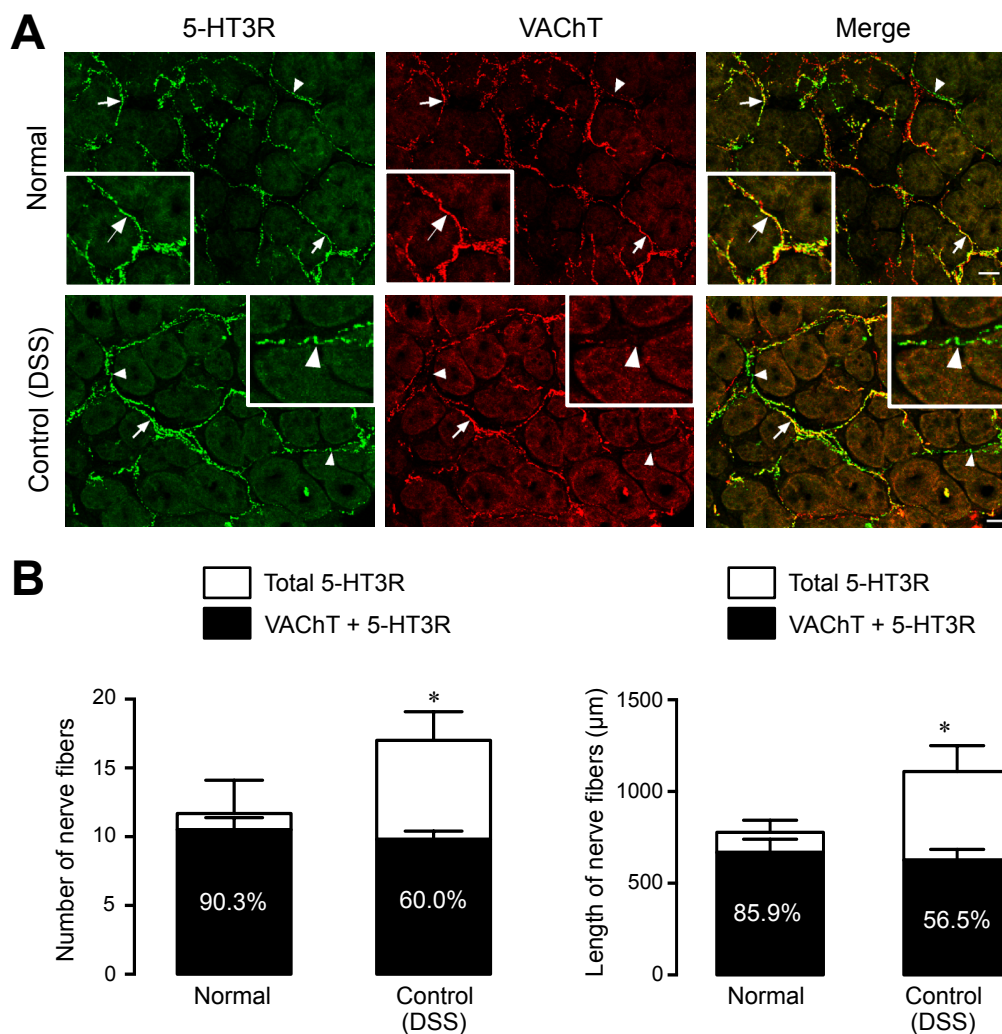
Utsumi et al., *Br. J. Pharmacol.* **2016**, 173, 1835-1849.



**Figure 8. Change in 5-HT3 receptor (5-HT3R)-positive cells in the colonic mucosa with or without DSS treatment.** Animals were exposed to 2.5% DSS for 7 days, and the expression of 5-HT3R-positive cells was examined immunohistochemically. (A) Double staining of 5-HT3R (green) and CD11b (red) in a horizontal section of the colonic mucosa in control mice. Arrows indicate typical double-positive cells for 5-HT3R and CD11b. (B) The numbers and lengths of 5-HT3R-positive cells were determined in 100  $\mu$ m squares on horizontal section. Data are presented as the mean  $\pm$  S.E.M. for 5 mice per group.

Utsumi et al., *Br. J. Pharmacol.* **2016**, 173, 1835-1849.

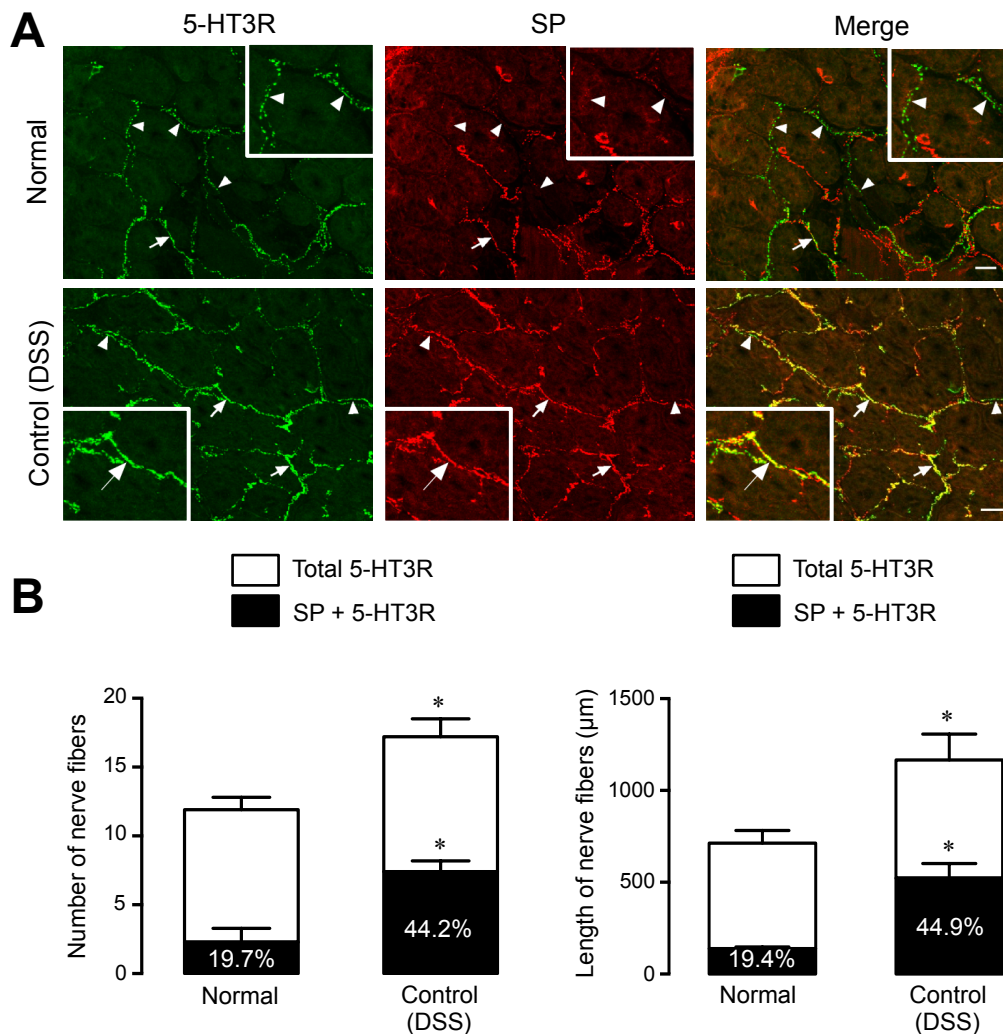
5-HT<sub>3</sub> 受容体陽性神経を同定するため、コリン作動性神経マーカーである VAcHt および一次求心性知覚神経マーカーである SP との蛍光二重免疫染色を行った。正常大腸粘膜において、5-HT<sub>3</sub> 受容体陽性神経と VAcHt 陽性神経の陽性率は、数および長さにおいてそれぞれ 90.3% および 85.9%であった (Fig. 9A および 9B)。DSS 処置 7 日目の大腸炎粘膜においては、正常粘膜と比較して 5-HT<sub>3</sub> 受容体陽性神経は有意に増大したが、VAcHt 陽性神経数は何ら変化せず、結果として 5-HT<sub>3</sub> 受容体陽性神経における VAcHt 陽性率は、数および長さにおいてそれぞれ 60.0%および 56.5%にまで低下した。一方、正常大腸粘膜における 5-HT<sub>3</sub> 受容体陽性神経は、ごく一部が SP 陽性神経であるに過ぎず、その陽性率は数および長さにおいてそれぞれ 19.7%および 19.4%であった。DSS 処置 7 日目の大腸炎粘膜においては、5-HT<sub>3</sub> 受容体と同様に SP 陽性神経が顕著に増加し、5-HT<sub>3</sub> 受容体陽性神経における SP 陽性率は数および長さにおいてそれぞれ 44.2%および 44.9%にまで有意に増大した (Fig.10A および 10B)。以上の結果より、正常大腸粘膜において 5-HT<sub>3</sub> 受容体は主としてコリン作動性神経に発現していたが、大腸炎粘膜では 5-HT<sub>3</sub> 受容体は SP 陽性一次求心性知覚神経において発現が増大することが明らかになった。



**Figure 9. Changes in the number and length of 5-HT3 receptor (5-HT3R)- and VACht-positive nerve fibers in the colonic mucosa with or without DSS treatment.** Animals were exposed to 2.5% DSS for 7 days, and the expression of 5-HT3R and VACht was examined immunohistochemically. (A) Representative images showing the double staining for 5-HT3R (green) and VACht (red) in normal (DSS untreated) and control (DSS) mice. Scale bars: 20 μm. Arrows indicate double-positive nerve fibers, while arrow heads indicate nerve fibers that were single positive for 5-HT3R. (B) The numbers and lengths of nerve fibers positive for 5-HT3R and double positive for VACht and 5-HT3 receptors. Immunopositive nerve fibers were determined in 100 μm squares in normal and control mice, and data are presented as the mean ± S.E.M. for 5 mice per group. \*P < 0.05 for the comparison between normal and control mice.

Utsumi et al., *Br. J. Pharmacol.* **2016**, 173, 1835-1849.





**Figure 10. Changes in the number and length of 5-HT3 receptor (5-HT3R)- and SP-positive nerve fibers in the colonic mucosa with or without DSS treatment.** Animals were exposed to 2.5% DSS for 7 days, and the expression of 5-HT3R and SP was examined immunohistochemically. (A) Representative images showing the double staining for 5-HT3R (green) and SP (red) in normal (DSS untreated) and control (DSS) mice. Scale bars: 20 μm. Arrows indicate double-positive nerve fibers, while arrow heads indicate nerve fibers that were single positive for 5-HT3R. (B) The numbers and lengths of nerve fibers positive for 5-HT3R and double positive for SP and 5-HT3 receptors. Immunopositive nerve fibers were determined in 100 μm squares in normal and control mice, and data are presented as the mean ± S.E.M. for 5 mice per group. \*P < 0.05 for the comparison between normal and control mice.

Utsumi et al., *Br. J. Pharmacol.* **2016**, 173, 1835-1849.

## 第4節 考察

近年、内因性5-HTが消化管における炎症・免疫応答の調節に関与している可能性を報告されているが[13, 43-44]、その詳細については、5-HT受容体サブタイプとの関連も含めて不明な部分が多い。本章では、IBDの代表的な動物実験モデルであるDSS誘起大腸炎の病態における5-HTおよび5-HT<sub>3</sub>受容体の関与について、選択的5-HT<sub>3</sub>受容体拮抗薬を用いて検討した。5-HT<sub>3</sub>受容体拮抗薬であるラモセトロン<sup>®</sup>の投与は、2.5%DSS処置により誘起される体重減少、下痢・下血、MPO活性の上昇を伴う重篤な大腸炎を用量依存的かつ有意に抑制することを見出した。これらの結果は、5-HT<sub>3</sub>受容体拮抗薬がNSAIDや抗がん剤により誘起される小腸傷害や術後腸閉塞などの腸管の炎症性病変を改善するという当研究室を含む過去の報告と一致するものである [16, 18]。ゆえに、IBDの病態においても5-HT/5-HT<sub>3</sub>受容体が関与しているものと推察される。

IBDの病因および病態は未だ不明な部分が多いが、様々な炎症性メディエーターの関与、腸内細菌による免疫異常、遺伝的要因などが知られている [45-47]。DSS誘起大腸炎の病態においても、これら炎症性メディエーターや腸内細菌が関与していることが明らかになっている [48-50]。本章の検討において、DSS処置は大腸組織におけるTNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-17AおよびiNOS mRNA発現を著明に増大させたが、IFN- $\gamma$ およびIL-17A mRNA発現の増大は7日目に最大に達し、その後10日目にはそれらの増大は減弱した。一方、iNOSおよびTNF- $\alpha$  mRNA発現の増大は7日目以降も持続し、特にiNOS発現は10日目にはさらなる顕著な増大が観察された。同様な炎症性メディエーターの発現変化は、Nishikawa et al. [51] によっても報告されている。すなわち、IFN- $\gamma$ およびIL-17Aは免疫調節性サイトカインであり、それらの下流に位置するTNF- $\alpha$ などの炎症性サイトカインやiNOSなどの局所炎症に直接関連する炎症性メディエーターの調節に寄与しているものと推察される。実際、Iwakura et al. [52] は、これらの免疫調節性サイトカインが炎症性サイトカインやケモカインの産生を促進することにより炎症局所への白血球の遊走を促進することを明らかにしている。本章の検討において、DSS処置7日目におけるTNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-17AおよびiNOS mRNAの発現の増大はいずれも、ラモセトロンおよびオンダンセトロン<sup>®</sup>の投与により顕著に抑制された。これらの結果は、DSS誘起大腸炎の病態の進展・増悪には、5-HT/5-HT<sub>3</sub>受容体の活性化を介した炎症性メディエーター発現の増大が関与していることを示唆している。

最近、Margolis et al. [53] は、消化管炎症にはEC細胞由来の5-HTが重要であることを報告している。彼らは、TPH阻害薬の投与は消化管粘膜や血液中の5-HT含量を低下させるが、消化管の筋層間神経叢や脳内の5-HT含量には影響しないこと、またTPH阻害薬はトリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) 誘発大腸炎を抑制するが、消化管運動機能には影響しないことを明らかにした。さらに、大腸におけるEC細胞数がIBD患者 [54-55]、さらにはDSSやTNBSによ



り誘起される実験的大腸炎モデルにおいて増加していることが報告されている [14, 40, 56-57]。

当研究室の以前の検討においても、NSAID誘起小腸傷害の発生がTPH阻害薬により内因性5-HTを枯渇させた条件下では顕著に抑制されることを観察している [16]。本章の検討において、大腸粘膜における5-HT含有細胞（ほとんどはEC細胞であると考えられる）は、DSS処置により著明に増加し、その増加は7日目に最大に達したが、10日目には減少していた。10日目におけるEC細胞数の減少は、大腸炎の進展に伴い組織傷害が進行した結果、EC細胞が消失したことによるものと考えられる。しかし、大腸炎発症時におけるEC細胞の増加および5-HT遊離の機序については不明である。おそらく、腸内細菌やそれらの産生物、あるいは炎症性メディエーターなどによる可能性が指摘されているが [57-59]、この点についてはさらなる研究が必要である。

DSS誘起大腸炎の病態における5-HT/5-HT<sub>3</sub>受容体の役割をさらに解析するため、正常および大腸炎粘膜における5-HT<sub>3</sub>受容体の発現局在および変化を蛍光免疫染色により観察した。正常大腸粘膜においては、5-HT<sub>3</sub>受容体は主に粘膜下層の神経に局在しており、ごくわずかではあるが粘膜固有層に分布する細胞に発現していた。一方、大腸炎粘膜においては、5-HT<sub>3</sub>受容体陽性神経が正常粘膜と比較して、神経本数および長さともに有意に増加したが、粘膜固有層の5-HT<sub>3</sub>受容体陽性細胞数は何ら変化が認められなかった。この5-HT<sub>3</sub>受容体陽性細胞は、CD11b陽性であることから、マクロファージなどの炎症性細胞であると推察される。これらの結果は、大腸粘膜においては、5-HT<sub>3</sub>受容体は主に神経に発現しており、大腸炎発症時には5-HT<sub>3</sub>受容体陽性神経が増加することが判明した。当研究室の以前の検討では、小腸粘膜における5-HT<sub>3</sub>受容体は主に粘膜固有層に分布するマクロファージに発現しており、神経における発現はわずかであること観察している [18, 60]。したがって、5-HT<sub>3</sub>受容体の発現局在は小腸と大腸で異なっているものと推察されるが、部位により発現が異なる理由についてはさらなる検討が必要である。

5-HT<sub>3</sub>受容体発現神経を同定するため、蛍光免疫二重染色により検討した。正常大腸粘膜における5-HT<sub>3</sub>受容体のほとんどがVAcHt陽性、すなわちコリン作動性神経に発現しているが、大腸炎粘膜での5-HT<sub>3</sub>受容体陽性神経の増加はコリン作動性神経とは一致しなかった。一方、正常粘膜においては、5-HT<sub>3</sub>受容体発現はSP陽性一次求心性知覚神経にはわずかに認められるに過ぎなかったが、大腸炎粘膜における5-HT<sub>3</sub>受容体陽性神経の増加は、SP陽性一次求心性知覚神経とほぼ一致していた。Matsumoto et al. [61] は、大腸粘膜における5-HT<sub>3</sub>受容体陽性神経は主に脊髄および迷走神経求心路に発現していることを報告している。これらの結果より、DSS誘起大腸炎粘膜では、5-HT<sub>3</sub>受容体はSP陽性一次求心性知覚神経において発現が増大し、病態の進展・増悪に寄与しているものと推察される。また、炎症局所において遊離される神経成長因子（NGF）、5-HT、ヒスタミン、プロスタグランジンなどの炎症性メディエーターが神経線維における神経ペプチドや伝達物質の合成および放出を促進するこ

とが知られている [62-63]。すなわち、大腸炎粘膜における SP や 5-HT<sub>3</sub> 受容体陽性神経の増大はこれら炎症性メディエーターにより生じたものと推察される。

以上、本章では、DSS誘起大腸炎の病態に5-HT/5-HT<sub>3</sub>受容体が関与していることを明らかにした。大腸炎発症時には、EC細胞の増加に伴い5-HT放出が促進し、SP陽性一次求心性知覚神経に発現する5-HT<sub>3</sub>受容体の活性化を介して炎症性メディエーター発現を増大させることで、大腸炎の病態を進展・増悪させるものと推察される。

## 第5節 小括

本章では、IBD の動物実験モデルであるマウス DSS 誘起大腸炎の病態における 5-HT/5-HT<sub>3</sub> 受容体の役割を明らかにするため、5-HT<sub>3</sub> 受容体拮抗薬を用いて検討し、次の知見を得た。

1. DSS 誘起大腸炎に対して、5-HT<sub>3</sub> 受容体拮抗薬の投与は有意な抑制効果を発揮した。
2. 大腸炎発症時には、5-HT を含有する EC 細胞および 5-HT<sub>3</sub> 受容体陽性神経の増加が観察された。
3. 大腸炎発症時における 5-HT<sub>3</sub> 受容体陽性神経は主として SP 陽性一次知覚神経であった。
4. 以上の結果より、DSS 誘起大腸炎の病態に 5-HT/5-HT<sub>3</sub> 受容体が関与していることが判明した。大腸炎発症時には EC 細胞の増加に伴い 5-HT 放出が促進し、SP 陽性一次求心性知覚神経に発現する 5-HT<sub>3</sub> 受容体の活性化を介して炎症性メディエーター発現を増大させることで、大腸炎の病態を進展・増悪させるものと推察される。

## 第2章

### デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘起マウス大腸炎の病態におけるサブスタンス P/NK1 受容体の役割

#### 第1節 緒言

第1章において、DSS 誘起大腸炎が 5-HT<sub>3</sub> 受容体拮抗薬であるラモセトロンおよびオンダンセトロンの投与により有意に抑制されることを見出した。実際、DSS 処置による体重減少や下痢・下血などの全身症状、さらには肉眼的および組織学的大腸炎の程度に加えて、各種炎症性メディエーター発現の増大も 5-HT<sub>3</sub> 受容体拮抗薬により抑制された。これらの結果は、5-HT/5-HT<sub>3</sub> 受容体の活性化は炎症性メディエーター発現の増大を介して大腸炎の増悪・進展に関与している可能性を示唆している。さらに、大腸炎発症時には、5-HT<sub>3</sub> 受容体は SP 陽性一次知覚神経において発現が増大することを観察した。これらの知見は、大腸炎の病態修飾に、一次求心性知覚神経における 5-HT<sub>3</sub> 受容体の活性化を介して SP 放出の増大が関与している可能性を示唆している。

SP はタキキニンファミリーに属する神経ペプチドであり、NK1 受容体を介して消化管運動や血管透過性、上皮イオン輸送、さらには免疫応答など様々な機能調節に関与していることが知られている [61, 64-65]。IBD の病態との関連についても、NK1 受容体拮抗薬の投与が各種実験的大腸炎モデルにおいて抑制効果を発揮することが示されている [30-32]。ゆえに、SP/NK1 受容体は IBD の病態の進展・増悪に関与しているものと推察されるが、その機序については不明な部分が多い。Saria et al. [35] は、摘出ラット脊髄において、5-HT の処置が SP の放出を増大させることを報告している。この現象の 5-HT 受容体サブタイプとの関連については明らかになっていないが、5-HT が SP を放出させる作用を有していることを示唆しており、第1章の知見を支持するものである。また、消化管運動の調節における 5-HT/5-HT<sub>3</sub> 受容体-SP/NK1 受容体経路が関与していることも報告されている [33-35]。したがって、IBD の病態においても、5-HT/5-HT<sub>3</sub> 受容体-SP/NK1 受容体経路が関与している可能性が推察されるが、これまで両者の関連については不明である。

本章では、マウス DSS 誘起大腸炎の病態における SP/NK1 受容体の関与について、主として NK1 受容体拮抗薬を用いて検討した。さらに、SP/NK1 受容体と 5-HT<sub>3</sub>/5-HT<sub>3</sub> 受容体との関連を明らかにするため、免疫組織学的手法により、5-HT 陽性細胞および SP 陽性神経の変化、また NK1 受容体発現局在について検討した。

## 第2節 実験材料と方法

### 1. 実験動物

第1章に準ずる。

### 2. 使用薬物

NK1 受容体拮抗薬であるアプレピタント (EMEND<sup>®</sup>) は、小野薬品 (大阪) より購入した。アプレピタントは滅菌処理済 0.5% CMC 溶液で懸濁して使用した。薬剤は使用直前に調整し、0.1 mL/10 g 投与した。他の薬物については第1章に準ずる。

### 3. マウスデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘起大腸炎

DSS 誘起大腸炎モデルマウスは、2.5%DSS 溶液を9日間、給水ボトルを用いて自由飲水させることにより惹起させた。NK1 受容体拮抗薬であるアプレピタント (1 および 3 mg/kg) は1日1回腹腔内投与を、5-HT3 受容体拮抗薬であるラモセトロン (0.1 mg/kg) は1日2回経口投与を9日間行った。また、正常群 (Normal 群) には滅菌済水道水を自由飲水させ、同容量の 0.5%CMC を腹腔内投与した。また、対照群である DSS 単独処置群 (Control 群) にも同容量の 0.5%CMC を腹腔内投与した。

### 4. Disease activity index (DAI) スコアの評価

第1章に準ずる。

### 5. Myeloperoxidase (MPO) 活性の測定

第1章に準ずる。

### 6. 各種サイトカイン mRNA 発現の定量

第1章に準ずる。

### 7. 蛍光免疫組織染色

以下に、本章で用いた一次抗体および二次抗体を示す (Table 4 および 5)。

NK1 受容体の蛍光免疫染色は以下の方法で行った。すなわち、スライドガラス上の組織切片に 10% normal donkey serum を添加し、室温で1時間ブロッキングを行った。PBST で3回洗浄後、0.3%過酸化水素溶液 (和光純薬) を用いて内因性のペルオキシダーゼを失活させ、Avidin/Biotin Blocking Kit (VECTOR LABORATORIES) を用いてアビジンおよびビオチンをいずれも15分間処置した。PBST で3回洗浄後、1次抗体を添加し、室温で40時間インキュベートを行った。PBST で3回洗浄後、ビオチン標識二次抗体を添加し、1時間インキュベ

トした。PBST で3回洗浄後、VECTASTAIN Elite ABC standard Kit (VECTOR LABORATORIES) を用いてアビジン-ビオチン標識酵素複合体を形成させ、AMPLIFICATION DILUENT/FLUORESCCEIN TYRAMDE REAGENT FP1013 (PerkinElmer, Massachusetts, USA) を処置した。PBST で3回洗浄後、カバーガラスで固定および核染色 (DAPI) を行った (Hard Set Mounting Medium with DAPI; VECTOR LABORATORIES)。蛍光免疫組織学的観察は、第1章に準ずる。

Table 4. primary antibody

Target	Host	Consentration	Company
anti serotonin	goat	1:4000	Immunostar, Hudson, WI, USA
anti Substance P	guinea pig	1:4000	Abcam, Cambridge, UK
anti CD11b	rabbit	1:100	Calbiochem, Darmstadat, Germay
anti NK1 receptor	rabbit	1:50000	Millipore, Billerica, MA, USA

Table 5. secondary antibody

antibody	Consentration	Campany
fluorescein isothiocyanate-labelled donkey anti-rabbit	1:400	invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
tetramethyl rhodamine isothiocyanate-labelled donkey anti-guinea pig	1:400	invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
tetramethyl rhodamine isothiocyanate-labelled donkey anti-goat	1:400	invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
tetramethyl rhodamine isothiocyanate-labelled donkey anti-rat	1:400	invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
biotin-SP-conjugated donkey anti rabbit	1:400	Jackson ImmunoResearch LABORATORIES, West Grove, PA, USA

## 8. 大腸組織中の SP 含量の測定

DSS 処置 7 日目に大腸組織を採取し、冷 PBS で洗浄後、組織重量を測定した。PBS を溶媒として大腸組織をガラスホモジナイザーで均質化し、4℃、10 分、10,000 g で遠心分離した。上清中 SP の含量は、酵素免疫測定法 (ELISA; Cayman, Ann Arbor, MI, USA) により定量した。

## 9. 統計学的検討

第1章に準ずる。

### 第3節 結果

#### 1. DSS 誘起大腸炎に対する NK1 受容体拮抗薬の効果

2.5%DSS の自由飲水投与は、体重減少および下痢・下血を惹起し、DSS 処置 9 日目における DAI は  $11.2 \pm 0.5$  に達し、Normal 群 ( $0.0 \pm 0.0$ ) と比較して明らかに増大した (Fig. 11)。NK1 受容体拮抗薬であるアプレピタント (1 および 3 mg/kg) の 1 日 1 回腹腔内投与は、DSS 処置による DAI の増大を用量依存的かつ有意に抑制し、DAI はそれぞれ  $8.5 \pm 0.9$  および  $6.3 \pm 0.3$  であった。

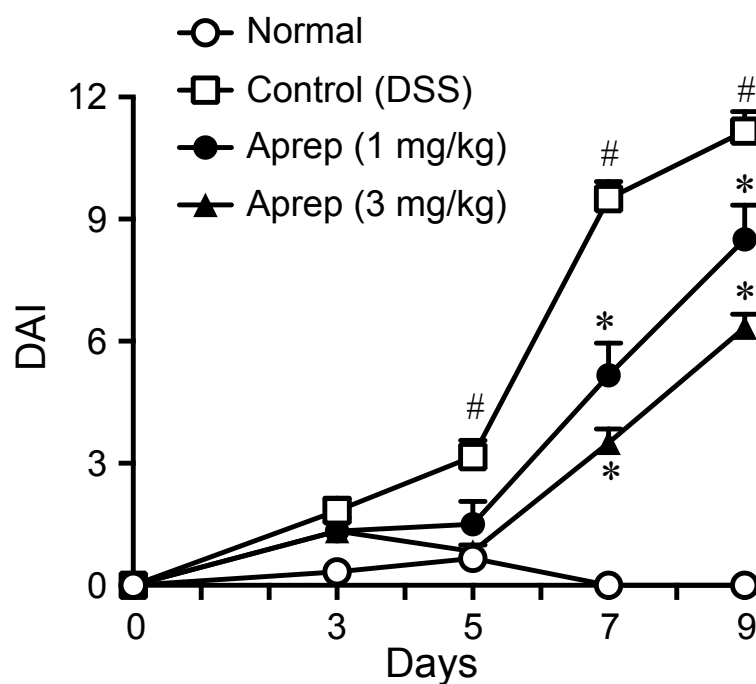
DSS 処置 9 日目には、Control 群では大腸粘膜への好中球浸潤の指標である大腸組織中 MPO 活性が  $0.09 \pm 0.12 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{mg protein}$  まで著明に増大したが、この増大はアプレピタント (3 mg/kg) の投与により  $0.04 \pm 0.02 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{mg protein}$  まで有意に抑制された (Fig. 12A)。

Normal 群の大腸の長さは  $6.4 \pm 0.3 \text{ cm}$  であったが、DSS 処置 9 日目には  $5.3 \pm 0.3 \text{ cm}$  まで短縮した。アプレピタント (1 および 3 mg/kg) の投与は、DSS 処置による大腸の短縮をそれぞれ  $5.3 \pm 0.3 \text{ cm}$  および  $6.0 \pm 0.3 \text{ cm}$  まで有意に抑制した (Fig. 12b)。

組織学的評価において、DSS 処置 9 日目の Control 群の大腸組織では、上皮の傷害、杯細胞の消失、粘膜の肥厚および高度の炎症性細胞の浸潤が観察され、組織学的スコアは  $3.5 \pm 0.3$  であった (Fig. 12C および 12D)。アプレピタント (1 および 3 mg/kg) の投与は、DSS 処置による組織学的傷害を 3 mg/kg の用量で有意に抑制し、1 および 3 mg/kg の用量における組織学的スコアはそれぞれ  $1.8 \pm 0.6$  および  $1.3 \pm 0.4$  であった。

DSS 処置 7 日目には、大腸粘膜 iNOS、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  および IL-17A mRNA の発現は著明に増大し、それぞれ Normal 群の  $12.0 \pm 3.6$ 、 $3.1 \pm 0.5$ 、 $6.6 \pm 2.7$  および  $31.8 \pm 12.7$  倍であった (Fig. 13)。これら増大は、アプレピタント (3 mg/kg) の投与により抑制され、それぞれ Normal 群の  $4.4 \pm 1.0$ 、 $1.5 \pm 0.2$ 、 $2.0 \pm 0.1$  および  $16.2 \pm 8.6$  倍であった。

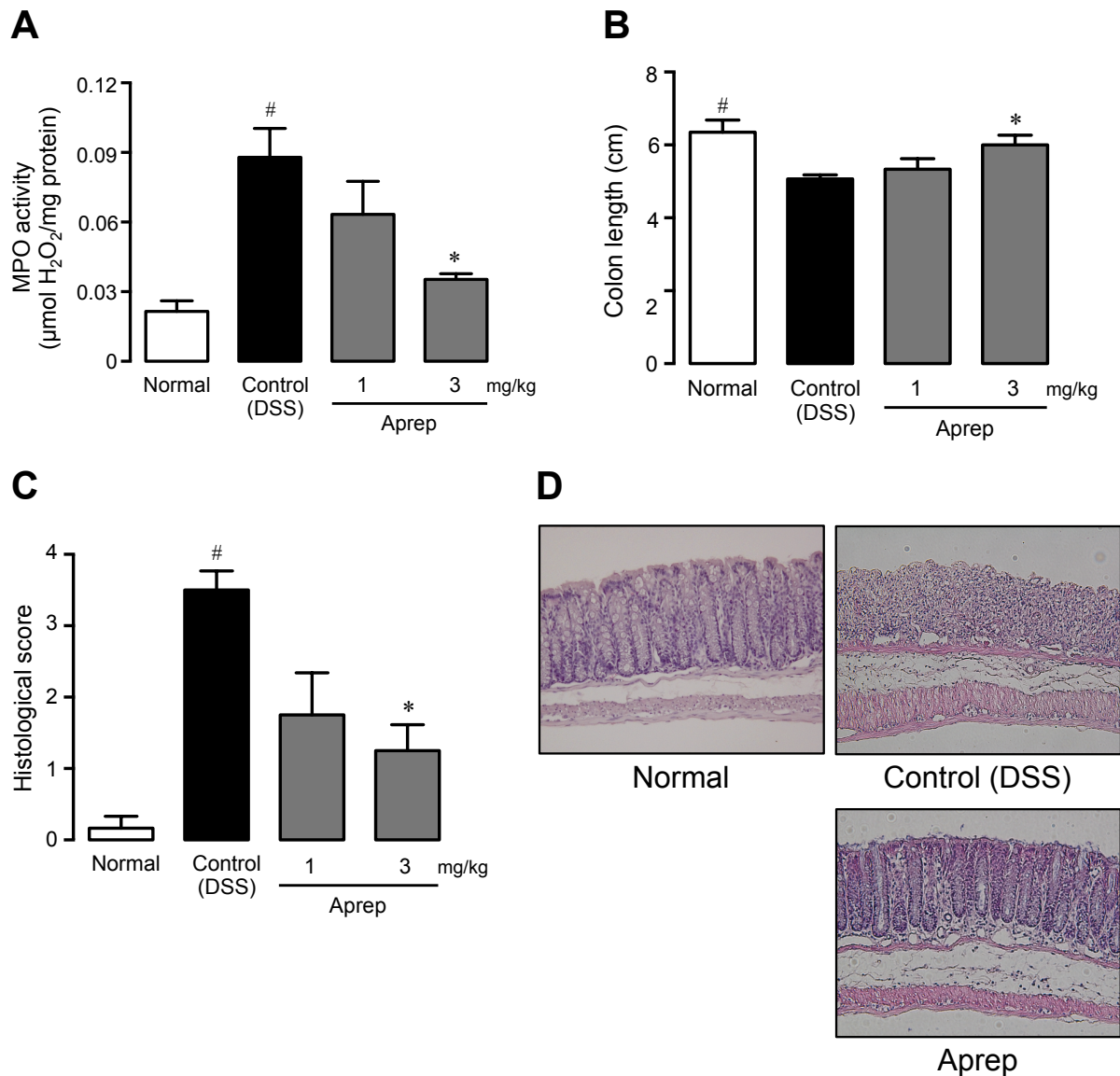
以上より、DSS 誘起大腸炎における体重減少、下痢・下血、組織学的傷害および好中球浸潤などの炎症反応は、NK1 受容体拮抗薬であるアプレピタントの投与により有意に抑制することが判明した。



**Figure 11. Effect of aprepitant (Aprep) on increase in DAI during DSS treatment.** Animals were exposed to 2.5% DSS for 9 days, while Aprep (1 and 3 mg/kg) was administered i.p. once daily. DAI was determined on days 0, 3, 5, 7 and 9. Data are presented as the mean  $\pm$  S.E.M. for 6 mice per group. \* $P < 0.05$  for the comparison with control mice (DSS); # $P < 0.05$  for the comparison with normal mice (DSS untreated).

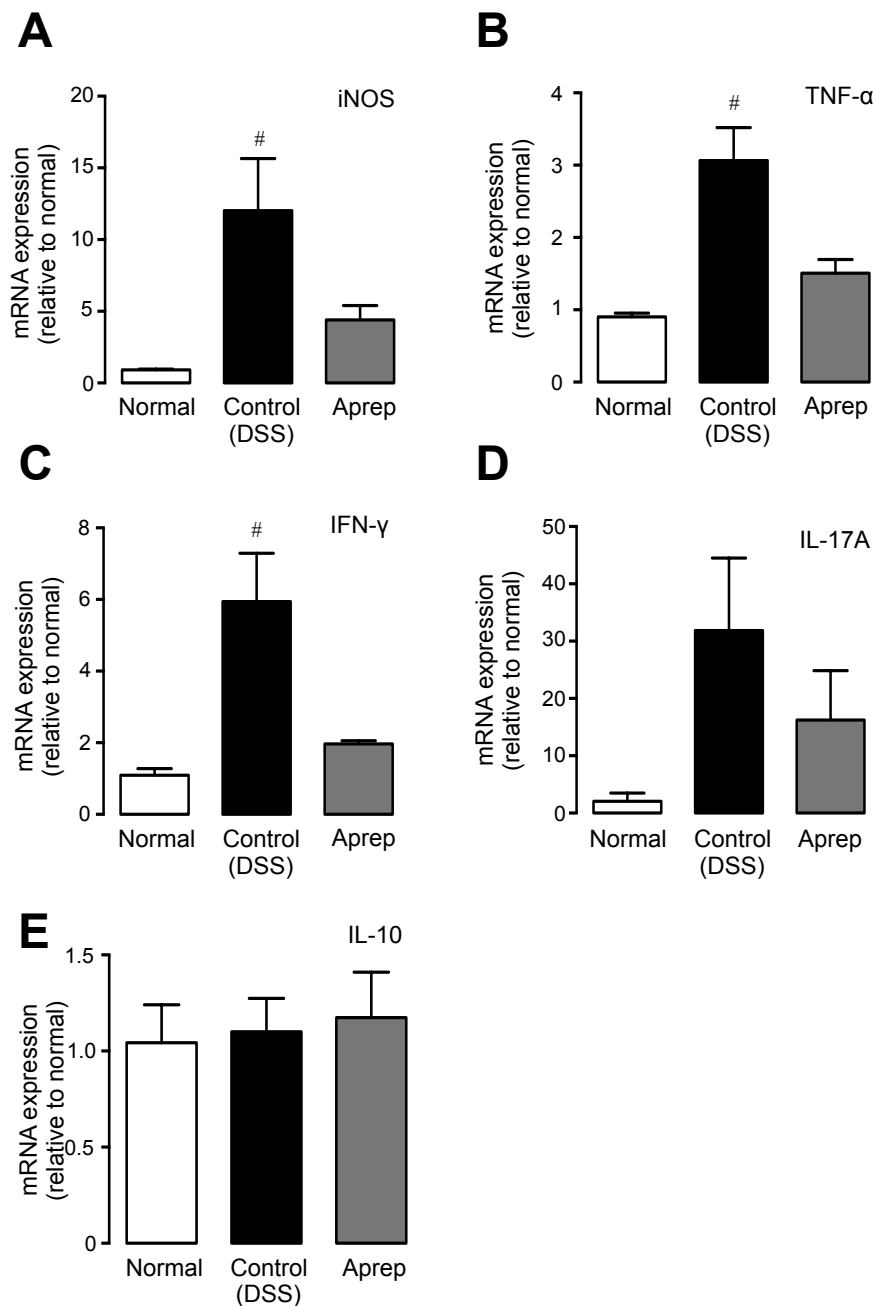
Utsumi et al., *Br. J. Pharmacol.* **2016**, 173, 1835-1849.





**Figure 12. Effect of aprepitant (Aprep) on DSS-induced increase in MPO activity, shortening of colon length, and histological damage.** Animals were exposed to 2.5% DSS for 9 days, while Aprep (1 and 3 mg/kg) was administered i.p. once daily. (A) MPO activity, (B) Colon length, and (C) histological score were examined on day 9. Data are presented as the mean  $\pm$  S.E.M. for 6 mice per group. \* $P < 0.05$  for the comparison with control mice (DSS); # $P < 0.05$  for the comparison with normal mice (DSS untreated). (D) Representative images of haematoxylin and eosin staining in the colon ( $\times 100$ ) on day 9 of the indicated treatments.

Utsumi et al., *Br. J. Pharmacol.* **2016**, 173, 1835-1849.



**Figure 13. Effect of aprepitant (Aprep) on DSS-induced expression of inflammatory mediators in the colon.** Animals were exposed to 2.5%DSS for 7 days, while Aprep (3 mg/kg) was administered i.p. once daily. The mRNA expression of (A) iNOS, (B) TNF- $\alpha$ , (C) IFN- $\gamma$ , (D) IL-17A, and (E) IL-10 was determined by real-time RT-PCR. Expression levels of each mRNA was standardized to that of  $\beta$ -actin mRNA and normalized to the mean value in normal (DSS untreated) mice. Data are presented as the mean  $\pm$  S.E.M. for 6 mice per group. \* $P < 0.05$  for the comparison with control (DSS); # $P < 0.05$  for the comparison with normal (DSS untreated) mice.

Utsumi et al., *Br. J. Pharmacol.* **2016**, 173, 1835-1849.

## 2. DSS 誘起大腸炎における SP 陽性神経、5-HT 陽性細胞および組織中 SP 含量の増加に対するラモセトロンおよびアプレピタントの効果

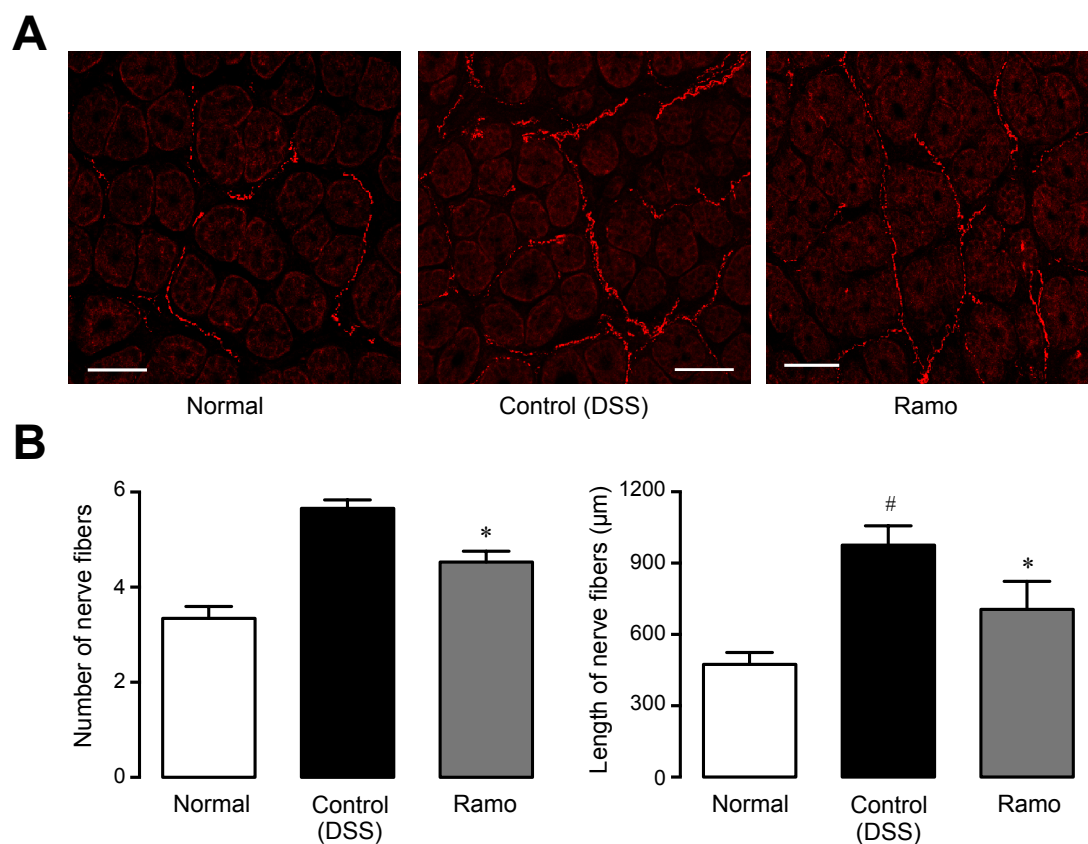
DSS 誘起大腸炎の病態における 5-HT/5-HT<sub>3</sub> 受容体および SP/NK1 受容体の関連を明らかにするため、大腸炎粘膜における SP 陽性神経、5-HT 陽性細胞および組織中 SP 含量の増加に対するラモセトロンおよびアプレピタントの影響について検討した。

正常大腸粘膜における SP 陽性神経の数および長さはそれぞれ  $3.3 \pm 0.1$  本および  $474.4 \pm 20.5 \mu\text{m}$  であった。DSS 処置 7 日目においては、SP 陽性神経は著明に増大し、数および長さにおいてそれぞれ  $5.7 \pm 0.2$  本および  $976.1 \pm 81.0 \mu\text{m}$  であった。DSS 処置による SP 陽性神経の増大はラモセトロン ( $0.1 \text{ mg/kg}$ ) の投与により有意に抑制され、数および長さにおいてそれぞれ  $4.5 \pm 0.1$  本および  $705.5 \pm 41.7 \mu\text{m}$  であった (Fig. 14A および B)。

正常大腸粘膜における 5-HT 陽性細胞は  $36.4 \pm 1.0$  個であり、DSS 処置 7 日目には  $79.4 \pm 1.3$  個まで増加した。DSS 処置による 5-HT 陽性細胞の増大は、アプレピタント ( $3 \text{ mg/kg}$ ) の投与によっては何ら影響を受けず、 $80.5 \pm 2.9$  個であった (Fig. 15A および B)。

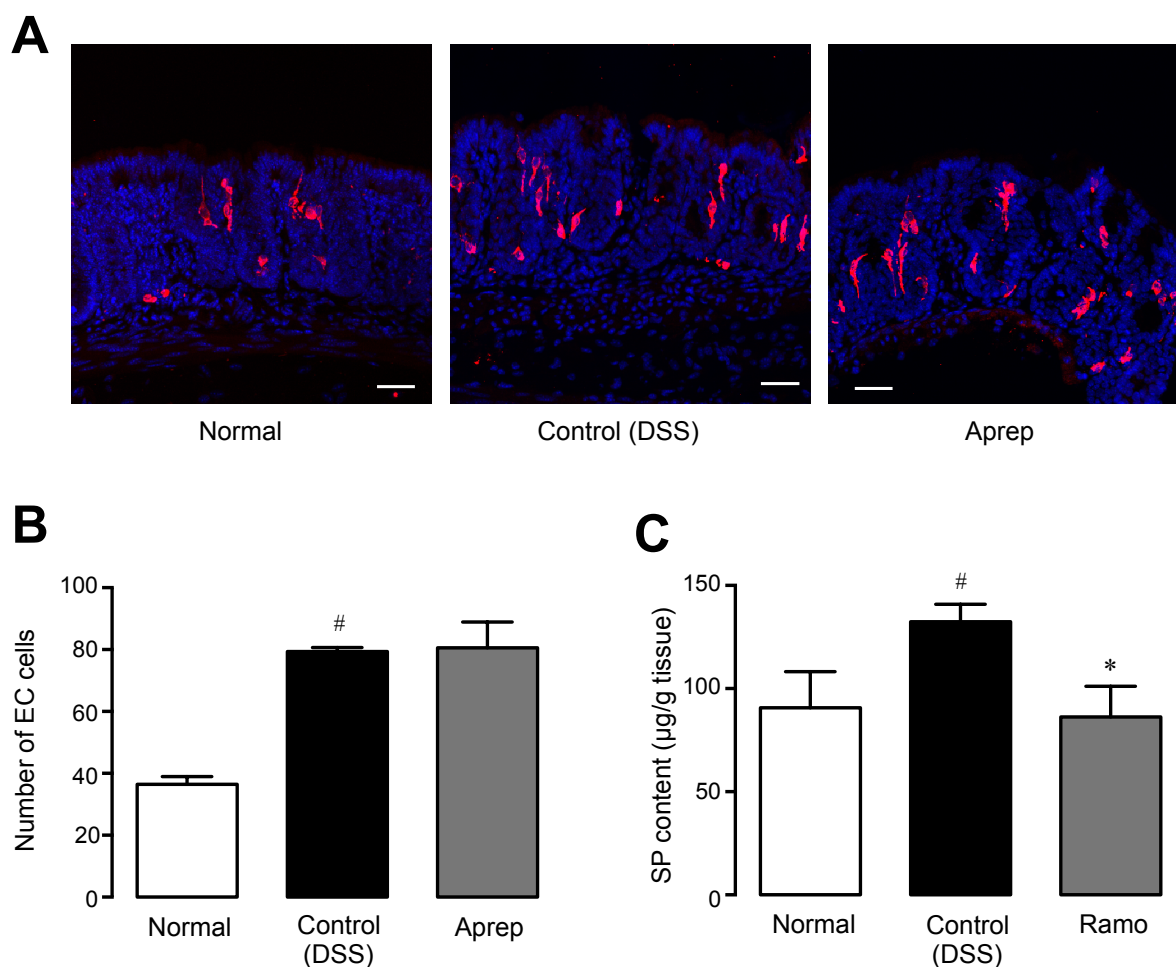
大腸粘膜の組織中 SP 含量は、正常レベルでは  $90.7 \pm 6.2 \mu\text{g/g tissue}$  であったが、DSS 処置 7 日目には  $132.4 \pm 8.5 \mu\text{g/g tissue}$  まで増大した。DSS 処置による組織中 SP 含量の増大はラモセトロン ( $0.1 \text{ mg/kg}$ ) の投与により  $86.2 \pm 5.3 \mu\text{g/g tissue}$  まで有意に低下した (Fig. 15C)。

以上の結果より、DSS 処置による SP 陽性神経の増大は、5-HT/5-HT<sub>3</sub> 受容体の活性化の結果生じることが明らかになった。すなわち、大腸炎発症時には、5-HT 産生の増加による一次求心性知覚神経上の 5-HT<sub>3</sub> 受容体の活性化を介して、SP 放出が増大し、大腸炎の病態が増悪・進展するものと推察される。



**Figure 14. Effects of ramosetron (Ramo) on DSS-induced increases in SP-positive nerve fibers in the colonic mucosa.** Animals were exposed to 2.5% DSS for 7 days while Ramo (0.1 mg/kg) was administered p.o. twice daily. (A) Representative images showing immunohistochemical detection of SP, scale bars: 20 μm. (B) The total numbers and lengths of SP-positive nerve fibers were determined in 100 μm squares on horizontal section. Data are presented as mean ± S.E.M. for 7–8 mice per group. \* $P < 0.05$  for the comparison with control (DSS); # $P < 0.05$  for the comparison with normal (DSS untreated) mice.

Utsumi et al., *Br. J. Pharmacol.* **2016**, 173, 1835-1849.

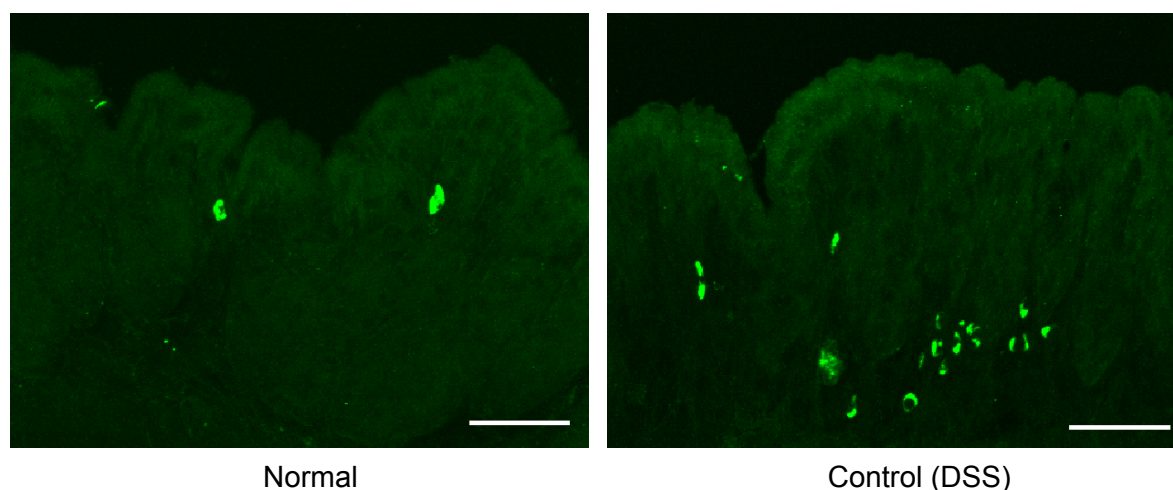


**Figure 15. Effects of ramosetron (Ramo) and aprepitant (Aprep) on DSS-induced increases in 5-HT-positive cells and SP contents in the colonic mucosa.** Animals were exposed to 2.5% DSS for 7 days while Aprep (3 mg/kg) was administered i.p. once daily. (A) Representative images showing immunohistochemical detection of 5-HT. Scale bars: 50  $\mu$ m. (B) The number of 5-HT-positive (EC) cells were determined in a 1 mm length. (C) The colonic SP content was determined by enzyme immunoassay. Data are presented as mean  $\pm$  S.E.M. for 7–8 mice per group. \* $P < 0.05$  for the comparison with control (DSS); # $P < 0.05$  for the comparison with normal (DSS untreated) mice.

Utsumi et al., *Br. J. Pharmacol.* **2016**, 173, 1835-1849.

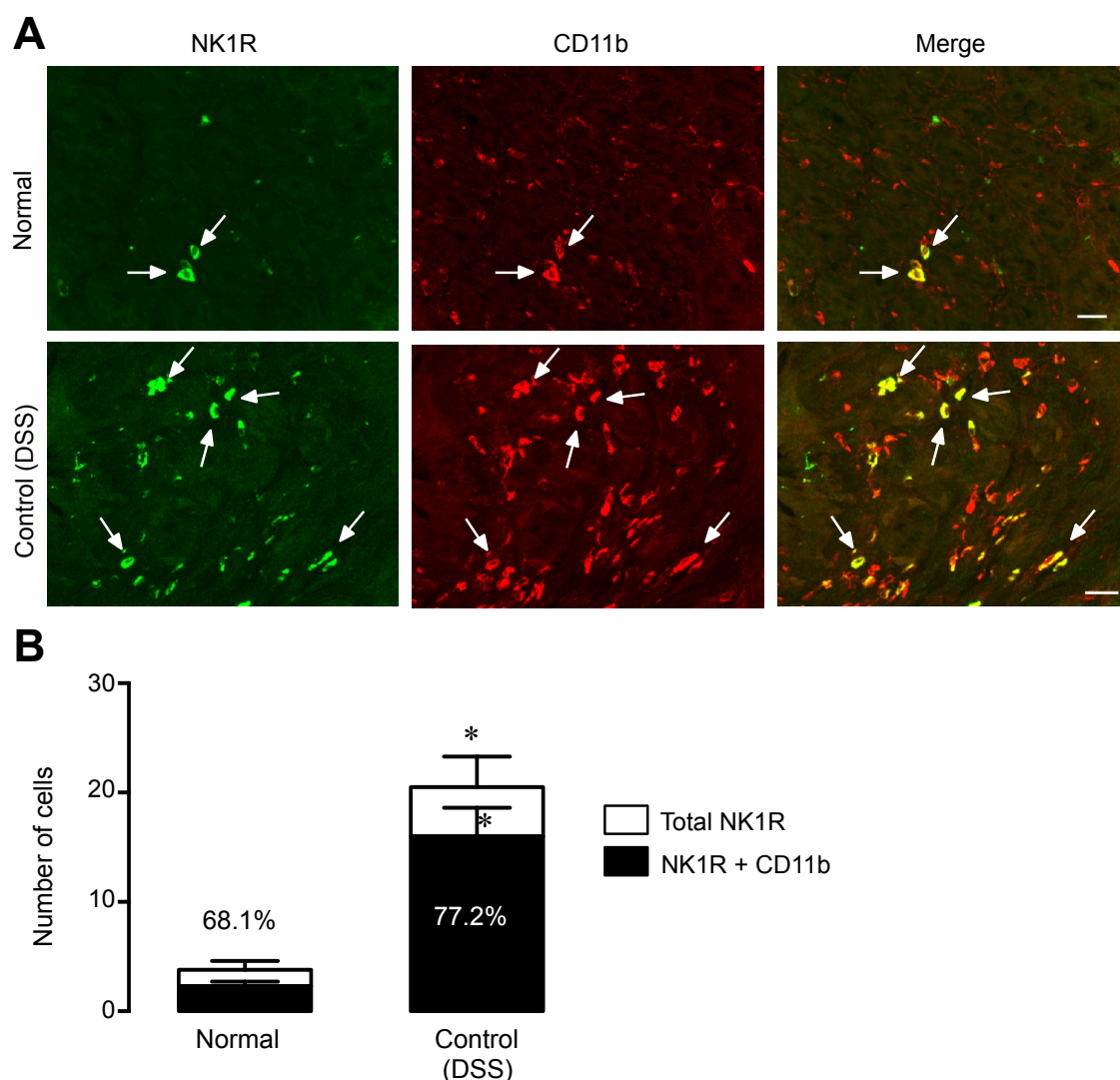
### 3. 大腸粘膜における NK1 受容体の局在

NK1 受容体の発現局在を免疫組織学的に検討した。正常大腸粘膜において、NK1 受容体の発現は主に粘膜固有層に分布する細胞に観察された (Fig. 16)。DSS 処置 7 日目では、大腸粘膜固有層に分布する NK1 受容体陽性細胞数は正常粘膜と比較して顕著に増加した。NK1 受容体陽性細胞を同定するため、マクロファージなど炎症性細胞のマーカーである CD11b と蛍光二重免疫染色を行ったところ、正常大腸粘膜では 68.1%の NK1 受容体陽性細胞が CD11b と共局在していた (Fig. 17A および B)。DSS 処置 7 日目においては、NK1 受容体および CD11b 陽性細胞はいずれも著明に増加し、77.2%の NK1 陽性細胞が CD11b 陽性であり、共局在の割合に変化はなかった。



**Figure 16. Expression of NK1 receptors (NK1R) in the colonic mucosa.** Animals were exposed to 2.5% DSS for 7 days, and the expression of NK1R was examined immunohistochemically. Expression of NK1R in the colonic mucosa of normal (DSS untreated) and control (DSS) mice on transverse section. Scale bars: 20  $\mu$ m.

Utsumi et al., *Br. J. Pharmacol.* **2016**, 173, 1835-1849.



**Figure 17. Characterization of NK1 receptors (NK1R) in the colonic mucosa.** Animals were exposed to 2.5% DSS for 7 days, and the expression of NK1R was examined immunohistochemically. (A) Double staining of NK1 receptors (green) and CD11b (red) in the colonic mucosa of normal (DSS untreated) and control (DSS treated) mice on horizontal section. Scale bars: 20  $\mu$ m. (B) The number of cells positive for NK1R and double positive for NK1R and CD11b were determined in 100  $\mu$ m squares in normal and control mice. The number of double-positive cells is also expressed as a percentage of the total number of NK1R-positive cells. Data are presented as the mean  $\pm$  S.E.M. for 6 mice per group. Statistical analyses were performed using Student's t-test. \* $P < 0.05$  for the comparison between normal and control mice.

Utsumi et al., *Br. J. Pharmacol.* **2016**, 173, 1835-1849.



## 第4節 考察

SPがIBDの病態に関与していることはこれまでも報告されている。実際、IBD患者および実験的大腸炎モデルの大腸においてSPが増大すること [66-67]、またNK1受容体拮抗薬の投与が大腸炎を抑制することが報告されている [30-32]。本章の検討においても、臨床において抗がん剤による嘔吐に対して使用されているNK1受容体拮抗薬であるアプレピタントの投与が、DSS処置によるDAIおよびMPO活性の増大、大腸の短縮を伴う大腸炎を用量依存的かつ有意に抑制することを観察した。また、DSS処置による大腸粘膜におけるiNOS、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ およびIL-17Aなどの炎症性メディエーター発現の増大もまたアプレピタントの投与により有意に抑制された。これらの結果は、DSS誘起大腸炎の病態に5-HT/5-HT3受容体と同様にSP/NK1受容体に関与していることを示唆している。

第1章の検討において、大腸炎粘膜では5-HT3受容体が発現したSP陽性一次求心性知覚神経が顕著に増加することを認めている。この結果は、5-HT/5-HT3受容体を介して一次求心性知覚神経からのSP遊離が促進する可能性を示唆している。そこで、5-HT/5-HT3受容体とSP/NK1受容体の関連を明らかにするため、大腸炎粘膜における5-HT含有EC細胞、SP陽性神経およびSP含量の増加に対する5-HT3受容体拮抗薬およびNK1受容体拮抗薬の影響を検討した。DSS処置7日目における大腸粘膜SP陽性神経およびSP含量の増加はいずれもラモセトロン投与により有意に抑制された。一方、EC細胞の増加はアプレピタントの投与によっては何ら影響を受けなかった。これらの結果は、5-HT/5-HT3受容体の下流にSP/NK1受容体が存在することを示唆している。すなわち、大腸炎発症時には、EC細胞の増加、5-HT3受容体およびNK1受容体陽性一次求心性知覚神経が増大しており、産生増加した5-HTが一次求心性知覚神経における5-HT3受容体の活性化を介してSP放出を増大させることで、病態がさらに進展・増悪するものと推察される。

NK1受容体は、腸管神経叢やカハール細胞、上皮細胞、血管、さらには免疫細胞に発現していることが報告されている [68]。Matsumoto et al [60] は、NK1受容体が小腸の粘膜固有層のCD11b陽性炎症性細胞（主としてマクロファージ）に存在しており、さらに5-FU誘起腸炎の発症時にはNK1受容体陽性細胞数が増加することを報告している。本章の検討においても、大腸粘膜におけるNK1受容体の発現のほとんどは、粘膜固有層に分布するCD11b陽性細胞であることを確認した。さらに、大腸炎発症時にはこれらの細胞は顕著に増加することを観察した。したがって、大腸炎発症時に増大したSPは、マクロファージに発現するNK1受容体を介して炎症性メディエーター産生を促進させる可能性が推察される。実際、SPがNK1受容体を介してマクロファージからのTNF- $\alpha$ などの炎症性メディエーター産生を促進することが報告されている [69]。

以上、本章では、DSS誘起大腸の病態に5-HT/5-HT3受容体と同様にSP/NK1受容体に関与することが判明した。大腸炎発症時には、EC細胞の増加により5-HT産生が増大し、一次求心性



知覚神経の5-HT<sub>3</sub>受容体を介してSP放出が増大するものと推察される。このSPは、マクロファージのNK1受容体を介して炎症性メディエーター産生を促進し、大腸炎の病態がさらに進展・増悪するものと考えられる。

## 第5節 小括

本章では、DSS 誘起大腸炎の病態における SP/NK1 受容体の役割、さらには 5-HT/5-HT3 受容体との関連を明らかにするため、NK1 受容体拮抗薬および 5-HT3 受容体拮抗薬を用いて検討し、次の知見を得た。

1. DSS 誘起大腸炎の病態に対して、NK1 受容体拮抗薬の投与は有意な抑制効果を発揮した。
2. 大腸炎発症時における SP 陽性神経および SP 含量の増加は、5-HT3 受容体拮抗薬の投与により有意に抑制されたのに対し、EC 細胞の増加は NK1 受容体拮抗薬によっては何ら影響を受けなかった。
3. 大腸粘膜における NK1 受容体の発現は、主としてマクロファージであり、これは大腸炎発症時には顕著に増加した。
4. 以上の結果より、DSS 誘起大腸炎の病態に 5-HT/5-HT3 受容体と同様に、SP/NK1 受容体が関与していることが判明した。大腸炎発症時には、5-HT3 受容体を介して一次求心性知覚神経からの SP 放出が増大し、マクロファージの NK1 受容体を介して炎症性メディエーター産生が促進され、病態がさらに進展・増悪するものと推察される。

## 総括

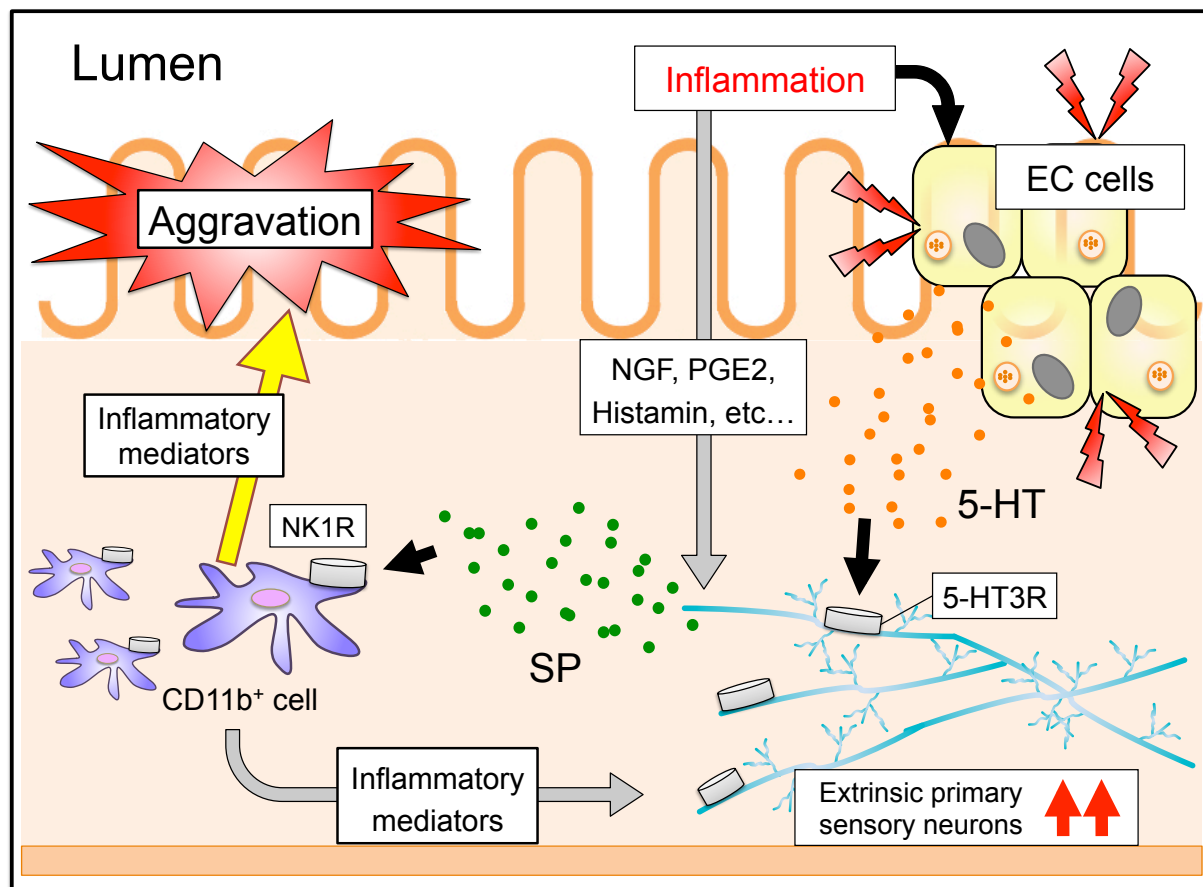
本研究では、IBD の病態における 5-HT/5-HT3 受容体および SP/NK1 受容体の役割について、IBD の代表的な動物実験モデルであるマウス DSS 誘起大腸炎モデルにおいて、それぞれの受容体に対する選択的拮抗薬を用いて検討した。

第 1 章では、DSS 誘起大腸炎が 5-HT3 受容体拮抗薬であるラモセトロンおよびオンダンセトロン投与により抑制されることを明らかにした。また、大腸炎粘膜においては、5-HT 含有 EC 細胞および 5-HT3 受容体陽性神経の増加が観察された。5-HT3 受容体陽性神経は、正常時には主として VACHT 陽性コリン作動性神経であったが、大腸炎発症時には特に SP 陽性一次求心性知覚神経で増加した。以上の結果より、DSS 誘起大腸炎の病態に 5-HT/5-HT3 受容体が関与していることが判明した。大腸炎発症時には EC 細胞の増加に伴い 5-HT 放出が促進し、SP 陽性一次求心性知覚神経に発現する 5-HT3 受容体の活性化を介して炎症性メディエーター発現を増大させることで、大腸炎の病態を進展・増悪させるものと推察される。

第 2 章では、DSS 誘起大腸炎が 5-HT3 受容体拮抗薬と同様に、NK1 受容体拮抗薬であるアプレピタントの投与により有意に抑制されることを明らかにした。また、大腸炎発症時における SP 陽性神経および SP 含量の増加は、5-HT3 受容体拮抗薬の投与により有意に抑制された。一方、大腸炎発症時における EC 細胞の増加は、NK1 受容体拮抗薬の投与によっては何ら影響を受けなかった。大腸粘膜における NK1 受容体の発現は主として粘膜固有層に分布する CD11b 陽性マクロファージであり、これらは大腸炎発症時には顕著に増加した。以上の結果より、DSS 誘起大腸炎の病態に 5-HT/5-HT3 受容体と同様に、SP/NK1 受容体が関与していることが判明した。大腸炎発症時には、5-HT3 受容体を介して一次求心性知覚神経からの SP 放出が増大し、マクロファージの NK1 受容体を介して炎症性メディエーター産生が促進され、病態がさらに進展・増悪するものと推察される。

第 1 章および第 2 章で得られた結果より、DSS 誘起大腸炎の病態に 5-HT/5-HT3 受容体および SP/NK1 受容体が関与していることが判明した。大腸炎発症時には、EC 細胞の増加に伴い 5-HT 産生が増大し、一次求心性知覚神経に発現する 5-HT3 受容体を活性化することで SP 放出が促進される。SP はマクロファージに発現する NK1 受容体を活性化することにより、炎症性メディエーター産生を促進し、大腸炎の病態をさらに進展・増悪するものと推察される (Fig. 18)。すなわち、大腸炎の病態は、5-HT/5-HT3 受容体-SP/NK1 受容体経路を介して進展・増悪するものと考えられる。5-HT3 受容体拮抗薬および NK1 受容体拮抗薬は、現在臨床において抗がん剤による嘔吐の抑制や IBS の治療などに使用されている。したがって、本研究成果は、IBD の病態解明のみならず、既存医薬品の適応拡大という、育薬の観点からも興

味深いものである。



**Figure 18.** Schematic representation of 5-HT/5-HT3–SP/NK1 receptor pathways in the pathogenesis of DSS-induced colitis. DSS upregulates the expression of 5-HT3 receptors in SP-positive non-cholinergic sensory afferent nerve fibres. Therefore, it is possible that 5-HT released from EC cells may act via 5-HT3 receptors to increase SP release from sensory afferent nerve fibres in DSS-induced colitis. Then, SP released from sensory afferent nerve fibres may aggravate colonic inflammation via NK1 receptor on a CD11b<sup>+</sup> cells with upregulation of various inflammatory mediators.

## 引用文献

1. Natalie A. Molodecky, Ing Shian Soon, Doreen M. Rabi, William A. Ghali, Mollie Ferris, Greg Chernoff, Eric I. Benchimol, Remo Panaccione, Subrata Ghosh, Herman W. Barkema, Gilaad G. Kaplan. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology*. **2012**, 142, 46–54, e42, quiz e30.
2. Arthur Kaser, Sebastian Zeissig, Richard S. Blumberg. Inflammatory bowel disease. *Annu. Rev. Immunol.* **2010**, 28: 573–621.
3. Miles Berger, John A. Gray, Bryan L. Roth. The expanded biology of serotonin. *Annu. Rev. Med.* **2009**, 60, 355–366.
4. Nicholas J Talley. Serotonergic neuroenteric modulators. *Lancet*. **2011**, 358, 2061–2068.
5. Jason Hannon, Daniel Hoyer. Molecular biology of 5-HT receptors. *Behav. Brain. Res.* **2008**, 195, 198–213.
6. Färber Lothar, Haus Ulrike, Spath Michael, Drechsler Sabine. Physiology and pathophysiology of the 5-HT<sub>3</sub> receptor. *Scand. J. Rheumatol. Suppl.* **2004**, 119, 2–8.
7. Mark Berner Hanser. The enteric nervous system III: a target for pharmacological treatment. *Pharmacol. Toxicol.* **2003**, 93, 1–13.
8. Meyer B Jackson, Jerrel L Yakel. The 5-HT<sub>3</sub> receptor channel. *Annu. Rev. Physiol.* **1995**, 57, 447–468.
9. Ajith K. Siriwardena, Misra R. Budhoo, Elise P. Smith, John M. Kellum. A 5-HT<sub>3</sub> receptor agonist induces neurally mediated chloride transport in rat distal colon. *J. Surg. Res.* **1993**, 55, 55–59.
10. Shin Fukudo, Motoko Ida, Hiraku Akiho, Yoshihiro Nakashima, Kei Matsueda. Effect of ramosetron on stool consistency in male patients with irritable bowel syndrome with diarrhea. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **2014**, 12, 953–959, e954.
11. Christopher M. Kozlowski, Andrew Green, David Grundy, Fiona M. Boissonad, Chas Bountra. The 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonist alosetron inhibits the colorectal distention induced depressor response and spinal c-fos expression in the anaesthetised rat. *Gut*. 2000, 46, 474–480.
12. Masaru Minami, Masahiro Nemoto, Toru Endo, Naoya Hamaue, Yasuko Kohno. Effects of talipexole on emesis-related changes in abdominal afferent vagal activity and ileal serotonin

- metabolism in rats. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* **1997**, 95, 67–82.
13. Jean–Eric Ghia, Nan Li, Huaqing Wang, Matthew Collins, Yikang Deng, Rami T. El–Sharkawy, Francine Côté, Jacques Mallet and Waliul I. Khan. Serotonin has a key role in pathogenesis of experimental colitis. *Gastroenterology*. **2009**, 137, 1649–1660.
  14. David R. Linden, Jing-Xian Chen, Michael D. Gershon, Keith A. Sharkey, Gary M. Mawe. Serotonin availability is increased in mucosa of guinea pigs with TNBS-induced colitis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.* **2003**, 285, G207–G216.
  15. Matthew D. Coates, Christine R. Mahoney, David R. Linden, Joanna E. Sampson, Jason Chen, Hagen Blaszyk, Michael D. Crowell, Keith A. Sharkey, Michael D. Gershon, Gary M. Mawe, and Peter L. Moses. Molecular defects in mucosal serotonin content and decreased serotonin reuptake transporter in ulcerative colitis and irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*. **2004**, 126, 1657–1664.
  16. Magdy El-Salhy, Åke Danielsson, Roger Stenling, Lars Grimelius. Colonic endocrine cells in inflammatory bowel disease. *J. Intern. Med.* **1997**, 242, 413–419.
  17. Shinichi Kato, Narumi Matsuda, Kenjiro Matsumoto, Mai Wada, Naoki Onimaru, Masashi Yasuda, Kikuko Amagase, Syunji Horie, Koji Takeuchi. Dual role of serotonin in the pathogenesis of indomethacin-induced small intestinal ulceration: pro-ulcerogenic action via 5-HT<sub>3</sub> receptors and anti-ulcerogenic action via 5-HT<sub>4</sub> receptors. *Pharmacol. Res.* **2012**, 66, 226–234.
  18. Masashi Yasuda, Shinichi Kato, Naoki Yamanaka, Maho Iimori, Kenjiro Matsumoto, Daichi Utsumi, Yumeno Kitahara, Kikuko Amagase, Syunji Horie, Koji Takeuchi. 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonists ameliorate 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis by suppression of apoptosis in murine intestinal crypt cells. *Br. J. Pharmacol.* **2013**, 168, 1388–1400.
  19. Yasutake Shimizu, Hayato Matsuyama, Takahiko Shiina, Tadashi Takewaki John B. Furness. Tachykinins and their functions in the gastrointestinal tract. *Cell. Mol. Life. Sci.* **2008**, 65, 295–311.
  20. Jocelyn N Pennefather, Alessandro Lecci, M.Luz Candenas, Eva Patak, Francisco M Pintor, Carlo Alberto Maggi. Tachykinins and tachykinin receptors: a growing family. *Life. Sci.* **2004**, 74, 1445–1463.
  21. Martin S. Steinhoff, Bengt von Mentzer, Pierangelo Geppetti, Charalabos Pothoulakis, Nigel W.

- Bunnett. Tachykinins and their receptors: contributions to physiological control and the mechanisms of disease. *Physiol. Rev.* **2014**, 94, 265–301.
22. Selena Harrison, Pierangelo Geppetti. Substance p. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **2001**, 33, 555–576.
  23. Prasanna Datar, Sudha Srivastava, Evans Coutinho, Girjesh Govil. Substance P: structure, function, and therapeutics. *Curr. Top. Med. Chem.* **2004**, 4, 75–103.
  24. Dionne Okafor, Alan David Kaye, Rachel J Kaye and Richard D Urman. The role of neurokinin-1 (substance P) antagonists in the prevention of postoperative nausea and vomiting. *J. Anaesthesiol. Clin. Pharmacol.* **2017**, 33, 441-445.
  25. Masae Ikeda, Masako Shida, Takeshi Hirasawa, Toshinari Muramatsu, Mikio Mikami. Efficacy of the oral neurokinin-1 receptor antagonist aprepitant for nausea and vomiting induced by cisplatin and carboplatin in Japanese patients with gynecological cancer. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* **2017**, 43, 1613-1620.
  26. Paul J. Hesketh, Steven M. Grunberg, Richard J. Gralla, David G. Warr, Fausto Roila, Ronald de Wit, Sant P. Chawla, Alexandra D. Carides, Juliana Ianus, Mary E. Elmer, Judith K. Evans, Klaus Beck, Scott Reines, Kevin J. Horgan. The oral neurokinin-1 antagonist aprepitant for the prevention of chemotherapy-induced nausea and vomiting: a multinational, randomized, double-blind, placebo-controlled trial in patients receiving high-dose cisplatin--the Aprepitant Protocol 052 Study Group. *J. Clin. Oncol.* **2003**, 21, 4112-4119.
  27. Terence M. O'Connor, Joseph O'Connell, Darren I. O'Brien, Triona Goode, Charles P. Bredin, and Fergus Shanahan. The role of substance P in inflammatory disease. *J. Cell. Physiol.* **2004**, 201, 167–180.
  28. Hon Wai Koon and Charalabos Pothoulakis. Immunomodulatory properties of substance P: the gastrointestinal system as a model. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2006**, 1088, 23–40.
  29. Matthias A. Engel, Andreas Leffler, Florian Niedermirtl, Alexandru Babes, Katharina Zimmermann, Miloš R. Filipović, Iwona Izydorczyk, Mirjam Eberhardt, Tatjana I. Kichko, Sonja M. Mueller-Tribbensee, Mohammad Khalil, Norbert Siklosi, Carla Nau, Ivana Ivanović–Burmazović, Winfried L. Neuhuber, Christoph Becker, Markus F. Neurath, Peter W. Reeh. TRPA1 and substance P mediate colitis in mice. *Gastroenterology.* **2011**, 141, 1346-1358.
  30. Triona Goode, Joe O'Connell, Peter Anton, Helen Wong, Gerald C. O'Sullivan, J. Kevin Collins,

- Fergus Shanahan. Neurokinin-1 receptor expression in inflammatory bowel disease: molecular quantitation and localisation. *Gut*. **2000**, 47, 387-396.
31. Matthias A. Engel, Becker Christoph, Reeh Peter W, Neurath Markus F. Role of sensory neurons in colitis: increasing evidence for a neuroimmune link in the gut. *Inflamm. Bowel. Dis.* **2011**, 17, 1030–1033.
  32. Gad Monika, Elm Pedersen Anders, Ny Kristensen Nanna, de Felipe Fernandez Carmen, Claesson Mogens H. Blockage of the neurokinin 1 receptor and capsaicin-induced ablation of the enteric afferent nerves protect SCID mice against Tcell-induced chronic colitis. *Inflamm. Bowel. Dis.* **2009**, 15, 1174–1182.
  33. Anneke Rijnierse, Kim M.F. van Zijl, Andries S. Koster, Frans P. Nijkamp, Aletta D. Kraneveld. Beneficial effect of tachykinin NK1 receptor antagonism in the development of hapten-induced colitis in mice. *Eur. J. Pharmacol.* **2006**, 548, 150–157.
  34. Javier Ramírez, Edurne Cenarruzabeitia, Joaquín Del Río, Berta Lasheras. Involvement of neurokinins in the non-cholinergic response to vactivation of 5-HT3 and 5-HT4 receptors in guinea-pig ileum. *Br. J. Pharmacol.* **1994**, 111, 419–424.
  35. Alois Saria, Friedrich Javorsky, Christian Humpel, Rainer Gamse. Endogenous 5-hydroxytryptamine modulates the release of tachykinins and calcitonin gene-related peptide from the rat spinal cord via 5-HT3 receptors. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1991**, 632, 464–465.
  36. Mayumi Yamano, Keiji Miyata. Investigation of 5-HT3 receptormediated contraction in guinea-pig distal colon. *Eur. J. Pharmacol.* **1996**, 317, 353–359.
  37. John C McGrath, Elliot Lilley. Implementing guidelines on reporting research using animals (ARRIVE etc.): new requirements for publication in BJP. *Br. J. Pharmacol.* **2015**, 172, 3189–3193.
  38. Stefan Wirtz, Clemens Neuffer, Benno Weigmann, Markus F Neurath. Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. *Nat. Protoc.* **2007**, 2, 541–546.
  39. Jean-Eric Ghia, Patricia Blennerhassett, and Stephen M. Collins. Impaired parasympathetic function increases susceptibility to inflammatory bowel disease in a mouse model of depression. *J. Clin. Invest.* **2008**, 118, 2209–2218.
  40. Peter P. Bradley, Dennis A. Priebe, Robert D. Christensen, Gerald Rothstein. Measurement of Cutaneous Inflammation: Estimation of Neutrophil Content with an Enzyme Marker. *J. Invest.*



*Dermatol.* **1982**, 78, 206-209.

41. Kenjiro Matsumoto, Emi Kurosawa, Hiroyuki Terui, Takuji Hosoya, Kimihito Tashima, Toshihiko Murayama, John V. Priestley, Syunji Horie. Localization of TRPV1 and contractile effect of capsaicin in mouse large intestine: high abundance and sensitivity in rectum and distal colon. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.* **2009**, 297, G348–G360.
42. Michael J Curtis, Richard A Bond, Domenico Spina, Amrita Ahluwalia, Stephen P A Alexander, Mark A Giembycz, Annette Gilchrist, Daniel Hoyer, Paul A Insel, Angelo A Izzo, Andrew J Lawrence, David J MacEwan, Lawrence D F Moon, Sue Wonnacott, Arthur H Weston, John C McGrath. Experimental design and analysis and their reporting: new guidance for publication in BJP. *Br. J. Pharmacol.* **2015**, 172, 3461–3471.
43. Nan Li, Jean-Eric Ghia, Huaping Wang, Jessica McClemens, Francine Cote, Youko Suehiro, Jacques Mallet, Waliul I. Khan. Serotonin activates dendritic cell function in the context of gut inflammation. *Am. J. Pathol.* **2011**, 178, 662–671.
44. Huaping Wang, Justin Steeds, Yasuaki Motomura, Yikang Deng, Monica Verma Gandhu, Rami T El Sharkawy, John T McLaughlin, Richard K Grencis, Waliul I Khan. CD4+ T cell-mediated immunological control of enterochromaffin cell hyperplasia and 5-hydroxytryptamine production in enteric infection. *Gut.* **2007a**, 56, 949–957.
45. Cucchiara Salvatore, Stronati Laura, Alois Marina. Interactions between the host innate immune system and microbes in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* **2011**, 140, 1729–1737.
46. Akira Andoh, Yuhki Yagi, Makoto Shioya, Atsushi Nishida, Tomoyuki Tsujikawa, Yoshihide Fujiyama. Mucosal cytokine network in inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* **2008**, 14, 5154–5161.
47. Raymond K. Cross, Keith T. Wilson. Nitric oxide in inflammatory bowel disease. *Inflamm, Bowel. Dis.* 2003, 9, 179–189.
48. Yuji Naito, Tomohisa Takagi, Osamu Handa, Takeshi Ishikawa, Shuji Nakagawa, Taiji Yamaguchi, Norimasa Yoshida, Masato Minami, Masakazu Kita, Jiro Imanishi, Toshikazu Yoshikawa. Enhanced intestinal inflammation induced by dextran sulfate sodium in tumor necrosis factor-alpha deficient mice. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **2003**, 18, 560–569.
49. Florian Obermeier, Georgi Kojouharoff, Wolfgang Hans, Jürgen Schölmerich, Volker Gross, Werner Falk. Interferon-gamma (IFN-gamma)- and tumour necrosis factor (TNF)-induced nitric

- oxide as toxic effector molecule in chronic dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Clin. Exp. Immunol.* **1990**, 116, 238–245.
50. Hidetoshi Takedatsu, Kathrin S. Michelsen, Bo Wei, Carol J. Landers, Lisa S. Thomas, Deepti Dhall, Jonathan Braun, Stephan R. Targan. TL1A (TNFSF15) regulates the development of chronic colitis by modulating both T-helper 1 and T-helper 17 activation. *Gastroenterology*. **2008**, 135, 552–567.
  51. Kenichiro Nishikawa, Naohiro Seo, Mie Torii, Nei Ma, Daisuke Muraoka, Isao Tawara, Masahiro Masuya, Kyosuke Tanaka, Yoshiyuki Takei, Hiroshi Shiku, Naoyuki Katayama, Takuma Kato. Interleukin-17 induces an atypical M2-like macrophage subpopulation that regulates intestinal inflammation. *PLoS. One*. **2014**, 9, e108494.
  52. Yoichiro Iwakura, Harumichi Ishigame, Shinobu Saijo, Susumu Nakae. Functional specialization of interleukin-17 family members. *Immunity*. **2011**, 34, 149–162.
  53. Kara Gross Margolis, Korey Stevanovic, Zhishan Li, Qi Melissa Yang, Tamas Oravecz, Brian Zambrowicz, Kanchan G Jhaver, Alexander Diacou, Michael D Gershon. Pharmacological reduction of mucosal but not neuronal serotonin opposes inflammation in mouse intestine. *Gut*. **2014**, 63, 928–937.
  54. Paul P. Bertrand, Alma Barajas-Espinosa, Shadia Neshat, Rebecca L. Bertrand, Alan E. Lomax. Analysis of real-time serotonin (5-HT) availability during experimental colitis in mouse. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.* **2010**, 298, G446–G455.
  55. Magdy El-Salhy, Aina Danielsson, Mats Stridsberg, Lars Grimelius. Colonic endocrine cells in inflammatory bowel disease. *J. Intern. Med.* **1997**, 242, 413–419.
  56. Sin-ichi Oshima, Masaki Fujimura, Mineko Fujimiya. Changes in number of serotonin-containing cells and serotonin levels in the intestinal mucosa of rats with colitis induced by dextran sodium sulfate. *Histochem. Cell. Biol.* **1990**, 112, 257–263.
  57. Mark Kidd, Bjorn I. Gustafsson, Ignat Drozdov, Irvin M. Modlin. IL1beta- and LPS-induced serotonin secretion is increased in EC cells derived from Crohn's disease. *Neurogastroenterol. Motil.* **2009**, 21, 439–450.
  58. Jun Wang, Srinivas Kodali, Sang Ho Lee, Andrew Galgoci, Ronald Painter, Karen Dorso, Fred Racine, Mary Motyl, Lorraine Hernandez, Elizabeth Tinney, Steven L. Colletti, Kithsiri Herath, Richard Cummings, Oscar Salazar, Ignacio Gonzalez, Angela Basilico, Francisca Vicente, Olga

- Genilloud, Fernando Pelaez, Hiranthi Jayasuriya, Katherine Young, Doris F. Cully, Sheo B. Singh. Discovery of platencin, a dual FabF and FabH inhibitor with in vivo antibiotic properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007b**, 104, 7612–7616.
59. Waliul I. Khan, Yasuaki Motomura, Huaqing Wang, Rami T. El-Sharkawy, Elena F. Verdu, Monica Verma-Gandhu, B. J. Rollins, Stephen M. Collins. Critical role of MCP-1 in the pathogenesis of experimental colitis in the context of immune and enterochromaffin cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.* **2006**, 291, G803–G811.
  60. Kenjiro Matsumoto, Tomoharu Nakajima, Hiroyasu Sakai, Sae Kato, Atsunobu Sagara, Kazuhiko Arakawa, Kimihito Tashima, Minoru Narita, Syunji Horie. Increased expression of 5-HT<sub>3</sub> and NK 1 receptors in 5-fluorouracil-induced mucositis in mouse jejunum. *Dig. Dis. Sci.* **2013**, 58, 3440–3451.
  61. Kenjiro Matsumoto, Mee Wah Lo, Takuji Hosoya, Kimihito Tashima, Hiromitsu Takayama, Toshihiko Murayama and Syunji Horie. Experimental colitis alters expression of 5-HT receptors and transient receptor potential vanilloid 1 leading to visceral hypersensitivity in mice. *Lab Invest.* **2012**, 92, 769–782.
  62. Gaetana Minnone, Fabrizio De Benedetti and Luisa Bracci-Laudiero. NGF and Its Receptors in the Regulation of Inflammatory Response. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, 18, E1028.
  63. Felipe A. Pinho-Ribeiro, Waldiceu A. Verri Jr, and Isaac M. Chiu. Nociceptor Sensory Neuron-Immune Interactions in Pain and Inflammation. *Trends. Immunol.* **2017**, 38, 5-19.
  64. Peter Holzer. Implications of tachykinins and calcitonin generelated peptide in inflammatory bowel disease. *Digestion*, **1998**, 59, 269–283.
  65. Daniela Renzi, Beatrice Pellegrini, Francesco Tonelli, Calogero Surrenti, Antonio Calabro. Substance P (neurokinin-1) and neurokinin A (neurokinin-2) receptor gene and protein expression in the healthy and inflamed human intestine. *Am. J. Pathol.* **2000**, 157, 1511–1522.
  66. Christopher R. Mantyh, Steven R. Vigna, R. Randall Bollinger, Patrick W. Mantyh, John E. Maggio, Theodore N. Pappas. Differential expression of substance P receptors in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gastroenterology.* **1995**, 109, 850–860.
  67. Toshiaki Watanabe, Yasuhiko Kubota, Tetsuichiro Muto. Substance P containing nerve fibers in ulcerative colitis. *Int. J. Colorectal. Dis.* **1998**, 13, 61–67.
  68. Peter Holzer and Ulrike Holzer-Petsche. Tachykinin receptors in the gut: physiological and

- pathological implications. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2001**, 1, 583–590.
69. Mohammad M Khan, Steven D Douglas and Tami D Benton. Substance P-neurokinin-1 receptor interaction upregulates monocyte tissue factor. *J. Neuroimmunol.* **2012**, 242, 1-8.

## 謝辞

本研究の遂行に当たり、終始ご懇篤なるご指導とご鞭撻を賜りました京都薬科大学薬物治療学分野 加藤伸一 教授に深甚なる感謝の意を表します。

また、本論文の作成に当たり、ご助言ならびにご指導とご高閲を賜りました、京都薬科大学臨床薬理学分野 中田徹男 教授ならびに薬理学分野 藤井正徳 准教授に深甚なる感謝致します。

さらに、本研究の遂行に当たり、貴重なご助言とご助力を賜りました、天ヶ瀬紀久子 講師ならびに 松本健次郎 助教、塚原卓矢 博士研究員に感謝の意を表します。

加えて、本研究の遂行に当たり、5-HT<sub>3</sub> 受容体拮抗薬：ラモセトロンをご供与頂きました、アステラス製薬に深く感謝致します。

末筆ながら、実験の一部にご協力頂きました、大橋将人、河原彩子、島田裕規、諸頭温菜の諸氏をはじめとした京都薬科大学薬物治療学分野の研究室員の皆様に厚く御礼申し上げます。