

論文の内容の要旨

論文題目 シリアンハムスターを用いた炎症性腸疾患モデルの作出と腸炎進展過程における好中球エラスターゼの役割

氏 名 廣田 泰

炎症性腸疾患（IBD）は、潰瘍性大腸炎およびクローン病を指す疾患概念である。寛解と再燃を繰り返す難治性疾患であり、腸管における潰瘍形成、出血、好中球浸潤および好中球エラスターゼ（NE）の高値を特徴とする。

NE は好中球顆粒に含まれる蛋白分解酵素であり、基質特異性が低いために幅広く結合織蛋白を分解でき、正常細胞をも傷害し得る。従って、急性炎症時の結合織分解や血管透過性亢進に関与し、組織破壊や臓器不全の原因となる。IBDにおいても、その活動期に大腸腔の NE が増加し、IBD の病勢と相関する。また、健常な状態では、NE は血清中の内因性プロテアーゼインヒビターと複合体を形成して速やかにその活性を失うが、IBD 患者の NE は複合体を形成していない。これらの事実から、NE は IBD の増悪因子の 1 つと考えられてきたが、それを臨床的あるいは実験的に証明したという報告はない。

IBD の増悪過程における NE の役割の検証や、NE 阻害剤などの新しい機序の IBD 治療薬の開発研究において、実験動物モデルは有用である。このため、ヒトの IBD と同様に、炎症局所で NE 活性が上昇する IBD モデルが必要であるが、

内因性プロテアーゼインヒビターの酵素阻害能は動物種毎に大きく異なるので、IBDモデルを作成する上で動物種の選択が重要である。申請者が行った予備検討では、従来繁用されているラットIBDモデルの大腸内NE活性は上昇しなかった。これは、ラットの内因性プロテアーゼインヒビターの酵素阻害能はヒトと比べて約3倍強いため、炎症局所のNEが内因性プロテアーゼインヒビターと速やかに複合体を形成してしまい、結果としてNE活性が失われた可能性が考慮される。また、マウスやモルモットの内因性プロテアーゼインヒビターの酵素阻害能はヒトと比べて2~4倍強いことも知られている。一方、ハムスターの内因性プロテアーゼインヒビターの酵素阻害能はヒトに近い。そこで、本研究では、シリアンハムスターを用いてIBDモデルを作出し、それを利用して腸炎の進展過程におけるNEの役割の解明を試みた。得られた成果は下記の通りである。

第1章では、シリアンハムスターの酢酸誘発大腸炎モデルの作出を試みた。その結果、ハムスターに酢酸水溶液を注腸することにより大腸炎を誘発できた。本モデルでは大腸腔のNE活性の上昇とともに潰瘍面積が増大し、病理組織学的には潰瘍、浮腫および出血が認められた。これらの変化は好中球浸潤が顕著な領域で生じており、ヒトのIBDと類似した病理組織像を呈した。さらに、ヒトのIBD急性期の第1選択薬であるプレドニゾロンの本モデルに対する効果を検討した。その結果、プレドニゾロンは大腸への好中球浸潤に影響しなかったが、NE活性および潰瘍面積の抑制あるいは抑制傾向を示した。プレドニゾロンはNEの放出を抑制することから、本モデルにおいてもプレドニゾロン処置によりNEの放出が減少し、潰瘍面積が抑制されたものと考えられた。この作用はプレドニゾロンのヒトIBDに対する薬効メカニズムの1つと推察された。

第2章では、シリアンハムスターの酢酸誘発大腸炎モデルを用いて、特異的NE阻害剤・ONO-6818の大腸炎に対する作用を検討した。その結果、ONO-6818はNE活性を抑制するとともに潰瘍面積および大腸出血量を抑制した。また、NE活性と潰瘍面積には相関が認められた。ONO-6818が炎症部位のNE活性を抑制した結果、大腸の組織破壊が抑制されたものと考えられた。一方、ONO-6818は大腸への好中球浸潤を抑制しなかった。従って、好中球の大腸組織への浸潤過程にNEは関与していないものと考えられた。以上、NEが大腸炎の増悪因子であることが実験的に示され、またNE阻害剤により大腸炎の病勢を抑制し得ることが明らかとなった。

第3章では、シリアンハムスターの酢酸誘発大腸炎モデルが有する2つの欠点

(慢性炎症像が認められないこと, 炎症持続時間が短いこと)を克服するために, シリアンハムスターのトリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) 誘発大腸炎モデルの作出を試みた. その結果, TNBS 溶液をハムスターに注腸することにより, 急性炎症とそれに続く慢性炎症を誘発できた. また, 本モデルの炎症持続時間は, 酢酸誘発大腸炎モデルの 5 倍以上長かった. 本モデルの急性期および亜急性期においては, 大腸腔の NE 活性の上昇とともに潰瘍面積が増大した. このとき, 病理組織学的には潰瘍, 浮腫, 出血, 好中球浸潤が認められ, 亜急性期には単核球浸潤などの慢性炎症像も認められた. 慢性期には NE 活性の低下および好中球浸潤の消失とともに, 単核球浸潤などの慢性炎症像がより顕著となった. このとき, 潰瘍面積は縮小しており, 単核球は大腸の組織破壊に関与していないものと考えられた. さらに, 本モデルに対するプレドニゾロンの効果について検討したところ, 酢酸誘発大腸炎モデルへの作用と同様, プレドニゾロンは大腸への好中球浸潤に影響しなかったが, NE 活性および潰瘍面積を抑制した. この結果からも, プレドニゾロンの NE 放出抑制作用は, プレドニゾロンのヒト IBD に対する薬効メカニズムの 1 つと考えられた.

第 4 章では, シリアンハムスターの TNBS 誘発大腸炎モデルを用いて, ONO-6818 の大腸炎に対する作用を検討した. その結果, ONO-6818 は NE 活性を抑制するとともに潰瘍面積および大腸出血量を抑制した. また, NE 活性と潰瘍面積には相関が認められた. 本モデルにおいても, ONO-6818 は炎症部位の NE 活性を抑制し, 大腸の組織破壊を抑制したものと考えられた. 一方, 酢酸誘発大腸炎モデルと同様に, ONO-6818 は大腸組織への好中球浸潤を抑制しなかった. さらに, ヒトの IBD に対する NE 阻害剤の臨床応用の可能性について明らかにするために, 大腸炎誘発後からの ONO-6818 処置による治療的効果を検討した. 治療的効果の検討は, 炎症持続時間が短い酢酸誘発大腸炎モデルでは実施できなかった項目である. その結果, ONO-6818 は潰瘍面積, 大腸出血量および NE 活性を抑制した. IBD の治療薬は発症後に投与されることから, ONO-6818 の治療的効果は臨床応用の観点から重要と考えられた. 以上, TNBS 誘発大腸炎モデルにおいても NE が大腸炎の増悪因子であることが実験的に確認され, また ONO-6818 の後処置により大腸炎が抑制されたことから, NE 阻害剤の臨床応用の可能性が広がった.

これまでの結果から, NE が大腸炎を増悪させることが明らかとなったが, 大腸に浸潤した好中球から NE が放出される機構については明らかでない. 一方,

ヒトの IBD においては、炎症性エイコサノイドの TXA_2 および LTB_4 の産生能が亢進していることが知られている。このことから、 TXA_2 や LTB_4 は IBD の炎症メディエーターと考えられているが、両者の病態生理学的役割については不明な部分が多い。第 5 章では、シリアンハムスターの TNBS 誘発大腸炎モデルを用い、炎症性エイコサノイドの大腸炎における役割解明の一環として、NE 放出への関与について検討した。大腸炎を誘発した大腸組織片を *in vitro* で U-46619 (TXA_2 アナログ)、 TXB_2 (TXA_2 の不活性自然分解産物) および LTB_4 で処理し、大腸組織片からの NE 放出を調べた。その結果、U-46619 は NE 放出を亢進したが、 TXB_2 の NE 放出作用は極めて弱く、 LTB_4 は NE 放出に影響しなかった。この U-46619 の NE 放出作用が、 TXA_2 受容体の TP レセプターを介した作用かどうかを確認するために、TP レセプター拮抗剤 (SQ29548) によって U-46619 の NE 放出が阻害されるかどうか検討した。その結果、SQ29548 は U-46619 の NE 放出作用を阻害した。これらの結果から、ハムスターの TNBS 誘発大腸炎モデルにおいては、 TXA_2 が TP レセプターを介して NE の放出を調節しているものと考えられた。さらに、*in vivo* においても TXA_2 が NE 放出作用を有し、 LTB_4 が NE 放出作用を有さないことを示すために、ハムスターの TNBS 誘発大腸炎モデルを NDGA (シクロオキシゲナーゼ/リポキシゲナーゼのデュアル阻害剤) で処置し、大腸腔の TXB_2 量 (TXA_2 は不安定なため自然分解産物の TXB_2 を測定) と NE 活性との相関、 LTB_4 量と NE 活性との相関について検討した。その結果、 LTB_4 量と NE 活性には相関が認められなかったが、 TXB_2 量と NE 活性とに相関が認められた。この結果からも TXA_2 が NE の放出を調節していると結論された。また、このとき潰瘍面積も抑制されており、NE 活性と潰瘍面積には相関が認められた。潰瘍面積の抑制効果は、NDGA により TXA_2 産生が減少し、その結果 NE の放出が抑制され、ひいては組織破壊が抑制されたためと考えられた。 TXA_2 の NE 放出作用は、これまでに報告のない TXA_2 の新たな生物学的作用であり、炎症性エイコサノイド研究において重要な知見と考えられた。

以上、シリアンハムスターを用いた 2 種類の IBD モデルを新たに作出し、NE が大腸炎の増悪因子であり、NE 阻害剤が大腸炎を抑制し得ることを実験的に示した。また、NE 放出に関与する炎症性エイコサノイドも明らかにした。今後、NE 阻害剤を用いた臨床試験等で、ヒトの IBD における NE の役割を検証する必要があると考えられる。