

[別紙2]

論文審査の結果の要旨

ひろた やすし

申請者氏名 廣田 泰

好中球エラスターゼ (NE) は蛋白分解酵素であり、炎症局所で好中球から放出され組織破壊を引き起こすことから、炎症性疾患の増悪因子と考えられている。炎症性腸疾患 (IBD) でも腸管の潰瘍形成、出血および好中球浸潤とともに大腸腔の好中球エラスターゼ (NE) が増加することが知られている。また通常、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。これらのことから、NE は IBD の増悪因子と考えられるが、それを実験的に証明したという報告はない。

IBD における NE の役割検証や、IBD 治療を目的とした NE 阻害剤の開発において実験動物モデルは有用である。このため、ヒト IBD と同様に、大腸の 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で異なり、IBD モデル作成には動物種の選択が重要である。ラット、マウスおよび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より数倍強く、ラット IBD モデルでは大腸腔 NE 活性は上昇しない。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く、上記の目的に適した実験動物である。そこで、ハムスターの IBD モデルを作出し、大腸炎における NE の役割解明を試みた。

1) ハムスターの酢酸誘発大腸炎モデルを作出した。本モデルでは大腸腔 NE 活性の上昇とともに潰瘍が増大した。病理組織学的には潰瘍、浮腫および出血が好中球浸潤の顕著な領域で生じ、ヒト IBD の病理像と類似していた。また、本モデルで IBD 治療薬・プレドニゾロンの効果を検討したところ、NE 活性および潰瘍が抑制された。プレドニゾロンが NE 放出を抑制し、大腸の組織破壊が抑制されたものと考えられた。

2) ハムスター酢酸誘発大腸炎モデルで NE 阻害剤・ONO-6818 の効果を検討したところ、ONO-6818 は NE 活性、潰瘍および出血を抑制した。ONO-6818 が NE 活性を抑制し、大腸の組織破壊が抑制されたものと考えられた。

3) ハムスター酢酸誘発大腸炎モデルでは慢性炎症像が認められず、炎症持続時間も短い。この欠点を克服するため、ハムスターのトリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) 誘発大腸炎モデルを作出した。本モデルでは炎症持続時間が酢酸誘発大腸炎モデルの 5 倍以上長かった。急性期および亜急性期では大腸腔 NE 活性が上昇し潰瘍も増大した。また、急性期では病理組織学的に潰瘍、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。慢性期には慢性炎症像が顕著となったが、NE 活性の低下とともに潰瘍も縮小した。また、本モデルでプレドニゾロンの効果を検討したところ、酢酸誘発大腸炎モデルと同様、NE 活性および潰瘍が抑制された。

4) ハムスターTNBS 誘発大腸炎モデルで、ONO-6818 の効果を検討したところ、酢酸誘発大腸炎モデルと同様、ONO-6818 は NE 活性、潰瘍および出血を抑制した。また、炎症持続時間が長いことを利用し、大腸炎誘発後からの ONO-6818 処置による治療的効果も検討したところ、ONO-6818 の治療的効果が確認された。

5) 大腸に浸潤した好中球から NE が放出される機構を明らかとするために、炎症性エイコサノイドの NE 放出への関与について検討した。ハムスターTNBS 誘発大腸炎の大腸組織片を、*in vitro* で U-46619 (TXA<sub>2</sub> アナログ)、TXB<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub> の不活性自然分解産物) および LTB<sub>4</sub> で処理し、組織片からの NE 放出を調べた結果、U-46619 は NE 放出を亢進したが、TXB<sub>2</sub> の作用は弱く、LTB<sub>4</sub> は NE 放出に影響しなかった。また、U-46619 の NE 放出作用は TP レセプター拮抗剤によって阻害されたことから、TXA<sub>2</sub> が TP レセプターを介して NE の放出を調節していると考えられた。さらに、ハムスター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 (*in vivo*)、大腸腔の TXA<sub>2</sub> 量と NE 活性との相関、LTB<sub>4</sub> 量と NE 活性との相関について検討した。その結果、LTB<sub>4</sub> と NE 活性は相関しなかったが、TXA<sub>2</sub> と NE 活性とは相関した。この結果からも TXA<sub>2</sub> が NE の放出を調節していると結論された。また、このとき潰瘍も抑制された。潰瘍の抑制は、NDGA により TXA<sub>2</sub> 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。

以上、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、TXA<sub>2</sub> が NE 放出に関与することも明らかにした。

本研究の成果は、ヒトの炎症性腸疾患の病態発現機序を考える上での基礎的知見として極めて重要である。よって審査委員一同は本論文が博士 (獣医学) の学位を授与するに値するものと認めた。