

学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
石田久美	主査 教授 樋口 和秀
	主査 教授 宮崎 瑞夫
	副査 教授 谷川 允彦
	副査 教授 林 秀行
	副査 教授 芝山 雄老
主論文題名 Role of chymase-dependent matrix metalloproteinase-9 activation in mice with dextran sodium sulfate-induced colitis (マウス DSS 誘発腸炎におけるキマーゼ依存性 MMP-9 活性化の役割)	
学位論文内容の要旨	
<p>《背景と目的》</p> <p>難治性疾患の一つである炎症性腸疾患(Inflammatory bowel disease;IBD)には、潰瘍性大腸炎(Ulcerative colitis;UC)とクローン病(Crohn disease;CD)が含まれる。UCは、炎症が粘膜から粘膜下層に限局して起こり、直腸から連続性の病変が特徴である。クローン病は、炎症が全層性に起こり、敷石状病変が特徴である。さまざまな分子生物学的手法が開発された現在でも、IBDの病因・病態はいまだ不明のままである。</p> <p>細胞基質分解酵素である matrix metalloproteinase (MMP)は、生体組織の恒常性維持のための組織破壊に関与する内因性活性物質であるが、一方で癌の浸潤や転移、あるいは慢性関節リウマチ等の慢性炎症性疾患における関わりが指摘されている。IBDにおいても、活動期の炎症粘膜における MMP 発現の増強が報告されており本症の病因・病態における MMP の重要性が報告されている。MMP は現在までに約 26 種類が認識されており、各疾患において重要な因子は異なる。慢性炎症性疾患である IBD においては MMP-9 が深く関与していることが知られている。近年、MMP-9の前駆体である proMMP-9がキモトリプシン類似セリンプロテアーゼである chymase により活性型MMP-9に変換されることが報告された。しかし、炎症性腸疾患の病態における chymase の役割および MMP-9 の動態については未だ解明されていない。</p> <p>今回、申請者は炎症性腸疾患における chymase の役割を明らかにし、炎症性腸疾患の新しい治療法を検討する目的で、潰瘍性大腸炎類似モデルである dextran sodium sulfate-induced colitis(以下 DSS 腸炎)を用い、chymase と MMP-9の動態を検討した。さらに、同疾患モデルにおいて chymase 阻害薬を用いて、chymase 活性と腸炎の病変抑制効果について検討した。</p> <p>《対象と方法》</p> <p>6週齢の BALB/c系雌性マウスを用い、各群を7日目に麻酔下で屠殺し検討に供した。</p> <p>実験1;Normal 群(水道水を自由飲水、n=5)、DSS 投与群(5% DSS 液を自由飲水、n=5)の2群に分け、摘出した腸の抽出液中の Chymase 活性を蛍光法を用いて測定し、MMP-9 活性を Gelatin zymography により測定し両群を比較検討した。また、in vitro での阻害実験として、腸の抽出液と chymase 阻害薬である NK3201 とを試験管内で反応させ、MMP-9 活性を上記の方法で測定し、阻害薬の効果を検討した。</p>	

実験2; Control 群(5%DSS 液を自由飲水、0.01%DMSO 1ml 連日腹腔内投与、n=8)、NK3201 群(5%DSS 液を自由飲水、NK3201 10mg/kg/day 連日腹腔内投与、n=8)の 2 群に分け、Chymase 活性、MMP-9 活性と腸管長(各マウスの肛門から盲腸までを測定)をそれぞれ比較検討した。病態の度合いは、Disease Activity Index (DAI)を以下の基準に従い数値化し比較検討した。[①体重減少率(0点:なし、1点:1~5%減少、2点:5~10%減少、3点:11~15%減少、4点:>15%減少)②屠殺時の便性状(0点:正常、2点:軟便、4点:下痢)③血便の状態(0点:正常、2点:やや血便、4点:著明な血便)]。

また、組織学的検討として、摘出した直腸の組織をヘマトキシリン・エオジン(H.E)染色を施した標本を用い、Histological damage score(HDS)を下記の項目で求め点数化し比較検討した。[炎症細胞浸潤および陰窩の欠損程度により、0点:正常、1点:陰窩の1/3の欠損、2点:陰窩の2/3の欠損、3点:固有層が1層の粘膜で覆われ炎症細胞浸潤が存在、4点:びらんや炎症細胞浸潤が著明]。

さらに好中球浸潤の程度を比較するため、直腸の組織を抗マウス好中球抗体を用いて免疫染色し、好中球の発現を検討した。

《結果》

実験1; chymase 活性および MMP-9 活性は、Normal 群と比較して DSS 投与群において有意に上昇していた。また in vitro において、抽出液に NK3201 を投与した群でほぼ完全に抑制された。

実験2; 直腸粘膜中の chymase 活性および MMP-9 活性は、Control 群と比較して NK3201 投与群では、有意に抑制されていた。また、腸管長および DAI の検討においても、NK3201 投与群では腸管病変は有意に軽微であった。これらのことより、NK3201 投与では腸炎は有意に抑制されていることが示された。

組織学的検討においても、HDS は NK3201 投与群で有意に低値を示し、炎症の程度はごく軽度であった。また、好中球染色では、1mm²あたりの好中球の個数が NK3201 投与群では少数しか見られず、炎症は軽度であった。

《考察》

難治性炎症性腸疾患の病因・病態は未だ不明なところが多く、適確な薬物療法を確立されておらず、治療に難渋する症例が少なくない。現在までに、IBD における MMP-9 の関与については、MMP-9 knock-out mouse において、好中球遊走が抑制され、大腸の粘膜障害が軽微となることが報告されており、MMP-9 により好中球の遊走が活性化されることが、腸炎を引き起こす一因と考えられる。

今回、申請者は、ヒト潰瘍性大腸炎の類似実験モデルである DSS 誘発腸炎モデルの腸管抽出液中で、chymase 活性と MMP-9 活性が著明に増加していること、および腸管抽出液に chymase 阻害薬を投与することにより、MMP-9 活性がほぼ完全に抑制されていることを証明することにより腸炎モデルにおける MMP-9 活性化に chymase が深く関与していることを明らかにした。

また、腸炎モデルに chymase 阻害薬を投与することによって、MMP-9 活性および好中球の浸潤が抑制され、腸の粘膜傷害も有意に抑制された。炎症性腸疾患の病態に重要な役割を示している MMP-9 の活性化に関与する chymase を阻害することにより、好中球の浸潤が抑制され、炎症性腸疾患の腸の炎症を改善させる可能性が示唆された。今後、IBD に対する新しい治療薬として chymase 阻害薬の有用性が期待される。

審査結果の要旨および担当者

報告番号	甲 第 号	氏 名	石 田 久 美
論文審査担当者		主 査 教 授	樋 口 和 秀
		主 査 教 授	宮 崎 瑞 夫
		副 査 教 授	谷 川 允 彦
		副 査 教 授	林 秀 行
		副 査 教 授	芝 山 雄 老
主論文題名 Role of chymase-dependent matrix metalloproteinase-9 activation in mice with dextran sodium sulfate-induced colitis (マウス DSS 誘発腸炎におけるキマーゼ依存性 MMP-9 活性化の役割)			
論文審査結果の要旨			
<p>本研究は難治性の慢性炎症性疾患である潰瘍性大腸炎類似モデルにおける、MMP-9 の活性とセリンプロテアーゼである chymase との関連および腸粘膜障害との関連について検討したものである。</p> <p>申請者は、潰瘍性大腸炎類似モデルである dextran sodium sulfate-induced colitis(以下 DSS 腸炎)の腸管粘膜を用い、chymase と MMP-9 の活性について検討している。さらに、DSS 誘発腸炎モデルに対して、chymase 阻害薬である NK3201 の投与を行い、in vivo における効果を検討している。</p> <p>DSS 誘発腸炎の腸管粘膜において、chymase 活性および MMP-9 活性は増加しており、腸抽出液に NK3201 を投与すると MMP-9 活性が有意に抑制された。また、DSS 誘発腸炎モデルに NK3201 を投与すると、直腸粘膜中の chymase 活性および MMP-9 活性は、Control 群と比較して有意に抑制され、腸管長、Disease Activity Index および組織学的検討においても、NK3201 投与群では腸管病変は有意に軽微であった。</p> <p>近年、chymase が MMP-9 を活性化することが報告されたが、炎症性腸疾患の病態における chymase の役割および MMP-9 の動態については未だ解明されていない。本研究は、chymase および MMP-9 が炎症性腸疾患の病態に深く関与していることを示しており、in vivo において、chymase 阻害薬の腸管炎症抑制効果を初めて確認したものである。この事実は、潰瘍性大腸炎に対する薬物療法が確立されていない現状において、本疾患の新規の治療薬として chymase 阻害薬が臨床応用できる可能性を示唆するものである。</p> <p>以上により、本論文は本学大学院学則第 9 条に定めるところの博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。</p> <p>(主論文公表誌) The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 324(2): 422-426, 2008</p>			