

学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
柿本一城	主査 教授 谷川 允彦 副査 教授 朝日 通雄 副査 教授 林 秀行 副査 教授 芝山 雄老
主論文題名 Significance of chymase-dependent matrix metalloproteinase-9 activation on indomethacin-induced small intestinal damages in rats (ラット NSAIDs 起因性小腸潰瘍におけるキマーゼ依存性マトリックスメタロプロテアーゼ-9 活性の意義)	
学位論文内容の要旨	
《背景と目的》 近年、NSAIDs 内服により従来考えられていたよりも高頻度で、小腸における傷害が発生することが、カプセル内視鏡やダブルバルーン内視鏡といった新しい機器の開発・普及により明らかとなった。しかしその病態については未だ不明な点が多く、予防法・治療法の確立が重要視されている。 Matrix metalloproteinases (MMPs) は組織の支持や維持に重要な細胞外基質の分解において中心的役割を担う酵素であり、癌の浸潤や転移、あるいは多くの炎症性疾患に関わっている。MMPs の中で、近年 MMP-9 が消化管の炎症性疾患において重要な役割を果たしていることが報告され、MMP-9 の制御が炎症抑制において有用な strategy となると考えられる。一方、chymase は肥満細胞顆粒中に存在するキモトリプシン類似セリンプロテアーゼであり、MMP-9 の前駆体の pro MMP-9 を活性型 MMP-9 に変換することが知られている。しかしながら、NSAIDs 起因性小腸傷害における MMP-9 の動態や chymase の関与については未だ解明されていない。	

今回、申請者らは小腸傷害の発生における MMP-9 の役割を明らかにし、新しい治療法を検討する目的で、ラット NSAIDs 起因性小腸傷害を用いて MMP-9 の動態を検討した。さらに MMP 阻害薬 (ONO-4817)、chymase 阻害薬 (TY-51469) を投与し、炎症抑制効果について検討した。

《対象と方法》

雄性 SD 系ラット(200～250g)を用いて NSAIDs 起因性小腸傷害モデルを作製し、以下の検討を行った。

実験 1;ラットにインドメタシン(IM:10mg/kg)を経口投与後、経時的に小腸を摘出し、粘膜の損傷面積(mm²)を測定した。また小腸抽出液中の活性型 MMP-9 を gelatin zymography により、ミエロペルオキシダーゼ(MPO)活性をオルトジアニシジン法により測定した。次に IM 投与 3 時間前に MMP 阻害薬 (ONO-4817) を腹腔内投与し、IM 投与 24 時間後に小腸を摘出し、損傷面積、活性型 MMP-9 を測定した。

実験2;IM 投与 24 時間後の小腸抽出液と chymase 阻害薬 (TY-51469) を試験管内で反応させ、in vitro における TY-51469 の活性型 MMP-9 抑制効果を検討した。さらに IM 投与 3 時間前に TY-51469 を腹腔内投与し、24 時間後に小腸を摘出し、損傷面積、活性型 MMP-9、MPO 活性を上記の方法で測定した。また組織学的評価として、肥満細胞数、chymase 陽性細胞数を測定した。

《結果》

実験1;IM 投与により経時的に、空・回腸の腸間膜付着側に縦走する多発潰瘍を生じた。損傷面積の上昇と相関して、MPO 活性、活性型 MMP-9 も上昇した。また ONO-4817 の投与にて、損傷面積、活性型 MMP-9 はともに有意に抑制された。

実験2;TY-51469 は *in vitro* において活性型 MMP-9 を有意に抑制し、逆に pro MMP-9 は有意に上昇した。*In vivo* においても潰瘍係数、MPO 活性、活性型 MMP-9 は TY-51469 投与にて有意に減少した。また肥満細胞数、chymase 陽性細胞数はとも

に IM 投与にて有意に上昇し、TY-51469 投与にて有意に減少した。

《考 察》

NSAIDs 起因性小腸傷害の発生機序としては、プロスタグランジンの抑制、腸内細菌の粘膜内浸潤、炎症性サイトカインの誘導や好中球の浸潤が考えられているが、MMPs の関与についてはあまり報告がない。一方、胃潰瘍やマウス潰瘍性大腸炎モデルにおいては MMP-9 が炎症を惹起していることが報告されており、MMP-9 は消化管の様々な炎症性疾患に関わっていると考えられる。今回、NSAIDs 起因性小腸傷害において、活性型 MMP-9 が損傷面積と相関して経時的に上昇していることが判明し、本疾患においても MMP-9 が関与していることが明らかとなった。MMP knock out mouse では好中球の遊走が抑制されているとの報告があり、MMP-9 が好中球の遊走を活性化することが、粘膜傷害を引き起こす一因であると考えられる。

また ONO-4817 は MMP-9(及び 2)を特異的に阻害する MMP 阻害剤であるが、ONO-4817 の投与にて活性型 MMP-9 は有意に抑制され、損傷面積も有意に抑制されたことで、MMP-9 は潰瘍形成に強く関与していることが明らかとなった。さらに TY-51469 は *in vitro*、*in vivo* でともに活性型 MMP-9 を抑制し、*in vivo* では MPO 活性を抑制し、潰瘍面積が減少していた。この結果より TY-51469 は活性型 MMP-9 を阻害し、好中球の浸潤を抑制することで炎症を改善させている可能性が示唆された。今後、chymase 阻害薬が NSAIDs 起因性小腸傷害に対する新たな予防・治療薬となることが期待される。

審査結果の要旨および担当者

報告番号	第 号	氏 名	柿 本 一 城
論文審査担当者		主 査 教 授 谷 川 允 彦	
		副 査 教 授 朝 日 通 雄	
		副 査 教 授 林 秀 行	
		副 査 教 授 芝 山 雄 老	
主論文題名			
Significance of chymase-dependent matrix metalloproteinase-9 activation on indomethacin-induced small intestinal damages in rats			
(ラット NSAIDs 起因性小腸潰瘍におけるキマーゼ依存性マトリックスメタロプロテアーゼ-9 活性の意義)			
論文審査結果の要旨			
<p>近年、NSAIDs による小腸傷害が注目を集めているが、その発生機序は未だ不明な点が多く、予防法・治療法も確立されていない。本研究は小腸傷害の発生機序を解明し、さらに新しい治療法を開発するため、NSAIDs 起因性小腸傷害モデルを用いて、MMP-9 および chymase 依存性 MMP-9 の関与とその意義について検討したものである。</p> <p>申請者は NSAIDs 起因性小腸傷害モデルの小腸を経時的に摘出し、損傷面積と相関して MPO 活性、活性型 MMP-9 が上昇することを示した。さらに同疾患モデルに MMP 阻害剤である ONO-4817 を投与すると、活性型 MMP-9 の抑制に伴い、小腸傷害は有意に抑制された。これらの検討結果より、小腸傷害の病態に MMP-9 が深く関与していることを明らかにした。</p> <p>また chymase は MMP-9 を活性化することが知られており、申請者らは潰瘍性大腸炎類似モデルである DSS 誘発腸炎モデルにおいて chymase が重要な役割を果たしていることを報告している。本研究では、NSAIDs 起因性小腸傷害モデルに chymase 阻害薬</p>			

である TY-51469 を投与し、*in vitro*、*in vivo* でともに活性型 MMP-9 を有意に抑制し、*in vivo* では損傷面積、MPO 活性を有意に抑制することを示した。以上の結果より、NSAIDs 起因性小腸傷害モデルにおいて chymase 依存性 MMP-9 活性が、炎症を惹起する上で重要な役割を果たしていることを明らかにした。

MMP 阻害薬は副作用出現の頻度が高く、現在では臨床応用は難しいとされているが、chymase 阻害薬は比較的安全に使用可能である。本研究は、小腸傷害の発生機序に MMP-9 および chymase 依存性 MMP-9 活性が深く関与していることを明らかにし、さらに NSAIDs による小腸傷害の治療法が確立されていない現状において、chymase 阻害薬が新規の治療薬として臨床応用できる可能性を示唆するものである。

以上により、本論文は本学大学院学則第11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。

(主論文公表誌)

The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics

332(2): 684-689, 2010