

Effects of anti-oxidant agents on endotoxin-induced uveitis

(エンドトキシン誘発ぶどう膜炎における抗酸化物質の治療効果)

学位論文内容の要旨

要旨

ベーチェット病に代表される難治性ぶどう膜の発症機序はいまだに不明である。ベーチェット病に関してはシクロスポリン等の免疫抑制薬の導入により一定の治療効果がみられるが、免疫抑制薬の無効例もみられる。その他の難治性ぶどう膜はステロイド薬による対症療法の副作用のため長期投与ができない。そのため、視力予後不良も多く、これまでにない作用機序を持った治療薬の開発、その研究は急務である。

生体内で発生する一酸化窒素 (NO) は直接的あるいは間接的に疾患の発症および進行に関わっていることが知られている。NO 合成酵素 (NOS) は 3 種類あり、そのうちマクロファージに存在する Ca^{2+} に依存しない誘導型 NOS (iNOS) は炎症の発症に関与する。iNOS により過剰に産生された NO 量が炎症の重症度に相関があることを示唆する報告がある。これまでも、NOS 抑制薬として知られている *N*-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) を用いたぶどう膜炎モデルでの治療効果を検討した報告例はあるが、その他に報告例はみられない。そこで、本研究では iNOS 抑制、すなわち酸化ストレスの除去はぶどう膜炎の治療に有効ではないかという仮説のもとに、3 種類の抗酸化作用を示す化合物あるいは抽出物を用いてラットエンドトキシン誘発ぶどう膜炎 (EIU) モデルで検討した。

アスタキサンチン (astaxanthin, AST) はカロテノイドの一種であり、エビ、カニなどの体表面およびサケなどに含まれる。AST は抗酸化作用の他に、anti-*Helicobacter pylori* および抗癌作用などの作用が報告されている。まず最初に、AST の治療効果を検討した。EIU は lipopolysaccharide (LPS) をラット (レイス系オス、8 週齢) に 100 μg footpad に注射した。AST は 60% polyethylene glycol に溶解させ、1, 10 100 mg/0.4ml/kg になるように調整し、LPS 投与 30 分前、同時および 30 分後に尾静脈から計 3 回投与した。LPS 投与 24 時間後前房水を採取し、前房水中のタンパク濃度、細胞数、NO 濃度、prostaglandin E2 (PGE2) 濃度および tumor necrosis factor- α (TNF- α) 濃度を検討した。また、陽性対照薬として prednisolone 10mg/kg を用いた。その結果、前房水中のタンパク濃度は対照群 (23.1 $\pm$ 4.7mg/ml) と比較して、10mg/kg, 100mg/kg AST 群でそれぞれ著明に低下した (15.3 $\pm$ 2.6 mg/ml, 6.2 $\pm$ 1.7 mg/ml)。次に前房水中炎症細胞数への影響をみたところ、対照群 (26.9 $\pm$ 4.7 $\times 10^5$ 個/ml) と比較して、100mg/kg AST 群のみで有意に減少した (5.4 $\pm$ 4.3 $\times 10^5$ 個/ml)。10mg/kg AST 群での細胞数は減少傾向がみら

れた。前房水中の NO 濃度、PGE2 濃度および TNF- α 濃度についてもタンパク濃度および細胞数と同様に AST 濃度依存的に減少がみられた。特に、100mg/kg AST の抗炎症効果は 10mg/kg prednisolone とほぼ同程度であった。今回の AST 投与濃度範囲では動物に異常はみられなかった。また、マクロファージ細胞(RAW264.7)を用いた実験では LPS 刺激時に AST を投与したところ、iNOS のみならず PGE2 産生酵素(COX2)のタンパク発現レベルが明らかに抑制された。以上の結果より、AST の抗炎症効果は prednisolone とほぼ同等であり、その作用機序は iNOS だけでなく、COX2 の発現抑制を介していることが考えられた。

次に、アロニア(*Aronia melanocarpa*)は北ヨーロッパからロシア、北アメリカ、日本では北海道に植生するバラ科の植物である。その果実には抗酸化作用がある quercetin、anthocyanin に代表される polyphenol が多く含まれることが知られている。そこで、アロニア抽出物(aronia crude extract, ACE)について検討した。LPS 投与直後に 1、10、100mg/0.1ml/rat の ACE を尾静脈内投与した。24 時間後、AST と同様に前房水中の炎症メディエータを測定した。また、prednisolone および quercetin、anthocyanin についても同じスケジュールで投与した。その結果、LPS 群と比較して、ACE は LPS で惹起された前房水中のタンパク濃度、炎症細胞数、NO 濃度、PGE2 濃度および TNF- α 濃度を濃度相関的に顕著に抑制した。100mg ACE 群の抗炎症効果は 10mg prednisolone とほぼ同程度であった。ACE はまた LPS にて誘導した iNOS および COX-2 タンパクの発現を濃度相関的に有意に抑制した。一方、quercetin、anthocyanin でも前房水中の PGE2 濃度は抑制されたが、その程度は ACE 1mg 投与群よりも小さかった。したがって、ACE の抗炎症効果は既知の物質単独では説明できず、未知の物質あるいは相乗効果の可能性を示唆した。

最後に CAP18 ペプチドについて検討した。Human cationic antimicrobial protein 18 (hCAP18, 18kDa) は好中球由来の塩基性タンパクである。hCAP18 の C 末端側の 27 個のアミノ酸からなるペプチドには LPS 結合能があり、エンドトキシンショック敗血症の治療に有効であることが知られている。EIU モデルは眼組織での自然免疫異常のモデルであるため、EIU に有効ではないかと考えられた。その結果、hCAP18 を 10 μ g、100 μ g 投与した群は、前房水中のタンパク濃度、炎症細胞数、NO、PGE2 および TNF- α 濃度を有意に抑制した。hCAP18、10 μ g 群の抗炎症効果は、100 μ g 群とほぼ同程度であった。1 μ g 群は、EIU を抑制しなかった。以上の結果から CAP18 ペプチドは LPS の toll like receptor 4 への結合を阻害することが示唆された。

以上のことから、ぶどう膜炎の治療には酸化ストレスの除去、すなわち NO 産生の抑制が有効であることを強く示唆した。今後、安全性試験を含め、眼発作モデルでこれらの物質、抽出物に関し詳細な検討が必要であろう。また、AST、アロニアは天然物であり、これらの物質については食品として炎症再燃の予防、症状の緩和などの代替医療にも応用出来ることが考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 大 野 重 昭

副 査 教 授 小野江 和 則

副 査 教 授 西 信 三

学 位 論 文 題 名

Effects of anti-oxidant agents on endotoxin-induced uveitis

(エンドトキシン誘発ぶどう膜炎における抗酸化物質の治療効果)

NO 合成酵素を抑制することはぶどう膜炎の治療に有効であるか仮説をたて、ラットエンドトキシン誘発ぶどう膜炎モデル(EIU)を用いて、アスタキサンチン、アロニア抽出物について治療効果を検討した。

アスタキサンチン(astaxanthin, AST)はカロテノイドの一種であり、エビ、カニなどの体表面およびサケなどに含まれる。ASTは抗酸化作用の他に、anti-*Helicobacter pylori*および抗癌作用などの作用が報告されている。まず最初に、ASTの治療効果を検討した。EIUはlipopolysaccharide (LPS)をラット(レイス系オス、8週齢)に100 μ g footpadに注射した。ASTは60% polyethylene glycolに溶解させ、1, 10 100 mg/0.4ml/kgになるように調整し、LPS投与30分前、同時および30分後に尾静脈から計3回投与した。LPS投与24時間後前房水を採取し、前房水中のタンパク濃度、細胞数、NO濃度、prostaglandin E2 (PGE2)濃度およびtumor necrosis factor- α (TNF- α)濃度を検討した。また、陽性対照薬としてprednisolone 10mg/kgを用いた。その結果、前房水中のタンパク濃度は対照群(23.1 $\pm$ 4.7mg/ml)と比較して、10mg/kg, 100mg/kg AST群でそれぞれ著明に低下した(15.3 $\pm$ 2.6 mg/ml, 6.2 $\pm$ 1.7 mg/ml)。次に前房水中炎症細胞数への影響をみたところ、対照群(26.9 $\pm$ 4.7 $\times 10^5$ 個/ml)と比較して、100mg/kg AST群のみで有意に減少した(5.4 $\pm$ 4.3 $\times 10^5$ 個/ml)。10mg/kg AST群での細胞数は減少傾向がみられた。前房水中のNO濃度、PGE2濃度およびTNF- α 濃度についてもタンパク濃度および細胞数と同様にAST濃度依存的に減少がみられた。特に、100mg/kgASTの抗炎症効果は10mg/kg prednisolone とほぼ同程度であった。今回のAST投与濃度範囲では動物に異常はみられなかった。また、マクロファージ細胞(RAW264.7)を用いた実験ではLPS刺激時にASTを投与したところ、iNOSのタンパク発現レベル抑制が明らかに抑制された。以上の結果より、ASTの抗炎症効果はprednisolone とほぼ同等であり、iNOS介して炎症を抑制していることを示唆した。

次に、アロニア(*Aronia melanocarpa*)は北ヨーロッパからロシア、北アメリカ、日本では北海道に植生するバラ科の植物である。その果実には抗酸化作用がある quercetin、anthocyanin に代表される polyphenol が多く含まれることが知られている。そこで、アロニア抽出物(aronia crude extract, ACE)について検討した。LPS投与直後に1, 10, 100mg/0.1ml/ratのACEを尾静脈内投与した。24時間後、ASTと同様に前房水中の炎症メデ

イエータを測定した。また、prednisolone および quercetin、anthocyanin についても同じスケジュールで投与した。その結果、LPS 群と比較して、ACE は LPS で惹起された前房水中のタンパク濃度、炎症細胞数、NO 濃度、PGE2 濃度および TNF- α 濃度を濃度相関的に顕著に抑制した。100mg ACE 群の抗炎症効果は 10mg prednisolone とほぼ同程度であった。ACE はまた LPS にて誘導した iNOS および COX-2 タンパクの発現を濃度相関的に有意に抑制した。一方、quercetin、anthocyanin でも前房水中の PGE2 濃度は抑制されたが、その程度は ACE 1mg 投与群よりも小さかった。したがって、ACE の抗炎症効果は既知の物質単独では説明できず、未知の物質あるいは相乗効果の可能性を示唆した。

以上の結果より、ぶどう膜炎の治療に NO 合成酵素の抑制は有効であることを示唆した。臨床応用するために、今後安全性試験を含め、眼発作モデルでこれらの物質、抽出物に関し詳細な検討が必要であることを付け加えた。また、AST、アロニアは天然物であり、これらの物質については食品として炎症再燃の予防、症状の緩和などの代替医療にも応用出来ることも考察した。

最初に副査である小野江和則教授から EIU の病態発症機序および全身での組織障害について質問があり、次に副査である西信三教授より AST、ACE の投与タイミングについて質問があった。最後に、主査である大野重昭教授から AST、ACE に関するその他での研究状況、臨床への応用への可能性についての質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は学位論文の背景にある自己の研究結果や参考論文を引用し、概ね適切に回答した。

この論文は、これまでにない作用機序をもったぶどう膜炎の治療薬の開発への足掛かりになる点で高く評価され、今後臨床への応用に期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。