

# Studies on the mechanism of anti-inflammation in endotoxin induced ocular inflammation

(エンドトキシン誘発眼炎症モデルにおける抗炎症機序に関する研究)

## 学位論文内容の要旨

実験的眼炎症モデルの一つとしてエンドトキシン誘発眼炎症モデルが広く用いられている。今回このモデルを用いて、2種類の化合物の抗炎症作用機序について検討した。一つは免疫調節ホルモンである、メラノサイト刺激ホルモンの1種である alpha-melanocyte stimulating hormone (alpha-MSH)、もう一つは海藻由来のカロテノイドであるフコキサンチンを用いた。Alpha-MSHは13のアミノ酸からなる免疫調節ペプチドであり、脳炎、腎炎などの様々な実験的炎症モデルにおいて抗炎症作用が知られている。またフコキサンチンは抗酸化物質として知られているカロテノイドの一種であり、ワカメやヒジキの褐色色素の成分である。本研究ではこの2種類の化合物を用いてぶどう膜炎抑制作用機序に関する検討を行った。

実験的眼炎症モデルは、サルモネラ菌由来のリポポリサッカライド (LPS) をルイス系ラットの皮下に投与し、その24時間後に房水を採取した。採取した房水中の炎症性細胞およびタンパク質濃度を測定することで、炎症の指標とした。alpha-MSHはLPS投与直後に、またフコキサンチンはLPS投与前30分、直後および30分後に静脈内投与した。眼炎症を惹起した房水中には炎症メディエーターの濃度が上昇することが知られていることから、今回プロスタグランジン(PG)E2および腫瘍壊死因子(TNF-alpha)の変動についても調べた。また作用機序を検討するために、マクロファージ様細胞であるRAW264.7細胞を用いて、LPS処理によるシクロオキシゲナーゼ(COX)2の誘導に対する作用についても検討した。

LPS投与群の房水中細胞数および蛋白濃度は正常ラット房水と比べて有意に高値を示した。この上昇に対してalpha-MSHの10、100および1000 µg/kg投与群ではLPS投与群と比べて有意な低値を示した。房水中のPGE2およびTNF-alphaはLPS投与により、有意な高値を示した。この上昇に対して、100および1000 µg/kg投与群ではLPS投与群と比べて有意な低値を示したが、10 µg/kg投与群では有意な抑制作用はみられなかった。RAW264.7細胞をLPS処理したところ、COX-2蛋白の顕著な誘導がみられたが、alpha-MSHはCOX-2蛋白誘導を処理濃度依存的に抑制し、1000 µg/mlでは完全に抑制した。

フコキサンチン 0.1、1 および 10 mg/kg すべての投与群の房水中細胞数および蛋白濃度は LPS 投与群と比べていずれも有意な低値を示した。10 mg/kg フコキサンチン投与群でみられた抑制作用はプレドニゾロン 10 mg/kg 投与群とほぼ同程度であった。PGE2 および TNF-alpha の上昇に対しては、フコキサンチン 0.1、1 および 10 mg/kg 投与群すべてにおいて、顕著な抑制作用を示した。COX-2 蛋白誘導に対してもフコキサンチンは処理濃度依存的に抑制し、10 および 100 µg/ml 処理群では完全に抑制した。

Alpha-MSH およびフコキサンチンは LPS による房水中細胞数および蛋白の上昇を投与量依存的に抑制した。さらに房水中の PGE2 および TNF-alpha に対しても抑制効果を示した。LPS による COX-2 蛋白誘導に対して、この両化合物は誘導を処理濃度依存的に抑制した。以上のことから alpha-MSH およびフコキサンチンの抗炎症機序のひとつとして COX-2 誘導抑制作用が考えられた。

# 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 吉 岡 充 弘

学 位 論 文 題 名

## Studies on the mechanism of anti-inflammation in endotoxin induced ocular inflammation

(エンドトキシン誘発眼炎症モデルにおける抗炎症機序に関する研究)

実験的眼炎症モデルの一つとしてエンドトキシン誘発眼炎症モデルが広く用いられている。今回このモデルを用いて、2種類の化合物の抗炎症作用機序について検討した。一つは免疫調節ホルモンである、メラノサイト刺激ホルモンの1種である alpha-melanocyte stimulating hormone (alpha-MSH)、もう一つは海藻由来のカロテノイドであるフコキサンチンを用いた。Alpha-MSH は 13 のアミノ酸からなる免疫調節ペプチドであり、脳炎、腎炎などの様々な実験的炎症モデルにおいて抗炎症作用が知られている。またフコキサンチンは抗酸化物質として知られているカロテノイドの一種であり、ワカメやヒジキの褐色色素の成分である。本論文ではこの2種類の化合物を用いて眼炎症抑制作用機序に関する検討を行った。

エンドトキシン誘発眼炎症モデルはサルモネラ菌由来のリポポリサッカライド (LPS) をルイス系ラットの皮下に投与し作成した。LPS 投与 24 時間後に房水を採取し、房水中の炎症細胞およびタンパク濃度を測定することで、炎症の指標とした。alpha-MSH は LPS 投与直後に、またフコキサンチンは LPS 投与前 30 分、直後および 30 分後に静脈内投与した。眼炎症を惹起した房水中には炎症メディエーターの濃度が上昇することが知られていることから、今回プロスタグランジン(PG)E2 および腫瘍壊死因子 (TNF-alpha) の変動についても調べた。また作用機序を検討するため、マクロファージ様細胞である RAW264.7 細胞を用いて、LPS 処理によるシクロオキシゲナーゼ (COX) 2 の誘導に対する作用についても検討した。

LPS 投与群の房水中炎症細胞数およびタンパク濃度は正常ラットと比べて有意に高値を示した。この上昇に対して alpha-MSH の 10、100 および 1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  投与群では LPS 投与群と比べて有意な低値を示した。房水中の PGE2 および TNF-alpha は LPS 投与により、有意な高値を示した。この上昇に対して、100 および 1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  の alpha-MSH 投与群では LPS 投与群と比べて有意な低値を示したが、10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  投

与群では有意な抑制作用はみられなかった。RAW264.7 細胞を LPS 処理したところ、COX-2 の顕著な誘導がみられたが、alpha-MSH は COX-2 誘導を処理濃度依存的に抑制し、1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  では完全に抑制した。

フコキサンチン 0.1、1 および 10  $\text{mg}/\text{kg}$  すべての投与群の房水中炎症細胞数およびタンパク濃度は LPS 投与群と比べていずれも有意な低値を示した。10  $\text{mg}/\text{kg}$  フコキサンチン投与群でみられた抑制作用はプレドニゾロン 10  $\text{mg}/\text{kg}$  投与群とほぼ同程度であった。PGE2 および TNF-alpha の上昇に対しては、フコキサンチン 0.1、1 および 10  $\text{mg}/\text{kg}$  投与群すべてにおいて、顕著な抑制作用を示した。COX-2 誘導に対してもフコキサンチンは処理濃度依存的に抑制し、10 および 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  処理群では完全に抑制した。

Alpha-MSH およびフコキサンチンは LPS による房水中炎症細胞数およびタンパクの上昇を投与量依存的に抑制した。さらに房水中の PGE2 および TNF-alpha に対しても抑制効果を示した。LPS による COX-2 誘導に対して、この両化合物は誘導を処理濃度依存的に抑制した。以上のことから alpha-MSH およびフコキサンチンの抗炎症機序のひとつとして COX-2 誘導抑制作用が考えられた。

発表に際し副査の吉岡充弘教授からエンドトキシン誘発眼炎症モデルに関する炎症発生部位および活性ラジカルの関与についての質問があった。もう一人の副査である小野江和則教授からはラットとマウスの動物種差および前房内にみられる炎症細胞のポピュレーションに関する質問があった。次いで主査の大野重昭教授から後部ぶどう膜炎を伴う眼内炎モデルの存在についての質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は学位論文として発表していなかった実験結果や過去の報告を引用し、適切に解答した。

この論文は2種類の化合物を実験的眼炎症モデルに応用し、そのメカニズムを解明した点で高く評価され、今後、眼炎症の抑制作用の研究および臨床への応用が期待される。

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。