

学位論文題名

A novel NF- κ B inhibitor, dehydroxymethylepoxyquinomicin,
ameliorates inflammatory colonic injury in mice(新規NF- κ B阻害剤dehydroxymethylepoxyquinomicinは、
マウスにおける大腸の炎症性傷害を改善する)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】

潰瘍性大腸炎・クローン病に代表される慢性炎症性腸疾患 (IBD) は、1980 年代以降著明に漸増している難治性疾患である。近年、アミノサリチル酸製剤 (5-ASA) に加え免疫抑制剤・抗 TNF α 抗体の使用により治療成績が向上しているが、未だ難治性であり更なる治療法の開発が望まれる。IBD の腸粘膜では、炎症性サイトカイン産生を制御する転写因子 NF- κ B の持続的な活性化とその制御失調が起こっていることが知られている。また、臨床治療薬の 5-ASA や抗 TNF α 抗体には NF- κ B の間接的阻害作用があり、動物実験においては Simvastatin、crucumin、NF- κ B decoy 等による大腸炎抑制効果、NF- κ B 活性抑制効果が報告されている。これらより、NF- κ B の核内移行を選択的に阻害する新規薬剤である DHMEQ の治療効果が期待される。そこで我々は、マウスの大腸炎モデルを用いて DHMEQ の腸炎抑制効果を検討した。

【材料と方法】

In vitro: 結腸細胞株 (HT-29)、マクロファージ細胞株 (RAW264.7) をそれぞれ LPS 10 ng/ml と 10 μ g/ml で刺激し、DHMEQ 添加による HT-29 からの IL-8、RAW264.7 からの TNF α ・IL-6 の産生抑制効果を ELISA 法で検討した。同時に、RAW264.7 では NF- κ B のサブユニットである p65 の核内移行を免疫組織化学染色により確認した。*In vivo*: 8 週齢雄 C57BL/6 マウスに 3% デキストラン硫酸ナトリウム (DSS:36-50kDa) を 5 日間飲水させて大腸炎を誘発し、その後 5 日間 RO 水を飲水させた。また 8 週齢雄 BALB/c マウスに 2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) 1.5mg を含んだ 50% エタノール溶液を注腸して大腸炎を誘発し、4 日間経過を観察した。DHMEQ は両大腸炎ともに連日腹腔内投与した。大腸炎の評価は体重減少・下痢・血便による disease activity index (DAI)、大腸浮腫、組織学的スコアリング、免疫組織化学染色による細胞浸潤の程度、大腸組織中の炎症性サイトカイン mRNA 発現により行い、DHMEQ の大腸炎抑制効果を検討した。統計では、2 群間の比較には student-t test、多群間の比較には ANOVA (with a post-hoc turkey's test) を用いた。

【結果】

In vitro: RAW264.7 細胞において、DHMEQ は LPS 刺激による p65 の核内移行を阻害し、炎症性サイトカインである IL-6、TNF α の産生も有意に抑制していた。また、HT-29 細胞では、LPS 刺激による IL-8 の産生を有意に抑制していた。*In vivo*: DSS 腸炎では、DHMEQ 20mg/kg 1 日 2 回投与群で DAI スコア、大腸浮腫、組織学的スコアリングの有意な改善を認めた。また標準治療薬である 5-ASA の投与では、明らかな DSS 腸炎の改善を認めなかった。大腸組織の免疫組織化学染色 (IHC) では、F4/80 (マクロファージ)・CD4 陽性細胞、また核内 p65 陽性の炎症細胞浸潤を有意に抑制した。大腸組織中の炎症性サイトカインの解析では、IL-1 β 、TNF α 、IL-6、IL-12p40、IL-17、MCP-1 の mRNA 発現を有意に抑制していた。さらに、TNBS 腸炎においても DHMEQ 15mg/kg 1 日 2 回投与群では体重減少、肉眼的な大腸障害スコアリング、組織学的スコアリングの有意な改善を認めた。

【考察】

本研究では、腸管上皮細胞 (IEC) とマクロファージにおける DHMEQ の抗炎症作用を検討した。腸管上皮細胞は、腸管粘膜において T 細胞分化の抗原提示細胞としての機能を担い、effector T 細胞を刺激し、IL-1, 6, 8 や TNF α といった炎症性サイトカインを産生する。特に

IL-8は、好中球やT細胞の遊走因子でありLPSやTNF α の刺激でIECより過剰産生される。DHMEQは、結腸細胞株のLPSの刺激によるIL-8の産生を抑制した。IBDでは、マクロファージ・T細胞といった単核球の固有粘膜への浸潤がみられる。マクロファージは細菌抗原の認識・排除に重要な役割をもち、マクロファージの機能異常は炎症性サイトカイン過剰産生を引き起こし、単核球の組織浸潤を誘導して組織傷害を引き起こす。DHMEQは、p65の核内移行の阻害によりマクロファージ細胞株のLPS刺激によるIL-6、TNF α の過剰産生を抑制していることが確認された。

次に、DHMEQの*in vivo*における効果を評価するために、DSS・TNBS誘発腸炎の抑制効果を検討した。DSS腸炎では、DAIスコア、大腸浮腫、組織学的スコアリングの有意な改善を示し腸炎の抑制効果が認められた。また、より急性の大腸炎モデルでの効果を確認するために施行したTNBS腸炎でも、体重減少、肉眼的な大腸障害スコアリング、組織学的スコアリングの有意な改善を示し、腸炎の抑制が認められた。一方、臨床治療薬としての可能性を評価するために行った5-ASAとの比較では、DHMEQがより腸炎を抑制し得る可能性が示唆された。有害事象に関しては、本実験のプロトコール・投与量ではDHMEQの明らかな副作用は認めなかった。これらの結果は*vitro*の効果と、DHMEQによるNF- κ B阻害がIBDの腸炎をコントロールするのに効果的な方法であるということをサポートしている。

DHMEQによる腸炎抑制作用の基本機序を検討するため、DSS腸炎の大腸組織で解析をおこなった。大腸組織のIHCでは、マクロファージ、CD4陽性T細胞の浸潤が確認され、浸潤細胞の多くは核内p65染色陽性であった。DHMEQはこれらの細胞浸潤、核内へのp65移行のいずれも抑制していた。また、real time PCRによる大腸組織のサイトカインmRNA発現の測定では、マクロファージの活動に関わるTNF α 、IL-1 β 、IL-6、MCP-1といったサイトカインの発現上昇とDHMEQによる抑制が確認された。マクロファージに加え、T細胞応答の機能障害もIBDの病態進行・慢性化に深く関わっているされている。本実験では、上記サイトカインに加え、IFN- γ 、IL-12p40、IL-17といったサイトカインの発現上昇とDHMEQによる抑制が認められており、Th1/Th17の過剰応答に関してもDHMEQが抑制していると考えられる。これらの結果をまとめると、DHMEQはNF- κ Bの阻害によりマクロファージ、T細胞の過剰応答を抑制することにより腸炎を改善しているといえる。

過去にもいくつかNF- κ B阻害薬の腸炎抑制効果を示す論文があり、本研究の結果と総合すると、NF- κ B活性を阻害することは腸管の炎症を抑制するための確実な方法であると考えられる。現在皮膚疾患の外用剤以外に臨床応用可能なNF- κ B阻害剤はないが、DHMEQはより選択的作用の低分子量薬剤であるため、その臨床応用が期待される。

【結語】

新規NF- κ B阻害剤DHMEQは実験的大腸炎を抑制する。臨床応用に向け、さらなる研究が必要ではあるが、本剤は炎症性腸疾患に対し有用である可能性がある。

学位論文審査の要旨

主査	教授	佐藤典宏
副査	教授	平野 聡
副査	教授	武富紹信
副査	准教授	神山俊哉

学位論文題名

A novel NF- κ B inhibitor, dehydroxymethylepoxyquinomicin, ameliorates inflammatory colonic injury in mice

(新規NF- κ B阻害剤dehydroxymethylepoxyquinomicinは、マウスにおける大腸の炎症性傷害を改善する)

潰瘍性大腸炎・クローン病に代表される慢性炎症性腸疾患（IBD）は、厚生省の特定疾患研究対象疾患であり、未だ治療法が確立されていない難治性疾患である。炎症性腸疾患の腸粘膜では、NF- κ B の持続的な活性化とその制御失調が起こっていることが知られており、NF- κ B の核内移行を選択的に阻害する DHMEQ の治療効果が期待される。本研究では、マウスの大腸炎モデルを用いて DHMEQ の腸炎抑制効果を検討した。発表内容は、DHMEQ のマクロファージ・腸管上皮細胞株における炎症性サイトカインの産生抑制効果に関するものと、DHMEQ が NF- κ B 活性を阻害することにより DSS 腸炎・TNBS 腸炎を抑制すること、DSS 腸炎の機序において DHMEQ がマクロファージの活性・Th1/17 応答の抑制に関わっていることであった。

公開発表後、神山准教授から①DSS 腸炎はクローン・UC どちらに近いモデルなのか、②5-ASA は注腸投与で、DHMEQ は腹腔内投与と投与方法が異なる理由、③DHMEQ を注腸すると腸管上皮に悪影響はないかについての質問があった。回答として①腸管の組織所見から、当初は UC 類似と言われていたが、現在はサイトカインの反応などからクローン病類似と考えられている。ただし、完全に片方の疾患を反映している腸炎モデルは存在しない。②DHMEQ は腹腔内投与では効果を認めたが、直腸内投与では抑制効果を示さなかった。できるだけ標準的な治療薬との比較をするために 5-ASA を用いた。5-ASA の投与方法としては、経口か注腸があるが、より直接の治療効果を考慮して注腸を選択した。最終的に同じ投与方法での比較ができなかったため、それぞれに vehicle control 群を設定して間接的に比較した。③NF- κ B 活性の抑制が腸管上皮のみに限局されることがあれば、上皮の増殖・免疫寛容に関連するシグナル伝達が阻害され、上皮層が破綻する可能性がある。腸炎を抑制するためには粘膜下層における NF- κ B 活性の抑制が必要と考えられる、と説明した。

次に、武富教授からは①IBD は慢性炎症であり、このモデルでは炎症の抑制は示せても、改善を示すものではないのでは、②HT-29 という癌細胞を用いた理由、③クローンと UC の発症機序についての質問があった。回答として①厳密には、3-4 サイクル繰り返すことで慢性腸炎モデルを作成して投薬実験を行うべきだが、物理的に困難であったため、DSS 腸炎の DSS 投与終了後の炎症持続期間の評価で代用した。②大腸癌細胞株ではあるが、大腸炎モデルの実験では腸管上皮細胞の代用として広く使用されているため、本実験でも用いた。実際に、純粋な大腸の上皮細胞を用いるのは困難である。③基本的には多因子疾患であるが、衛生面等の環境要因が影響を与える割合は大きい。実際発展途上国には同疾患はほとんど認めず、日本より衛生環境が早くとのった欧米では、日本よりもはやく患者数が増加した、と説明した。

平野教授からは①i.p 投与での薬剤の作用形態、②vitro 実験の n=5 は少ないのでは、検定

は問題ないか、③DSS 腸炎の DAI スコアで行っている 2 つの検定はどれを比較しているのか、④大腸の mRNA 発現で、5 日目と 10 日目で異なる結果の解釈は、⑤DSS と TNBS と 2 つのモデルを用いた根拠についての質問があった。回答として①腸管の外側より DMSO を媒体としての直接浸潤と、腹膜を通しての血中移行の両方と考えるが、実証する手段が整っていないため確認はしていない。②n=5 でもそれほど SD は大きくなく、t 検定で明らかな有意差を認めているため問題ないと考える。③多群間比較をしたものと、vehicle control との 2 群比較をしたものの両者の有意差を認めた点を示した。④DSS 投与最終日の 5 日目では、TNF α ・IL-1・IL-6・MCP-1 が高値でありマクロファージを中心とした炎症反応が起きている。DSS の投与終了後の 10 日目では、TNF α の発現は低下しているが、IFN γ の発現は高めである。また IL-6・MCP-1・IL-17 と Th17 関連の mRNA 発現の上昇がみられる。これらから、10 日目の段階では Th1/17(Th17 優位)による T 細胞応答による炎症反応が継続していると考えられる。⑤DSS と TNBS は、もっとも一般的に確立されたもので、頻繁に用いられているモデルである。IBD を明確に反映しているモデルはなく、一般的には 2 つ以上のモデルでの効果を示さなければ不十分とされる傾向がある、と説明した。

最後に佐藤教授から、①DHMEQ40mg/kg1 日 1 回投与と 20mg/kg1 日 2 回投与とで結果が異なった理由は、②NF- κ B をより選択的に阻害することがより良い治療効果が得られることにつながるのかに関する質問があった。回答として、①DHMEQ40mg/kg1 日 1 回投与では、5 日目までは腸炎を抑制する傾向にあるが、その後腸炎は悪化した。もともと血中での分解が早く半減期が短いこともあり、一回で強く抑制するよりもある程度の NF- κ B の抑制を継続的に行う方が腸炎を抑制するのに適していると考えられる。②NF- κ B においてより選択的に阻害することが必ずしも良い治療効果につながるとは限らないが、この薬剤を作用させる場所をある程度確定できれば、効果を期待できると考える、と説明した。

この論文は、DHMEQ という新規薬剤が大腸炎モデルで腸炎抑制効果を示した最初の論文であり、今後の IBD 領域での臨床応用が期待される。

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。