

# Platelet-activating factor, a critical mediator in the pathogenesis of dextran sulfate sodium-induced colitis in rats

メタデータ	言語: jpn 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-31 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 平山, 一久 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/1654">http://hdl.handle.net/10271/1654</a>

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 377号	学位授与年月日	平成15年 9月19日
氏名	平山 一久		
論文題目	Platelet-activating factor, a critical mediator in the pathogenesis of dextran sulfate sodium-induced colitis in rats (ラットのデキストラン硫酸ナトリウム誘導腸炎の病態において、血小板活性化因子は危険なメディエーターである)		

## 論文題目

Platelet-activating factor, a critical mediator in the pathogenesis of dextran sulfate sodium-induced colitis in rats

(ラットのデキストラン硫酸ナトリウム誘導腸炎の病態において、血小板活性化因子は危険なメディエーターである)

## 論文の内容の要旨

## [はじめに]

腸管粘膜における免疫の異常に基づく炎症性サイトカインと抗炎症性サイトカインの不均衡は、潰瘍性大腸炎(UC)において重要な病因のひとつと考えられている。血小板活性化因子(PAF)は各種炎症細胞から放出される内因性リン脂質で、炎症細胞を活性化し、炎症性サイトカインの産生を増強する。したがって、UCの病態にPAFの関与が示唆されるが、直接的証拠は得られていない。この研究の目的は、炎症性腸疾患の発症あるいは進展において、PAFがどのような役割を演じているかを検討することである。

## [材料ならびに方法]

雄性ウイスターラットを用いて、3.5%(wt/vol)のデキストラン硫酸ナトリウム(DSS;分子量 5000kDa)溶液の自由飲水により腸炎(DSS 腸炎)を作成した。DSS 腸炎は UC のよく確立された実験モデルである。DSS 腸炎の病態における PAF の関与を評価するために、PAF レセプター拮抗薬(Y-24180;吉富製薬)200mg/kg/day を胃管を用いて投与した。ラットを次の三群に分類した。Group I: 無処置コントロール群(n=15)。Group II: DSS 腸炎群(n=15)。Group III: PAF レセプター拮抗薬を予め経口投与した後に DSS を投与した群(n=15)。各群とも DSS 投与 6 日目に犠死せしめ、評価した。ラット結腸を、盲腸、近位結腸、および遠位結腸の三区域に分割し、各群各結腸区域において、組織学的に粘膜傷害の程度、及び粘膜に浸潤している炎症細胞の種類と分布につき評価した。分子生物学的手法を用いて、ヒト interleukin-8 (IL-8) に相当するラット cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC)、tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、及び PAF レセプターの各区域における messenger ribonucleic acid (mRNA) の発現について解析した。犠死時の採血より血漿中の TNF- $\alpha$  と CINC 濃度を測定した。

## [結果]

DSS 腸炎群(Group II)において DSS の投与開始 5 日目には全てのラットに下血を認めたが、PAF レセプター拮抗薬投与群(Group III)では下血がなかった。組織学的には Group II の遠位結腸における粘膜傷害程度がもっとも強かった。Group III において、粘膜傷害は Group II に比し有意に軽減されたが、control 群 (Group I) と同等までは改善しなかった。腸炎の傷害程度は CINC 陽性好中球と ED-1 陽性貪食細胞の浸潤程度と平行していた。しかし、炎症細胞浸潤のパターンで、CINC 陽性好中球は粘膜の傷害中心部へ集中した集積像を呈したが、ED-1 陽性貪食細胞は結腸粘膜全体に瀰漫性に広がりを示し、両者に相異があった。

Group II 遠位結腸において、CINC と TNF- $\alpha$  の mRNA は有意に発現が増強した。一方、

Group III の遠位結腸において CINC mRNA は有意に減少したが、TNF- $\alpha$  mRNA は全く変化を示さなかった。PAF レセプター mRNA 発現は各群各結腸区域で差がなかった。なお、血漿中の TNF- $\alpha$  および CINC 濃度はすべての群で上昇がなかった。

#### [考察]

好中球浸潤は一般に急性炎症の重要な現象であるが、この実験でも粘膜傷害部において CINC 陽性好中球の集中像と CINC mRNA の増強を認め、CINC と CINC 陽性好中球の病態への関与が示唆された。

一方、貪食細胞は DSS を貪食し、TNF- $\alpha$  等の炎症性サイトカインを分泌する。興味深いのは、PAF レセプター拮抗薬投与によって、粘膜傷害及び CINC mRNA 発現が軽減しても TNF- $\alpha$  mRNA の発現量に変化がなかったことである。これは、TNF- $\alpha$  が急性炎症を誘導するサイトカインカスケードの中でもより上流に位置する為、PAF 活性の変化による影響を受けなかったこと、評価した腸管が DSS 投与 6 日目で腸炎が完成していたため TNF- $\alpha$  mRNA 発現のピークが過ぎていたことが考えられた。

この研究は PAF が CINC 陽性好中球及び貪食細胞の集積や、CINC 発現を介して DSS 腸炎の病態に関与することを示した。しかし、上皮細胞の浸透性を増加させ、IL-1 $\beta$  等を増幅させるといった PAF 自身の直接的作用も DSS 腸炎の病態に関与している可能性がある。

今回の実験で、PAF レセプター拮抗薬は腸炎の粘膜傷害を有意に改善した。経口投与可能なこの薬剤は、UC に対する有効な治療戦略となる可能性がある。

#### [結論]

ラット DSS 腸炎において、PAF は CINC との相互作用により CINC 陽性好中球を活性化させ、炎症を増幅し、粘膜傷害を引き起こす危険な誘導物質である。経口投与された PAF レセプター拮抗薬は、直接あるいは間接的に PAF の作用を抑制することにより粘膜傷害を有意に軽減したと考えられ、炎症性腸疾患の治療に有効である可能性が示唆された。

### 論文審査の結果の要旨

潰瘍性大腸炎(UC)の病態形成に Tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )や Interleukin-8 (IL-8) などの炎症性サイトカイン/ケモカインが重要な役割を担っていることが明らかにされつつある。しかしこれらの炎症モデュレーターを作動させる因子については不明な点が多い。近年血小板活性化因子(PAF)が炎症性サイトカインの誘導因子であることが明らかになっている。申請者らは PAF が UC の炎症性サイトカインネットワーク形成に密接に関与しているのではないかと仮説をたて、UC の動物実験モデルを用いて UC における PAF の役割を明らかにすることを目的とした。同時に PAF 受容体拮抗剤である Y-24180 が UC の治療薬として可能性があるかについても検討を加えた。

最近の報告からデキストラン硫酸ナトリウム(DSS)が UC 類似病態を引き起こすことが報告された。申請者らはこのモデルに着目し以下の実験を行った。具体的にはデキストラン硫酸ナトリウムをウイスターラットに 6 日間経口投与することにより作成した。DSS 腸管粘膜における免疫の異常に基づく炎症性サイトカインと抗炎症性サイトカインの不均衡は、潰瘍性大腸炎(UC)において重要な病因のひとつと考えられている。血小板活性化因子(PAF)は各種炎症細胞から放出される内因性リン脂質で、炎症細胞を活性化し、炎症性サイトカインの産生を増強する。したがって、UC の病態に PAF の関与が示唆されるが、直接的証

拠は得られていない。この研究の目的は、炎症性腸疾患の発症あるいは進展において、PAFがどのような役割を演じているかを検討することである。

実験は雄性ウイスターラットを3群に分けて各種溶液を6日間経口投与した。DSS溶液の自由飲水により6日間投与した。Group I: 無処置コントロール群、Group II: DSS投与群、Group III: PAFレセプター拮抗薬を予め経口投与した後にDSSを投与した群。6日目に腸管を取り出し、病理学的、分子生物学的解析を行った。病理学的解析は各群各結腸区域において、炎症の程度、組織構築の変化を解析した。分子生物学的には cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC)、TNF- $\alpha$  及び PAFレセプターの各区域における mRNA の発現について解析した。

申請者らは次の結果を得た。

- 1) DSS投与群では5日目にヒトのUCにみられる下血が観察されたが、その他の群では下血は見られなかった。
- 2) 組織学的解析ではDSS投与群で遠位結腸に顕著な粘膜障害、炎症性変化がみられた。好中球は粘膜の傷害中心部へ集中した集積像を呈したが、食食細胞は結腸粘膜全体に瀰漫性に広がりを示した。PAFレセプター拮抗薬投与群ではその障害、炎症性変化が中等度抑制された。
- 3) UCに近い変化を示したDSS投与群の遠位結腸ではCINCとTNF- $\alpha$ のmRNAは有意に発現が増強した。PAFレセプターmRNA発現は各群で差がなかった。PAFレセプター拮抗薬投与によりCINC mRNAは有意に減少したが、TNF- $\alpha$  mRNAは変化を示さなかった。

以上の結果から注目すべき点として2つが挙げられる。第1にヒトUC類似のDSS腸炎の病態にCINCとTNF- $\alpha$ などの炎症性サイトカインが関与し、PAFはCINC発現亢進作用があることを発見したことである。第2にPAFレセプター拮抗薬はDSS腸炎の粘膜傷害を改善したことから、現在気管支喘息で臨床応用されているが、UCにおいても新しい治療薬として期待されることを示唆した点である。本研究は臨床レベルでの発展が期待できる有益な研究であると考えられた。

審査委員会は本論文について、次のような試問を行った。

- 1) DSS腸炎の発症機序について
- 2) 各結腸区域でなぜ障害程度が異なるかについて
- 3) PAFの容量設定の根拠について
- 4) 遠位結腸に障害が強度にみられた理由について
- 5) 投与初期での腸管の変化について
- 6) CINCと好中球数が相関しない理由について
- 7) 各群で血中炎症マーカーの変化について
- 8) PAFレセプター拮抗薬の抑制機序について
- 9) DSS腸炎におけるPAFの産生量と産生細胞について

これらの試問に対して申請者からは適切な解答が得られた。問題点も充分理解しており、このことより博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で判定した。

論文審査担当者 主査 金山尚裕

副査 前川真人 副査 花井洋行