

メトトレキサートによる小腸組織傷害に対する忍容性についての基礎研究

著者	志賀 咲紀
学位名	博士（薬学）
学位授与機関	北海道医療大学
学位授与年度	令和2年度
学位授与番号	30110甲第336号
URL	http://id.nii.ac.jp/1145/00064878/

論 文 要 旨

メトトレキサートによる小腸組織傷害に対する忍容性についての基礎研究

令 和 2 年 度

北 海 道 医 療 大 学 大 学 院 薬 学 研 究 科

志 賀 咲 紀

【背景・目的】メトトレキサート (MTX) は、ジヒドロ葉酸還元酵素阻害作用や炎症局所でのアデノシン濃度上昇作用を有し、悪性腫瘍や関節リウマチ治療などに幅広く用いられている。MTX の主な副作用の一つに消化器傷害が挙げられ、これは患者の QOL を大きく低下させる。そのため MTX による副作用発現メカニズムの解明は、より良い支持療法の確立につながり、MTX の忍容性を高めることが期待できる。しかしながら、MTX による消化器傷害発現の程度は、投与条件によって異なり、その発現メカニズムは複雑であると考えられている。本研究では、消化器傷害に及ぼす MTX の影響の詳細を明らかにするため、まず小腸組織像に及ぼす MTX 投与の影響と腸管機能の恒常性に寄与するグルカゴン様ペプチド-2 (GLP-2) 発現及びアデノシンによって活性化される Epac1/2 の関係について検討し、次に MTX の投与方法と小腸組織傷害の関係、並びに腸管機能に対して二面性を有する内因性一酸化窒素 (NO) の役割について検討した。

【方法】1. 小腸組織像に及ぼす MTX 投与の影響と GLP-2 発現との関係—5-FU 投与との比較
9 週齢の雄性ウィスターラットに、MTX (50 mg/kg) または 5-フルオロウラシル (5-FU) (100 mg/kg) 及び対照群として生理食塩液を単回腹腔内投与した。各薬物投与 24 時間後及び 72 時間後に小腸を摘出した。小腸組織像をヘマトキシリン・エオシン (HE) 染色により観察し、小腸組織傷害による炎症の観察及び GLP-2 発現を、それぞれ抗ミエロペルオキシンダーゼ (MPO) 抗体または抗 GLP-2 抗体を用いた酵素抗体法により検討した。さらに GLP-2 関連遺伝子 mRNA 発現を RT-qPCR 法により検討した。2. MTX 単回投与および分割投与による小腸組織傷害における一酸化窒素の役割
9 週齢の雄性ウィスターラットに MTX 50 mg/kg 単回腹腔内投与または総投与量が 50 mg/kg になるように 12.5 mg/kg を 24 時間ごとに 4 回腹腔内投与し、初回投与 96 時間後に小腸組織を摘出した。対照群には生理食塩水を投与した。さらに、NO

合成酵素 (NOS) 阻害薬である *N*^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME; 20 mg/kg) を 24 時間ごとに 4 回皮下投与し, 対照群, L-NAME 単独群, MTX 単独群, MTX と L-NAME の併用群で検討を行った. MTX 初回投与から 24 時間ごとに QOL (体重, 摂餌量, 飲水量) を計測した. 小腸組織像を HE 染色により観察し, MPO 発現及び GLP-2 発現を酵素抗体法により検討した. さらに炎症性サイトカイン, NOS, プログルカゴン mRNA 発現を RT-qPCR 法により検討した. NOS タンパク質発現をウエスタンブロット法により検討した.

【結果・考察】1. 小腸組織像に及ぼす MTX 投与の影響と GLP-2 発現との関係 —5-FU 投与との比較— MTX 投与は小腸組織像に著明な影響を及ぼさなかった一方, 5-FU 投与は時間依存的に小腸組織傷害及び炎症を引き起こした. MTX 投与は小腸における GLP-2 関連遺伝子 mRNA 発現, GLP-2 発現を有意に増加させた. 一方, 5-FU 投与は GLP-2 関連遺伝子 mRNA 発現, GLP-2 発現を有意に減少させた. さらに MTX 投与は cAMP により活性化される Epac1/2 mRNA 発現を有意に増加させたが, 5-FU 投与はこれらに影響を与えなかった. 以上の結果から MTX 投与は小腸において GLP-2 の生合成を促進させることで, 小腸組織傷害に拮抗していることが示唆された. 一方, 5-FU 投与は小腸での GLP-2 生合成を抑制することが明らかとなった. MTX 投与による Epac シグナル伝達経路の活性化が, MTX 投与による GLP-2 発現増加作用の一部に関連している可能性が考えられた. 2. MTX 単回投与および分割投与による小腸組織傷害における一酸化窒素の役割 MTX 分割投与はラット QOL を低下させ, L-NAME を併用するとさらに QOL を低下させた. MTX 単回投与は L-NAME の有無に関わらず小腸組織像及び MPO 発現に著明な影響を与えなかった. 一方, MTX 分割投与は軽度の組織傷害を引き起こし, L-NAME を併用すると組織傷害を著明に悪化させた. MTX 単回投与は炎症性サイトカイン mRNA 発現に影響を与えなかったが, MTX 分割投与は L-NAME の有無に関わらず炎症性サイトカイン mRNA 発現を増加させる傾向を示した. また MTX 分割投与は構成型 NOS 発現を有意に増加させ, 誘導型 NOS 発現を増加させる傾向を示した. さらに MTX 単回投与および分割投与は L-NAME の有無に関わらず小腸 GLP-2 発現を有意に増加させた. MTX 単回投与は GLP-2 の前駆物質であるプログルカゴン mRNA 発現に影響を与えなかった. 一方 MTX 分割投与はプログルカゴン mRNA 発現を増加させる傾向を示し, L-NAME を併用すると有意に増加した. 以上の結果から, MTX 単回投与は投与後 96 時間においても小腸組織像に著明な影響を与えない一方, MTX 分割投与は QOL 低下及び小腸組織傷害を引き起こすことが明らかとなった. また MTX 分割投与による構成型 NOS 発現亢進が QOL 低下及び小腸組織傷害に拮抗していることが示唆された.

【結語】ラットにおいて嘔吐類似行動を引き起こす用量である 50 mg/kg の MTX 単回投与は, 小腸において GLP-2 動態を亢進させることで, 小腸組織傷害に拮抗している可能性が考えられた. また MTX の総投与量が同じであっても投与回数の違いによりラット QOL 及び小腸組織像に対する影響が大きく異なることが明らかとなった. これらの知見は, MTX による小腸組織傷害発現機序の一端を明らかにしたものであり, 臨床における MTX の忍容性と副作用対策を考える上での基礎的知見として有用であると考えられる.