

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

志 賀 咲 紀

略語表

本文では、以下の略語を使用した。

5-FU	5-fluorouracil (5-フルオロウラシル)
5-HT	5-hydroxytryptamine (セロトニン)
AICAR	5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside
COX-2	cyclooxygenase-2 (シクロオキシゲナーゼ-2)
DHFR	dihydrofolate reductase (ジヒドロ葉酸還元酵素)
DPP-4	dipeptidyl peptidase-4 (ジペプチジルペプチダーゼ-4)
Epac	exchange protein directly activated by cAMP
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (グリセルアルデヒド 3-リン酸デヒドロゲナーゼ)
GLP-2	glucagon-like peptide-2 (グルカゴン様ペプチド-2)
HE	hematoxyline and eosin (ヘマトキシリン・エオシン)
IGF-1	insulin-like growth factor-1 (インスリン様増殖因子-1)
IL-1 β	interleukin-1 β (インターロイキン-1 β)
i.p.	intraperitoneal (腹腔内投与)
L-NAME	N^G -nitro-L-arginine methyl ester (N^G -ニトロ-L-アルギニンメチルエステル)
MPO	myeloperoxidase (ミエロペルオキシダーゼ)
MTX	methotrexate (メトトレキサート)
MTX-PGs	MTX-polyglutamate (ポリグルタメート型 MTX)
NO	nitric oxide (一酸化窒素)
NOS	NO synthase (NO 合成酵素)
cNOS	constitutive NOS (構成型 NOS)
eNOS	endothelial NOS (内皮型 NOS)
iNOS	inducible NOS (誘導型 NOS)
nNOS	neuronal NOS (神経型 NOS)
PBS	phosphate-buffered saline (リン酸緩衝食塩水)
s.c.	subcutaneous (皮下投与)

SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動)
TBS	tris-buffered saline (トリス緩衝生理食塩水)
TGF- β	transforming growth factor- β (トランスフォーミング増殖因子- β)
TNBS	2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid (トリニトロベンゼンスルホン酸)
TNF- α	tumor necrosis factor- α (腫瘍壊死因子- α)

本学位論文は、以下の原著論文を基礎としたものである。

Potentiation of glucagon-like peptide-2 dynamics by methotrexate administration in rat small intestine.

Machida M., Shiga S., Machida T., Ohno M., Iizuka K., Hirafuji M.

Biol. Pharm. Bull., **42**, 1733–1740 (2019).

The role of nitric oxide in small intestine differs between a single and a consecutive administration of methotrexate to rats.

Shiga S., Machida T., Yanada T., Machida M., Hirafuji M., Iizuka K.

J. Pharmacol. Sci., **143**, 30–38 (2020).

目次

序論.....	1
本論.....	6
第 1 章 小腸組織像に及ぼす MTX 投与の影響と小腸 GLP-2 発現との関係 —5-FU 投与との比較—.....	6
第 1 節 緒言	6
第 2 節 方法	7
第 3 節 結果	13
第 1 項 小腸組織形態に及ぼす MTX および 5-FU 投与の影響	13
第 2 項 小腸 MPO 発現に及ぼす MTX および 5-FU 投与の影響.....	14
第 3 項 プログルカゴン mRNA 発現に及ぼす MTX および 5-FU 投与の影響.....	16
第 4 項 抗 GLP-2 抗体陽性細胞数に及ぼす MTX および 5-FU 投与の影響	17
第 5 項 血漿 GLP-2 濃度に及ぼす MTX および 5-FU 投与の影響	21
第 6 項 GLP-2 受容体 mRNA 発現に及ぼす MTX および 5-FU 投与の影響.....	22
第 7 項 IGF-1 mRNA 発現に及ぼす MTX および 5-FU 投与の影響.....	23
第 8 項 血漿 IGF-1 濃度に及ぼす MTX および 5-FU 投与の影響.....	24
第 9 項 TGF- β mRNA 発現に及ぼす MTX および 5-FU 投与の影響.....	25
第 10 項 β -カテニン mRNA 発現に及ぼす MTX および 5-FU 投与の影響	27
第 11 項 DPP-4 mRNA 発現に及ぼす MTX および 5-FU 投与の影響.....	28
第 12 項 Epacl/2 mRNA 発現に及ぼす MTX および 5-FU 投与の影響.....	29
第 13 項 Epacl/2 mRNA 発現及びプログルカゴン mRNA 発現の相関	30
第 4 節 考察	31

第2章	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..	35
第1節	緒言	35
第2節	方法	36
第3節	結果	41
第1項	ラット QOL に及ぼす MTX 分割投与の影響	41
第2項	小腸組織形態に及ぼす MTX 単回投与および分割投与の影響	44
第3項	MPO 発現に及ぼす MTX 単回投与および分割投与の影響	47
第4項	炎症性サイトカイン mRNA 発現に及ぼす MTX 単回投与および分割投与の影響	49
第5項	COX-2 mRNA 発現に及ぼす MTX 単回投与および分割投与の影響	52
第6項	NOS 発現に及ぼす MTX 単回投与および分割投与の影響	53
第7項	プログルカゴン mRNA 発現に及ぼす MTX 単回投与および分割投与の影響 ..	56
第8項	抗 GLP-2 抗体陽性細胞数に及ぼす MTX 単回投与および分割投与の影響	57
第4節	考察	58
	総括	61
	謝辞	63
	引用文献	64

Abstract

Methotrexate (MTX), a folate antagonist, is widely used for the treatment of various malignancies as well as autoimmune diseases. Although gastrointestinal mucositis is generally accepted as one of major adverse effects by administration of MTX, the detail mechanisms are still controversial. To clarify the effect of MTX on gastrointestinal damage in detail, I investigated the following two themes using some models in which MTX was administered to rats.

1) Effect of MTX on glucagon-like peptide-2 (GLP-2) dynamics in small intestine.

Rats were injected intraperitoneally with a single dose of either 50 mg/kg MTX or 100 mg/kg 5-fluorouracil (5-FU). Administration of MTX caused moderate but not significant intestinal injury within 72 h, while administration of 5-FU caused severe injury in a time-dependent manner. MTX significantly increased proglucagon mRNA expression and the number of anti-GLP-2 antibody-positive cells in the ileal tissue. MTX also significantly induced GLP-2 receptor, insulin-like growth factor-1 (IGF-1), transforming growth factor- β 2 (TGF- β 2) and β -catenin mRNA expression. In contrast, 5-FU significantly inhibited proglucagon, GLP-2 receptor, IGF-1 and TGF- β 2 mRNA expression as well as the number of anti-GLP-2 antibody-positive cells. These results suggest that potentiation of endogenous GLP-2 dynamics by MTX is associated with a mechanism that preserves gastrointestinal mucosal integrity at a moderate level.

2) Comparison of the effect of a single administration of MTX and consecutive administration of MTX on the gastrointestinal mucosal injury.

Rats were received MTX intraperitoneally either as a single administration (50 mg/kg) or as a consecutive administration (12.5 mg/kg/day) for 4 days. *N*^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) was subcutaneously to inhibit nitric oxide synthase (NOS). Although a slight mucosal injury resulted from single administration of MTX, L-NAME had almost no effect. Consecutive administration of methotrexate caused a significant mucosal injury, which is further worsened by L-NAME. Consecutive, but not single, administration of MTX induced mRNA expression of inflammatory cytokines in ileal tissue. Consecutive administration of MTX also significantly induced constitutive NOS expression. These results suggest that consecutive administration, rather than single administration of MTX aggravates mucosal injury. Potentiation of constitutive NOS expression by consecutive administration might be the main reason to antagonize the intestinal mucosal injury as well as lead to a reduction in rat quality of life.

The present study may contribute to the understanding of basic mechanisms underlying how MTX causes gastrointestinal injury. The findings in the present study may be useful as a basic knowledge in considering the clinical tolerance of MTX and countermeasures for side effects.

序論

一般的な細胞傷害性抗がん剤は、がん細胞のみならず細胞分裂が盛んな血液細胞や消化管粘膜上皮細胞、毛根細胞などにも大きな影響を及ぼすことから、代表的な副作用として骨髄抑制や口内炎、悪心・嘔吐、下痢、脱毛などが発現する。これらの副作用が患者に与える苦痛は大きく、QOLの低下により治療の中断に至ることもあることから、临床上重要な問題となっている。これらの副作用の中でも特に消化管粘膜炎と骨髄抑制の時期が重なることから感染症などの副作用が重症化しやすくなる。¹⁾ 抗がん剤による消化管粘膜炎の発現に急性炎症性粘膜損傷、活性酸素種の産生、上皮細胞のアポトーシスを引き起こす炎症性サイトカインの産生などが関与していることがこれまでに報告されている。^{2,3)}

メトトレキサート (methotrexate: MTX, Fig. 1A) は、悪性リンパ腫の治療で用いられるほか、胃がん、肝がん、乳がんなどの治療に他の抗がん剤と併用され、主に静脈内投与されている。また、現在では関節リウマチに対する第一選択薬としても用いられており、この場合は経口投与されている。さらに適応外使用薬として全身性エリテマトーデス、炎症性筋疾患、血管炎症候群や成人 Still 病など、様々な難治性疾患の治療にも幅広く応用されている。⁴⁾

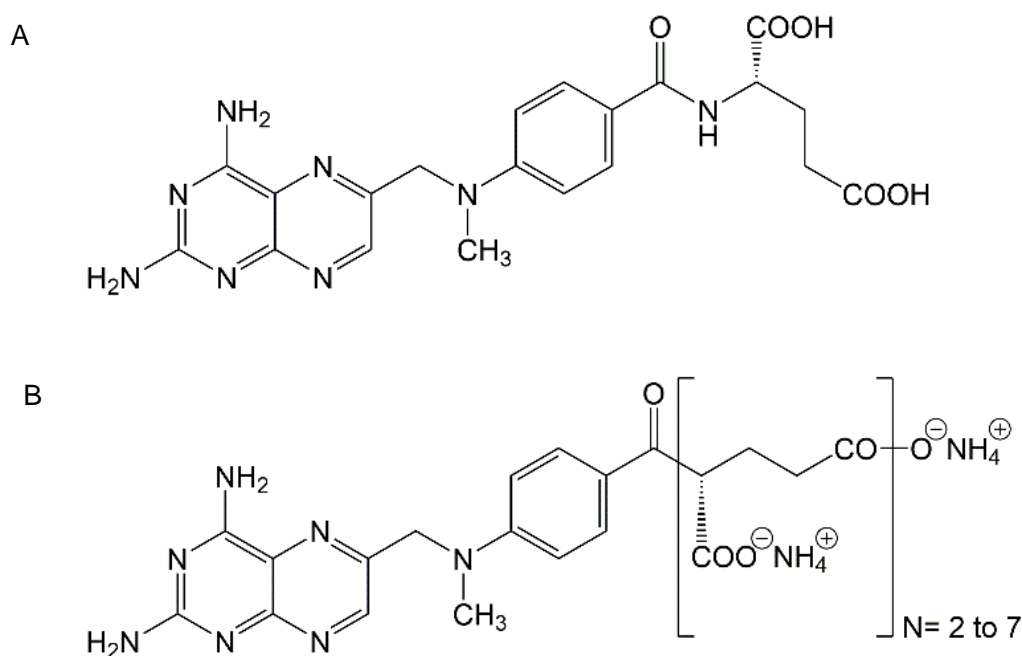
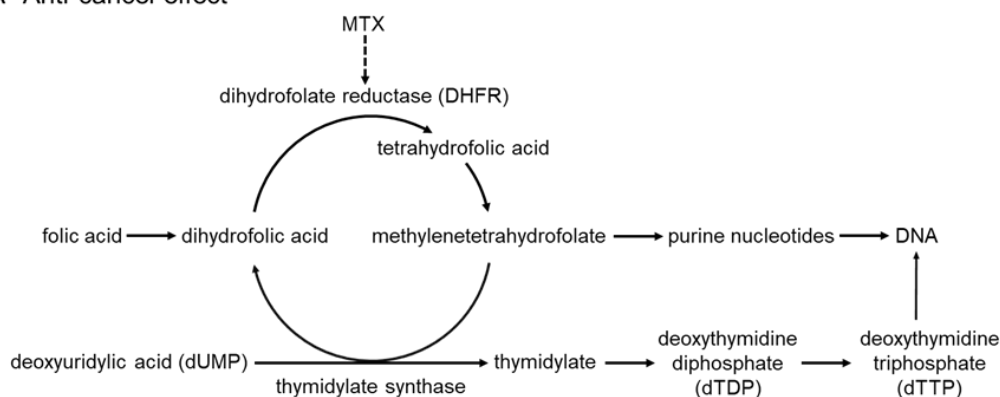


Fig. 1. Chemical Structures of MTX (A) and MTX-polyglutamate (B)

MTX の抗がん作用の主たるメカニズムは、DNA 合成抑制作用である。MTX は、ジヒドロ葉酸還元酵素（dihydrofolate reductase: DHFR）を阻害し、ジヒドロ葉酸やテトラヒドロ葉酸の生成を抑制することで、結果的に DNA 合成に必要なチミジル酸を不足させることで、プリンスクレオチドや DNA の新たな合成を抑制する（Fig. 2A）。

一方、MTX の抗リウマチ作用メカニズムは、DNA 合成抑制作用とは別の機序が考えられている。具体的には、血管内皮細胞や滑膜細胞において MTX が 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside (AICAR) トランスホルミラーゼを阻害することにより、間接的に AMP デアミナーゼおよびアデノシンデアミナーゼを阻害し、アデノシン含量の増加・遊離を引き起こす（Fig. 2B）。遊離されたアデノシンは血小板や白血球などのアデノシン A_{2A} 受容体を刺激し、細胞内 cAMP 産生の増加を介してプロテインキナーゼ A および Epac1/2 などの酵素を活性化させる。これらの作用により、MTX は結果的にサイトカイン産生を抑制し、抗炎症効果を発揮すると考えられている。⁵⁻⁹⁾

A Anti-cancer effect



B Anti-inflammatory effect

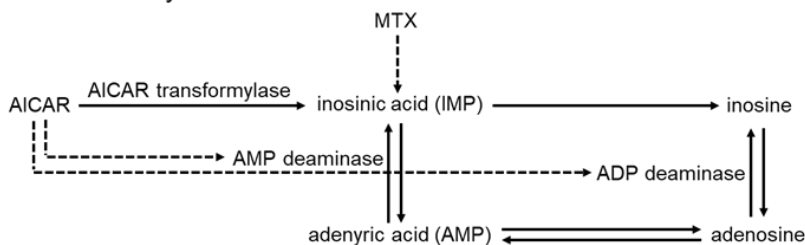


Fig. 2. Pharmacological Action of MTX

A: Inhibitory action of DNA synthesis. B: Hindrance action of adenosine metabolism. The dotted line shows the inhibitory effect.

MTX の血中半減期は数時間と短いですが、細胞内に取り込まれた MTX は、細胞内の葉酸ポリグルタミン酸合成酵素によりポリグルタミン酸化され、ポリグルタメート型 MTX (MTX-polyglutamate: MTX-PGs, Fig. 1B) となり細胞内に蓄積される。⁹⁻¹²⁾ 細胞内 MTX-PGs は γ -グルタミルトランスぺプチダーゼによって加水分解され、¹³⁾ ATP 結合カセットである ABCB1, ABCC1-4, ABCG2 により細胞外へと排泄される。¹⁴⁾ MTX-PGs は、DHFR と強力に結合し、その活性を阻害するほか、チミジル酸合成酵素や AICAR ホルミルトランスフェラーゼにも高い親和性を持ち、MTX の持続的な作用の発揮や副作用と密接に関連している。^{15, 16)}

グルカゴン様ペプチド-2 (glucagon-like peptide-2: GLP-2) は、小腸粘膜の増殖、粘膜バリアの維持などの作用を有する消化管ホルモンのひとつである。GLP-2 は、小腸粘膜上皮細胞である内分泌性 L 細胞内で前駆物質であるプログルカゴンから GLP-1 と共に等モル生成され、ジペプチジルペプチダーゼ-4 (dipeptidyl peptidase-4: DPP-4) によって代謝される。この DPP-4 による GLP-2 の代謝は速く、ヒトに GLP-2 を皮下投与した場合の血中半減期は 7 分と短い。¹⁷⁾ 産生された GLP-2 は筋線維芽細胞などにある GLP-2 受容体に結合することで、インスリン様増殖因子-1 (insulin-like growth factor-1: IGF-1) やトランスフォーミング増殖因子- β (transforming growth factor- β : TGF- β) などの転写を誘導する。これまでに IGF-1 発現誘導が GLP-2 による小腸粘膜の増殖に必須であることが IGF-1 ノックアウトマウスを用いた研究などで明らかにされている。^{18, 19)} IGF-1 は、L 細胞などに発現している IGF-1 受容体を刺激して陰窩細胞において Wnt/ β -カテニン経路に連なる β -カテニンの発現を促進する。^{18, 19)} また、GLP-2 による TGF- β の発現は、粘膜再生に伴う粘膜上皮の遊走に関与する。²⁰⁾ 近年、GLP-2 による小腸の恒常性維持機能が創薬の観点からも注目され、様々な消化器疾患への GLP-2 関連薬の応用が期待されている。米国などでは、DPP-4 抵抗性の GLP-2 アナログであるテデュグルチドが短腸症候群の治療に実用化されている。また動物実験においては、GLP-2 アナログが抗がん剤や非ステロイド性抗炎症薬により誘発した小腸粘膜傷害を改善させることが報告されている。²¹⁻²³⁾

Takano らは、ラットにおける嘔吐類似行動に及ぼす MTX 10, 20 および 50 mg/kg 単回腹腔内投与の影響について検討し、50 mg/kg 投与により臨床での嘔吐発現パターンと類似した嘔吐類似行動が引き起こされることを報告している。²⁴⁾ 興味深いことに、このラット小腸において MTX 投与によるセロトニン (5-hydroxytryptamine: 5-HT) 合成系の亢進が認められるものの、シスプラチン²⁴⁾ や 5-フルオロウラシル (5-fluorouracil: 5-FU)²¹⁾ 投与により惹起されるような著明な小腸組織傷害は認められない。²⁵⁾ 前述した通りアデノシン A_{2A}

受容体の刺激によって活性化される Epac1/2 は内分泌性 L 細胞内に発現しており、²⁶⁾ L 細胞におけるプログルカゴン産生および分泌に Epac シグナル伝達経路が関与していることが示されている^{26,27)} ことから、MTX は小腸 GLP-2 発現およびそのシグナル伝達に何らかの影響を与え、このことが MTX 単回投与によっても著明な小腸組織傷害が認められない理由の一つである可能性が考えられる。

一酸化窒素 (nitric oxide: NO) は、生体内において多岐にわたる生理活性を有するラジカルであり、生体内で L-アルギニンを基質として NO 合成酵素 (NO synthase: NOS) によって産生される。NOS には誘導型 NOS (inducible NOS: iNOS)、神経型 NOS (neuronal NOS: nNOS) および内皮型 NOS (endothelial NOS: eNOS) の 3 種のアイソザイムが存在する。NO は多臓器への影響と同様に、消化管に対しても二面性の生理作用を示す。消化管の恒常性維持には、主に構成型 NOS (constitutive NOS: cNOS) である nNOS および eNOS によって産生される NO が関与し、産生された NO は神経伝達物質として消化管の弛緩を介して消化管運動を維持する。また、血管拡張作用、血管内皮への好中球の接着防止を介した粘膜保護作用、殺菌作用による潰瘍防止作用を示す。一方、iNOS 由来の NO はエンドトキシンショック誘発作用、消化管傷害作用などを示す。前述した Takano らの報告では、ラットへの MTX 50 mg/kg 単回腹腔内投与が小腸 iNOS 発現を増加させるものの cNOS 発現には影響を及ぼさないこと、さらに非特異的 NOS 阻害薬である N^G-ニトロ-L-アルギニンメチルエステル (N^G-nitro-L-arginine methyl ester: L-NAME) が、嘔吐類似行動発現や体重増加抑制、摂餌量の低下などの QOL に大きな影響を与えずに、5-HT 合成促進作用を有意に抑制することが示されている。²⁸⁾ 一方、ラットへの MTX の反復投与は、著明な消化管粘膜炎症を引き起こし、その要因として様々な炎症性サイトカインやそれに伴う NO 産生、アラキドン酸代謝系の亢進が関与していることが報告されている。²⁹⁻³¹⁾ 従って 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る。上述の通り MTX をはじめとする抗がん剤による消化管傷害は、副作用の中でも頻度が高く、骨髄抑制、腎障害、肝障害など他の副作用も同時に発現することから、治療の遅延や中断を引き起こす大きな要因となっている。³²⁻³⁴⁾ しかし、MTX 投与による小腸組織傷害の詳細なメカニズムは解明されておらず、副作用対策も不十分であるのが現状である。³⁵⁾ 従って MTX 投与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もつながり、結果的に臨床における MTX の忍容性を高めることが期待できる。

本研究の目的は、ラットへの MTX 投与による小腸組織傷害に及ぼす影響とそのメカニズムの一端を明らかにすることである。本研究では、主に抗がん剤として使用される際の MTX 投与による消化管に対する影響を検討するため、ラットへの MTX の投与方法として腹腔内投与を選択した。第 1 章では、小腸組織像に及ぼす MTX 投与の影響と小腸 GLP-2 発現との関係について、小腸組織傷害を引き起こす代表的な抗がん剤である 5-FU 投与の影響と比較検討した。第 2 章では、MTX 単回投与および分割投与によるラット QOL および小腸組織像に及ぼす影響と NO の役割について検討した。

本論

第1章 小腸組織像に及ぼす MTX 投与の影響と小腸 GLP-2 発現との関係—5-FU 投与との比較—

第1節 緒言

一般的に細胞傷害性抗がん剤は代謝回転の早い消化管粘膜上皮細胞に作用し、組織傷害を引き起こす。動物実験においても、抗がん剤投与により炎症を伴う小腸組織傷害を引き起こすことが多数報告されているが、²¹⁾ Takano らは、MTX 50 mg/kg 単回腹腔内投与が小腸 5-HT 合成系を亢進させ、遅発性の嘔吐類似行動を引き起こす一方で、小腸組織像に著明な影響を及ぼさないことを報告した。²⁵⁾ 従って MTX 単回投与による小腸組織への影響は、他の抗がん剤投与による影響と異なる特徴を有することが考えられた。GLP-2 は消化管恒常性の維持に寄与する代表的な消化管ホルモンのひとつであることから、ラットに嘔吐類似行動を引き起こす用量の MTX を単回投与しても小腸組織傷害が軽微である理由に MTX による小腸 GLP-2 発現への影響が関与している可能性を考えた。

そこで第1章では、小腸組織像に及ぼす MTX 投与の影響と小腸 GLP-2 発現との関係について、小腸組織傷害を引き起こす代表的な抗がん剤である 5-FU 投与の影響と比較検討した。

第2節 方法

1) 使用動物

実験動物として9週齢の雄性ウイスター系ラット（日本エスエルシー社，静岡）を使用した。動物は北海道医療大学動物実験センター内で人工照明（800ルクス）による12時間毎の明暗環境（明期：8:00–20:00，暗期：20:00–8:00），一定の温度（ $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ），相対湿度（ $50 \pm 10\%$ ），換気回数（12回/時間）下で飼育され，水（水道水）および固形飼料（MF，日本オリエンタル酵母工業，東京）を自由摂取させた。実験には健康で順調な発育がみられた動物のみを使用した。なお，本研究の動物実験は「北海道医療大学動物実験規程」に基づいて行われた。

2) 使用薬物および使用試薬

メトトレキサート（注射用メトトレキサート[®] 50 mg）をファイザー（東京）より購入した。5-フルオロウラシル（5-FU 注 250 mg）を協和発酵キリン（東京）より購入した。生理食塩水を大塚製薬（大塚生食注，東京）より購入した。TRI[®] Reagent，イソプロパノールをSigma-Aldrich（MO, USA）より購入した。PrimeScript[™] One-Step RT-PCR Kit をタカラバイオ（滋賀）より購入した。VECTASTAIN[®] elite ABC KIT を Vector Laboratories（CA, USA）より，3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride（DAB）を同仁化学研究所（熊本）より購入した。ウサギ抗ミエロペルオキシダーゼ（myeloperoxidase: MPO）抗体を Thermo Fisher Scientific（MA, USA）より購入した。ウサギ抗 GLP-2 抗体を Bioss Antibodies（MA, USA）より購入した。ヒストファイン シンプルステインラインラット MAX-PO（MULTI）をニチレイバイオサイエンス（東京）より購入した。Assay Max GLP-2 ELISA kit を Assaypro LLC（MO, USA）より，Quantikine ELISA Mouse/Rat IGF-1 Immunoassay を R&D Systems（MN, USA）より購入した。その他の試薬は，すべて特級規格または生化学分析用を富士フィルム和光純薬（大阪）より購入して使用した。

3) 薬物投与プロトコール

ラットに MTX (50 mg/kg) , 5-FU (100 mg/kg) または生理食塩水を単回腹腔内投与し、投与後 24 または 72 時間後に各検討を行った (Fig. 3) .

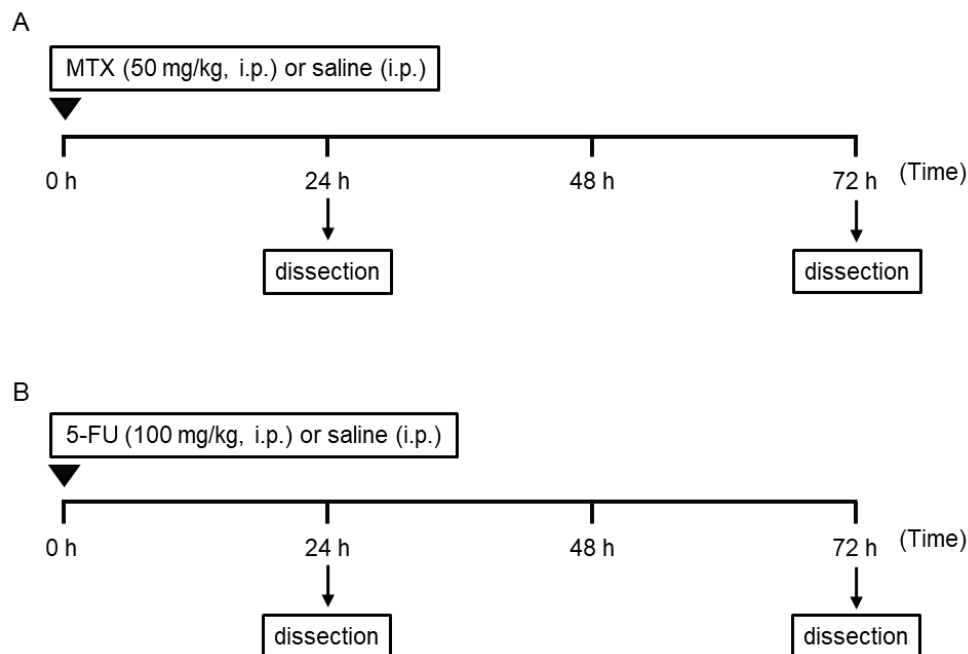


Fig. 3. Schedule of Administration of MTX (A) or 5-FU (B) to Rats

4) 小腸組織の摘出と血液の採取

ラットをイソフルラン麻酔下、放血致死させた。その際に血液凝固阻害剤であるエチレンジアミン四酢酸二カリウム並びに DPP-4 阻害薬を含むタンパク安定化剤含有の採血管 (BD800; Becton Dickinson and Company, NJ, USA) に血液を採取した。その後、回腸を摘出し、滅菌リン酸緩衝食塩水 (phosphate-buffered saline: PBS) (pH 7.4) 内で脂肪などの付着物を滅菌済みのピンセットで除去した。

5) パラフィン切片の作成

4) にて摘出した腸管を縦方向に切開し、腸管内の内容物を滅菌 PBS 内で洗浄した。絨毛側が上部になるようにゴム板に張り付け 10% 中性緩衝ホルマリン液 (pH 7.4) に浸し固定した。その後、パラフィン処理し薄切切片を作成した。

6) 小腸粘膜組織形態の観察

5) にて作成した薄層切片をヘマトキシリン・エオシン (hematoxyline and eosin: HE) 染色し、顕微鏡にて観察した。なお、本工程は株式会社モルフォテクノロジー (札幌) に依頼し行われた。

7) 抗 MPO 抗体を用いた免疫組織化学 (酵素抗体法)

5) にて作成した切片を、脱パラフィン (キシレン 10 分間 3 回, 100% エタノール 5 分間 2 回, 95% エタノール 5 分間 2 回, 70% エタノール 5 分間 1 回, 蒸留水 5 分間 2 回それぞれ洗浄) した。次に, 95°C の抗原賦活化液 (pH 9) (Agilent, CA, USA) で 20 分間抗原賦活化し, その後 10 分間室温放置し冷却した。次いで蒸留水で洗浄し, 内因性ペルオキシダーゼを阻害するため, 0.3% 過酸化水素に 10 分間浸し, トリス緩衝生理食塩水 (tris-buffered saline: TBS) にて 2 回洗浄した。次に, 一次抗体として Dako REAL 抗体希釈液 (Agilent) にて 200 倍に希釈した抗 MPO 抗体を 4°C で一晩反応させた。未反応抗体は TBS にて洗浄した。次いで, 二次抗体 (ヒストファイン シンプルステインラインラット MAX-PO MULTI) を室温で 30 分間反応させ, 未反応抗体を TBS で洗浄した。DAB により発色後, TBS で洗浄した。次いでヘマトキシリンにより核染色し, 蒸留水でヘマトキシリンを洗浄した後, 脱水 (蒸留水 5 分間 2 回, 70% エタノール 5 分間 1 回, 95% エタノール 5 分間 2 回, 100% エタノール 5 分間 2 回それぞれ洗浄), 透徹 (キシレン 10 分間 3 回洗浄) し, マウントクイック (大道産業, 埼玉) を用いて封入した。封入後は一晩水平条件で乾燥させ, 撮影した。なお, 本工程は株式会社モルフォテクノロジー (札幌) に依頼し行われた。

8) 抗 GLP-2 抗体を用いた免疫組織化学 (酵素抗体法)

7) と同様の操作にて脱パラフィンを行い, 95°C のクエン酸緩衝液 (pH 6) を用い抗原賦活化を行った。一次抗体として 300 倍に希釈した抗 GLP-2 ポリクローナル抗体を用いた。以降の手順は 7) に準じて行われた。

9) 抗 GLP-2 抗体陽性細胞数の計測

8) にて染色されたプレパラートを NDP にて観察し, 各サンプルの隣り合った 20 本の絨毛を 2 ヶ所選択し, 存在する抗 GLP-2 抗体陽性細胞を計数した。結果を絨毛 1 本あたりの陽性細胞数として表した。

10) 小腸組織からの total RNA の抽出

4) にて抽出した腸管の内容物を滅菌 PBS 内で洗浄した。これを TRI[®] Reagent 1 mL 中に浸し、バイオミキサー（日本精機製作所，東京）にてホモジナイズ（6,000 rpm，氷中，30 秒間）した。ホモジネートを遠心分離（15,000×g，4℃，10 分間）して，上清を分取し，5 分間室温に静置後，クロロホルム 200 μL 加えて穏やかに混和した。さらに 15 分間室温に静置後，遠心分離（15,000×g，4℃，15 分間）した。三層より上清を分取し，イソプロパノール 500 μL を加えて穏やかに混和し，10 分間室温に静置後，遠心分離（15,000×g，4℃，10 分間）し，上清を除去した。沈殿した total RNA に 75%エタノール 1 mL を加えて遠心分離（15,000×g，4℃，10 分間）し，上清を除去した。沈殿した total RNA を滅菌蒸留水で溶解した。Nano Drop[®] DN-1000 Spectrophotometer（Nano Drop Technologies，DE，USA）を用いて 260 nm での吸光度を測定し，total RNA の濃度を求めた。

11) Real-time RT-PCR 法

10) にて得られた total RNA を 20 ng/μL に希釈し，Real-time RT-PCR に用いた。2×One Step SYBR RT-PCR Buffer 10 μL，TaKaRa Ex Taq HS Mix 1.2 μL，Prime Script PLUS RTase Mix 0.4 μL，ROX 0.4 μL，プライマー（Forward，Reverse）各 0.8 μL，試料 2 μL，滅菌蒸留水 4.4 μL を混和し，7500 Real-time PCR System（アプライドバイオシステムジャパン，東京）を用いて増幅反応を行った。逆転写反応を 42℃ 5 分間，95℃ 10 秒間行い，その後，PCR 反応は 95℃ 5 秒間，60℃ 34 秒間を 45 回繰り返すことで行った。使用したプログラムカゴン，GLP-2 受容体，IGF-1，TGF-β1，TGF-β2，TGF-β3，β-カテニン，exchange protein directly activated by cAMP1（Epac1），Epac2 のプライマーを Table 1 に示した。内部標準遺伝子にグリセルアルデヒド 3-リン酸デヒドロゲナーゼ（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: GAPDH）を用い，GAPDH と各遺伝子の PCR 産物の示す明度の相対値を算出し，その結果から mRNA 発現量を比較 C_t法により求めた。

Table 1. Primers for Real-time RT-PCR

Product		Sequences (5' → 3')	Reference
Proglucagon	Forword	AACAACATTGCCAAACGTCA	36)
	Reverse	CAATGAATTCCTTTGCTGCC	
GLP-2 receptor	Forword	CGGATTCTGGAAATTCTTC	37)
	Reverse	CCCAGGAACCGGAAATTCTTC	
IGF-1	Forword	AAGCCTACAAAGTCAGCTCG	38)
	Reverse	GGTCTTGTTTCCTGCACTTC	
TGF-β1	Forword	TGGCGTTACCTTGGTAACC	39)
	Reverse	GGTGTTGAGCCCTTCCAG	
TGF-β2	Forword	ATCGATGGCACCTCCACATATG	39)
	Reverse	GCGAAGGCAGCAATTATGCTG	
TGF-β3	Forword	AAGCGCACAGAGCAGAGAATC	39)
	Reverse	AGTGTCAGTGACATCGAAG	
β-catenin	Forword	GCCAAGTGGGTGGCATAGA	40)
	Reverse	TCCCTGTCACCAGCACGAA	
DPP-4	Forword	TCCCAACTCCAGAGGACAAC	41)
	Reverse	CAGGGCTTTGGAGATCTGAG	
Epac1	Forword	GTGTTGGTGAAGGTCAATTCTG	42)
	Reverse	CCACACCACGGGCATC	
Epac2	Forword	TGTTAAAGTGTCTGAGACCAGCA	42)
	Reverse	AAAGGCTGTCCCAATTCCCAG	
GAPDH	Forword	ATGTTCCAGTATGACTCCACTCACG	43)
	Reverse	GAAGACACCAGTAGACTCCACGACA	

12) 血漿 GLP-2 の測定

4) にて採取した血液を室温で 20 分間静置し、その後、遠心分離 (1,600×g, 室温, 20 分間) し、得られた血漿を試料とした。血漿 GLP-2 濃度を Assay Max GLP-2 ELISA kit を用いて測定した。試料を 50 μL ずつ GLP-2 抗体がコーティングされたマイクロプレートに加え、

2時間室温で静置した。その後、200 μ L の Wash Buffer で5回洗浄した。50 μ L の Biotinylated GLP-2 Antibody を加え、室温で1時間静置した。その後、50 μ L の SP Conjugate を加え、室温で30分間静置した。200 μ L の Wash Buffer で5回洗浄した。100 μ L の Substrate Solution を加え、室温で30分間静置した。50 μ L の Chromogen Substrate を加え、室温で12分間静置した。50 μ L の Stop Solution を加え、混和した。その後450 nm の吸光度をマイクロプレートリーダー (BIO-RAD, CA, USA) で測定した。標準品を用いて作成した検量線から GLP-2 の濃度を求めた。

13) 血漿 IGF-1 の測定

4) にて採取した血液を室温で20分間静置し、その後、遠心分離 (1,600 \times g, 室温, 20分間) し、得られた血漿を Calibrator Diluent RD5-38 で1,000倍に希釈したものを試料とした。Calibrator Diluent RD5-38 および試料をそれぞれ50 μ L ずつ IGF-1 抗体がコーティングされたマイクロプレートに加え、500 \pm 50 rpm でシェーカー上、2時間室温でインキュベートした。その後、200 μ L の Wash Buffer で洗浄し、この操作を4回繰り返した。100 μ L の Mouse/Rat IGF-1 Conjugate を加え、シェーカー上室温にて2時間インキュベートした。その後、200 μ L の Wash Buffer で洗浄し、この操作を4回繰り返した。100 μ L の Substrate Solution を加え、30分間室温に静置した。100 μ L の Stop Solution を加え、混和した。その後450 nm の吸光度をマイクロプレートリーダー (BIO-RAD) で測定した。標準品を用いて作成した検量線から IGF-1 の濃度を求めた。

14) 統計学的処理および検定方法

測定値はすべて平均値 \pm 標準誤差 (Mean \pm S.E.) で示した。2群間の比較は F 検定後、Student's unpaired t -test または Welch's t -test を行い、危険率5%未満 ($p < 0.05$) をもって統計学的に有意と判断した。

第3節 結果

第1項 小腸組織形態に及ぼす MTX および 5-FU 投与の影響

小腸組織形態に及ぼす MTX および 5-FU 投与の影響を HE 染色にて検討した。MTX は投与 24 および 72 時間後において小腸組織形態に著明な影響を及ぼさなかった (Fig. 4)。一方, 5-FU 投与は 24 時間後において軽度の絨毛萎縮を (Fig. 4A), さらに 72 時間後においては上皮細胞配列の乱れなどを伴う重度の組織傷害を引き起こし (Fig. 4B), 時間依存的な小腸組織傷害の悪化が認められた。

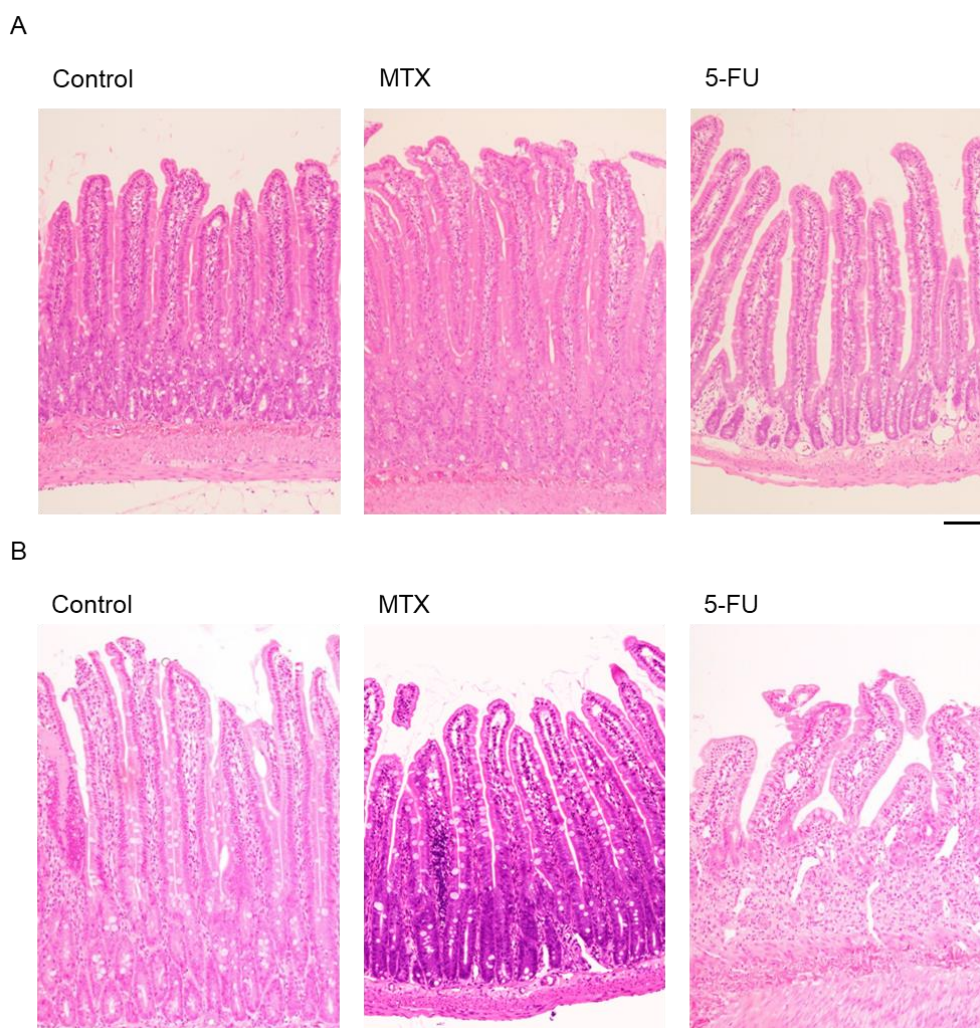


Fig. 4. Hematoxylin-eosin Stained Sections from Rat Ileal Mucosa

At 24 h (A) or 72 h (B) after a single intraperitoneal administration of saline (control), 50 mg/kg MTX or 100 mg/kg 5-FU, ileal tissues were isolated and fixed with 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin. Scale bars = 100 μ m.

第2項 小腸 MPO 発現に及ぼす MTX および 5-FU 投与の影響

第1項の検討により、5-FU 投与は時間依存的な小腸組織傷害を引き起こすことが明らかとなった。そこで次に小腸での炎症を観察するために、小腸 MPO 発現に及ぼす MTX および 5-FU 投与の影響を検討した。Fig. 5B および Fig. 6B にはそれぞれ Fig. 5A および Fig. 6A の囲み部分を拡大したものを示している。MTX 投与は MPO 発現に著明な影響を与えなかった (Fig. 5, 6)。一方 5-FU 投与は 24 時間以内に MPO 発現を増加させ (Fig. 5)，72 時間後までにさらに発現を増加させた (Fig. 6)。

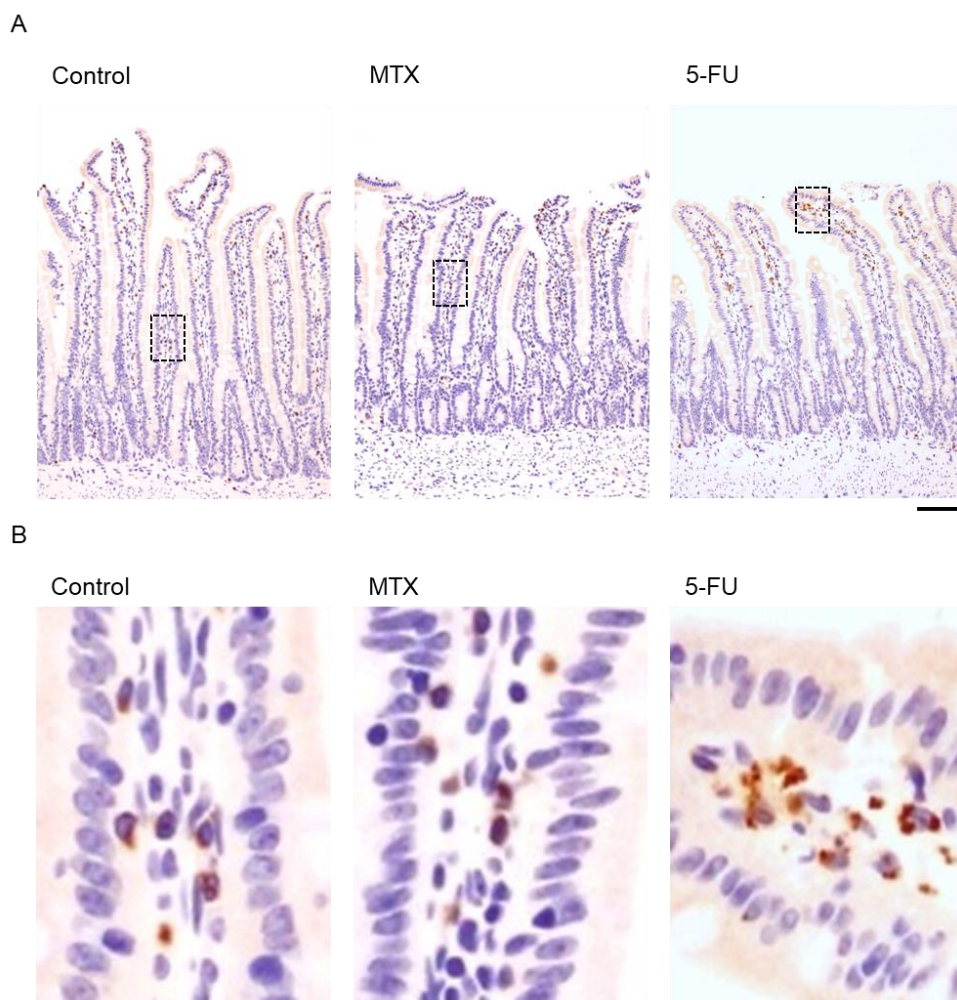


Fig. 5. Effect of MTX and 5-FU on MPO Expression in Ileal Tissue

A: At 24 h after the administration of saline (control), 50 mg/kg MTX or 100 mg/kg 5-FU, ileal tissues were isolated and fixed with 4% paraformaldehyde for immunohistochemical examination with an anti-MPO antibody. B: Magnification of the square with a dotted line in A. Scale bars = 100 μm for A, 20 μm for B.

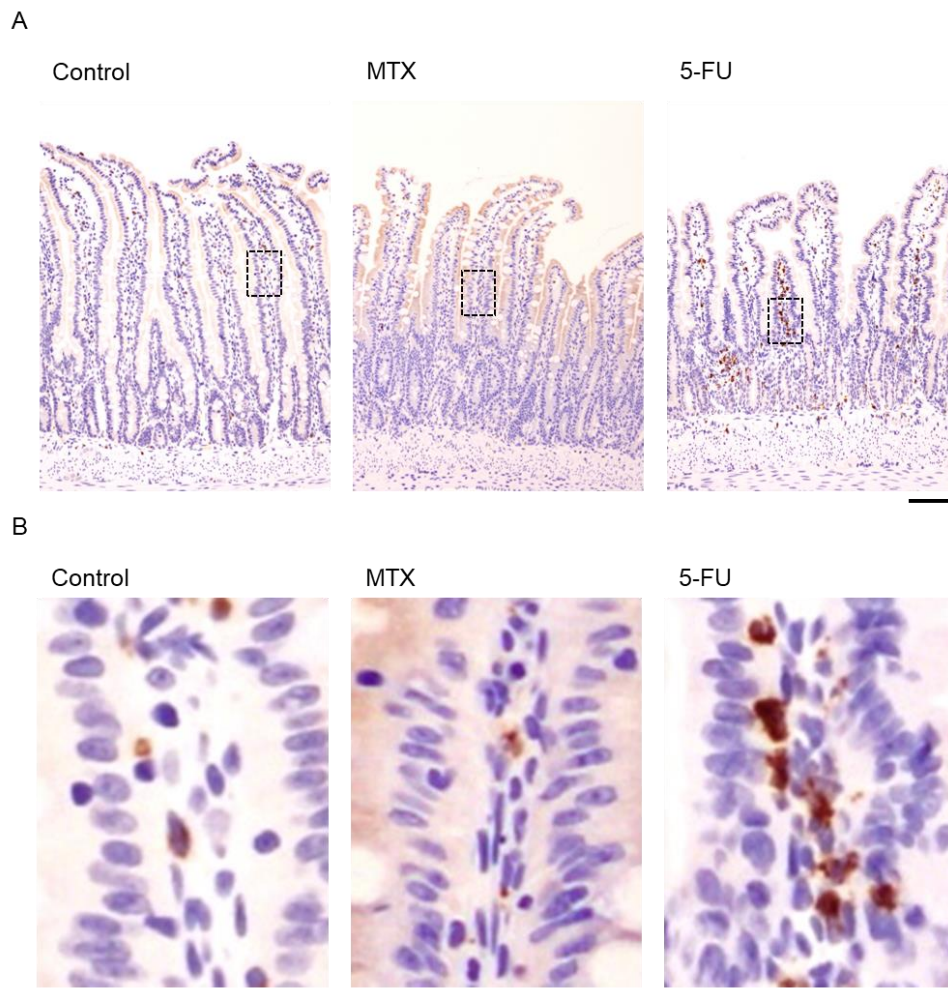


Fig. 6. Effect of MTX and 5-FU on MPO Expression in Ileal Tissue

A: At 72 h after the administration of saline (control), 50 mg/kg MTX or 100 mg/kg 5-FU, ileal tissues were isolated and fixed with 4% paraformaldehyde for immunohistochemical examination with an anti-MPO antibody. B: Magnification of the square with a dotted line in A. Scale bars = 100 μm for A, 20 μm for B.

第3項 プログルカゴン mRNA 発現に及ぼす MTX および 5-FU 投与の影響

第1項および第2項の検討において抗がん剤投与による小腸組織形態への影響は投与24時間後で既に異なっていたことから、GLP-2 関連遺伝子発現をはじめとする以降の検討はすべて薬物投与24時間後で行った。

まず、GLP-2 の前駆物質であるプログルカゴン mRNA 発現に及ぼす MTX および 5-FU 投与の影響について検討した。MTX 投与はプログルカゴン mRNA 発現を有意に増加させ (Fig. 7A) , 5-FU 投与はこれを有意に減少させた (Fig. 7B) .

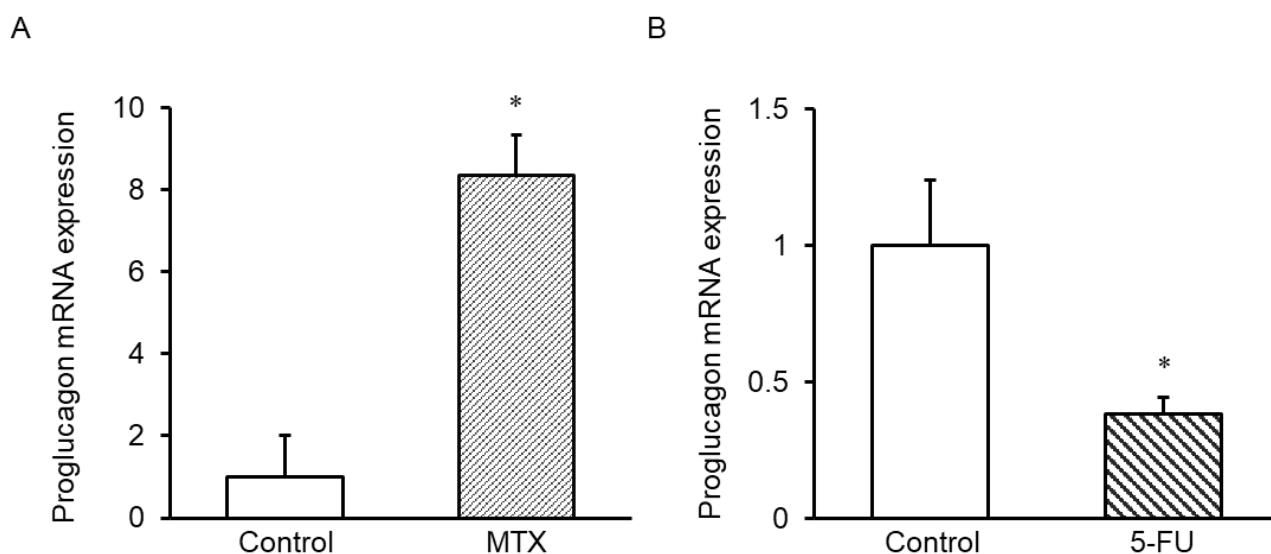


Fig. 7. Effect of MTX and 5-FU on Proglucagon mRNA Expression in Rat Ileal Tissue

Each column represents the mean \pm S.E. (n = 6 each for A; n = 6 for control and 5 for 5-FU for B). * $p < 0.05$ versus control.

第4項 抗 GLP-2 抗体陽性細胞数に及ぼす MTX および 5-FU 投与の影響

次に抗 GLP-2 抗体陽性細胞数に及ぼす MTX および 5-FU 投与の影響について検討した。Fig. 8A および Fig. 9A の矢印には抗 GLP-2 抗体を用いた酵素抗体法によって染色された細胞を示しており，Fig. 8B および Fig. 8B にはそれぞれ Fig. 8A および Fig. 9A の囲み部分を拡大したものを示している。抗 GLP-2 抗体陽性細胞は絨毛上皮細胞および陰窩に局在していた (Fig. 8, 9)。Fig. 10 には絨毛 1 本あたりの抗 GLP-2 抗体陽性細胞を計数した結果を示している。MTX 投与は抗 GLP-2 抗体陽性細胞数を有意に増加させ (Fig. 10A)，5-FU 投与はこれを有意に減少させた (Fig. 10B)。

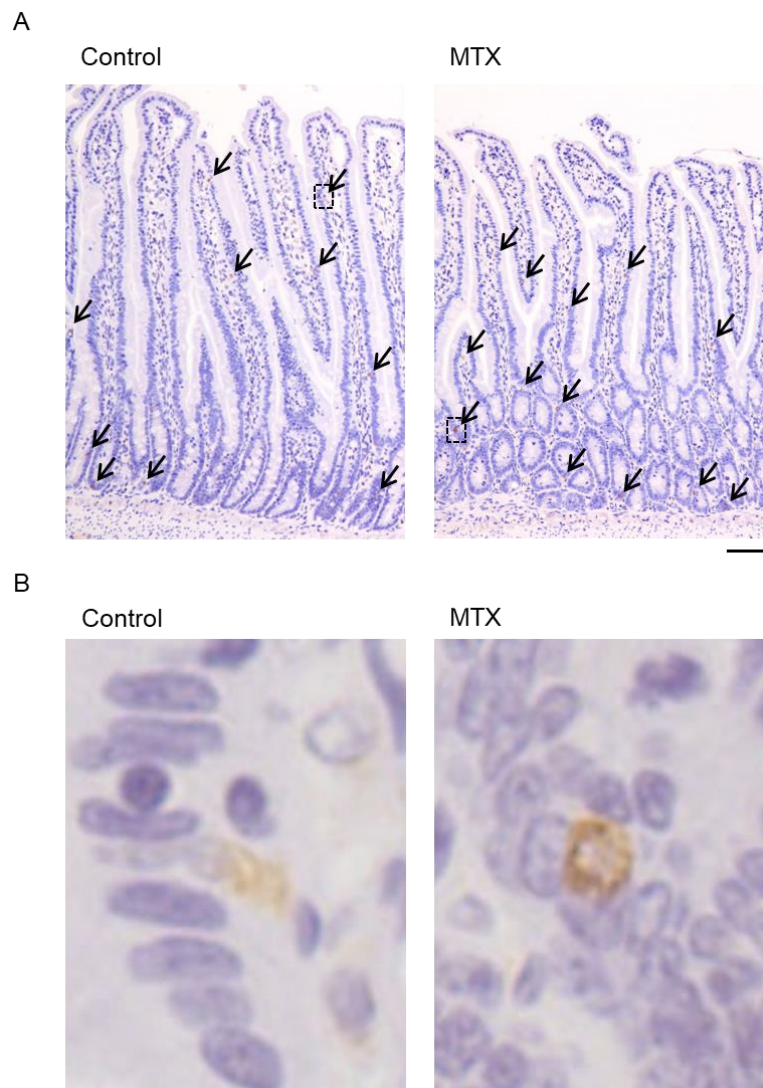


Fig. 8. Effect of MTX on Anti-GLP-2 Antibody-Positive Cells (*i.e.*, L-Cells) in Rat Ileal Tissue

A: At 24 h after the administration of saline (control) or 50 mg/kg MTX, ileal tissues were isolated and fixed with 4% paraformaldehyde for immunohistochemical examination using an anti-GLP-2 antibody. Arrows indicate GLP-2-expressing cells in the ileal mucosa. Scale bars = 100 μ m. B: Magnification of the square with a dotted line in A.

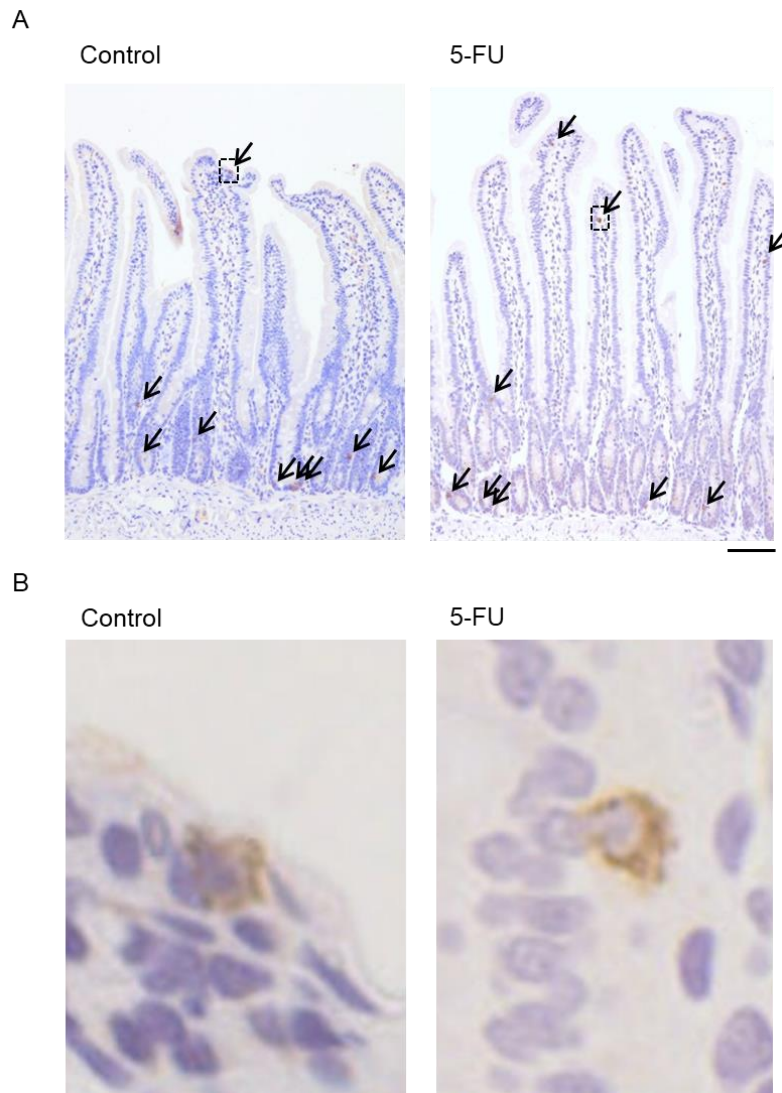


Fig. 9. Effect of 5-FU on Anti-GLP-2 Antibody-Positive Cells (*i.e.*, L-Cells) in Rat Ileal Tissue

A: At 24 h after the administration of saline (control) or 100 mg/kg 5-FU, ileal tissues were isolated and fixed with 4% paraformaldehyde for immunohistochemical examination using an anti-GLP-2 antibody. Arrows indicate GLP-2-expressing cells in the ileal mucosa. Scale bars = 100 μ m. B: Magnification of the square with a dotted line in A.

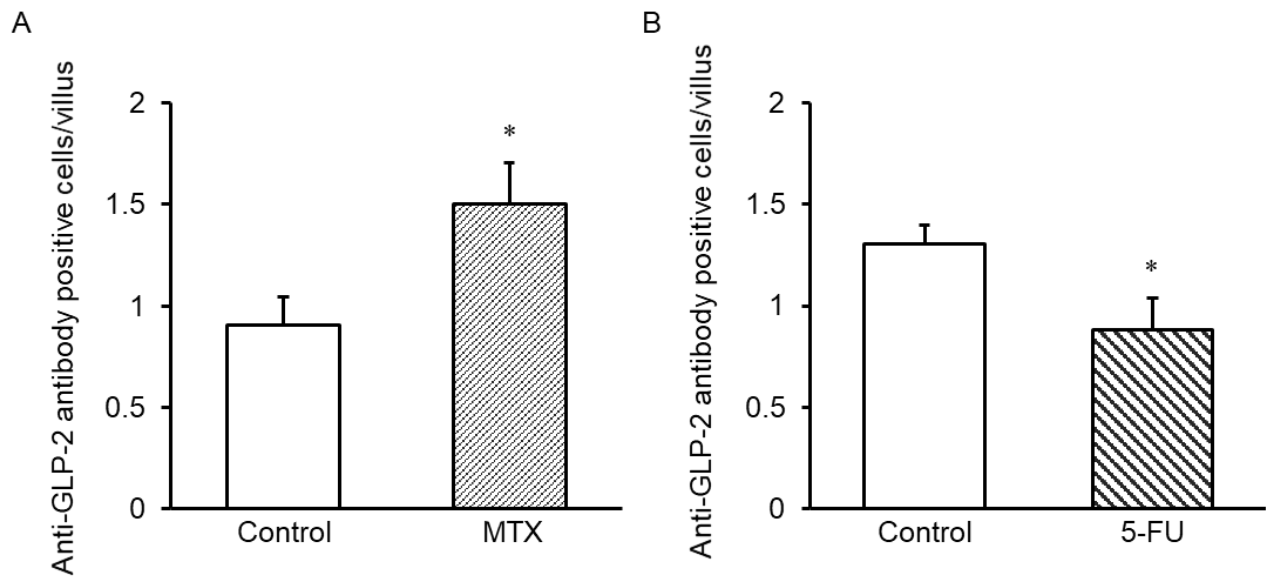


Fig. 10. Effect of MTX and 5-FU on Number of Anti-GLP-2 Antibody Positive Cells in Rat Ileal Tissue

Each column represents the mean \pm S.E. (n = 5 each for A; n = 6 each for B). * $p < 0.05$ versus control.

第5項 血漿 GLP-2 濃度に及ぼす MTX および 5-FU 投与の影響

血漿 GLP-2 濃度に及ぼす MTX および 5-FU 投与の影響を検討した. MTX および 5-FU 投与ともに血漿 GLP-2 濃度に有意な影響を及ぼさなかった (Fig. 11) .

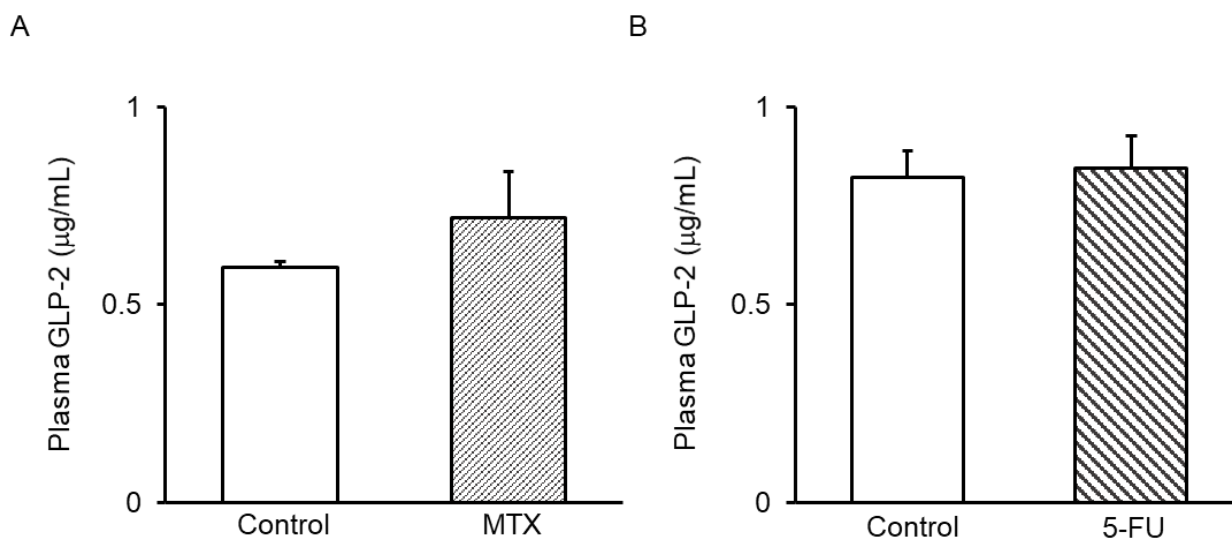


Fig. 11. Effect of MTX and 5-FU on GLP-2 Concentration in Rat Plasma

Each column represents the mean \pm S.E. (n = 6 each for A; n = 6 for control and 5 for 5-FU). * p < 0.05 versus control.

第6項 GLP-2 受容体 mRNA 発現に及ぼす MTX および 5-FU 投与の影響

これまでの検討で MTX 投与は小腸 GLP-2 発現を亢進し, 5-FU 投与はこれを抑制することが明らかとなった. そこで次に GLP-2 受容体発現および受容体刺激により変動するシグナル伝達経路への MTX および 5-FU 投与の影響を検討した. まず本項では, GLP-2 受容体 mRNA 発現に及ぼす MTX および 5-FU 投与の影響を検討した. MTX 投与は GLP-2 受容体 mRNA 発現を有意に増加させ (Fig. 12A), 5-FU 投与はこれを有意に減少させた (Fig. 12B).

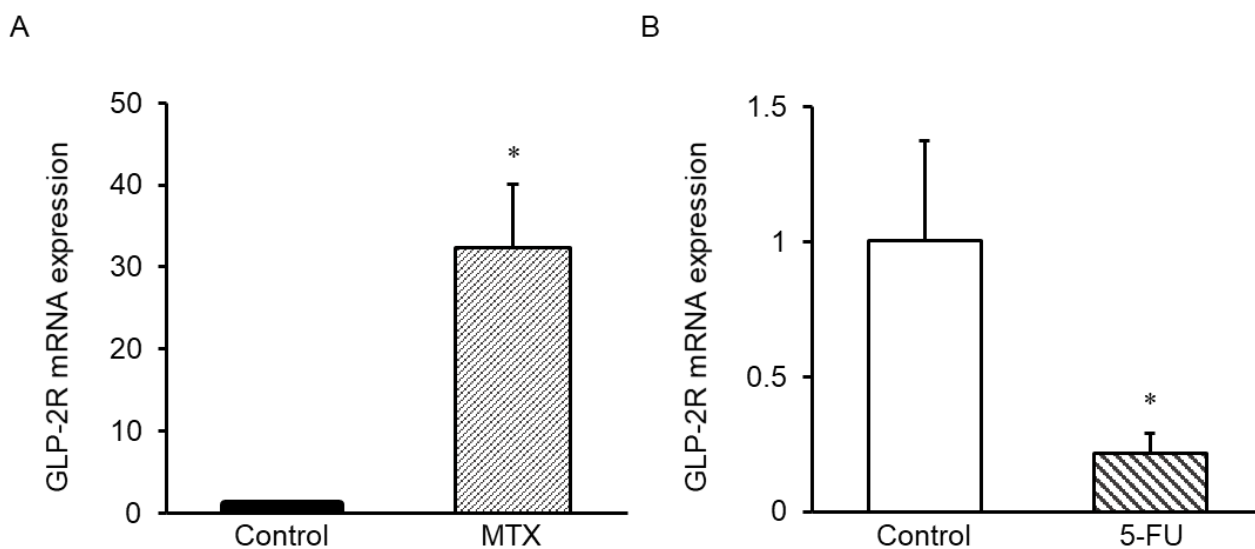


Fig. 12. Effect of MTX and 5-FU on GLP-2 Receptor mRNA Expression in Rat Ileal Tissue

Each column represents the mean \pm S.E. ($n = 5$ each for A; $n = 5$ for control and 6 for 5-FU for B). * $p < 0.05$ versus control.

第7項 IGF-1 mRNA 発現に及ぼす MTX および 5-FU 投与の影響

次に GLP-2 受容体刺激により転写が誘導される IGF-1^{18,19)} の mRNA 発現に及ぼす MTX および 5-FU 投与の影響について検討した。MTX 投与は IGF-1 mRNA 発現を有意に増加させ (Fig. 13A) , 5-FU 投与はこれを有意に減少させた (Fig. 13B) .

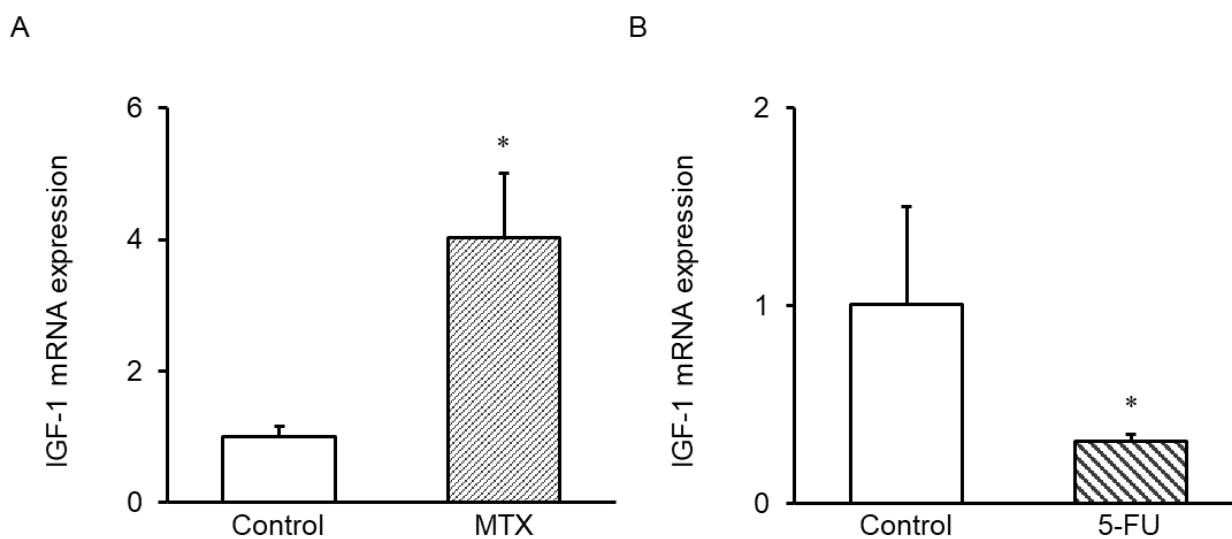


Fig. 13. Effect of MTX and 5-FU on IGF-1 mRNA Expression in Rat Ileal Tissue

Each column represents the mean ± S.E. (n = 6). * $p < 0.05$ versus control.

第8項 血漿 IGF-1 濃度に及ぼす MTX および 5-FU 投与の影響

血漿 IGF-1 濃度に及ぼす MTX および 5-FU 投与の影響について検討した。MTX は血漿 IGF-1 濃度に影響を及ぼさなかったが (Fig. 14A) , 5-FU はこれを有意に減少させた (Fig. 14B) .

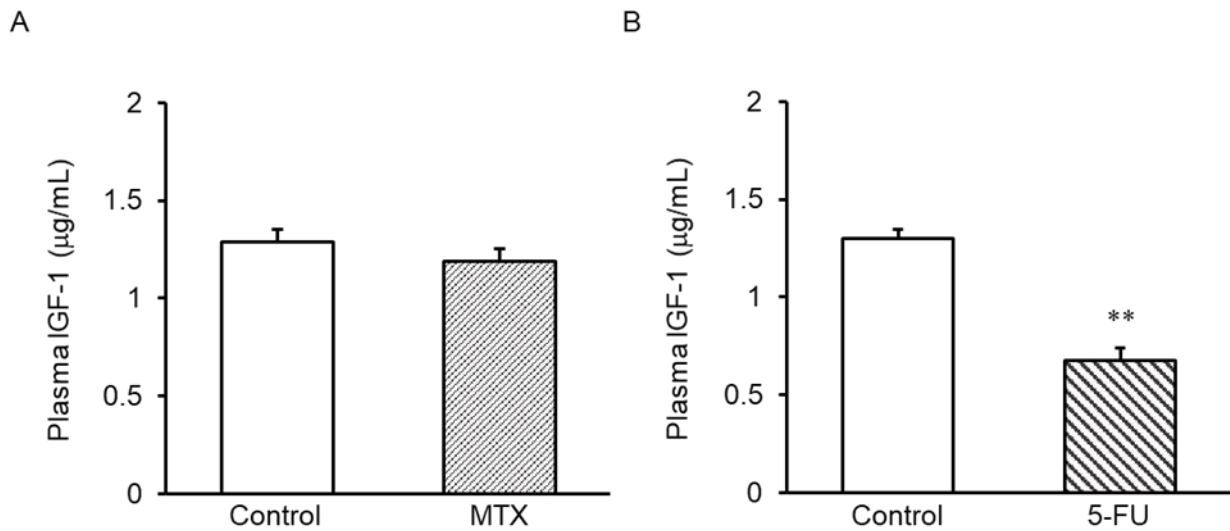


Fig. 14. Effect of MTX and 5-FU on IGF-1 Concentration in Rat Plasma

Each column represents the mean \pm S.E. (n = 6 each for A; n = 5 each for B). ** $p < 0.01$ versus control.

第9項 TGF- β mRNA 発現に及ぼす MTX および 5-FU 投与の影響

IGF-1 と同様に GLP-2 受容体刺激により転写が誘導される TGF- β ²⁰⁾ の mRNA 発現に及ぼす MTX および 5-FU 投与の影響について検討した。哺乳類において TGF- β 1 から TGF- β 3 まで 3 つのアイソフォームが存在する。MTX 投与は TGF- β 2 mRNA 発現を有意に増加させたが (Fig. 15C) , TGF- β 1 および TGF- β 3 mRNA 発現には有意な影響を与えなかった (Fig. 15A, 15E) 。 5-FU 投与は TGF- β 1 mRNA 発現を有意に増加させ (Fig. 15B) , TGF- β 2 mRNA 発現を有意に減少させた (Fig. 15D) 。 また, 5-FU 投与は TGF- β 3 mRNA 発現に影響を及ぼさなかった (Fig. 15F) 。

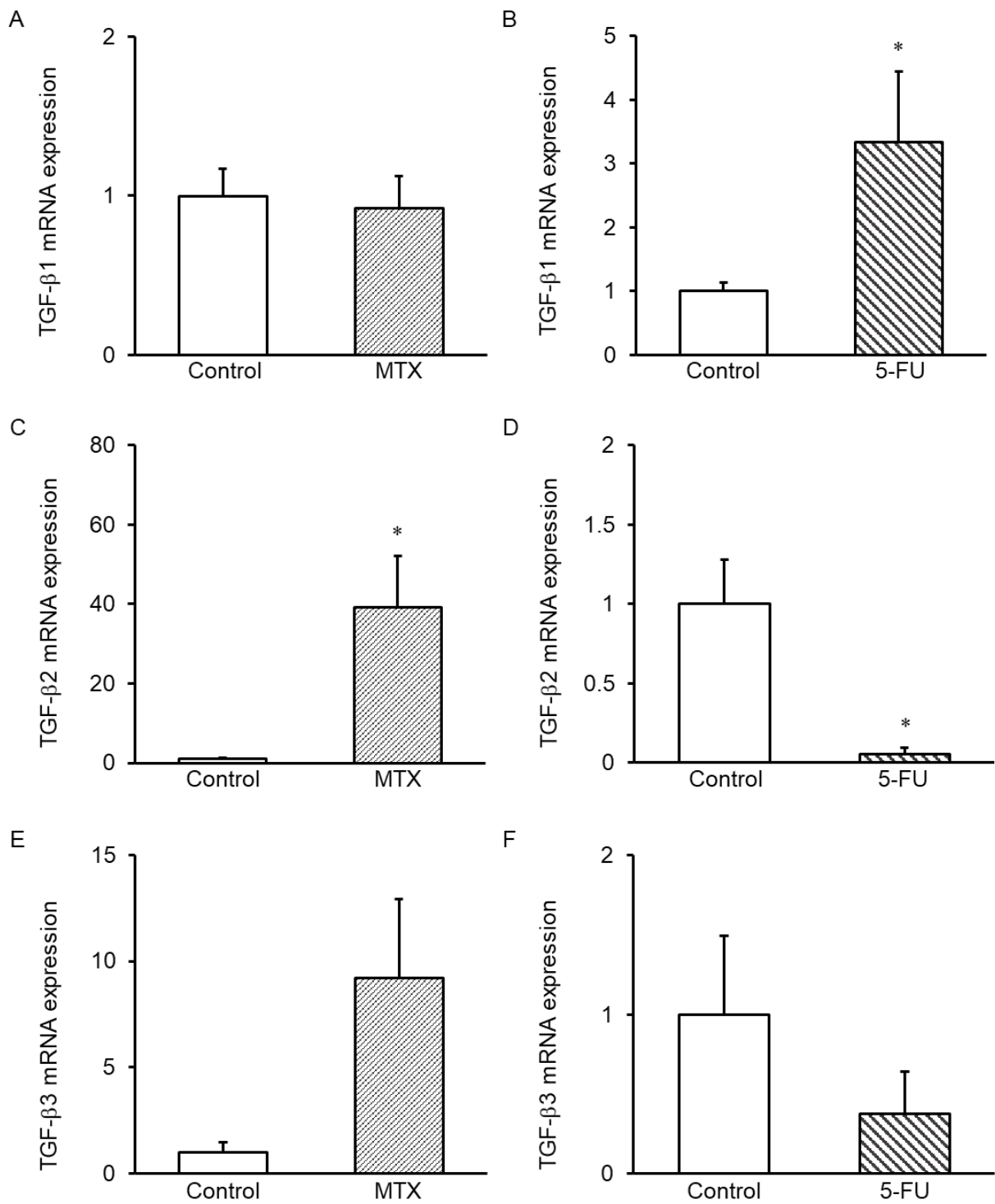


Fig. 15. Effect of MTX and 5-FU on TGF- β 1 (A and B), TGF- β 2 (C and D), and TGF- β 3 (E and F) mRNA Expression in Rat Ileal Tissue

Each column represents the mean \pm S.E. (n = 6 each for A, C, and E; n = 6 for control and 5 for 5-FU for B, D, and F). * $p < 0.05$ versus control.

第10項 β -カテニン mRNA 発現に及ぼす MTX および 5-FU 投与の影響

次に陰窩細胞において主に IGF-1 によって発現が誘導される β -カテニン^{18, 19)} の mRNA 発現に及ぼす MTX および 5-FU 投与の影響について検討した。MTX 投与は β -カテニン mRNA 発現を有意に増加させ (Fig. 16A), 5-FU 投与はこれを有意に減少させた (Fig. 16B)。

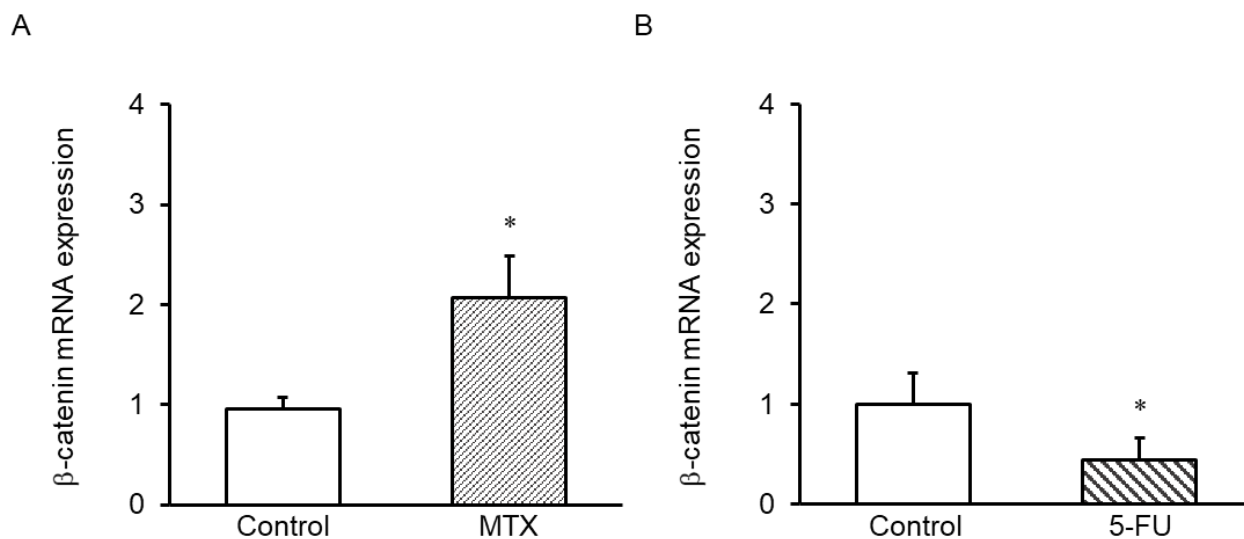


Fig. 16. Effect of MTX and 5-FU on β -catenin mRNA Expression in Rat Ileal Tissue

Each column represents the mean \pm S.E. (n = 6 each for A; n = 6 for control and 5 for 5-FU for B). * $p < 0.05$ versus control.

第 11 項 DPP-4 mRNA 発現に及ぼす MTX および 5-FU 投与の影響

次に GLP-2 の分解酵素である DPP-4 mRNA 発現に及ぼす MTX および 5-FU 投与の影響について検討した。MTX 投与は DPP-4 mRNA 発現を増加させる傾向を示し (Fig. 17A) , 5-FU 投与はこれを有意に増加させた (Fig. 17B) .

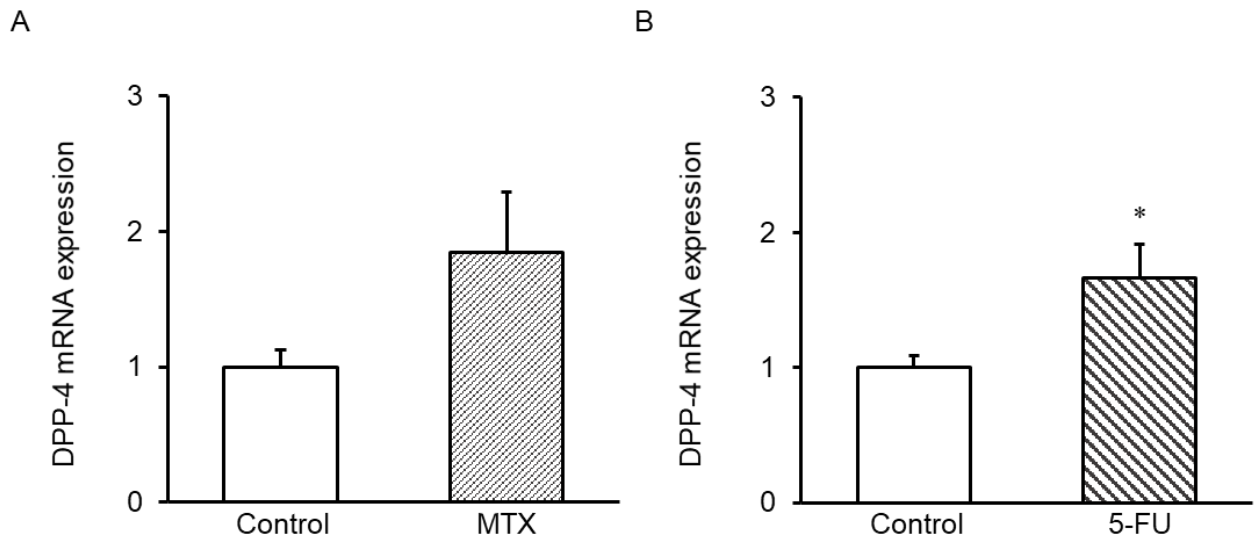


Fig. 17. Effect of MTX and 5-FU on DPP-4 mRNA Expression in Rat Ileal Tissue

Each column represents the mean \pm S.E. (n = 6 for control and 5 for MTX for A; n = 6 for control and 5 for 5-FU for B). * $p < 0.05$ versus control.

第 12 項 Epac1/2 mRNA 発現に及ぼす MTX および 5-FU 投与の影響

これまでの検討で、MTX 投与は GLP-2 発現およびそのシグナル伝達経路を亢進することが明らかとなった。MTX は前述の通り DHFR 阻害作用の他にアデノシン濃度上昇作用も有する。MTX 投与による小腸 GLP-2 発現亢進作用に、このアデノシン濃度上昇作用が関与している可能性を考え、次にアデノシン A_{2A} 受容体刺激により活性化される Epac1/2 mRNA 発現に及ぼす MTX および 5-FU 投与の影響を検討した。MTX 投与は Epac1 および Epac2 mRNA 発現を有意に増加させ (Fig. 18A, C) , 5-FU 投与はこれらの発現に影響を与えなかった (Fig. 18B, D) .

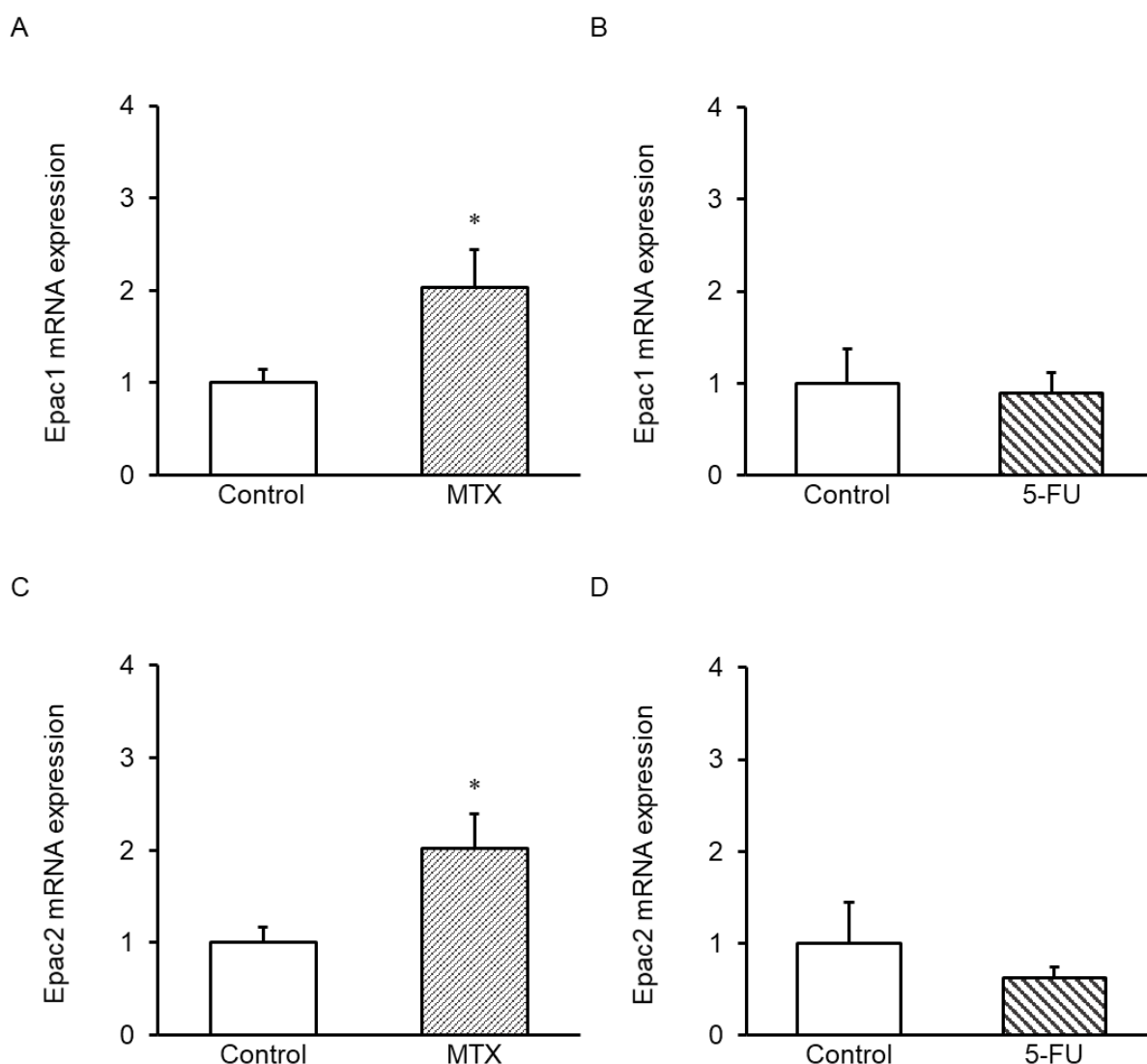


Fig. 18. Effect of MTX and 5-FU on Epac1 and Epac2 mRNA Expression in Rat Ileal Tissue

Each column represents the mean \pm S.E. (n = 6 each for A, C; n = 6 for control and 5 for 5-FU for B, D). * p < 0.05 versus control.

第 13 項 Epac1/2 mRNA 発現およびプログルカゴン mRNA 発現の相関

本項では、MTX および 5-FU 投与による GLP-2 発現の変動と Epac1/2 発現との関係について各薬物投与によるプログルカゴン mRNA 発現および Epac1/2 mRNA 発現との相関をとることにより検討した。Fig. 19 の各点はそれぞれ個別のラットのデータを示している。MTX 投与によるプログルカゴン mRNA 発現と Epac1 および Epac2 mRNA 発現には、それぞれ強い相関関係 ($R^2 = 0.9209$ および $R^2 = 0.8384$) が認められた (Fig. 19A, C) 。一方、5-FU 投与によるこれらの相関関係 ($R^2 = 0.0197$ および $R^2 = 0.0068$) は認められなかった (Fig. 19B, D) 。

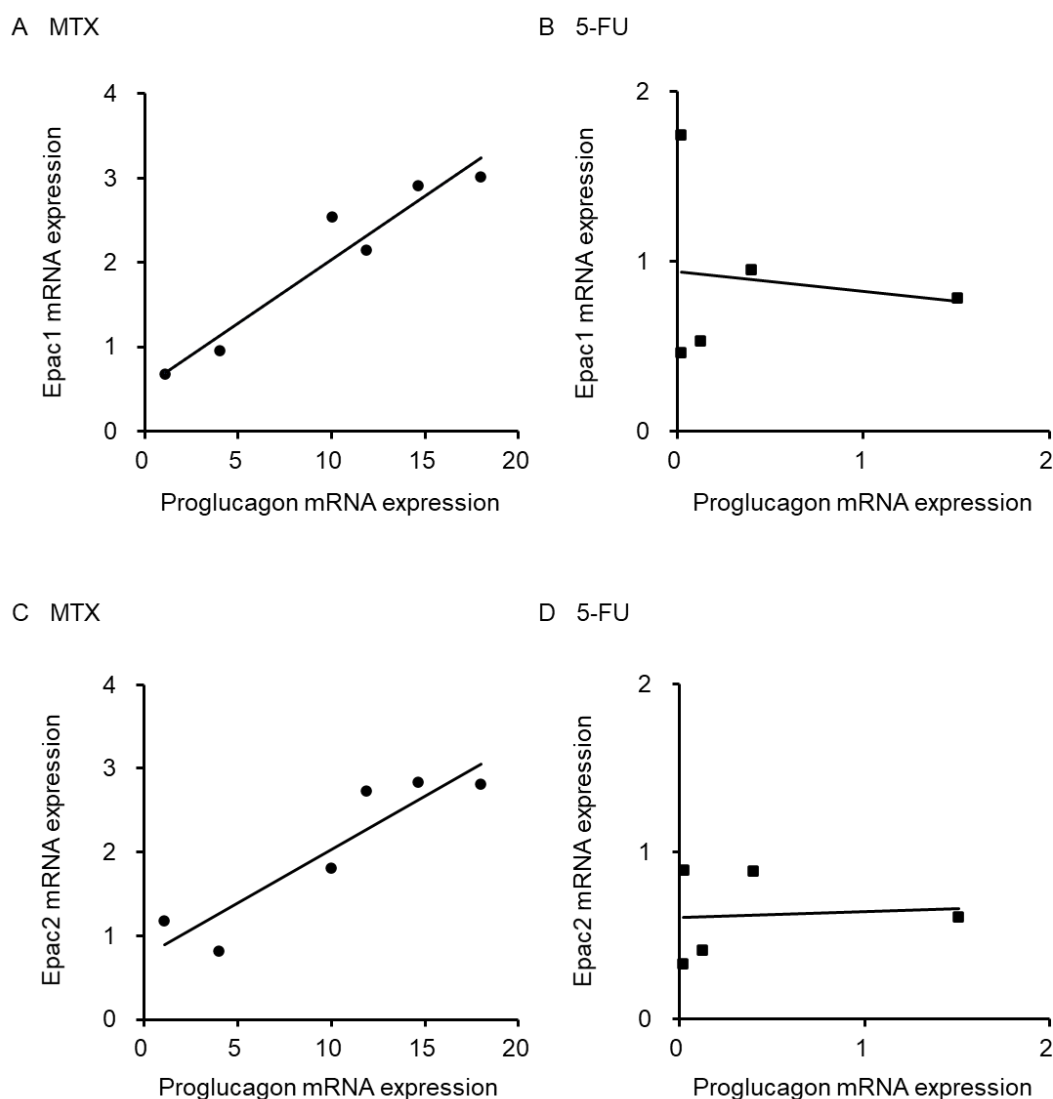


Fig. 19. Correlation between GLP-2 mRNA Expression and Epac1/2 mRNA Expression in MTX or 5-FU Treated Rat Ileal Tissue

第4節 考察

第1章では、ラットに嘔吐類似行動を引き起こす用量の MTX を投与しても小腸組織傷害が軽微である理由に、小腸 GLP-2 発現とそれに伴うシグナル伝達への影響が関与している可能性を考え、小腸組織像に及ぼす MTX 投与の影響と小腸 GLP-2 発現との関係について、5-FU 投与の影響と比較検討した。その結果 MTX は、時間依存的にわずかな小腸組織傷害を引き起こすものの著明な組織傷害を引き起こさず、Takano らの報告と一致した結果を得た。^{25,28)} また本研究において 5-FU 100 mg/kg 単回腹腔内投与は著明な小腸組織傷害を引き起こした。一般的にラットにおいては 400 mg/kg の 5-FU 投与で、消化管傷害が引き起こされるとの報告がなされているが、^{21,44)} 本研究では 100 mg/kg の 5-FU でも MPO 発現を伴う小腸組織傷害が認められた。

Kissow らは、ラットに 5-FU 400 mg/kg を単回腹腔内投与すると、投与 48 時間後をピークに炎症を伴う小腸組織傷害を引き起こすが、48 時間以降に血漿 GLP-2 濃度を増加させることで小腸組織傷害を回復させることを示している。²¹⁾ さらに GLP-2 アゴニスト (NNC 103-0066) が 5-FU 誘発性小腸組織傷害を改善させることを報告している。²¹⁾ また、L 細胞からの GLP-1 および GLP-2 の分泌を促進するメトホルミンと DPP-4 阻害薬のラットへの併用投与は、内因性 GLP-2 を増加させ、5-FU による小腸重量の減少を防ぐことが示されている。⁴⁵⁾

本研究では、MTX 投与が小腸において GLP-2 発現とそれに伴うシグナル伝達を亢進させ、これと対照的に 5-FU はこれらを低下させることを見出した。一方、MTX 投与は DPP-4 mRNA 発現を増加させる傾向を示し、5-FU はこれを有意に増加させた。DPP-4 は主に細胞膜や可溶性タンパク質として血中に存在するが、T 細胞などの免疫担当細胞表面にも CD26 として発現している。従って 5-FU 投与が DPP-4 mRNA 発現を増加させた理由に、5-FU 投与により傷害された小腸組織に DPP-4 を発現した免疫担当細胞が集積したことが考えられ、これは小腸において内因性 GLP-2 含量をさらに低下させる要因となることが考えられた。一方、MTX は投与 24 時間後の小腸において GLP-2 発現を有意に増加させた。MTX による抗 GLP-2 抗体陽性細胞数の増加は、即ち MTX が L 細胞数を増加させることを示唆している。同投与条件の MTX はまた、エンテロクロマフィン細胞の増殖も促進する。^{25,46)} 腸管上皮に存在する L 細胞やエンテロクロマフィン細胞などの内分泌細胞は、杯細胞、パネート細胞、吸収上皮細胞とともに絨毛陰窩に存在する腸管幹細胞 Lgr5 細胞から分化・増殖される。本研究により MTX は腸管上皮の内分泌細胞の増殖を促進することが明らか

となったが、この機序については未だ不明である。MTX が Lgr5 細胞数を増加させるのか、それとも幹細胞から内分泌細胞への分化を選択的に促進するののかについては、今後の研究が必要である。また、MTX および 5-FU は血漿 GLP-2 濃度に有意な影響を及ぼさなかったことから、小腸局所での GLP-2 発現の変動が小腸組織像に影響を与えると考えられた。

GLP-2 受容体は、ヒトならびにラット小腸の筋線維芽細胞および腸内神経に存在する。^{47, 48)} GLP-2 受容体 mRNA 発現は MTX 投与によって有意に増加した一方、5-FU によって減少したことから、これらの抗がん剤の投与が GLP-2 受容体刺激による下流シグナルにまで影響を及ぼしていることが示唆された。GLP-2 は、マウス小腸において IGF-1 mRNA 発現を増加させる。⁴⁹⁾ 実際、本研究においても IGF-1 mRNA 発現は、MTX 投与により誘導され、5-FU 投与により抑制された。従って、これらの抗がん剤による内因性 GLP-2 発現の変化は、小腸の IGF-1 発現に直接的に影響を与えることが示された。さらに、5-FU 投与ラットにおいて血漿 IGF-1 濃度の低下が観察された。IGF-1 の多くは肝臓で産生されることから、5-FU 投与は小腸以外に肝臓においても IGF-1 発現に影響を及ぼすことが考えられた。IGF-1 と同様に TGF- β も小腸における GLP-2 の作用を発揮するための必須因子である。²⁰⁾ 実際、GLP-2 刺激による TGF- β および血管内皮細胞増殖因子の増加は、ヒト結腸癌細胞株である Caco-2 細胞およびラット回腸 IEC-18 細胞において粘膜再生に伴う粘膜上皮細胞の遊走に関与することが報告されている。²⁰⁾ また TGF- β 1 は主に免疫反応に関与しており、⁵⁰⁾ 濾胞性 T 細胞や B 細胞、NK 細胞、樹状細胞などの免疫担当細胞に発現している。⁵¹⁻⁵⁴⁾ 5-FU 投与により TGF- β 1 mRNA 発現が増加した理由に、5-FU 投与により傷害された小腸組織に TGF- β 1 が発現している免疫担当細胞が集積した可能性が考えられた。近年、小腸粘膜上皮細胞の維持においては TGF- β 1 よりも TGF- β 2 が重要な役割を果たしていることが報告されている。^{55, 56)} 実際、ラットへの TGF- β 2 経口投与は、抗がん剤誘発性腸傷害を改善させること、また Caco-2 細胞への TGF- β 2 処理は抗がん剤誘発性細胞傷害に対して、アポトーシス抑制作用を介して細胞生存率を増加させることが示されている。⁵⁷⁾ 本研究においても TGF- β 2 mRNA 発現に及ぼす MTX および 5-FU 投与の影響はプログルカゴン mRNA 発現や抗 GLP-2 抗体陽性細胞数などへの影響と一致しており、GLP-2 受容体刺激を介した TGF- β 2 発現の誘導が MTX による小腸粘膜上皮細胞の恒常性維持に寄与している可能性が考えられた。さらに、MTX は β -カテニン mRNA 発現を増加させた。Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路は、消化管幹細胞の増殖および恒常的自己再生において重要な役割を果たすことが知られている。^{58, 59)} Ben-Lulu らは、ラットにおいて TGF- β 2 投与が小腸 β -カ

テニンタンパク質発現を上昇させることを示した。⁵⁵⁾ さらに、GLP-2によって活性化される IGF-1 は β -カテニンシグナル伝達を活性化する。⁶⁰⁾ 従って、MTX 投与ラットの小腸における内因性 GLP-2 による IGF-1 および TGF- β 2 の転写促進が、 β -カテニン発現を増加させたと考えられた。

前述の通り MTX による抗リウマチ作用の一つに、炎症局所でのアデノシン濃度上昇によるアデノシン A_{2A} 受容体刺激に依存した抗炎症作用が挙げられている。アデノシン A_{2A} 受容体の刺激は、細胞内 cAMP 産生の増加を介してプロテインキナーゼ A および Epac1/2 などの酵素を活性化させる。これまでに L 細胞におけるプログルカゴン遺伝子の転写は、cAMP 応答配列を介したプロテインキナーゼ A 経路によって促進されること、⁶¹⁾ また、Epac2 が L 細胞に発現していること、⁶²⁾ 腸のプログルカゴン産生細胞においてプログルカゴン産生および分泌に Epac シグナル伝達経路が関与していることが示されている。^{62, 26)} そこで MTX による小腸 GLP-2 発現の亢進にこのアデノシン濃度上昇作用が関与している可能性を考え、本研究では Epac1/2 mRNA 発現に及ぼす MTX および 5-FU 投与の影響を検討したところ、MTX 投与は Epac1/2 mRNA 発現を有意に増加させた。さらに MTX 投与によるプログルカゴン mRNA 発現増加作用とそれぞれ Epac1/2 mRNA 発現増加作用に強い相関関係が認められた。従って MTX 投与による小腸での cAMP-Epac シグナル伝達経路の活性化が GLP-2 発現の亢進に関連していることが示唆された (Fig. 20)。今後、MTX 投与によるアデノシン濃度の測定や AICAR トランスホルミラーゼ阻害作用を詳細に検討することで、MTX による GLP-2 発現亢進作用の機序の詳細を明らかにできるものと考えられた。

以上、本章では小腸組織像に及ぼす MTX 投与の影響と小腸 GLP-2 発現との関係について 5-FU 投与の影響と比較検討し、その結果、ラットへの MTX 単回腹腔内投与は、投与 24 時間後において小腸 GLP-2 発現を亢進させることを明らかにした。また、この機序に抗リウマチ作用の機序として知られているアデノシン合成促進作用が関連していることが示唆され、このことが抗がん剤の中でも MTX 単回投与が、著明な小腸組織傷害を誘発しないというユニークな特徴を有する理由であると考えられた。一方、5-FU 投与は小腸での GLP-2 発現を抑制した。小腸 GLP-2 発現は MTX および 5-FU 投与により異なった挙動を示し、このことがそれぞれの抗がん剤投与による小腸組織傷害と関連していることが明らかとなった。

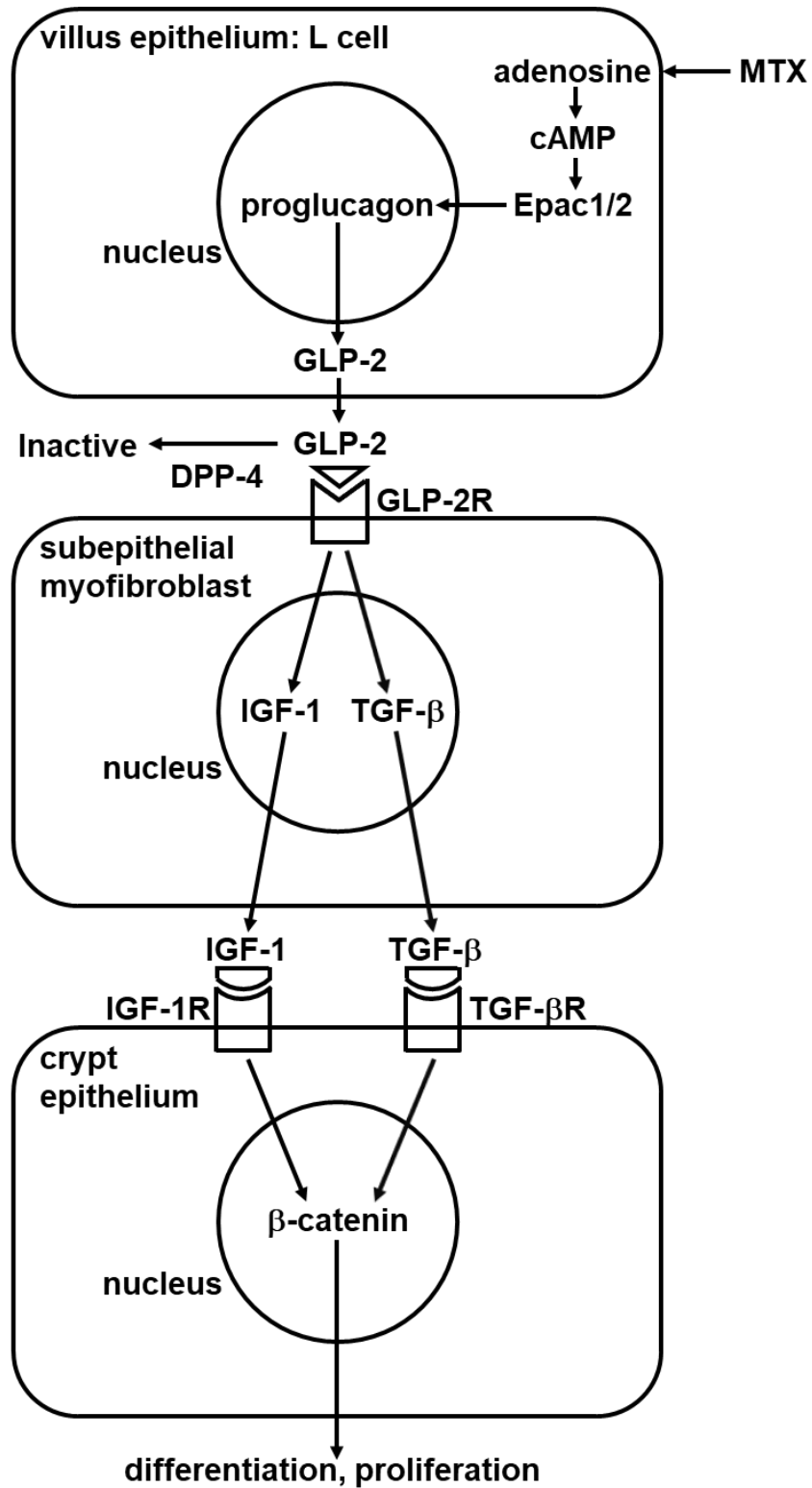


Fig. 20. A Possible Mechanism for the Induction of GLP-2 Expression in Small Intestine by a Single Administration of MTX

第2章 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

第1節 緒言

MTX は悪性腫瘍に対してのみならず、様々な疾患の治療に応用されている。そのため適応により投与量や投与方法が異なりそれに伴い副作用発現も異なる。実際、動物実験において MTX の総投与量が同じであっても、単回投与より連日投与の方が、重度の腎障害を生じることが報告されている。²⁷⁾ 序論で述べたように、Takano らはラットへの MTX 50 mg/kg 単回腹腔内投与が成長に伴う体重増加を抑制させ、さらに摂餌量、飲水量を投与 72 時間後をピークに一過性に低下させるものの、小腸組織傷害が軽微であることを報告した。²⁵⁾ また、同投与条件の MTX 投与は、小腸において 5-HT 合成系を亢進すること、また iNOS 発現を増加させるものの nNOS および eNOS 発現には影響を及ぼさないことを明らかにしている。²⁵⁾ さらに Takano らは、非特異的 NOS 阻害薬の L-NAME が、MTX による飲水量低下を改善させるものの、摂餌量、飲水量および体重増加の低下に大きな影響を与えずに、小腸 5-HT 合成亢進作用を抑制することを明らかにした。²⁸⁾ このことから MTX 投与による 5-HT 合成の亢進に iNOS 由来の NO が関与していることが考えられた。一方、ラットへの MTX の投与量は Takano らの報告よりも少ないものの、複数回投与投与することで小腸組織傷害を引き起こすことが多数報告されている。²⁹⁻³¹⁾ 従ってラットでの MTX 投与による小腸組織傷害は、投与量よりも投与回数に依存して起こることが考えられた。また、MTX 投与による小腸組織傷害の誘発機序に iNOS 由来の NO が関与しているという報告もあることから、²⁹⁾ 本章では、ラットへの MTX の総投与量を変えずに、分割投与することで小腸組織像がどのように変化するかを単回投与と比較した。また MTX 分割投与による小腸 NOS 発現とその役割を明らかにすることを目的として検討した。

第2節 方法

1) 使用動物

第1章第2節の1) に準じた。

2) 使用薬物および使用試薬

L-NAME, 抗 β -アクチン抗体を Sigma-Aldrich より購入した。Mammalian Protein Extraction Buffer, Protein inhibitor mix を Cytiva (東京) より, 4 \times Laemmli Sample Buffer を BIO-RAD より購入した。BCATM Protein Assay Kit, マウス抗ウサギ IgG 抗体, Immobilon Western chemiluminescent HRP substrate を Thermo Fisher Scientific より購入した。Prestained XL-Ladder を アンテグラル (東京) より購入した。マウス抗 iNOS 抗体を BD Biosciences (MO, USA) より, マウス抗 nNOS 抗体を Transduction Laboratory (KY, USA) より, ウサギ抗 eNOS 抗体を Affinity Bioreagents (CO, USA) より購入した。Horseradish peroxidase 標識ウサギ抗マウス IgG 抗体, horseradish peroxidase 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体は Santa Cruz Biotechnology (TX, USA) より購入した。Immobilon Western chemiluminescent HRP substrate を Merck Millipore (MA, USA) より購入した。上記以外は第1章第2節の2) に準じた。

3) 薬物投与プロトコール並びに QOL (体重, 摂餌量, 飲水量) の観察

ラットを小動物実験用摂餌量測定装置 (FDM700S, メルクエスト, 富山) にて飼育し, 摂餌量を 24 時間毎に経時的に記録した。8 週齢の雄性ウィスターラットを 1) に準じた条件下にて 6 日間飼育, 馴化させた。その後薬物投与を開始し, 24 時間毎に摂餌量, 飲水量および体重を測定した。

ラットに MTX の総投与量が 50 mg/kg になるように単回投与 (単回投与群) または 4 回に分けて投与 (分割投与群) した。単回投与群および分割投与群は, さらに対照群, L-NAME 単独投与群, MTX 単独投与群, MTX および L-NAME の併用投与群の 4 つのサブグループに分類設定した。単回投与群のプロトコールを Fig. 21A に示す。ラットに MTX (50 mg/kg) または, 対照として生理食塩水を腹腔内投与した。L-NAME を使用した実験では, MTX または生理食塩水を投与する 10 分前に L-NAME (20 mg/kg) を皮下注射し, その後 24 時間ごとに 3 日間連日投与した (Fig. 21A) 。分割投与群の薬物スケジュールを Fig. 21B に示す。ラットに MTX (12.5 mg/kg) または, 生理食塩水を 4 日間連日腹腔内投与した。L-NAME の投与方法は MTX 単回投与群のプロトコールに準じた。

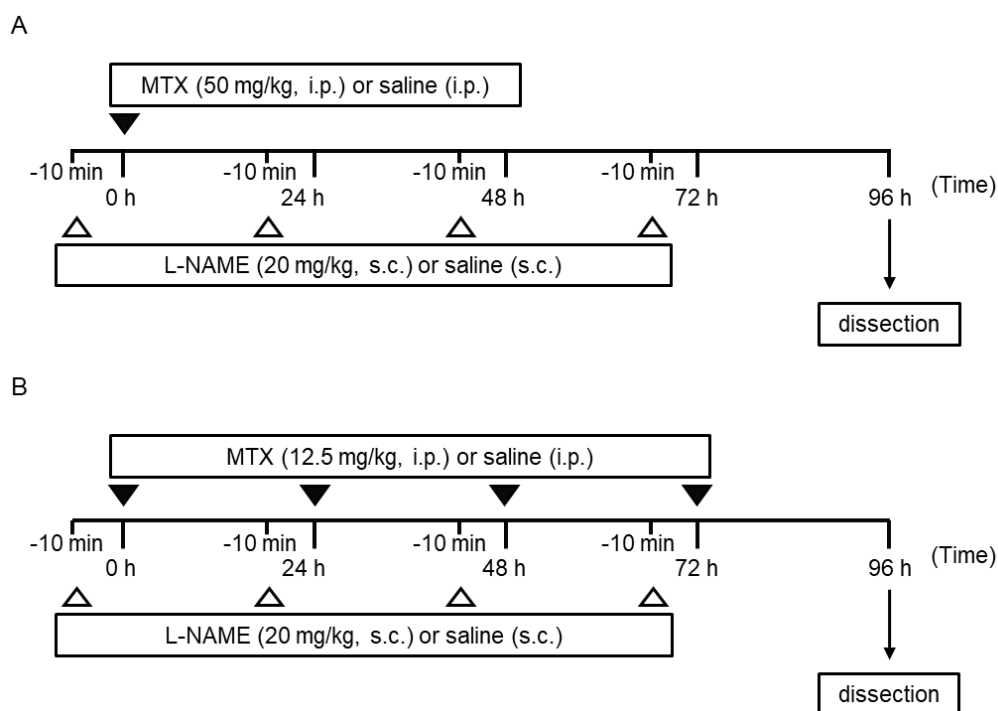


Fig. 21. Schedule for the Single (A) and Consecutive (B) Administration of MTX to Rats

4) 小腸組織の摘出

第1章第2節の4) に準じた。

5) パラフィン切片の作成

第1章第2節の5) に準じた。

6) 小腸粘膜組織形態の観察および小腸絨毛長の計測

第1章第2節の6) に準じた。各試料の20本の絨毛長をNanoZoomer Digital Pathology (NDP) (浜松ホトニクス, 静岡) にて計測し, 絨毛長の平均を算出した。

7) 抗MPO抗体を用いた免疫組織化学 (酵素抗体法)

第1章第2節の7) に準じた。

8) 小腸組織からの total RNA の抽出

第 1 章第 2 節の 10) に準じた.

9) Real-time RT-PCR 法

第 1 章第 2 節の 11) に準じた. 使用した腫瘍壊死因子- α (tumor necrosis factor- α : TNF- α), インターロイキン-1 β (interleukin-1 β : IL-1 β), IL-6, シクロオキシゲナーゼ-2 (cyclooxygenase-2: COX-2), iNOS, nNOS, eNOS のプライマーは Table 2 に示した.

Table 2. Primers for Real-time RT-PCR

Product		Sequences (5' → 3')	Reference
TNF- α	Forword	GTGATCGGTCCCAACAAGGA	63)
	Reverse	AGGGTCTGGGCCATGGAA	
IL-1 β	Forword	CACCTCTCAAGCAGAGCACAGA	64)
	Reverse	ACGGGTTCCATGGTGAAGTC	
IL-6	Forword	TCCTACCCCAACTTCCAATGCTC	63)
	Reverse	TTGGATGGTCTTGGTCCTTAGCC	
COX-2	Forword	TTTGTTGAGTCATTCACCAGACAGAT	65)
	Reverse	ACGATGTGTAAGGTTTCAGGGAGAAG	
iNOS	Forword	TCGAGCCCTGGAAGACCCACATCTG	66)
	Reverse	GTTGTTCCCTCTTCCAAGGTGTTTGCCTTAT	
nNOS	Forword	TTTCTGTCCGTCTCTTCAAACGCAAAGTGG	67)
	Reverse	GACATCATCTCGCAGTCAA	
eNOS	Forword	CATCACCTACGATACCCTCAG	68)
	Reverse	CGGCTCTGTAACCTCCTTG	

10) 組織の可溶化

第 1 章第 2 節の 4) に準じて摘出した腸管組織を縦方向に切開し, 腸管内の内容物を滅菌 PBS 内で洗浄した. これを Mammalian Protein Extraction Buffer 990 μ L, Protease Inhibitor Mix

10 μ L を含む可溶化液中に浸し、ホモジナイズ（6,000 rpm, 氷中, 30 秒間）した。ホモジネートを遠心分離（12,000 \times g, 4 $^{\circ}$ C, 30 分間）し分取した上清を可溶化液とした。

11) タンパク質の定量

可溶化液中のタンパク質定量には BCATM Protein Assay Kit を用いた。生理食塩水にて適宜希釈した可溶化液 10 μ L に、BCATM Protein Assay Reagent A と BCA Protein Assay Reagent B を 50 : 1 の割合で混合した溶液を 200 μ L 加え、37 $^{\circ}$ C のインキュベーター内で 30 分間放置し、550 nm の吸光度を分光光度計（Multiskan JK, サーモエレクトロン株式会社, 神奈川県）にて測定した。既知濃度のウシ血清アルブミンを用いて得られた検量線から可溶化液のタンパク質濃度を求めた。

12) タンパク質の電気泳動：ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis: SDS-PAGE)

タンパク質量を統一した可溶化試料に 2-メルカプトエタノールを含む 4 \times Laemmli Sample Buffer を全量の 4 分の 1 量加え、ドライサーモユニット（DTU-1B, タイテック, 埼玉）で 100 $^{\circ}$ C, 5 分間加熱した。その後 Laemmli の方法⁶⁹⁾ に従い、0.1% SDS を含む 25 mM Tris, 192 mM グリシン緩衝液（pH 8.3）中、20 mA/gel で通電、泳動した。電気泳動用ゲルには SuperSepTM ACE, 7.5%, 13 well を使用した。泳動装置としてミニプロティアン 3 セル（BIO-RAD）を用いた。分子量マーカーとして Prestained XL-Ladder を同時に泳動し、その移動度から目的タンパク質の分子量を求めた。

13) NOS タンパク質の検出（Western blot 法）

SDS-PAGE にて分離した後のゲル内のタンパク質を 25 mM Tris, 192 mM グリシン緩衝液（pH 8.3）中、30 mA の定電流にて室温で 3 時間通電し、孔径 0.45 μ m の Immobilon polyvinylidene difluoride transfer membrane（PVDF 膜）（Millipore Co., MA, USA）に転写した。抗体の非特異的な吸着を防ぐため、この PVDF 膜を室温で 2 時間あるいは 4 $^{\circ}$ C で一晩、2.5% スキムミルク/10 mM Tris-HCl（pH 7.4）, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20（2.5% スキムミルク/TBS-T）でブロッキングした。次にそれぞれの一次抗体として 2.5% スキムミルク/TBS-T で 250 倍に希釈した抗 iNOS 抗体, 100 倍に希釈した抗 nNOS および抗 eNOS 抗体, 1,000 倍に希釈した抗 β -アクチン抗体を室温で 2 時間あるいは 4 $^{\circ}$ C で一晩、PVDF 膜と

反応させた。未反応抗体は TBS-T を用いて、室温で 15 分間 1 回、10 分間 3 回の振とうにより洗浄除去した。次に、iNOS, nNOS および β -アクチンの二次抗体として horseradish peroxidase 標識ウサギ抗マウス IgG 抗体, eNOS の二次抗体として horseradish peroxidase 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体を 2.5% スキムミルク/TBS-T で 5,000 倍に希釈し、45 分間 PVDF 膜と反応させた。未反応抗体を TBS-T により室温で 15 分間 1 回、10 分間 3 回の振とうにより洗浄除去した後、Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate で化学発光させ、Ez-capture MG (ATTO, 東京) を用いて露光, 撮影した。iNOS, nNOS, eNOS, β -アクチンは、130, 155, 140, 42 kDa にそれぞれ単一のバンドとして現れた。そのバンドを Image J (National Institute of Health, MD, USA) を用いてデンシトメトリーにより定量的に解析した。iNOS, nNOS, eNOS の発現量はそれぞれ β -アクチンの発現量に対する相対比として解析した。

14) 抗 GLP-2 抗体を用いた免疫組織化学 (酵素抗体法)

第 1 章第 2 節の 8) に準じた。

15) 統計学的処理および検定方法

測定値はすべて平均値 \pm 標準偏差 (Mean \pm S.E.) で示した。2 群間の比較は F 検定後, Student's unpaired t -test または Welch's t -test を行った。多群間の比較は一元配置分散分析 (one-way ANOVA) または二元配置分散分析 (two-way ANOVA) を用い, その後 Tukey 検定を行った。危険率 5% 未満 ($p < 0.05$) をもって統計学的に有意と判断した。

第3節 結果

第1項 ラット QOL に及ぼす MTX 分割投与の影響

MTX 分割投与は成長に伴う体重増加を抑制し、L-NAME の併用投与は、MTX 単独投与と比較してさらに有意に抑制した (Fig. 22) .

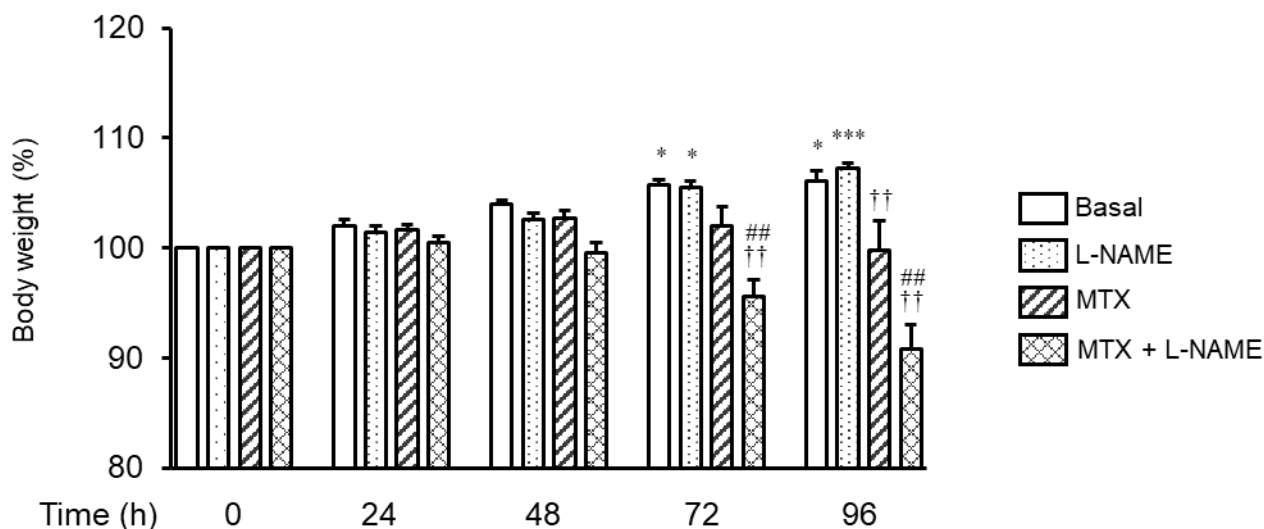


Fig. 22. Effects of L-NAME on Consecutive Administration of MTX-Induced Change in Body Weight in Rats

After the first administration of physiological saline (basal) or MTX, body weight was measured every 24 h up to 96 h, and expressed as a percentage with 100% representing Time 0 h. Each column represents the mean \pm S.E. (n = 6). * p < 0.05 and *** p < 0.01 versus Time 0 h; †† p < 0.01 versus basal; ## p < 0.01 versus MTX.

MTX 分割投与は時間依存的に摂餌量を低下させ、L-NAME の併用投与は、MTX 単独投与と比較してさらに有意に抑制した (Fig. 23) .

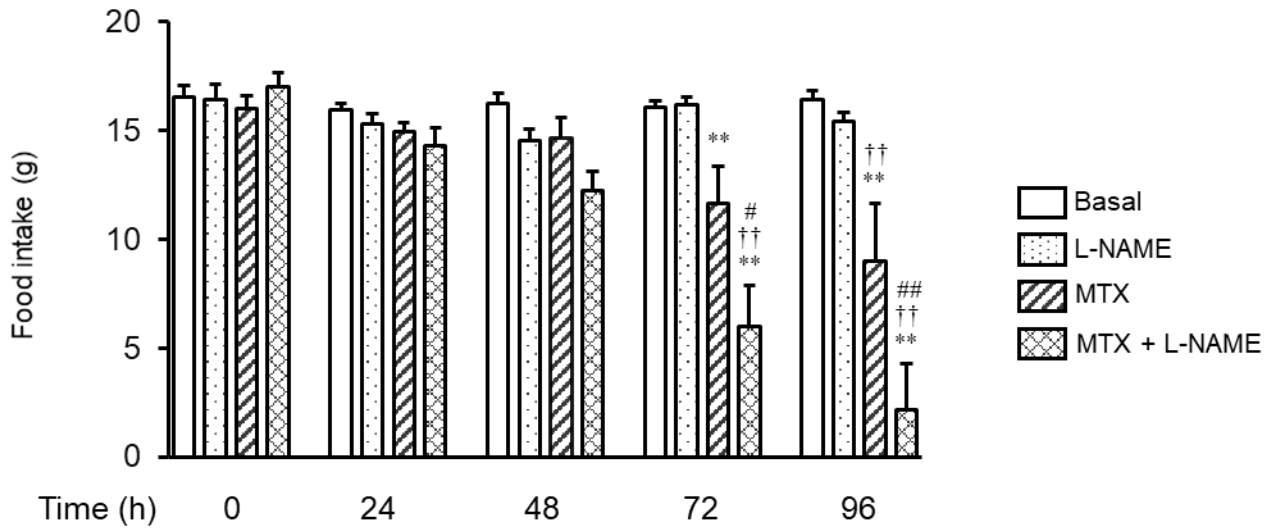


Fig. 23. Effects of L-NAME on Consecutive Administration of MTX-Induced Change in Food Intake in Rats

After the first administration of physiological saline (basal) or MTX, food intake was measured every 24 h up to 96 h, and are shown as cumulative daily amounts (g) during the 24 h periods up to 96 h. Each column represents the mean \pm S.E. (n = 6). ** p < 0.01 versus Time 0 h; †† p < 0.01 versus basal; # p < 0.05 and ## p < 0.01 versus MTX.

MTX 分割投与は時間依存的に飲水量を低下させ、L-NAME の併用投与は、MTX 単独投与と比較してさらに有意に抑制した (Fig. 24) .

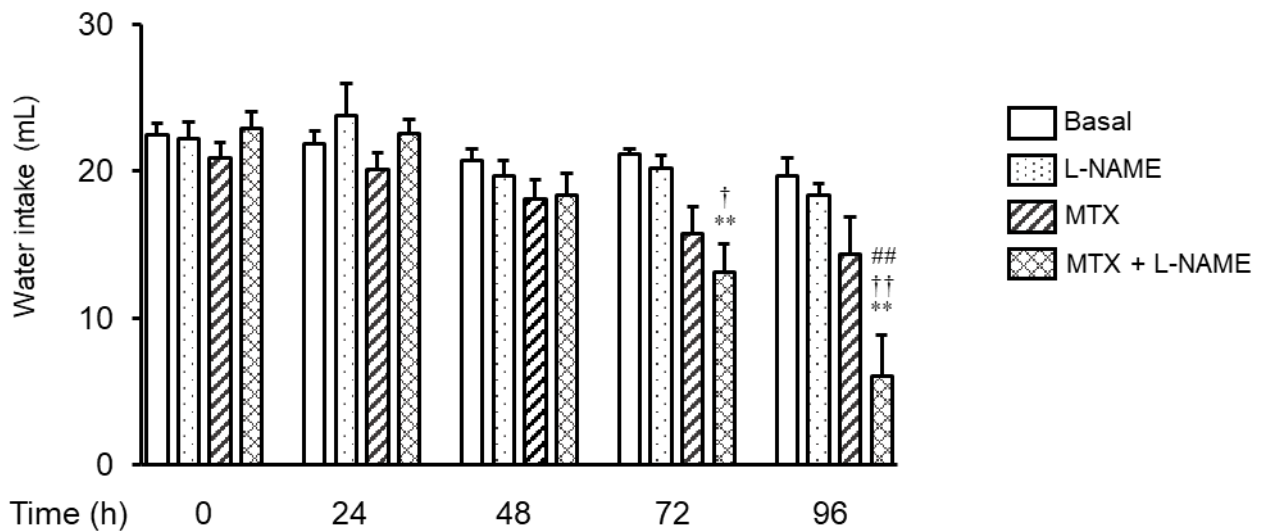


Fig. 24. Effects of L-NAME on Consecutive Administration of MTX-Induced Change in Water Intake in Rats

After the first administration of physiological saline (basal) or MTX, water intake was measured every 24 h up to 96 h, and are shown as cumulative daily amounts (mL) during the 24 h periods up to 96 h. Each column represents the mean \pm S.E. (n = 6). $**p < 0.01$ versus Time 0 h; $\dagger p < 0.05$ and $\dagger\dagger p < 0.01$ versus basal; $##p < 0.01$ versus MTX.

第2項 小腸組織形態に及ぼす MTX 単回投与および分割投与の影響

本項では, 小腸組織形態に及ぼす MTX 単回投与および分割投与の影響を HE 染色にて検討した. MTX 単回投与群は L-NAME の有無に関わらず小腸組織に著明な影響を及ぼさなかった (Fig. 25) .

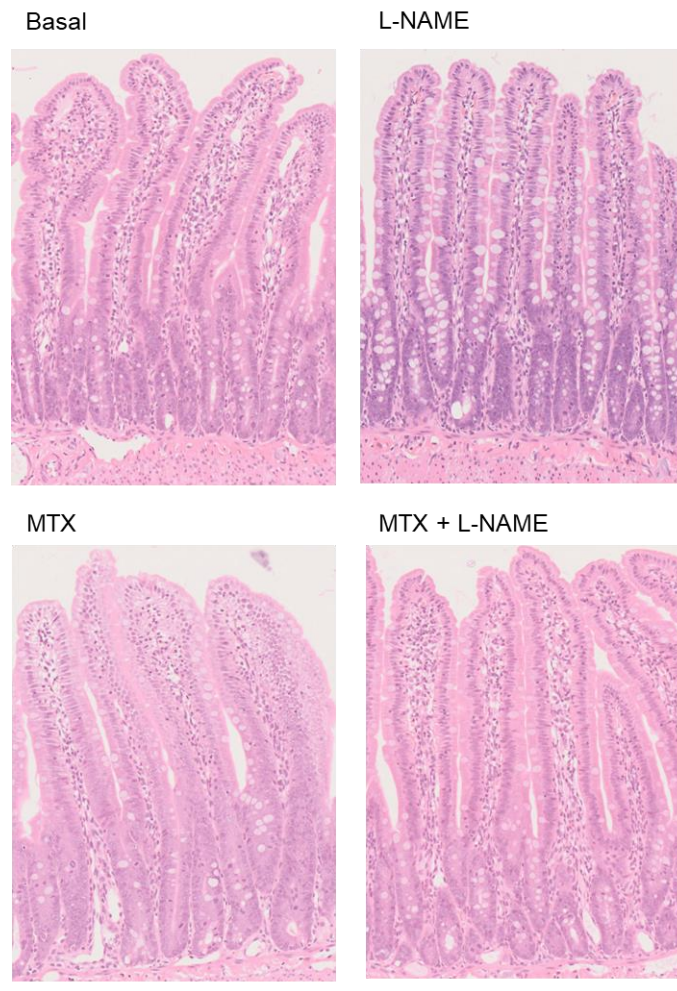


Fig. 25. Hematoxylin-Eosin Stained Sections from Ileal Mucosa Isolated from Single Administration Group

Ileal tissues were dissected and fixed with 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin. Scale bars = 100 μ m.

MTX 分割投与は、明らかな小腸組織傷害を引き起こし、L-NAME の併用は小腸組織傷害をさらに悪化させた (Fig. 26) .

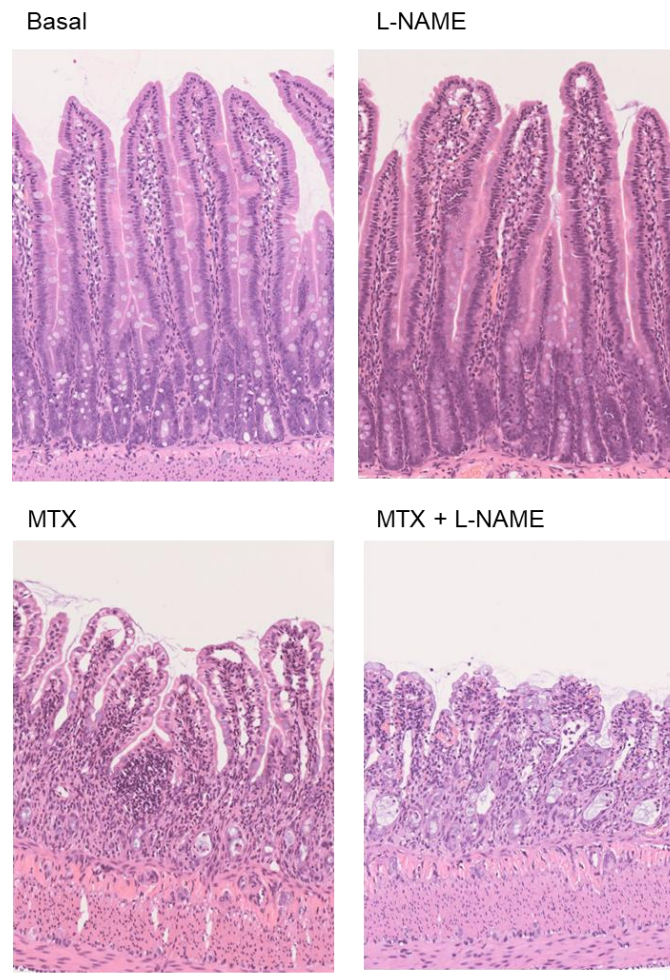


Fig. 26. Hematoxylin-Eosin Stained Sections from Ileal Mucosa Islated from Consecutive Administration Group

Ileal tissues were dissected and fixed with 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin. Scale bars = 100 μ m.

また、MTX 単回投与は L-NAME の有無に関わらず小腸絨毛長に著明な影響を及ぼさなかった (Fig. 27A) . MTX 分割投与は L-NAME の併用により有意な絨毛長の短縮が認められた (Fig. 27B) .

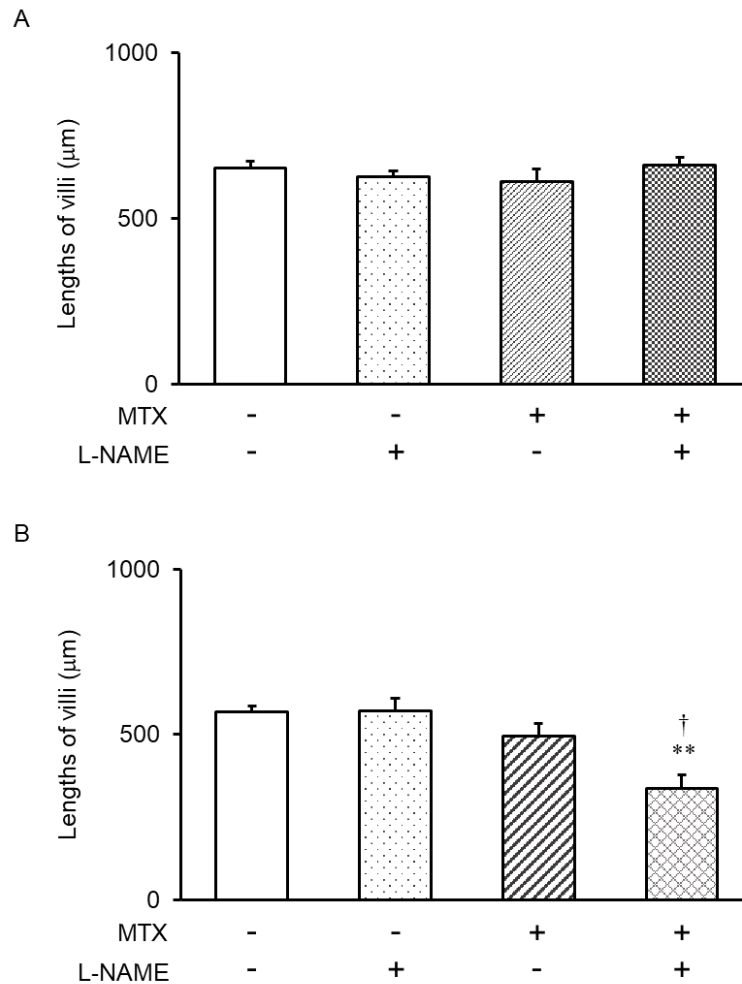


Fig. 27. Effect of MTX and L-NAME on Lengths of Villi

A: The single administration group. B: The consecutive administration group. Each column represents the mean \pm S.E. ($n = 5$ each for A and 6 each for B). ** $p < 0.01$ versus basal; $\dagger < 0.05$ versus MTX.

第3項 MPO 発現に及ぼす MTX 単回投与および分割投与の影響

次に、炎症反応に及ぼす MTX 投与の影響について MPO を染色することにより検討した。Fig. 28B および Fig. 29B にはそれぞれ Fig. 28A および Fig. 29A の囲み部分を拡大したものを示している。MTX 単回投与群は L-NAME の有無に関わらず MPO 発現に著明な影響を及ぼさなかった (Fig. 28)。

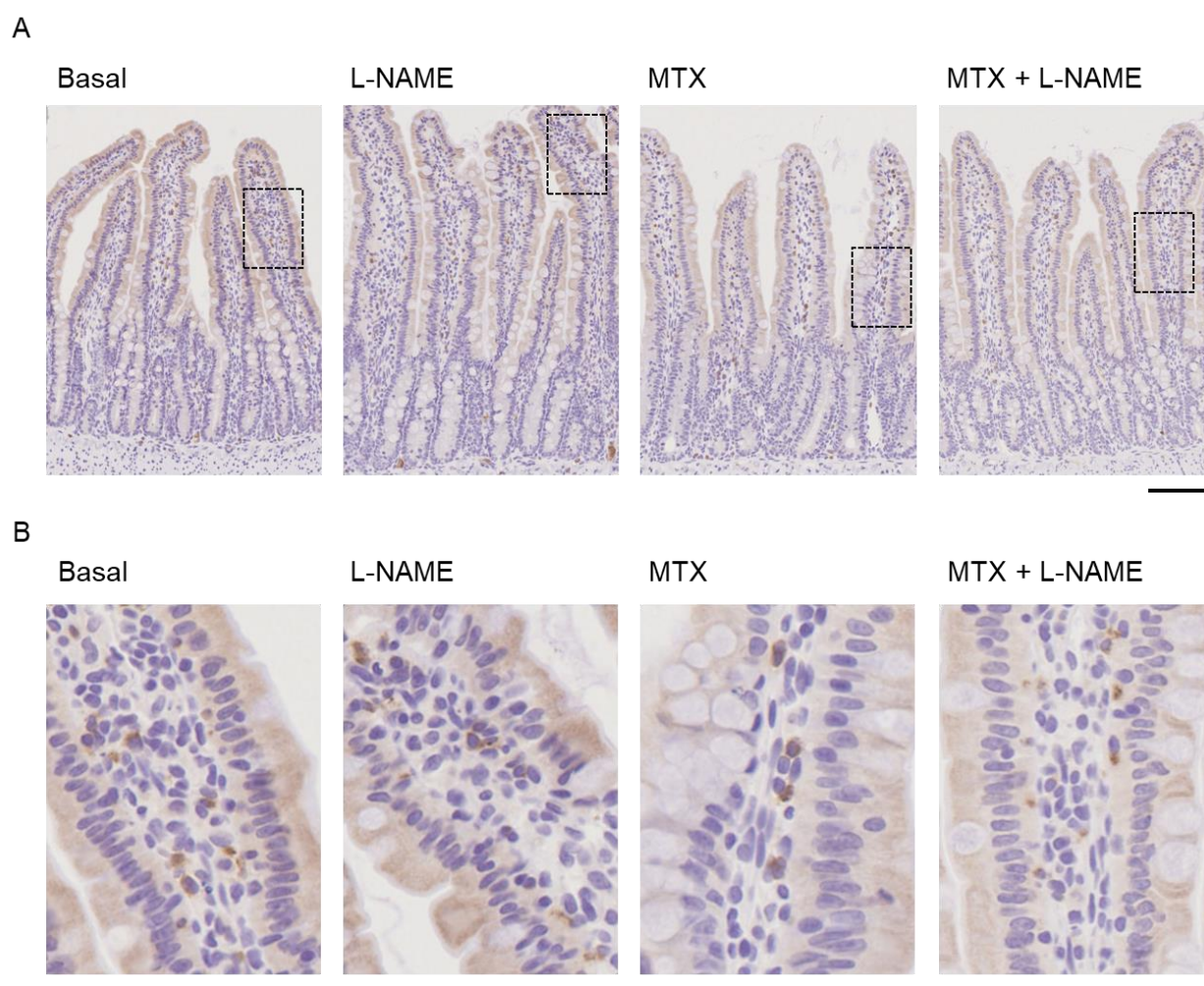


Fig. 28. Effect of MTX and L-NAME on MPO Expression in Ileal Tissue Isolated from Single Administration Group

A: Ileal tissues were dissected and fixed with 4% paraformaldehyde for immunohistochemical examination with an anti-MPO antibody. B: Magnification of the square with a dotted line in A. Scale bars = 100 μm for A, 20 μm for B.

MTX 分割投与は MPO 発現を増加させ、L-NAME を併用するとさらなる著明な増加が認められた (Fig. 29) .

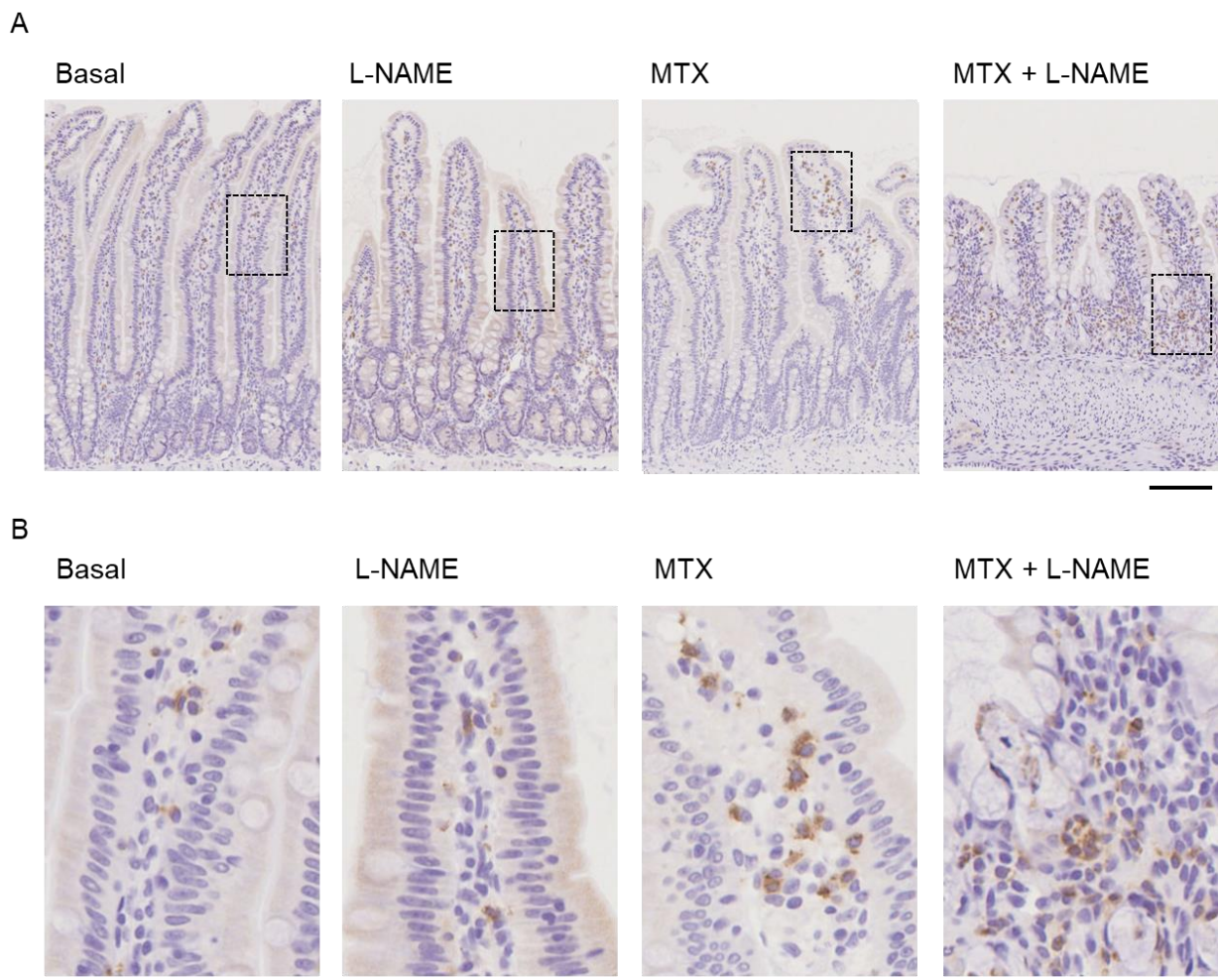


Fig. 29. Effect of MTX and L-NAME on MPO Expression in Rat Ileal Tissue Isolated from Consecutive Administration Group

A: Ileal tissues were dissected and fixed with 4% paraformaldehyde for immunohistochemical examination with an anti-MPO antibody. B: Magnification of the square with a dotted line in A. Scale bars = 100 μm for A, 20 μm for B.

第4項 炎症性サイトカイン mRNA 発現に及ぼす MTX 単回投与および分割投与の影響

第2項および第3項の結果から、MTX 分割投与は小腸において炎症を伴った組織傷害を引き起こすことが明らかとなった。そこで、次に代表的な炎症性サイトカインである TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 mRNA 発現に及ぼす MTX 投与の影響について検討した。MTX 単回投与は L-NAME の有無に関わらず TNF- α mRNA 発現に影響を与えなかった (Fig. 30A) 。 MTX 分割投与は、TNF- α mRNA 発現を有意に増加させ、L-NAME の併用投与は TNF- α mRNA 発現をさらに増加させる傾向を示した (Fig. 30B) 。

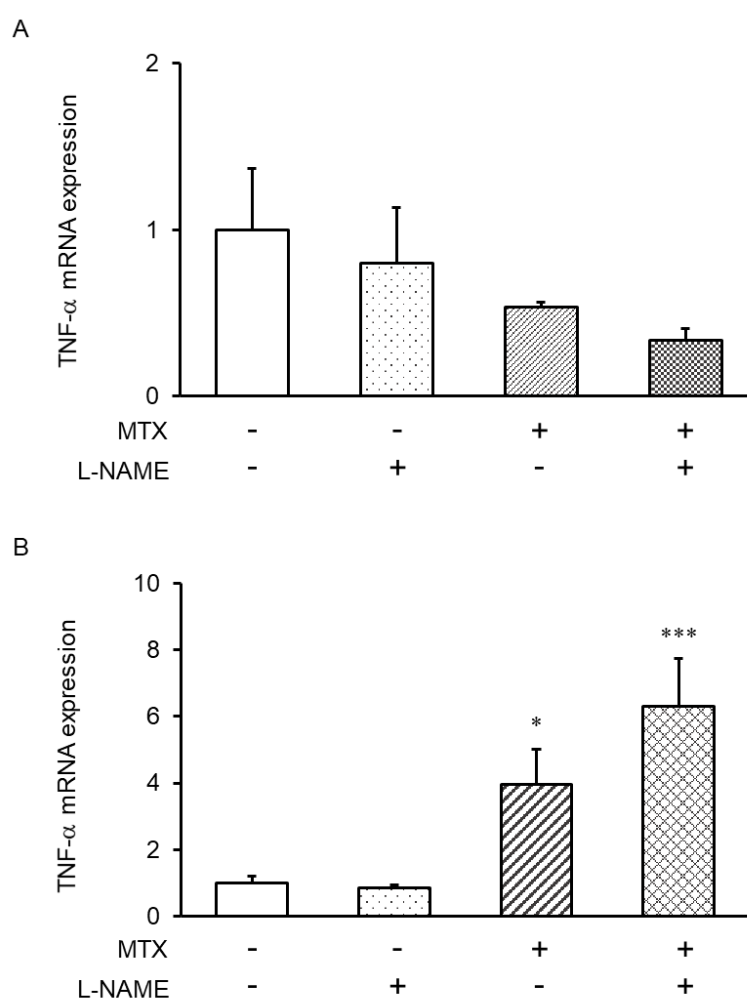


Fig. 30. Effects of MTX and L-NAME on the TNF- α mRNA Expression in Rat Ileal Tissue

A: The single administration group. B: The consecutive administration group. Each column represents the mean \pm S.E. (n = 4–5). * p < 0.05, *** p < 0.001 versus basal.

MTX 単回投与は IL-1 β mRNA 発現に影響を与えなかった (Fig. 29A) . L-NAME の併用投与は, コントロールと比較して IL-1 β mRNA 発現を有意に減少させた (Fig. 31A) . MTX 分割投与は, IL-1 β mRNA 発現を有意に増加させ, L-NAME の併用は, IL-1 β mRNA 発現に影響を与えなかった (Fig. 31B) .

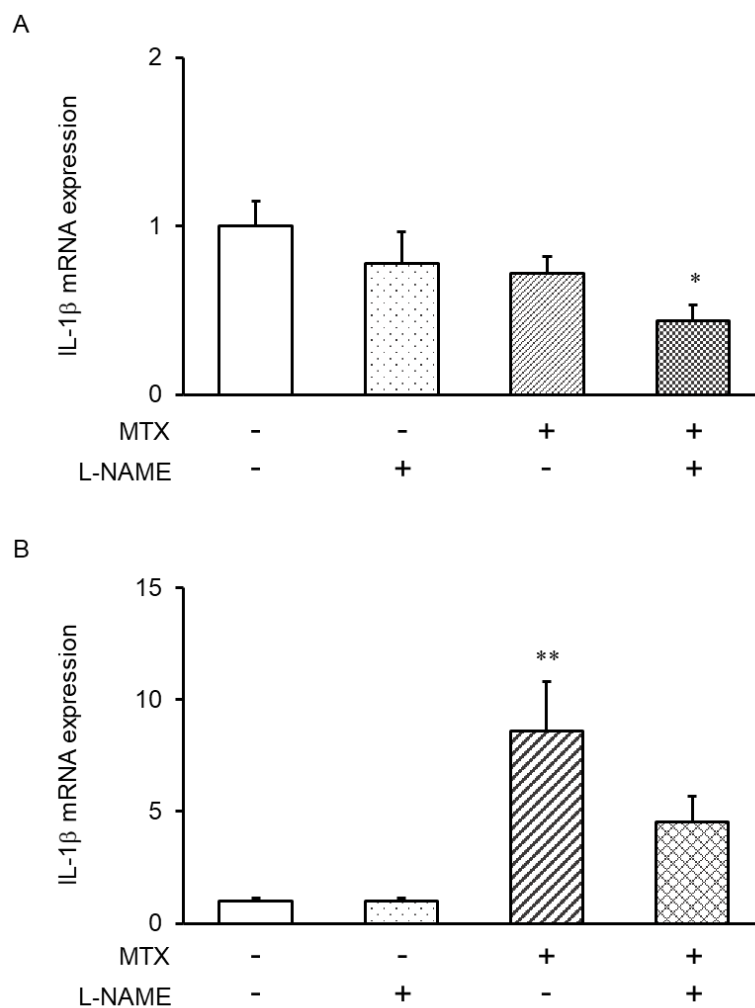


Fig. 31. Effects of MTX and L-NAME on the IL-1 β mRNA Expression in Rat Ileal Tissue
 A: The single administration group. B: The consecutive administration group. Each column represents the mean \pm S.E. (n = 4–5). * p < 0.05, ** p < 0.01 versus basal.

MTX 単回投与は L-NAME の有無に関わらず IL-6 mRNA 発現に影響を与えなかった (Fig. 32A) . MTX 分割投与は, IL-6 mRNA 発現には有意な影響を与えなかったが, L-NAME の併用投与は, IL-6 mRNA 発現を増加させる傾向を示した (Fig. 32B) .

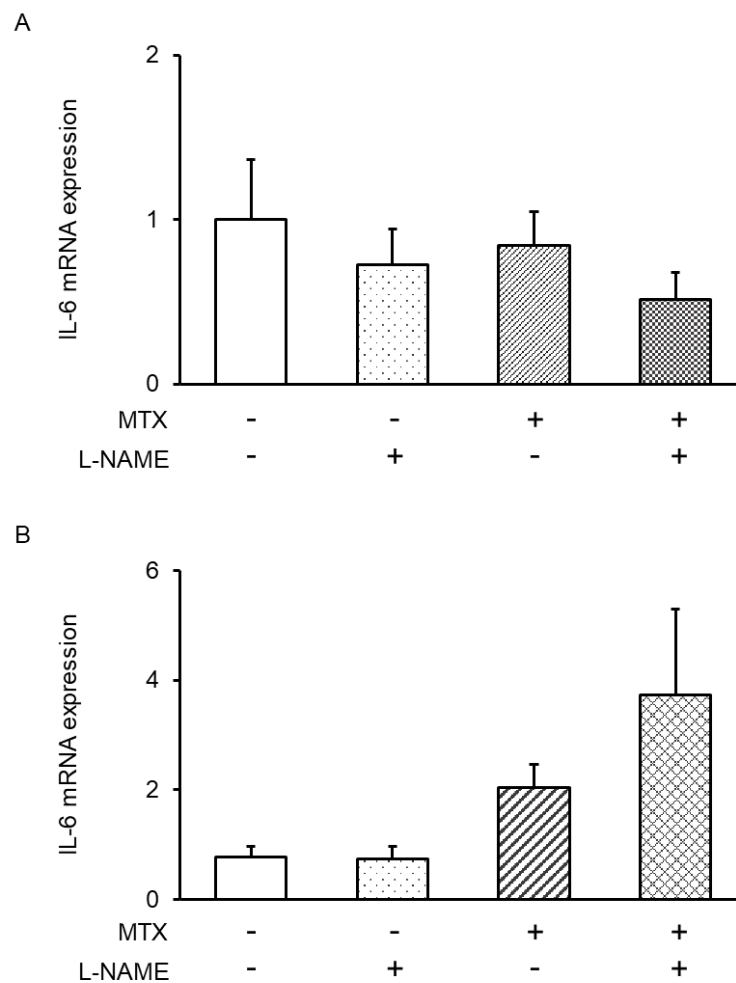


Fig. 32. Effects of MTX and L-NAME on the IL-6 mRNA Expression in Rat Ileal Tissue

A: The single administration group. B: The consecutive administration group. Each column represents the mean \pm S.E. (n = 4–5).

第5項 COX-2 mRNA 発現に及ぼす MTX 単回投与および分割投与の影響

次に炎症性サイトカインの刺激により発現が誘導される COX-2 mRNA 発現に及ぼす MTX 投与の影響について検討した。MTX 単回投与および分割投与は L-NAME の有無に関わらず、COX-2 mRNA 発現に有意な影響を及ぼさなかった (Fig. 33A, B)。

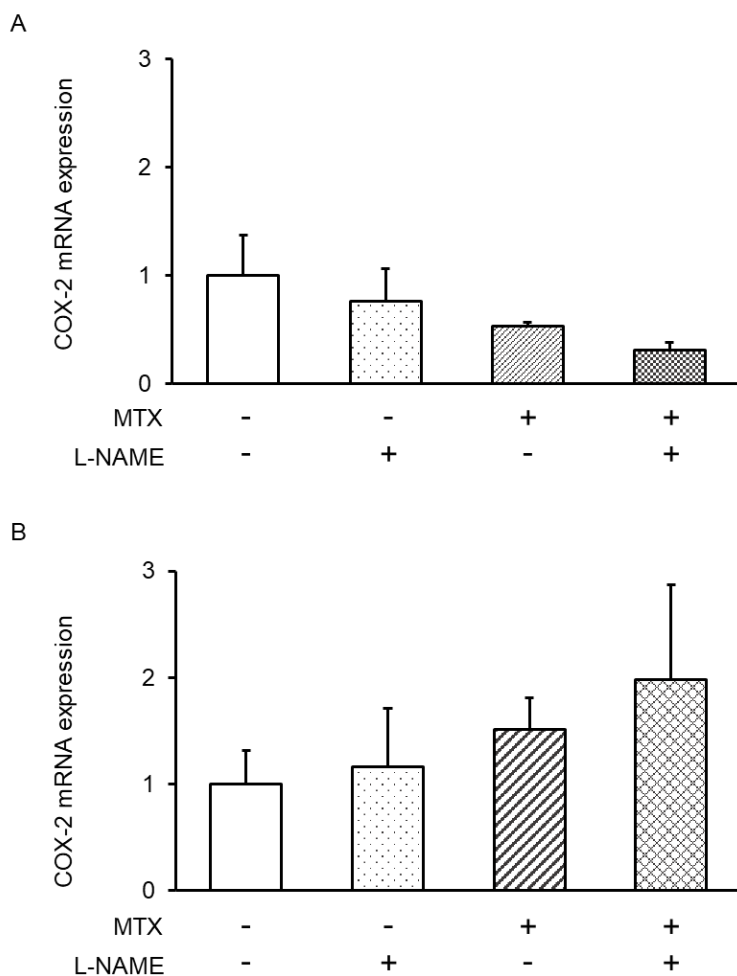


Fig. 33. Effects of MTX and L-NAME on the COX-2 mRNA Expression in Rat Ileal Tissue

A: The single administration group. B: The consecutive administration group. Each column represents the mean \pm S.E. (n = 5–6 for A; n = 6 for B).

第6項 NOS 発現に及ぼす MTX 単回投与および分割投与の影響

本項では、NOS 発現に及ぼす MTX 分割投与の影響について検討した。MTX 分割投与は有意差はないものの iNOS mRNA 発現およびタンパク質発現を増加させる傾向を示した (Fig. 34A, B) . L-NAME の併用投与は iNOS mRNA 発現に影響を及ぼさなかった (Fig. 34A) .

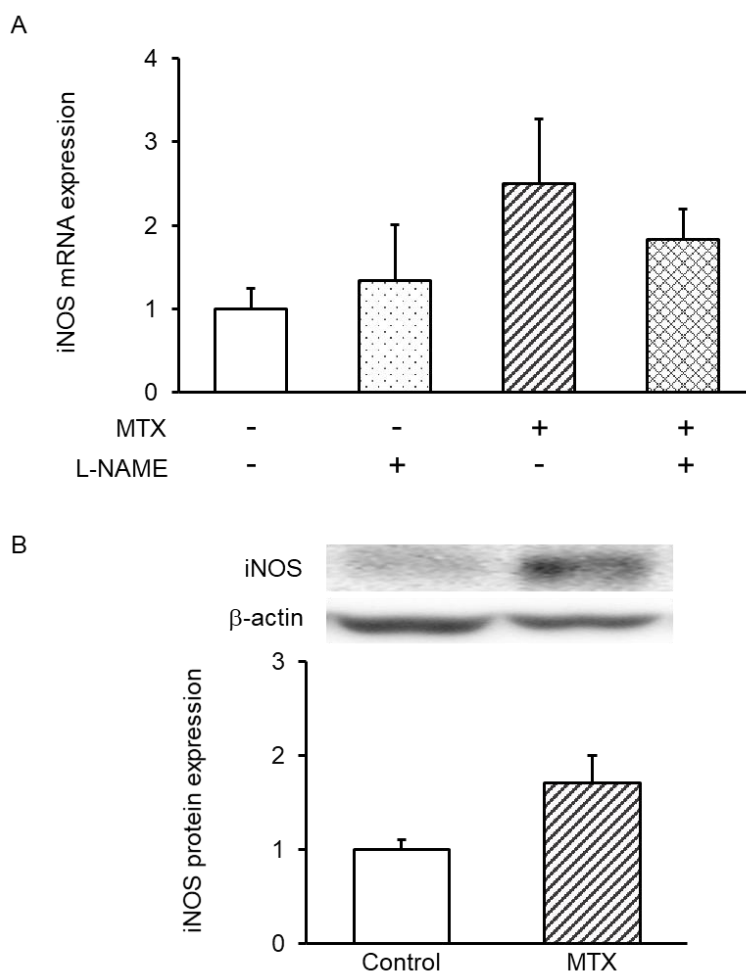


Fig. 34. Effects of Consecutive Administration of MTX on iNOS mRNA and Protein Expression in Rat Ileal Tissue

A: iNOS mRNA expression. B: iNOS protein expression. Each column represents the mean \pm S.E. (n = 5–6 for A; n = 6 for B).

MTX 分割投与は nNOS mRNA 発現およびタンパク質発現を有意に増加させた (Fig. 35A, B) . L-NAME の併用投与は nNOS mRNA 発現に影響を及ぼさなかった (Fig. 35A) .

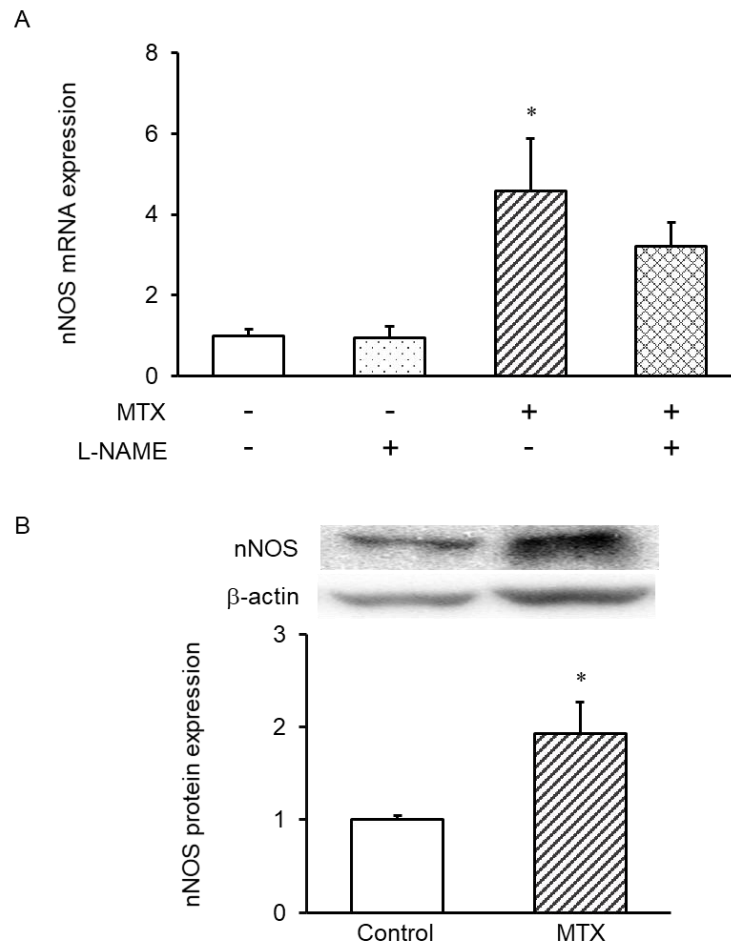


Fig. 35. Effects of Consecutive Administration of MTX on nNOS mRNA and Protein Expression in Rat Ileal Tissue

A: nNOS mRNA expression. B: nNOS protein expression. Each column represents the mean \pm S.E. (n = 5–6 for A; n = 4–5 for B). * $p < 0.05$ versus basal.

MTX 分割投与は eNOS mRNA 発現およびタンパク質発現を有意に増加させた (Fig. 36A, B) . L-NAME の併用投与は eNOS mRNA 発現に影響を及ぼさなかった (Fig. 36A) .

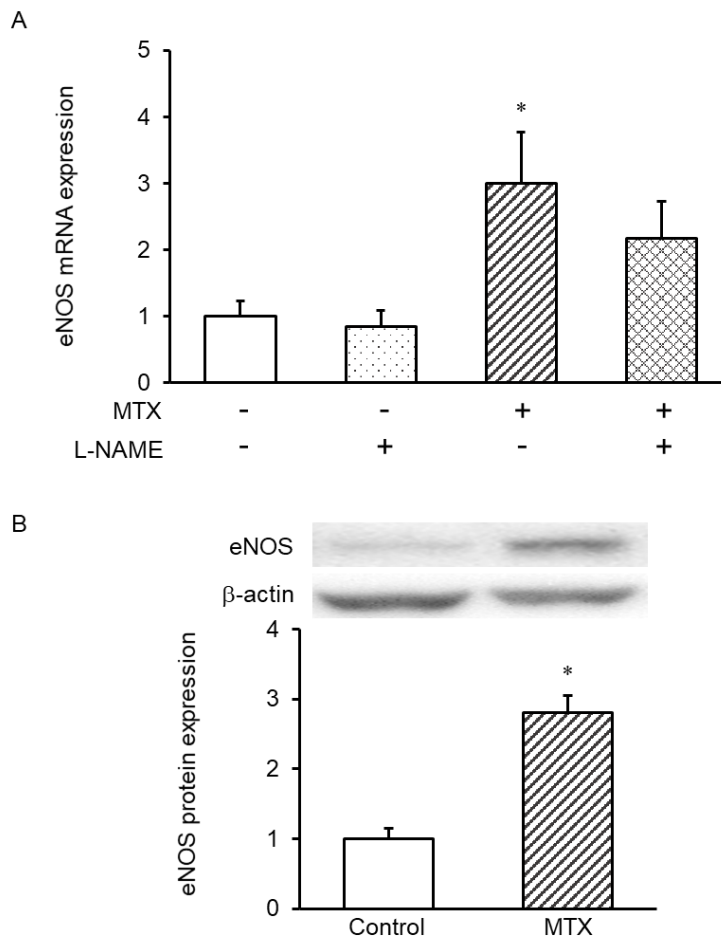


Fig. 36. Effects of Consecutive Administration of MTX on eNOS mRNA and Protein Expression in Rat Ileal Tissue

A: eNOS mRNA expression. B: eNOS protein expression. Each column represents the mean \pm S.E. (n = 5–6 for A; n = 4 for B). * $p < 0.05$ versus basal.

第7項 プログルカゴン mRNA 発現に及ぼす MTX 単回投与および分割投与の影響

本項では、プログルカゴン mRNA 発現に及ぼす MTX 単回投与および分割投与の影響について検討した。MTX 単回投与は、L-NAME の有無に関わらずプログルカゴン mRNA 発現に影響を及ぼさなかった (Fig. 37A) 。一方、MTX 分割投与はこれを増加させる傾向を示し、L-NAME の併用投与によりコントロールと比較して、これを有意に増加させた (Fig. 37B) 。

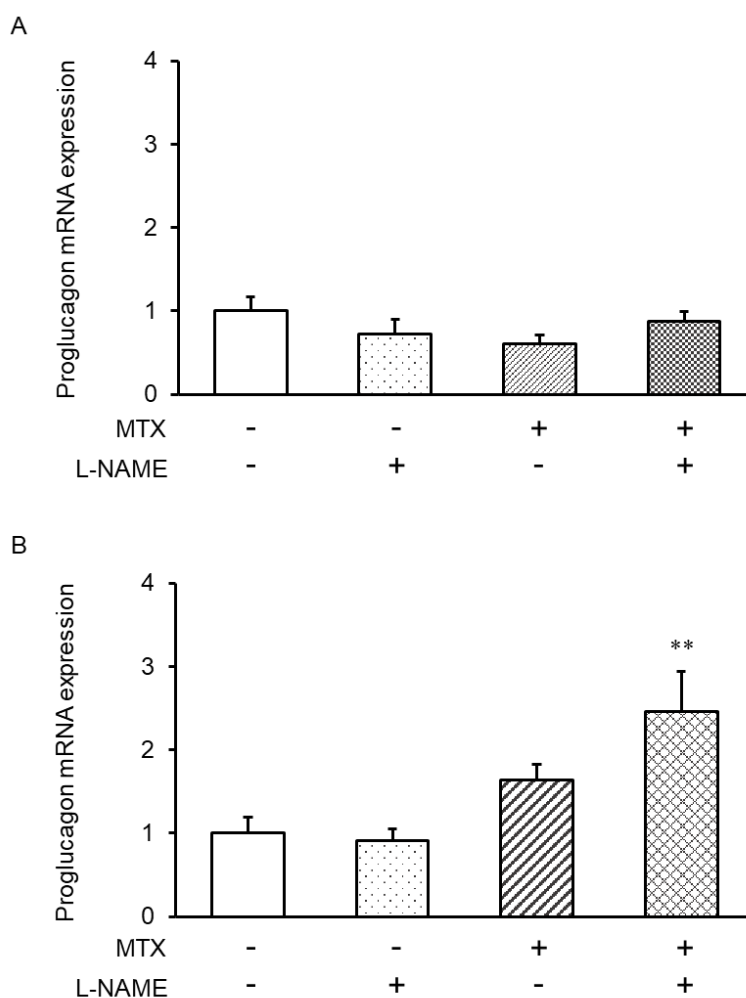


Fig. 37. Effects of MTX and L-NAME on the Proglucagon mRNA Expression in Rat Ileal Tissue

A: The single administration group. B: The consecutive administration group. Each column represents the mean \pm S.E. (n = 5–6 for A; n = 7 for B). ** $p < 0.01$ versus basal.

第 8 項 抗 GLP-2 抗体陽性細胞数に及ぼす MTX 単回投与および分割投与の影響

本項では、抗 GLP-2 抗体陽性細胞数に及ぼす MTX 単回投与および分割投与の影響について検討した。MTX 単回投与および分割投与は、絨毛一本当たりの抗 GLP-2 抗体陽性細胞数を有意に増加させたが、L-NAME の併用投与は、これに有意な影響を及ぼさなかった (Fig. 38) .

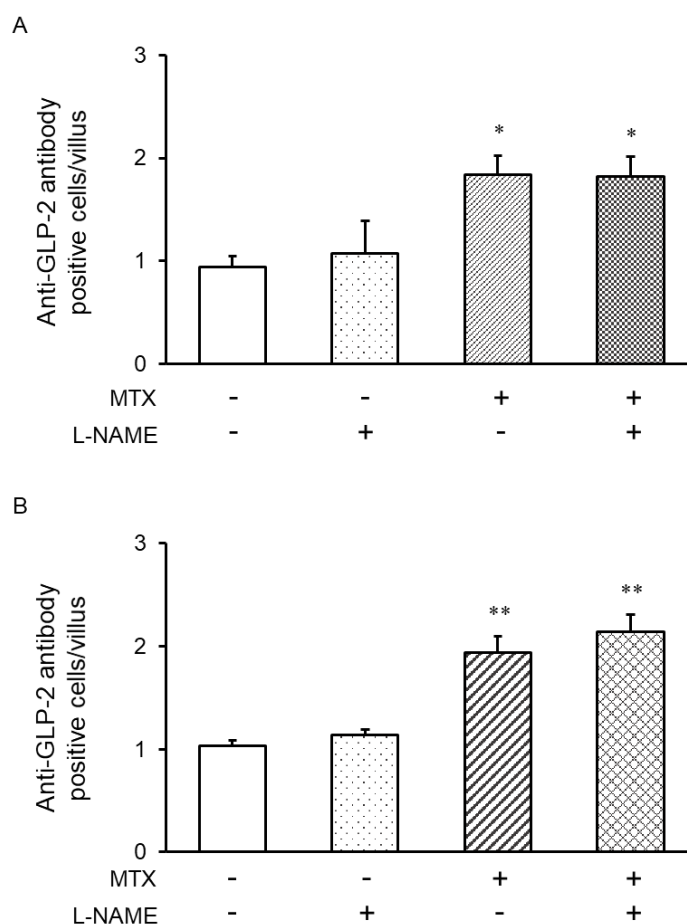


Fig. 38. Effects of MTX and L-NAME on the Number of Anti-GLP-2 Antibody Positive Cells in Rat Ileal Tissue

A: The single administration group. B: The consecutive administration group. Each column represents the mean \pm S.E. ($n = 5-6$ for A; $n = 6$ for B). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus basal.

第4節 考察

本章では、まずラット QOL に及ぼす MTX 分割投与の影響を検討した。その結果 MTX 分割投与は単回投与と同様に体重や摂餌量などを抑制するものの、その発現パターンは異なることが明らかとなった。即ち、MTX 単回投与においては、投与後 72 時間をピークに摂餌量、飲水量が抑制され、96 時間後にはコントロールレベルまで回復していたが、²⁸⁾ MTX 分割投与では摂餌量、飲水量は初回投与から 96 時間まで時間依存的に抑制された。さらに、L-NAME の併用投与は MTX 単回投与による QOL 低下には影響を及ぼさなかったが、²⁸⁾ MTX 分割投与による QOL の低下をさらに悪化させた。また、Takano らの報告²⁵⁾ と一致して MTX 単回投与は、L-NAME の併用の有無に関わらず小腸組織像に大きな影響を与えなかったものの、MTX 分割投与は、MTX の反復投与を行っている他研究報告と同様に、小腸組織傷害を引き起こした。^{21, 29-31)} 従って MTX 投与による小腸組織に与える傷害は、投与量よりも投与回数の増加によって引き起こされることが明らかとなった。また、L-NAME と MTX 分割投与の併用は、MTX 単回投与と比較して MPO 発現を指標とした炎症および粘膜萎縮を伴う小腸組織傷害をさらに悪化させた。このことから、主に cNOS 由来の内因性 NO による粘膜保護作用および潰瘍防止作用が、MTX 分割投与によって引き起こされる QOL の低下および小腸組織傷害に拮抗していることが考えられた。実際、MTX 分割投与は TNF- α および IL-1 β mRNA 発現を有意に増加させ、IL-6 mRNA 発現を増加させる傾向を示した。興味深いことに MTX 分割投与群における L-NAME の併用投与は、有意差はないものの MTX 単回投与と比較して TNF- α および IL-6 mRNA 発現を増加させる傾向を示した。L-NAME は、ラット腎皮質において抗炎症作用を担う IL-10 の産生を抑制することで TNF- α 産生を増加させることが報告されており、⁷⁰⁾ 従って L-NAME の併用投与による TNF- α および IL-6 mRNA 発現の増加傾向の機序に L-NAME による小腸での IL-10 産生の抑制が関与している可能性が考えられた。

L-NAME は実験動物への投与タイミングによって cNOS 及び iNOS に対する阻害効果が異なることが示唆されている。Tanaka らは、ラットへの L-NAME の前投与がインドメタシン投与による小腸潰瘍を悪化させる一方、インドメタシン投与 6 時間後の L-NAME 投与はこれを抑制することを報告している。^{71, 72)} また、トリニトロベンゼンスルホン酸 (2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid: TNBS) により誘発した大腸炎モデルラットに L-NAME を前投与すると、炎症をさらに悪化させることが報告されている。⁷³⁾ 即ち L-NAME の前投与は主に nNOS および eNOS を阻害し、L-NAME の後投与は主に iNOS を阻害すると考えられ

ている。従って、本研究において MTX 分割投与群への L-NAME の投与は主に cNOS による NO 産生を阻害し、このことが L-NAME 併用による小腸組織傷害の悪化に関与していると考えられた。また、前述した Tanaka らは、選択的 iNOS 阻害薬であるアミノグアニジンの前投与がインドメタシン誘発性小腸潰瘍に拮抗することも明らかにしている。⁷²⁾ 今後、本実験条件においても iNOS 選択的阻害薬などを用いることで NOS のより詳細な役割が解明できると考えられた。

ラットへの MTX 分割投与は、iNOS 発現のみならず nNOS および eNOS 発現を増加させた。L-NAME はすべての NOS mRNA 発現に影響を及ぼさなかったが、これは L-NAME が NOS 活性を競合的に阻害するためである。MTX 分割投与による cNOS 発現の亢進のメカニズムは未だ不明である。これまでに TNBS 誘発大腸炎モデルラットおよびデキストラン硫酸ナトリウム誘発性大腸炎モデルラットの結腸において iNOS と同時に eNOS mRNA 発現が増加すること、⁷⁴⁾ 虚血再灌流誘発腸炎モデルモルモットの回腸において nNOS mRNA 発現が増加することが報告されている。⁷⁵⁾ このことから本研究結果と共に考えると、cNOS 発現の亢進は、主に小腸組織傷害作用により低下した生理的役割を担う NO 産生を回復させる機能としての役割を持つことが示唆された。MTX 分割投与による cNOS 発現誘発メカニズムの解明については、今後の検討課題である。

本章ではまた、MTX 単回投与および分割投与後 96 時間後の小腸 GLP-2 発現を検討した。MTX 単回投与 96 時間後の小腸において抗 GLP-2 抗体陽性細胞数は増加していたが、プログルカゴン mRNA 発現には影響が認められなかった。これらの結果と第 1 章の結果を共に考えると、MTX 単回投与は 24 時間以内に L 細胞の過形成を引き起こし、96 時間後まで持続する一方、プログルカゴン mRNA 発現の亢進は一過性であり、投与 96 時間後では既に収束していることが示唆された。MTX 分割投与においては投与 96 時間後にて抗 GLP-2 抗体陽性細胞数を増加させ、プログルカゴン mRNA 発現も増加傾向を示した。また、L-NAME を併用するとコントロールと比較して有意なプログルカゴン mRNA 発現の増加が認められた。このことから、この GLP-2 発現の亢進は、MTX 分割投与により誘発された小腸組織傷害に対する代償反応として遅発性に引き起こされることが示唆された。実際、序論で述べたように Kissow らもラットへの 5-FU 投与は、投与 48 時間以内に MPO 発現を伴う小腸組織傷害を引き起こすが、投与 48 時間以降に血漿 GLP-2 濃度が増加することを示している。²¹⁾ また、MTX 分割投与による GLP-2 発現の亢進は、先に認められた cNOS 発現増加作用に関与している可能性も考えられる。De Heuvel らは、GLP-2 の 24 時間刺激が腸内神

経細胞における nNOS 発現を増加させることを報告している。⁷⁶⁾ また、GLP-2 アナログ投与がシスプラチン投与ラットの胃底部において nNOS 発現を増加させることや、⁷⁷⁾ ブタへの GLP-2 アナログの投与は小腸 eNOS 発現を増加させることで小腸血流を改善させることも報告されている。⁷⁸⁾ さらにマウスへの GLP-2 アナログの投与は NO および血管作動性腸管ペプチド経路を介し、リポポリサッカライド誘発性腸炎に拮抗する。⁷⁹⁾ 本研究においては、MTX 投与による GLP-2 発現亢進作用と NO との関係についての解明には至らなかった。今後 GLP-2 欠損モデル動物や GLP-2 阻害薬が MTX 投与による小腸 NOS 発現の変動にどのような影響を及ぼすかを明らかにするなど、さらなる検討が必要である。

以上第 2 章では、MTX 単回投与および分割投与によるラット QOL および小腸組織像に及ぼす影響と NO の役割について検討し、その結果、MTX 単回投与は小腸組織に著明な影響を与えず、MTX 投与による小腸への影響が QOL 低下と関連している可能性は低いと考えられた。一方、MTX 分割投与は小腸組織傷害を誘発し、この傷害が QOL 低下と関連していることが示唆された。また MTX 分割投与による cNOS 発現の増加は、小腸組織傷害のみならず、ラット QOL 低下に拮抗する可能性が考えられた。

総括

MTX の代表的な副作用として、消化器傷害や骨髄抑制などが挙げられ、これらの発現は患者の QOL を低下させるだけでなく、治療の中断に至る原因となる場合もある。そのため MTX による副作用発現メカニズムの解明は、より良い支持療法的确立につながり、結果的に臨床における MTX 使用の忍容性を高めることが期待できる。しかしながら、臨床においてのみならず実験動物を用いたこれまでの研究からも、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 投与の影響と腸の恒常性維持に寄与する GLP-2 発現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および NO の役割について検討した。

1. 小腸組織像に及ぼす MTX 投与の影響と小腸グルカゴン様ペプチド-2 発現との関係について 5-FU 投与と比較検討した。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炎症を伴う小腸組織傷害を引き起こした。MTX 投与は小腸における GLP-2 関連遺伝子 mRNA 発現、抗 GLP-2 抗体陽性細胞数を有意に増加させた。一方、5-FU 投与はこれらの GLP-2 関連遺伝子 mRNA 発現、抗 GLP-2 抗体陽性細胞数を有意に減少させた。また、MTX 投与は GLP-2 の分解酵素である DPP-4 mRNA 発現を増加させる傾向を示し、5-FU 投与はこれに有意に増加させた。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。実際 MTX 投与ラットにおいてプログルカゴン mRNA 発現と Epac1/2 mRNA 発現に強い相関関係が認められ、5-FU 投与ラットにおいてはこれらに相関関係は認められなかった。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 発現増加作用の機序の一部として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 NO の役割について検討した. MTX 分割投与はラット QOL を低下させ, L-NAME の併用はこれをさらに低下させた. MTX 単回投与は, L-NAME の有無に関わらず小腸組織像および 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 の併用はこれ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, L-NAME を併用すると IL-1 β mRNA 発現は有意に減少した. MTX 分割投与は L-NAME の有無に関わらず, これらの炎症性サイトカイン mRNA 発現を増加させる傾向を示した. MTX 単回投与および分割投与は COX-2 mRNA 発現に有意な影響を及ぼさなかった. 一方, MTX 分割投与は cNOS 発現を有意に増加させ, iNOS 発現を増加させる傾向を示した. MTX 単回投与は L-NAME の有無に関わらずプログルカゴン mRNA 発現に影響を及ぼさなかったが, MTX 分割投与は L-NAME を併用することでコントロールと比較してプログルカゴン mRNA 発現を有意に増加させた. 一方, MTX 単回投与および分割投与は抗 GLP-2 抗体陽性細胞数を有意に増加させ, L-NAME の併用はこれに影響を与えなかった. 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 低下およ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 cNOS 発現の増加が QOL 低下および小腸組織傷害に拮抗していることが示唆された. さらに MTX 分割投与による GLP-2 発現の亢進は, cNOS 発現増加作用に関与している可能性が考えられた.

本研究により, ラットにおいて嘔吐類似行動を引き起こす用量 (50 mg/kg) の MTX 単回投与は, 著明な小腸組織傷害を引き起こさず, その機序として小腸 GLP-2 発現の亢進作用が関連している可能性を見出した. また MTX の総投与量が同じであっても投与回数を変更することで QOL およ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. MTX による GLP-2 発現亢進作用と NO の関係の詳細を明らかにするために今後さらなる検討が必要であるものの, これらの知見は, 抗がん剤誘起性消化管傷害に対して GLP-2 作動薬が有効である可能性を示したと同時に, 幅広い適応を有する 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.

謝辞

稿を終えるにあたり，本研究に際し終始懇切丁寧な御指導御鞭撻を賜りました，北海道医療大学大学院薬学研究科病態生理学分野 町田拓自准教授に心より感謝の意を表します。

本研究を遂行するにあたり，有益な御鞭撻を賜りました，北海道医療大学 平藤雅彦名誉教授，北海道医療大学大学院薬学研究科病態生理学分野 飯塚健治教授，北海道科学大学薬学部薬物治療学分野 町田麻依子准教授，北海道医療大学薬学部薬理学講座（病態生理学）平出幸子助教に感謝の意を表します。

本論文作成に際し，有益な御助言をいただきました北海道医療大学大学院薬学研究科泉剛教授，西剛秀教授，中川宏治教授に心より感謝いたします。

本研究に際し，多大なる御協力と御支援を賜りました北海道医療大学薬学部薬理学講座（薬理学）の皆様感謝いたします。

最後に終始暖かく見守ってくれた家族をはじめ，すべての方に心から感謝いたします。

令和2年9月25日

北海道医療大学大学院薬学研究科

志賀 咲紀

引用文献

- 1) 宮城悦子, 坪井正博, 太田一郎, 縄田修一, がん化学療法クリティカルポイント対応マニュアル (2013).
- 2) Gaté L., Paul J., Ba G.N., Tew K.D., Tapiero H., Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. *Biomed. Pharmacother.*, **53**, 169–180 (1999).
- 3) Trier J.S., Morphologic alterations induced by methotrexate in the mucosa of human proximal intestine. II. Electron microscopic observations. *Gastroenterology*, **43**, 407–424 (1962).
- 4) 鈴木康夫, 知念直史, メトトレキサート, 日内会誌, **100**, 2902–2909 (2011).
- 5) White J.C., Goldman I.D., Mechanism of action of methotrexate. IV. Free intracellular methotrexate required to suppress dihydrofolate reduction to tetrahydrofolate by Ehrlich ascites tumor cells in vitro. *Mol. Pharmacol.*, **12**, 711–719 (1976).
- 6) Szeto D.W., Cheng Y.C., Rosowsky A., Yu C.S., Modest E.J., Piper J.R., Temple C. Jr., Elliott R.D., Rose J.D., Montgomery J.A., Human thymidylate synthetase--III. Effects of methotrexate and folate analogs. *Biochem. Pharmacol.*, **28**, 2633–2637 (1979).
- 7) Allegra C.J., Drake J.C., Jolivet J., Chabner B.A., Inhibition of phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide transformylase by methotrexate and dihydrofolic acid polyglutamates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **82**, 4881–4885 (1985).
- 8) Baggott J.E., Vaughn W.H., Hudson B.B., Inhibition of 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribotide transformylase, adenosine deaminase and 5'-adenylate deaminase by polyglutamates of methotrexate and oxidized folates and by 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside and ribotide. *Biochem. J.*, **236**, 193–200 (1986).
- 9) Cronstein B.N., The mechanism of action of methotrexate. *Rheum. Dis. Clin. North Am.*, **23**, 739-755 (1997).
- 10) Shen D.D., Azarnoff D.L., Clinical pharmacokinetics of methotrexate. *Clin. Pharmacokinet.*, **3**, 1–13 (1978).

- 11) Hendel J., Nyfors A., Pharmacokinetics of methotrexate in erythrocytes in psoriasis. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **27**, 607–610 (1984).
- 12) Kremer J.M., Galivan J., Streckfuss A., Kamen B., Methotrexate metabolism analysis in blood and liver of rheumatoid arthritis patients. Association with hepatic folate deficiency and formation of polyglutamates. *Arthritis Rheum.*, **29**, 832–835 (1986).
- 13) Barrueco J.R., O'Leary D.F., Sirotiak F.M., Metabolic turnover of methotrexate polyglutamates in lysosomes derived from S180 cells. Definition of a two-step process limited by mediated lysosomal permeation of polyglutamates and 81 activating reduced sulfhydryl compounds. *J. Biol. Chem.*, **267**, 15356–15361 (1992).
- 14) Panetta J.C., Yanishevski Y., Pui C.H., Sandlund J.T., Rubnitz J., Rivera G.K., Ribeiro R., Evans W.E., Relling M.V., A mathematical model of in vivo methotrexate accumulation in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **50**, 419–428 (2002).
- 15) Chabner B.A., Allegra C.J., Curt G.A., Clendeninn N.J., Baram J., Koizumi S., Drake J.C., Jolivet J., Polyglutamation of Methotrexate. Is Methotrexate a Prodrug? *J. Clin. Invest.*, **76**, 907–912 (1985).
- 16) Grim J., Chládek J., Martínková J., Pharmacokinetics and pharmacodynamics of methotrexate in non-neoplastic diseases. *Clin. Pharmacokinet.*, **42**, 139–151 (2003).
- 17) Hartmann B., Harr M.B., Jeppesen P.B., Wojdemann M., Deacon C.F., Mortensen P.B., Holst J.J., In vivo and in vitro degradation of glucagon-like peptide-2 in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **85**, 2884–2888 (2000).
- 18) Dubé P.E., Brubaker P.L., Frontiers in glucagon-like peptide-2: multiple actions, multiple mediators. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **293**, E461–E465 (2007).
- 19) Dubé P.E., Rowland K.J., Brubaker P.L., Glucagon-like peptide-2 activates β -catenin signaling in the mouse intestinal crypt: role of insulin-like growth factor-I. *Endocrinology*, **149**, 291–301 (2008).

- 20) Bulut K., Pennartz C., Felderbauer P., Meier J.J., Banasch M., Bulut D., Schmitz F., Schmidt W.E., Hoffmann P., Glucagon like peptide-2 induces intestinal restitution through VEGF release from subepithelial myofibroblasts. *Eur. J. Pharmacol.*, **578**, 279–285 (2008).
- 21) Kissow H., Viby NE., Hartmann B., Holst J.J., Timm M., Thim L., Poulsen S.S., Exogenous glucagon-like peptide-2 (GLP-2) prevents chemotherapy-induced mucositis in rat small intestine. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **70**, 39–48 (2012).
- 22) Mayo B.J., Stringer A.M., Bowen J.M., Bateman E.H., Dorothy M., Keefe D.M., Irinotecan-induced mucositis: the interactions and potential role of GLP-2 analogues. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **79**, 233–249 (2017).
- 23) Said H., Akiba Y., Narimatsu K., Maruta K., Kuri A., Iwamoto K., Kuwahara A., Kaunitz J.D., FFA3 activation stimulates duodenal bicarbonate secretion and prevents NSAID-induced enteropathy via the GLP-2 pathway in rats. *Dig. Dis. Sci.*, **62**, 1944–1952 (2017).
- 24) Obara Y., Machida T., Takano Y., Shiga S., Suzuki A., Hamaue N., Iizuka K., Hirafuji M., Cisplatin increases the number of enterochromaffin cells containing substance P in rat intestine. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **391**, 847–858 (2018).
- 25) Takano Y., Machida T., Obara Y., Hirano M., Kudo S., Takagi M., Hamaue N., Iizuka K., Hirafuji M., Methotrexate causes a change in intestinal 5-hydroxytryptamine metabolism in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, **740**, 496–503 (2014).
- 26) Jin T., Mechanism underlying proglucagon gene expression. *J. Endocrinol.*, **198**, 17–28 (2008).
- 27) Li X., Abe E., Yamakawa Y., Yoneda G., Fujino R., Yamashita M., Iida Y., Jono H., Saito H., Effect of administration duration of low dose methotrexate on development of acute kidney injury in rats. *J. Kidney*, **2**, 3 (2016).
- 28) Takano Y., Hirano M., Machida T., Obara Y., Hamaue N., Fujita K., Taniguchi M., Endo T., Shiga S., Machida M., Iizuka K., Hirafuji M., Nitric oxide plays a critical role in methotrexate-induced hyperplasia of enterochromaffin cells containing 5-hydroxytryptamine in rat small intestine. *J. Pharmacol. Sci.*, **141**, 32–40 (2019).

- 29) Leitão R.F., Brito G.A., Oriá R.B., Braga-Neto M.B., Bellaguarda E.A., Silva J.V., Gomes A.S., Lima-Júnior R.C., Siqueira F.J., Freire R.S., Vale M.L., Ribeiro R.A., Role of inducible nitric oxide synthase pathway on methotrexate-induced intestinal mucositis in rodents. *BMC Gastroenterol.*, **11**, 90 (2011).
- 30) Natarajan K., Abraham P., Kota R., Selvakumar D., Aminoguanidine pretreatment prevents methotrexate-induced small intestinal injury in the rat by attenuating nitrosative stress and restoring the activities of vital mitochondrial enzymes. *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.*, **28**, 239–247 (2017).
- 31) Natarajan K, Abraham P, Kota R, Isaac B. NF- κ B-iNOS-COX2-TNF α inflammatory signaling pathway plays an important role in methotrexate induced small intestinal injury in rat. *Food Chem. Toxicol.*, **118**, 766–783 (2018).
- 32) Widemann B.C., Balis F.M., Kempf-Bielack B., Bielack S., Pratt C.B., Ferrari S., Bacci G., Craft A.W., Adamson P.C., Highdose methotrexate-induced nephrotoxicity in patients with osteosarcoma. *Cancer*, **100**, 2222–2232 (2004).
- 33) Perez-Verdia A., Angulo F., Hardwicke F.L., Nugent K.M., Acute cardiac toxicity associated with high-dose intravenous methotrexate therapy: case report and review of the literature. *Pharmacotherapy*, **25**, 1271–1276 (2005).
- 34) Morsy M.A., Ibrahim S.A., Amin E.F., Kamel M.Y., Rifaai R.A., Hassan M.K., Curcumin ameliorates methotrexate-induced nephrotoxicity in rats. *Adv. Pharmacol Sci.*, 387071–387077 (2013).
- 35) Keefe D.M., Schubert M.M., Elting L.S., Sonis S.T., Joel B. Epstein J.B., Raber-Durlacher J.E., Migliorati C.A., McGuire D.B., Hutchins R.D., Peterson D.E., Updated clinical practice guidelines for the prevention and treatment of mucositis. *Cancer*, **109**, 820–831 (2007).
- 36) Patrìti A., Aisa M.C., Annetti C., Sidoni A., Galli F., Ferri I., Gullà N., Donini A., How the hindgut can cure type 2 diabetes. Ileal transposition improves glucose metabolism and beta-cell function in goto-kakizaki rats through an enhanced proglucagon gene expression and L-cell number. *Surgery*, **42**, 74–85 (2007).

- 37) Pfaff M.W., Georgieva T.M., Georgiev I.P., Ontsouka E., Hageleit M., Blum J.W., Real-time RT-PCR quantification of insulin-like growth factor (IGF)-1, IGF-1 receptor, IGF-2, IGF-2 receptor, insulin receptor, growth hormone receptor, IGF-binding proteins 1, 2 and 3 in the bovine species. *Domest. Anim. Endocrinol.*, **22**, 91–102 (2002).
- 38) Teramoto H., Puri P., Gene expression of insulin-like growth factor-1 and epidermal growth factor is downregulated in the heart of rats with nitrofen-induced diaphragmatic hernia. *Pediatr. Surg. Int.*, **17**, 284–287 (2001).
- 39) Wickert L., Steinkrüger S., Abiaka M., Bolkenius U., Purps O., Schnabel C., Gressner A.M., Quantitative monitoring of the mRNA expression pattern of the TGF-beta-isoforms (beta 1, beta 2, beta 3) during transdifferentiation of hepatic stellate cells using a newly developed real-time SYBR green PCR. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **295**, 330–335 (2002).
- 40) Fernández-Martos C.M., González-Fernández C., González P., Maqueda A., Arenas E., Rodríguez F.J., Differential expression of Wnts after spinal cord contusion injury in adult rats. *PLoS One*, **6**, e27000 (2011).
- 41) Pal A., Rhoads D.B., Tavakkoli A., Customization of biliopancreatic limb length to modulate and sustain antidiabetic effect of gastric bypass surgery. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **314**, G287–G299 (2018).
- 42) Yokoyama U., Susumu Minamisawa S., Hong Quan H., Toru Akaike T., Jin M., Otsu K., Ulucan C., Wang X., Baljinniyam E., Takaoka M., Sata M., Ishikawa Y., Epacl is upregulated during neointima formation and promotes vascular smooth muscle cell migration. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **295**, H1547–H1555 (2008).
- 43) Liu W., Saint D., A new quantitative method of real time reverse transcription polymerase chain reaction assay based on simulation of polymerase chain reaction kinetics. *Anal. Biochem.*, **302**, 52–59 (2002).
- 44) Kim S.H., Chun H.J., Choi H.S., Kim E.S., Keum B., Seo Y.S., Jeon Y.T., Lee H.S., Um S.H., Kim C.D., Ursodeoxycholic acid attenuates 5-fluorouracil-induced mucositis in a rat model. *Oncol. Lett.*, **16**, 2585–2590 (2018).

- 45) Yamazaki K., Yasuda N., Inoue T., Nagakura T., Kira K., Saeki T., Tanaka I., The combination of metformin and a dipeptidyl peptidase IV inhibitor prevents 5-fluorouracil-induced reduction of small intestine weight. *Eur. J. Pharmacol.*, **488**, 213–218 (2004).
- 46) Machida T., Takano Y., Iizuka K., Machida M., Hirafuji M., Methotrexate causes acute hyperplasia of enterochromaffin cells containing substance P in the intestinal mucosa of rats. *J. Pharmacol. Sci.*, **133**, 190–193 (2017).
- 47) Yusta B., Huang L., Munroe D., Wolff G., Fantaske R., Sharma S., Demchyshyn L., Asa S.L., Drucker D.J., Enteroendocrine localization of GLP-2 receptor expression in humans and rodents. *Gastroenterology*, **119**, 744–755 (2000).
- 48) Crosnier C., Stamataki D., Lewis J., Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. *Nat. Rev. Genet.*, **7**, 349–359 (2006).
- 49) Feng Y., Demehri F.R., Xiao W., Tsai Y.H., Jones J.C., Brindley C.D., Threadgill D.W., Holst J.J., Hartmann B., Barrett T.A., Teitelbaum D.H., Dempsey P.J., Interdependency of EGF and GLP-2 signaling in attenuating mucosal atrophy in a mouse model of parenteral nutrition. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.*, **17**, 447–468 (2017).
- 50) Shull M.M., Ormsby I., Kier A.B., Pawlowski S., Diebold R.J., Yin M., Allen R., Sidman C., Proetzel G., D Calvint D., Annunziata N., Doetschman T., Targeted disruption of the mouse transforming growth factor- β 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature*, **359**, 693–699 (1992).
- 51) Kehrl J.H., Roberts A.B., Wakefield L.M., Jakowlew S., Sporn M.B., Fauci A.S., Transforming growth factor beta is an important immunomodulatory protein for human B lymphocytes. *J. Immunol.*, **137**, 3855–3860 (1986).
- 52) Gray J.D., Hirokawa M., Chitsuka K., Horwitz D.A., Generation of an inhibitory circuit involving CD8+ T cells, IL-2, and NK cell- derived TGF-beta: contrasting effects of anti-CD2 and anti-CD3. *J. Immunol.*, **160**, 2248–2254 (1998).

- 53) de Saint-Vis B., Fugier-Vivier I., Massacrier C., Gaillard C., Vanbervliet B., Ait-Yahia S., Banchereau J., Liu Y.J., Lebecque S., Cauxet C., The cytokine profile expressed by human dendritic cells is dependent on cell subtype and mode of activation. *J. Immunol.*, **160**, 1666–1676 (1998).
- 54) Dullaers M., Li D., Xue Y., Ni L., Gayet I., Morita R., Ueno H., Palucka K.A., Banchereau J., Oh Set., A T cell-dependent mechanism for the induction of human mucosal homing immunoglobulin A-secreting plasmablasts. *Immunity*, **30**, 120–129 (2009).
- 55) Ben-Lulu S, Pollak Y, Mogilner J, Bejar J, G Coran A, Sukhotnik I. Dietary transforming growth factor-beta 2 (TGF- β 2) supplementation reduces methotrexate-induced intestinal mucosal injury in a rat. *PLoS One*, **7**, e45221 (2012).
- 56) Nguyen D.N., Jiang P., Jacobsen S., Sangild P.T., Bendixen E., Chatterton D.E., Protective effects of transforming growth factor β 2 in intestinal epithelial cells by regulation of proteins associated with stress and endotoxin responses. *PLoS One*, **10**, e0117608 (2015).
- 57) Shani G, Fischer W.F., Justice N.J., Kelber J. A., Vale W., Gray P., GRP78 and cripto form a complex at the cell surface and collaborate to inhibit transforming growth factor beta signaling and enhance cell growth. *Mol. Cell. Biol.*, **28**, 666–677 (2008).
- 58) Kingsley D.M., The TGF β superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev.*, **8**, 133–146 (1994).
- 59) Clevers H., Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell*, **127**, 469–480 (2006).
- 60) Sukhotnik I., Geyer T., Pollak Y., Mogilner J.G., Coran A.G., Berkowitz D., The role of Wnt/ β -catenin signaling in enterocyte turnover during methotrexate-induced intestinal mucositis in a rat. *PLoS One*, **9**, e110675 (2014).
- 61) Brubaker P.L., Schloos J., Drucker D.J., Regulation of glucagon-like peptide-1 synthesis and secretion in the GLUTag enteroendocrine cell line. *Endocrinology*, **139**, 4108–4114 (1998).

- 62) Lotfi S., Li Z., Sun J., Zuo Y., Lam P.P., Kang Y., Rahimi M., Islam D., Wang P., Gaisano Y.H., Jin T., Role of the exchange protein directly activated by cyclic adenosine 5'-monophosphate (Epac) pathway in regulating proglucagon gene expression in intestinal endocrine L cells. *Endocrinology*, **147**, 3727–3736 (2006).
- 63) Nakanishi A, Tsukamoto I., n-3 polyunsaturated fatty acids stimulate osteoclastogenesis through PPAR γ -mediated enhancement of c-Fos expression, and suppress osteoclastogenesis through PPAR γ -dependent inhibition of NF κ B activation. *J. Nutr. Biochem.*, **26**, 1317-27 (2015).
- 64) Ong Z.Y., Rachel J., Gibson R.J., Bowen J.M., Stringer A.M., Darby J.M., Logan R.M., Ann S.j Yeoh, Keefe DM., Pro-inflammatory cytokines play a key role in the development of radiotherapy-induced gastrointestinal mucositis. *Radiat. Oncol.*, **5**, 22 (2010).
- 65) Choi B.K., Kim J.H., Jung J.S., Lee Y.S., Han M.E., Baek S.Y., Kim B.S., Kim J.B., Oh S.O., Reduction of ischemia-induced cerebral injury by all-trans-retinoic acid. *Exp. Brain Res.*, **193**, 581–589 (2009).
- 66) Aoki K., Nakajima M., Hoshi Y., Saso N., Kato S., Sugiyama Y., Sato H., Effect of aminoguanidine on lipopolysaccharide-induced changes in rat liver transporters and transcription factors. *Biol. Pharm. Bull.*, **31**, 412–420 (2008).
- 67) Kuo D.Y., Yang S.F., Chu S.C., Chen C.H., Chen P.N., Hsieh Y.S., The effect of protein kinase C-delta knockdown on anti-Free radical enzyme and neuropeptide Y Gene expression in phenylpropanolamine-treated rats. *J. Neurochem.*, **114**, 1217–1230 (2010).
- 68) Machida T., Iizuka K., Shinohara K., Hatakeyama N., Nakano K., Kubo Y., Hirafuji M., Pressure stress reduces inducible NO synthase expression by interleukin-1 β stimulation in cultured rat vascular smooth muscle cells. *Eur. J. Pharmacol.*, **731**, 44–49 (2014).
- 69) Laemmli U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680–685 (1970).
- 70) Singh P., Castillo A., Majid D.S.A., Decrease in IL-10 and increase in TNF- α levels in renal tissues during systemic inhibition of nitric oxide in anesthetized mice. *Phys. Rep.*, **2**, e00228 (2014).

- 71) Tanaka A., Kunikata T., Konaka A., Kato S., Takeuchi K., Dual action of nitric oxide in pathogenesis of indomethacin-induced small intestinal ulceration in rats. *J. Physiol. Pharmacol.*, **50**, 405–417 (1999).
- 72) Tanaka A., Mizoguchi H., Kunikata T., Miyazawa T., Takeuchi K., Protection by constitutively formed nitric oxide of intestinal damage induced by indomethacin in rats. *J. Physiol. Paris.*, **95**, 35–41 (2001).
- 73) Kiss J., Lamparque D., Delchier J.C., Whittle B.J., Time-dependent actions of nitric oxide synthase inhibition on colonic inflammation induced by trinitrobenzene sulphonic acid in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, **336**, 219–224 (1997).
- 74) Petersson J., Schreiber O., Steege A., Patzak A., Hellsten A., Phillipson M., Holm L., eNOS involved in colitis-induced mucosal blood flow increase. *Am J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **293**, G1281–1287 (2007).
- 75) Giaroni C., Marchet S., Carpanese E., Prandoni V., Oldrini R., Bartolini B., Moro E., Vigetti D., Crema F., Lecchini S., Frigo G., Role of neuronal and inducible nitric oxide synthases in the guinea pig ileum myenteric plexus during in vitro ischemia and reperfusion. *Neurogastroenterol. Motil.*, **25**, 114–126 (2013).
- 76) de Heuvel E., Wallace L., Sharkey K.A., Sigalet D.L., Glucagon-like peptide 2 induces vasoactive intestinal polypeptide expression in enteric neurons via phosphatidylinositol 3-kinase- γ signaling. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **303**, E994–1005 (2012).
- 77) Pini A., Garella R., Idrizaj E., Calosi L., Baccari M.C., Vannucchi M.G. Glucagone-like peptide 2 counteracts the mucosal damage and the neuropathy induced by chronic treatment with cisplatin in the mouse gastric fundus. *Neurogastroenterol. Motil.*, **28**, 206–216 (2016).
- 78) Guan X., Karpen H.E., Stephens J., Bukowski J.T., Niu S., Zhang G., Stoll B., Finegold M.J., Holst J.J., Hadsell D., Nichols B.L., Burrin D.G., GLP-2 receptor localizes to enteric neurons and endocrine cells expressing vasoactive peptides and mediates increased blood flow. *Gastroenterology*, **130**, 150–164 (2006).

- 79) Maruta K., Takajo T., Akiba Y., Said H., Irie E., Kato I., Kuwahara A., Kaunitz JD., GLP-2 acutely prevents endotoxin-related increased intestinal paracellular permeability in rats. *Dig. Dis. Sci.*, in press.