

# 学 位 論 文 要 旨

メトトレキサート誘起性小腸組織障害に対する

ナファモスタットメシル酸塩の有効性に関する研究

令和 5 年 度

北海道医療大学大学院薬学研究科

山本 隆弘

【背景・目的】ドラッグリポジショニング (DR) とは、既存薬や開発中もしくは開発中止となった医薬品等から新しい薬効を見つけ出し、実用化につなげる開発手法を指し、近年の社会情勢からもそのメリットが注目されている。ナファモスタットメシル酸塩 (ナファモスタット) は現在、急性膵炎や播種性血管内凝固症候群治療に使用されているセリンプロテアーゼ阻害薬であるが、動物実験においては生体での様々な炎症反応を抑制することが報告されている。細胞傷害性抗がん薬に分類されるメトトレキサート (MTX) は、主に白血病や乳がんなどの治療に対して現在臨床において広く使用されている。代表的な MTX の副作用として骨髄抑制や消化器障害が挙げられ、これらの副作用は時に患者のがん治療の継続を困難にさせるほどの QOL 低下を引き起こす。一方、セロトニン (5-HT) はその 90%以上が小腸エンテロクロマフィン細胞 (EC 細胞) 内でトリプトファン水酸化酵素 (TPH) などの反応を経て合成され、消化管においては嘔吐や消化管機能の維持に重要な役割を担う。また EC 細胞にはサブスタンス P (SP) も存在しており、これも消化管運動や嘔吐に関わる。ナファモスタットは、これまでに潰瘍性大腸炎モデルラットの腸炎を改善することが報告されている。ナファモスタットにより阻害されるセリンプロテアーゼのうちトリプターゼは、消化管では主にプロテアーゼ活性化受容体-2 (PAR-2) を刺激し、消化管炎症に関与する。本研究では抗がん薬誘起性小腸組織障害に対する新たな支持療法薬としてナファモスタットが DR として応用できる可能性について薬理的観点から検討した。

【方法】9 週齢のウィスターラットを 4 群 (対照群, ナファモスタット単独群, MTX 単独群, ナファモスタット及び MTX 併用群) に分けた。ラットに MTX (12.5 mg/kg) を 24 時間毎に 4 回腹腔内投与し、各 MTX 投与 10 分前にナファモスタット (1, 3 及び 10 mg/kg) を 4 回皮下投与した。MTX 初回投与から 96 時間後に回腸を摘出し実験に用いた。回腸組織像及び炎症スコアリングをヘマトキシリン・エオシン染色にて、ミエロペルオキシダーゼ (MPO), TPH 及び SP 発現を免疫組織化学にて検討した。mRNA 発現を定量的及び定性的 RT-PCR 法にて、シクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2) タンパク質発現をウエスタンブロッ

ト法にて検討した。5-HT 含量および 5-HT の主要代謝物である 5-ヒドロキシインドール酢酸 (5-HIAA) 含量を電気化学検出器 HPLC (HPLC-ECD) で測定した。TPH 活性を、組織ホモジネートにトリプトファンを添加し合成された 5-ヒドロキシトリプトファン含量を測定することで、モノアミン酸化酵素 (MAO) 活性を、組織ホモジネートにキヌラミンを添加し合成された 4-ヒドロキシキノリンを測定することで検討した。

【結果】1. MTX 投与によるラット小腸組織障害・炎症反応に及ぼすナファモスタットの影響 ナファモスタット 1 mg/kg 投与は MTX による体重減少を有意に抑制した。また同用量のナファモスタットは MTX による小腸粘膜の障害・炎症スコアの増加、抗 MPO 抗体陽性細胞数の増加を有意に抑制した。さらに同用量のナファモスタットは MTX 投与による小腸でのインターロイキン-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )、腫瘍壊死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、IL-6 の各 mRNA 発現亢進及び COX-2 mRNA 発現亢進を有意に抑制し、COX-2 タンパク質発現亢進を抑制する傾向を示した。一方、ナファモスタット 3 及び 10 mg/kg 投与は MTX による組織障害・炎症反応に著明な影響を与えなかった。またナファモスタット 1 mg/kg 投与は MTX による摂餌量減少及び飲水量減少を有意に抑制したが、ナファモスタット 3 mg/kg 投与はこれらの減少に影響を与えなかった。2. MTX 投与によるラット小腸 5-HT・SP 合成系に及ぼすナファモスタットの影響 ナファモスタット 1 mg/kg 投与は、MTX 投与により増加した小腸 5-HT 含量、TPH 活性及び TPH1 mRNA 発現を有意に抑制した。さらに同用量のナファモスタットは MTX 投与により増加した抗 TPH 抗体陽性細胞数及び 5-HIAA 含量を抑制する傾向を示した。一方、ナファモスタット 3 及び 10 mg/kg 投与は MTX によるこれらの因子の変動に影響を与えなかった。また MTX 及びナファモスタットは MAO 活性に有意な影響を与えなかった。さらにナファモスタット 1 mg/kg 投与は MTX により増加した抗 SP 抗体陽性細胞数及び SP の前駆物質プレプロタキキニン-A mRNA 発現を有意に抑制し、ナファモスタット 3 及び 10 mg/kg 投与はこれらの因子に影響を与えなかった。3. ナファモスタットによる MTX 誘起性小腸組織障害抑制機序の検討 ラット小腸組織では PAR-1, 2 及び 3 mRNA 発現が認められた。ナファモスタット 1 mg/kg 投与は MTX により増加した PAR-2 mRNA 発現亢進を有意に抑制したが、ナファモスタット 10 mg/kg 投与は影響を与えなかった。さらにナファモスタット 1 mg/kg は MTX 投与によるオクルディン mRNA 発現減少を有意に抑制し、MTX 投与による zonula occludens-1 (ZO-1) mRNA 発現亢進を抑制する傾向を示した。ナファモスタット 10 mg/kg は MTX 投与によるオクルディン mRNA の発現亢進に影響を及ぼさず、ZO-1 mRNA 発現をさらに増加させた。

【考察】ナファモスタットは、低用量で用いることでトリプターゼに対する選択性が高まり、これをより強力に阻害する。従って、本研究で認められたナファモスタットのラット小腸組織障害・炎症反応及び 5-HT 合成亢進抑制作用にはトリプターゼ及びこれにより活性化される PAR-2 が関連していることが示唆された。ナファモスタットは、トリプターゼを阻害することで PAR-2 刺激を抑制するとともに、MTX による PAR-2 発現亢進を抑制し、このことも MTX 誘起性小腸機能障害に拮抗する機序であると考えられた。

【結語】ナファモスタットは、小腸において MTX 誘起性小腸組織障害および 5-HT 合成系亢進を抑制し、その作用機序に間接的な PAR-2 刺激抑制作用とともに、PAR-2 発現への抑制作用が関与している可能性があることが示された。本研究結果は、臨床においてナファモスタットが抗がん薬誘起性消化管障害に対しての支持療法薬として有効である可能性を示し、DR の観点からも有用な知見であると考えられた。