

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

略語表

本文では、以下の略語を使用した。

5-HIAA	5-hydroxyindolacetic acid (5-ヒドロキシインドール酢酸)
5-HT	5-hydroxytryptamine (セロトニン)
5-HTP	5-hydroxytryptophan (5-ヒドロキシトリプトファン)
CBC cell	crypt base columnar cell (腸陰窩基底円柱細胞)
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)
DSS	dextran sulfonic sodium (デキストラン硫酸ナトリウム)
EC cell	enterochromaffin cell (エンテロクロマフィン細胞)
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)
GPCR	G-protein coupled receptor (Gタンパク質共役型受容体)
HE	hematoxylin and eosin (ヘマトキシリン・エオシン)
IBS	irritable bowel syndrome (過敏性腸症候群)
IL-1 β	interleukin-1 β (インターロイキン-1 β)
i.p.	intraperitoneal (腹腔内投与)
MAO	monoamine oxidase (モノアミン酸化酵素)
MPO	myeloperoxidase (ミエロペルオキシダーゼ)
MTX	methotrexate (メトトレキサート)
MTX-PG	MTX-polyglutamate (MTX-ポリグルタメート)
Lgr5	leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5 (ロイシンリッチリピート含有 Gタンパク質共役受容体 5)
PAR	protease-activated receptor (プロテアーゼ活性化受容体)
PBS	phosphate-buffered saline (リン酸緩衝食塩水)
PPT-A	preprotachykinin-A (プレプロタキキニン-A)
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)
TEER	transepithelial electrical resistance (経上皮電気抵抗値)
TNBS	2,4,6-trinitrobenzen sulfonic acid (2,4,6-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)
TPH	tryptophan hydroxylase (トリプトファン水酸化酵素)
UC	ulcerative colitis (潰瘍性大腸炎)
ZO-1	zonula occluden-1

本学位論文は、以下の原著論文を基礎としたものである。

Low-dose nafamostat mesilate ameliorates tissue injury and inhibits 5-hydroxytryptamine synthesis in the rat intestine after methotrexate administration.

Yamamoto T., Machida T., Tanno C., Hasebe S., Tamura M., Kobayashi N., Hiraide S., Hamaue N., Iizuka K.
J. Pharmacol. Sci., **152**, 90–102 (2023).

目次

序論	1
本論	7
第1章 MTX 投与によるラット小腸組織障害および炎症反応に及ぼすナファモスタットメシ ル酸塩の影響	7
第1節 緒言	7
第2節 方法	8
第3節 結果	14
第1項 MTX 投与によるラット体重減少に及ぼすナファモスタットの影響	14
第2項 MTX 投与によるラット小腸組織障害に及ぼすナファモスタットの影響	16
第3項 MTX 投与による小腸 MPO 発現増加に及ぼすナファモスタットの影響	22
第4項 MTX 投与による炎症性サイトカイン発現増加に及ぼすナファモスタットの影響 ..	22
第5項 MTX 投与による COX-2 発現増加に及ぼすナファモスタットの影響	25
第6項 MTX 投与による摂餌量減少および飲水量減少に及ぼすナファモスタットの影響 ..	27
第4節 考察	30

第2章 MTX 投与によるラット小腸 5-HT およびサブスタンス P 合成系亢進に及ぼすナファモスタットメシル酸塩の影響

第1節 緒言.....	33
第2節 方法.....	35
第3節 結果.....	39
第1項 MTX 投与によるラット小腸 5-HT 含量増加に及ぼすナファモスタットの影響.....	39
第2項 MTX 投与による TPH 活性上昇に及ぼすナファモスタットの影響.....	40
第3項 MTX 投与による抗 TPH 抗体陽性細胞数増加に及ぼすナファモスタットの影響.....	41
第4項 MTX 投与による TPH1 mRNA 発現増加に及ぼすナファモスタットの影響.....	44
第5項 MAO 活性に及ぼす MTX およびナファモスタットの影響.....	45
第6項 MTX 投与によるラット小腸 5-HIAA 含量増加に及ぼすナファモスタットの影響.....	46
第7項 MTX 投与による抗サブスタンス P 抗体陽性細胞数増加に及ぼすナファモスタットの 影響.....	47
第8項 MTX 投与による PPT-A mRNA 発現増加に及ぼすナファモスタットの影響.....	50
第4節 考察.....	51

第3章 ナファモスタットメシル酸塩による MTX 誘起性小腸組織障害抑制機序の検討

第1節 緒言.....	54
第2節 方法.....	55
第3節 結果.....	58
第1項 PAR-2 mRNA 発現に及ぼす MTX およびナファモスタットの影響.....	58
第2項 オクルディン mRNA 発現に及ぼす MTX およびナファモスタットの影響.....	60
第3項 ZO-1 mRNA 発現に及ぼす MTX およびナファモスタットの影響.....	61
第4節 考察.....	62
総括.....	64
謝辞.....	67
引用文献.....	69

Abstract

Nafamostat mesilate (nafamostat), a potent and specific serine protease inhibitor, has long been used to treat acute pancreatitis and disseminated intravascular coagulation syndrome. Serine proteases include tryptase, C1r, C1s, kallikrein, thrombin, and trypsin, of which tryptase has been reported to be involved in the pathogenesis of various gastrointestinal tract disorders, including inflammation of the intestine. Based on these findings, I hypothesized that nafamostat might have a useful effect on anti-cancer drug-induced mucositis as well as 5-HT dynamics. In the present study, I aimed to clarify whether nafamostat affects the intestinal mucositis and the potentiation of intestinal 5-HT dynamics induced by methotrexate. Rats received intraperitoneal methotrexate at 12.5 mg/kg/day for 4 days. In addition, 1, 3, or 10 mg/kg/day of nafamostat was given subcutaneously for 4 days. Ninety-six hours after the first administration of methotrexate, jejunal tissues were collected for analysis. The results showed that 1 mg/kg, but not 3 or 10 mg/kg, of nafamostat significantly ameliorated the methotrexate-induced body weight loss. Moreover, 1 mg/kg of nafamostat significantly improved methotrexate-induced mucositis, including villus atrophy. Nafamostat (1 mg/kg) significantly inhibited the methotrexate-induced mRNA expression of pro-inflammatory cytokines and cyclooxygenase-2, as well as methotrexate-induced 5-HT content and tryptophan hydroxylase (TPH) activity. In addition, it tended to inhibit the number of anti-TPH antibody-positive cells and significantly inhibited the number of anti-substance P antibody-positive cells. Methotrexate significantly increased protease-activated receptor-2 (PAR-2) mRNA expression. Nafamostat (1 mg/kg) significantly inhibited the PAR-2 mRNA expression. Methotrexate significantly decreased mRNA expression of occludin, which is tight junction protein. Methotrexate tended to increase to mRNA of zonula occluden-1 (ZO-1), which is another tight junction protein. Nafamostat (1 mg/kg) significantly ameliorated the changes of occludin and ZO-1 mRNA expressions. These findings suggest that low-dose nafamostat ameliorates tissue injury and 5-HT and substance P synthesis, as well as tight junction related protein change in methotrexate-induced mucositis. The suppression of methotrexate-induced PAR-2 mRNA expression by nafamostat, followed by amelioration of tight junction-related mRNA expression changes, may be involved in the mechanism. Nafamostat may be a novel therapeutic strategy for the prevention and treatment of mucositis as well as 5-HT- and/or substance P-related adverse effects in cancer chemotherapy.

序論

ドラッグリポジショニングとは、すでに承認されている薬物について新しい効果や標的を探索・発見することにより、既存薬を新たな疾患の治療薬として利用することである。¹⁾ ドラッグリポジショニングの利点として、対象薬物の薬理的な効果や安全性が確認されていること、上市されているので臨床試験の早期相を短縮でき、開発費が安価なことから治療費も安くなることなどが挙げられる。²⁾ このように従来からの新薬の開発手法とは別の意味で大きな利点があるため、近年、盛んにドラッグリポジショニング研究が行われており、それに伴いドラッグリポジショニングに関連した論文数が増加している。³⁾

がんは日本の死因で最も多く、1981年以降死因順位第1位を維持している。がん治療法として手術、放射線治療、薬物療法が挙げられる。薬物療法においては、主に細胞障害性抗がん薬、分子標的薬、免疫チェックポイント阻害薬およびホルモン療法薬が用いられている。近年、分子標的薬や免疫チェックポイント阻害薬の開発が進み、がん薬物療法においてこれらの存在感が増している。しかしながら、古くから用いられている細胞障害性抗がん薬も、現在でも多くのがん薬物療法のレジメンで使用され、がん薬物療法に欠かせない。⁴⁾ 一般的な細胞障害性抗がん薬は、細胞増殖に必要な過程を阻害することにより殺細胞性作用を示す。このため細胞障害性抗がん薬は、がん細胞のみならず、骨髄細胞、消化管粘膜細胞、毛根細胞など特に増殖が盛んな正常細胞にも大きな影響を及ぼす。このことから細胞障害性抗がん薬の代表的な副作用として、骨髄抑制や口内炎、悪心・嘔吐、下痢などが出現する。これらの副作用は患者にとって苦痛であることが多く、患者のQOL低下を招き、時にがん治療の継続を困難にさせる。

細胞障害性抗がん薬のひとつであるメトトレキサート (methotrexate: MTX, Fig. 1) は、核酸合成に必須の補酵素である葉酸に拮抗する葉酸代謝拮抗薬であり、日本では1963年に経口薬として上市された。現在もMTXは白血病や悪性リンパ腫の治療で用いられる他、乳がん、胃がん、膀胱がんなどの治療で他の抗がん薬と併用され、主に静脈内投与されている。またMTXは慢性関節リウマチにおいては第一選択薬として世界で最も多く使用され、主に経口投与されている。MTXの主な抗がん作用のメカニズムは、DNA合成阻害作用である。MTXは、葉酸を核酸合成に必要な活性型葉酸に還元するジヒドロ葉酸還元酵素 (dihydrofolate reductase: DHFR) を阻害し、テトラヒドロ葉酸の合成を低下させ、結果的にチミジル酸の産生を不足させることでDNAの新たな合成を阻害する。⁵⁾ MTXの血中半減期は経口投与において約6時間、非経口

投与においても18時間と短い⁶⁾、細胞膜上の還元型葉酸キャリア1を介して細胞内に取り込まれたMTXは、フォリルポリグルタミン酸合成酵素によってポリグルタミン酸化され、MTX-ポリグルタミン酸 (MTX-polyglutamate: MTX-PG) となり細胞内に蓄積する。このMTX-PGもDHFR、メチレンテトラヒドロ葉酸、チミジル酸合成酵素を阻害する。細胞内に蓄積されたMTX-PGは、その期間抗がん作用を持続させる一方、副作用も持続させる。^{7,8)} MTX投与による副作用は他の細胞障害性抗がん薬と同様に、骨髄抑制や脱毛、嘔気・嘔吐、口内炎、下痢などを含む消化器症状である。注射用メソトレキセート[®]のインタビューフォームによると消化器症状の発現頻度が50%以上であり、他の副作用と比較して最も多く発現する。また、MTXを低用量で用いたがん患者では40%以上に、高用量で用いた患者ではほぼ100%に腸管粘膜炎が認められるとの報告もあり、⁹⁾ がん治療の中断や患者のQOL低下の要因になっている。実際、MTXは口腔や消化管上皮に対する感受性が骨髄よりも高く、消化管上皮細胞にMTXが蓄積しやすい。¹⁰⁾

一方、ナファモスタットメシル酸塩 (nafamostat mesilate: ナファモスタット, Fig. 2) は1981年に藤井らが報告したセリンプロテアーゼ阻害薬である。¹¹⁾ 現在、プロテアーゼは大きくセリンプロテアーゼ、金属プロテアーゼ、チオールプロテアーゼおよび酸性プロテアーゼの4つに分類されている。¹²⁾ 中でもセリンプロテアーゼはさらに基質特異性により、トリプシン様

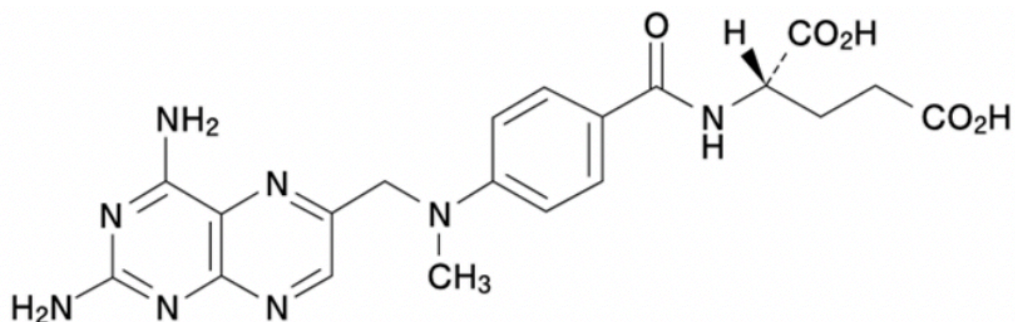


Fig. 1. Chemical Structure of MTX

セリンプロテアーゼ，キモトリプシン様セリンプロテアーゼ，エラスターゼ様セリンプロテアーゼの3つに分類される。ナファモスタットは，トリプシン，トリプターゼ，カリクレイン，トロンビン，プラスミン，補体のC1rおよびC1sなどのトリプシン様セリンプロテアーゼに対し，選択的かつ強力に阻害作用を示す。¹³⁾ この阻害作用によりナファモスタットは現在，臨床において急性膵炎および播種性血管内凝固症候群（disseminated intravascular coagulation: DIC）治療薬として応用されている。¹⁴⁾ さらに近年，ナファモスタットは新型コロナウイルス感染症治療薬としてドラッグリポジショニングされる期待が高まっている。ナファモスタットは気道上皮細胞の細胞膜上にて新型コロナウイルスの膜融合に必要なセリンプロテアーゼである transmembrane serine protease 2 を抑制し，ウイルスの体内への侵入を阻害する。^{15,16)}

またナファモスタットは，動物実験において消化管での炎症や各種刺激による知覚反応を抑制することが明らかにされている。実際，ナファモスタットは潰瘍性大腸炎（ulcerative colitis: UC）モデルラットの大腸において，炎症性サイトカインの蓄積と好中球の蓄積を阻害し，炎症を改善させ，¹⁷⁾ 過敏性腸症候群（irritable bowel syndrome: IBS）モデルラットにおいては，過剰な内臓運動応答を抑制する。¹⁸⁾

また Kikuchi らは，ナファモスタットが MTX 投与ラット摘出小腸からの 5-HT 遊離を有意に抑制することを報告している。¹⁹⁾ 生体内の 5-HT の約 90%が小腸エンテロクロマフィン細胞（enterochromaffin cell: EC 細胞）で合成，貯蔵されている。抗がん薬による EC 細胞からの 5-HT

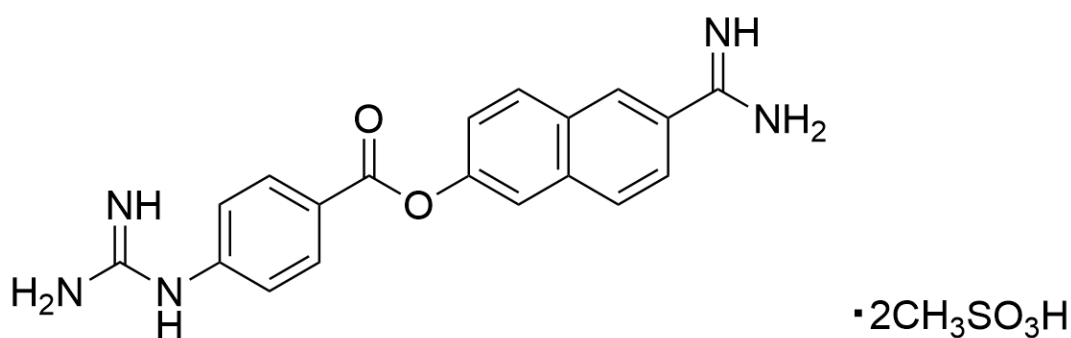


Fig. 2. Chemical Structure of Nafamostat Mesilate

遊離は、抗がん薬誘起性悪心・嘔吐に深く関与していることから、ナファモスタットによる摘出小腸 5-HT 遊離抑制作用は抗がん薬誘起性悪心・嘔吐に対する制吐薬として応用できる可能性を示している。EC 細胞にはサブスタンス P も貯蔵されているが、²⁰⁾ サブスタンス P もまた抗がん薬誘起性悪心・嘔吐発現に関与している。これまでに動物実験において、MTX を含む多くの細胞障害性抗がん薬が EC 細胞を過増殖させ小腸 5-HT 合成を亢進させることが報告されている。²⁰⁻²⁶⁾

前述したナファモスタットによる UC および IBS の病態進展の抑制作用の主な機序として、消化管組織における間接的なプロテアーゼ活性化受容体-2 (protease-activated receptor-2: PAR-2) 阻害作用が示唆されている。²⁷⁻²⁹⁾ G タンパク質共役型受容体 (G-protein coupled receptor: GPCR) である PAR は、主に細胞外のプロテアーゼの作用を仲介する。PAR の活性化機構は非常にユニークであり、プロテアーゼが PAR の細胞外 N 末端のペプチドを特定部位で不可逆的に切断することにより、新たな N 末端を露出させこれが tethered ligand として機能し、自身の細胞外第 2 ループ部位に結合し活性化する (Fig. 3)。また、tethered ligand と同じ配列のペプチド鎖が PAR に結合することによっても活性化される (Fig. 3)。PAR は 1~4 のサブタイプに分類される。PAR は様々なプロテアーゼによって活性化されるが、PAR-1, 3, 4 は主にトロンビンにより活性化され、PAR-2 は主にトリプシンおよびトリプターゼにより活性化される。^{30,31)} Table 1 に PAR の発現部位、PAR を活性化するプロテアーゼ、PAR の細胞外 N 末端のペプチドがプロテアーゼによって切断される cleavage cite および tethered ligand を示した。

PAR はまた内因性のプロテアーゼのみならず、細菌やアメーバ、昆虫などから分泌される外因性プロテアーゼによっても活性化され、これが原因で炎症や血栓症、痛みなどが引き起こされることもある。³²⁾ 消化管においては UC や IBS モデルラットの結腸において、トリプターゼ

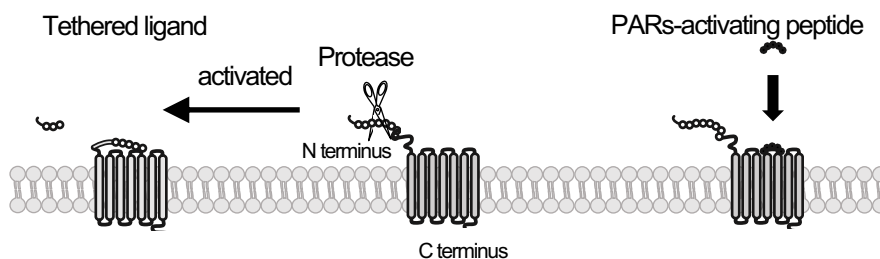


Fig. 3. Activation Mechanism of PARs

Table 1. Characteristics of PARs ^{31,33,34)}

	PAR-1	PAR-2	PAR-3	PAR-4
Tissue and cells	Brain, lung, stomach, colon, kidney, endothelial cell, white blood cells, intestinal epithelial cell, fibroblast, neuron, mast cell	Small intestine, colon, pancreas, liver, kidney, white blood cells, epithelium of gastrointestinal tract and lung, neuron, mast cell, intestinal epithelial cell	Heart, kidney, pancreas, thymus, small intestine, stomach, lymph nodes, trachea, respiratory system and vascular smooth muscle cell, platelets, astrocytoma cells, megakaryocytes	Lung, pancreas, thyroid, placenta, skeletal muscle, lymph nodes, adrenal glands, prostate, uterus, colon, platelets, megakaryocytes
Activating protease	Thrombin, APC, granzyme A, plasmin, trypsin, tryptase, factor Xa/VIIa, kallikrein, MMP-1, cathepsin G, proatherocytin	Trypsin, tryptase, proteinase-3, factor Xa/VIIa, acrosyan, matriptase/MT-SP1, granzyme A, TMPRSS2, kallikrein	Thrombin	Thrombin, trypsin, cathepsin G, trypsin IV, MASP-1, plasmin, factor Xa/VIIa, kallikrein, gingipine
Cleavage site	Arg41/Ser42	Arg36/Ser37	Lys38/Thr39	Arg47/Gly48
Tetherd ligand	SFLLR (human) SFLLR (mouse/rat)	SLIGKV (human) SLIGRL (mouse/rat)	TFRGAP (human) SFNGGP (mouse)	GYPGQV (human) GYPGKF (mouse)

を含有するマスト細胞が増加することが報告されている。^{17,18)} このトリプターゼはラット小腸上皮細胞株 IEC-6 において PAR-2 タンパク質発現量を増加させ、細胞生存率を低下させる。³⁵⁾ 従って、ナファモスタットは UC や IBS 病態において、過剰に遊離されたトリプターゼによる PAR-2 活性化を抑制し、これら病態進展を抑制すると示唆されている。

細胞障害性抗がん薬の消化管への蓄積は腸管バリアを破綻させる。実際、ラットに MTX 15 mg/kg/day を 4 日間投与すると、小腸の透過性が有意に上昇する。³⁶⁾ 腸管バリア機能において重要な役割を果たすのは腸管上皮細胞である。腸管バリアは、管腔側に存在するタイトジャンクションと基底側にあるアドヘレンスジャンクションによる上皮細胞間接着装置により形成される。タイトジャンクションに関連するタンパク質には、内在性膜貫通タンパク質であるオクルルディン、クローディン、また細胞内に存在しタイトジャンクションの裏打ち因子である zonula occluden (ZO) などがある。^{37,38)} ZO は 1 から 3 のサブタイプを持ち、タイトジャンクションプロテイン 1 (tight junction protein 1: tjp1) 遺伝子をノックアウトしたマウスより作製された ZO-1 欠損細胞³⁹⁾ では、tjp2 および tjp3 をノックアウトし作製された ZO-2, ZO-3 欠損細胞と比

較し、タイトジャンクションの形成が遅延する。⁴⁰⁾ また ZO-1 欠損遺伝子はオクルディンおよびクローディンの活性が低下していることが報告されている。⁴⁰⁾ 従って ZO-1 は、ZO-2、ZO-3 と比較し、特にタイトジャンクション機能制御に対して重要な役割を果たしている。消化管上皮細胞におけるタイトジャンクションの崩壊は腸粘膜透過性を増加させ、細菌などが侵入することで炎症を惹起させる。実際、ヒト結腸がん由来細胞 Caco-2 細胞を炎症性サイトカインで刺激した実験では、腸粘膜透過性が増加する。⁴¹⁾ また結腸がん由来細胞 T84 細胞に PAR-2 アゴニストを添加すると、細胞間結合の強度を定量的に表す経上皮電気抵抗値 (transepithelial electrical resistance: TEER) が低下し、オクルディンおよび ZO-1 タンパク質発現が抑制される。⁴²⁾

以上の背景から UC や IBS にナファモスタットが有効であるようにナファモスタットは抗がん薬誘起性消化管障害にも有効である可能性があると考えられた。本研究の目的は MTX による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ドラッグリポジショニングとして応用できる可能性を明らかにすることである。第 1 章では MTX 投与によるラット小腸組織障害および炎症反応に及ぼすナファモスタットの影響について、第 2 章では MTX 投与によるラット小腸 5-HT およびサブスタンス P 合成系亢進に及ぼすナファモスタットの影響について、第 3 章では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について検討した。

本論

第1章 MTX 投与によるラット小腸組織障害および炎症反応に及ぼすナファモスタットの 影響

第1節 緒言

細胞障害性抗がん薬は、代謝回転の速い消化管上皮細胞に作用し、消化管組織障害を引き起こす。Shigaらは、ラットにMTX 12.5 mg/kgを24時間毎に4回腹腔内投与しさらに24時間後の小腸において、絨毛長短縮を含め著明な組織障害が惹起されることを見出し、またこの障害にはミエロペルオキシダーゼ (myeloperoxidase: MPO) 発現の増加や炎症性サイトカイン mRNA 発現の増加などの炎症反応を伴うことを報告している。⁴³⁾

ナファモスタットは 2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸 (2,4,6-trinitrobenzen sulfonic acid: TNBS) やデキストラン硫酸ナトリウム (dextran sulfonic sodium: DSS) により誘発された UC および IBS 動物モデルにおける結腸粘膜炎を抑制することから、^{17,44)} 細胞障害性抗がん薬による消化管組織障害も抑制できる可能性がある。

そこで第1章では、まず MTX 投与によるラット小腸組織障害および炎症反応に及ぼすナファモスタットの影響を検討した。

第2節 方法

1) 使用動物

実験動物として9週齢の雄性ウィスター系ラット（日本エスエルシー株式会社，静岡）を使用した。全ての動物は北海道医療大学動物実験センター内で一定の室温（ $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ），相対湿度（ $50 \pm 10\%$ ），換気回数（12回/時間），人工照明（800ルクス）による12時間ごとの明暗環境（明期：8:00–20:00，暗期：20:00–8:00）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。動物を一定期間予備飼育し，健康で順調な発育が見られたもののみを実験に使用した。本研究の動物実験は「北海道医療大学動物実験規定」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），イソフルランをファイザー（東京）より購入した。ナファモスタットメシル酸塩（注射用フサン[®] 10 mg）を日医工（富山）より購入した。生理食塩液（大塚生食注[®]）および注射用水（大塚蒸留水[®]）を大塚製薬（東京）より購入した。TRI[®] Reagent，イソプロパノール，マウス抗 β -アクチン抗体をSigma-Aldrich（MO，USA）より購入した。PrimeScript[™] One-Step RT-PCR KitおよびPrimeScript[™] RT Reagent Kit，TB Green[®] Premix Ex Taq[™] II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）を同仁科学研究所（熊本）より購入した。ウサギ抗MPO抗体，BCA[™] Protein Assay Kit，horseradish peroxidase（HRP）標識ヤギ抗ウサギIgG抗体，Immobilon Western chemiluminescent HRP substrateをThermo Fisher Scientific（MA，USA）より購入した。HRP標識ウサギ抗COX-2抗体をCell Signaling Technology（MA，USA）より購入した。Mammalian Protein Extraction BufferをGEヘルスケア（IL，USA）より，Protein inhibitor mixをCytiva（東京）より，4×Laemmli Sample BufferをBIO-RAD（CA，USA）より購入した。Prestained XL-Ladderをアンテグラル（東京）より購入した。なお，この他実験に使用した試薬は全て特級規格品または生化学用を富士フィルム和光純薬（大阪）のものを使用した。

3) 薬物投与プロトコール

プロトコールを Fig. 4 に示す. Shiga らの方法⁴³⁾に従いラットに MTX 12.5 mg/kg または対照として生理食塩液を 24 時間毎に 4 回腹腔内投与した. さらに, Kikuchi らの方法¹⁹⁾に従い MTX または生理食塩液を投与する 10 分前に, ナファモスタット (1 mg/kg, 3 mg/kg または 10 mg/kg) または注射用水を 24 時間ごとに 4 回皮下投与した (Fig. 4).

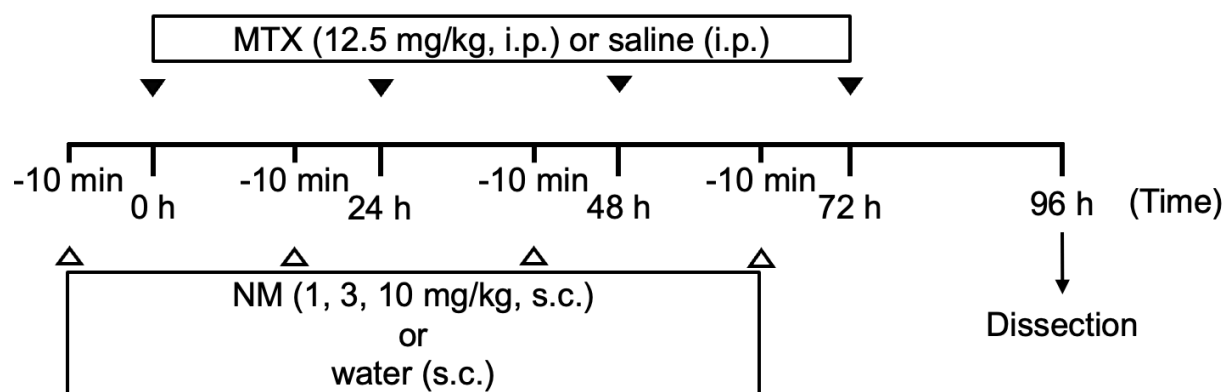


Fig. 4. Schedule of Administration of MTX and Nafamostat Mesilate to Rats

NM: nafamostat mesilate

4) ラット体重, 摂餌量, 飲水量の測定

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) にて飼育した. 8 週齢の雄性ウィスターラットを 1) に準じた条件にて 6 日間飼育し, 馴化させた. その後, 3) のプロトコールに従い, 薬物投与を開始し 24 時間毎に体重, 摂餌量, 飲水量を測定した.

5) 小腸組織の摘出

ラットをイソフルラン麻酔下にて放血致死せしめ, 空腸を摘出し, 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除去した.

6) パラフィン切片の作成

5) にて摘出した空腸を絨毛を損傷ないように縦方向に切開し, 腸管内の内容物を滅菌

PBS 内で洗浄した。管腔側が上部になるようにゴム版に張り付け 10%中性緩衝ホルマリン液 (pH 7.4) に浸し固定した。その後、パラフィン包埋し 3~5 μm の厚さで薄切し薄層切片を作成した。

7) 小腸組織形態の観察, 小腸絨毛長の計測および炎症スコアの測定

6) にて作成した薄層切片をヘマトキシリン・エオシン (hematoxylin 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。NDP View2 画像閲覧ソフトウェア (浜松ホトニクス, 静岡) を用いて絨毛長を測定した。Otagiri ら⁴⁵⁾ の方法により, 組織傷害の程度をスコアリングした。なお, スコアリングは株式会社モルフォテクノロジーに依頼して行われた。

8) 抗 MPO 抗体を用いた免疫組織化学 (酵素抗体法)

6) 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。次に蒸留水で洗浄し, 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。ついで二次抗体 (ヒストファインシンプルシステムラット 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に依頼し行われた。

9) 小腸組織からの total RNA の抽出

5) にて摘出した空腸をバイオミキサー (日本精機製作所, 東京) を用いて TRI[®] Reagent 1 mL 中でホモジナイズ (6,000 rpm, 30 秒間, 氷冷下) した。ホモジネートを遠心分離 (20,000 \times g,

10分間、4℃)した。上清を回収し、室温で5分静置後、クロロホルム 200 μ L を加え、転倒混和した。さらに室温で15分間静置後、遠心分離 (21,500 \times g, 15分間, 4℃) した。採取した上清に 2-プロパノール 500 μ L を加え、転倒混和し、10分室温で静置した。その後、上清を除去し、遠心分離 (21,500 \times g, 30-45秒間, 4℃) して、さらに上清を除去した。沈殿した total RNA に 75%エタノールを 1 mL を加え、遠心分離 (21,500 \times g, 10分間, 4℃) し、上清を除去して、遠心分離 (20,000 \times g, 30-45秒間, 4℃) した。その後、上清を除去し、滅菌水 200 μ L を加え、沈殿した total RNA を溶解させた。

10) Real-time RT-PCR 法

9) にて得られた total RNA を Nano Drop[®] ND-1000 Spectrophotometer (Nano Drop, Technologies, DE, USA) を用いて 260 nm での吸光度を測定し、total RNA 濃度を求めた。その後、total RNA 濃度が 20 ng/mL になるように滅菌水で希釈した。その後、PrimeScript[™] One-Step RT-PCR Kit を用いて、または PrimeScript[™] RT Reagent Kit にて cDNA を作成し、TB Green[®] Premix Ex Taq[™] II を用いて、7500 Real time PCR System (アプライドバイオシステムジャパン, 東京) にて PCR 反応を実施した。使用したインターロイキン-1 β (interleukin-1 β : IL-1 β), 腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor- α : TNF- α), IL-6, シクロオキシゲナーゼ-2 (cyclooxygenase-2: COX-2) のプライマーを Table 2 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 2. Primers for Real-time RT-PCR

product		Sequences (5' \rightarrow 3')	Reference
IL-1 β	Forward	CACCTCYCAAGCAGAGCACAGA	46)
	Reverse	ACGGGTTCATGGTGAAGTC	
TNF- α	Forward	GTGATGGGTCCCAACAAGGA	47)
	Reverse	AGGGTCTGGGCCATGGAA	
IL-6	Forward	TCCTACCCCAACTTCCAATGCTC	47)
	Reverse	TTGGATGGTCTTGGTCCTTAGCC	
COX-2	Forward	TTTGTTGAGTCATTCACCAGACAGAT	48)
	Reverse	ACGATGTGTAAGGTTTCAGGGAGAAG	
GAPDH	Forward	ATGTTCCAGTATGACTCCACTCACG	49)
	Reverse	GAAGACACCAGTAGACTCCACGACA	

11) 組織の可溶化

5) で抽出した空腸を, Mammalian Protein Extraction Buffer 990 μL , Protease Inhibitor Mix 10 μL を含む可溶化液中に浸し, バイオミキサーでホモジナイズ (6,000 rpm, 30 秒間, 氷冷下) した. これを遠心分離 (17,200 \times g, 10 分間, 4 $^{\circ}\text{C}$) し, その上清を回収して遠心分離 (20,000 \times g, 30 分間, 4 $^{\circ}\text{C}$) し, 上清を回収した.

12) タンパク質の定量

11) で回収した上清を BCATM Protein Assay Kit を用いてタンパク質量を測定した. 生理食塩液にて適宜希釈した可溶化液 10 μL に, BCATM Protein Assay Reagent A と BCATM Protein Assay Reagent B を 50 : 1 の割合で混合した溶液を 200 μL 加え, 37 $^{\circ}\text{C}$ のインキュベーター内で 30 分間インキュベートし, 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) 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中のタンパク質濃度を求めた.

13) 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 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 $^{\circ}\text{C}$, 5 分間加熱した. その後 Laemmli の方法⁵⁰⁾ 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 で通電し泳動した. 電気泳動用ゲルには SuperSepTM ACE, 7.5%, 17 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.

14) COX-2 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 μm 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, 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. 次に一次抗体

として 2.5%スキムミルク/TBS-T にて 100 倍に希釈した抗 COX-2 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°Cで一晩, PVDF 膜と反応させた. 未反応抗体除去のために TBS-T を用いて, 室温で 15 分間 1 回, 10 分間 3 回振とうした. 次に, COX-2 および β -アクチンの二次抗体として, それぞれ horseradish peroxidase 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体を 1,000 倍に, horseradish peroxidase 標識ウサギ抗マウス IgG 抗体を 3,000 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. COX-2 および β -アクチンはそれぞれ 74 kDa, 42 kDa に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. COX-2 の発現量は β -アクチンの発現量に対する相対比として解析した.

15) 統計学的処理および検定方法

全ての測定値を平均 \pm 標準誤差 (Mean \pm S.E.) で示した. 多重間の比較は一元配置分散分析 (ANOVA) の後に 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 MTX 投与によるラット体重減少に及ぼすナファモスタットの影響

まず MTX による体重減少に及ぼすナファモスタットの影響を検討した。MTX 単独投与は初回投与から 96 時間にかけて時間依存的に体重を減少させた (Fig. 5)。ナファモスタット単独投与は体重に影響を与えなかった (Fig. 5)。ナファモスタット 1 mg/kg の併用は MTX 投与による体重減少を初回投与から 96 時間後において有意に抑制した (Fig. 5A)。一方、ナファモスタット 3 mg/kg の併用は MTX 投与による体重減少に影響を与えなかった (Fig. 5B)。ナファモスタット 10 mg/kg の併用は MTX 投与による体重減少を初回投与 96 時間後において MTX 単独投与と比較して、さらに有意に減少させた (Fig. 5C)。

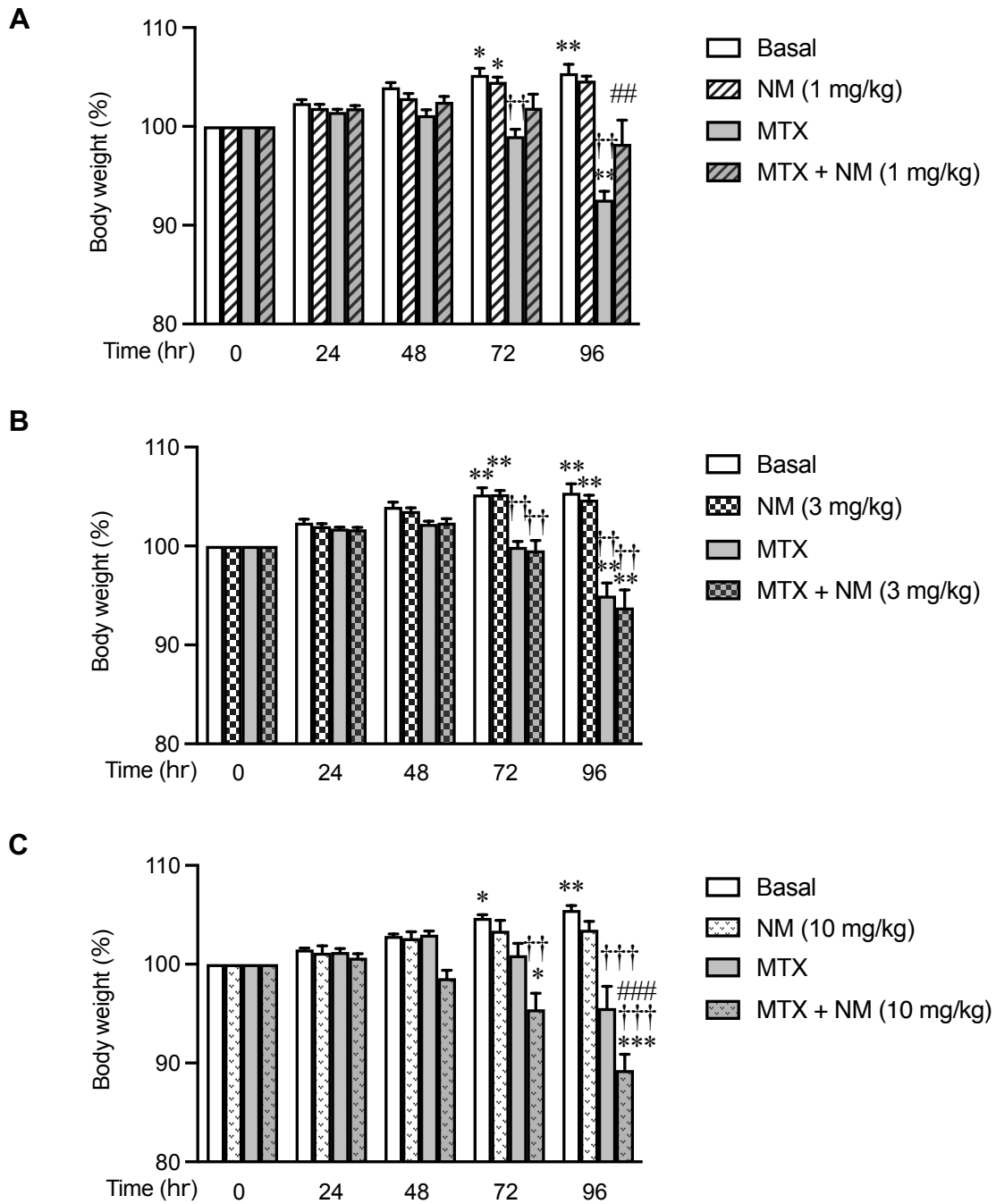


Fig. 5. Effects of Nafamostat Mesilate on the MTX-induced in Body Weight Change in Rats.

A: 1 mg/kg nafamostat administration group. B: 3 mg/kg nafamostat administration group. C: 10 mg/kg nafamostat administration group. 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 = 8–10 for A; 10 for B; 6 for C). * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 versus time 0 h; †† p < 0.01, ††† p < 0.001 versus basal; ### p < 0.01, #### p < 0.001 versus MTX. NM: nafamostat mesilate.

第2項 MTX 投与によるラット小腸組織障害に及ぼすナファモスタットの影響

第1項の検討において、MTX 投与による体重減少に及ぼす各濃度のナファモスタットの影響が、初回投与 96 時間後で明確に異なっていたことから、以降の小腸組織を用いた検討は全て薬物初回投与 96 時間後で行った。

MTX 投与によるラット小腸組織障害に及ぼすナファモスタットの影響を HE 染色にて検討した。ナファモスタット 1 mg/kg 単独投与は小腸組織に著明な影響を与えなかった一方、MTX 単独投与は小腸上皮細胞の配列や陰窩部の乱れなどを引き起こし、著明な組織障害が認められた (Fig. 6A)。ナファモスタット 1 mg/kg を MTX に併用投与すると著明な組織障害は認められなかった (Fig. 6A)。ナファモスタット 3 mg/kg および 10 mg/kg 単独投与は小腸組織に著明な影響を与えなかった (Fig. 6B and C)。また、ナファモスタット 3 mg/kg および 10 mg/kg を MTX に併用しても MTX 投与による小腸組織障害に大きな影響はみられなかった (Fig. 6B and C)。

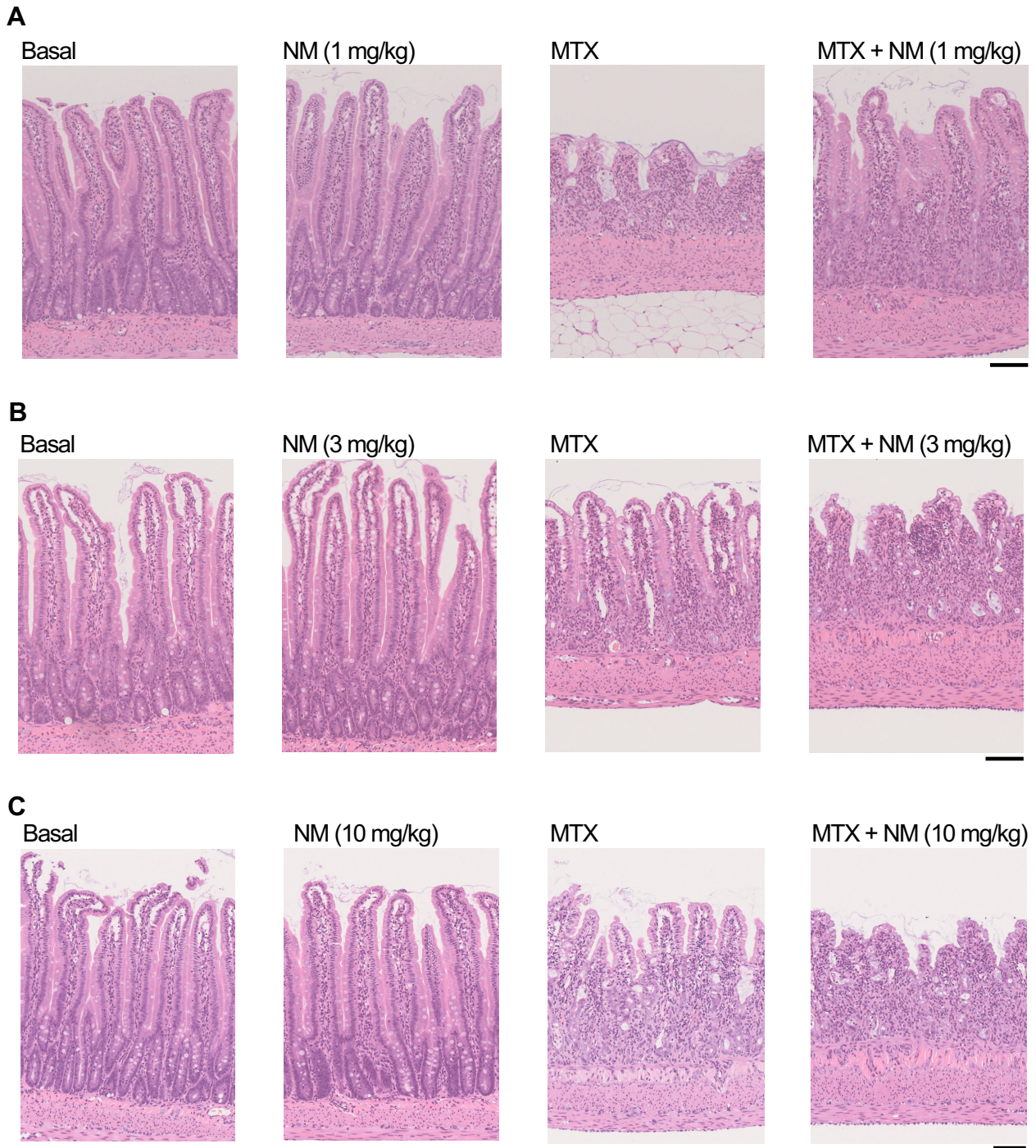


Fig. 6. Hematoxylin & Eosin-stained Sections from Rat Jejunal Mucosa

A: 1 mg/kg nafamostat administration group. B: 3 mg/kg nafamostat administration group. C: 10 mg/kg nafamostat administration group. Jejunal tissue were dissected and fixed with 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin. Scale bar = 100 mm. NM: nafamostat mesilate.

次に、HE染色像を用いてMTX投与による絨毛長短縮に及ぼすナファモスタットの影響を検討した。MTXによる絨毛腸短縮は、ナファモスタット 1 mg/kg 併用により有意に抑制された (Fig. 7A)。一方、ナファモスタット 3 および 10 mg/kg の併用は MTX による絨毛長短縮に影響を与えなかった (Fig. 7B and C)。

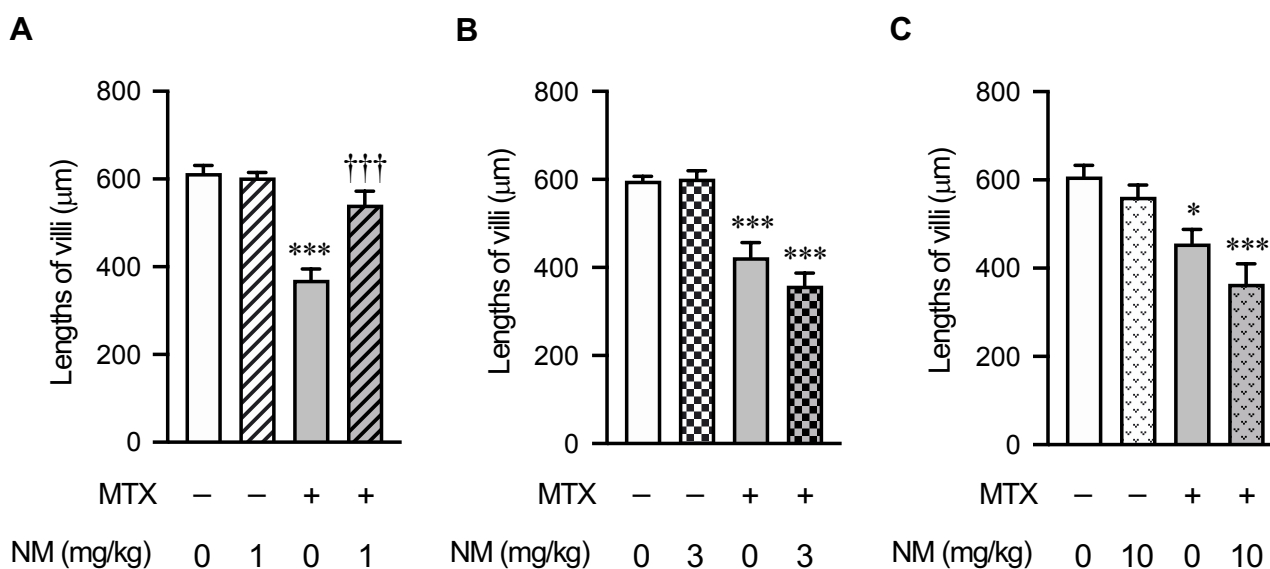


Fig. 7. Effects of MTX and Nafamostat on Lengths of Villi

A: 1 mg/kg nafamostat administration group. B: 3 mg/kg nafamostat administration group. C: 10 mg/kg nafamostat administration group. Each column represents the mean \pm S.E. ($n = 8-9$ for A; 8 for B; 6 for C). * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ versus basal; ††† $p < 0.001$ versus MTX. NM: nafamostat mesilate.

次に HE 染色による MTX およびナファモスタット投与による小腸組織の炎症反応の程度をスコア化した。Table 3 には各薬物投与群の炎症スコアの中央値 (Median) およびスコアの範囲 (Range) を示した。炎症スコアは MTX 投与より有意に上昇した (Table 3)。ナファモスタット 1 mg/kg および 3 mg/kg 単独投与は炎症スコアに影響を与えなかった (Table 3)。ナファモスタット 1 mg/kg を MTX に併用すると MTX 単独投与で認められるような有意な炎症スコアの上昇を認めなかった (Table 3)。一方、ナファモスタット 3 mg/kg は MTX 投与による炎症スコアの上昇に影響を与えなかった (Table 3)。

Table 3. Effects of MTX and Nafamostat on Histopathological Score of Damage to Rat Jejunal Tissue

Group	Median	Range
NM 1 mg/kg administration		
Basal	0	0-0
NM	0	0-0
MTX	12	9-16***
MTX + NM	2	0-9
NM 3 mg/kg administration		
Basal	0	0-0
NM	0	0-0
MTX	12	9-20*
MTX + NM	16	9-20**

A: 1 mg/kg nafamostat administration group. B: 3 mg/kg nafamostat administration group. Mean \pm S.E. (n = 7-9 for A; 4-7 for B). * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 versus basal. NM: nafamostat mesilate.

第3項 MTX 投与による小腸 MPO 発現増加に及ぼすナファモスタットの影響

さらに、好中球に豊富に発現し炎症反応の指標として用いられる MPO 発現に及ぼす MTX およびナファモスタット 1 mg/kg の影響を検討した。Fig. 8B には Fig. 8A の点線で囲まれた部分の拡大図を示している。また、Fig. 9 には一定の範囲内の MPO 発現面積を示している。ナファモスタット 1 mg/kg は MTX 投与による MPO 発現増加を有意に抑制した (Fig. 8 and 9)。

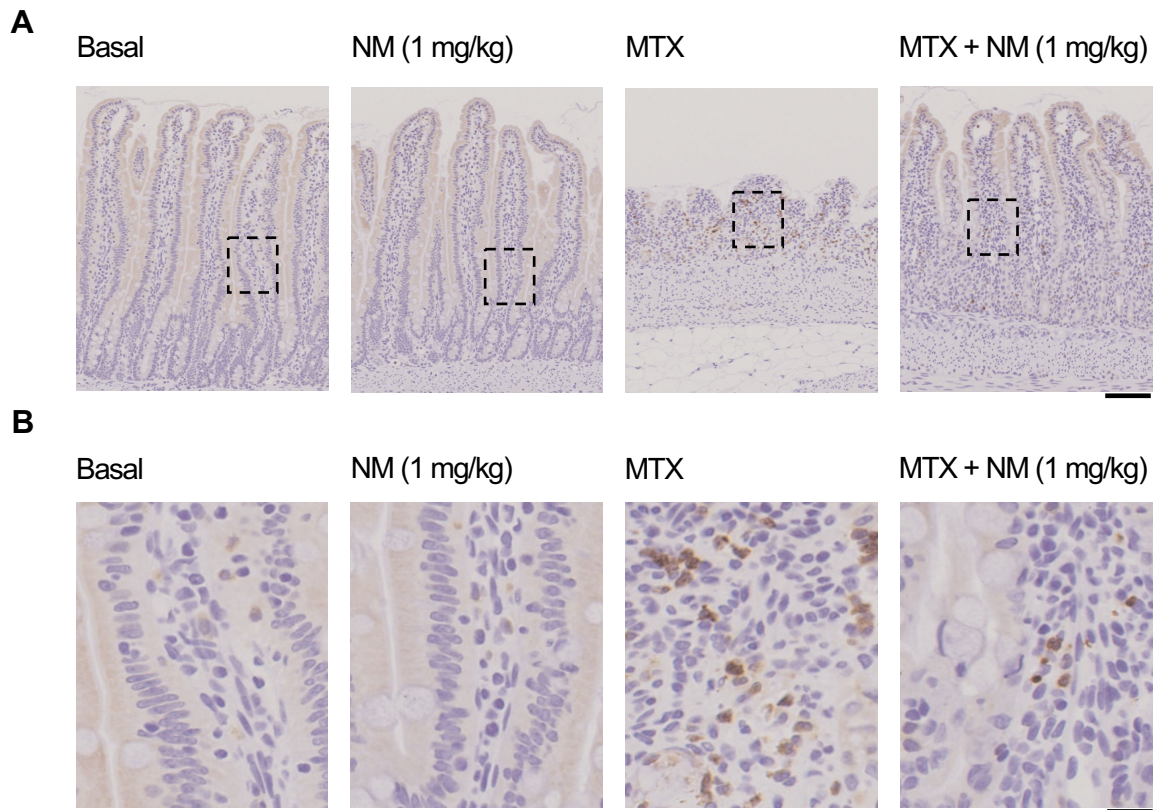


Fig. 8. Effects of MTX and Nafamostat on MPO Expression in Jejunal Tissue

A: Jejunal 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.

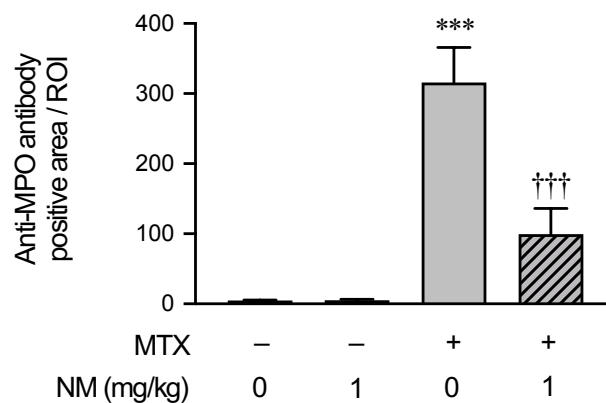


Fig. 9. Effects of MTX and Nafamostat on Number of Anti-MPO Antibody Positive Area in Rat Jejunal Tissue

Each column represents the mean \pm S.E. (n = 6–9). *** p < 0.001 versus basal; ††† p < 0.001 versus MTX. NM: nafamostat mesilate.

第4項 MTX 投与による炎症性サイトカイン mRNA 発現増加に及ぼすナファモスタットの影響

ここまでの検討で、ナファモスタットは 1 mg/kg の投与量において MTX 投与によるラット小腸組織障害および MPO 発現増加を抑制することが明らかとなった。そこで、次に MTX 投与による炎症性サイトカイン mRNA 発現増加に及ぼすナファモスタットの影響を検討した。

まず、IL-1 β mRNA 発現に及ぼす MTX およびナファモスタットの影響を検討した。ナファモスタット 1 mg/kg は MTX 投与による IL-1 β mRNA 発現増加を有意に抑制した (Fig. 10A)。ナファモスタット 3 mg/kg および 10 mg/kg は MTX 投与による IL-1 β mRNA 発現増加に有意な影響を与えなかった (Fig. 10B and C)。

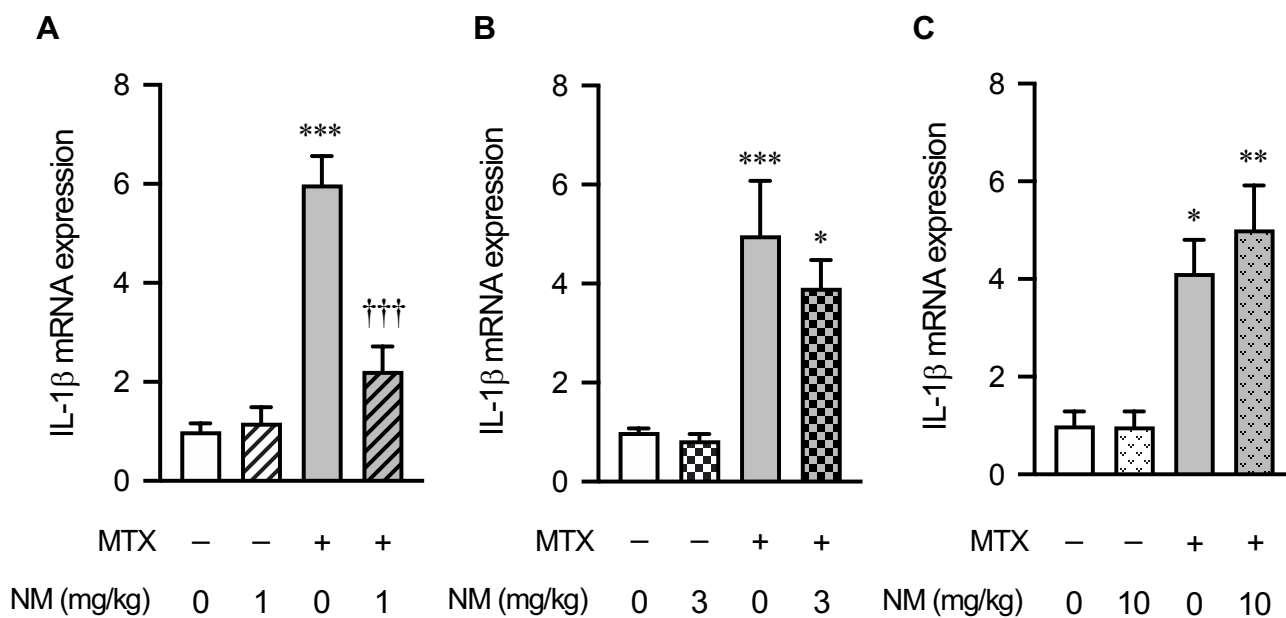


Fig. 10. Effects of MTX and Nafamostat on IL-1 β mRNA Expression in Rat Jejunal Tissue

A: 1 mg/kg nafamostat administration group. B: 3 mg/kg nafamostat administration group. C: 10 mg/kg nafamostat administration group. Each column represents the mean \pm S.E. (n = 6–8 for A; 9 for B; 5 for C). * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 versus basal; ††† p < 0.001 versus MTX. NM: nafamostat mesilate.

次に、TNF- α mRNA 発現に及ぼす MTX 投与およびナファモスタットの影響を検討した。ナファモスタット 1 mg/kg は MTX 投与による TNF- α mRNA 発現増加を有意に抑制した (Fig. 11A)。ナファモスタット 3 mg/kg は MTX 投与による TNF- α mRNA 発現増加に有意な影響を与えず (Fig. 11B)，ナファモスタット 10 mg/kg は MTX 投与による TNF- α mRNA 発現増加をさらに有意に増加させた (Fig. 11C)。

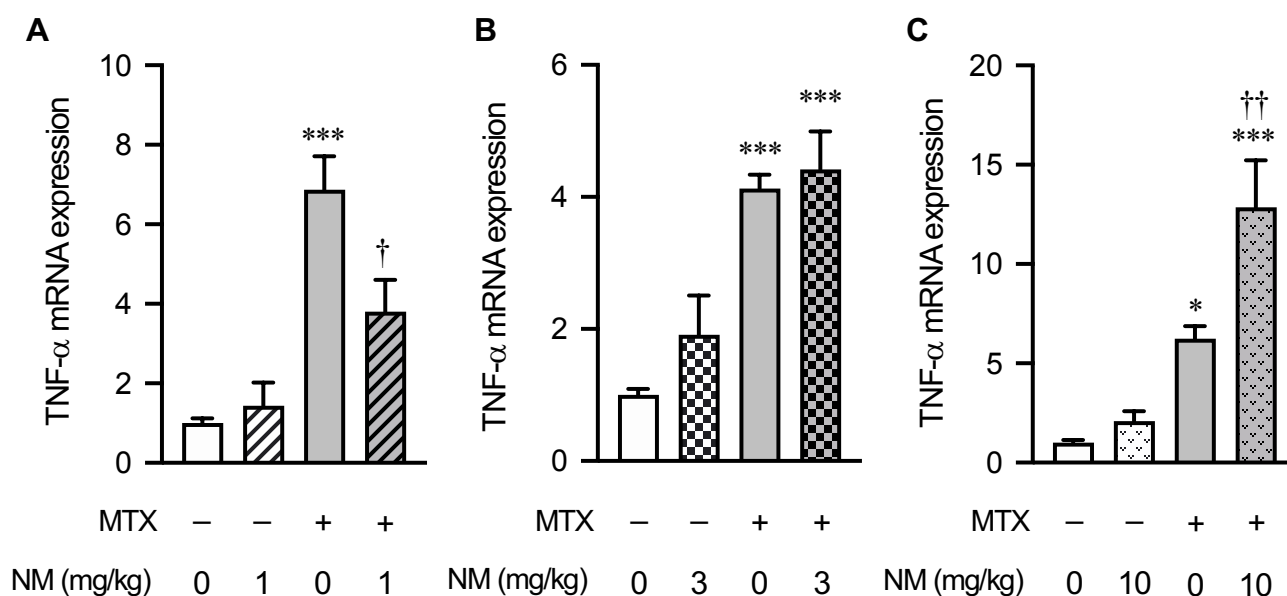


Fig. 11. Effects of MTX and Nafamostat on TNF- α mRNA Expression in Rat Jejunal Tissue

A: 1 mg/kg nafamostat administration group. B: 3 mg/kg nafamostat administration group. C: 10 mg/kg nafamostat administration group. Each column represents the mean \pm S.E. ($n = 6-8$ for A; 6 for B and C). * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ versus basal; † $p < 0.05$ ††† $p < 0.001$ versus MTX. NM: nafamostat mesilate.

次に、IL-6 mRNA 発現に及ぼす MTX およびナファモスタットの影響を検討した。ナファモスタット 1 mg/kg は MTX 投与による IL-6 mRNA 発現増加を有意に抑制した (Fig. 12A)。一方、ナファモスタット 3 mg/kg および 10 mg/kg は MTX 投与による IL-6 mRNA 発現増加に有意な影響を与えなかった (Fig. 12B and C)。

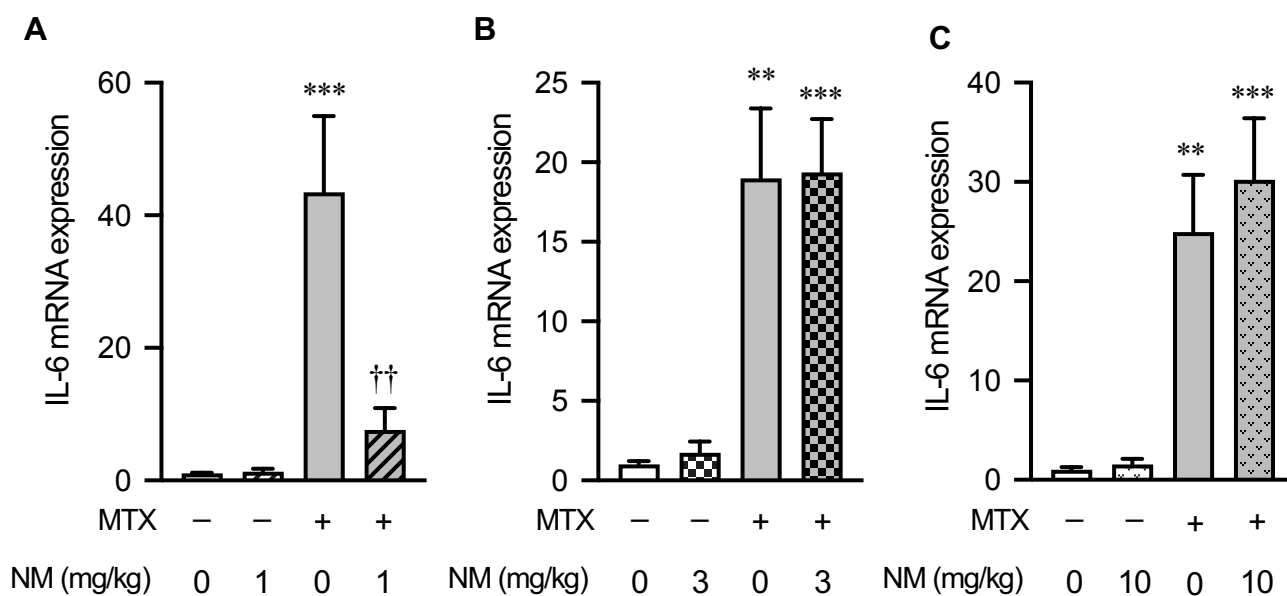


Fig. 12. Effects of MTX and Nafamostat on IL-6 mRNA Expression in Rat Jejunal Tissue

A: 1 mg/kg nafamostat administration group. B: 3 mg/kg nafamostat administration group. C: 10 mg/kg nafamostat administration group. Each column represents the mean \pm S.E. ($n = 6-8$ for A; 6 for B and C). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus basal; †† $p < 0.01$ versus MTX. NM: nafamostat mesilate.

第5項 MTX 投与による COX-2 発現増加に及ぼすナファモスタットの影響

次に炎症反応により誘導される COX-2 発現に及ぼす MTX 投与およびナファモスタットの影響について検討した。ナファモスタット 1 mg/kg は MTX 投与による COX-2 mRNA 発現増加を有意に抑制した (Fig. 13A)。一方, ナファモスタット 3 mg/kg および 10 mg/kg は MTX 投与による COX-2 mRNA 発現増加に有意な影響を与えなかった (Fig. 13B and C)。

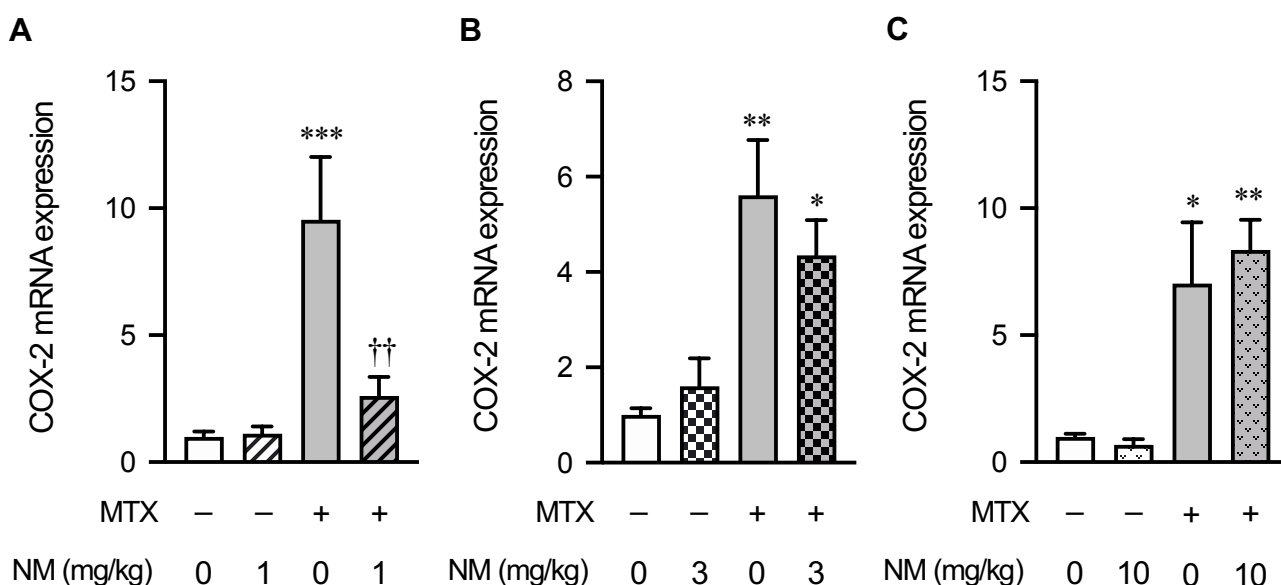


Fig. 13. Effects of MTX and Nafamostat on COX-2 mRNA Expression in Rat Jejunal Tissue

A: 1 mg/kg nafamostat administration group. B: 3 mg/kg nafamostat administration group. C: 10 mg/kg nafamostat administration group. Each column represents the mean \pm S.E. ($n = 6-8$ for A; 7 for B; 6 for C). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus basal; †† $p < 0.01$ versus MTX. NM: nafamostat mesilate.

次に、COX-2 タンパク質発現に及ぼす MTX 投与およびナファモスタットの影響を検討した。ナファモスタット 1 mg/kg は MTX 投与による COX-2 タンパク質発現増加を抑制する傾向を示した (Fig. 14A)。一方、ナファモスタット 3 mg/kg および 10 mg/kg は MTX 投与による COX-2 タンパク質発現増加に有意な影響を与えなかった (Fig. 14B and C)。

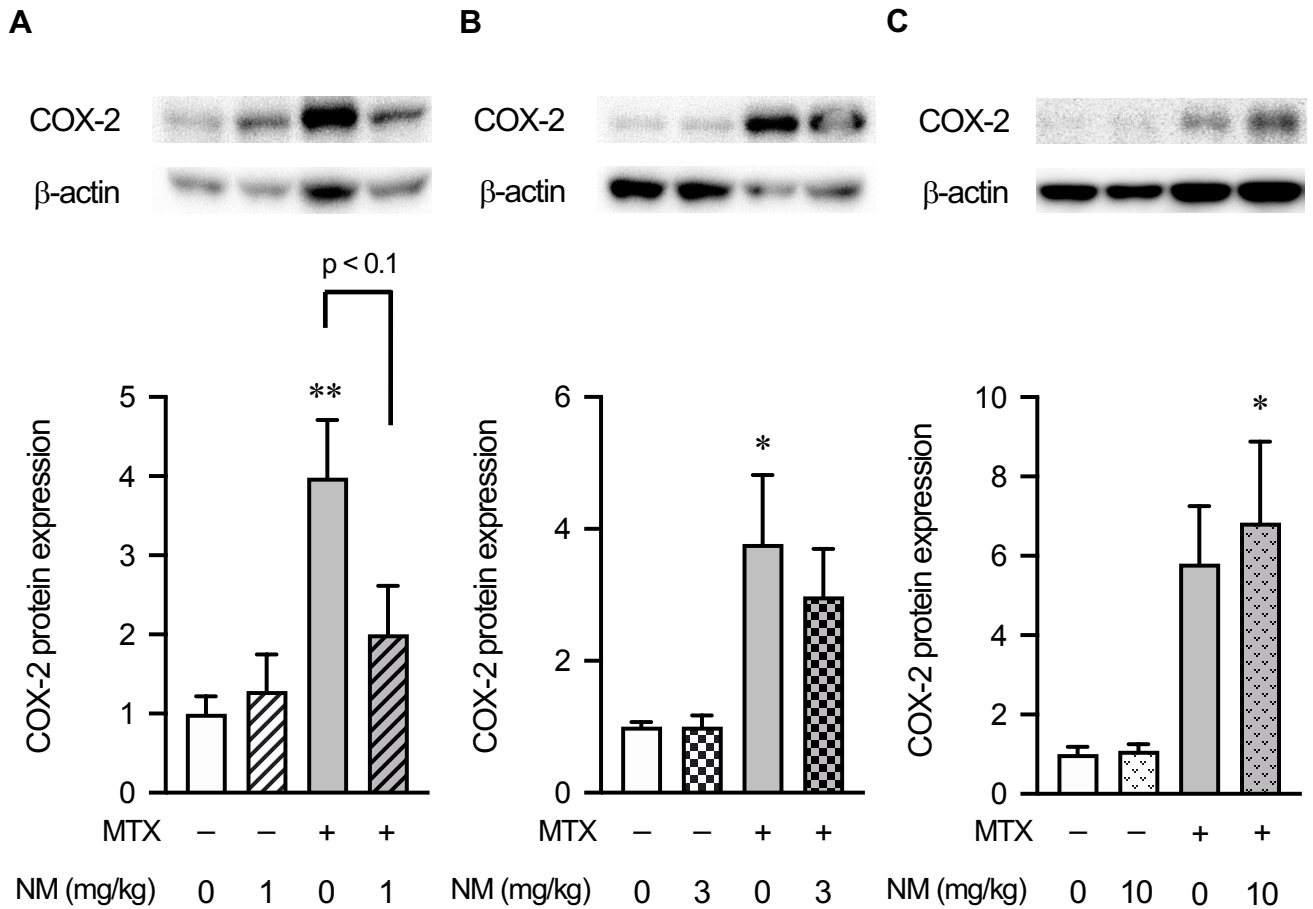


Fig. 14. Effects of MTX and Nafamostat on COX-2 Protein Expression in Rat Jejunum Tissue

A: 1 mg/kg nafamostat administration group. B: 3 mg/kg nafamostat administration group. C: 10 mg/kg nafamostat administration group. Each column represents the mean \pm S.E. ($n = 7-10$ for A; 7 for B; 6 for C). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus basal. NM: nafamostat mesilate.

第6項 MTX 投与による摂餌量減少および飲水量減少に及ぼすナファモスタットの影響

ここまでの検討により、ナファモスタット 1 mg/kg は MTX 投与による体重減少および小腸組織障害、炎症反応を抑制し、ナファモスタット 3 mg/kg および 10 mg/kg はこれらに著明な影響を与えないことが明らかとなった。そこで次に MTX 投与による摂餌量減少および飲水量減少に及ぼすナファモスタット 1 mg/kg および 3 mg/kg の影響について検討した。

まず、MTX 投与による摂餌量減少に及ぼすナファモスタットの影響を検討した。MTX 単独投与は時間依存的に摂餌量を減少させた (Fig. 15A and B)。ナファモスタット 1 mg/kg は MTX 投与による摂餌量減少を初回投与 96 時間後において有意に抑制した (Fig. 15A)。一方、ナファモスタット 3 mg/kg は MTX 投与による摂餌量減少に影響を与えなかった (Fig. 15B)。

次に、MTX 投与による飲水量減少に及ぼすナファモスタットの影響を検討した。MTX 単独投与は時間依存的に飲水量を減少させた (Fig. 16A and B)。ナファモスタット 1 mg/kg は MTX 投与による飲水量減少を初回投与 96 時間後において有意に抑制した (Fig. 16A)。一方、ナファモスタット 3 mg/kg は MTX 投与による飲水量減少に影響を与えなかった (Fig. 16B)。

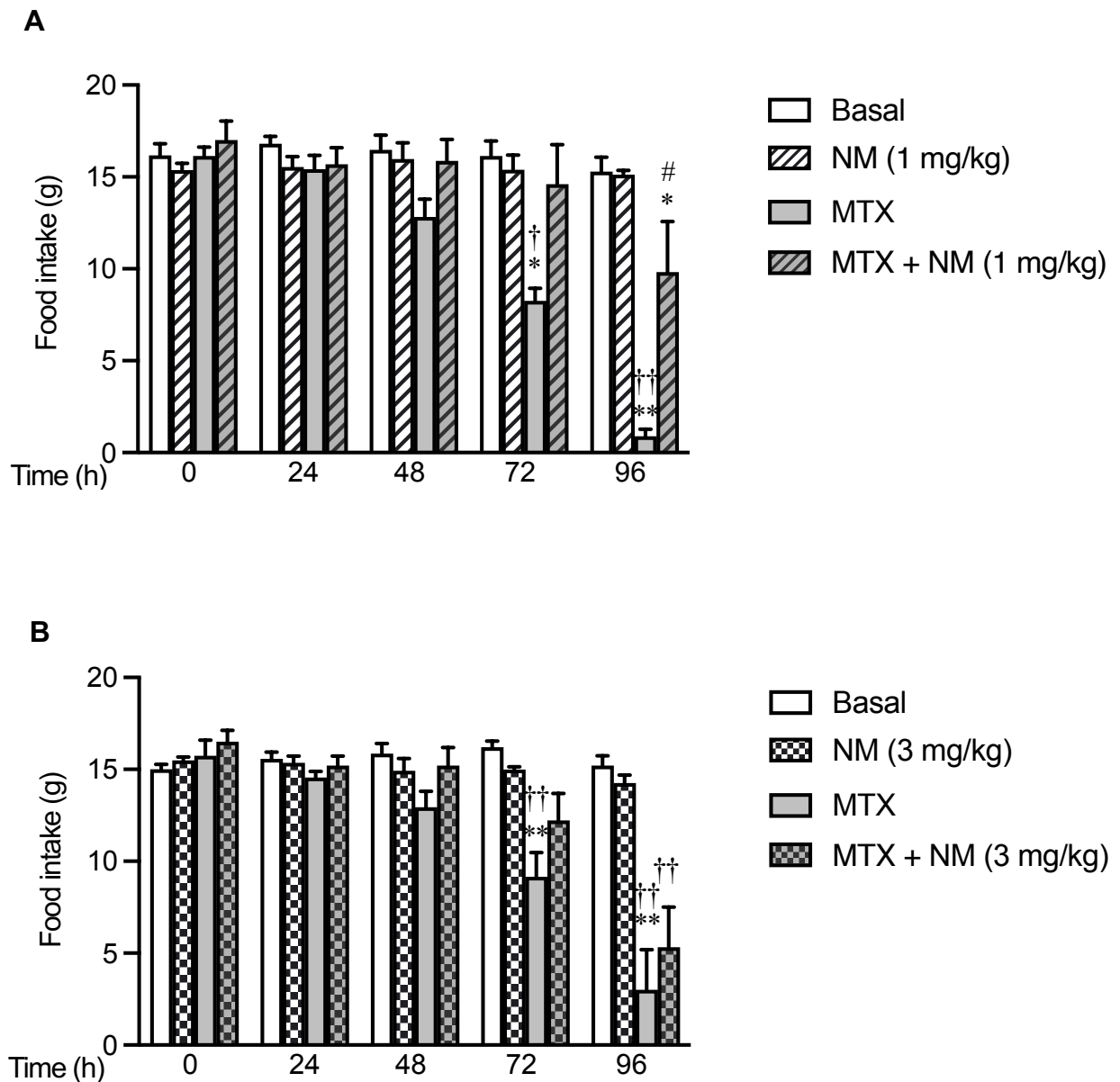


Fig. 15. Effects of Nafamostat on the MTX-induced Change in Food Intake in Rats.

A: 1 mg/kg nafamostat administration group. B: 3 mg/kg nafamostat administration group. 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 = 4). * p < 0.05, ** p < 0.01, versus time 0 h; † p < 0.05, †† p < 0.01 versus basal; # p < 0.05 versus MTX. NM: nafamostat mesilate.

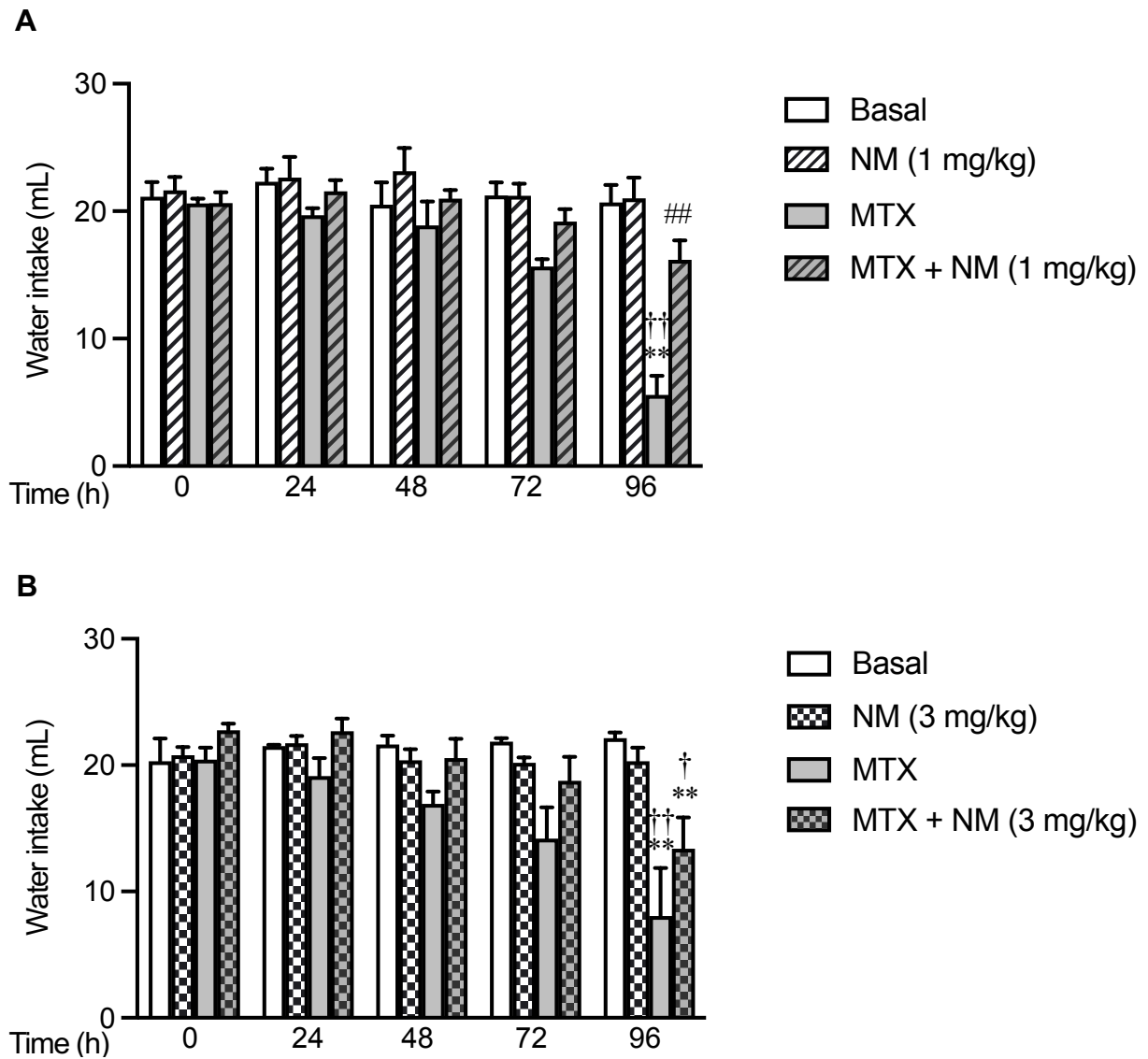


Fig. 16. Effects of Nafamostat on the MTX-induced Change in Water Intake in Rats.

A: 1 mg/kg nafamostat administration group. B: 3 mg/kg nafamostat administration group. 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 = 4). ** p < 0.01, versus time 0 h; † p < 0.05, †† p < 0.01 versus basal; ### p < 0.01 versus MTX. NM: nafamostat mesilate.

第4節 考察

本章では、まず MTX 投与によるラット体重減少に及ぼすナファモスタットの影響を検討した。結果にも示したように、Shiga らの報告⁴³⁾と一致して MTX は時間依存的に体重を減少させ、ナファモスタット 1 mg/kg はこれを有意に抑制した。一方、ナファモスタット 3 mg/kg は MTX 投与による体重減少に影響を与えず、10 mg/kg は体重減少をさらに亢進した。さらに、ナファモスタット 1 mg/kg は MTX 投与による摂餌量および飲水量減少を有意に抑制し、ナファモスタット 3 mg/kg はこれらに影響を与えなかった。また、MTX 投与によって惹起された小腸組織障害および炎症反応もナファモスタット 1 mg/kg を併用すると認められないことが明らかとなった。ラットにおけるナファモスタット 1 mg/kg は体表面積に基づいて設定されたヒトの急性膵炎治療に用いられる用量に相当する。具体的には急性膵炎に用いられる最小用量の 10 mg/day は体重 60 kg のヒトにおいて 0.16 mg/kg であり、これはラットでは 0.99 mg/kg に相当する。⁵¹⁾ ナファモスタットが低用量において MTX 投与により惹起される体重減少や消化管障害を抑制した理由として、ナファモスタットはより低用量で用いることでプロテアーゼの中でもより選択的にトリプターゼを阻害すること⁵²⁾が関係している可能性が考えられた。本研究と同様に Ceuleers ともナファモスタットを低用量で用いることで、内臓過敏症に対する抑制効果が現れることを報告している。¹⁸⁾ 彼らは、TNBS 投与 IBS モデルラット結腸にバルーンを用いて拡張圧をかけ、内臓過敏症に対するナファモスタットの影響を検討した。その結果、0.01 から 1 mg/kg の用量のナファモスタットは、IBS による内臓過敏症を軽減する一方、10 mg/kg においては影響を及ぼさないことを報告している。¹⁸⁾

MTX 投与によるラット体重減少の主要な原因として MTX による小腸組織障害と関連していることが示唆されている。^{43,53)} 細胞障害性抗がん薬は消化管の形成に大きな影響を及ぼす。具体的には細胞障害性抗がん薬は、絨毛長の短縮、絨毛の融合、消化管の粘膜上皮細胞の過形成およびアポトーシスの亢進を引き起こし、消化管の中でも特に小腸がその影響を受けやすい。⁵⁴⁾ また MTX および MTX-PG は、口腔や消化管上皮細胞に対しての感受性が骨髄よりも高く、消化管上皮細胞に蓄積するため MTX による影響も持続する。¹⁰⁾ Kolli らはラットに MTX 7 mg/kg を 3 日連続で腹腔内投与すると最終投与から 12 時間および 24 時後に有意な体重減少が現れるとともに、小腸組織障害が認められることを報告している。⁹⁾ また、ラットに MTX 2.5 mg/kg を 3 日連続皮下投与すると、MTX 初回投与から時間依存的に体重および摂餌量が減少し、これが小腸組織障害の程度と相関があることも報告されている。⁵⁵⁾

本研究においてラットへのナファモスタット 1 mg/kg 投与は、MTX による誘発された絨毛長短縮、小腸組織障害スコア上昇、炎症性サイトカイン mRNA 発現増加および COX-2 発現増加を著明に抑制した。これまでにナファモスタットは、ラットへの TNBS 経肛門的投与により誘発した炎症性腸疾患 (inflammatory bowel disease: IBD) モデルの大腸 HE 染色像の悪化や大腸ダメージスコアの上昇、体重減少、大腸 MPO 活性の上昇および TNF- α mRNA 発現増加を有意に抑制することが報告されている。¹⁷⁾ さらにナファモスタットは、DSS により誘発した UC モデルマウスの体重減少や大腸 MPO 活性の上昇、大腸組織中の TNF- α 発現量増加、COX-2 タンパク質量発現増加、さらに大腸組織におけるマスト細胞の浸潤を有意に抑制する。⁴⁴⁾ 従って本研究によりナファモスタットは、IBS モデルおよび UC モデルに対してのみならず抗がん薬投与による消化管障害に対しても有効であることが明らかになった。序論で述べたように IBS モデルおよび UC モデルに対してのナファモスタットによる有効性にトリプターゼ阻害による PAR-2 阻害作用が関連していることが示唆されているが、^{17,44)} 本研究において明らかになった抗がん薬誘起性消化管障害に対しての有用性にも同様の機序が関与していることが考えられた。

消化管における COX-2 mRNA およびタンパク質発現の増加は、大腸壊死および実験的大腸炎モデルラットや、^{44,56)} シスプラチンを投与したラット小腸で確認されており、^{21,23)} 本研究の結果についても MTX 投与による小腸に対する炎症反応によりこれらが上昇したと考えられる。また、興味深いことに Takano らは、ラットに MTX 50 mg/kg を単回腹腔内投与しても COX-2 mRNA および COX-2 タンパク質発現に変化が認められず、また小腸組織障害は軽度であることを示し、²²⁾ さらに Shiga らは MTX 50 mg/kg をラットに単回腹腔内投与した場合、小腸組織において、炎症スコアの上昇や絨毛長の短縮、陰窩部の乱れはないと報告している。⁴³⁾ このことから COX-2 発現には腸粘膜障害の程度が深く関わっていると推察できる。ヒト胎児包皮線維芽細胞において、トリプターゼによって活性化された PAR-2 は COX-2 発現を誘導することが報告されている。⁵⁷⁾ 従って、本研究で認められた MTX 投与による COX-2 発現誘導は PAR-2 活性化による可能性があり、ナファモスタットによる小腸組織障害改善作用の機序の一つとして COX-2 発現抑制作用が関与していることが考えられた。興味深いことにラットへの PAR-2 アンタゴニストの腹腔内投与は、インドメタシンを経口投与したラット回腸において誘起された粘膜障害および MPO 発現増加を抑制する。⁵⁸⁾ インドメタシンは恒常的に発現している COX-1 および炎症刺激などで誘導される COX-2 をともに阻害する。従って、本研究における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には COX-2 発現抑制作用を介した機序のみならず、COX 非依存的な経路も抑制する機序も関与していることが考えられた。

前述したようにナファモスタットによって阻害されるセリンプロテアーゼには補体 C1r および C1s が含まれる。補体古典経路において C1r および C1s の下流には C5a がある。C5a 受容体はトリプターゼを含有するマスト細胞膜上に存在し、脱顆粒に関与する。従って、ナファモスタットは、C1r および C1s を抑制することにより結果的に C5a を減少させ、このことも MTX 誘起性小腸組織障害を抑制する機序であると考えられる。実際、TNBS 投与大腸炎モデルマウスを用いた研究において、抗 C5a 抗体の投与は大腸の炎症スコアの上昇や炎症性サイトカインの産生を抑制する。⁵⁹⁾

一方で、ナファモスタット 10 mg/kg は MTX による体重減少および小腸 TNF- α mRNA 発現増加をさらに亢進させた。ナファモスタット 10 mg/kg は臨床で DIC 治療に用いられる用量に相当する。⁵¹⁾ 前述したとおりナファモスタットは低用量で用いることで強力かつ選択的なトリプターゼ活性阻害作用を発揮する。⁵²⁾ 一方で、高用量では阻害されるセリンプロテアーゼがより広範になり、トリプターゼ阻害活性はむしろ弱まる。このことから高用量のナファモスタットを用いることで生体内プロテアーゼプロファイルが変化することが示唆されている。¹⁸⁾ ナファモスタットはまた、強力なジアミンオキシダーゼ阻害作用も有する。⁶⁰⁾ ジアミンオキシダーゼはヒスタミンを代謝し、実際 IBD 患者では尿中 N-メチルヒスタミン排泄量が増えることが報告されている。⁶¹⁾ さらに、オキサゾロン誘発大腸炎モデルマウスを用いた研究では、ヒスタミン受容体をノックアウトすることで、野生型マウスでみられる体重減少、大腸粘膜障害スコアの上昇、大腸粘膜の MPO 発現および炎症性サイトカイン発現が抑制されることが報告されている。⁶²⁾ 従って、ナファモスタット 10 mg/kg はトリプターゼへの選択性が低くなることに加えて、ジアミンオキシダーゼ阻害が強まり、これによるヒスタミンの増加が MTX による消化管症状をさらに悪化させる要因の一つである可能性もある。

以上、本章では MTX 投与によるラット小腸組織障害および炎症反応に及ぼすナファモスタットの影響を検討し、その結果、低用量のナファモスタットは MTX 誘起性小腸組織障害を抑制すること、さらに MTX 投与による体重減少、摂餌量および飲水量減少も抑制することを明らかにした。また、ナファモスタットが低用量においてのみ効果を示したことから、本抑制作用機序にトリプターゼ阻害による PAR-2 活性化の阻害が関与することが示唆された。

第2章 MTX投与によるラット小腸5-HTおよびサブスタンスP合成系亢進に及ぼす ナファモスタットの影響

第1節 緒言

細胞障害性抗がん薬の代表的な副作用である嘔気・嘔吐の機序には EC 細胞から遊離される 5-HT が主たる要因の一つとして関与している。⁶³⁾ また 5-HT は嘔気・嘔吐以外の消化器疾患にも関与し、実際、感染後 IBS や IBD などにおいて EC 細胞の過形成や腸粘膜の 5-HT 含量増加が認められている。⁶⁴⁻⁶⁸⁾ 5-HT は、EC 細胞内にて 5-HT 合成経路の律速酵素であるトリプトファン水酸化酵素 (tryptophan hydroxylase: TPH) により生合成される。具体的には、5-HT は TPH により 5-ヒドロキシトリプトファン (5-hydroxytryptophan: 5-HTP) に変換され、これが芳香族 L-アミノ酸脱炭酸酵素により 5-HT に変換される (Fig. 17)。⁶⁹⁾

また細胞外に遊離した 5-HT はモノアミン酸化酵素 (monoamine oxidase: MAO) により 5-ヒドロキシインドール-3-アセトアルデヒドへ代謝され、これがアルデヒド脱水素酵素によって最終代謝物である 5-ヒドロキシインドール酢酸 (5-hydroxyindolactic acid: 5-HIAA) へ代謝される (Fig. 17)。

また抗がん薬誘起性悪心・嘔吐にはサブスタンス P も関与している。サブスタンス P による悪心・嘔吐発現の主な作用点は、第四脳室付近に存在する化学受容器引金帯や延髄の嘔吐中枢であるとされているが、サブスタンス P は TPH とともに EC 細胞にも局在している。^{20,70)} これまでに動物実験において、MTX を含む多くの細胞障害性抗がん薬が EC 細胞を過増殖させ小腸 5-HT 合成系を亢進させるとともにサブスタンス P 発現も増加させることが報告されている。²⁰⁻²⁶⁾ また Machida らは、本研究と同様の MTX 投与条件において、ラット小腸の 5-HT およびサブスタンス P 合成が亢進することを報告している。²⁵⁾

一方、Kikuchi らは、MTX 投与ラットから摘出した小腸からの 5-HT 遊離は、ナファモスタット 1 mg/kg および 3 mg/kg 併用投与により抑制されること、さらにこの 5-HT 遊離抑制作用は、MTX 単独投与したラット小腸摘出後にナファモスタット 10^{-5} M を適用しても抑制されることを明らかにしている。¹⁹⁾ しかし、ナファモスタットが抗がん薬による小腸 5-HT およびサブスタンス P 合成亢進に及ぼす影響については不明である。

そこで第2章では、MTX 投与によるラット小腸 5-HT およびサブスタンス P 合成系亢進に及ぼすナファモスタットの影響について検討した。

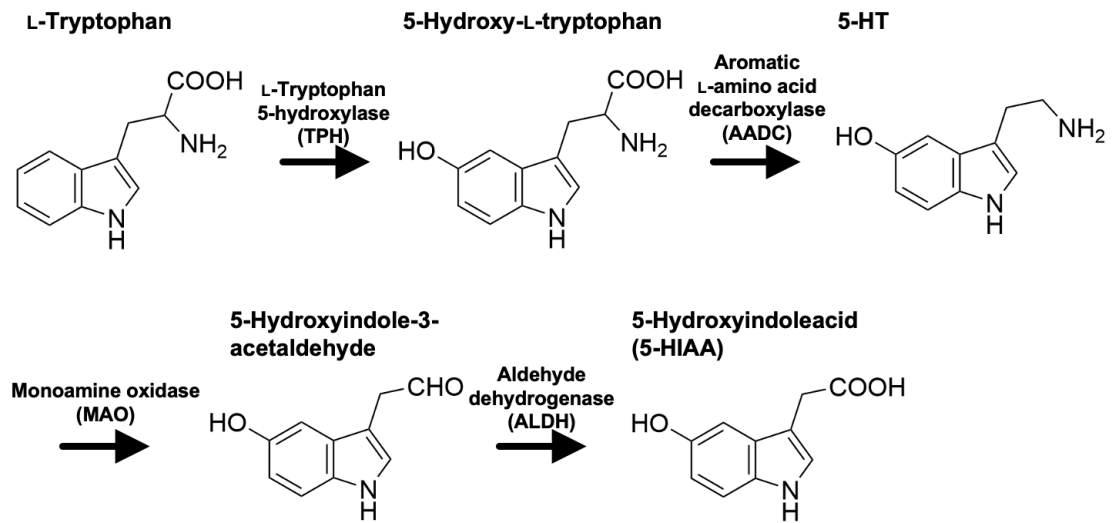


Fig. 17. 5-HT Synthesis and Metabolic Pathway

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

ヒツジ抗TPH抗体はMillipore Co. (MA, USA) より購入したものを使用した。なお、この他実験に使用した試薬は全て特級規格品または生化学用を富士フィルム和光純薬（大阪）のものを使用した。

3) 薬物投与プロトコール

第1章の第2節の3) に準じた。

4) 小腸組織の摘出

第1章第2節の5) に準じた。

5) パラフィン切片の作成

第1章2項の6) に準じた。

6) 5-HT および 5-HIAA 含量測定

4) にて摘出した空腸組織の重量を量り、1 mL の 0.2 M 過塩素酸および 100 μ M エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム塩 (ethylenediamine tetraacetic acid-2Na: EDTA-2Na) 中に浸し。内標準物質として 200 ng のイソプロテレノールを加え、バイオミキサー（日本精機製作所，東京）を用いてホモジナイズ（6,000 rpm, 30 秒, 氷冷下）した。ホモジネートをタンパク除去の目的で 30 分以上氷中に放置した。このホモジネートを遠心分離（15,000 \times g, 15 分間, 4 $^{\circ}$ C）し、上清を 600 μ L 回収し、1 M の酢酸ナトリウム 120 μ L を加え pH 3.0 に調整した。混和後、この試料 200 μ L を 0.45 μ m 遠心分離方式ディスパーザブル限外ろ過機（Centricut W-MO, 倉敷紡績, 東京）を用いて、遠心分離（5,000 \times g, 2 分間, 4 $^{\circ}$ C）し、ろ液をサンプルとした。ろ液中の 5-HT は、電気化学検出器付高速液体クロマトグラフィー（high performance liquid chromatograph-electron capture detector: HPLC-ECD）にオートインジェクターMODEL 234（GILSON 社）を用いて注入し

測定を行った。本 HPLC-ECD は電子検出器 (ECD-300, エイコム, 京都), カラム (EICOMPAK SC-5ODS 3.0 mmφ × 150 mm), プレカラム (PREPAK 4.0 mmφ × 5.0 mm) 送液ポンプ (EP-300), カラム恒温槽 (ATC-300), 脱気装置 (DG-300), データ処理装置 (EP-500) により構成されている。測定は全て流速 (0.5 mL/min), 移動相は 5 mg/L EDTA-2Na, 190 mg/L 1-オクタンスルホン酸ナトリウム, および 17% メタノールで構成されていた。ECD の酸化電位は ±750 mV に設定された。5-HT 含量および 5-HIAA 含量は内部標準法を用いてピークの高さから計算し, 腸管の重量で補正した。

7) タンパク定量

第1章第2節の12) に準じた。

8) TPH 活性測定

TPH 活性は Kuhn ら⁷¹⁾ の方法に従って測定した。4) にて摘出した空腸組織凍結切片の重量を量り, ホモジナイズ用試験管に 250 mM スクロース 1 mL および組織サンプルを入れ, テフロンホモジナイザーにて氷上でホモジナイズした (6,000rpm, 30 秒間)。試験管に組織ホモジネート 20 μL, 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) 750 μL, 4 mM dithiothreitol 50 μL, 2 mM 6-methyltetrahydropterin 50 μL, catalase 8,000 unit/30 μL を入れ, 8 mM L-tryptophane を 100 μL 加え, 攪拌し 37°C の温浴で 30 分反応させた。その後, 氷上で 0.2 M 過塩素酸 500 μL を加え反応を停止させ, 内標準物質 N-methylserotonin を添加し振って攪拌させ, 遠心分離した (4,300×g, 10 分間, 4°C)。上清 200 μL を 0.45 mm メンブランフィルターに移し替え遠心分離した (7,160×g, 2分間, 4°C)。ろ液中の産生された 5-HTP を ECD の酸化電位を ±700 mV に設定した HPLC-ECD にて測定した。移動相は, 4 mg/L EDTA-2Na, 0.65 mM 1-オクタンスルホン酸ナトリウム, および 15% メタノールで構成されるものを用いた。合成された 5-HTP 含量を 7) で測定した腸管タンパク質量で補正し, TPH 活性を求めた。

9) 抗 TPH 抗体を用いた免疫組織化学

5) にて作成した切片を, 脱パラフィンし水洗した。次に 95°C の抗原賦活化液 (pH 9) (Agilent, CA, USA) で 40 分間抗原賦活化処理し, 蒸留水で洗浄後, 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, TBS にて 2 回洗浄した。次に, 抗体の非特異的な結合を阻害するため 7% スキムミルクで 20 分間ブロッキング処理した。次に一次抗

体として Dako REAL 抗体希釈液 (Agilent) にて 250 倍に希釈した抗 TPH 抗体を 60 分間反応させた。未反応抗体は TBS にて洗浄した。ついで二次抗体として Dako REAL 抗体希釈液にて 300 倍に希釈したビオチン標識抗ヒツジ抗体を室温で 30 分間反応させ、未反応抗体を TBS で洗浄した。その後、ストレプトアビジンに 15 分間反応させ、未反応抗体を TBS で洗浄液にて洗浄した。次いで、DAB により発色後、TBS で洗浄した。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。なお, 本工程は株式会社モルフォテクノロジーに依頼し行われた。

10) 小腸組織からの total RNA の抽出

第 1 章第 2 節の 9) に準じた。

11) Real-time RT-PCR 法

第 1 章第 2 節の 10) に準じた。使用した TPH1 およびプレプロタキキニン-A (preprotachykinin-A: PPT-A) のプライマーを Table 4 に示した。GAPDH のプライマーは第 1 章第 2 節 10) の Table 2 に示してある。

Table 4. Primers for Real-time RT-PCR

product		Sequences (5' → 3')	Reference
TPH1	Forward	CAAGGAGAACAAAGACCATTC	22)
	Reserve	ATTCAGCTGTTCTCGGTTGATG	
PPT-A	Forward	ATTATTGGTCCGACTGGTCCG	72)
	Reserve	CCC GCT TGC CCA TTA	

12) MAO 活性

Krajl ら⁷³⁾ の方法に従って MAO 活性を, キヌラミンを基質として産生された 4-ヒドロキシキノリンを蛍光光度計 (SH9000 Lab, 日立製作所製) を用いて測定することで求めた。4) にて摘出した空腸組織凍結切片の重量を量り, これと 250 mM スクロース 1 mL をホモジナイズ用試験管に入れ, テフロンホモジナイザーにて氷上でホモジナイズした (6,000 rpm, 30 秒間)。

この組織ホモジネート 0.1 mL および 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) 0.6 mL, 1 mM キヌラミン 0.1 mL, 蒸留水 0.2 mL を混合し 37°C の恒温槽で 20 分間静置した。その後, 6% 過塩素酸 1.0 mL を加えることで反応を停止し, 遠心分離した (2,860 × g, 3 分間, 4°C)。上清 1 mL に 1 M 水酸化ナトリウム 2.0 mL を加え混和したものを励起波長 315 nm, 蛍光波長 380 nm で測定した。活性値は産生された 4-ヒドロキシキノリンを標準物質として作成した検量線から算出した。また MAO 活性は 7) で測定した腸管タンパク質量および恒温槽にて活性化させた 20 分で補正した。

13) 抗サブスタンス P 抗体を用いた免疫組織化学

5) にて作成した切片を, 脱パラフィンし水洗した。次に 95°C の抗原賦活化液 (pH 9) (Agilent) で 40 分間抗原賦活化処理し, 蒸留水で洗浄後, 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, TBS にて 2 回洗浄した。次に, 抗体の非特異的な結合を阻害するため 7% スキムミルクで 20 分間ブロッキング処理した。次に一次抗体として Dako REAL 抗体希釈液 (Agilent) にて 1,000 倍に希釈した抗サブスタンス P 抗体を 30 分間反応させた。未反応抗体を TBS にて洗浄後, 二次抗体である React with Histofine® Simple Stain Rat MAX PO (M) と室温で 30 分間反応させ, 未反応抗体を TBS で洗浄した。その後, DAB により発色後, TBS で洗浄した。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) を用いて封入した。なお, 本工程は株式会社モルフォテクノロジーに依頼し行われた。

14) 統計学的処理および検定方法

全ての測定値を平均 ± 標準誤差 (Mean ± S.E.) で示した。多重間の比較は一元配置分散分析 (ANOVA) の後に 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 MTX 投与によるラット小腸 5-HT 含量増加に及ぼすナファモスタットの影響

まず, MTX 投与によるラット小腸 5-HT 含量増加に及ぼすナファモスタットの影響を検討した. ナファモスタット単独投与はラット小腸 5-HT 含量に影響を与えなかった (Fig. 18). MTX 単独投与はラット小腸 5-HT 含量を有意に増加させた (Fig. 18). ナファモスタット 1 mg/kg は MTX 投与によるラット小腸 5-HT 含量増加を有意に抑制した (Fig. 18A). ナファモスタット 3 mg/kg および 10 mg/kg は MTX 投与によるラット小腸 5-HT 含量増加に有意な影響を与えなかった (Fig. 18B and C).

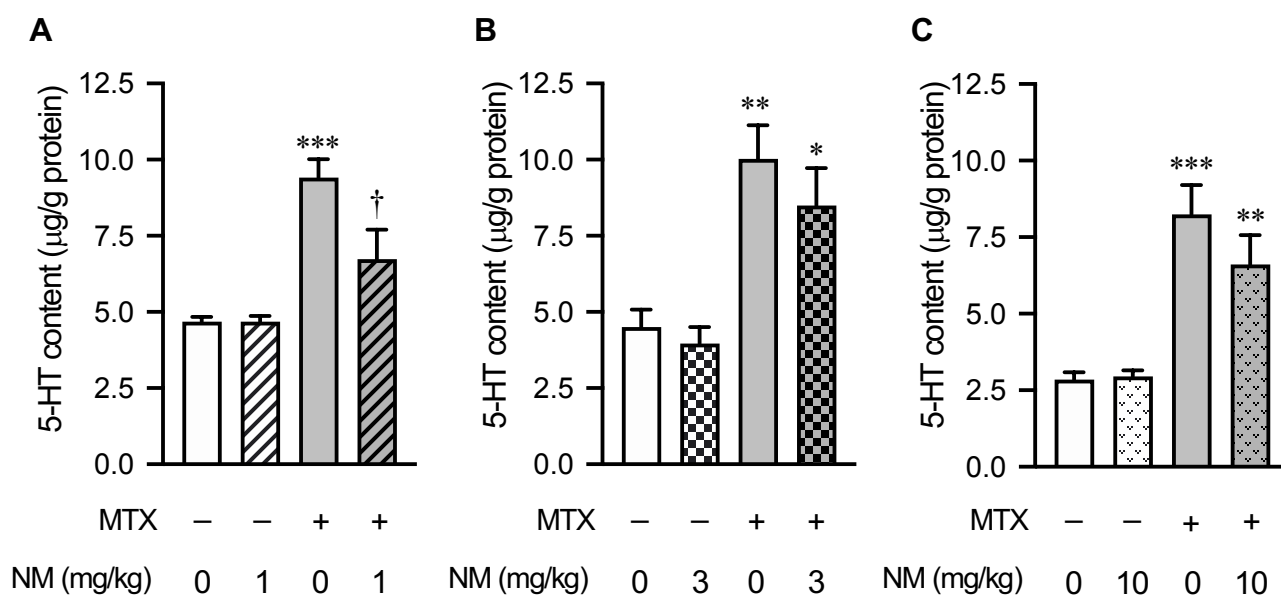


Fig. 18. Effects of MTX and Nafamostat on 5-HT Content in Rat Jejunal Tissue

A: 1 mg/kg nafamostat administration group. B: 3 mg/kg nafamostat administration group. C: 10 mg/kg nafamostat administration group. Each column represents the mean \pm S.E. ($n = 7-10$ for A and B; 6 for C). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus basal; † $p < 0.05$ versus MTX. NM: nafamostat mesilate.

第2項 MTX 投与による TPH 活性上昇に及ぼすナファモスタットの影響

ラットへの本実験条件と同一の MTX 投与は小腸において 5-HT 合成の律速酵素である TPH の活性を上昇させる。²⁵⁾ そこで次に MTX 投与による TPH 活性上昇に対するナファモスタットの影響を検討した。ナファモスタット単独投与は TPH 活性に影響を与えなかった (Fig. 19)。MTX 単独投与は TPH 活性を上昇させた (Fig. 19)。ナファモスタット 1 mg/kg は MTX 投与による TPH 活性上昇を有意に抑制した (Fig. 19A)。ナファモスタット 3 mg/kg は MTX 投与による TPH 活性上昇に有意な影響を与えなかった (Fig. 19B)。一方、ナファモスタット 10 mg/kg は MTX 投与による TPH 活性上昇を更に有意に上昇させた (Fig. 19C)。

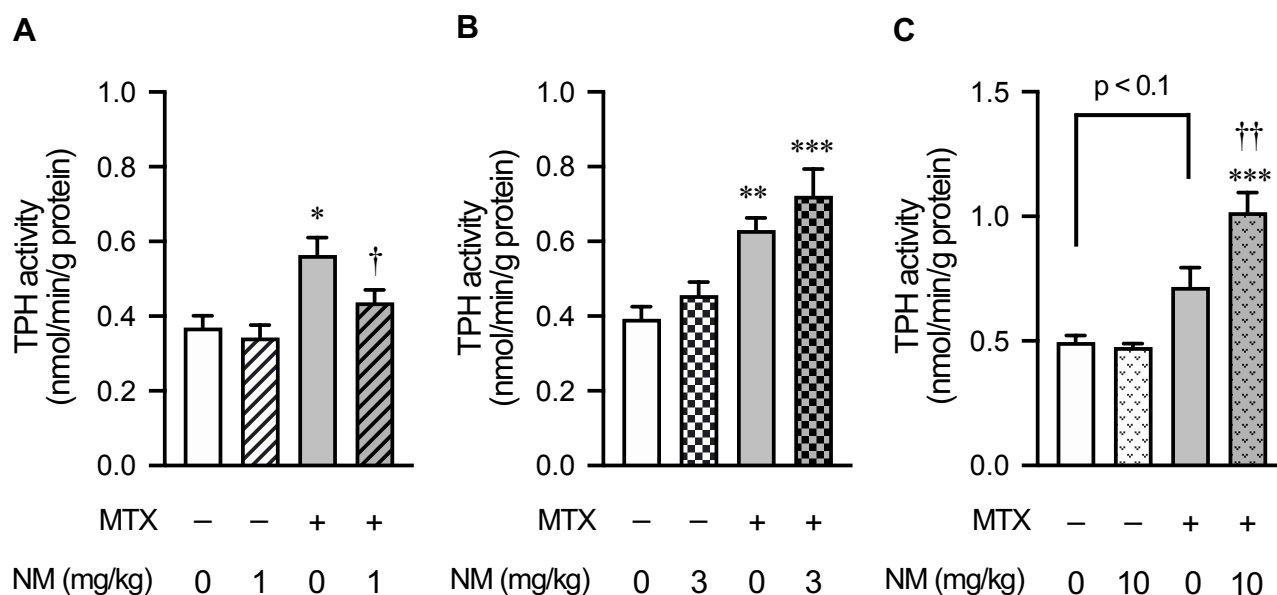


Fig. 19. Effects of MTX and Nafamostat on TPH Activity in Rat Jejunal Tissue

A: 1 mg/kg nafamostat administration group. B: 3 mg/kg nafamostat administration group. C: 10 mg/kg nafamostat administration group. Each column represents the mean \pm S.E. (n = 10–18 for A ; n = 8 for B; 6 for C). * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 versus basal; † p < 0.05 versus MTX. NM: nafamostat mesilate.

第3項 MTX 投与による抗 TPH 抗体陽性細胞数増加に及ぼすナファモスタットの影響

次に MTX 投与による抗 TPH 抗体陽性細胞数増加に及ぼすナファモスタットの影響を検討した。Fig. 20B, 22B には Fig. 20A, 22A の点線で囲まれた部分の拡大図をそれぞれ示している。また、Fig. 20A, 22A の黒矢印は抗 TPH 抗体陽性細胞を示している。また、Fig. 21 および 23 には小腸絨毛一本あたりの抗 TPH 抗体陽性細胞数を示している。ナファモスタット単独投与は抗 TPH 抗体陽性細胞数に影響を与えなかった。ナファモスタット 1 mg/kg は MTX 投与による抗 TPH 抗体陽性細胞数増加を抑制する傾向を示した (Fig. 20 and 21)。一方、ナファモスタット 3 mg/kg は MTX 投与による抗 TPH 抗体陽性細胞数増加に有意な影響を与えなかった (Fig. 22 and 23)。

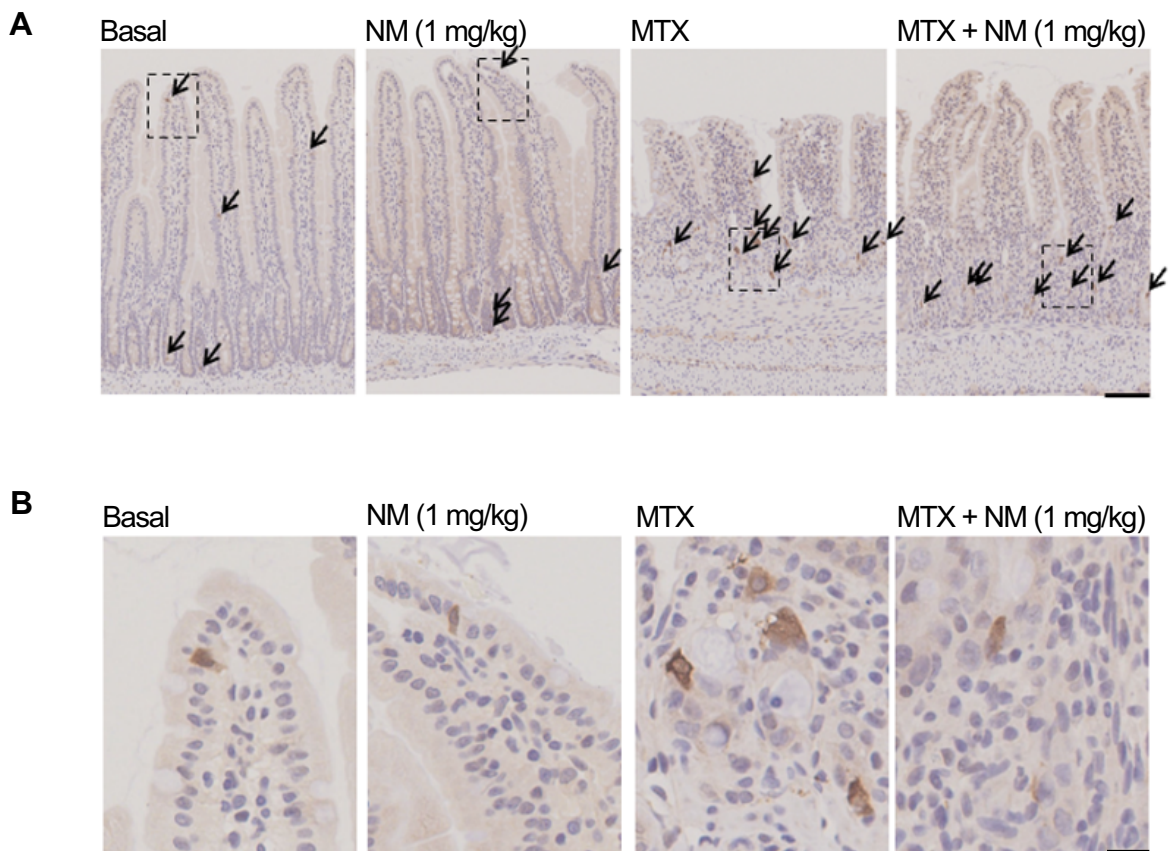


Fig. 20. Effects of MTX and Nafamostat 1 mg/kg on Anti-TPH Positive Cells Expression in Villus

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

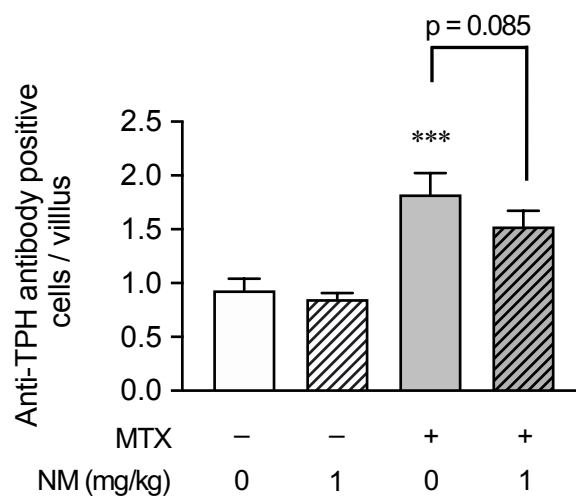


Fig. 21. Effects of MTX and Nafamostat on Number of Anti-TPH Positive Cells in Villus

Each column represents the mean \pm S.E. (n = 9–12). *** p < 0.001 versus basal. NM: nafamostat mesilate.

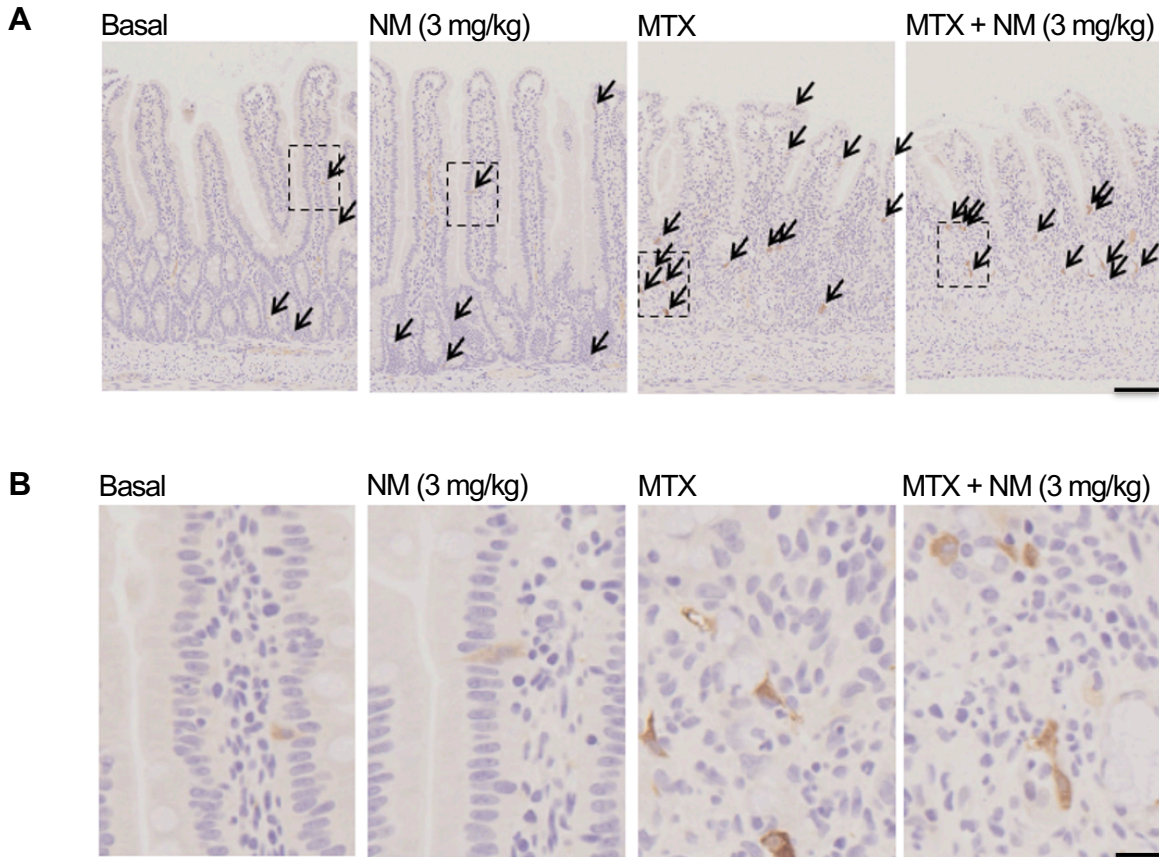


Fig. 22. Effects of MTX and Nafamostat 3 mg/kg on Anti-TPH Positive Cells Expression in Villus

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

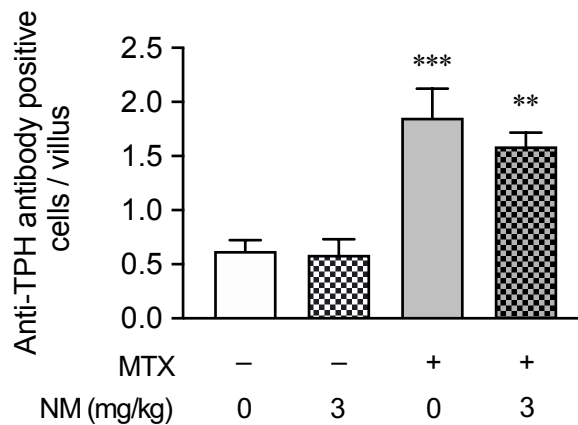


Fig. 23. Effects of MTX and Nafamostat on Number of Anti-TPH Positive Cells in Villus

Each column represents the mean \pm S.E. (n=8). ** p < 0.01, *** p < 0.001 versus basal. NM: nafamostat mesilate.

第4項 MTX 投与による TPH1 mRNA 発現増加に及ぼすナファモスタットの影響

次に MTX 投与による TPH1 mRNA 発現増加に及ぼすナファモスタットの影響を検討した。ナファモスタット単独投与は TPH1 mRNA 発現に影響を与えなかった (Fig. 24)。ナファモスタット 1 mg/kg は MTX 投与による TPH1 mRNA 発現増加を有意に抑制した (Fig. 24A)。ナファモスタット 3 mg/kg および 10 mg/kg は MTX 投与による TPH1 mRNA 発現増加に有意な影響を与えなかった (Fig. 24B and C)。

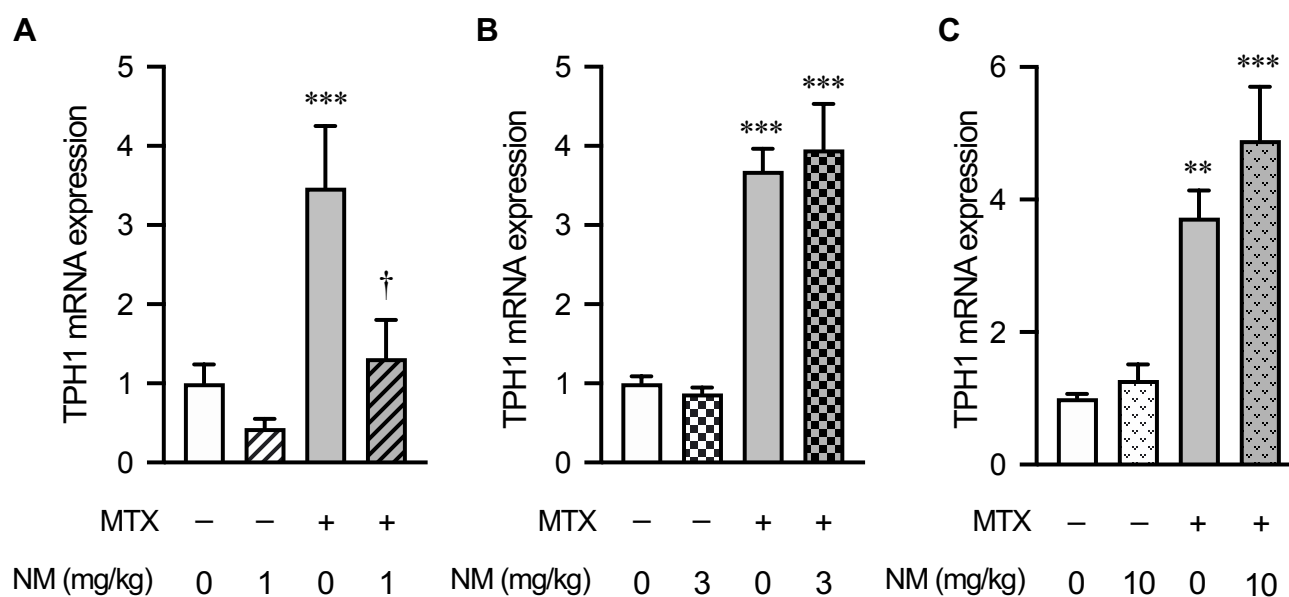


Fig. 24. Effects of MTX and Nafamostat on TPH1 mRNA Expression in Rat Jejunal Tissue

A: 1 mg/kg nafamostat administration group. B: 3 mg/kg nafamostat administration group. C: 10 mg/kg nafamostat administration group. Each column represents the mean \pm S.E. ($n = 6-8$ for A; 8 for B; 4 for C). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus basal; † $p < 0.05$ versus MTX. NM: nafamostat mesilate.

第5項 MAO活性に及ぼすMTXおよびナファモスタットの影響

これまでの結果から、ナファモスタットは1 mg/kgの投与量においてMTX投与によるラット小腸5-HT合成系を抑制し、ナファモスタット3 mg/kgおよび10 mg/kgは影響を与えないことが明らかとなった。次に、小腸5-HT代謝系に及ぼすMTXおよびナファモスタットの影響をMAO活性を測定することで検討した。MTXおよびナファモスタットはMAO活性に影響を与えなかった (Fig. 25)。

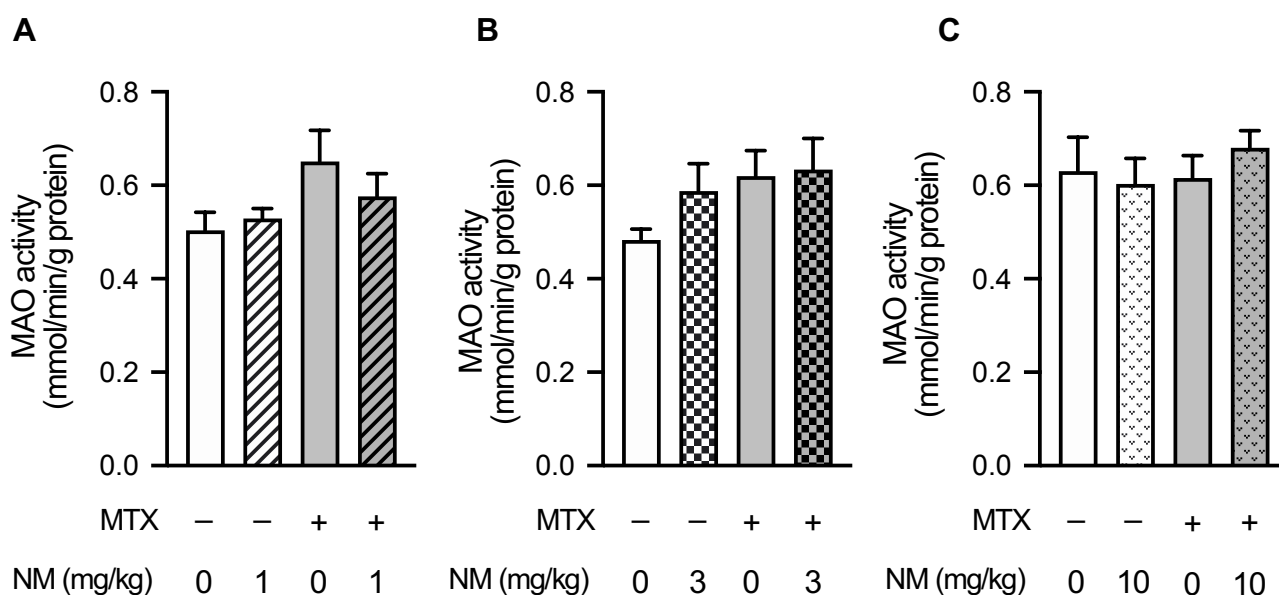


Fig. 25. Effects of MTX and Nafamostat on MAO Activity in Rat Jejunal Tissue

A: 1 mg/kg nafamostat administration group. B: 3 mg/kg nafamostat administration group. C: 10 mg/kg nafamostat administration group. Each column represents the mean \pm S.E. ($n = 8-11$ for A; $n = 8$ for B; 6 for C).

NM: nafamostat mesilate.

第6項 MTX 投与によるラット小腸 5-HIAA 含量増加に及ぼすナファモスタットの影響

MTX 投与によるラット小腸 5-HIAA 含量増加に及ぼすナファモスタットの影響を検討した。ナファモスタット単独投与はラット小腸 5-HIAA 含量に影響を与えなかった (Fig. 26)。ナファモスタット 1 mg/kg は MTX 投与によるラット小腸 5-HIAA 含量増加を抑制する傾向を示した (Fig. 26A)。ナファモスタット 3 mg/kg はラット小腸 5-HIAA 含量増加に影響を与えず、10 mg/kg はこれを上昇させる傾向を示した (Fig. 26B and C)。

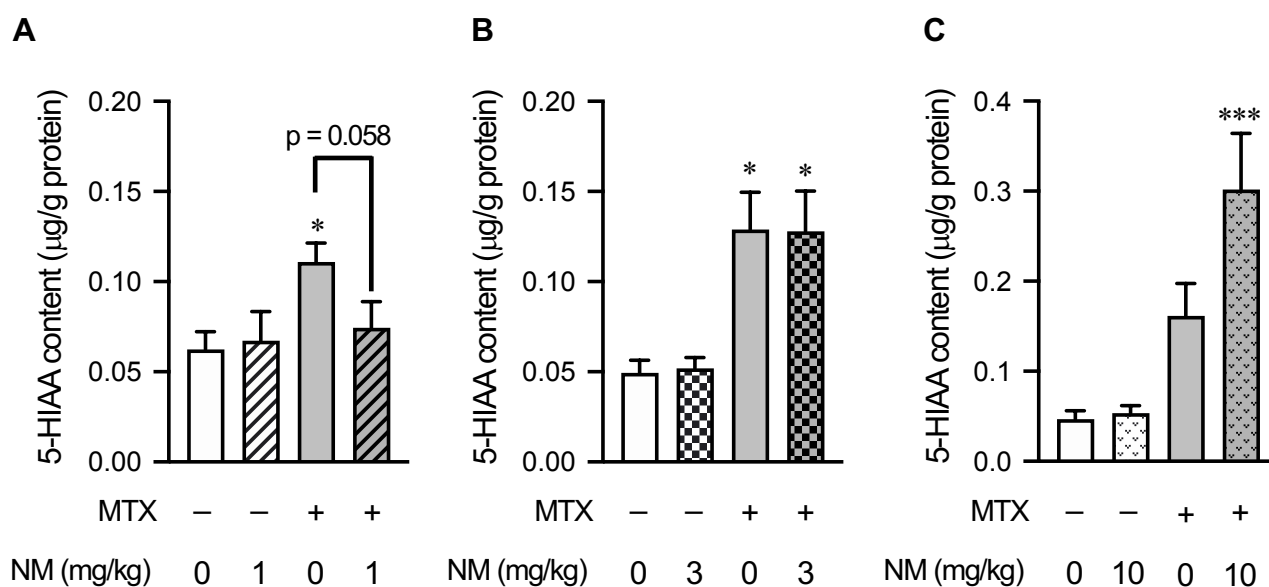


Fig. 26. Effects of MTX and Nafamostat on 5-HIAA Content in Rat Jejunal Tissue

A: 1 mg/kg nafamostat administration group. B: 3 mg/kg nafamostat administration group. C: 10 mg/kg nafamostat administration group. Each column represents the mean \pm S.E. (n = 6–8 for A; n = 7 for B; 6 for C).

* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ versus basal. NM: nafamostat mesilate.

第7項 MTX 投与による抗サブスタンス P 抗体陽性細胞数増加に及ぼすナファモスタットの 影響

前述の通り、サブスタンス P は抗がん薬誘起性悪心・嘔吐発現に関与しており、これは TPH とともに EC 細胞に存在する。^{20,70)} また、ここまでにナファモスタットが MTX 投与による EC 細胞数増加を抑制することを明らかにした。そこで、次に MTX 投与による抗サブスタンス P 抗体陽性細胞数増加に及ぼすナファモスタットの影響を検討した。Fig. 27B, 29B には Fig. 27A, 29A の点線で囲まれた部分の拡大図をそれぞれ示している。また、Fig. 27A, 29A の黒矢印は抗サブスタンス P 抗体陽性細胞を示している。また、Fig. 28, 30 には小腸絨毛一本あたりのサブスタンス P 陽性細胞数をカウントした結果を示している。ナファモスタット単独投与は抗サブスタンス P 抗体陽性細胞数に影響を与えなかった (Fig. 28 and 30)。ナファモスタット 1 mg/kg は MTX 投与による抗サブスタンス P 陽性細胞数増加を有意に抑制した (Fig. 27 and 28)。一方、ナファモスタット 3 mg/kg は MTX 投与による抗サブスタンス P 陽性細胞数増加に有意な影響を与えなかった (Fig. 29 and 30)。

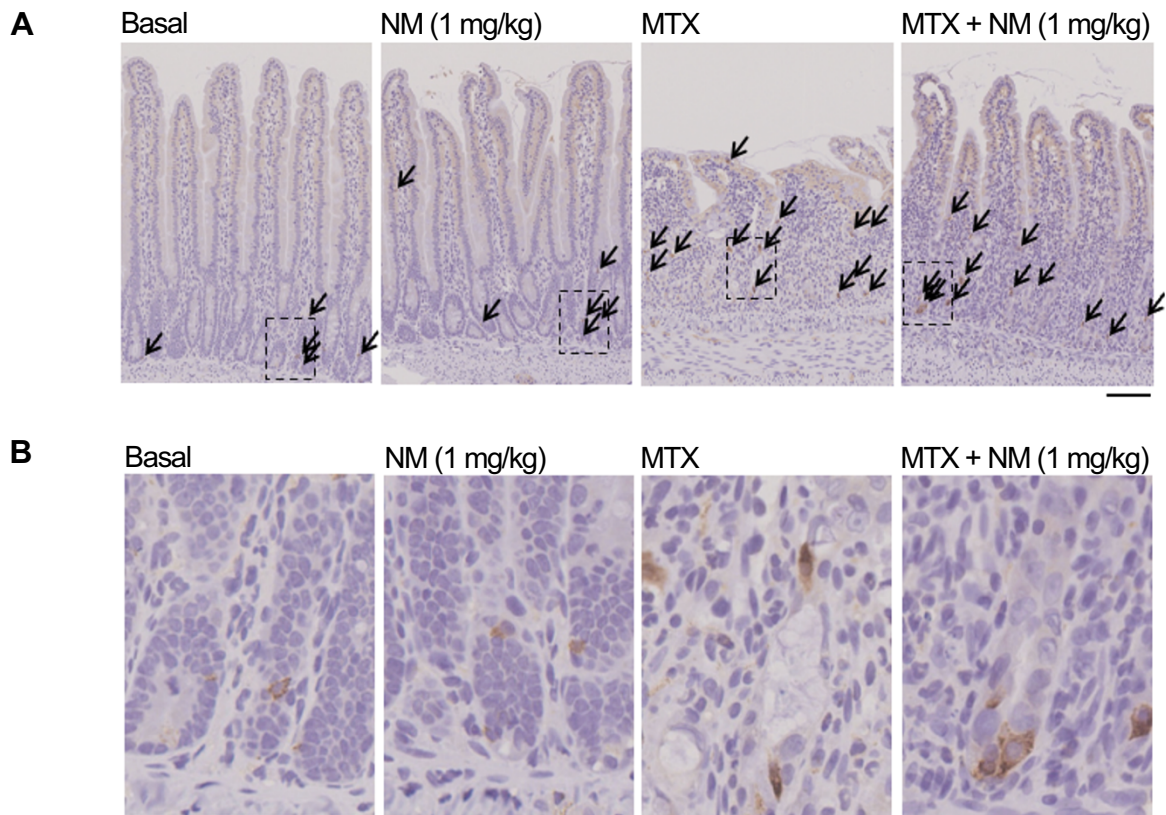


Fig. 27. Effects of MTX and Nafamostat 1 mg/kg on Anti-Substance P Positive Cells Expression in Villus

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

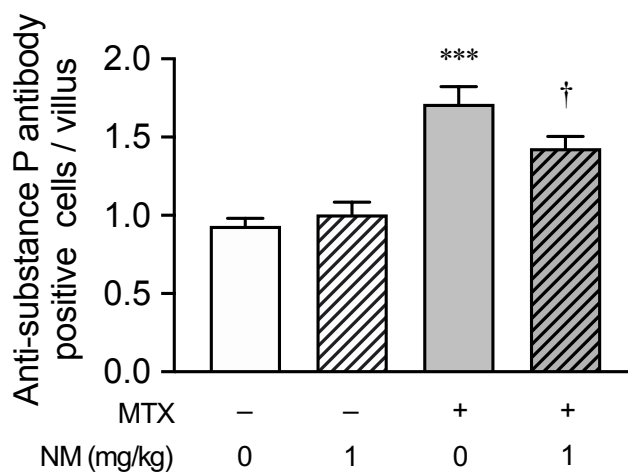


Fig. 28. Effects of MTX and Nafamostat 1 mg/kg on Number of Anti-substance P Positive Cells in Villus

Each column represents the mean \pm S.E. (n = 7). *** p < 0.001 versus basal; † p < 0.05 versus MTX. NM: nafamostat mesilate.

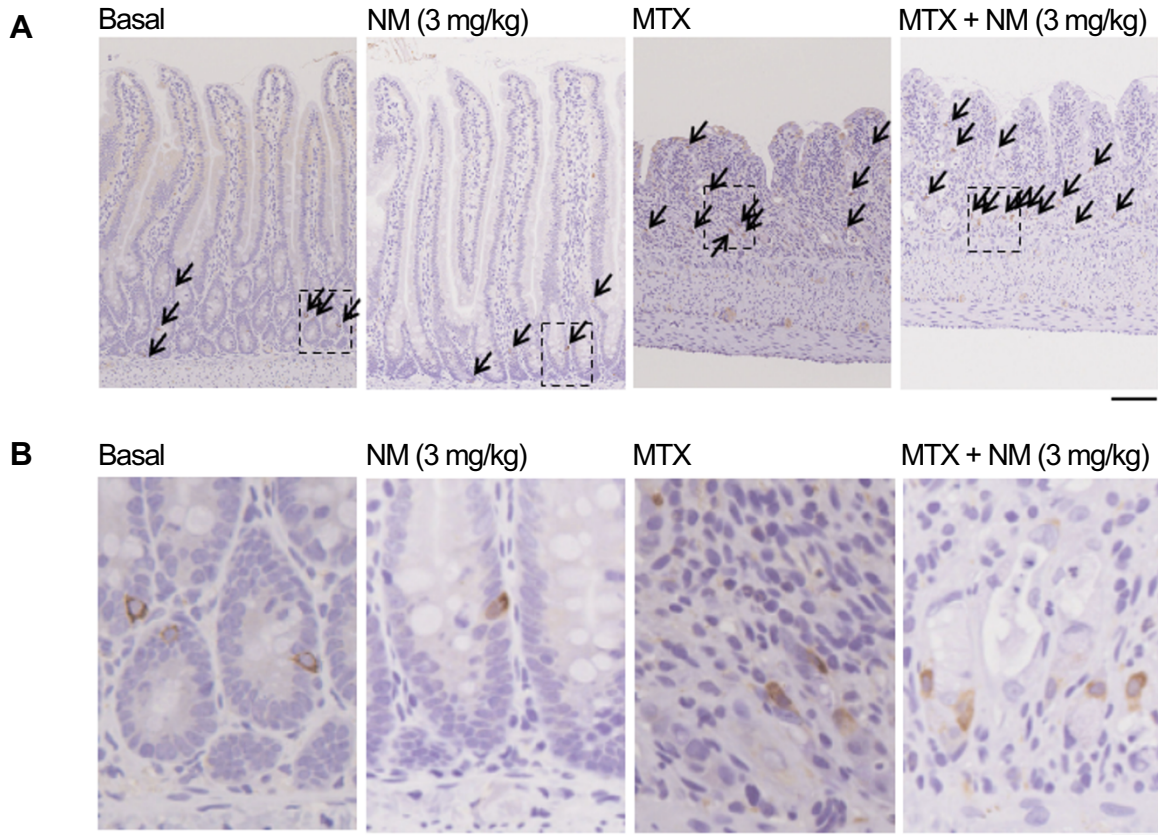


Fig. 29. Effects of MTX and Nafamostat 3 mg/kg on Anti-TPH Positive Cells Expression in Villus

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

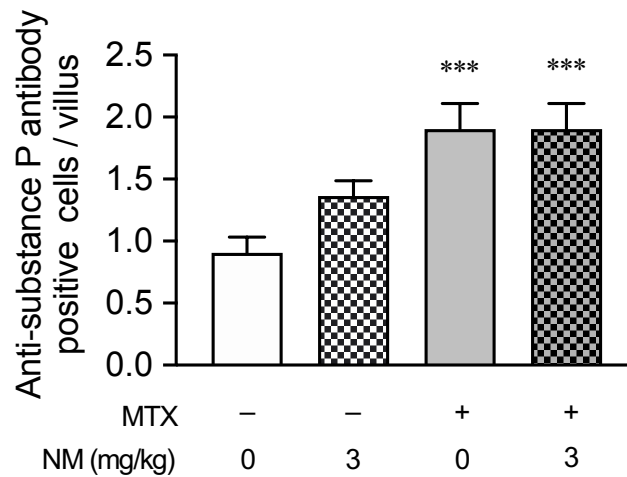


Fig. 30. Effects of MTX and Nafamostat 3 mg/kg on Number of Anti-substance P Positive Cells in Villus

Each column represents the mean \pm S.E. (n = 8). *** p < 0.001 versus basal. NM: nafamostat mesilate.

第8項 MTX 投与による PPT-A mRNA 発現増加に及ぼすナファモスタットの影響

サブスタンス P は、7つのエクソンを持つ PPT-A 遺伝子から alternative splicing をうけて α , β , γ という3種類の前駆体 mRNA から産生される。そこで MTX 投与による PPT-A mRNA 発現増加に及ぼすナファモスタットの影響を検討した。ナファモスタット単独投与は PPT-A mRNA 発現に影響を与えなかった (Fig. 31)。MTX 単独投与は PPT-A mRNA 発現を有意に増加させた (Fig. 31)。ナファモスタット 1 mg/kg は MTX 投与による PPT-A mRNA 発現増加を有意に抑制した。

(Fig. 31A) ナファモスタット 3 mg/kg および 10 mg/kg は MTX 投与による PPT-A mRNA 発現増加に有意な影響を与えなかった (Fig. 31B and C)。

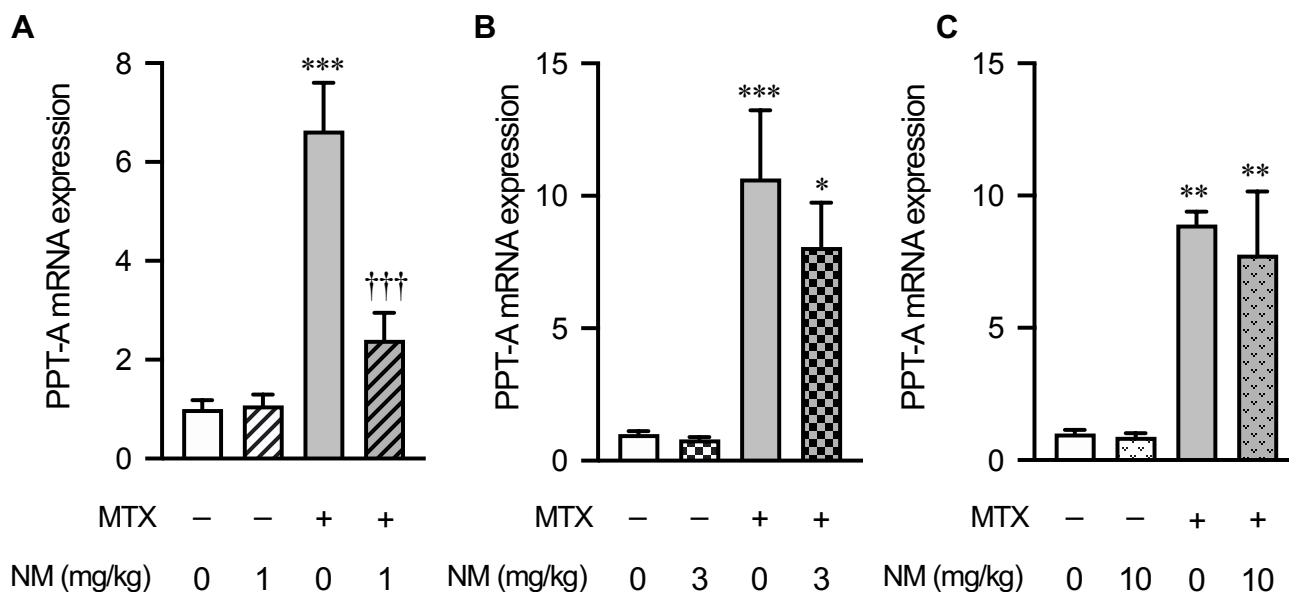


Fig. 31. Effect of MTX and Nafamostat on PPT-A mRNA Expression in Rat Jejunal Tissue

A: 1 mg/kg nafamostat administration group. B: 3 mg/kg nafamostat administration group. C: 10 mg/kg nafamostat administration group. Each column represents the mean \pm S.E. ($n = 6-9$ for A; 8 for B; 7 for C). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus basal; ††† $p < 0.001$ versus MTX. NM: nafamostat mesilate.

第4節 考察

本研究では MTX 投与によるラット小腸 5-HT 合成・代謝系およびサブスタンス P に及ぼすナファモスタットの影響を検討した。その結果、小腸組織障害に及ぼすナファモスタットへの影響と同様にナファモスタットは 1 mg/kg の用量でのみ MTX 投与による 5-HT 合成およびサブスタンス P 合成の亢進を有意に抑制した。一方で MTX およびナファモスタット 1 mg/kg は MAO 活性に影響を与えなかった。またナファモスタットは、MTX 投与による 5-HT 含量増加および 5-HIAA 含量増加をともに抑制したことから、ナファモスタット 1 mg/kg は MTX 投与による小腸 5-HT 系合成系亢進を有意に抑制するものの、5-HT 代謝系には影響を与えないことが明らかとなった。一方、ナファモスタット 10 mg/kg は MTX 投与による TPH 活性の上昇をさらに有意に上昇させ、5-HIAA 含量増加をさらに増加させる傾向を示した。これらの現象は前章での考察と同様に、ナファモスタットの高用量の使用により生体内プロテアーゼプロファイルが変化することが関連している可能性がある。MTX とは別の機序を有する細胞障害性抗がん薬であるシスプラチン 5 mg/kg をラットに単回腹腔内投与した研究において、シスプラチン投与 72 時間後の小腸組織において 5-HT 含量増加、TPH 活性上昇が認められるとともに、MAO 活性が抑制される。²¹⁾ 従って、シスプラチンの投与は小腸 5-HT 合成系を亢進するとともに、5-HT 代謝系を抑制することで MTX と比較しても、小腸での 5-HT 利用がさらに高まることが示唆される。事実、臨床におけるシスプラチンによる悪心・嘔吐の発現率は MTX によるものより高く、⁷⁴⁾ 小腸での 5-HT 合成・代謝系への影響の差が各細胞障害性抗がん薬による副作用発現の程度と関連している可能性がある。またこのシスプラチンを用いた研究においては、ラットに COX-2 選択的阻害薬であるメロキシカム 3 mg/kg をシスプラチン投与に併用すると、シスプラチン投与による TPH 活性上昇作用および MAO 活性抑制作用が有意に阻害されることも明らかにされている。²¹⁾ このことから、細胞障害性抗がん薬による TPH 活性および MAO 活性変動機序の一部には小腸での COX-2 代謝物が関与していることが示唆される。第 1 章で示したように、本研究においてナファモスタット 1 mg/kg は、MTX 投与によるラット小腸 COX-2 発現増加を抑制した。従って、ナファモスタットによる TPH 活性上昇の抑制作用はナファモスタットによる COX-2 発現抑制作用に関連している可能性があると考えられた。さらに、本研究ではナファモスタット 1 mg/kg は、MTX 投与による TPH1 mRNA 発現増加を有意に抑制し、抗 TPH 抗体陽性細胞数増加も抑制させる傾向を示すことを明らかにした。メロキシカムは、上述したようにシスプラチンによる TPH 活性上昇作用を阻害する一方、シスプラチンによる TPH1

mRNA 発現増加作用には有意な影響を与えない。²⁴⁾ 従って、ナファモスタットによる TPH 活性抑制機序に COX-2 発現抑制作用が一部関連しているという機序とは異なり、ナファモスタットによる TPH 発現抑制作用機序には COX-2 発現を伴う小腸炎症反応は関連していない可能性がある。本研究における MTX による抗 TPH 抗体陽性細胞数の増加は即ち EC 細胞数の増加を示している。EC 細胞は、小腸上皮または陰窩部に存在する内分泌細胞である。EC 細胞を含む腸管上皮細胞は腸管上皮幹細胞 (intestinal stem cell: ISC) から分化する。この ISC の本体は腸陰窩基底円柱細胞 (crypt base columnar cell: CBC 細胞) とされており、CBC 細胞にはロイシンリッチリピート含有 G タンパク質共役受容体 5 (leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5: Lgr5) という Wnt 標的遺伝子が特異的に発現している。⁷⁵⁾ ISC から 4 種類の腸管上皮細胞、即ち内分泌細胞、杯細胞、パネート細胞、吸収上皮細胞への分化の制御は複雑であり完全には解明されていない。Machida らは、本実験条件と同じ条件での MTX 投与がラット小腸の Lgr5 mRNA 発現増加並びにいくつかの ISC 関連遺伝子発現を増加させること、また小腸陰窩部での抗 Lgr5 抗体陽性細胞数を増加させることを報告している。⁷⁶⁾ また、MTX とは別の機序を有する細胞障害性抗がん薬であるシクロホスファミドをラットに 120 mg/kg の用量で単回腹腔内投与した研究でも、シクロホスファミドは小腸において EC 細胞数を増加させるとともに Lgr5 mRNA 発現を増加させる。²⁶⁾ 従って、ナファモスタットによる 5-HT 合成系の抑制には MTX 投与による ISC 細胞から EC 細胞への分化亢進を抑制することが関与している可能性がある。今後 ISC へのナファモスタットの影響をさらに検討する必要がある。

これまでに EC 細胞には 5-HT とともにサブスタンス P も局在していることが報告されている。^{20,70)} サブスタンス P も抗がん薬誘起性悪心・嘔吐に関与しており、事実、サブスタンス P の受容体であるタキキニン NK₁ 受容体遮断薬であるアプレピタントは抗がん薬誘起性悪心・嘔吐に対する制吐薬として上市されている。サブスタンス P による催吐には主に第四脳室にある化学受容器引金帯や延髄にある嘔吐中枢のタキキニン NK₁ 受容体刺激であると想定されているが、⁷⁷⁾ 末梢における EC 細胞からのサブスタンス P 遊離も一部関与している可能性がある。^{20,78)} 本研究において、ナファモスタットは MTX 投与による抗サブスタンス P 抗体陽性細胞増加および PPT-AmRNA 発現増加を抑制した。この結果もナファモスタットが MTX 投与による EC 細胞数の増加を抑制したためであると考えられた。また、PAR-2 は結腸の筋層ニューロンや粘膜下ニューロンにも存在しているが、⁷⁹⁾ マウスへのタキキニン NK₁ 受容体遮断薬の投与は経肛門的に注入された PAR-2 アゴニストによる結腸の炎症を抑制する。⁸⁰⁾ このことは、結腸での PAR-2 活性化は局所的にサブスタンス P を放出させている可能性を示しており、今後本実験

条件においてもサブスタンス P 遊離に及ぼすナファモスタットの影響を検討する必要があると考えられた。

序論で述べたように、Kikuchi らは、MTX 投与ラットへのナファモスタットの併用投与が摘出小腸からの 5-HT 遊離を抑制することを明らかにしている。¹⁹⁾ このナファモスタットによる 5-HT 遊離抑制作用は、ラットに MTX を投与した後の摘出小腸にナファモスタットを処理することによっても抑制される。¹⁹⁾ さらにラットにおけるこのナファモスタットによる 5-HT 遊離抑制作用を示す用量は、1 mg/kg のみならず 3 mg/kg でも認められる。¹⁹⁾ これらのことから、ナファモスタットによる小腸からの 5-HT 遊離抑制作用と本研究で認められた 5-HT 合成系亢進抑制作用の機序は異なると考えられる。ナファモスタットによる 5-HT 遊離抑制作用および 5-HT 合成亢進抑制作用に及ぼす影響の相違についての詳細なメカニズムは現在も不明であり、今後の検討課題である。EC 細胞からの 5-HT 遊離は、細胞内の Ca²⁺動員を誘発する GPCR を含む複数の受容体刺激によって制御されている。⁸¹⁾ また、PAR-2 も EC 細胞上にも存在する。⁸²⁾ 従って、ナファモスタットが小腸 5-HT 遊離を抑制するメカニズムのひとつに EC 細胞上の PAR-2 を阻害することが考えられる。また、ラット小腸粘膜マスト細胞も 5-HT および TPH を含有し、^{69,83)} その細胞膜上には PAR-2 を発現している。⁸⁴⁾ このことから、ナファモスタットは EC 細胞からの 5-HT 遊離に加えてマスト細胞からの 5-HT 遊離も抑制している可能性もある。

以上第 2 章では、ナファモスタットが MTX 投与によるラット小腸 5-HT 合成系およびサブスタンス P 合成系亢進を抑制することが明らかとなった。またこの機序に、ナファモスタットによる PAR-2 活性化抑制が関与している可能性が考えられた。さらに、本研究で示した MTX 投与に及ぼすナファモスタットの効果は、消化管障害抑制作用のみならず、制吐作用としても期待できることが示唆された。

第3章 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

第1節 緒言

これまでの検討により、低用量のナファモスタットが MTX 誘起性ラット小腸組織障害およびラット小腸 5-HT、サブスタンス P 合成亢進を抑制した一方、ナファモスタットを高用量で用いるとこの抑制作用がみられないことを明らかにした。ナファモスタットは低用量で用いるとトリプターゼ阻害活性が高まること、⁵²⁾ また IBS や US などの炎症性腸疾患での消化管障害にトリプターゼにより活性化される PAR-2 が関与していることから、本研究で認められたナファモスタットの有効性に小腸での PAR-2 が関与している可能性が考えられた。PAR-2 は消化管に広く発現し、その中でも小腸絨毛および陰窩部に豊富に局在しており、⁸⁵⁾ トリプシンやマスト細胞に存在するトリプターゼにより活性化される。³⁰⁾

一方、抗がん薬は腸管バリアを破綻させる。腸管バリアの本体は消化管上皮細胞におけるタイトジャンクションであるが、抗がん薬によるタイトジャンクションの崩壊は腸粘膜透過性を増加させ、炎症を惹起する。実際、ラットへの MTX 15 mg/kg/day を 4 日間投与すると、小腸粘膜透過性が有意に上昇することが報告されている。³⁶⁾ また結腸がん由来細胞 T84 細胞に PAR-2 アゴニストを添加すると、タイトジャンクション形成の指標となる TEER が低下し、⁸⁶⁾ またタイトジャンクションタンパク質発現が低下する。⁴²⁾

そこで第3章では、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一端を明らかにするため、PAR 発現およびタイトジャンクション関連遺伝子に及ぼすナファモスタット影響を検討した。またここまでの検討で、ナファモスタット 1 mg/kg が MTX 投与による消化管障害および 5-HT およびサブスタンス P 合成系亢進を抑制し、一方で、ナファモスタット 3 mg/kg および 10 mg/kg では、ともに著明な影響が認められないことが明らかになっていることから、本章ではナファモスタット 1 mg/kg および 10 mg/kg の用量を用いて各検討を行った。

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

QIAGEN[®] One Step RT-PCR Kit をキアゲン（東京）より，TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice をタカラバイオ（滋賀）より購入した。なお，この他実験に使用した試薬は全て特級規格品または生化学用を富士フィルム和光純薬（大阪）のものを使用した。

3) 薬物投与プロトコール

第1章の第2節の3) に準じた。

4) 小腸組織の摘出

第1章第2節の5) に準じた。

5) 小腸組織からの total RNA の抽出

第1章2項の9) に準じた。

6) RT-PCR 法

5) で抽出した total RNA を QIAGEN[®] One Step RT-PCR Kit（キアゲン，東京）を用いて cDNA の合成および PCR を行った。cDNA の合成および遺伝子の増幅には TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice（タカラバイオ，滋賀）を用いた。付属の説明書に従ってサンプルを調整し，逆転写反応としてサンプルを 50°C で 30 分加熱した。続けて PCR 初期活性化のため，95°C で 15 分加熱しさらに，94°C 1 分，55°C 1 分，72°C 1 分の反応を 40 サイクル行った後，72°C 10 分の反応を行った。使用した PAR-1~4 のプライマーを Table 5 に示した。GAPDH のプライマーは第1章第2節 10) の Table 2 に示してある。

Table 5. Primers for RT-PCR

product		Sequences (5' → 3')	Reference
PAR-1 (355 bp)	Forward	CCTATGAGACAGCCAGAATC	87)
	Reverse	GCTTCTTGACCTTCATCC	
PAR-2 (453 bp)	Forward	GAACGAAGAAGAAGCACC	
	Reverse	GGAACAGAAAGACTCCAATG	
PAR-3 (262 bp)	Forward	CCCAAGTGATACCTGCCATC	
	Reverse	ATAGCGCAGTACATGTTGCC	
PAR-4 (994 bp)	Forward	GCCAACGACAGTGACACGCT	
	Reverse	GTCACAGAAGTGTAGAGGAGC	

7) アガロースゲル電気泳動

泳動用緩衝液としてトリス酢酸 EDTA 緩衝液 (tris-acetate EDTA: TEA) (40 mM Tris-acetate pH 8.0, 20 mM 酢酸ナトリウム, 2 mM EDTA, 18 mM 塩化ナトリウム) を用いた. 泳動緩衝液に適量のエチジウムブロマイドおよび1%になるように Agarose S (ニッポンジーン, 東京) を添加して泳動用ゲルを作成した. DNA 溶液に, 泳動試料調製用緩衝液 (200 mM Tris-acetate pH 8.0, 100 mM 酢酸ナトリウム, 10 mM EDTA, 90 mM 塩化ナトリウム, 50%グリセリン, 0.005% ブロモフェノールブルー) を 1/10 容量加え泳動用試料を調製した. その後, Mupid-exU 泳動装置 (タカラバイオ, 滋賀) を用い 50 V 定電圧で泳動した. BioDoc-It™ Imaging system (UVP, CA, USA) を用い紫外線 (302 nm) を照射し DNA と結合したエチジウムブロマイドの蛍光を検出し撮影した.

8) Real-time RT-PCR 法

第1章2項の10) に準じた. 使用した PAR-2, オクルディンおよび ZO-1 のプライマーを Table 6 に示した. GAPDH のプライマーは第1章第2節10) の Table 2 に示してある.

9) 統計学的処理および検定方法

全ての測定値を平均 ± 標準誤差 (Mean ± S.E.) で示した. 多重間の比較は一元配置分散分析 (ANOVA) の後に 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.

Table 6. Primers for Real-time RT-PCR

product		Sequences (5' → 3')	Reference
PAR-2	Forward	GGCTGCTGGGAGGTATCACC	88)
	Reverse	GCGTGTCCAATCTGCCAATC	
Occludin	Forward	GCCTATGGAACGGGCATCTT	59)
	Reverse	GCCAGCAGGAAACCCTTTG	
ZO-1	Forward	GAGGCTTCAGAACGAGGCTATTT	89)
	Reverse	CATGTCCGAGAGTAGAGGTTCTGA	

第3節 結果

第1項 PAR-2 mRNA 発現に及ぼす MTX およびナファモスタットの影響

ラット小腸における PARs mRNA 発現を RT-PCR 法にて定性的に検討した。その結果、ラット小腸組織に PAR1~3 の発現は認められたものの、PAR-4 は検出されなかった (Fig. 32)。

そこで次に PAR-2 mRNA 発現に及ぼす MTX およびナファモスタットの影響をリアルタイム RT-PCR 法にて検討した (Fig. 32)。ラットへの MTX 投与は小腸 PAR-2 mRNA 発現を有意に増加させた (Fig. 33)。ナファモスタット 1 mg/kg は MTX 投与による PAR-2 mRNA 発現増加を有意に抑制した一方、ナファモスタット 10 mg/kg は MTX 投与による PAR-2 mRNA 発現増加に有意な影響を与えなかった (Fig. 33A and B)。

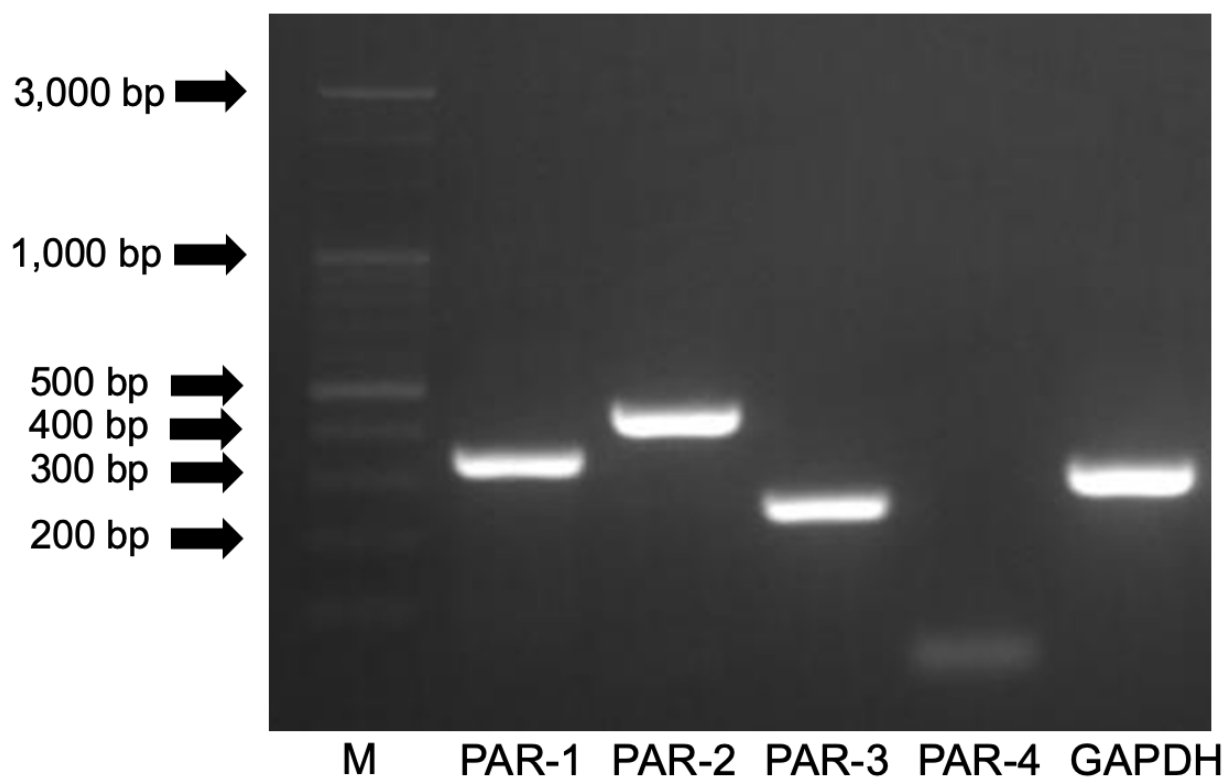


Fig. 32. Detection of Protease-Activated Receptors PAR-1, PAR-2, PAR-3 and PAR-4 in Rat Jejunal Tissue

M: molecular marker

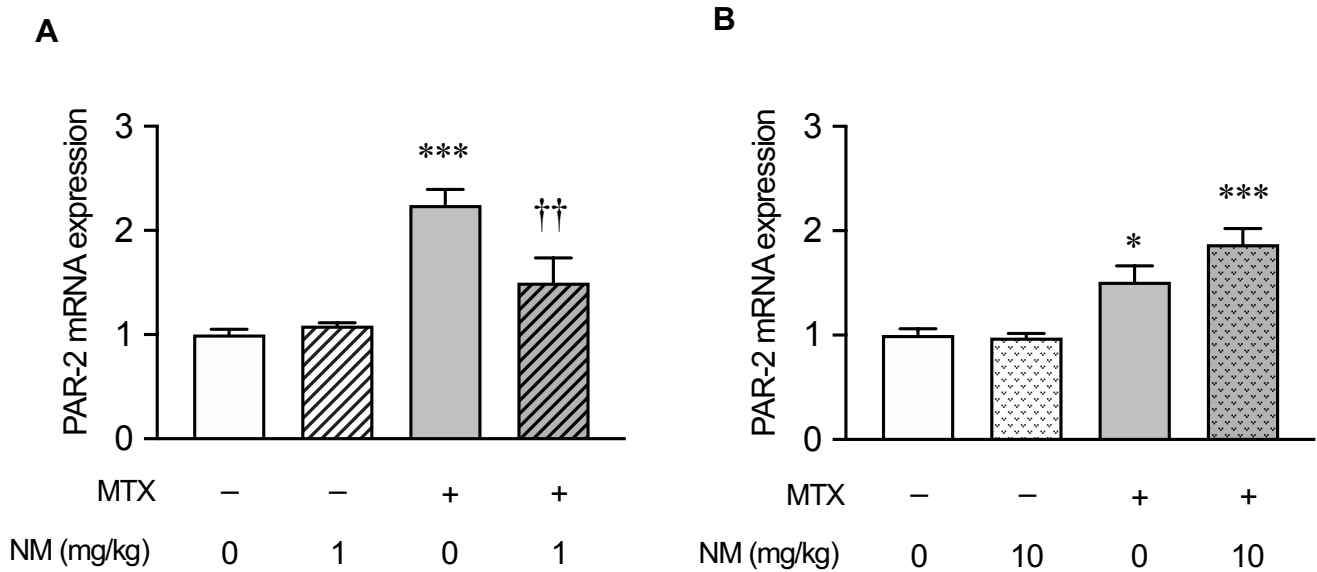


Fig. 33. Effects of MTX and Nafamostat on PAR-2 mRNA Expression in Rat Jejunal Tissue

A: 1 mg/kg nafamostat administration group. B: 10 mg/kg nafamostat administration group. Each column represents the mean \pm S.E. (n = 6–9 for A; 6 for B). * p < 0.05, *** p < 0.001 versus basal; †† p < 0.01 versus MTX. NM: nafamostat mesilate.

第2項 オクルディン mRNA 発現に及ぼす MTX およびナファモスタットの影響

ラットへのナファモスタット単独投与は小腸オクルディン mRNA 発現に影響を与えなかった (Fig. 34). ラットへの MTX 投与は小腸オクルディン mRNA 発現を有意に減少させた (Fig. 34). 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た一方, 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 発現減少に有意な影響を与えなかった (Fig. 34A and B).

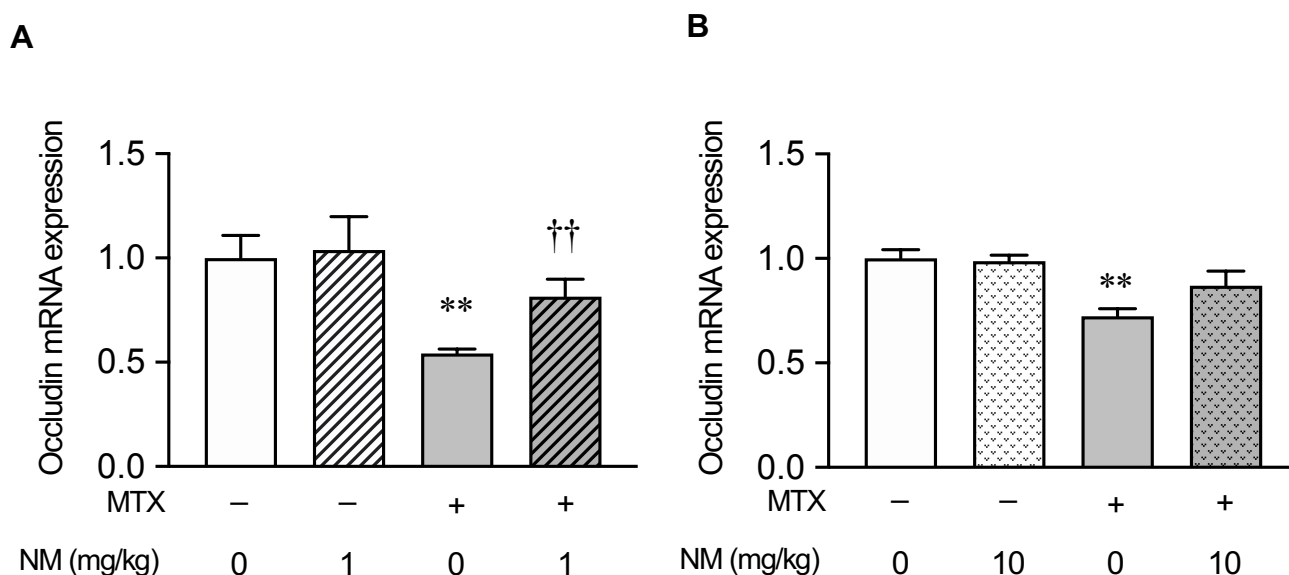


Fig. 34. Effects of MTX and Nafamostat on Occludin mRNA Expression in Rat Jejunal Tissue

A: 1 mg/kg nafamostat administration group. B: 10 mg/kg nafamostat administration group. Each column represents the mean \pm S.E. ($n = 6-9$ for A; 6 for B). $**p < 0.01$ versus basal; $\dagger\dagger p < 0.01$ versus MTX. NM: nafamostat mesilate.

第3項 ZO-1 mRNA 発現に及ぼす MTX およびナファモスタットの影響

ラットへのナファモスタット単独投与は小腸 ZO-1 mRNA 発現に影響を与えなかった (Fig. 35). ラットへの MTX 投与は小腸 ZO-1 mRNA 発現を増加させた (Fig. 35). ナファモスタット 1 mg/kg は MTX 投与による ZO-1 mRNA 発現増加を減少させる傾向を示した (Fig. 35A). また, ナファモスタット 10 mg/kg は MTX 投与による ZO-1 mRNA 発現と比較してこれを有意に増加させた (Fig. 35 B).

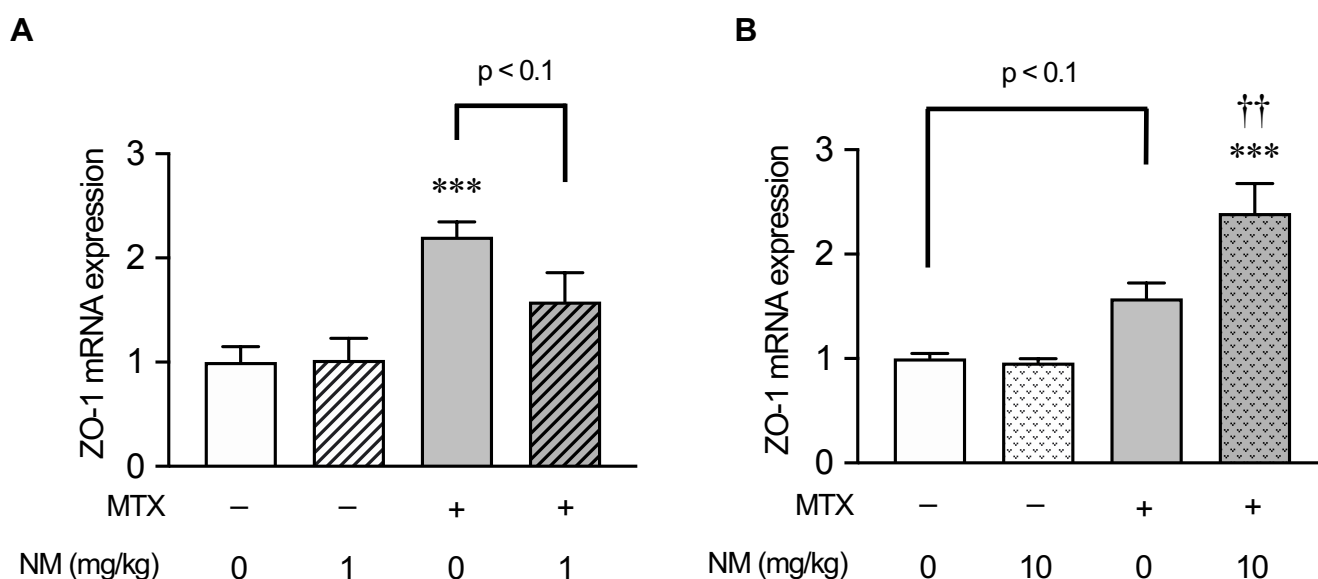


Fig. 35. Effects of MTX and Nafamostat on ZO-1 mRNA Expression in Rat Jejunal Tissue

A: 1 mg/kg nafamostat administration group. B: 10 mg/kg nafamostat administration group. Each column represents the mean \pm S.E. ($n = 6-8$ for A; 6 for B). *** $p < 0.001$ versus basal; †† $p < 0.01$ versus MTX. NM: nafamostat mesilate.

第4節 考察

本研究において、ラットへの MTX 投与は、小腸 PAR-2 mRNA 発現を増加させることが明らかとなった。ラット由来小腸上皮細胞株 IEC-6 においてトリプターゼ刺激は PAR-2 発現を増加させることが報告されている。³⁵⁾ 従って、本研究で認められた MTX による小腸 PAR-2 mRNA 発現増加作用にも、MTX 投与によるマスト細胞からのトリプターゼ脱顆粒が促進され、この PAR-2 mRNA 発現増加作用に関与している可能性が考えられた。MTX 投与によるマスト細胞からのトリプターゼ脱顆粒は、MTX 投与による非特異的細胞障害によりマスト細胞が傷害されたために引き起こされていると考えられる。細胞が傷害されると細胞内の ATP が細胞外へと漏出する。ATP 受容体である P2 受容体は、イオンチャネル内蔵型受容体である P2X 受容体と GPCR の P2Y 受容体に分類されるが、^{90,91)} マスト細胞膜上には ATP 受容体サブタイプである P2X4 受容体や P2X7 受容体が発現しており、ATP の刺激により脱顆粒が引き起こされる。^{92,93)} 従って、MTX 投与により傷害された小腸上皮細胞から ATP が細胞外に放出され、P2X4 および P2X7 受容体を刺激することでマスト細胞の脱顆粒が起こっている可能性も考えられた。

ナファモスタット 1 mg/kg は MTX 投与による PAR-2 mRNA 発現増加を有意に抑制した。このことから低用量ナファモスタットによる小腸組織障害および 5-HT およびサブスタンス P 合成系抑制作用には、トリプターゼを阻害することにより PAR-2 刺激を抑制する機序に加えて、小腸 PAR-2 発現を直接抑制する機序も関与している可能性が考えられた。

また、ラットへの MTX 投与はオクルディン mRNA 発現を低下させた。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 発現低下を有意に抑制した。4 回膜貫通型タンパク質であるオクルディンは、タイトジャンクション鎖内に存在しており、³⁷⁾ タイトジャンクションの構築と維持に重要な役割を果たす。またオクルディンは細胞外ではホモフィリックな結合をすることでタイトジャンクションを形成する。Hamada らはラットに MTX 15 mg/kg/day を 4 日間投与すると、オクルディン mRNA 発現が減少し、小腸の透過性が増加することを報告している。³⁶⁾ また、マウスへの PAR-2 アゴニストの投与は、結腸での透過性を有意に増加させる。^{94,95)} 本研究において、ナファモスタットは MTX 投与による PAR-2 mRNA 発現増加に連動して、オクルディン mRNA 発現を抑制した。このことから、本研究においても PAR-2 とタイトジャンクションは密接に関係していることが明らかとなった。

本研究ではさらに MTX 投与により ZO-1 mRNA 発現が増加し、ナファモスタット 1 mg/kg を併用するとこれを抑制させる傾向を示すことを明らかにした。反対にナファモスタット 10

mg/kg 併用は MTX 単独投与と比較しても ZO-1 mRNA 発現をさらに有意に増加させた。ZO-1 はタイトジャンクションの裏打ち因子として、タイトジャンクション制御に重要な役割を果たしている。ZO-1 発現は UC 患者の結腸において有意に低下している。^{96,97)} 一方、本研究とは異なりラットへ MTX 投与は、小腸 ZO-1 mRNA 発現およびタンパク質発現に影響を与えないとの報告もある。³⁶⁾ 興味深いことに Kuo らは、ZO-1 ノックアウトマウス結腸では腸粘膜透過性が亢進していることを見出したが、この結腸において ZO-1 以外のタイトジャンクションタンパク質発現に影響が認められないと報告している。⁹⁷⁾ 一方で、TNBS および DSS 投与大腸炎モデルマウスにおいては、ZO-1 をノックアウトすると腸粘膜透過性の亢進や Lgr5 mRNA 発現が減少することを報告している。⁹⁷⁾ さらに ZO-1 ノックアウト大腸炎誘発マウスの結腸では、粘膜修復過程における紡錘体の配向不全によるアポトーシスの増加や細胞増殖能の低下もみられる。⁹⁷⁾ これらのことから ZO-1 は組織障害後の粘膜修復時において重要な役割を担うと考えられ、本研究において認められた MTX 投与による ZO-1 mRNA 発現の上昇は、MTX 投与による小腸組織障害を修復する過程にみられたものである可能性がある。従って、本実験条件における各薬物投与による ZO-1 mRNA 発現量の変動は、間接的に小腸組織障害の程度とその修復過程を反映していると考えられる。事実、第 1 章における小腸 HE 染色像で明らかとなった MTX 投与による組織障害に及ぼす各用量のナファモスタットの影響と本章で明らかとなった ZO-1 mRNA 発現への各薬物の影響は一致している。

TNBS 投与 UC モデルラット結腸ではトリプターゼを含有するマスト細胞数が増加し、この増加が疾患の重症度と関連があることが報告されている。^{17,44)} また、IBS 患者の結腸粘膜では健常ヒト結腸と比較し、マスト細胞数が増加する。⁹⁸⁾ 従って、IBS 患者の結腸粘膜では、脱顆粒されるトリプターゼおよびヒスタミンが増加し、PAR-2 は長期的に活性化され、このことが IBD における痛みや腸機能不全と相関する一因となっている。⁹⁸⁾

以上第 3 章では、ナファモスタット 1 mg/kg が MTX 投与によるラット小腸 PAR-2 発現増加を抑制し、タイトジャンクション関連タンパク質 mRNA 発現を正常に保つことを明らかにした。今後、本実験条件におけるマスト細胞からの各セリンプロテアーゼの脱顆粒および小腸上皮細胞における PAR-2 刺激からのタイトジャンクション機能変化に関わるシグナル伝達をさらに詳細に検討することで、低用量ナファモスタットによる抗がん薬誘起性消化管障害および小腸 5-HT ならびにサブスタンス P 合成系亢進作用の機序を明らかにすることができると考えられた。

総括

既存薬を新たな疾患の治療薬として利用するドラッグリポジショニングは、対象薬物の薬理的な効果や安全性が確認されていること、上市されているので臨床試験の早期相を短縮でき、開発費が安価なことから治療費も安くなることなど大きな利点がある。近年、盛んにドラッグリポジショニング研究が行われており、それに伴いドラッグリポジショニングに関連した論文数が増加している。

抗がん薬の代表的な副作用には、消化管障害や骨髄抑制などがあり、これらの発現は患者の QOL 低下や治療の中断を余儀なくされる場合がある。そのため、抗がん薬の副作用に対する支持療法薬の探索を続けることは患者の QOL 維持や疾患の治療効果にもつながる。

本研究では、MTX による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ドラッグリポジショニングとして応用できる可能性を明らかにするため、まず MTX 投与によるラット小腸組織障害および炎症反応に及ぼすナファモスタットの影響について検討した。次に MTX 投与によるラット小腸 5-HT およびサブスタンス P 合成系亢進に及ぼすナファモスタットの影響について検討し、最後に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について検討した。

第 1 章では、MTX 投与によるラット小腸組織障害および炎症反応に及ぼすナファモスタットの影響について検討した。ナファモスタット単独投与は本研究で使用したいずれの用量においても、ラットの健康状態、小腸組織像、MPO 発現、炎症性サイトカインおよび COX-2 発現に影響を与えなかった。ナファモスタット 1 mg/kg は MTX 投与によるラット健康状態の悪化を有意に抑制したが、ナファモスタット 3 mg/kg は影響を与えず、ナファモスタット 10 mg/kg はこれを一部さらに悪化させた。ナファモスタット 1 mg/kg は、MTX 投与による小腸組織障害および MPO 発現増加を有意に抑制した。一方、ナファモスタット 3 mg/kg および 10 mg/kg は MTX 投与による小腸組織障害に著明な影響を与えなかった。ナファモスタット 1 mg/kg は MTX 投与による炎症性サイトカイン mRNA 発現増加を有意に抑制したが、ナファモスタット 3 mg/kg は影響を与えず、ナファモスタット 10 mg/kg は MTX 投与による TNF- α mRNA 発現増加をさらに悪化させた。さらにナファモスタット 1 mg/kg は MTX 投与による COX-2 発現増加を抑制し、ナファモスタット 3 mg/kg および 10 mg/kg は影響を与えなかった。以上の結果から、低用量の

ナファモスタットは MTX 誘起性小腸組織障害を抑制し、MTX 投与によるラットの健康状態悪化を抑制することを明らかにした。また、低用量のナファモスタットのみが MTX 投与によるラット小腸組織障害および健康状態の悪化を抑制したことから、これらの抑制作用機序にトリプターゼ阻害による PAR-2 活性化の阻害が関与している可能性が考えられた。

第 2 章では、MTX 投与によるラット小腸 5-HT およびサブスタンス P 合成系亢進に及ぼすナファモスタットの影響を検討した。ナファモスタット 1 mg/kg は MTX 投与によるラット小腸 5-HT 含量増加および TPH1 mRNA を有意に抑制したが、ナファモスタット 3 mg/kg および 10 mg/kg はこれに影響を与えなかった。ナファモスタット 1 mg/kg は MTX 投与による TPH 活性上昇を有意に抑制したが、ナファモスタット 3 mg/kg は影響を与えず、ナファモスタット 10 mg/kg はこれをさらに上昇させた。ナファモスタット 1 mg/kg は MTX 投与による抗 TPH 抗体陽性細胞数増加を抑制する傾向を示す一方、ナファモスタット 3 mg/kg は影響を与えなかった。またナファモスタット 1 mg/kg は、MTX 投与による 5-HIAA 含量を抑制する傾向を示したが、ナファモスタット 3 mg/kg および 10 mg/kg は影響を与えなかった。本研究で用いたナファモスタットのいずれの用量においても MAO 活性に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 投与による抗サブスタンス P 陽性細胞数増加を有意に抑制したが、ナファモスタット 3 mg/kg は影響を与えなかった。また、ナファモスタット 1 mg/kg は MTX 投与による PPT-A mRNA 発現増加を有意に抑制したが、ナファモスタット 3 mg/kg および 10 mg/kg はこれに影響を与えなかった。以上の結果から、ナファモスタットは MTX 投与によるラット小腸 5-HT 合成系およびサブスタンス P 合成系亢進を抑制することが明らかとなった。これらの結果から、ナファモスタットは、消化管障害抑制作用のみならず、制吐作用も有することが期待された。また、MTX 投与による小腸 5-HT 合成並びにサブスタンス P 合成系亢進作用に対する抑制作用も、低用量のナファモスタットのみで認められたことから、これらの抑制作用の機序にもトリプターゼ阻害による PAR-2 活性化阻害が関与している可能性が考えられた。

第 3 章では、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について検討した。ラット小腸では PAR-1~3 mRNA 発現が認められた。また MTX 投与は PAR-2 mRNA 発現を増加させ、ナファモスタット 1 mg/kg はこれを有意に抑制したが、ナファモスタット 10 mg/kg は影響を与えなかった。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たが、ナファモスタット 10 mg/kg はこれに影響を与えなかった。また、ナフ

アマスタット 1 mg/kg は MTX 投与による ZO-1 mRNA 発現増加を抑制させる傾向を示したが、ナファモスタット 10 mg/kg は MTX はこれをさらに有意に増加させた。以上の結果から、ナファモスタット 1 mg/kg が MTX 投与によるラット小腸 PAR-2 発現増加を抑制し、タイトジャンクション関連タンパク質 mRNA 発現を正常に保つことにより、MTX 誘起性小腸組織障害を抑制したと考えられた。

本研究により、低用量のナファモスタットは MTX 投与による小腸組織障害および 5-HT 合成亢進並びにサブスタンス P 合成亢進を抑制することを明らかにした。またこの機序に、ナファモスタットが MTX 投与による PAR-2 mRNA 発現増加を抑制し、タイトジャンクション関連タンパク質 mRNA 発現を正常に保つことが関連している可能性を示した。今後、抗がん薬投与による小腸でのマスト細胞からのトリプターゼ遊離および PAR-2 活性化、さらに PAR-2 活性化による細胞内シグナル伝達などに及ぼすナファモスタットの影響を検討することで、ナファモスタットの詳細な作用機序を明らかにできると考えられた。本研究で明らかになった知見は、抗がん薬誘起性消化管障害に対してナファモスタットが支持療法薬として有効である可能性を示し、ドラッグリポジショニングの観点からも有用であると考えられた。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究に際し終始御懇篤な御指導、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 飯塚健治教授に深甚なる感謝の意を表します。

本研究を遂行するにあたり、終始有益な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、北海道医療大学大学院薬学研究科衛生化学分野 浜上尚也教授、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、有益なご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 柳川芳毅教授、小田雅子准教授、中川勉准教授に心より感謝いたします。

本研究に際し、多大なるご協力とご支援を賜りました北海道医療大学薬学部薬理学講座（病態生理学）の皆様感謝いたします。

最後に、終始暖かく見守り、貴重な研究生活の機会を与えてくれた妻と子供たちに心から感謝します。

令和5年3月31日

北海道医療大学大学院薬学研究科

山本 隆弘

引用文献

- 1) Masuda T., Tsuruda Y., Matsumoto Y., Uchida H., Nakayama K. I., Mimori K., Drug repositioning in cancer: The current situation in Japan. *Cancer Sci.*, **111**, 1039–1046 (2020).
- 2) 齊藤 聡, 山本 由, 猪原 匡, 老年医学の展望 ドラッグ・リポジショニングの新展開. 日本老年医学会雑誌, **52**, 200–205 (2015).
- 3) Shah R. R., Stonier P. D., Repurposing old drugs in oncology: Opportunities with clinical and regulatory challenges ahead. *J. Clin. Pharm. Ther.*, **44**, 6–22 (2019).
- 4) 吉岡 弘, 細胞障害性化学療法の基本. 肺癌, **59**, 1111–1114 (2019).
- 5) Cronstein B. N., Aune T. M., Methotrexate and its mechanisms of action in inflammatory arthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.*, **16**, 145–154 (2020).
- 6) Herman R. A., Veng-Pedersen P., Hoffman J., Koehnke R., Furst D. E., Pharmacokinetics of low-dose methotrexate in rheumatoid arthritis patients. *J. Pharm. Sci.*, **78**, 165–171 (1989).
- 7) 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).
- 8) 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).
- 9) Kolli V. K., Natarajan K., Isaac B., Selvakumar D., Abraham P., Mitochondrial dysfunction and respiratory chain defects in a rodent model of methotrexate-induced enteritis. *Hum. Exp. Toxicol.*, **33**, 1051–1065 (2014).
- 10) Kremer J. M., Toward a better understanding of methotrexate. *Arthritis Rheum.*, **50**, 1370–1382 (2004).
- 11) Fujii S., Hitomi Y., New synthetic inhibitors of C1r, C1 esterase, thrombin, plasmin, kallikrein and trypsin. *Biochim. Biophys. Acta*, **661**, 342 (1981).
- 12) Hartley B. S., Proteolytic enzymes. *Annu. Rev. Biochem.*, **29**, 45–72 (1960).
- 13) Aoyama T., Ino Y., Ozeki M., Oda M., Sato T., Koshiyama Y., Suzuki S., Fujita M., Pharmacological studies of FUT-175, nafamstat mesilate. I. Inhibition of protease activity in in vitro and in vivo experiments. *Jpn. J. Pharmacol.*, **35**, 203–227 (1984).

- 14) Iwaki M., Ino Y., Motoyoshi A., Ozeki M., Sato T., Kurumi M., Aoyama T., Pharmacological studies of FUT-175, nafamostat mesilate. V. Effects on the pancreatic enzymes and experimental acute pancreatitis in rats. *Jpn. J. Pharmacol.*, **41**, 155–162 (1986).
- 15) Yamamoto M., Matsuyama S., Li X., Takeda M., Kawaguchi Y., Inoue J. I., Matsuda Z., Identification of nafamostat as a potent inhibitor of middle east respiratory syndrome coronavirus S protein-mediated membrane fusion using the split-protein-based cell-cell fusion assay. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **60**, 6532–6539 (2016).
- 16) Okugawa S., Ikeda M., Kashiwabara K., Moritoyo T., Kohsaka T., Shimizu T., Hagiya H., Hasegawa K., Otsuka F., Miwa A., Kisimoto N., Mizoguchi A., Imamura A., Ikeuchi K., Tsutsumi T., Jubishi D., Hashimoto H., Okamoto K., Harada S., Inoue J. I., Seto Y., Moriya K., Antiviral effect and safety of nafamostat mesilate in patients with mild early-onset COVID-19: An exploratory multicentre randomized controlled clinical trial. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **62**, 106922 (2023).
- 17) Isozaki Y., Yoshida N., Kuroda M., Handa O., Takagi T., Kokura S., Ichikawa H., Naito Y., Okanoue T., Yoshikawa T., Anti-tryptase treatment using nafamostat mesilate has a therapeutic effect on experimental colitis. *Scand. J. Gastroenterol.*, **41**, 944–953 (2006).
- 18) Ceuleers H., Hanning N., Heirbaut J., Van Remoortel S., Joossens J., Van Der Veken P., Francque S. M., De Bruyn M., Lambeir A. M., De Man J. G., Timmermans J. P., Augustyns K., De Meester I., De Winter B. Y., Newly developed serine protease inhibitors decrease visceral hypersensitivity in a post-inflammatory rat model for irritable bowel syndrome. *Br. J. Pharmacol.*, **175**, 3516–3533 (2018).
- 19) Kikuchi K., Hamaue N., Machida T., Iizuka K., Minami M., Hirafuji M., Effects of nafamostat mesilate on 5-hydroxytryptamine release from isolated ileal tissues induced by anti-cancer drugs in rats. *Biomed. Res.*, **41**, 253–257 (2020).
- 20) 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).
- 21) Ju C., Hamaue N., Machida T., Liu Y., Iizuka K., Wang Y., Minami M., Hirafuji M., Anti-inflammatory drugs ameliorate opposite enzymatic changes in ileal 5-hydroxytryptamine metabolism in the delayed phase after cisplatin administration to rats. *Eur. J. Pharmacol.*, **589**, 281–287 (2008).

- 22) 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).
- 23) 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).
- 24) 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).
- 25) Machida T., Inotani A., Shiga S., Kon S., Yanada T., Kobayashi H., Hamaue N., Hirafuji M., Iizuka K., Role of nitric oxide in the change of 5-hydroxytryptamine synthesis in the intestine by a consecutive administration of methotrexate to rats. *Pharmacology*, **105**, 723–728 (2020).
- 26) Kamiya A., Machida T., Hirano M., Machida M., Shiga S., Hamaue N., Hirafuji M., Iizuka K., Administration of cyclophosphamide to rats induces pica and potentiates 5-hydroxytryptamine synthesis in the intestine without causing severe intestinal injury. *J. Pharmacol. Sci.*, **147**, 251–259 (2021).
- 27) Kim J. A., Choi S. C., Yun K. J., Kim D. K., Han M. K., Seo G. S., Yeom J. J., Kim T. H., Nah Y. H., Lee Y. M., Expression of protease-activated receptor 2 in ulcerative colitis. *Inflamm. Bowel Dis.*, **9**, 224–229 (2003).
- 28) Kawabata A., Matsunami M., Sekiguchi F., Gastrointestinal roles for proteinase-activated receptors in health and disease. *Br. J. Pharmacol.*, **153 Suppl 1**, S230–S240 (2008).
- 29) Yoshida N., Yoshikawa T., Basic and translational research on proteinase-activated receptors: implication of proteinase/proteinase-activated receptor in gastrointestinal inflammation. *J. Pharmacol. Sci.*, **108**, 415–421 (2008).
- 30) Kawabata A., Kuroda R., Protease-activated receptor (PAR), a novel family of G protein-coupled seven trans-membrane domain receptors: activation mechanisms and physiological roles. *Jpn. J. Pharmacol.*, **82**, 171–174 (2000).
- 31) Guenther F., Melzig M. F., Protease-activated receptors and their biological role - focused on skin inflammation. *J. Pharm. Pharmacol.*, **67**, 1623–1633 (2015).

- 32) Ossovskaya V. S., Bunnett N. W., Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease. *Physiol. Rev.*, **84**, 579–621 (2004).
- 33) Zhuo X., Wu Y., Fu X., Liang X., Xiang Y., Li J., Mao C., Jiang Y., The Yin-Yang roles of protease-activated receptors in inflammatory signalling and diseases. *FEBS J.*, **289**, 4000–4020 (2022).
- 34) Heuberger D. M., Schuepbach R. A., Protease-activated receptors (PARs): mechanisms of action and potential therapeutic modulators in PAR-driven inflammatory diseases. *Thromb. J.*, **17**, 4 (2019).
- 35) Li S., Guan J., Ge M., Huang P., Lin Y., Gan X., Intestinal mucosal injury induced by tryptase-activated protease-activated receptor 2 requires β -arrestin-2 in vitro. *Mol. Med. Rep.*, **12**, 7181–7187 (2015).
- 36) Hamada K., Shitara Y., Sekine S., Horie T., Zonula Occludens-1 alterations and enhanced intestinal permeability in methotrexate-treated rats. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **66**, 1031–1038 (2010).
- 37) Furuse M., Hirase T., Itoh M., Nagafuchi A., Yonemura S., Tsukita S., Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J. Cell Biol.*, **123**, 1777–1788 (1993).
- 38) Bazzoni G., Dejana E., Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiol. Rev.*, **84**, 869–901 (2004).
- 39) Umeda K., Matsui T., Nakayama M., Furuse K., Sasaki H., Furuse M., Tsukita S., Establishment and characterization of cultured epithelial cells lacking expression of ZO-1. *J. Biol. Chem.*, **279**, 44785–44794 (2004).
- 40) Tsukita S., Katsuno T., Yamazaki Y., Umeda K., Tamura A., Roles of ZO-1 and ZO-2 in establishment of the belt-like adherens and tight junctions with paracellular permselective barrier function. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1165**, 44–52 (2009).
- 41) Tao Y., Yue M., Lv C., Yun X., Qiao S., Fang Y., Wei Z., Xia Y., Dai Y., Pharmacological activation of ER β by arctigenin maintains the integrity of intestinal epithelial barrier in inflammatory bowel diseases. *FASEB J.*, **34**, 3069–3090 (2020).
- 42) Jacob C., Yang P. C., Darmoul D., Amadesi S., Saito T., Cottrell G. S., Coelho A. M., Singh P., Grady E. F., Perdue M., Bunnett N. W., Mast cell tryptase controls paracellular permeability of the intestine. Role of protease-activated receptor 2 and beta-arrestins. *J. Biol. Chem.*, **280**, 31936–31948 (2005).
- 43) Shiga S., Machida T., Yanada T., Machida M., Hirafuji M., Iizuka K., The role of nitric oxide in small intestine differs between a single and a consecutive administration of methotrexate to rats. *J. Pharmacol. Sci.*, **143**, 30–38 (2020).

- 44) Cho E. Y., Choi S. C., Lee S. H., Ahn J. Y., Im L. R., Kim J. H., Xin M., Kwon S. U., Kim D. K., Lee Y. M., Nafamostat mesilate attenuates colonic inflammation and mast cell infiltration in the experimental colitis. *Int. Immunopharmacol.*, **11**, 412–417 (2011).
- 45) Otagiri S., Ohnishi S., Ohara M., Fu Q., Yamamoto K., Katsurada T., Sakamoto N., Oleoylethanolamide ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis in rats. *Front. Pharmacol.*, **11**, 1277 (2020).
- 46) Ong Z. Y., Gibson R. J., Bowen J. M., Stringer A. M., Darby J. M., Logan R. M., Yeoh A. S., Keefe D. M., Pro-inflammatory cytokines play a key role in the development of radiotherapy-induced gastrointestinal mucositis. *Radiat. Oncol.*, **5**, 22 (2010).
- 47) 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**, 1317–1327 (2015).
- 48) 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).
- 49) Liu W., Saint D. A., 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).
- 50) Laemmli U. K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680–685 (1970).
- 51) Food and Drug Administration. “Guidance for industry: estimating the maximum safe starting dose in initial clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers.” : <<https://www.fda.gov/media/72309/download>>, cited 5 September, 2023.
- 52) Mori S., Itoh Y., Shinohata R., Sendo T., Oishi R., Nishibori M., Nafamostat mesilate is an extremely potent inhibitor of human tryptase. *J. Pharmacol. Sci.*, **92**, 420–423 (2003).
- 53) Boukhattala N., Leblond J., Claeysens S., Faure M., Le Pessot F., Bôle-Feysot C., Hassan A., Mettraux C., Vuichoud J., Lavoine A., Breuillé D., Déchelotte P., Coëffier M., Methotrexate induces intestinal mucositis and alters gut protein metabolism independently of reduced food intake. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **296**, E182–E190 (2009).

- 54) Cinausero M., Aprile G., Ermacora P., Basile D., Vitale M. G., Fanotto V., Parisi G., Calvetti L., Sonis S. T., New Frontiers in the pathobiology and treatment of cancer regimen-related mucosal injury. *Front. Pharmacol.*, **8**, 354 (2017).
- 55) Howarth G. S., Francis G. L., Cool J. C., Xu X., Byard R. W., Read L. C., Milk growth factors enriched from cheese whey ameliorate intestinal damage by methotrexate when administered orally to rats. *J. Nutr.*, **126**, 2519–2530 (1996).
- 56) McElroy S. J., Hobbs S., Kallen M., Tejera N., Rosen M. J., Grishin A., Matta P., Schneider C., Upperman J., Ford H., Polk D. B., Weitkamp J. H., Transactivation of EGFR by LPS induces COX-2 expression in enterocytes. *PLoS One*, **7**, e38373 (2012).
- 57) Frungieri M. B., Weidinger S., Meineke V., Köhn F. M., Mayerhofer A., Proliferative action of mast-cell tryptase is mediated by PAR2, COX2, prostaglandins, and PPAR gamma: Possible relevance to human fibrotic disorders. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **99**, 15072–15077 (2002).
- 58) Fornai M., Colucci R., Pellegrini C., Benvenuti L., Natale G., Ryskalin L., Blandizzi C., Antonioli L., Role of proteinase-activated receptors 1 and 2 in nonsteroidal anti-inflammatory drug enteropathy. *Pharmacol. Rep.*, **72**, 1347–1357 (2020).
- 59) Chen G., Yang Y., Gao X., Dou Y., Wang H., Han G., Wang R., Wang J., Wang L., Li X., Guo R., Xiao H., Shen B., Li Y., Blockade of complement activation product C5a activity using specific antibody attenuates intestinal damage in trinitrobenzene sulfonic acid induced model of colitis. *Lab. Invest.*, **91**, 472–483 (2011).
- 60) Boehm T., Alix M., Petroczi K., Vakal S., Gludovacz E., Borth N., Salminen T. A., Jilma B., Nafamostat is a potent human diamine oxidase inhibitor possibly augmenting hypersensitivity reactions during nafamostat administration. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **382**, 113–122 (2022).
- 61) Winterkamp S., Weidenhiller M., Otte P., Stolper J., Schwab D., Hahn E. G., Raithel M., Urinary excretion of N-methylhistamine as a marker of disease activity in inflammatory bowel disease. *Am. J. Gastroenterol.*, **97**, 3071–3077 (2002).
- 62) Wechsler J. B., Szabo A., Hsu C. L., Krier-Burris R. A., Schroeder H. A., Wang M. Y., Carter R. G., Velez T. E., Aguiniga L. M., Brown J. B., Miller M. L., Wershil B. K., Barrett T. A., Bryce P. J., Histamine drives severity of innate inflammation via histamine 4 receptor in murine experimental colitis. *Mucosal Immunol.*, **11**, 861–870 (2018).

- 63) Minami M., Endo T., Hirafuji M., Hamaue N., Liu Y., Hiroshige T., Nemoto M., Saito H., Yoshioka M., Pharmacological aspects of anticancer drug-induced emesis with emphasis on serotonin release and vagal nerve activity. *Pharmacol. Ther.*, **99**, 149–165 (2003).
- 64) Dunlop S. P., Coleman N. S., Blackshaw E., Perkins A. C., Singh G., Marsden C. A., Spiller R. C., Abnormalities of 5-hydroxytryptamine metabolism in irritable bowel syndrome. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, **3**, 349–357 (2005).
- 65) Spiller R., Recent advances in understanding the role of serotonin in gastrointestinal motility in functional bowel disorders: alterations in 5-HT signalling and metabolism in human disease. *Neurogastroenterol. Motil.*, **19 Suppl 2**, 25–31 (2007).
- 66) Spiller R., Serotonin and GI clinical disorders. *Neuropharmacology*, **55**, 10721080 (2008).
- 67) Vermeulen W., De Man J. G., Pelckmans P. A., De Winter B. Y., Neuroanatomy of lower gastrointestinal pain disorders. *World J. Gastroenterol.*, **20**, 1005–1020 (2014).
- 68) Bellono N. W., Bayrer J. R., Leitch D. B., Castro J., Zhang C., O'Donnell T. A., Brierley S. M., Ingraham H. A., Julius D., Enterochromaffin cells are gut chemosensors that couple to sensory neural pathways. *Cell*, **170**, 185–198. e116 (2017).
- 69) Yu P. L., Fujimura M., Okumiya K., Kinoshita M., Hasegawa H., Fujimiya M., Immunohistochemical localization of tryptophan hydroxylase in the human and rat gastrointestinal tracts. *J. Comp. Neurol.*, **411**, 654–665 (1999).
- 70) Simon C., Portalier P., Chamoin M. C., Ternaux J. P., Substance P like-immunoreactivity release from enterochromaffin cells of rat caecum mucosa. Inhibition by serotonin and calcium-free medium. *Neurochem. Int.*, **20**, 529–536 (1992).
- 71) Kuhn D. M., Vogel R. L., Lovenberg W., Calcium-dependent activation of tryptophan hydroxylase by ATP and magnesium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **82**, 759–766 (1978).
- 72) Berner J., Ringstedt T., Brodin E., Hökfelt T., Lagercrantz H., Wickström R., Prenatal exposure to nicotine affects substance p and preprotachykinin-A mRNA levels in newborn rat. *Pediatr. Res.*, **64**, 621–624 (2008).
- 73) Krajl M., A rapid microfluorimetric determination of monoamine oxidase. *Biochem. Pharmacol.*, **14**, 1684–1686 (1965).
- 74) 日本癌治療学会, 制吐薬適正使用ガイドライン, 金原出版 (2023).

- 75) Barker N., van Es J. H., Kuipers J., Kujala P., van den Born M., Cozijnsen M., Haegebarth A., Korving J., Begthel H., Peters P. J., Clevers H., Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature*, **449**, 1003–1007 (2007).
- 76) Machida M., Machida T., Kikuchi M., Shimizu A., Ida S., Tawaraya Y., Kato R., Haramaki K., Yama K., Shiga S., Hirafuji M., Iizuka K., Methotrexate mediates the integrity of intestinal stem cells partly through nitric oxide-dependent Wnt/ β -catenin signaling in methotrexate-induced rat ileal mucositis. *J. Pharmacol. Sci.*, **148**, 281–285 (2022).
- 77) Hargreaves R., Ferreira J. C., Hughes D., Brands J., Hale J., Mattson B., Mills S., Development of aprepitant, the first neurokinin-1 receptor antagonist for the prevention of chemotherapy-induced nausea and vomiting. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1222**, 40–48 (2011).
- 78) Minami M., Endo T., Kikuchi K., Ihira E., Hirafuji M., Hamaue N., Monma Y., Sakurada T., Tan-no K., Kisara K., Antiemetic effects of sendide, a peptide tachykinin NK1 receptor antagonist, in the ferret. *Eur. J. Pharmacol.*, **363**, 49–55 (1998).
- 79) Cuffe J. E., Bertog M., Velázquez-Rocha S., Dery O., Bunnett N., Korbmacher C., Basolateral PAR-2 receptors mediate KCl secretion and inhibition of Na⁺ absorption in the mouse distal colon. *J. Physiol.*, **539**, 209–222 (2002).
- 80) Nguyen C., Coelho A. M., Grady E., Compton S. J., Wallace J. L., Hollenberg M. D., Cenac N., Garcia-Villar R., Bueno L., Steinhoff M., Bunnett N. W., Vergnolle N., Colitis induced by proteinase-activated receptor-2 agonists is mediated by a neurogenic mechanism. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **81**, 920–927 (2003).
- 81) Hirafuji M., Minami M., Endo T., Ogawa T., Kato K., Yoshioka M., Parvez S. H., Intracellular regulatory mechanisms of 5-HT release from enterochromaffin cells in intestinal mucosa. *Biog. Amines*, **16**, 29–52 (2000).
- 82) Li Z., Zhang X. J., Xu H. X., Sung J. J., Bian Z. X., Intracolonic administration of protease-activated receptor-2 agonists produced visceral hyperalgesia by up-regulating serotonin in the colon of rats. *Eur. J. Pharmacol.*, **606**, 199–204 (2009).
- 83) Wingren U., Enerbäck L., Ahlman H., Allenmark S., Dahlström A., Amines of the mucosal mast cell of the gut in normal and nematode infected rats. *Histochemistry*, **77**, 145–158 (1983).

- 84) Dugina T. N., Kiseleva E. V., Glusa E., Strukova S. M., Activation of mast cells induced by agonists of proteinase-activated receptors under normal conditions and during acute inflammation in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, **471**, 141–147 (2003).
- 85) Kong W., McConalogue K., Khitin L. M., Hollenberg M. D., Payan D. G., Böhm S. K., Bunnett N. W., Luminal trypsin may regulate enterocytes through proteinase-activated receptor 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **94**, 8884–8889 (1997).
- 86) Cerejido M., González-Mariscal L., Contreras R. G., Gallardo J. M., García-Villegas R., Valdés J., The making of a tight junction. *J. Cell Sci. Suppl.*, **17**, 127–132 (1993).
- 87) Wang H., Ubl J. J., Reiser G., Four subtypes of protease-activated receptors, co-expressed in rat astrocytes, evoke different physiological signaling. *Glia*, **37**, 53–63 (2002).
- 88) Bhatt D. K., Ploug K. B., Ramachandran R., Olesen J., Gupta S., Activation of PAR-2 elicits NO-dependent and CGRP-independent dilation of the dural artery. *Headache*, **50**, 1017–1030 (2010).
- 89) Chaves F. M., Baptista I. L., Simabuco F. M., Quaresma P. G. F., Pena F. L., Bezerra R. M. N., Pauli J. R., da Cunha D. T., Campos-Ferraz P. L., Antunes A. E. C., High-intensity-exercise-induced intestinal damage is protected by fermented milk supplemented with whey protein, probiotic and pomegranate (*Punica granatum* L.). *Br. J. Nutr.*, **119**, 896–909 (2018).
- 90) North R. A., P2X receptors. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **371** (2016).
- 91) von Kügelgen I., Pharmacological characterization of P2Y receptor subtypes - an update. *Purinergic Signal.*, (2023).
- 92) Kurashima Y., Amiya T., Nochi T., Fujisawa K., Haraguchi T., Iba H., Tsutsui H., Sato S., Nakajima S., Iijima H., Kubo M., Kunisawa J., Kiyono H., Extracellular ATP mediates mast cell-dependent intestinal inflammation through P2X7 purinoceptors. *Nat. Commun.*, **3**, 1034 (2012).
- 93) Matsuoka I., Yoshida K., Ito M. A., Purinergic regulation of mast cell function: P2X4 receptor-mediated enhancement of allergic responses. *J. Pharmacol. Sci.*, **150**, 94–99 (2022).
- 94) Cenac N., Coelho A. M., Nguyen C., Compton S., Andrade-Gordon P., MacNaughton W. K., Wallace J. L., Hollenberg M. D., Bunnett N. W., Garcia-Villar R., Bueno L., Vergnolle N., Induction of intestinal inflammation in mouse by activation of proteinase-activated receptor-2. *Am. J. Pathol.*, **161**, 1903–1915 (2002).

- 95) Róka R., Demaude J., Cenac N., Ferrier L., Salvador-Cartier C., Garcia-Villar R., Fioramonti J., Bueno L., Colonic luminal proteases activate colonocyte proteinase-activated receptor-2 and regulate paracellular permeability in mice. *Neurogastroenterol. Motil.*, **19**, 57–65 (2007).
- 96) Kucharzik T., Walsh S. V., Chen J., Parkos C. A., Nusrat A., Neutrophil transmigration in inflammatory bowel disease is associated with differential expression of epithelial intercellular junction proteins. *Am. J. Pathol.*, **159**, 2001-2009 (2001).
- 97) Kuo W. T., Zuo L., Odenwald M. A., Madha S., Singh G., Gurniak C. B., Abraham C., Turner J. R., The tight junction protein ZO-1 is dispensable for barrier function but critical for effective mucosal repair. *Gastroenterology*, **161**, 1924–1939 (2021).
- 98) Barbara G., Stanghellini V., De Giorgio R., Cremon C., Cottrell G. S., Santini D., Pasquinelli G., Morselli-Labate A. M., Grady E. F., Bunnett N. W., Collins S. M., Corinaldesi R., Activated mast cells in proximity to colonic nerves correlate with abdominal pain in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*, **126**, 693–702 (2004).