

# インドメタシン誘発ラット小腸潰瘍モデルにおけるマクロファージ関連 matrix metalloproteinases (MMPs) の役割

松本 啓志

【目的】 Crohn 病の実験モデルである、インドメタシン誘発ラット小腸潰瘍モデルにおけるマクロファージ関連 matrix metalloproteinases (MMPs) の関与について明らかにする。【方法】 6 週齢の雄性 Wistar 系ラットに、インドメタシン (Indo) 24 mg/kg を注腸し小腸縦走潰瘍を誘発した。小腸全長に対する全小腸縦走潰瘍長の占める割合である Ulcer Index (UI) と組織学的損傷スコア (HDS) を用いて小腸縦走潰瘍を経時的 (投与 6, 12, 24 時間後, 3, 7 日後) に評価し、小腸潰瘍部における MMP-2, -3, -9 の発現について、Western blotting, zymography, 免疫染色を用いて検討した。さらに小腸潰瘍抑制における MMP 阻害剤の効果を検討するために、まず広域 MMPs 阻害剤 (GM6001) を Indo 投与の 3 時間後に 1, 5, 10, 30 mg/kg の用量で腹腔内投与し、24 時間後の小腸潰瘍の程度を UI および HDS で評価し、MMP-3, -9 の発現についても、Western blotting, zymography, 免疫染色で検討した。次に選択的 MMP-3 阻害剤について、用量を変えて腹腔内投与し、同様に小腸潰瘍の程度を評価した。【結果】 小腸潰瘍は、UI, HDS ともに Indo 投与 24 時間後に最大値となったが、MMPs では MMP-3 が 24 時間後で最大値を示し、小腸潰瘍の肉眼的・組織学的変化と最も相関していた。MMP-9 は 6～12 時間に、MMP-2 では主に 3～7 日後に発現のピークを認めた。GM6001 は、用量依存的に肉眼的・組織学的に小腸潰瘍の発生を抑制し、MMP-3 の発現は潰瘍の程度と相関をもって抑制されていた。さらに選択的 MMP-3 阻害剤は、用量依存性に肉眼的・組織学的に小腸潰瘍の発生を抑制した。【結論】 本研究により、ラットの Indo 誘発小腸縦走潰瘍発生に、マクロファージ関連 MMPs, 特に MMP-3 が強く関与していることが明らかになった。この結果から、選択的 MMP-3 阻害剤は Crohn 病の治療に応用できる可能性がある。

(平成 15 年 10 月 6 日受理)

## Essential Role of Macrophage-related Matrix Metalloproteinases in Indomethacin-induced Enteropathy in Rats.

Hiroshi MATSUMOTO

**Background and Aims:** Matrix metalloproteinases (MMPs) play a key role in degradation and remodeling of the extracellular matrix in various inflammatory diseases. Intrarectal administration of indomethacin induces longitudinal ulcers of the small intestine in rats, similar to those in Crohn's diseases. The aim of this study was to investigate the role of macrophage-related MMPs in the

development of indomethacin-induced small intestinal ulcers in male Wistar rats. **Materials and Methods:** In the first experiment, we investigated serial changes in small intestinal ulcers and assessed the production of MMP-2, -3, and -9 by Western blotting, zymography, and immunohistochemistry. In the second experiment, we assessed the effect of a broad spectrum MMP inhibitor, GM6001, which was given intraperitoneally three hours after indomethacin administration. We evaluated small intestinal injury 24 hours after indomethacin administration by the methods used in the first experiment. In the third experiment, we administered selective MMP-3 inhibitor VI three hours after intrarectal indomethacin and assessed the small intestinal ulcers. **Results:** In the first experiment, the ulcer index of the small intestine and the histological damage score during the acute phase were at their peak at 24 hours after indomethacin administration. MMP-3 production was also at its peak at 24 hours after indomethacin administration. In the second experiment, intraperitoneal GM6001 inhibited the small intestinal ulcers in a dose-dependent fashion. The change in MMP-3, but not in MMP-2, and MMP-9, correlated positively with the change in the small intestinal ulcers after GM6001 treatment. In the third experiment, selective MMP-3 inhibitor VI also suppressed the small intestinal ulcers in a dose-dependent fashion. **Conclusions:** MMP-3 plays an essential role in indomethacin-induced enteropathy in rats. Regarding the equal efficacy of selective MMP-3 inhibitor VI and the broad-spectrum MMP inhibitor GM6001 against the experimental longitudinal ulcers of the small intestine, selective inhibition of MMP-3 may become a strong alternative in the management of Crohn's disease.

(Accepted on October 6, 2003) *Kawasaki Igakkaishi* 29(3):177-188, 2003

**Key Words** ① Matrix metalloproteinases ② Macrophage ③ Indomethacin  
④ Enteropathy ⑤ Matrix metalloproteinase inhibitor

## はじめに

生体内の組織は、細胞と細胞外 matrix から構成されている。細胞外 matrix は、組織構造や機能を調節しており、その分解は細胞機能の変化や組織破壊を引き起こす。Matrix metalloproteinases (MMPs) は、この細胞外 matrix を分解する酵素であり、生体組織の恒常性維持のための組織破壊に関与している。しかし、近年、癌の局所浸潤や転移に大きく関与することが注目され、さらには慢性関節リウマチなどの炎症性疾患でも、その成因としての動態が研究されつつある<sup>1)~4)</sup>。消化管の難治性慢性炎症性疾患である Crohn 病の生検組織において MMP-1, -3 の発現が亢進しているとの報告が散見される<sup>5)~12)</sup>。しかしながら、これらすべてが大腸組織での検討であり、小腸での検討は未だ報告されてい

ない。ゆえに、主病変が小腸であるとされている Crohn 病の病態が解明されるに至ってはいない。

本研究では、Crohn 病の実験モデルであるインドメタシン (Indomethacin, 以下 Indo) 誘発ラット小腸潰瘍モデルを用いて、その潰瘍形成におけるマクロファージに関連する MMPs の関与を明らかにするために、以下の検討を行った。

## 材料と方法

### 1. 使用動物

体重 190~220 g の 6 週齢雄性 Wistar 系ラット (チャールスリバー・ジャパン, 神奈川) を使用した。ラットは 5 週齢で購入、プラスチックケージにて自由摂水および自由摂餌 (オリエンタル酵母, 大阪) の条件下に 1 週間かけて馴化 (室温 23 ± 3 °C, 7 時~21 時まで照明) した。

## 2. Indo 誘発小腸縦走潰瘍モデルの作製

Matsumoto ら<sup>13)</sup>の報告に準じ、アモバルビタール 100 mg/kg の腹腔内投与による麻酔下で 1%カルボキシメチルセルロースナトリウム (CMC-Na) 液に懸濁した Indo (シグマ, 米国) を 24 mg/kg の用量でゾンデを用い経肛門的に単回投与した。小腸潰瘍の評価は、アモバルビタールの腹腔内過量投与で苦痛なく屠殺して、全小腸を摘出して行った。また、MMP の蛋白発現および酵素活性を検討するために潰瘍組織の一部を小腸摘出後、速やかに液体窒素に凍結保存した。また、1% CMC-Na 液のみを注腸したラットを control 群とした。以下の全ての各検討において各群のラット数は 6 匹とした。

## 3. Indo 誘発小腸縦走潰瘍形成過程における小腸潰瘍と MMPs 発現の経時的検討

Indo 投与後、6、12、24 時間および 3、7 日後に取り出した全小腸に関して、後述する方法で肉眼的、組織学的に小腸潰瘍を評価した。また、潰瘍部位の MMP-2、-3、-9 発現について、Western blotting, zymography, 免疫染色を用いて評価した。

## 4. Indo 誘発小腸縦走潰瘍に対する広域 MMP 阻害剤の効果

広域 MMP 阻害剤である GM6001 (カルビオケム, 独国) をジメチルスルフォキシド (DMSO) に溶解し、Indo 投与の 3 時間後に 1、5、10、30 mg/kg の 4 段階に分けて腹腔内投与した。Indo 投与 24 時間後に、小腸潰瘍の程度を肉眼的、組織学的に評価した。また、その小腸潰瘍部における MMP-3、-9 の発現を Western blotting, zymography, 免疫染色を用いて評価した。また、Indo 投与 3 時間後に DMSO 5 ml を腹腔内投与したものを Control (Vehicle 群) とした。

## 5. Indo 誘発小腸縦走潰瘍に対する選択的 MMP 阻害剤の効果

MMP-3 を選択的に阻害する MMP-3 inhibitor

VI (カルビオケム, 独国) を DMSO に溶解し、Indo 投与の 3 時間後に 0.1、0.5、1、5 mg/kg の 4 段階に分けて腹腔内投与し、Indo 24 時間後に小腸を摘出した。MMP-3 選択的阻害剤の効果は、肉眼的および組織学的に評価を行った。

## 6. 小腸病変の肉眼組織学的評価

取り出した全小腸を肉眼的に観察し、Matsumoto ら<sup>13)</sup>の方法に準じて評価した。すなわち、長径 10 mm 以上の潰瘍を縦走潰瘍と定義し (Fig. 1, 2), 全小腸の縦走潰瘍の長径を全て計測した上で、小腸全長に占める縦走潰瘍総計の割合を ulcer index (UI) (%) として算出し、小腸潰瘍の肉眼的評価の代表的指標とした。さらに、Table 1 に示すように、Vilaseca ら<sup>14)</sup>の方法を一部改定し、急性期および慢性期組織学的傷害スコア (Histological Damage Score, 以下 HDS) を用いて、潰瘍が最も高度な部分の組織学的評価を行った。炎症の組織学的な経

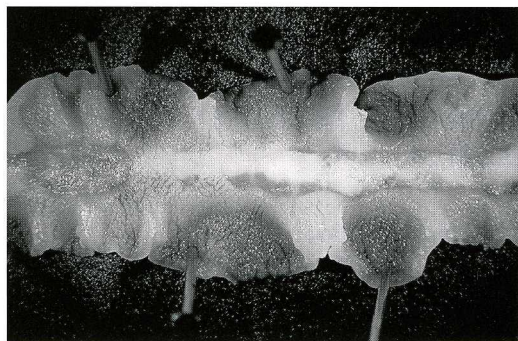


Fig. 1. Macroscopic view of a typical longitudinal ulcer of the small intestine in an indomethacin-treated rat.

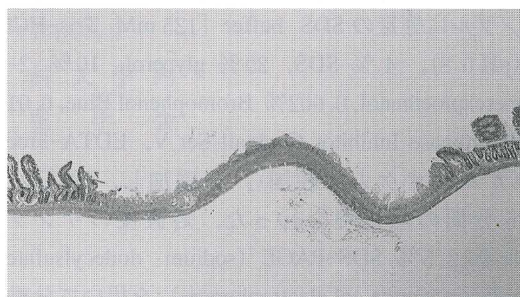


Fig. 2. Microscopic view of a typical longitudinal ulcer of the small intestine in an indomethacin-treated rat ( $\times 40$ , H&E).

**Table 1a.** Histological damage score of the small intestine in acute phase

Width of the ulceration	No ulcer	0
	< 3mm	1
	3mm~6mm	2
	> 6mm	3
Depth of the ulceration	None	0
	Mucosa	1
	Submucosa	2
	Muscularis propria	3
	Serosa	4
Neutrophil infiltration	None	0
	Mild	1
	Moderate	2
	Severe	3
Thrombi	No	0
	Yes	1
	Maximum score	11

時的变化をより反映させるため、炎症細胞浸潤を、急性期 HDS は好中球、慢性期 HDS はリンパ球浸潤とし、慢性期 HDS には線維化の項目を追加した。

## 7. Western blotting

抽出した小腸潰瘍部の凍結標本に sample buffer [20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.01% Brij-35] 40  $\mu$ l を加えて、ホモジネートし、その蛋白濃度を bicinchoninic acid (BCA) 法 (シグマ, 米国) にて測定した<sup>15)</sup>。1  $\mu$ g の蛋白を含むサンプルに等量の SDS buffer [125 mM Tris-HCl (pH 6.8), 4 % SDS, 20 % glycerol, 10 % 2-mercaptoethanol, 0.002% Bromophenol Blue, 0.01 % Protease Inhibitor Cocktail Set V, EDTA-Free (カルピオケム, 独国)] を添加し、100 $^{\circ}$ C, 5 分間の熱処理を行った。処置後のサンプルを 12.5% SDS-PAGE (sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis) を用いて分離した。泳動した gel から Hybond-P メンブレン (アマシャム, 英国) に蛋白を転写した。蛋白

**Table 1b.** Histological damage score of the small intestine in chronic phase

Width of the ulceration	No ulcer	0
	< 3mm	1
	3mm~6mm	2
	> 6mm	3
Depth of the ulceration	None	0
	Mucosa	1
	Submucosa	2
	Muscularis propria	3
	Serosa	4
Lymphocyte infiltration	None	0
	Mild	1
	Moderate	2
	Severe	3
Thrombi	No	0
	Yes	1
Fibrosis	None	0
	Mild~moderate	1
	Severe	2
	Maximum score	13

が転写されたメンブレンを 5 % スキムミルクで室温 4 $^{\circ}$ C の暗室下で一晩ブロッキングした後、ラットとの交叉性のある抗ヒト MMP-2, -3, -9 モノクローナル抗体 4  $\mu$ g/ml (第一ファインケミカル, 富山) と反応させた。Enhanced chemiluminescence detection 法 (ECL キット, アマシャム, 英国) にて、Hyperfilm ECL (アマシャム, 英国) に感光させ、画像を Macintosh Power Mac G4 (アップルコンピュータ, 米国) で、NIH Image 1.62 (U.S. National Institutes of Health, 米国) を用いて解析を行った。外部スタンダードとして Codak 製の external density standards を使用した。

## 8. zymography

MMP の酵素活性を測定するために、gelatin zymography を行った<sup>7), 16)</sup>。凍結標本を sample buffer 内でホモジネートした後、4 $^{\circ}$ C, 10000G

で20分間遠心分離した。蛋白を含む上清の蛋白濃度をBCA法で測定し、1  $\mu\text{g}$ の蛋白を含むサンプルに、3倍量のSDS buffer [0.5 M Tris-HCl (pH 6.8), SDS, 70% glycerol, 5% BPB]を混合したあと、4%ゼラチンを重合させた10% SDS-PAGEにて氷浴中電気泳動した。泳動終了後、ゲルを洗浄用 buffer [50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.1 M NaCl, 2.5% Triton X-100]に浸し1.5時間インキュベートした。その後、蛋白阻害剤 [終濃度 2 mM o-phenanthroline, 200  $\mu\text{M}$  Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF)] 加反応 buffer [1 M Tris-HCl (pH 7.5), 1 M  $\text{CaCl}_2$ , 1 mM  $\text{ZnCl}_2$ , 2%  $\text{NaN}_3$ ] で37 $^\circ\text{C}$ , 30時間インキュベートし、Coomassie blue R-250 (シグマ, 米国)にて染色, 洗浄し, 脱色部分を NIH Image で測定し, 酵素活性の指標とした。各活性型 MMPs 標準品 20  $\mu\text{l}$  [活性型 MMP-2+9, MMP-3, (ヤガイ研究所, 山形)] も同様の処置を行った。

## 9. 免疫染色

全小腸を摘出し、10%緩衝ホルマリンで即時固定して24時間後に小腸病変部を横断面でパラフィン包埋し、厚さ4  $\mu\text{M}$ の切片を作製した。この標本を脱パラフィンした後、室温で30分間1%  $\text{H}_2\text{O}_2$  加メタノールを用いて内因性ペルオキシダーゼ活性を阻害した。十分な洗浄後、ラットと交叉性のある抗ヒト MMPs 抗体 [抗ヒト MMP-2 抗体 (140倍希釈), 抗ヒト MMP-3 抗体 (60倍希釈), 抗ヒト MMP-2 抗体 (100倍希釈)] を1次抗体として室温4 $^\circ\text{C}$ の暗室下に一晚反応させ、ストレプトアビジン・ビオチン化ペルオキシダーゼ複合体法を用いて発色させた。核染色にはヘマトキシリンを用いた。小腸潰瘍部を中心部と辺縁部に分け、それぞれ3ヶ所ずつ1視野0.2  $\text{mm}^2$ における陽性細胞数を集計し、1視野あたりの平均値を陽性細胞数として算出した。

## 10. 統計解析

小腸潰瘍の UI, HDS, および MMPs 陽性細胞

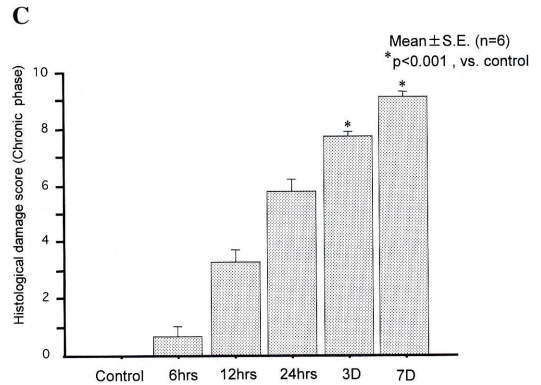
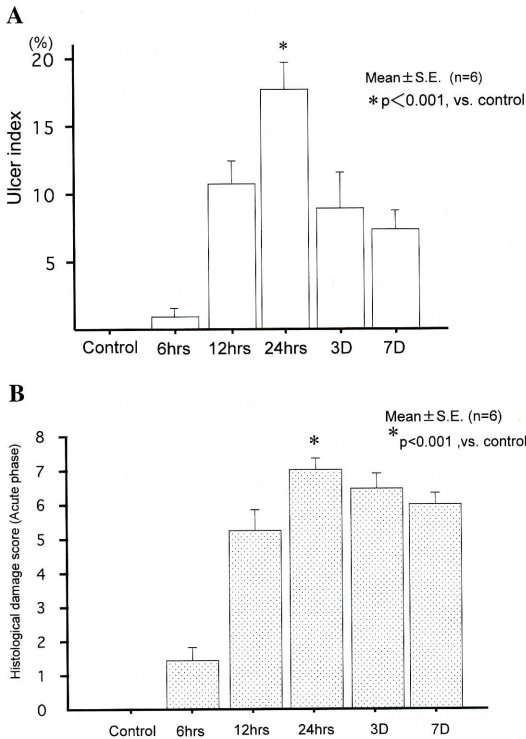
数は、平均値  $\pm$  標準誤差で表した。Western blotting, zymography による MMP 発現は、一定蛋白量の MMPs standard との比較値を平均値  $\pm$  標準誤差で表した。各群における統計学的有意差は一元配置分散分析法ならびに多重比較検定を用い、危険率  $p < 0.05$  の場合に統計学的有意差ありとした。なお解析は統計解析ソフト Macintosh 版 Stat View J-5.0 (SAS Institute, 米国)を用いて行った。

なお、本実験は川崎医科大学動物実験委員会 の承認 (No. 00-030, 01-050, 02-052, 03-049) を受け川崎医科大学動物実験指針に基づき行った。

## 結 果

### 1. Indo 誘発小腸縦走潰瘍形成過程における MMPs の発現と活性

小腸潰瘍の UI は、Indo 投与24時間後に18.1  $\pm$  4.8で最大となった (Fig. 3A)。急性期 HDS も24時間後に7.3  $\pm$  0.7と最大となったが、慢性期 HDS は経時的に増加し、7日目に9.3  $\pm$  0.5で最大となった (Fig. 3B, C)。Western blotting による MMPs 発現の変化を Figure 4A に示す。MMP-3 は、24時間後に4.2倍 (control との比較) と最大値を呈した。MMP-9 は12時間で3.3倍、MMP-2 は7日目に3.1倍で最大を示した。zymography による MMPs 活性の変化を Figure 4B に示す。MMP-3 活性は、24時間後に control の2.5倍となり最大を示した。MMP-9 は、12時間後に最大となったが、すべて control よりも低値であった。MMP-2 は、12時間後に4倍と最大になった。免疫染色による MMP 陽性細胞数の変化を、Figure 4C, D に示す。MMP-3 陽性細胞数は、24時間後に潰瘍中心部で29.4  $\pm$  4.1個、辺縁部で78.5  $\pm$  7.3個と最大値を示した。MMP-9 陽性細胞数は、3時間後の潰瘍中心部で4.2  $\pm$  0.5個、6時間後の潰瘍辺縁部で6.7  $\pm$  1.3個と最大値を示した。MMP-2 は、7日後の中心部で16.9  $\pm$  0.5個、3日後の辺縁部で14.1  $\pm$



**Fig. 3.** Serial changes in small intestinal ulcers. The ulcer index of the small intestine was at its peak at 24 hours after indomethacin administration (A). The histological damage score during the acute phase was at its peak at 24 hours after indomethacin administration (B). The histological damage score during the chronic phase increased in a time-dependent fashion (C).

3.0個と最大値を示した。

## 2. Indo 誘発小腸縦走潰瘍における GM6001 の抑制効果

GM6001 は、用量依存性に UI を抑制し、30 mg/kg 投与では、縦走潰瘍が全く誘発されなかった (Fig. 5A)。急性期 HDS も用量依存性に抑制された (Fig. 5B)。MMPs 蛋白発現の変化を Figure 5C に示す。GM6001 は、MMP-3 蛋白発現を用量依存性に抑制し、10 mg/kg で 99.5% の抑制率であった。MMP-9 発現は、1 mg/kg の低用量で 3.7 倍に増加したが、それ以上の量では低下傾向を示したが、いずれも Viechle 群よりも高値であった。MMP 活性の変化を、Fig. 5D に示す。蛋白発現と同様に、MMP-3 は用量依存性に低下し、10 mg/kg では 94% の抑制率を示した。MMP-9 は、1 mg/kg で vehicle の 1.8 倍に増加した。高用量になると低下傾向を示したが、10 mg/kg でも 64% の抑制率にとどまった。免疫染色による陽性細胞数の変化を Fig. 5E, F に示す。MMP-3 陽性細胞数は、潰

瘍中心部、辺縁部ともに用量依存性に減少した。

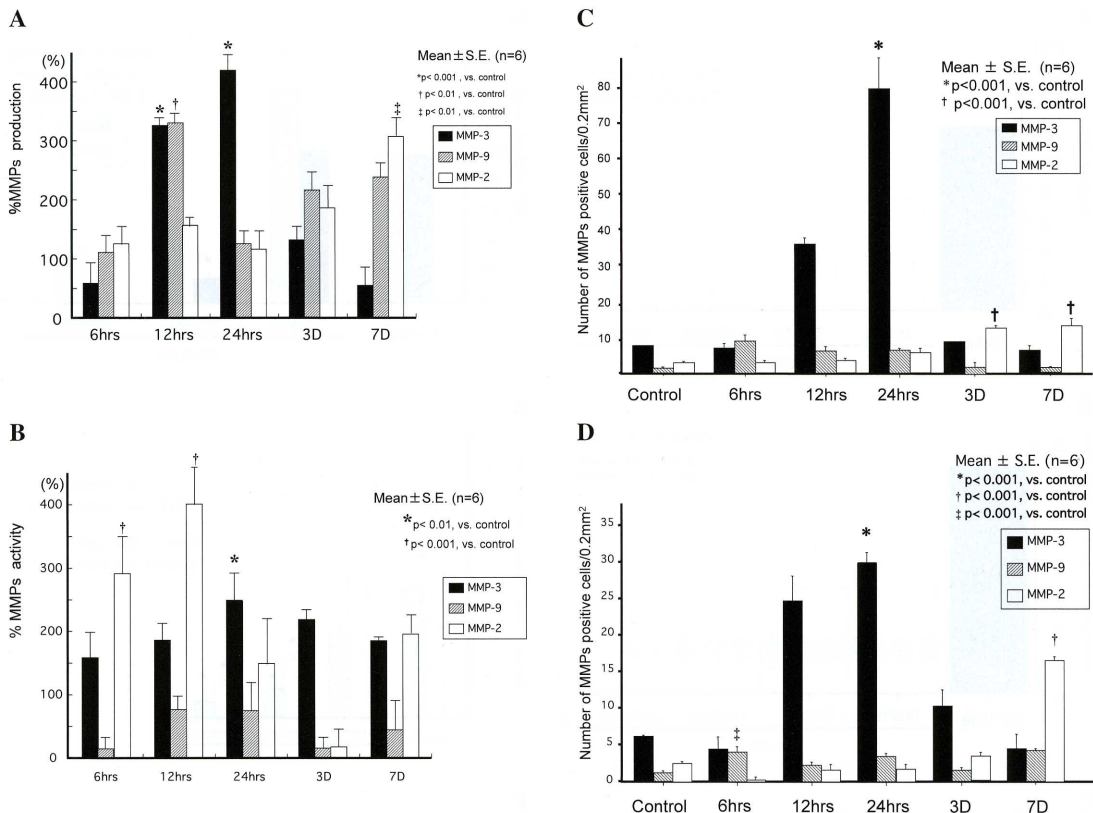
MMP-9 陽性細胞数には有意な変化を認めなかった。

## 3. Indo 誘発小腸縦走潰瘍における選択的 MMP-3 阻害剤の効果

選択的 MMP-3 阻害剤投与により、UI は用量依存性に抑制された (Fig. 6A)。5 mg/kg で最大 93.8% の抑制率となり、GM6001 の効果に匹敵した。急性期 HDS も、同様に用量依存性に抑制された (Fig. 6B)。

## 考 察

Indo に代表される非ステロイド性抗炎症剤 (nonsteroidal anti-inflammatory drugs ; NSAIDs) が消化管に粘膜傷害を引き起こすことは古くから知られているが、Matsumoto ら<sup>13)</sup>は、ラットに Indo を経肛門的に投与することで中部小腸に Crohn 病類似的縦走潰瘍を誘発できることを報告した。この小腸縦走潰瘍は、経腸栄養療法、



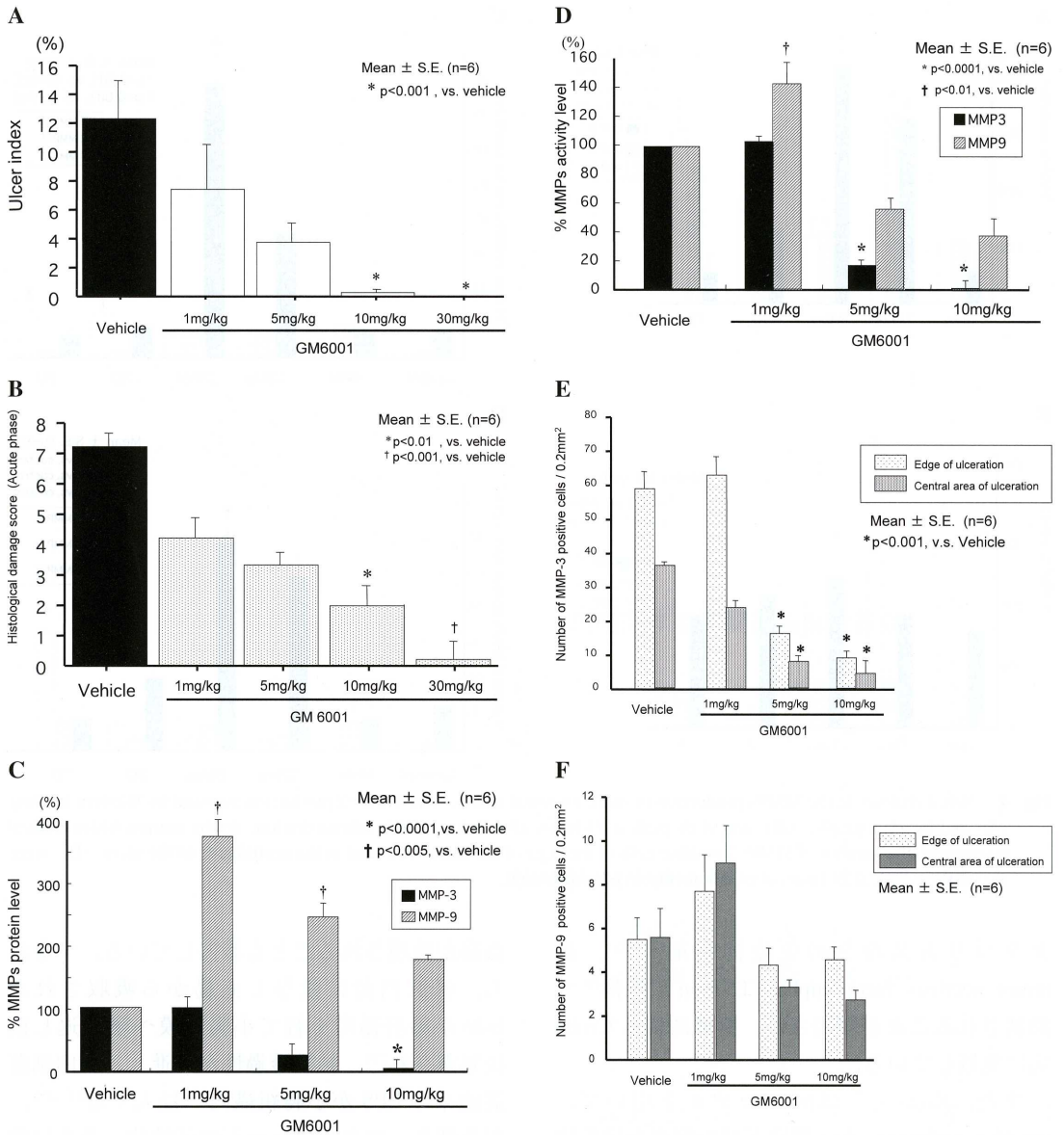
**Fig. 4.** Serial changes in the MMPs production in small intestinal ulcers. The MMP-3 production assessed by Western blotting (A) and by zymography (B), was at its peak at 24 hours after indomethacin administration. In the immunohistochemical assessment, the number of MMP-3 positive cells at the edge of the ulcer (C) and in the central area of the ulcer (D) were also at their peak at 24 hours after indomethacin administration.

タクロリムスなどの免疫抑制剤<sup>17)~19)</sup>, 抗 tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 抗体<sup>20)</sup>で抑制されることが報告され, 病態的にも Crohn 病に類似している。

また, Koga ら<sup>21)</sup>は同一モデルを用いて, specific pathogen free 環境下での飼育や抗生物質投与で小腸縦走潰瘍が有意に抑制され, 小腸縦走潰瘍の発生過程に腸内細菌叢由来のリポ多糖体 (以下 LPS) が深く関与することを報告した. 垂水<sup>20)</sup>は, ジクロロエチレン・ビスフォスフォネートを用いて LPS の標的細胞であるマクロファージの除去ラットを作製しているが, このラットでは Indo を投与しても小腸潰瘍がほとんど誘発されないことを見出ししている. また, マクロファージを除去しても, リコンビナントサイトカインを投与することで小腸縦走

潰瘍が再現されることも報告している. すなわち, 経肛門的に投与し直腸から吸収された Indo が腸肝循環を経て小腸粘膜へ繰り返し直接暴露され<sup>22)</sup>, 粘膜透過性が亢進し, 腸内細菌叢由来の LPS が小腸組織内へ侵入する<sup>21), 23)</sup>. 引き続き, マクロファージの活性化, さらに催炎症性サイトカインが放出され<sup>20)</sup>, その結果, 小腸縦走潰瘍が発生すると考えられる。

MMP-3 は, TNF- $\alpha$ , インターロイキン-1, LPS などの刺激下で, 主に活性化マクロファージや間質細胞から産出され, 消化管粘膜下層の組織破壊を惹起することが知られている<sup>24)~29)</sup>. 胎児小腸組織はその免疫反応が Crohn 病に類似しているが, リコンビナント MMP-3 を投与すると小腸組織傷害が引き起こされ, MMP 阻害剤でその小腸傷害が抑制される<sup>24), 30)~32)</sup>. 本研



**Fig. 5.** Intraperitoneal GM6001-inhibited indomethacin-induced enteropathy. Intraperitoneal GM6001 inhibited the ulcer index (A) and the histological damage score during the acute phase (B) in a dose-dependent fashion. The changes in MMP-3 production assessed by Western blotting (C) and by zymography (D) correlated positively with the change in the ulcer index of the small intestine. The number of MMP-3 positive cells (E), but not MMP-9 positive cells (F), correlated positively with the change in the ulcer index of the small intestine.

究では、Indo 誘発小腸縦走潰瘍形成は肉眼的にも組織学的にも24時間後に最大であったが、MMP-3の発現も24時間後に最大となっていた。すなわち、本モデルでの小腸縦走潰瘍形成過程とMMP-3の経時的発現には相関があり、MMP-3が本実験モデルの小腸潰瘍形成に強く

関与していると考えられる。一方、MMP-2発現は、主に24時間より後に最大値を呈し、その経時変化は慢性期HDSと相関していた。すなわち、MMP-2は潰瘍形成よりむしろ潰瘍治癒に関係していると考えられる。また、MMP-9発現は、主に24時間より前に最大値を呈し、潰



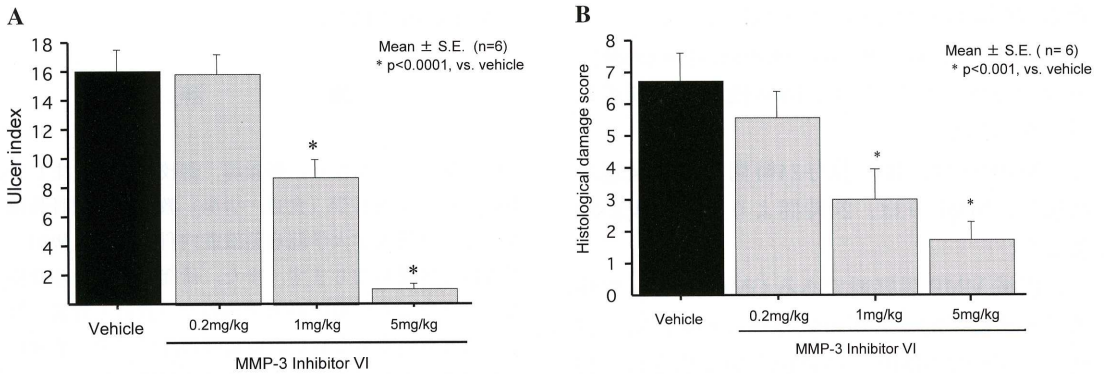


Fig. 6. Intraperitoneal administration of the selective MMP-3 inhibitor inhibited the ulcer index (A) and the histological damage score during the acute phase (B) in a dose-dependent fashion.

瘍形成初期因子に関連していると考えられる。つまり、各 MMPs 発現は経時的に異なり、潰瘍形成過程における MMPs の働きはそれぞれ異なると推測される。潰瘍形成過程における MMPs の発現を経時的に検討した報告ははまだ認められず、新たな知見である。

本研究では、小腸縦走潰瘍形成に MMPs が関与していることを更に明らかにするために、MMP 阻害剤を用いて検討を行った。まず、広域 MMP 阻害剤である GM6001 を投与したところ、用量依存性に小腸潰瘍の発症が抑制された。MMP については、MMP-3 の発現が小腸潰瘍と同様に用量依存性に抑制されていた。広域 MMP 阻害剤である GM6001 は、MMP-1, -2, -3, -9 等の幅広い MMP 抑制効果をもつ。広域 MMP 阻害剤が実験大腸炎を抑制すると報告されている<sup>5), 11), 33), 34)</sup>が、小腸潰瘍モデルでの報告は本研究が初めてである。次に、MMP-3 のみを選択的に抑制する選択的 MMP-3 阻害剤の潰瘍抑制効果についての検討を行い、潰瘍発生の抑制に有効であった事を確認した。このことは広域 MMP 阻害剤投与時に MMP-3 の発現が主に抑制されていたことに合致する。すなわち、本実験モデルでの小腸潰瘍発生には MMP-3 が主に関与し、広域 MMP 阻害剤は MMP-3 の抑制効果を介して小腸潰瘍形成を抑制したと考えられる。

近年 hydroxamate-base の MMP 阻害剤には、pro TNF- $\alpha$  を活性型に変換する TNF- $\alpha$

converting enzyme (TACE) の抑制作用があることが報告され<sup>35)~37)</sup>、注目されている。In vivo で TNF- $\alpha$  阻害が MMP-3 産出を低下させることや、抗 TNF- $\alpha$  抗体治療をおこなった慢性関節リウマチ患者の血清中では MMP-3 が低下することが指摘されているが<sup>12)</sup>、TNF- $\alpha$  と MMP-3 との間に TACE を介した関連があることが示唆される。GM6001 にも TACE 阻害作用があるため<sup>38)</sup>、その MMP 阻害作用の一部は TACE 阻害を介した TNF- $\alpha$  の抑制が MMP-3 発現を抑制したことによる可能性もある。一方、現在までに選択的 MMP-3 阻害剤による TACE 抑制効果は報告されていない。つまり、選択的 MMP-3 阻害剤の効果は、TNF- $\alpha$  や TACE を介したのではなく、MMP-3 阻害そのものによると考えられる。

本研究の結果から、Crohn 病実験モデルと考えられる Indo 誘発ラット小腸潰瘍の発生には MMP-3 が主に関与しており、MMP 阻害剤の Crohn 病治療への応用を考えると、選択的 MMP-3 阻害で十分な潰瘍抑制効果が得られたことは、意義のある新知見である。

## 結 語

ラットの Indo 誘発小腸縦走潰瘍モデルにおけるマクロファージ関連 MMPs の役割について検討した。

1) Indo 誘発小腸縦走潰瘍モデルは、肉眼的・

組織学的に Indo 投与の24時間後に最大となった。

2) MMP-3 発現は, Western blotting, zymography, 免疫染色すべての検討で Indo 投与24時間後に最大を示した。

3) MMP-2 は, Indo 投与24時間以降に発現が増加し, MMP-9 は, 24時間より前に発現が増加した。

4) 広域 MMP 阻害剤である GM6001 は, 肉眼的にも組織学的にも用量依存性に小腸潰瘍を抑制し, 同時に MMP-3 の発現も用量依存性に抑制した。

5) 選択的 MMP-3 阻害剤は, 用量依存性の肉眼的・組織学的に小腸潰瘍を抑制し, その効果は GM6001 に匹敵した。

以上より, ラットの Indo 誘発小腸縦走潰瘍発生に, MMPs, 特に MMP-3 が強く関与していると考えられた。また, MMP 阻害剤, 特に選択的 MMP-3 阻害剤は実験的小腸縦走潰瘍形成を抑制し, 今後 Crohn 病の治療に応用できる

可能性が示された。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり, 御指導, 御校閲を賜りました川崎医科大学内科学(食道・胃腸)教室 春間賢教授ならびに九州大学大学院病態機能内科学教室 飯田三雄教授に深謝いたします。また, 研究に多大なる御協力を頂きました川崎医科大学内科学(食道・胃腸)教室 古賀秀樹講師ならびに同教室の諸兄に深く感謝いたします。なお, 本研究の一部は, 川崎医科大学プロジェクト研究費(12-409)及び科学研究費(13670574)の援助により行われたものである。

本論文の要旨は, 第85回日本消化器学会総会(2002年4月, 旭川), 第40回小腸研究会(2003年3月, 大津), DDW-Japan 2003(2003年10月, 大阪), 11th UEGW(2003年11月, Madrid, Best Abstract AWARD 受賞)で発表した。

## 文 献

- 1) Ishiguro N, Ito T, Miyazaki K, Iwata H: Matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases, and glycosaminoglycans in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 26: 34-40, 1999
- 2) Catrina AI: Anti-tumor necrosis factor (TNF)-alpha therapy (etanercept) down-regulates serum matrix metalloproteinase (MMP)-3 and MMP-1 in rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 41: 484-489, 2002
- 3) Chamber AF, Matrisian LM: Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J Natl Cancer Inst* 103: 1260-1270, 1997
- 4) Mikala E, Zena W. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2: 163-176, 2002
- 5) Fergus S: Crohn's disease. *Lancet* 359: 62-69, 2002
- 6) Bailey CJ, Hembry RM, Alexander A, Irving MH, Grant ME, Shuttleworth CA: Distribution of the matrix metalloproteinases, stromelysin, gelatinases A, and B, and collagenase in Crohn's disease and normal intestine. *J Clin Pathol* 47: 113-116, 1994
- 7) Baugh MD, Perry MJ, Hollander AP, Davis DR, Cross SS, Lobo AJ, Tayer CJ, Evans GS: Matrix metalloproteinase levels are elevated in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 117: 814-822, 1999
- 8) Heuschkel RB, MacDonald TT, Montelone G, Bajaj-Elliott M, Walker-Smith JA, Pender SLF: Imbalance of stromelysin-1 and TIMP-1 in the mucosal lesions of children with inflammatory bowel disease. *Gut* 47: 57-62, 2000
- 9) Schuppan D, Hahn EG: MMPs in the gut; inflammation hits the matrix. *Gut* 47: 12-14, 2000
- 10) Von Lampe B, Barthel B, Coupland SE, Ricken EO, Rosewicz S: Differential expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in colon mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 47: 63-73, 2000
- 11) Fergus S: Inflammatory bowel disease: immunodiagnostics, immunotherapeutics, and ecotherapeutics. *Gastroenterology*

- 120 : 622-635, 2001
- 12) Ulpu K, Kere S, Vaalamo M, Pauli P, Airola K, Parks WC, Lindsberg M : Enhanced expression of matrilysin, collagenase, and stromelysin-1 in gastrointestinal ulcers. *Am J Pathol* 148 : 519-526, 1996
  - 13) Matsumoto T, Iida M, Nakamura S, Hizawa K, Fujishima M : An animal model of longitudinal ulcers in the small intestine induced by intracolonicly administered indomethacin in rat. *Gastroenterol Jpn* 28 : 10-17, 1993
  - 14) Vilaseca J, Salas A, Guarner F, Rodriguez R, Malagelada JR : Participation of thromboxane and other eicosanoid synthesis in the course of experimental inflammatory colitis. *Gastroenterology* 98 : 269-277, 1990
  - 15) Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olison BJ, Klenk DC : Measurement of protein using biocinchoninic acid. *Anal Biochem* 150 : 76-82, 1985
  - 16) Hawkes SP, Li H, Taguchi GT : Zymography and reverse zymography for detecting MMPs and TIMPs. In Ian M. Clark ed, *Matrix Metalloproteinase Protocols*. New Jersey, Humana Press Inc, Totowa. 2000, pp 399-411
  - 17) Anthony A, Pounder RE, Dhillon AP, Wakefield AJ : Similarities between ileal Crohn's disease and indomethacin experimental jejunal ulcers in the rat. *Aliment Pharmacol Ther* 14 : 241-245, 2000
  - 18) Matsumoto T, Iida M, Kuroki F, Hizawa K, Koga H, Fujishima M : Effect of diet on experimentally induced intestinal ulcers in rats : morphology and tissue leukotrienes. *Gut* 35 : 1058-1063, 1994
  - 19) Matsumoto T, Iida M, Nakamura S, Hizawa K, Kuroki F, Fujishima M : Preventive effect of immunosuppressive agents against indomethacin-induced small intestinal ulcers in rats. *Dig Dis Sci* 39 : 787-795, 1994
  - 20) 垂水研一 : 実験的小腸縦走潰瘍におけるマクロファージと催炎症性サイトカインの役割-マクロファージ除去ラットを用いた検討. *川崎医学会誌* 28 : 243-456, 2002
  - 21) Koga H, Aoyagi K, Matsumoto T, Iida M, Fujishima M : Experimental enteropathy in athymic and euthymic rats : synergistic role of lipopolysaccharide and indomethacin. *Am J Physiol* 276 : G576- G582, 1999
  - 22) Yamada T, Deitch E, Specian RD, Perry MA, Sartor RB, Girsham MB. Mechanism of acute and chronic intestinal inflammation induced by indomethacin. *Inflammation* 14 : 641-662, 1993
  - 23) Mizoguchi H, Hase S, Tanaka A, Takeuchi K : Lack of small intestine ulcerogenicity of nitric oxide-releasing indomethacin, NCX-530, in rats. *Aliment Pharmacol Ther* 15 : 257-267, 2001
  - 24) Pender SLF, Tickle SP, Docherty AJ, Howie D, Wathen NC, MacDonald TT : A major role of matrix metalloproteinases in T cell injury in the gut. *J Immunol* 158 : 1582-1590, 1997
  - 25) Bryce SM, Lukes A, Wallace J, Lukes-Marx M, Rosenberg GA : Stromelysin-1 and gelatinase A are upregulated before TNF- $\alpha$  in LPS-stimulated neuroinflammation. *Brain Res* 933 : 42-49, 2002
  - 26) Schönbeck U, Mach F, Libby P : Generation of biologically active IL-1 $\beta$  by matrix metalloproteinases : a novel caspase-1 independent pathway of IL-1 $\beta$  processing. *J Immunology* 161 : 3340-3346, 1998
  - 27) Garbisa S, Ballin M, Doga-Gordin D, Fastelli G, Naturale M, Negro A, Semenzato G, Liotta LA : Transient expression of type IV collagenolytic metalloproteinase by human mononuclear phagocytes. *J Biol Chem* 261 : 2369-2375, 1986
  - 28) Goetzl EJ, Banada MJ, Leppert D : Matrix metalloproteinases in immunity. *J Immunol* 156 : 1-4, 1996
  - 29) Welgus HG, Senior RM, Park WC, Kahn AJ, Ley TJ, Shapiro SD, Campbell EJ : Natural proteinase expression by human mononuclear phagocytes : a prominent role of cellular differentiation. *Matrix Suppl* 1 : 363-397, 1992
  - 30) Pender SLF, Lionetti P, Murch SH, Wathan N, MacDonald TT : Proteolytic degradation of intestinal mucosal extracellular matrix after lamina propria T cell activation. *Gut* 39 : 284-290, 1996
  - 31) Pender SLF, Breese EJ, Gunther U, Howie D, Wathen NC, Schuppan D, MacDonald TT : Suppression of T-cell-mediated injury in human gut by interleukin 10 ; role of matrix metalloproteinases. *Gastroenterology* 115 : 573-583, 1998
  - 32) Pender SLF, Fell JM, Chamow SM, Ashkenazi A, MacDonald TT : A p55 TNF receptor immunoadhesion prevents T cell-mediated intestinal injury by inhibiting matrix metalloproteinase production. *J Immunol* 160 : 4098-4103, 1998

- 33) Sykes AP, Bhogal R, Brampton C, Chander C, Whelan C, Parsons ME, Bird J : The effect of an inhibitor of matrix metalloproteinases on colonic inflammation in trinitrobenzenesulphonic acid rat model of inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 13 : 1532 - 42, 1999
- 34) Di Sebastiano P, di Mola FF, Artese L, Rossi C, Mascetta G, Pernthaler H, Innocenti P : Beneficial effects of batimastat (bb-94), a matrix metalloproteinase inhibitor, in rat experimental colitis. *Digestion* 63 : 234 - 239, 2001
- 35) Black RA, Ranch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, Castner BJ, Stocking KL, Reddy P, Srinivasan S, Nelson N, Bioani N, Schooley KA, Gerhart M, Davis R, Fitzner JN, Johnson RS, Paxton RJ, March DJ, Cerretti DP : A metalloproteinase disintegrin that releases tumor necrosis factor- $\alpha$  from cells. *Nature* 385 : 729 - 733, 1997
- 36) Gearing AJH, Beckett P, Christodoulou M, Churchill M, Clements J, Davidson AH, Drummond AH, Galloway WA, Gillbert JL, Leber TM, Mangall M, Miller K, Nayee P, Owen K, Patel S, Thomas W, Wells G, Wood LM, Woolley K : Processing of tumor necrosis factor- $\alpha$  precursor by metalloproteinase. *Nature* 370 : 555 - 557, 1994
- 37) Colon AL, Menchen LA, Hurtabo O, De Cristabal J, Lizasoain I, Leza JC, Lorenzo P, Moro MA : Implication of TACE (ADAM17) in inducible nitric oxide synthase expression and inflammation in an experimental model of colitis. *Cytokine* 16 : 220 - 226, 2001
- 38) Mohler KH, Sleath PR, Fitzner JN, Cerretti DP, Alderson M, Kerwar SS, Torrance DS, Otten-Evans C, Greenastreet T, Weerwarna K, Kronhelm SR, Peterson M, Gerhardt M, Kozlosky CJ, March CJ, Black RA : Protection against a lethal dose of endotoxin by an inhibitor of tumor necrosis factor processing. *Nature* 370 : 218 - 220, 1994