

氏名	庫本 達
(ふりがな)	(くらもと とおる)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲 第42号
学位審査年月日	令和4年7月20日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題名	Chymase as a Novel Therapeutic Target in Acute Pancreatitis
	(急性膵炎における新規治療ターゲットとしてのキマーゼ)
論文審査委員	(主) 教授 朝日 通雄
	教授 中村 志郎
	教授 福西 新弥

## 学位論文内容の要旨

### 《目的》

急性膵炎は、膵酵素の活性化による自己融解を契機とする全身性の炎症性疾患である。急性膵炎の死亡率は、急性膵炎の管理に関する国際的なガイドラインの作成により5%以下へと低下したが、重症急性膵炎の死亡率は未だ10~20%と報告されている。

これまでの急性膵炎の動物モデルを用いた検討では、肥満細胞安定化剤が急性膵炎の予防に有用性を示すことが報告されている。即ち、ラットのタウロデオキシコレート誘発急性膵炎モデルでは、膵臓で肥満細胞の活性化と腫瘍壊死因子(TNF)- $\alpha$ のmRNAレベルの上昇が観察されたが、肥満細胞安定化剤の前処置による予防効果が示された。また、ラットセルレイン誘発急性膵炎モデルでは、膵臓で肥満細胞数が有意に増加し、セルレイン注射前に肥満細胞安定化剤を投与することにより、膵臓への好中球の浸潤や肥満細胞数が有意に減少することも確認されている。しかし、肥満細胞には、ヒスタミン、セロトニン、

サイトカイン、セリンプロテアーゼなどの炎症性メディエーターが含まれており、どの因子が急性膵炎の発症に重要な役割を果たすかについては未だ不明である。

キマーゼは肥満細胞顆粒中に含有されているキモトリプシン様セリンプロテアーゼであり、プロマトリックスメタロプロテアーゼ-9 (proMMP-9) をマトリックスメタロプロテアーゼ-9 (MMP-9) に活性化し、細胞外マトリックスを切断して好中球の浸潤を誘導することが明らかにされている。動物の急性膵炎モデルにおいて MMP-9 が膵臓で有意に増加し、MMP 阻害剤による治療と MMP-9 欠損マウスで膵炎の重症度が有意な軽減が示されている。これらのことから、キマーゼは急性膵炎に対し改善効果が期待される重要な治療ターゲットとなる可能性が考慮される。

本研究では、キマーゼ阻害薬である TY-51469 を用いて、L-アルギニン誘発急性膵炎モデルに対する有用性を評価した。

#### 《方 法》

体重90-110 gの6週齢の雄性ハムスターを用いてL-アルギニン誘発急性膵炎モデルを確立するために、L-アルギニンを1時間に2回腹腔内注射し、最終注射から12時間後に血清リパーゼ値、膵臓のTNF- $\alpha$ のmRNAレベルを測定した。TY-51469の投与時期を決定するため、L-アルギニン最終注射から1、2、8時間後に血清リパーゼ値、膵臓のTNF- $\alpha$ のmRNAレベルを測定した。

L-アルギニン誘発膵炎に対するTY-51469の治療効果を評価するため、L-アルギニン最終注射から1時間後にTY-51469、またはプラセボ（生理食塩水）30 mg/kgを皮下投与し、L-アルギニン最終注射から8時間後に、血清リパーゼ値、膵臓のTNF- $\alpha$ のmRNAレベル、キマーゼ活性、MMP-9活性、膵臓組織切片による好中球浸潤数とキマーゼ陽性細胞数を測定した。また、生存率に対するTY-51469の影響は、L-アルギニン最終注射から24時間後までの生存したハムスター数を試験開始前のハムスター数で割った生存率を算出して解析した。

## 《結 果》

L-アルギニン低用量群 (1.5 g/kg)、L-アルギニン高用量群 (3.0 g/kg)、対照群 (生理食塩水) において、投与から 12 時間後の血清リパーゼ値、膵臓の TNF- $\alpha$  の mRNA レベルを比較すると、対照群に比し、高用量群では有意な上昇を示したが、低用量群では有意な変化はなかった。そのため、高用量群で用いた 3.0 g/kg を L-アルギニン誘導急性膵炎モデルの投与量とした。

3.0 g/kg の L-アルギニンを投与してから 1 時間後において、血清リパーゼ値と膵臓の TNF- $\alpha$  mRNA レベルは有意に増加し、その後も経時的に 8 時間後まで増加した。また、膵組織の好中球数も L-アルギニン注射から 1 時間後に増加する傾向があり、2 時間後および 8 時間後に有意な増加が観察された。

L-アルギニン投与から 8 時間後において、血清リパーゼ値はプラセボ投与群でコントロール群より有意に高値を示したが、プラセボ投与群と TY-51469 投与群の間に有意差はなかった。膵臓の TNF- $\alpha$  の mRNA 量は、プラセボ投与群ではコントロール群に比べ有意な増加を認めたが、TY-51469 投与群では減弱する傾向が見られ、コントロール群との間に有意差はなかった。膵臓組織切片中の好中球の数は、プラセボ投与群では対照群に比べ有意に多かったが、TY-51469 投与群ではプラセボ投与群に比べ有意に少なかった。膵臓のキマーゼ活性は、プラセボ投与群ではコントロール群に比べ有意に上昇していたが、TY-51469 の投与により有意に低下した。MMP-9 活性は、プラセボ投与群ではコントロール群に比べ高い傾向にあったが、TY-51469 投与群ではプラセボ投与群より低い傾向であった。また、膵臓組織切片中のキマーゼ陽性細胞数は、TY-51469 投与群ではプラセボ投与群に比べ有意に少なかった。L-アルギニン注射後 24 時間の生存率は、プラセボ投与群 26%、TY-51469 投与群 56%であり、その差は有意であった。

## 《考 察》

急性膵炎モデルを確立するため、L-アルギニンの投与量を検討したところ、3.0 g/kg の L-アルギニンを用いることで血清リパーゼ値と膵臓で炎症誘発因子である TNF- $\alpha$  mRNA

レベルが有意に増加することが確認できた。そのため、ハムスター急性膵炎モデルの作製には 3.0 g/kg の L-アルギニンを用いることとした。また、L-アルギニン最終注射から 1 時間後より血清リパーゼ値と膵臓の TNF- $\alpha$  が有意に上昇することが確認できたため、L-arginine 最終注射から 1 時間後に TY-51469 を投与し、本急性膵炎モデルに対する TY-51469 の治療効果を解析することとした。

コントロール群に比べてプラセボ投与群で有意に増加した血清リパーゼ値に対して TY-51469 投与群は有意な抑制を認めなかった。一方、コントロール群に比べてプラセボ投与群で増加した TNF- $\alpha$  や MMP-9 活性の抑制や膵臓組織への好中球浸潤数の有意な抑制が TY-51469 投与群で見られた。また、プラセボ群で有意に増加した膵臓のキマーゼ活性は TY-51469 投与群で有意に抑制され、膵臓組織のキマーゼ活性陽性細胞数も有意に抑制された。これらのことより、キマーゼ阻害薬である TY-51469 は、急性膵炎の膵臓で増加するキマーゼ活性を阻害することにより、キマーゼによる MMP-9 の活性化を抑制し、膵臓への好中球の浸潤抑制を介して炎症を軽減させ、死亡率の改善に寄与したと考えられた。

## 《結 論》

キマーゼ阻害剤はハムスター急性膵炎モデルにおいて様々な機序を介して炎症を軽減させ、生存率を向上させる可能性がある。

## 論文審査結果の要旨

急性膵炎は、膵酵素の活性化による自己融解を契機とする全身性の炎症性疾患である。これまでにエビデンスレベルの高い有効な治療薬はなく、重症膵炎は依然として重篤な疾患である。これまでに急性膵炎の動物モデルを用いて、肥満細胞安定化剤による予防効果が動物実験では報告されている。しかし、肥満細胞には、ヒスタミン、セロトニン、サイトカイン、セリンプロテアーゼなど様々な炎症性メディエーターが含まれており、どの因子が急性膵炎の発症に重要な役割を果たすかは不明であった。

本研究では、肥満細胞内の顆粒中に存在するセリンプロテアーゼのキマーゼに着目し、まずハムスターを用いた急性膵炎モデルを確立している。急性膵炎モデルの作製には 1.5 g/kg と 3.0 g/kg の L-アルギニンを用いて検討し、3.0 g/kg の L-アルギニン投与群が、生理的食塩水投与群に比して、血清リパーゼ値、膵臓の TNF- $\alpha$  の mRNA レベルが有意に亢進することが分かり、急性膵炎ハムスターモデルが作製できることを示した。このモデルでは、膵臓のキマーゼ活性とキマーゼ陽性細胞数が増加し、また MMP-9 活性、好中球浸潤数が増加していることが分かった。次に、この急性膵炎ハムスターモデルを用いて、キマーゼ阻害薬の影響を検討している。その結果、キマーゼ阻害薬である TY-51469 は、膵臓のキマーゼ活性とキマーゼ陽性細胞数だけでなく、TNF- $\alpha$  の mRNA、MMP-9 活性、好中球浸潤を有意に抑制した。また、TY-51469 は、本急性膵炎モデルの生存率を有意に改善することも示した。これらのことより、キマーゼ阻害薬は、急性膵炎ハムスターモデルにおいて、膵臓で増加するキマーゼ活性を阻害することで、キマーゼにより活性化される MMP-9 の増加を減少させ、好中球浸潤や炎症を軽減し、予後を改善したものと考えられる。

これまで様々なプロテアーゼ阻害薬が臨床で検討されてきたが、未だ有効性の高い薬剤は見いだされていなかった。本研究結果より、キマーゼが急性膵炎における新たな治療ターゲットとなる可能性が示され、今後の治療学の進歩に寄与しうる新たな医学的知見が得られた可能性が示唆される。

以上により、本論文は本学大学院学則第 13 条第 1 項に定めるところの博士（医学）の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

International journal of molecular sciences

22(22):12313, 2021 Nov.

doi: 10.3390/ijms222212313