



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	オレオイルエタノールアミドのラットデキストラン硫酸ナトリウム誘発大腸炎モデルに対する抗炎症効果 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	小田切, 信介
Description	配架番号 : 2600
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14483号
Issue Date	2021-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/81889
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Shinsuke_Odagiri_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏 名 小田切 信介

学 位 論 文 題 名

オレオイルエタノールアミドのラットデキストラン硫酸ナトリウム
誘発大腸炎モデルに対する抗炎症効果

(The anti-inflammatory effect of oleoylethanolamide on dextran sulfate sodium-
induced colitis in rats)

【背景と目的】 炎症性腸疾患 (inflammatory bowel disease, IBD) は、主としてクローン病 (Crohn's disease, CD) と潰瘍性大腸炎 (ulcerative colitis, UC) で構成される消化管の慢性炎症性疾患であり、本邦において患者数が急増している。近年は従来の治療法に加え生物学的製剤など新規治療薬の開発により、IBD の治療法の選択肢が増えている。しかしながら未だに根治治療はなく、内科的治療に抵抗性を示し手術が必要となる症例が少なくない。したがって、新規治療法の開発が求められている。当科では羊膜由来の間葉系幹細胞 (amnion-derived mesenchymal stem cell, AMSC) を用いて研究を行っており、消化器疾患モデルに AMSC 投与やその培養上清の投与を行って、その抗炎症・抗線維化効果を報告してきた。今回 AMSC の液性因子の解析として培養上清中の脂質の解析を行い、オレオイルエタノールアミド (oleoylethanolamide, OEA) という生理活性物質を同定したため、この物質に着目した。OEA は、内因性脂肪酸エタノールアミドの一つで、食事摂取量の低下、脂質代謝や胃腸運動の調節、神経炎、アテローム性動脈硬化症に対して、治療効果を有すると報告されている。また lipopolysaccharide (LPS) で刺激した単球系の培養細胞に対し、peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- α 受容体を介して、nuclear factor kappa B (NF- κ B) pathway を抑制することにより、抗炎症効果を有すると報告されている。さらに、血漿中の OEA 濃度が IBD 患者で上昇し、OEA 濃度が CD 患者の重症度と相関すると報告されており、腸管恒常性の回復における OEA の役割が示唆されている。しかし、IBD における OEA 投与の効果と役割に関する報告はない。したがって本研究では、ラットの IBD モデルある dextran sulfate sodium (DSS) 大腸炎に対する OEA 投与の影響と、そのメカニズムを調べることを目的とした。

【対象と方法】 *in vitro* : LPS-Toll like receptor 4 (TLR4) signal に対する OEA の効果について、TLR4 を強発現させた HEK293 細胞 (HEK293/hTLR4A-MD2-CD14) に LPS 刺激を行って検討した。また培養腸管上皮細胞に対する OEA の効果について、Caco-2 細胞に tumor necrosis factor (TNF)- α で刺激を行って検討した。炎症性サイトカインの発現は qRT-PCR を用いて、I κ B- α や p65 のリン酸化は western blot を用いて検討した。*in vivo* : 8 週齢雄 Sprague-Dawley ラットに対して、8 %DSS を 5 日間自由飲水させてラット大腸炎モデルを作成した。ラットに OEA 20 mg/kg を day 0 から day 5 までの 6 日間、1 日 1 回腹腔内に投与した。大腸組織の病理組織学的評価および免疫染色でのマクロファージや好中球の浸潤の評価を行い、大腸組織の炎症関連因子の発現を qRT-PCR を用いて行った。

【結果】 HEK293/hTLR4A-MD2-CD14 に LPS 刺激を行うと TNF- α の発現が増加したが、OEA は濃度依存的にその増加を抑制した。さらに、LPS 刺激により I κ B α のリン酸化が亢進したが、OEA 投与によりそのリン酸化の亢進が抑制された。Caco-2 細胞に TNF- α 刺激を行うとインターロイキン (interleukin, IL) -8 と IL-1 β の発現が増加したが、OEA はその増加を有意に抑制した。更に、TNF- α 刺激により、I κ B- α と p65 のリン酸化が亢進したが、OEA 投与によりそのリン酸化が抑制された。IL-8 の発現を抑制する OEA の効果は、PPAR- α のアンタゴニストである MKK-866 によってブロックされた。*in vivo*において、DSS 投与によって体重増加抑制、疾患活動性スコアの上昇、腸管短縮が起きたが、これらは OEA 投与により有意に改善した。食餌摂取量は、OEA 群、DSS 群と DSS+OEA 群で有意に減少し、DSS 群と DSS+OEA 群に有意差はなかった。hematoxylin and eosin 染色では、DSS 投与によって粘膜障害・陰窩の消失・炎症細胞の浸潤を認めたが、OEA 投与によりこれらは減弱する傾向にあった。CD68 染色では、マクロファージの浸潤は DSS 投与により増加したが、OEA 投与によりその浸潤増加は有意に抑制され、MPO 染色でも同様に、OEA 投与により好中球の浸潤の有意な抑制を認めた。ラット大腸の炎症関連遺伝子発現の評価では、DSS 投与により IL-1 β 、TNF- α などの発現が有意に増加したが、OEA 投与によりこれらの発現は低下する傾向にあり、IL-1 β の発現は有意に低下した。PPAR- α の発現は、DSS 投与により有意に低下し、OEA 投与により改善せず、CD68 の発現は、DSS 投与で有意に増加し、OEA 投与で減少する傾向を認めた。

【考察】 NF- κ B の発現と活性化は、活動性を有する IBD 患者の腸管で強く誘導され、活性化された NF- κ B の量が腸管炎症の重症度と相関すると報告されている。本研究では LPS 刺激に対し、OEA は TNF- α の発現を低下させ、I κ B- α のリン酸化を抑制し、さらに TNF- α で刺激された Caco-2 細胞に対して、OEA は炎症性サイトカインの発現を低下させ、I κ B- α および p65 のリン酸化を抑制した。これらの結果より、OEA が抗炎症効果を有し、腸管上皮細胞の NF- κ B 経路の活性化を抑制することによって効果を発揮することが示唆された。PPAR- α は、腸管上皮細胞とマクロファージに高度に発現していると報告されている。本研究では、PPAR- α アンタゴニストは、*in vitro*において IL-8 の発現を低下させる OEA の作用をブロックした。この結果より、腸管上皮細胞における OEA の抗炎症効果が PPAR- α 依存적であることが示唆された。マクロファージは、IBD 患者で炎症性サイトカインを産生し、腸管組織損傷を誘発するとされている。本研究の *in vivo* 実験では、マクロファージの浸潤は OEA 投与によって抑制された。更に UC の患者では、好中球浸潤の程度は疾患の重症度と相関し、IL-8 は好中球走化性物質とされている。本研究では、OEA は Caco-2 細胞における IL-8 の発現と、ラット大腸における好中球浸潤を抑制した。これらの結果より、OEA が腸管上皮細胞での IL-8 発現を抑制し、大腸への好中球浸潤を抑制することが示唆された。本研究では、OEA 投与、DSS 投与によって食餌摂取量の低下を認めたが、DSS 群と DSS+OEA 群との間で食餌摂取量に有意な差は認めなかった。この結果は、OEA の抗炎症効果が DSS 投与による食餌摂取量の低下を改善させることを示唆すると考えられる。

【結論】 本実験において OEA が抗炎症効果を有し、腸管上皮細胞の NF- κ B シグナル伝達経路の活性化を抑制することによって、ラット腸炎モデルに対する治療効果を有することが示唆され、新たな治療法となる可能性が示唆された。