

氏 名	おおにし まさこ 大西 雅子
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	論 薬 博 第 644 号
学位授与の日付	平成 13 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学 位 論 文 題 目	好中球が関与する病態と P-セレクトインの役割に関する研究

論文調査委員	(主 査) 教 授 市 川 厚	教 授 川 寄 敏 祐	教 授 佐 藤 公 道
--------	--------------------	-------------	-------------

論 文 内 容 の 要 旨

序 論

好中球は炎症時に感染防御等の重要な働きをするが、過度な活性化は臓器障害をともなう重篤な病態を引き起こすことがある。炎症部位において好中球は血管内より組織へ移動するが、この過程を制御することにより病態の改善を図ることを目的として、接着分子である P-セレクトイン分子に着目した。その理由として、P-セレクトインは、好中球が組織へ浸潤する過程において最も初期に見られる血管内皮細胞上を転がるローリングという現象を起こす分子であり、炎症部位に特異的に発現する分子であることが挙げられる。本研究では、まず病変部位で発現し、好中球を組織内へ遊走させる因子である LTB₄ や IL-8、また炎症の発症物質である免疫複合体による組織への好中球浸潤における P-セレクトインの関与について検証した。次に好中球による臓器障害を原因とする疾患モデルとして新規な動物モデルの構築を試み、併せて P-セレクトイン阻害による改善効果を検討した。

第 1 章 遊走因子による好中球集積における P-セレクトインの役割

マウス末梢血中の好中球へのマウス P-セレクトインタンパク結合量をフローサイトメトリーによって検出したところ、抗マウス P-セレクトインモノクローナル抗体 RB40.34 は、強い結合阻害活性を示した。マウス背皮に好中球遊走因子である LTB₄ を皮内投与したところ、4 時間後には投与部位の血管周囲の結合組織に好中球が集積しており、抗マウス P-セレクトイン抗体 RB40.34 を 5 mg/kg 投与することにより、好中球浸潤を 55.6%抑制した。また IL-8 皮内投与によっても結合組織にびまん的な好中球集積が認められ、抗マウス P-セレクトイン抗体投与により有意な抑制 (59.2%) が認められた。さらに実際の病態で見られる炎症の発症物質として免疫複合体の組織への沈着を想定し、免疫複合体をマウス腹腔内で形成させたところ、4 時間後をピークとして好中球の浸潤が認められ抗 P-セレクトイン抗体投与により有意に抑制された。一方、免疫複合体を皮下に投与すると好中球浸潤に先んじて 1 時間をピークとして強い血管透過性亢進が認められるが、この症状についても抗 P-セレクトイン抗体や低分子阻害剤により抑制された。ラット足蹠を用いても同様に抗ラット P-セレクトイン抗体により有意な浮腫抑制 (3 mg/kg: 44.7%) が認められ、炎症組織の血管において免疫組織学的に P-セレクトインの発現が確認された。以上より、P-セレクトインは複数の刺激による好中球の組織への浸潤過程に関与しており、P-セレクトインを阻害することで各々の遊走因子の拮抗剤よりも効率的に好中球の浸潤を抑制できる可能性があること、また好中球集積およびそれにともなう血管透過性亢進をも抑制できることが示唆された。

第 2 章 好中球が関与する病態モデルの作製および P-セレクトイン阻害による改善効果

好中球の組織への急激な集積は、しばしば重篤な臓器障害をもたらす結果となるが、その中でも臨床上重篤かつ有効な治療薬がない疾患として急性呼吸窮迫症候群 (Acute Respiratory Distress Syndrome: ARDS) と呼ばれる肺障害がある。これまで様々な薬剤が ARDS の動物モデルで有効性を示したが、ヒトでの臨床成績では有効性を確認できなかった。この原因の一つとして動物を用いた疾患モデルがヒトの病態を十分に反映していない可能性が考えられている。そこで、本研究では従来用いられてきたげっ歯類を用いた肺障害モデルが数時間以内の比較的軽度な肺障害、主に血管透過性の亢進を見てき

たことに着目し、より重篤な組織障害を惹起できるようなモデルの作製を試みた。エンドトキシン 1 mg/kg をラットの静脈内に投与した後、輸液しつつ無麻酔下、非拘束で24時間放置すると出血を伴う重篤な障害が観察された。また血漿中 P-セレクトリン量上昇が確認された。本モデルに抗 P-セレクトリン抗体 5 mg/kg を投与したところ、肺への出血を74.6%抑制した。

肺障害以外で好中球の過度な活性化が原因とされる病態の一つに虚血・再灌流障害があり、特に心筋梗塞時の冠動脈の虚血・再灌流障害は重篤で、①心筋の壊死、②動脈開存後も冠流量が低下する no-reflow 現象および③心筋の壊死には至らないが、冠流量回復後も心筋機能が長時間低下する心筋スタンニング現象などが挙げられる。これらのうち①、②については数々の動物モデルが存在し、P-セレクトリン阻害をはじめとする好中球機能抑制により障害が軽減されることが報告されているが、③については知見が希薄であった。そこでラット摘出灌流心を用い、ヒト好中球を灌流することにより心機能低下を惹起するモデルを構築した。ラット摘出心を逆行性に灌流し、20分間全虚血を行った。再灌流と同時にヒト好中球を5分間灌流しその後45分まで冠流量および左心室発生圧等の心機能を継続して測定した。その結果再灌流45分間を通して、灌流する好中球の濃度依存的な収縮および拡張の両心機能の低下が認められた。一方冠流量は再灌流15分後までは好中球添加群において低下していたが45分後には非添加群と同等であった。また45分後の心筋に壊死は認められなかった。本評価系において抗 P-セレクトリン抗体を好中球と同時に 0.6 mg/ml 添加したところ、45分後の左心室発生圧の回復率が、溶媒投与群の 26.1%に対し、59.9%まで改善された。

総括

炎症部位において好中球の組織への浸潤を惹起する複数の因子の下流に P-セレクトリンが存在すること、また P-セレクトリン機能を抑制することにより、最終的に病態モデルにおいて症状を改善することを示し、炎症の一連のカスケードで P-セレクトリンが重要な働きを示すことを示唆した。また新たな観点より病態モデルを作製し、今後同様もしくは他のメカニズムによる薬剤の評価に用いることができると考えられる。

論文審査の結果の要旨

炎症時の感染防御に重要な働きをする好中球の働きを制御する医薬品は、これまで開発されていない。その原因は、解析に必要な実験モデル系がないことによる。本論文は、炎症部位への好中球集積に働く接着分子 P-セレクトリンの炎症での役割を病態薬理学的な研究により解明したものである。

P-セレクトリンは好中球集積に働く因子であるが、これまで実際の炎症部位における関与については十分わかっていなかった。著者は、マウスに LTB₄、IL-8 および免疫複合体の各投与を行った際に惹起される炎症部位への好中球集積数が抗 P-セレクトリン抗体の同時投与により阻害されることから、P-セレクトリンが好中球の浸潤に働く重要な因子の一つであることを明らかにした。次いで、免疫複合体をマウス腹腔内に投与して惹起させた血管透過性亢進反応、あるいは、それをラット足蹠内に投与して惹起させた浮腫亢進反応は、ともに P-セレクトリン投与により強く抑制されることを見出した。さらに、炎症組織を免疫組織学的に観察し、血管において P-セレクトリンが発現していることを明らかにした。これらの結果に基づいて、P-セレクトリンは好中球の組織への浸潤過程に関与し、その P-セレクトリンの働きを阻害することは好中球の浸潤を抑制し、その後の血管透過性亢進反応も抑制することを示した。

好中球の肺への急激な浸潤により重篤な肺障害が起こる急性呼吸窮迫症候群 (ARDS) は、これまで有効な治療薬が知られていない。薬物開発のための ARDS のモデルはこれまで幾つか知られているが、いずれもヒトの ARDS に対する薬物評価の有効なモデルではないことが問題となっている。著者は、これまでの ARDS モデルの欠点は、比較的軽度な肺障害、主に血管透過性の亢進を観察したことにあると考え、重篤な組織障害を起こすモデルの作製を試みた。その結果、エンドトキシンをラットの静脈内に投与した後、輸液しつつ無麻酔下、非拘束で24時間放置することにより、出血を伴う重篤な障害を肺に起こすことに成功した。そこで、このモデルを用いて、P-セレクトリン抗体が肺出血を強く抑制することを明らかにした。次いで、心筋梗塞時の冠動脈の虚血・再灌流障害における心筋スタンニング現象に抗 P-セレクトリンの関与を仮説し、その検証を行うためのモデルの作製を行った。その結果、ラット摘出灌流心を逆行性に灌流し、20分間全虚血を行い、再灌流と同時にヒト好中球を灌流し、左心室発生圧等を測定するモデルを開発した。さらに、抗 P-セレクトリン抗体投与が心機

能の低下を抑制することを明らかにした。

以上、著者は、炎症部位における好中球の組織浸潤はP-セ렉チンにより調節されていること、また、P-セ렉チンの働きを抑制することは炎症の病態モデル症状を改善することを明らかにした。さらに、炎症の一連のカスケードでP-セ렉チンが重要な働きをしていることを評価するのに適した病態モデル系を作製した。これらの成果は、今後の炎症関連の新たな薬剤開発を促す有益な知識と技術を賦与するものである。

よって、本論文は博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。

さらに、平成13年2月8日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。