論　文　の　内　容　の　要　旨

１　目的

潰瘍性大腸炎 (ulcerative colitis: UC)は難治性の炎症性腸疾患であり，その病態には腸管の微小循環障害や虚血が関与すると考えられる。

トロンボモジュリン (thrombomodulin: TM)は主に血管内皮に発現する膜蛋白質で抗凝固作用を有し，近年リコンビナント TM（rTM）は播種性血管内凝固症候群の治療に臨床応用されている。しかし，炎症性腸疾患での効果については検討されていない。

また TM は様々な経路を介して抗炎症作用を有するが, 最近 high mobility group box protein 1 (HMGB1)の抑制を介する経路が注目されている。HMGB1 は DNA の構造の維持や転写に働く核内蛋白質であるが，活性化されたマクロファージや壊死細胞から細胞外に放出されると炎症の増悪に働く。rTM は HMGB1 を吸着しその作用を抑制する。

そこで本研究では, rTM がマウス大腸炎を改善するかにつき実験的に検討を行い, HMGB1 の抑制がその効果に関与する可能性の有無につき検討を行った。またその機序を解析する目的で *in vitro* の検討を加え，さらに HMGB1 の動態に関して UC 患者の大腸粘膜における検討を行った。

２　対照ならびに方法

マウスに 5% dextran sulfate sodium (DSS)を投与して DSS 大腸炎を作成し，rTM の投与効果を検討した。腸炎の評価として体重，腸管長の測定，組織学的検討を行った。大腸での炎症性サイトカインと血管内皮接着分子の mRNA の PCR 法による検討と，HMGB1 の免疫染色を実施した。*in vitro* の検討としてマクロファージ系細胞株の RAW264.7 細胞と血管内皮細胞株の bEND.3 細胞を用い，tumor necrosis factor-α (TNF-α)および接着分子の mRNA 発現への rTM の抑制効果につき PCR 法で検討を行った。また，UC 患者の大腸における HMGB1 の免疫染色を実施した。

３　成績

マウス DSS 大腸炎において体重減少と腸管長の短縮，大腸での陰窩の消失と炎症細胞浸潤の増加が認められた。rTM の投与によりいずれの所見も有意に改善された。DSS 投与により炎症性サイトカインである TNF-α，interferon-γ (IFN-γ)や接着分子である intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)や vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)の mRNA の発現の亢進が認められたが，rTM により有意に抑制された。免疫染色では DSS 群において浸潤した炎症細胞と血管内皮細胞で HMGB1 が強く染まり，rTM により HMGB1 を発現した浸潤細胞数が有意に抑制された。

RAW264.7 細胞を heat killed feces (HKF)や LPS で刺激したところ, TNF-αの mRNA 発現が亢進し, rTM あるいは抗 HMGB1 抗体の投与により抑制された。bEND.3 細胞を LPS や TNF-α で刺激したところ，ICAM-1，VCAM-1 の mRNA 発現が亢進し，rTM あるいは抗 HMGB1 抗体の投与により抑制された。しかし，これらの rTM の抑制効果はリコンビナント HMGB1 を加えることにより阻害された。

UC 大腸粘膜の生検組織の免疫染色では非炎症部位と比較し，炎症部位において HMGB1 陽性の浸潤細胞数が有意に増加していた。また，HMGB1 は浸潤細胞の核のみならず細胞質で多く陽性であった。

４　考察

rTM はマウス DSS 大腸炎を改善したが，活性化マクロファージから産生される TNF-αの抑制や，血管内皮での ICAM-1，VCAM-1 の mRNA の発現亢進の抑制を介し，炎症細胞の腸管への浸潤を抑える機序が想定された。培養細胞を用いた検討においても，rTM はマクロファージと血管内皮細胞の両者に作用して, TNF-αや接着分子の発現を直接阻害することが確かめられた。

DSS 腸炎の免疫染色では浸潤細胞と血管内皮細胞に HMGB1 の強い発現が認められた。HMGB1 は炎症局所において浸潤細胞の細胞質に局在が多く認められ, 核内から細胞質への移行が起きているものと考えられた。rTM は多面的な抗炎症作用を持ち腸管炎症を改善したと考えられるが，rTM の投与により HMGB1 を発現する浸潤細胞数が抑制されたことより HMGB1 抑制も重要な機序のひとつとして考えられた。さらに，UC 患者でも炎症部位で HMGB1 陽性の炎症細胞の増加を認めたことより，TM と HMGB1 の関与する経路が腸管炎症の治療の標的となる可能性が示唆された。

５　結論

腸管炎症の制御に rTM は有効である可能性があり，HMGB1 の抑制を介した機序が関与している可能性が示唆された。