

**Nuclear factor-kappa B を標的とした
ウマのエンドトキセミア治療に関する研究**

2017.9

東京農工大学大学院
生物システム応用科学府
共同先進健康科学専攻

佐藤 宏昭

目次

緒言	1
I 章 <i>in vitro</i> における LPS 誘導性反応に対する NF-κB 阻害剤の抑制効果	
[1] 序論	7
[2] ウマ単球における LPS 誘導性 TNF- α 産生能に対する NF- κ B 阻害剤の効果	
1. 材料と方法	9
2. 結果	12
3. 考察	16
[3] LPS 誘導性 NF- κ B 活性化に対するボルテゾミブの効果	
1. 材料と方法	18
2. 結果	21
3. 考察	24
[4] 小括	25
II 章 LPS 局所投与モデルに対する IMD-0354 の <i>in vivo</i> 効果解析	
[1] 序論	26
[2] LPS 局所投与による低侵襲性局所炎症モデルの確立	
1. 材料と方法	28
2. 結果	31
3. 考察	34

[3]	低侵襲性局所炎症モデルを用いた NF- κ B 阻害剤の効果解析	
1.	材料と方法	36
2.	結果	38
3.	考察	40
[4]	小括	42
III章	エンドトキセミアモデルに対するボルテゾミブの <i>in vivo</i> 効果解析	
[1]	序論	43
[2]	LPS 全身投与によるエンドトキセミアモデルの確立	
1.	材料と方法	45
2.	結果	47
3.	考察	54
[3]	エンドトキセミアモデルを用いたボルテゾミブの効果解析	
1.	材料と方法	56
2.	結果	60
3.	考察	72
[4]	小括	78
	総括	79
	謝辞	81
	引用文献	83

緒言

ウマは、古代から現代にわたり人間社会に多大な貢献をしている、大型動物としては稀有な存在である。かつての交通手段としての役目は終えたものの、競馬施行を通して国家財政に寄与するなど、ウマは今なお人間社会と密接な繋がりをもって生存している。一例を挙げると、日本中央競馬会（Japan Racing Association, JRA）が主催する中央競馬では 2016 年の一年間に約 2,973 億円もの国庫納付金を納めており、ウマによる社会貢献は計り知れない。このような背景にあって、人間社会の発展に多大なる貢献をしているウマの福祉と健康を向上させる事は、ウマに携わる獣医師の責務と言える。

ウマの難治性疾患の一つにエンドトキセミアがある。エンドトキセミアとは血液循環中にバクテリア由来のエンドトキシンが存在することを指すが、臨床現場では、その存在が疑われる臨床状態を含めて、広義的にエンドトキセミアと診断されており、いわゆるヒトの敗血症や全身炎症反応症候群 Systemic inflammatory response syndrome（SIRS）に類似する疾患である[1, 2]。ウマのエンドトキセミアは、未だに罹患率および致死率が高く、馬産業に対する経済的損失の主要な原因の一つである[1, 3]。JRA では、2003 年から 2013 年までの 10 年間で 142 症例がエンドトキセミアに起因する大腸炎と診断され、その死亡率は 28.2%（40/142）であった（図 1）。ウマにおけるエンドトキセミアは、重度の疝痛などの消化管機能障害の後に惹起されることが多く、発熱、沈鬱状態、頻脈、頻呼吸、低血圧、出血性

または水瀉性下痢、脱水、粘膜色稠の変化、循環不全による肢端部の表面温度低下、凝固系機能異常などの複雑な臨床兆候パターンを呈す[1, 3]。エンドトキセミアに対する主要な治療法は、非ステロイド系抗炎症薬フルニキシメグルミンと輸液療法である[4]。しかし、フルニキシメグルミンは、腸粘膜透過性を亢進し、エンドトキシンの流入を容易にさせることによって、小腸に対する副作用を有しており、既発のエンドトキセミアを悪化させる可能性が示唆されていることから[5, 6]、より安全で奏功性の高い治療薬の開発が望まれている。これまで、多くの研究者が様々なアプローチを試みてきたものの、有効な治療法として証明されたものは未だ極僅かであり、エンドトキセミアに対する根治療法の確立が急務となっている[4]。QOLの顕著な低下に加え経済的損失の規模からも、ウマのエンドトキセミア治療への取り組みは、獣医学的な枠組みを超えた重要課題であり、解決に向けて努力する意義は非常に大きい。本研究は、分子標的アプローチという新しい観点から、効果的かつ副作用の少ないエンドトキセミアの治療法の確立を目指すものである。

エンドトキセミアの主要なトリガーは、グラム陰性菌の細胞壁構成成分リポポリサッカライド (lipopolysaccharide, LPS) であり、主たる供給源は大腸菌である。生体は、単球、マクロファージ、樹状細胞、好中球などの自然免疫系細胞の膜表面に発現している Toll-like receptor 4 (TLR4) によって体内に侵入した LPS を認識し、自然免疫反応を発動させる[7, 8]。LPS の結合により TLR4 下流の複雑なシグナル伝達経路を介して最終的に転写因子 Nuclear factor-kappa B (NF- κ B) が活性化され、tumor necrosis factor (TNF)

- α 、interleukin (IL) - 1β および IL-6 などを中心とした炎症性サイトカイン応答を誘導し、迅速に炎症反応を惹起することで、エンドトキシンや感染に対する初期防御機構が確立される[8]。通常、これら一連の炎症反応は、IL-10 や transforming growth factor- β (TGF- β) などの抗炎症性サイトカインが作用する負のフィードバックによって制御され、正常状態に沈静化される恒常性が維持されている。しかし、LPS の侵襲が過大であったり継続的であったりする場合には、炎症反応の恒常性が破綻し、炎症が局所に留まらず全身に波及する。このような状態では、炎症性サイトカインは生体防御因子としてではなく、むしろ攻撃因子として作用してしまい、全身性生体侵襲である SIRS へと移行する。SIRS は、心血管系の機能低下、動脈血低酸素血症、組織内灌流の低下、播種性血管内凝固 (disseminated intravascular coagulation, DIC) による末梢循環不全を引き起こし、最悪の場合、末梢低酸素による多臓器機能障害症候群に陥り死に至る[1, 2]。

特にウマは、エンドトキセミアの病態が重篤化し容易に SIRS に進行しやすいことが経験的に知られている。ウマの単球は LPS 高感受性であり、LPS のシグナル伝達経路において炎症性サイトカイン産生に関与する myeloid differentiation factor 88 (MyD88) 依存的経路が強く誘導される一方で、抗炎症性サイトカイン応答に係る TIR domain-containing adaptor inducing IFN- β (TRIF) 依存的経路の反応性が低いという報告[9]が、それを裏付けている。ウマに実験的に 30 ng/kg body weight (bwt) の LPS を投与することによって、容易に軽度のショック症状を誘導できるが[10-14]、ヒトも LPS に対する感受性が高く、1~4 ng/kg bwt 程度の LPS によって SIRS

特有の臨床症状を発現することが報告されている[15–17]。一方、マウスは 500 ng/kg bwt の LPS 投与に対しても生理反応を呈さず、LPS 耐性動物とされている[16]。ヒトのエンドトキセミア治療の研究では、主としてマウス等の齧歯類での研究が外挿されているが、それら実験動物モデルで有効性が確認された治療候補薬が、患者の臨床治験の段階では奏功性が確認できないケースが散見されており、エンドトキセミア関連遺伝子の変化を比較した研究においてヒトとマウス間の種差に起因するミスマッチが問題視されている[18]。こうした背景にあって、ヒトおよびウマにおける LPS 感受性や病態発現の類似性を鑑みると、エンドトキセミアモデルとして齧歯類よりもウマを用いることの妥当性が示唆される。従って、ウマのエンドトキセミアに関する研究の成果は、ヒトのエンドトキセミア研究にとっても有益な情報を提供し、ヒト医療への貢献に寄与することが期待できる。

エンドトキセミアから SIRS に至る過程で様々な炎症性サイトカインやメディエーターが複雑に相互作用して病態発現に関与しているが、とりわけ TNF- α が主要な役割を果たしており、ウマのエンドトキセミアの臨床症状と最も相関関係があると報告されている[10]。興味深いことに、TNF- α もそのシグナルカスケードにおいて、LPS 同様に NF- κ B を活性化する。これらの事実から、LPS 結合による病態発現開始から増悪化に至る一連の炎症カスケードにおいて、NF- κ B が共通の転写因子として作用し、NF- κ B の過剰な活性化がエンドトキセミアの病態形成において主要な役割を担っている可能性が示唆される。すなわち、ウマのエンドトキセミアの治療戦略において NF- κ B が重要な治療標的となり得ることが予期される。

本研究では、この NF- κ B 過剰活性に着目し、ウマのエンドトキセミアモデルを用いて NF- κ B をターゲットとした分子標的薬の効果解析を行った。NF- κ B 阻害剤として、IMD-0354 およびボルテゾミブの二つの分子標的薬を選択した。IMD-0354 は Inhibitor of NF- κ B kinase (I κ B kinase, IKK) β 特異的インヒビターであり、齧歯類やイヌへの *in vivo* 投与実験により乳癌やアトピー性皮膚炎に対する治療効果が証明されている[19, 20]。ボルテゾミブは多発性骨髄腫の治療薬として開発された“first-in-class”であり[21, 22]、市販製剤（ベルケイド[®]; Janssen Pharmaceutical K. K.）が唯一存在する NF- κ B 阻害剤である。ボルテゾミブはプロテアソームインヒビターとして作用し、NF- κ B の抑制因子 I κ B のプロテアソーム分解を阻害して NF- κ B の活性化（核内移行）を抑制することによって、多発性骨髄腫細胞のアポトーシスを誘導する[23–25]。

本研究の I 章では、ウマ単球を用いて、*in vitro* での IMD-0354 およびボルテゾミブの LPS 誘導性 TNF- α 産生に対する抑制効果を確認した。II 章では、生体局所における LPS 誘導性炎症反応に対して、NF- κ B をターゲットとする妥当性・有効性を検証した。この実験では、齧歯類やイヌでの安全性が立証済みである IMD-0354 をウマの肢端に局所投与し、NF- κ B 標的治療の有効性を確認した。III 章では、LPS 全身投与により誘導したウマのエンドトキセミアモデルに対する NF- κ B 阻害剤の効果解析を行った。将来的な臨床現場での応用を想定し、市販製剤が存在するボルテゾミブを治験薬として用いて、エンドトキセミアモデルにおける臨床パラメータに対する *in vivo* 効果を評価し、ボルテゾミブの全身投与が LPS 曝露により誘導され

た疼痛反応および指灌流低下を改善することを立証した。

これらの成果は、ウマのエンドトキセミアにおいて NF- κ B をターゲットとした分子標的治療法という従来と異なる全く新しい治療戦略の有効性を提唱するものである。

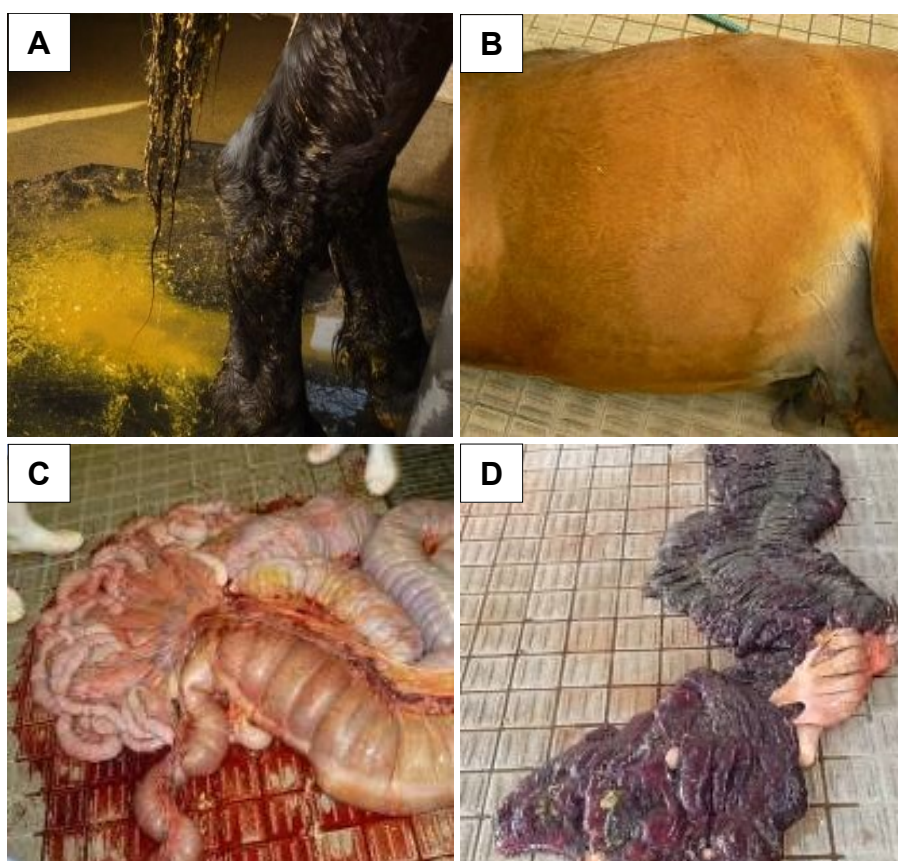


図1 エンドトキセミアに起因する大腸炎症例 (JRA 黒田泰輔博士提供)

- A: 水瀉性下痢
- B: ガスや腸内容物の停滞による腹囲膨満
- C: 下痢の貯留によって膨張した大結腸
- D: 盲結腸における広範囲な粘膜壊死

I 章 *in vitro* における LPS 誘導性反応に対する NF- κ B 阻害剤の抑制効果

[1] 序論

エンドトキセミアのトリガーである LPS を含め、微生物構成分子である蛋白、脂質、多糖等の異物が侵入すると生体は直ちに防御反応を発動させる[7, 8]。この反応を自然免疫と呼び、種々の微生物特有の分子パターンである病原体関連分子パターン (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) を生体が特異的に認識することで開始される。LPS は、マクロファージや樹状細胞などの自然免疫系細胞の表面上に発現している特異的受容体 TLR4 によって認識される[7, 8]。

LPS を認識した TLR4 のシグナル伝達の始動には、4 種類のアダプター分子である MyD88、Toll/IL-1 receptor (TIR) domain-containing adaptor protein (TIRAP)、TRIF および TRIF-related adaptor molecule (TRAM) が関与している。最初に活性化されるアダプター分子の違いにより、二種類の異なるシグナル伝達経路が誘導されることが特徴である[8]。その一つは MyD88 と TIRAP が反応する MyD88 依存的経路であり、もう一つが TRIF と TRAM が反応する TRIF 依存的経路である。この内、速やかに NF- κ B を活性化し早期の炎症性サイトカイン応答を誘導する経路が、MyD88 依存的経路である。MyD88 依存的経路を介した NF- κ B 活性化メカニズムは次の通りである (図 2)。まず、MyD88 は TIRAP の仲介によって TLR4 と会合する[7, 8, 26]。続いて、IL-1 receptor-associated kinase (IRAK) ファミリーと結合し、

デスドメイン複合体 Myddosome を形成する。活性化された Myddosome が E3 ユビキチンリガーゼである TNF receptor-associated factor 6 (TRAF6) と会合すると、TRAF6 は自分自身に複数のユビキチンを結合させ、このユビキチン鎖を足場として、下流のシグナル分子 TGF- β -activated kinase 1 (TAK1)-binding protein 2 (TAB2) および TAK1 の複合体や IKK 複合体が TRAF6 と繋がる。その結果、TAK1 が IKK β をリン酸化し、活性化された IKK β は NF- κ B 阻害因子である I κ B α をリン酸化する。リン酸化された I κ B α は k48 結合型ポリユビキチン修飾を受けて、プロテアソームによって分解される。I κ B α から解放された NF- κ B は核内移動が可能となり、TNF- α などの炎症性サイトカインの遺伝子転写を開始する。

TLR4 の活性化は、本来、生体防御機構としての役目を担っていることを考慮すると、シグナル伝達を標的とした治療開発においては、生体防御機能までも消失させることがないように部分的・限定的にシグナルパスウェイを阻害するというコンセプトで候補薬を選択する必要がある。IMD-0354 は IKK β を特異的に阻害することにより、ボルテゾミブは I κ B のプロテアソーム分解を阻害することにより、それぞれ NF- κ B の活性化を抑制する。本章では、これらの NF- κ B 阻害剤の効果を *in vitro* 下で解析するため、マクロファージの前駆細胞である単球を用いて、LPS 誘導性反応に対する抑制作用を検証した。2 節で、LPS によって刺激した単球の生存率および TNF- α 産生能に対する IMD-0354 またはボルテゾミブの効果を検証した。3 節では、LPS により誘導された NF- κ B 活性化経路における標的分子への作用について検証した。

[2] ウマ単球における LPS 誘導性 TNF- α 産生能に対する NF- κ B 阻害剤の効果

1. 材料と方法

1) ウマ

サラブレッド種 2 頭（騏馬）および温血種 2 頭（騏馬）を用いた。4 頭の平均年齢は 16.8 ± 5.4 歳（10–22 歳）であった。全ての馬に対して実験前に獣医師による馬体検査および歩様検査を実施し、健康であることを確認した上で実験に供した。

この実験は、国立大学法人東京農工大学研究倫理委員会および動物実験小委員会による承認（承認番号 26-55, 56）を受け、ガイドラインに従って実施した。

2) 試薬

ボルテゾミブ（StressMarq Biosciences Inc., Victoria, British Columbia, Canada）および IMD-0354（Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA）は、ジメチルスルホキシド（dimethyl sulfoxide, DMSO; Wako, Tokyo, Japan）で 10 mM になるように溶解した。LPS（*Escherichia coli* O55:B5 LPS; Sigma-Aldrich）は、phosphate buffered saline（PBS）で 1 mg/ml になるように溶解した。全ての試薬は -30°C で保存し、実験毎に用時調整した。

3) ウマ末梢血単球の分離および処理

あらかじめヘパリンナトリウム (Nipro, Osaka, Japan) を吸引した 50 ml シリンジ (Terumo Corporation, Tokyo, Japan) を用いて、ウマの左側頸静脈より採血した。採取した血液を 50 ml ポリプロピレン製コニカル遠心チューブ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) に移し、赤血球を沈降させるために 400 × g、20°C で 10 分間遠心分離した。 Buffy coat を吸引回収して得られた多白血球血漿 (leukocyte-rich plasma) を Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich) に重層し、密度勾配遠心法 (400 × g, 20°C, 30 分間) により末梢単核球を分離した。末梢単核球のバンドを吸引回収し、Dulbecco's PBS で 5 回洗浄した後、 4×10^6 cells/ml の細胞濃度になるように RPMI-1640 培地 (Gibco, Grand Island, NY, USA) に浮遊させ、ポリスチレン製 24 well 細胞培養プレートの各 well に 2×10^6 cells (0.5 ml/well) ずつ播種した。単球を付着させるために、37°C、5% CO₂ 下で 2 時間培養した後、37°C に温めた RPMI-1640 培地でプレートを 5 回洗浄し、非付着細胞を除去した。この時点で、非特異的エステラーゼ染色により付着細胞における単球の純度を測定し、トリパンブルー排除試験により生存率を測定した。

得られた単球に、10% ウマ血清 (HyClone Donor Equine Serum; Thermo Fisher Scientific)、100 units/ml ペニシリンおよび 100 μg/ml ストレプトマイシン (Sigma-Aldrich) を添加した RPMI-1640 培地を重層し、1 ng/ml LPS の存在下で、各種濃度 (1, 10, 100, 1,000 nM) のボルテゾミブまたは IMD-0354 を添加して 6 時間培養した。LPS の vehicle である PBS および NF-κB 阻害

剤の vehicle である DMSO を添加した培地単独群を negative control とし、1 ng/ml LPS と DMSO を添加した LPS 単独添加群を positive control とした。6 時間の培養後にプレートを遠心分離し (180 × g, 4°C, 10 分間)、培養上清を回収して TNF- α 測定アッセイまで -30°C で保存した。細胞は、trypsin-EDTA 溶液により剥離して回収し、トリパンブルー排除試験による生存率を測定した。

4) TNF- α の測定

TNF- α は、市販の測定キット (equine TNF- α ELISA reagent kit; Thermo Fisher Scientific) を用いて enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) により測定した。手技には、洗浄の回数およびタイミングにおいて軽微な変更を加えたものの、それ以外はメーカーの指示書に従って実施した。サンプルの一部は必要に応じて試薬希釈液 (StartingBlock [PBS] Blocking Buffer; Thermo Fisher Scientific) で 2 倍に希釈して測定した。サンプルは 2 well ずつの duplicate とし、マイクロプレートリーダー (ImmunoMini NJ-2300, Biotec, Tokyo, Japan) により波長 450 nm における吸光度を 2 回定量し、平均値を算出した。

5) 統計学的解析

一元配置分散分析を行った後、Dunnett 検定による多重比較検定を実施し、LPS 単独添加した positive control を対照群として比較した。有意水準は 5% とした。

2. 結果

末梢単核球の2時間培養により得られた付着細胞における単球の純度は、81%以上 (mean 88.1%, range 81.2–95.6%) であり、その生存率は98%以上であった。

TNF- α 濃度は、各実験の negative control (414–767 pg/ml) を 1.0 とした相対値で示した (図 3)。1 ng/ml の LPS 刺激 (positive control) により、ウマ末梢血単球からの TNF- α 産生は negative control の約 7 倍に増加した (2,597–7,423 pg/ml)。この LPS 誘導性 TNF- α 産生は、ボルテゾミブの添加により濃度依存的に抑制され、1,000 nM では positive control の約 1/4 まで減少した (700–1,727 pg/ml)。100 および 1,000 nM のボルテゾミブにおいて有意差が認められた。また、1,000 nM の IMD-0354 添加においても、LPS 誘導性 TNF- α 産生が有意差に抑制されたが、ボルテゾミブと比較してその効果は低かった。なお、生存率には有意差は認めなかった (表 1)。

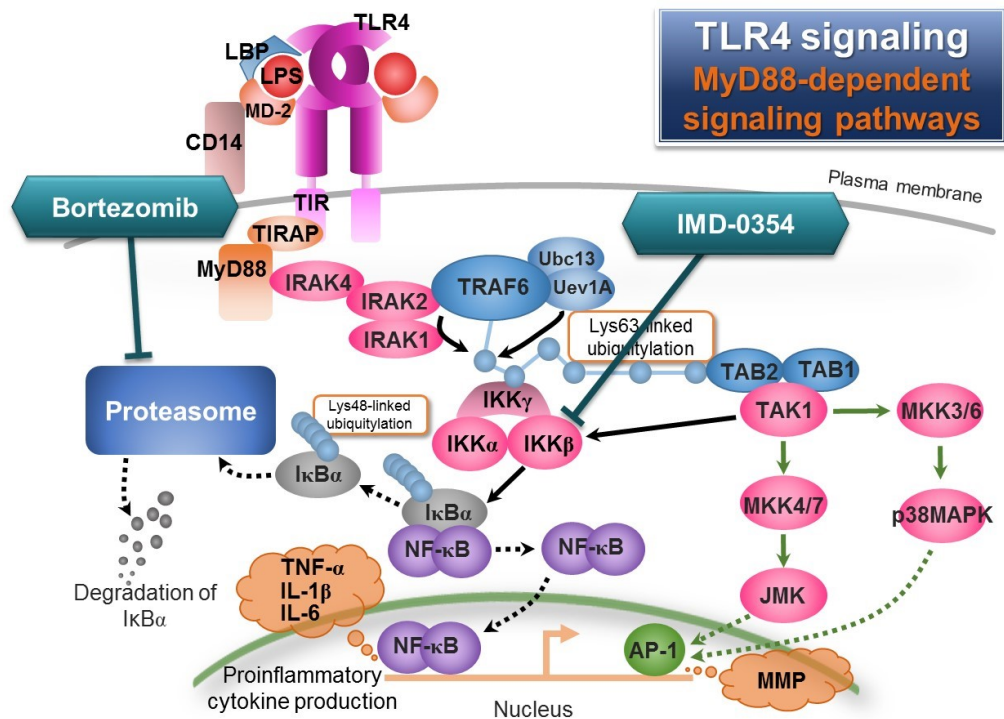


図 2 TLR4 の MyD88 依存的シグナルパスウェイ

TLR4 に会合した MyD88 は、IRAK ファミリーや TRAF6 と結合する。TRAF6 は、ユビキチン鎖を介して TAB2 および TAK1 と繋がり、TAK1 が IKKβ をリン酸化する。次いで、活性化した IKKβ が NF-κB 阻害因子 IκBα をリン酸化する。リン酸化 IκBα がプロテアソームにより分解されることで、NF-κB が解放され、核内に移行し転写を開始する。

IMD-0354 は IKKβ を特異的に阻害することにより、ボルテゾミブは IκB のプロテアソーム分解を阻害することにより、それぞれ NF-κB の活性化を抑制する。

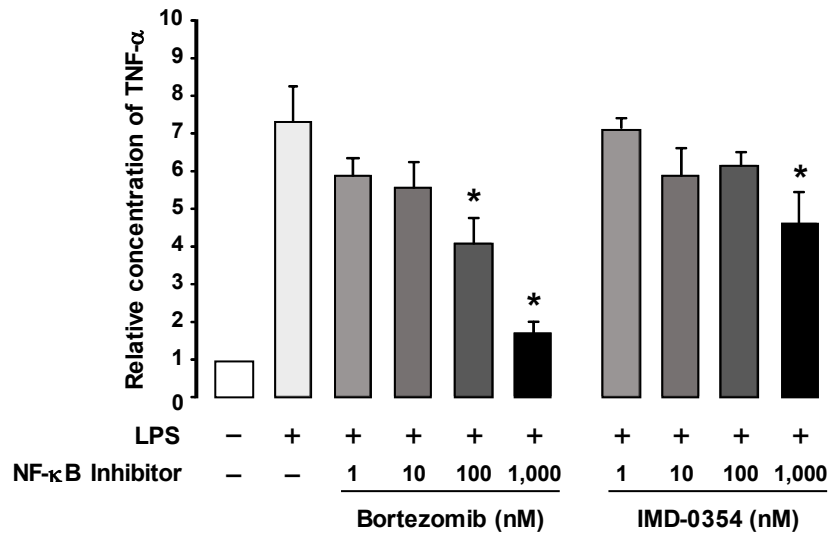


図 3 ウマ単球における LPS 誘導性 TNF- α 産生に対する NF- κ B 阻害剤の効果

ウマ単球を各種濃度の NF- κ B 阻害剤および 1 ng/ml LPS の存在下で 6 時間培養した。ボルテゾミブは、濃度依存的に LPS 誘導性 TNF- α 産生を抑制した。IMD-0354 は、高濃度で LPS 誘導性 TNF- α 産生を抑制する傾向がみられた。

実験は 4 回行い、TNF- α 濃度は negative control (左側白色カラム) を 1.0 とした相対値として算出し、その平均と標準誤差をグラフに示した。

* $P < 0.05$ vs LPS alone

表 1 LPS および NF- κ B 阻害剤存在下でのウマ単球の生存率

LPS (1 ng/ml)	Inhibitor	dose (nM)	Viability (mean. \pm SE)
-	-	-	97.6 \pm 0.6
+	-	-	99.0 \pm 0.7
+	IMD-0354	1	94.8 \pm 2.1
+	IMD-0354	10	98.5 \pm 0.9
+	IMD-0354	100	97.4 \pm 0.7
+	IMD-0354	1,000	96.6 \pm 1.4
+	Bortezomib	1	95.8 \pm 1.4
+	Bortezomib	10	94.6 \pm 2.5
+	Bortezomib	100	97.4 \pm 0.7
+	Bortezomib	1,000	97.8 \pm 0.4

ウマ単球を各種濃度の NF- κ B 阻害剤および 1 ng/ml LPS の存在下で 6 時間培養した。実験は 4 回実施し、トリパンブルー排除試験により測定した。各群に有意差は認めなかった。

3. 考察

これまで、ウマのエンドトキセミア治療の候補薬として、合成リピド A アナログ E5564 (エリトラン) [27]やアデノシン A_{2A} 受容体アゴニスト[28] について、ウマ単球による LPS 誘導性 TNF- α 産生に対する抑制作用を指標とした *in vitro* での効果解析がなされている。今回、これらの報告とほぼ同条件下でボルテゾミブおよび IMD-0354 の効果を検討し、ボルテゾミブが LPS 刺激を受けたウマ単球における TNF- α 産生を濃度依存的に抑制することが確認された。この効果は、細胞の生存率の減少に起因するものではなかった。また、IMD-0354 も高濃度において抑制作用を示した。

LPS 誘導性反応に対するボルテゾミブの効果を免疫担当細胞で検討した研究では、ヒトおよびマウスの樹状細胞からの TNF- α 産生を抑制することが報告されており[29, 30]、今回、ウマの単球においても同様の結果が確認された。本実験では TNF- α 以外の炎症性サイトカインの測定は行わなかったが、ボルテゾミブは樹状細胞からの IL-12 産生に対しても抑制効果を有している。また、 α CD3/CD28 刺激による活性化 T 細胞を用いた別の研究では、TNF- α に加え IL-1 β 、IL-6、IL-10 等の NF- κ B 誘導性サイトカインの放出をボルテゾミブが強力に抑制することが報告されている[31]。これらのボルテゾミブに関する *in vitro* 研究の結果から、ウマの単球においても、ボルテゾミブが TNF- α のみならず他の NF- κ B 誘導性サイトカインの産生を抑制する可能性は高いと考えられる。

ヒトにおける体内薬物動態では、ボルテゾミブ 1.3 mg/m^2 投与時の初期血中濃度が $185.84 \pm 57.65 \text{ ng/ml}$ (約 483 nM) に達する事が報告されており [32]、*in vitro* で効果を認めた濃度の範囲内にある。仮にウマでの薬物動態がヒトと類似するならば、*in vitro* で確認された効果が *in vivo* においても発揮される可能性が有り、ボルテゾミブが LPS に起因する炎症性疾患の治療薬としてのポテンシャルを有していることを示唆している。

[3] LPS 誘導性 NF- κ B 活性化に対するボルテゾミブの効果

1. 材料と方法

1) 細胞培養

I κ B の検出のために、健康なサラブレット種 3 頭（牡馬 1 頭、騏馬 2 頭、 9.0 ± 3.8 歳）から採血した。既述した方法で末梢単核球を分離し、 2×10^6 cells/ml の細胞濃度になるように RPMI-1640 に浮遊させ、ポリスチレン製 6 well 細胞培養プレートの各 well に 1×10^7 cells (5 ml/well) ずつ播種し、 37°C 、5% CO_2 の条件下で 2 時間培養した。培養後、温めた RPMI-1640 で 5 回洗浄し、非付着細胞を除去した。プレートに付着した単球に、10% ウマ血清、100 units/ml ペニシリン、100 $\mu\text{g/ml}$ ストレプトマイシンを含む RPMI-1640 を重層した。各種濃度のボルテゾミブまたは vehicle (0.01% DMSO) で、単球を 1 時間前処置した。前処置後、培地を除去して RPMI-1640 で 2 回洗浄し、1 ng/ml LPS または vehicle (0.0001% PBS) で 5 分間刺激した。

NF- κ B の検出のために、健康なサラブレット種 3 頭（騏馬、 14.7 ± 0.7 歳）から採血し、既述した方法で末梢単核球を分離した。付着刺激による基礎的な NF- κ B 活性化を考慮し、単球の分離処理は行わず末梢単核球をそのまま実験に用いた。 5×10^6 cells/ml の濃度で RPMI-1640 に浮遊させた細胞液を 1 ml ずつポリプロピレン製平底マイクロチューブ（Ina-Optica, Osaka, Japan）に分注し、1,000 nM ボルテゾミブまたは vehicle (0.01% DMSO) の

存在下で、37°C、5% CO₂ で 1 時間前処置した。続いて、1 または 10 ng/ml LPS により 6 時間刺激した。なお、単球の付着を極力防ぐために、小型巡回ミキサー (Revolution Mixer RVM-100; AGC Techno Glass, Shizuoka, Japan) によりチューブを常時巡回させながら培養した。

2) ウェスタンブロット法

I κ B 検出用の単球は、培養終了後に氷温の PBS で速やかに洗浄した後、氷温の protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich) 含有 CelLytic-M (Sigma-Aldrich) で溶解し、セルスクレイパーにより懸濁液を回収した。15 分間の氷冷却後、等量のサンプルバッファー (20% glycerol, 10% 2-mercaptoethanol, 4% sodium dodecyl sulfate [SDS], 100 mM Tris-HCl, pH 6.8) を添加し、98°C で 3 分間加熱した。

NF- κ B 検出用の末梢単核球は、培養終了後に直ちに遠心分離 (2,300 \times g, 20°C, 3 分間) して回収した。NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents kit (Thermo Fisher Scientific) を用いてメーカー指示書に従った操作により、核分画および細胞質分画を末梢単核球から抽出した。得られたサンプルは、等量のサンプルバッファーと混合し、98°C で 3 分間加熱した。

サンプルは、10% ゲル (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を用いて SDS-PAGE により蛋白質を分離し、PVDF メンブレン (Immobilon-P membrane; Merck Millipore, Bedford, MA, USA) に転写した。メンブレンを 5% スキムミルク (Wako) および 0.05% Tween-20 (Wako) を含むトリスバッファー (50 mM Tris, 150 mM NaCl) でブロッキング処理した後、各種 1

次抗体および HRP 標識 2 次抗体で反応させ、Immobilon Western chemiluminescent HRP Substrate (Merck Millipore) を用いた化学発光法によりシグナルを検出した。検出には luminescent image analyzer (LAS-4000 IR multi color; FujiFilm, Tokyo, Japan) を使用した。

2. 結果

ボルテゾミブは、ウマ単球において LPS 刺激により誘導されたリン酸化 I κ B α のプロテアソーム分解を濃度依存的に抑制し、リン酸化 I κ B α を蓄積させた (図 4)。一方、I κ B α の総量には顕著な変化は認めなかった。

また、LPS 刺激を受けたウマ末梢単核球において、核内の NF- κ B p65 サブユニットが増加した (図 5)。ボルテゾミブの添加により、その核内 NF- κ B p65 の存在は減少した。

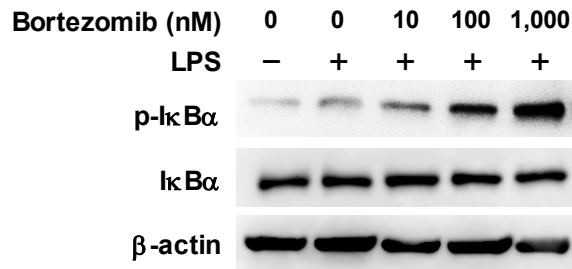


図4 リン酸化 I κ B α 分解に対するボルテゾミブの抑制効果

単球は、各種濃度（10, 100, 1,000 nM）のボルテゾミブで1時間前処置した後、1 ng/ml LPS で5分間刺激した。培養後に調整したサンプルを用いて、I κ B α およびリン酸化 I κ B α をウェスタンブロット法により検出した。内在性コントロールとして β -actin を検出した。ボルテゾミブは濃度依存的にリン酸化 I κ B α のプロテアソーム分解を抑制し、蓄積させた。3頭で実験し、代表的な結果を示した。

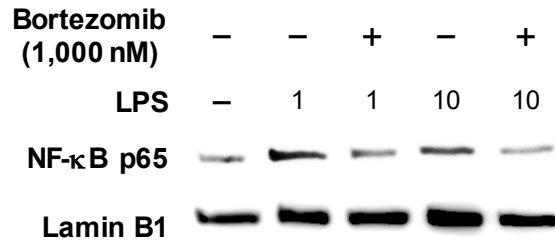


図 5 NF-κB p65 の核内移行に対するボルテゾミブの抑制効果

末梢単核球は、1,000 nM ボルテゾミブで 1 時間前処置した後、1 または 10 ng/ml LPS により 6 時間刺激した。培養後に細胞から核分画を抽出し、NF-κB p65 サブユニットをウェスタンブロット法により検出した。内在性コントロールとして Lamin B1 を検出した。ボルテゾミブは LPS 刺激による NF-κB p65 の核内移行を抑制した。3 頭で実験し、代表的な結果を示した。

3. 考察

ウマ単球における LPS のシグナルパスウェイに対して、ボルテゾミブはリン酸化 I κ B α のプロテアソーム分解を阻害し、リン酸化 I κ B α を蓄積させた。この作用により、ボルテゾミブが NF- κ B p65 サブユニットの核内移行を抑制することも確認された。これらの所見は、TNF- α によって刺激されたヒト多発性骨髄腫細胞を用いた報告[23–25]と同様であり、ウマの単球においてもボルテゾミブがプロテアソームの作用を阻害し、I κ B α および NF- κ B の活性化を直接的に抑制することを分子レベルで初めて明らかにした。すなわち、LPS 誘導性炎症反応に対するボルテゾミブの効果は、免疫担当細胞の NF- κ B を標的として機能することが予測される。

ボルテゾミブは、NF- κ B の別のサブユニット RelB の活性化も抑制することがヒトの樹状細胞において明らかにされている[29]。興味深いことに、LPS シグナルパスウェイの重要なアダプター因子である MyD88 の発現を軽減することも報告されており[29]、ボルテゾミブがプロテアソーム阻害以外の作用機序によっても NF- κ B 活性化を抑制する可能性が示唆される。

本節の実験において、NF- κ B 核内移行に対するボルテゾミブの抑制効果は、10 ng/ml の LPS 刺激に対してさえも発揮されたことから、ボルテゾミブが過剰な LPS シグナルカスケードの活性化を十分に抑制できることを示している。

[4] 小括

本章では、ボルテゾミブが、LPS 刺激を受けたウマ単球において、その生存率には影響を与えることなく、TNF- α 産生を濃度依存的に抑制することが明らかとなった。ボルテゾミブの効果よりは顕著ではないものの、IMD-0354 も高濃度において TNF- α 産生を抑制した。

また、ボルテゾミブの TNF- α 産生抑制メカニズムは、リン酸化 I κ B α のプロテアソーム分解を阻害し、NF- κ B p65 サブユニットの核内移行を抑制することによって機能することが確認された。

これらの結果により、ボルテゾミブおよび IMD-0354 が TNF- α をはじめとした NF- κ B 誘導性サイトカインの過剰産生を抑制し、LPS に起因する炎症を軽減する可能性が示唆された。

II 章 LPS 局所投与モデルに対する IMD-0354 の *in vivo* 効果解析

[1] 序論

I 章で *in vitro* の結果から、NF- κ B をターゲットとした分子標的薬が LPS 誘導性炎症の治療候補薬となり得る可能性が伺えた。しかし、生体内は多様な免疫担当細胞が種々のサイトカインやメディエーターを介して複雑に相互作用することから、*in vitro* で確認された効果が生体においても同様に発揮されるとは限らないため、生体を用いて NF- κ B をターゲットとする妥当性を検証することが必要となる。大型動物であるウマに対して NF- κ B を阻害する分子標的薬を生体内投与した報告はこれまで皆無であることから、生体内投与実験にあたっては慎重を期す必要がある。そこで、本章では、次の二点に留意して研究計画を立案した。一点目は全身投与に先立ち、侵襲性の低い局所投与による効果を確認することである。二点目は、より安全性の高い NF- κ B 阻害剤を選択することである。

ウマにおける実験的 LPS 投与モデルは、全身投与によるモデルは報告されているが、局所投与モデルの報告はない。全身投与モデルは、体温上昇、疼痛スコア増加、指灌流低下などの臨床症状および白血球活性化、炎症性サイトカイン産生増加などの炎症性反応を発現させるのが特徴である[10–14, 33]。このモデルで発現する臨床所見の内、指灌流低下は蹄壁表面温度の低下として観察される肢末端の局所反応である。そこで、指灌流の低下

に着目し、蹄内末梢循環への LPS 局所投与モデルを作成して、蹄壁表面温度低下を指標とした低侵襲性の局所炎症モデルの確立を試みた。

I 章で使用した NF- κ B 阻害剤の内、IMD-0354 は東京農工大学獣医分子病態治療学研究室において豊富な研究実績があり、乳癌や悪性中皮腫に対する治療効果[19, 34]に加え、炎症疾患であるアトピー性皮膚炎[20]に対しても治療効果を有していることを報告している。さらに、齧歯類のみならず、中型動物であるイヌにおいても IMD-0354 の生体内投与における安全性が既に確認されている。ウマ単球を用いた *in vitro* の実験結果では、高濃度の IMD-0354 において LPS 誘導性 TNF- α 産生の抑制効果が認められ、齧歯類やイヌ同様にウマにおいても IMD-0354 が有効性を発揮できる可能性が伺える。

本研究の最終目標は、市販製剤が存在するボルテゾミブの有効性を検証することにあるが、上述した理由から、本章の局所投与による *in vivo* 効果解析では IMD-0354 を選択した。2 節で確立した指灌流低下モデルを用いて、3 節で IMD-0354 の局所投与による効果解析を行った。

[2] LPS 局所投与による低侵襲性局所炎症モデルの確立

1. 材料と方法

1) ウマ

東京農工大学で繋養しているサラブレッド種 6 頭（騏馬, 3–20 歳, 体重 450–500 kg）を無作為に二つのグループに割り付け、一方のグループを本節の実験に用いた。もう片方のグループは 3 節の実験に用いた。全ての馬に対して実験前に獣医師による馬体検査（視診・触診）、歩様検査および血液検査（総血球計算・血液生化学検査）を実施し、健康であることを確認した上で実験に供した。この実験は、国立大学法人東京農工大学研究倫理委員会および動物実験小委員会による承認を受け、ガイドラインに従って実施した。ショック発症等の不測の事態に備え、緊急救命用の装置および薬剤を常備した環境で実験し、実験後は健康状態を最低 1 ヶ月間観察した。

2) LPS 局所投与による指灌流低下モデルの確立

実験は東京農工大学動物医療センター内の実験馬房で実施した。馬房はコンクリートで覆われた閉鎖空間であり、空調装置により室温を 20~23°C に維持した状態で実験開始 1 時間前からウマを繋留し、環境に順化させてから実験を行った。給餌や日内変動による蹄壁表面温度への影響を極力排除するため、実験の開始は概ね午前 10 時に統一した。

LPS 投与実験に先立ち、コントロール実験として鎮静処置による影響を検証した。実験開始時（0分時点）にキシラジン 5 mg/kg bwt（2% Ceractal; Bayer, Tokyo, Japan）または同量の生理的食塩水を左頸静脈から静脈内投与した後、両前肢の球節部（第1指関節）を駆血帯により30分間駆血した。蹄壁表面温度は、実験開始（0分時点、キシラジン投与直前）から90分後まで10分毎に測定した。

次いで、最低2週間の wash out 期間後に LPS 局所投与実験を行った。鎮静処置のために0分時点でキシラジン 5 mg/kg bwt を静脈内投与した後、両前肢の球節部を駆血帯により駆血し、怒張した外掌側指静脈に蝶翼状針を留置した。逆流を防ぎ薬液注入を確実にするために血液 10 ml を抜去した後、20分時点において LPS 10 μ g (*Escherichia coli* O55:B5 LPS; Sigma-Aldrich; 生理的食塩水 10 ml に溶解) を右前肢の外掌側指静脈から注入した。左前肢の外掌側指静脈には生理的食塩水 10 ml を注入し、同一個体内において LPS 投与と対照の比較を行った。30分時点で両前肢の駆血帯およびカテーテルを除去した。この投与方法は、指静脈のみならず指動脈まで逆行的に注入液が到達することが報告されている[35]。実験開始（0分時点、キシラジン投与直前）から90分後まで10分毎に蹄壁表面温度の測定および馬体検査を実施した。

3) 蹄壁表面温度の測定

蹄壁表面温度は、既報[12]を参考にして、サーモメーター（FLIR i7; FLIR Systems Inc., Tokyo, Japan）を用いて前肢の蹄冠帯から蹄尖までを結んだラインの上 1/3 の部位に焦点を合わせて測定した。

4) 統計学的解析

この実験の全データは、Bartlett 検定により等分散であることを確認した上で、反復測定二元配置分散分析を実施し、その後に Tukey 法による多重比較検定を行った。有意水準は 5%とした。

2. 結果

キシラジンにより中程度の鎮静状態が 50～60 分時点まで継続された。キシラジン投与による蹄壁表面温度への影響は認められず、対照群と比較して有意差はなかった（図 6）。

次いで、LPS 局所投与による指灌流低下モデルの作成を試みた。蹄壁表面温度は、駆血による血行遮断中は軽度に低下した。生理的食塩水を投与した対照群（左前肢）では、駆血帯除去後に蹄壁表面温度はベースラインまで速やかに回復し、90 分時点まで変化を認めなかった（図 7）。一方、LPS 投与群（右前肢）では、駆血帯除去後も蹄壁表面温度は徐々に低下し、70～90 分時点において有意な差が認められた。実験期間中、全馬において沈鬱、疝痛、跛行等の異常は一切認めなかった。

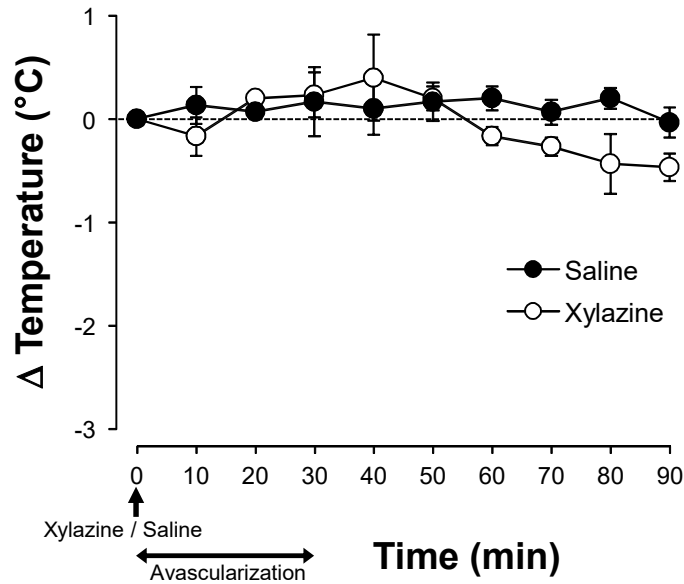


図 6 蹄壁表面温度に対するキシラジン鎮静処置の影響

0分時点においてキシラジン（0.5 mg/kg bwt）または生理的食塩水を静脈内投与した後、両前球節部に駆血帯を装着して駆血した状態を30分間維持した。蹄壁表面温度は、0分時点の測定値と各時点の測定値の差として算出し、3頭の実験結果の平均値 ± 標準誤差として示した。蹄壁表面温度に対するキシラジンの影響は認めなかった。

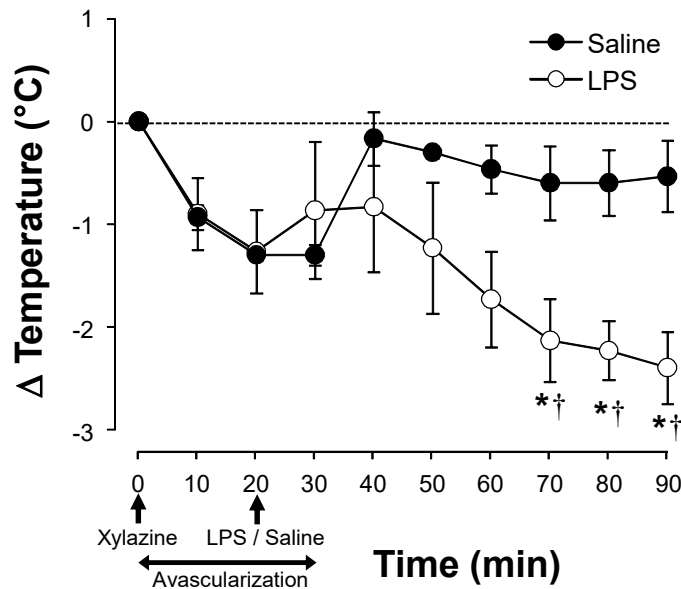


図7 LPS 局所投与による蹄壁表面温度の低下

0 分時点においてキシラジンを静脈内投与し鎮静処置後、両前球節部に駆血帯を装着して駆血した。20 分時点で、LPS (10 μ g) を右前肢に注入し、対照として生理的食塩水を左前肢に注入した。蹄壁表面温度は、0 分時点の測定値と各時点の測定値の差として算出し、3 頭の実験結果の平均値 \pm 標準誤差として示した。LPS の局所投与により蹄壁表面温度は有意に低下した。

* $P < 0.05$ vs 0 time point, † $P < 0.05$ vs Saline

3. 考察

今回の実験により、侵襲性の低い LPS 誘導性の局所炎症モデルを作成できた。測定項目とした蹄壁表面温度は、ドップラー超音波検査により測定した肢端の血流と相関性が有り、指灌流の指標となり得ることが明らかにされている[12]。その報告によれば、ドップラー超音波による測定は検出感度に限界があり、蹄壁表面温度の測定の方に優位性があることが示唆されている。

LPS 局所投与実験では、対照群および LPS 投与群の両群において駆血時に軽度の蹄壁表面温度の低下を認めたが、これは 20 分時点の LPS または生理食塩水の投与直前に、血液逆流の防止および薬液注入の確実性のために血液 10 ml を抜去した影響が考えられる。

ウマのエンドトキセミアの重篤な合併症の一つに蹄葉炎があり、回顧的研究においてエンドトキセミアが急性蹄葉炎発症の重要なリスクファクターであることが証明されている[36]。葉状層の微小血栓形成および組織低酸素がエンドトキシン関連性蹄葉炎の病態発現に関係している疑いがあり、LPS が病態形成の中心的な役割を担っているものと信じられているが、これまでのところ LPS 単独投与による実験的蹄葉炎モデル確立の試みは成功していない[10, 37, 38]。しかし、植物由来の炭水化物の一種であるオリゴフルクトースと一緒に LPS を投与することによって実験的に蹄葉炎を誘導できることが報告されている[38]。また、LPS 単独投与による蹄の指灌流低下が観察されている[12]。指血流の変化に関する研究結果については見

解が分かれているものの、蹄灌流は蹄葉炎の前駆期に著しく低下する可能性が高い[39,40]。これらの背景から、LPSはそれ自体では蹄葉炎を誘導しないものの、蹄葉炎の開始に強く関与することが示唆されている[41]。従って、今回作成したモデルは、蹄葉炎の前駆段階を再現している可能性が高く、エンドトキセミアに関連する蹄葉炎初期病態モデルとなり得ることが示唆された。

このモデルの問題点としては、駆血帯除去後の再灌流障害のリスクが挙げられる。特に、高齢馬では、蹄や球節の血行障害に起因する別の疾病を誘発するリスクが高まる可能性が有る。蹄内血液循環に投与薬物を停滞させ、確実に局所組織に作用させるためには一定時間の駆血が必須だが、再灌流障害リスクの軽減のためには最適な駆血時間の検討が必要かもしれない。なお、今回の実験では、実験後1ヶ月間の経過観察においても、蹄の疾患を含めていかなる異常も発現をすることは無かった。LPSの投与量は、I章の*in vitro*実験で効果が確認された濃度（1 ng/ml）を参考にし、蹄内血液循環においてその濃度を十分に上回ることを考慮して決定したが、適切な投与量についてはさらなる研究が必要である。

改善すべき要素はあるものの、LPS誘導性の局所炎症モデルが確立できたことから、このモデルを用いてNF- κ B阻害剤の効果判定が可能となった。

[3] 低侵襲性局所炎症モデルを用いた NF- κ B 阻害剤の効果解析

1. 材料と方法

1) ウマ

前節で無作為に割り付けた 3 頭のウマを使用し、獣医師による検査で健康であることを確認した上で実験に供した。実験計画は、国立大学法人東京農工大学研究倫理委員会および動物実験小委員会による承認を受け、ガイドラインに従って実施した。ショック発症等の不測の事態に備え、緊急救命用の装置および薬剤を常備した環境で実験し、実験後は健康状態を最低 1 ヶ月間観察した。

2) LPS 誘導性局所炎症モデルに対する IMD-0354 の効果

前節と同様の施設および環境で実施し、実験開始 1 時間前からウマを繋留して順化させた。

最初に、対照として LPS 非投与群のデータを採取した。鎮静処置のために 0 分時点でキシラジン 5 mg/kg bwt を静脈内投与した後、左前肢の球節部を駆血帯により駆血し、外掌側指静脈に蝶翼状針を留置した。血液 20 ml を抜去した後、20 分時点において留置したカテーテルを介して生理的食塩水 10 ml を注入した。30 分時点で駆血帯およびカテーテルを除去した。実験開始（0 分時点、キシラジン投与直前）から 90 分後まで 10 分毎に蹄壁表面温度の測定および馬体検査を実施した。

次いで、最低 2 週間の wash out 期間後に LPS 誘導性局所炎症モデルを用いた IMD-0354 の投与試験を行った。鎮静処置のために 0 分時点でキシラジン 5 mg/kg bwt を静脈内投与した後、両前肢の球節部を駆血帯により駆血し、怒張した外掌側指静脈に蝶翼状針を留置した。血液 20 ml を抜去した後、10 分時点において留置したカテーテルを介して右前肢に IMD-0354 (Institute of Medicinal Molecular Design, Tokyo, Japan) を 1 mg (生理的食塩水 10 ml に溶解) 注入し、左前肢には生理的食塩水 10 ml を注入した。IMD-0354 の濃度はマウスでの投与実験を参考にして決定した[19]。

20 分時点で LPS 10 μ g (生理的食塩水 10 ml に溶解) を両前肢に投与した。30 分時点で駆血帯およびカテーテルを除去した。実験開始 (0 分時点, キシラジン投与直前) から 90 分後まで 10 分毎に蹄壁表面温度の測定および馬体検査を実施した。

3) 蹄壁表面温度の測定

蹄壁表面温度は、既述の方法により測定した。

4) 統計学的解析

データは、Bartlett 検定により等分散であることを確認した上で、反復測定二元配置分散分析を実施し、その後に Tukey 法による多重比較検定を行った。有意水準は 5%とした。

2. 結果

LPS を投与しなかった対照群では、駆血時に蹄壁表面温度が一時的に低下したが、駆血解除後はベースライン近くまで回復した（図 8）。LPS を局所投与すると蹄壁表面温度は時間依存的に顕著に低下した。一方、IMD-0354 前処置群では、蹄壁表面温度は駆血解除後に上昇し、駆血前と同程度まで回復した。その後も蹄壁表面温度は低下することなく、LPS 誘導性の蹄壁表面温度低下を有意に抑制した。

実験期間中、全馬において沈鬱、疝痛、跛行等の異常は一切認めなかった。また、実験後 1 ヶ月間の経過観察においても、副作用は発現しなかった。

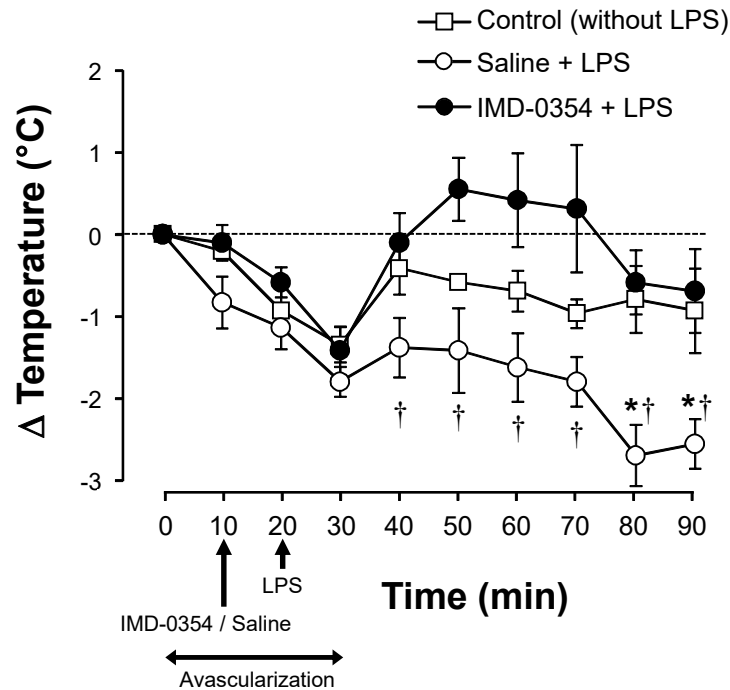


図 8 LPS 誘導性蹄壁表面温度低下に対する IMD-0354 の抑制効果

0 分時点においてキシラジンを静脈内投与し鎮静処置後、両前球節部に駆血帯を装着して駆血した。10 分時点で右前肢に IMD-0354 (1 mg/ml) を注入し、左前肢には生理的食塩水を注入して、両者を比較した。20 分時点で LPS (10 μ g) を両前肢に注入した。蹄壁表面温度は、0 分時点の測定値と各時点の測定値の差として算出し、3 頭の実験結果の平均値 \pm 標準誤差として示した。IMD-0354 による前処置は、LPS の局所投与による蹄壁表面温度の低下を有意に抑制した。

* $P < 0.05$ vs 0 time point, † $P < 0.05$ vs Control (without LPS)

3. 考察

3 群において共通に観察された 20～30 分時点での軽度の蹄壁表面温度の低下は、駆血および薬剤投与前の血液抜去による影響と推測された。駆血解除後も LPS 単独投与群では時間依存的に蹄壁表面温度が低下した。一方、NF- κ B 阻害である IMD-0354 の前処置によって、その蹄壁表面温度の低下が抑制されたことから、LPS 誘導性の指灌流障害において転写因子 NF- κ B が病態形成に関与している可能性が示唆された。

LPS による指灌流の低下には、エンドセリン-1 が関与していると考えられる。強力な血管収縮作用を有すエンドセリン-1 は、LPS 誘導性炎症疾患における重要な血管作用メディエーターである。エンドセリンシグナルの活性化は、心機能不全、内臓低灌流（血液循環低下）や DIC などの敗血症の症状と関連しており[1]、エンドトキセミア罹患馬において、エンドセリン-1 の血中濃度が増加していることが報告されている[42, 43]。LPS 刺激によりマクロファージはエンドセリン-1 を産生し、エンドセリン-1 自身も NF- κ B 活性化能を有していることから[44, 45]、IMD-0354 やボルテゾミブは NF- κ B 阻害を介してエンドセリン-1 の産生と作用を抑制し、その結果、指灌流低下を抑制する可能性が示唆される。

NF- κ B の活性化を阻害することによって、ウマの生体内でも LPS 誘導性炎症反応を抑制できるということは、エンドトキセミア等の LPS 関連性炎症疾患に対する治療において、NF- κ B をターゲットとする妥当性を示している。このことは、マウスの LPS 誘導性敗血症ショックモデルにおいて、

NF- κ B の阻害が全身性低血圧や血管収縮・拡張因子の機能不全を軽減するという報告[46]によっても支持される。さらには、今回利用した LPS 局所投与モデルは、LPS に関連する蹄葉炎初期病態モデルとなり得ることから、NF- κ B 特異的阻害剤のエンドトキセミア続発性蹄葉炎の予防または治療薬としてのポテンシャルも期待できる。

[4] 小括

本章では、ウマの指灌流への LPS 局所投与により低侵襲性局所炎症モデルを作成した。このモデルは、エンドトキセミア続発性蹄葉炎の初期病態モデルとなり得る。このモデルを用いて、NF- κ B 阻害剤の *in vivo* 効果を局所的に解析した結果、IMD-0354 が LPS 誘導性指灌流低下を抑制できることが明らかとなった。

これらの結果により、エンドトキセミアやエンドトキセミア続発性蹄葉炎などのウマの LPS 関連性炎症疾患において、NF- κ B 標的治療の妥当性・有効性が示唆され、全身投与による *in vivo* 解析にステップアップする根拠が得られた。

Ⅲ章 エンドトキセミアモデルに対するボルテゾミブの *in vivo* 効果解析

[1] 序論

Ⅱ章において、ウマの生体局所における *in vivo* 効果解析の結果から、生体においても LPS 関連性炎症疾患に対する治療戦略として NF- κ B をターゲットとする妥当性および有効性が確認できたため、Ⅲ章ではエンドトキセミアモデルを用いた NF- κ B 阻害剤の全身投与試験を実施した。

ヒトの敗血症から SIRS に至る過程では、様々な炎症性メディエーターが複雑に相互作用して病態発現に関与しているが、とりわけ TNF- α が主要な役割を果たしていることから、これまで、ヒトの敗血症やエンドトキセミアにおいて TNF- α を標的とした様々な治療が試みられてきたものの、そのほとんどが失敗に終わっている[47]。例えば、抗 TNF- α 抗体製剤である Afelimomab や AZ9773 (Cytofab) は、臨床試験による明瞭な効果が確認できなかったため、開発途中で研究が打ち切られており、現時点では TNF- α 以外のサイトカインも含めて、敗血症治療におけるサイトカイン標的治療薬の大規模臨床試験は一切実施されていないようである[48, 49]。ウマにおいても抗 TNF- α 抗体を用いた研究が行われたものの、有効性は確認されおらず、臨床応用には至っていない[50]。

これらの TNF- α に直接的な治療アプローチの失敗は、種々の炎症性メディエーターが関与している敗血症の複雑な病態ゆえ、単一のサイトカインだけを標的とした治療では限界であることを提示しており、網羅的な治療

アプローチの必要性を示唆している。すなわち、共通の転写因子 NF- κ B を標的とした治療戦略が望まれており、敗血症やエンドトキセミアに対する NF- κ B 阻害剤への期待は大きいものと言える。

NF- κ B 阻害剤であるボルテゾミブはプロテアソームインヒビターとして作用し、NF- κ B の抑制因子 I κ B のプロテアソーム分解を阻害して NF- κ B の活性化を抑制する分子標的薬である[23–25]。多発性骨髄腫の治療薬として開発されたボルテゾミブではあるが[21, 22]、NF- κ B 抑制作用を有することから、腫瘍のみならず NF- κ B が関連する炎症性疾患への応用も試みられている[51, 52]。しかしながら、ウマのエンドトキセミアに対して、これまでボルテゾミブを含め NF- κ B を直接的に標的とする分子標的薬の効果は検証されていない。

本章では、ウマのエンドトキセミア治療薬としてのボルテゾミブの有効性を検証するため、LPS 全身投与により誘導したエンドトキセミアモデルに対する効果解析を行った。1 節では、これまで報告されているウマのエンドトキセミアモデルの再現を試みた。2 節では、エンドトキセミアモデル用いて、ボルテゾミブ全身投与の *in vivo* 効果解析を行った。

[2] LPS 全身投与によるエンドトキセミアモデルの確立

1. 材料と方法

1) ウマ

JRA 美浦トレーニングセンターで繋養しているサラブレッド種 2 頭を実験に用いた。全ての馬に対して実験前に獣医師による視診および触診による馬体検査、歩様検査および血液検査（総血球計算・血液生化学検査）を実施し、健康であることを確認した上で実験に供した。この実験は、JRA 動物実験委員会により定められたガイドラインに従って実施した。ショック発症等の不測の事態に備え、緊急救命用の装置および薬剤を常備した環境で実験し、実験後は健康状態を最低 1 ヶ月間観察した。

2) LPS 低用量投与によるエンドトキセミアモデルの確立

実験は JRA 美浦トレーニングセンター競走馬診療所の柵馬内で実施した。空調装置により室温を 20.3~23.5°C に維持した状態で実験開始 1 時間前からウマを繋留し、環境に順化させてから実験を行った。実験期間中は飲水および採食をさせなかった。

エンドトキセミアは、既報を参考に低用量 LPS 曝露により誘導した[12-14, 33]。両頸静脈に静脈カテーテル（14 gauge 13.3 cm Angiocath catheter; Becton Dickinson Infusion Therapy Systems Inc., Franklin lakes, NJ, USA）を留置し、左頸静脈から LPS（*Escherichia coli* O55:B5 LPS; Sigma-Aldrich; 9%

生理的食塩水 500ml 中に溶解) を 1 ng/kg/min の用量で 30 分かけて投与した (0~30 分時点; 総投与量 30 ng/kg)。右頸静脈に留置したカテーテルから血液サンプルを採取した。実験は 120 分で終了とし、直ちに全馬に対してフルニキシメグルミン 1.1 mg/kg bwt (Banamine injection 5%, Sumitomo Dainippon Pharma Co., Ltd., Osaka, Japan) を投与した。

3) 臨床パラメータの測定

測定のタイミングは、LPS 暴露開始時点を 0 時点 (LPS 投与直前) とし、10 分毎とした。臨床指標として、直腸温度、心拍数、呼吸数、不快感スコア、蹄壁表面温度を測定した。不快感スコアは、沈鬱および疝痛症状の程度を 0 : 正常、1 : 軽度 (元気低下, 頭振り, フレーメン等)、2 : 中程度 (蠕動亢進, 間欠的な前掻き等)、3 : 顕著 (頭頸下垂, 継続的な前掻き, 下痢等) の 4 段階に分けてスコアリングを行った[10]。蹄壁表面温度は、既述の方法で測定した。また、同じ time point において、EDTA-2K 採血管 (BD Vacutainer; Nippon Becton Dickinson Company, Ltd., Tokyo, Japan) により血液サンプルも採材し、総血球計算を実施した。

4) 統計学的解析

サンプルサイズが小さいため、統計学的処理は実施しなかった。

2. 結果

30 ng/kg bwt の低用量 LPS の静脈内投与により、直腸温度は徐々に上昇し、120 分時点で最高値 (38.6°C) に達した (図 9)。心拍数は、徐々に上昇した (図 10)。呼吸様式は、LPS 投与開始してから一時的に浅速呼吸となったが、回数に顕著な変化は認めなかった (図 11)。不快感スコアは、LPS 投与終了後の 30 分時点から蠕動亢進や頭振りなどの不穏感を呈し始め、時間の経過とともに悪化した (図 12)。80~90 分時点をピークに前掻き、震戦、沈鬱などの明瞭な臨床症状を呈した。蹄壁表面温度は、両前肢とも同様の変化を呈した。50 分時点から経時的に低下し、120 分時点では 0 時点から約 5°C の低下が認められた (図 13)。白血球数は LPS 投与終了直後より急激に減少し、50 分時点 (2,900 cells/ μ l) でほぼ最低値に到達すると、その後も回復することなく低値で推移した (図 14)。

実験期間中、危機的なショック症状は認めず、実験直後のフルニキシン投与により不快感スコアは速やかに改善した。また、実験後 1 ヶ月間の経過観察においても、馬体に異常は認めなかった。

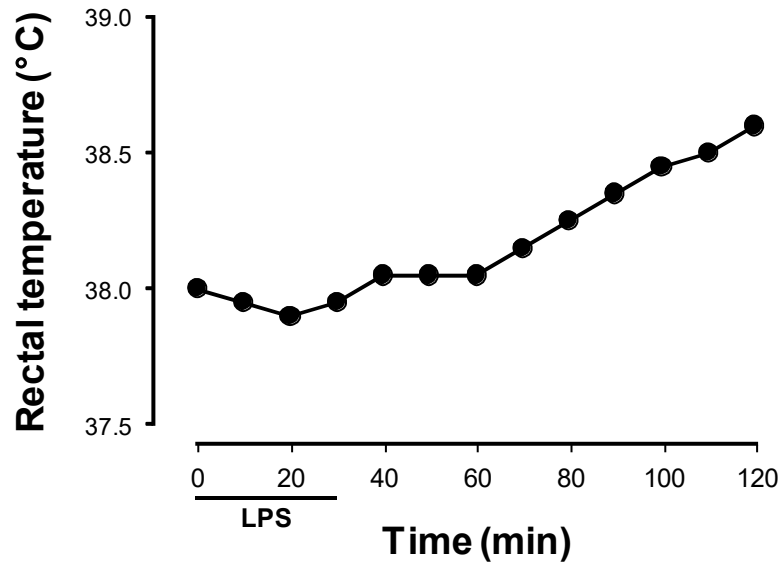


図 9 LPS 全身投与による直腸温度の変化

0 時点から 30 分かけて LPS (30 ng/kg bwt) を投与した。体温は経時的に上昇した。2 頭の実験結果の平均値として示した。

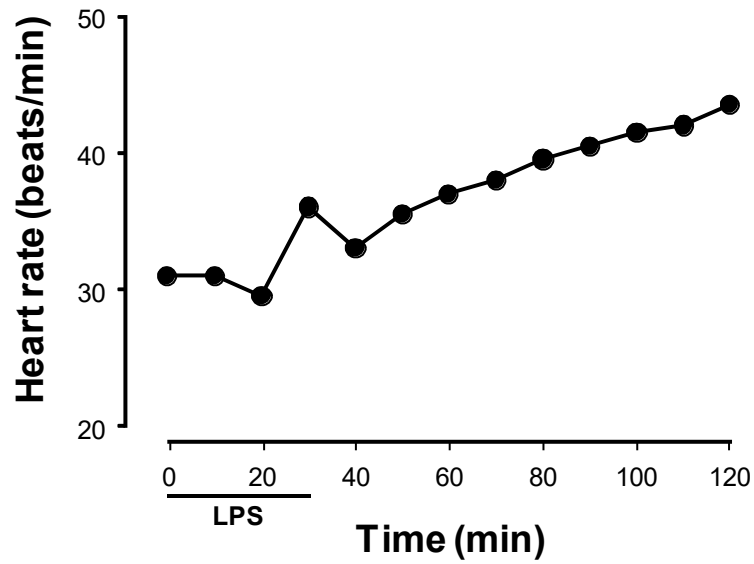


図 10 LPS 全身投与による心拍数の変化

0 時点から 30 分かけて LPS (30 ng/kg bwt) を投与した。心拍数は経時的に増加した。2 頭の実験結果の平均値として示した。

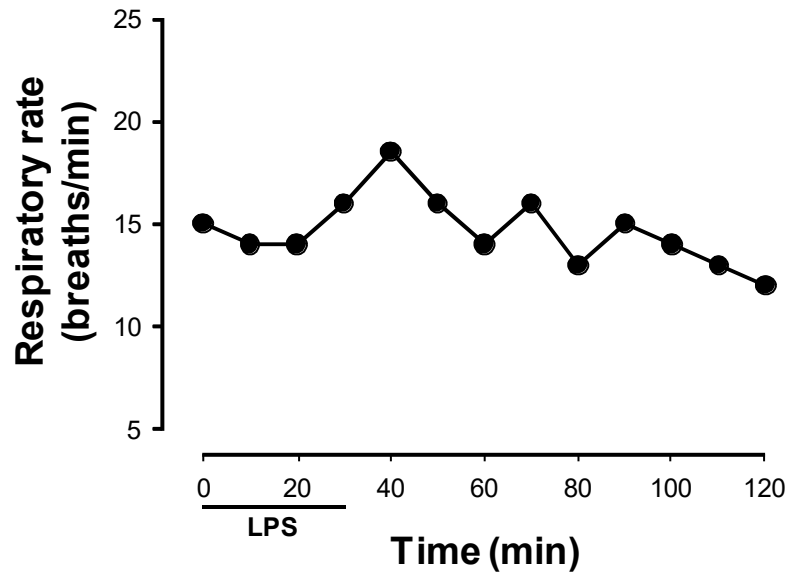


図 11 LPS 全身投与による呼吸数の変化

0 時点から 30 分かけて LPS (30 ng/kg bwt) を投与した。呼吸数には顕著な変化は認められなかった。2 頭の実験結果の平均値として示した。

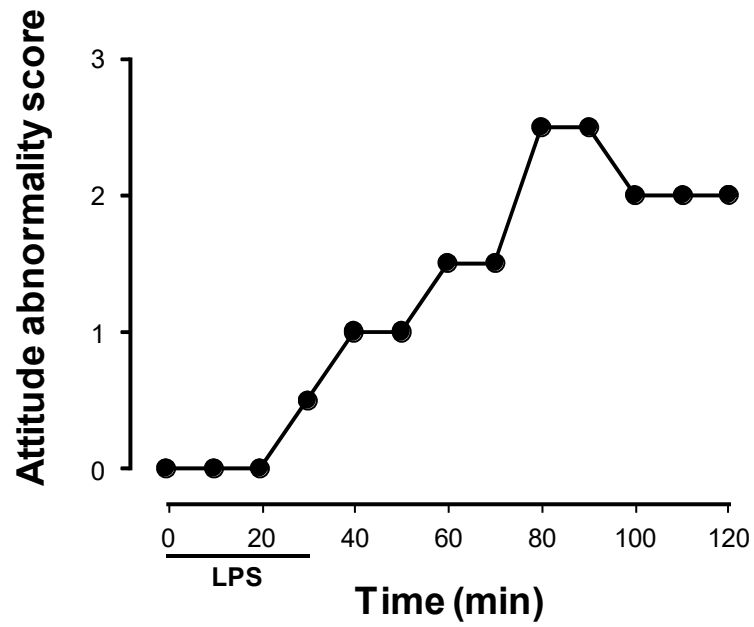


図 12 LPS 全身投与による不快感スコアの変化

0 時点から 30 分かけて LPS (30 ng/kg bwt) を投与した。不快感スコアは経時的に悪化し、80~90 分にかけてピークに達した。2 頭の実験結果の平均値として示した。

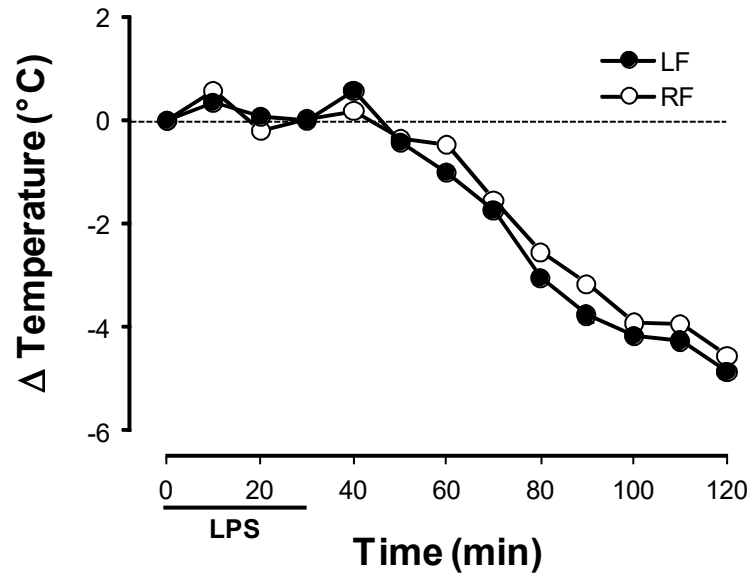


図 13 LPS 全身投与による蹄壁表面温度の変化

0 時点から 30 分かけて LPS (30 ng/kg bwt) を投与した。蹄壁表面温度は、0 分時点の測定値と各時点の測定値の差として算出し、2 頭の実験結果の平均値として示した。50 分時点から低下し始め、120 時点で約 -5°C となった。両前肢の変化に差はなかった。

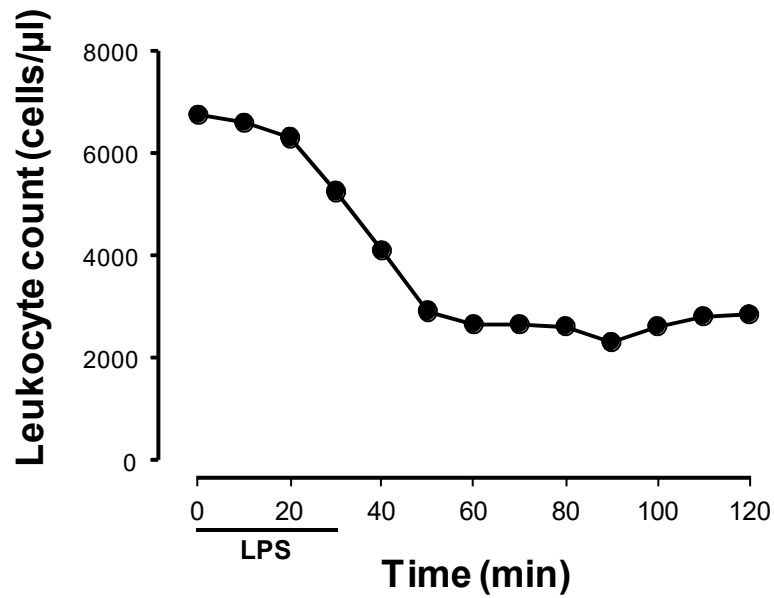


図 14 LPS 全身投与による白血球数の変化

0 時点から 30 分かけて LPS (30 ng/kg bwt) を投与した。白血球数は LPS 投与終了直後から経時的に減少し、50 分時点以降は低値のまま推移した。2 頭の実験結果の平均値として示した。

3. 考察

低用量 LPS 曝露によるウマのエンドトキセミアモデルは、既に報告されているが、その多くがサラブレッド以外の品種を用いた実験か、品種の記載がない報告である[10, 11, 13, 14, 33]。一般的にサラブレッドは、ウマの品種の中でも悍性が高い。特に競馬に供されているサラブレッドは、調教や飼養方法など乗用馬とは異なった特殊な飼養環境に置かれており、常態的にストレス負荷が掛かりやすい動物と言える。従って、品種や使役用途の違いによって、LPS に対する感受性が異なる可能性も考えられることから、既報のエンドトキセミアモデルの再現性を検証した。本節の実験において観察された所見の中で、体温、心拍数、不快感スコア、蹄壁表面温度および白血球動態については概ね既報と類似した変化を示した。呼吸は、一時的に浅速になるなど LPS に対する反応性は示したものの、個体内および個体間でのバラつきが大きく指標としては不適切と考えられた。今回は測定間隔を 10 分毎としたため、不快感スコアについては簡易的なスケールを用いて迅速に判定した。しかし、LPS を全身投与されたウマは複数の症状を異なるタイミングで発現することから、不穏感や疼痛感の評価に客観性を担保するためには、より細分化されたスケールを用いて判定する必要がある。サラブレッド種を用いた別の研究報告と同様に、蹄壁表面温度は経時的低下を示したが、LPS に対する反応はより顕著であった[12]。これは、飼養環境の違いに加え、投与された LPS のエンドトキシン力価の違いによるものかもしれない。

今回は安全性を考慮し、120分という比較的短時間の観察で実験を終了した。過去の研究によると直腸温度のピークはLPS投与開始から180～210分で、白血球数の最低値は90～105分で観察されていることから[11, 13, 14, 33]、ボルテゾミブの効果判定の際にはより長い時間での効果解析が必須となる。今回の120分間の実験期間中、実験を途中で切り上げる必要がある危機的な症状は全く認められなかったことから、実験時間を延長することは問題ないと考えられた。

[3]エンドトキセミアモデルを用いたボルテゾミブの効果解析

1. 材料と方法

1) ウマ

この実験は、国立大学法人東京農工大学研究倫理委員会および動物実験小委員会による承認（承認番号 27-57）を受け、ガイドラインに従って実施した。全ての馬に対して、実験前に獣医師による馬体検査（視診・触診）、歩様検査、総血球計算および血液生化学検査を行い、健康であることを確認した上で実験に供した。実験には3頭のサラブレッド種（A馬、B馬およびC馬）を用いた。3頭の詳細な情報については表2に示す。ショック発症等の不測の事態に備え、緊急救命用の装置および薬剤を常備した環境で実験し、実験後は健康状態を最低1ヶ月間観察した。

2) 薬剤

ボルテゾミブ（StressMarq Biosciences Inc.）はDMSOで50 mg/mlの濃度になるように溶解し、 -30°C で保存しておいたものを用時調整して使用した。ボルテゾミブの投与量は、ヒト多発性骨髄腫における投与量に準じて、 1.3 mg/m^2 （体表面積）とした。ウマの体表面積（例： $6.6\text{m}^2/500\text{kg bwt horse}$ ）は、成書を参考に算出した[53]。ボルテゾミブ 1.3 mg/m^2 を20 mlの生理的食塩水で希釈し、LPS曝露の30分前（AおよびB馬； -30 分時点）または

60 分前（C 馬; -60 分時点）に静脈内投与した。また、プラセボ投与実験では、ボルテゾミブと同量の DMSO（Vehicle）を投与した。

LPS（*Escherichia coli* O55:B5 LPS; Sigma-Aldrich）は、PBS で 1 mg/ml になるように溶解して -30 °C で保存し、実験毎に用時調整した。

3) *In vivo* 実験デザイン

各馬自身がコントロールとなるクロスオーバーデザインとして実施した。最初の投薬試験において、A および B 馬にはボルテゾミブを投与し、一方、C 馬にはプラセボとして vehicle（DMSO）を投与した。6 週間のウォッシュアウト期間後に、二回目の投薬試験をクロスオーバーして実施した。これにより、3 頭ともボルテゾミブ投与およびプラセボ投与の両方を受けたことになる。

4) エンドトキセミアモデル

実験は東京農工大学動物医療センター内の実験馬房で実施した。馬房はコンクリートで覆われており、床にはウッドチップを敷き詰めた。空調設備により室温を極力一定（実験内変動係数 < 2.4%）に保つように維持し、実験開始 1 時間前からウマを繋留して環境に順化させてから実験を行った。

エンドトキセミアは、2 節と同様に低用量 LPS 投与により作成した。2% リドカイン（Xylocaine injection 2%; AstraZeneca K. K., Osaka, Japan）による局所麻酔下で左頸静脈に静脈カテーテルを留置し、それを介して LPS（9% 生理食塩溶液 500 ml 中に溶解）を 1 ng/kg/min の用量で 30 分かけて

投与した（0～30分時点；総投与量 30 ng/kg bwt）。このカテーテルは、薬液の注入と血液サンプル採取にも利用した。270分時点までは採食・飲水を制限し、それ以降は乾草と水を自由給餌とした。実験は8時間（420分時点）で終了とし、直後に全馬に対してフルニキシメグルミン 1.1 mg/kg bwt を静脈内投与した。実験後は最低1ヶ月間にわたり健康状態をチェックした。

5) 臨床および炎症パラメータの測定

測定のタイミングは、LPS 暴露開始時点を0分時点とし、-60（C馬；前処置直前）、-30（AおよびB馬；前処置直前）、0（LPS投与前）、30、60、90、120、150、180、210、240、270、300、330、360、390、420分の30分毎とした。臨床指標として、直腸温度、心拍数、疼痛スコアおよび蹄壁表面温度を測定した。疼痛スコアは、ウマで既に有効性が確認されている numerical rating scale（NRS）を用いた[54]。表3に示す通り、このNRSのスコアは、最小スコアが9（疼痛症状認めず）で最大スコアが35（激痛または極度の沈鬱状態）である。蹄壁表面温度は、既述の方法を用いて左前肢蹄を測定した。

また、同じ time point において、EDTA-2K 採血管（BD Vacutainer; Nippon Becton Dickinson Company, Ltd.）およびヘパリン採血管（Venoject; Terumo Corporation）により血液サンプルも採材した。EDTA-2K 採血管により採取した血液サンプルの総血球計算は、Celltac α （MEK-6450; Nihon Kohden Corporation, Tokyo, Japan）を用いた。ヘパリン採血管から分離した各血漿

サンプルは試薬希釈液で2倍希釈し、既述(I章2節)した方法で血漿 TNF- α 濃度を測定した。

6) 統計学的解析

対照となるプラセボ投与時のデータとボルテゾミブ投与時のデータを個体内で比較するとともに、各パラメータの area under the curve (AUC) 値を線形台形法により算出し、ボルテゾミブ群とプラセボ群における平均値の比較を行った。統計処理には Student's *t*-test を用いて、有意水準は5%とした。

2. 結果

プラセボ前処置した対照群は、LPS 投与により、直腸温度上昇、心拍数増加、疼痛スコア悪化等の典型的なエンドトキセミアの臨床症状を発現した[10, 11, 13, 14, 33]。

対照群の直腸温度は徐々に上昇し、210～300 分時点で最大値（39.2–40.1°C）を呈した（図 15）。ボルテゾミブ前処置時の A 馬の直腸温度は、120 分時点でピークとなり一旦は低下したものの、240 分時点で再び上昇し、二峰性を呈した。最大値は同程度（+0.1°C）であった。B 馬は、ボルテゾミブにより直腸温度の上昇が悪化する傾向が見られ、最大値は対照群より高かった（+0.6°C）。逆に C 馬では、ボルテゾミブにより全体的に直腸温度上昇が抑えられる傾向にあり、最大値は対照群より低かった（-0.6°C）。両群の AUC 値（対照群：298.0 ± 7.0 °C・h，ボルテゾミブ群：297.9 ± 6.5 °C・h）に有意差は認めなかった。

対照群の心拍数は、30 分～90 分の間で最大値（46–90 beats/min）を示した（図 16）。ボルテゾミブ前処置時の心拍数の変化に、特筆すべき差異は観察されず、AUC 値（対照群：339.0 ± 26.7 beats/min・h，ボルテゾミブ群：353.7 ± 26.2 beats/min・h）の比較による有意差は認めなかった。

対照群のペインスコアは、90 分時点でピーク（A 馬 32 スコア，B 馬 29 スコア，C 馬 30 スコア）を呈し、徐々に低下した（図 17）。自由給餌を再開した後（270 分時点の測定後）に一時的な軽度の上昇を認めた。ボルテゾミブ前処置群は、対照群よりも全体的にペインスコアが低い値で推移し

た。対照群が最大スコアを示した 90 分時点での比較では、4~8 スコア軽減された。AUC 値（対照群：142.5 ± 3.9 score・h, ボルテゾミブ群：115.4 ± 4.6 score・h）の比較により有意差が認められた。

蹄壁表面温度（図 18）は、対照群では LPS 投与後に急速に低下し、150 分~210 分時点の間で最も低下した（A 馬 -6.5°C, B 馬 -7.7°C, C 馬 -8.0°C）。ボルテゾミブ前処置により 3 頭とも蹄壁表面温度の低下が抑制され、最低値（A 馬 -3.6°C, B 馬 -4.6°C, C 馬 -4.1°C）は対照時よりも 2.9~3.9°C 以上も高かった。AUC 値（対照群：42.2 ± 2.0 °C・h, ボルテゾミブ群：59.9 ± 5.2 °C・h）の比較により有意差が認められた。

白血球数は、プラセボ前処置後の LPS 刺激により急激に低下し、60~90 分時点において最低値（A 馬 1,600 cells/μl, B 馬 1,600 cells/μl, C 馬 1,100 cells/μl）に達した後、リバウンドとして増加に転じた（図 19 左）。白血球全体に占める顆粒球の割合は、60 分時点で急激な一過性の低下をみせており、白血球数低下は顆粒球の減少に起因することが示された（図 19 右）。A 馬では、ボルテゾミブ前処置により白血球数が最低値に達した後の上昇がプラセボ投与時に比べ緩やかであり、240 分時点においてもベースラインには回復しなかった。一方、B 馬および C 馬では、ボルテゾミブは白血球数全体に対する効果は認めなかったものの、顆粒球の減少に対しては抑制する傾向がみられた。白血球動態の AUC 値（対照群：41,217 ± 6,612 cells/μl・h, ボルテゾミブ群：36,400 ± 9,206 cells/μl・h）の比較では、有意差は認めなかった。

プラセボ前処置時の血漿中 TNF- α 濃度 (図 20) は、LPS 投与後に一過性に上昇し、60 分または 90 分時点においてピークに達した (A 馬 2,667 pg/ml, B 馬 3,264 pg/ml, C 馬 2,303 pg/ml)。ボルテゾミブ前処置による効果は、3 頭で異なった。A 馬は、プラセボ投与時に比べて TNF- α 濃度のピークが約 1.7 倍に増加した (90 分時点, 4,500 pg/ml)。B 馬では差異が観察されなかった。C 馬では、LPS 刺激による血漿中 TNF- α 濃度の上昇が著しく抑制され、ピーク値 (483 pg/ml) はプラセボ投与時の約 1/5 であった。AUC 値 (対照群 : $5,622 \pm 987$ pg/ml \cdot h, ボルテゾミブ群 : $5,780 \pm 2,319$ pg/ml \cdot h) の比較による有意差は認めなかった。

なお、実験期間中、緊急治療を要するような危機的なショック症状は発現しなかった。また、プラセボ投与群およびボルテゾミブ投与群のいずれも、実験後 1 ヶ月間の経過観察において馬体に異常は認めなかった。

表 2 実験に供したウマのリスト

Horse	Breed	Age	Sex	Body weight (kg)	Body surface area (m ²)
A	thoroughbred	8	male	500	6.6
B	thoroughbred	5	gelding	538	6.9
C	thoroughbred	3	female	438	6.1

表 3 疼痛スコア判定に利用した NRS

Behavior category	1	2	3	4
Gross pain behaviors ^{a,b}	None		Occasional	Continuous
Head position ^b	Above withers		At withers	Below withers
Ear position ^b	Forward, frequent movement		Slightly back, little movement	
Location in stall ^b	At door watching environment	Standing in middle, facing stall door	Standing in middle, facing sides of stall	Standing in middle, facing back of stall
Spontaneous locomotion ^b	Moves freely	Occasional steps		No movement
Response to open door ^c	Moves to door	Looks at door		No response
Response to approach ^c	Move to observer, ears forward	Looks at observer, ears forward	Moves away from observer	Does not move, ears back
Lifting feet ^c	Freely lift feet when asked	Lift feet after mild encouragement		Extremely unwilling to lift feet
Response to grain ^c	Move to door and reaches for grain	Looks at door		No response

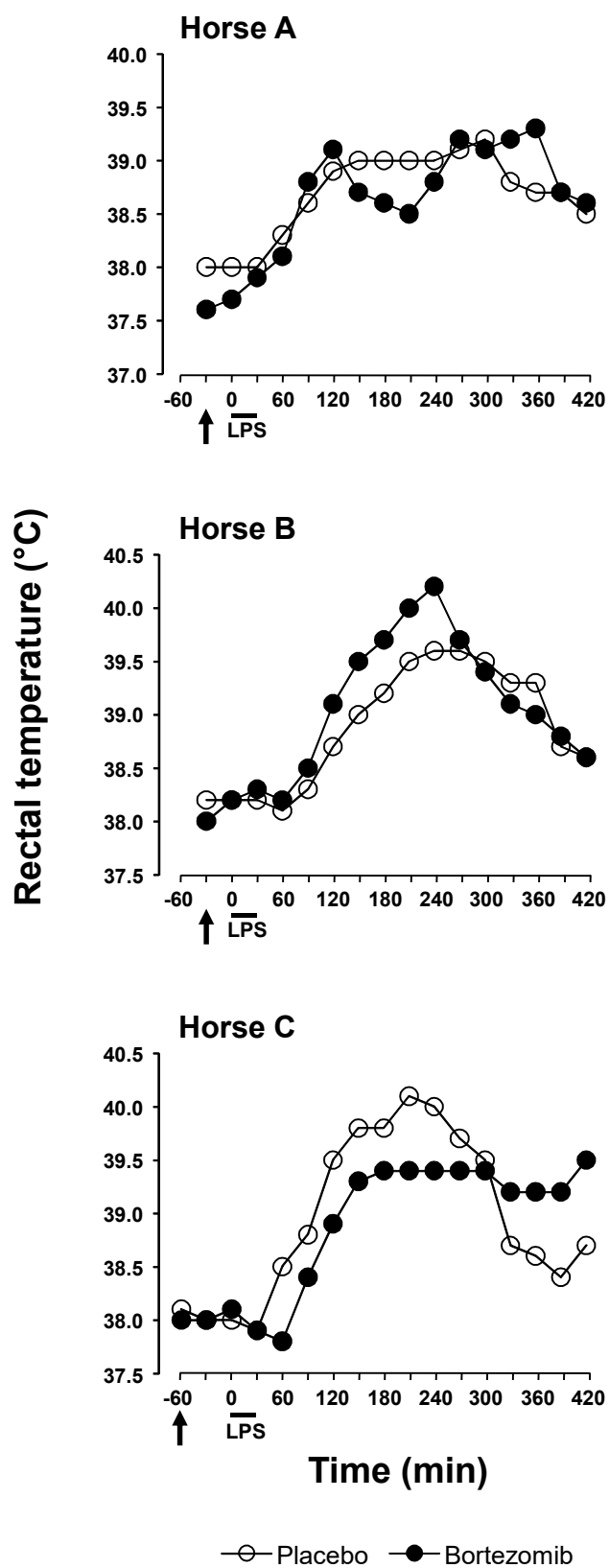
^a Gross pain behaviors include pawing, sweating, looking at the flank, flehmen, and lying down/standing up repeatedly.

^b Scores combined to yield Posture score.

^c Scores combined to yield Socialization score.

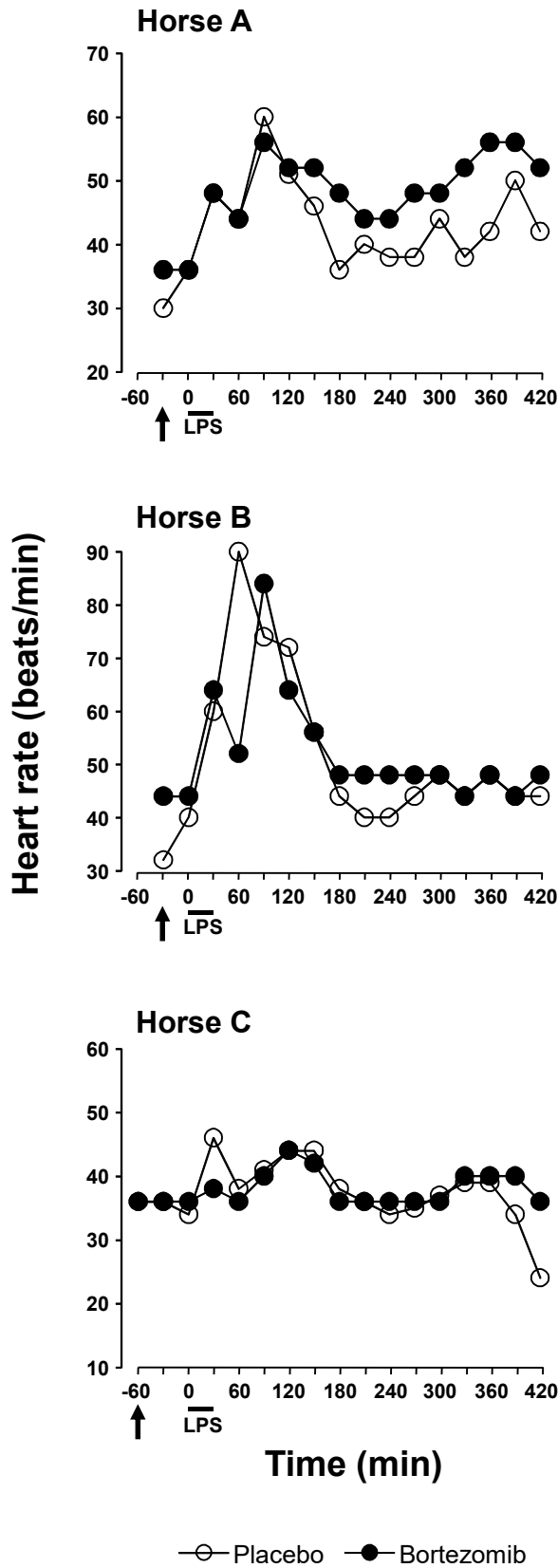
引用文献 No.54 より修正引用。

図 15 ボルテゾミブの直腸温度に対する効果



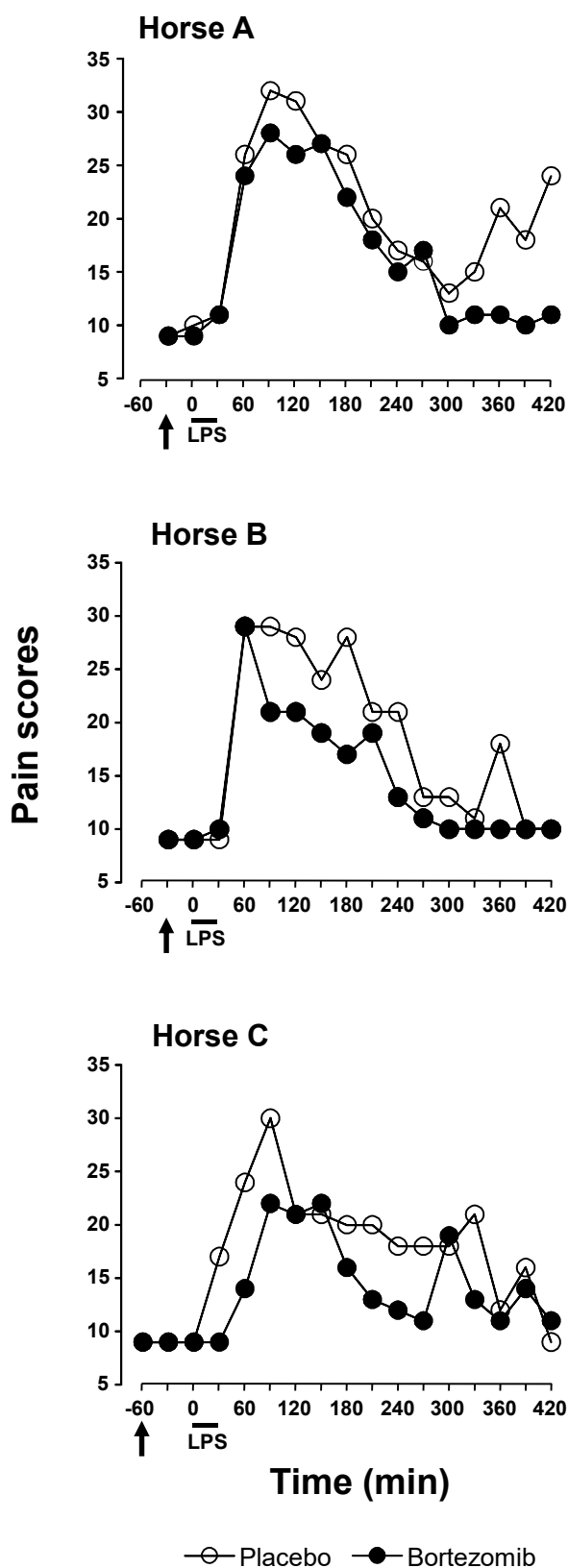
0 時点から 30 分かけて LPS (30 ng/kg bwt) を投与した。矢印はボルテゾミブの投与タイミングを示している。各馬のデータをそれぞれ個別に提示した。

図 16 ボルテゾミブの心拍数に対する効果



0 時点から 30 分かけて LPS (30 ng/kg bwt) を投与した。矢印はボルテゾミブの投与タイミングを示している。各馬のデータをそれぞれ個別に提示した。

図 17 ボルテゾミブの疼痛スコアに対する効果



0 時点から 30 分かけて LPS (30 ng/kg bwt) を投与した。矢印はボルテゾミブの投与タイミングを示している。各馬のデータをそれぞれ個別に提示した。ボルテゾミブは LPS 誘導性の疼痛反応を全体的に軽減した。

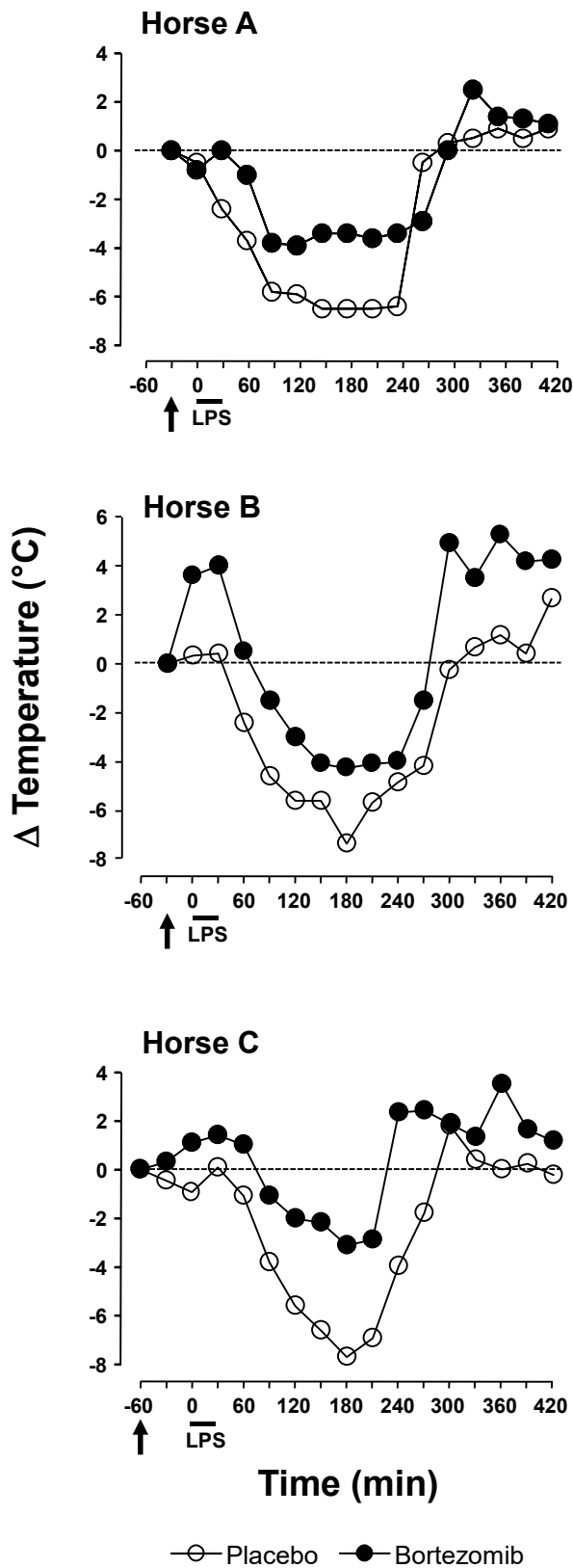
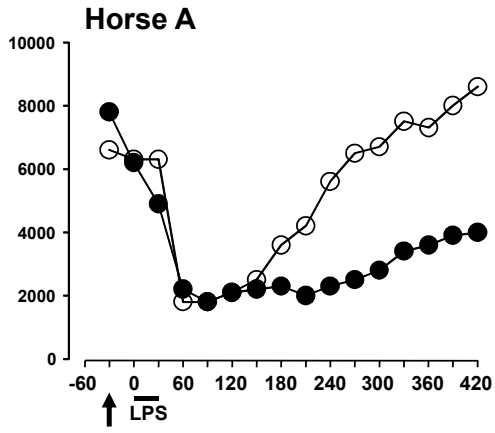


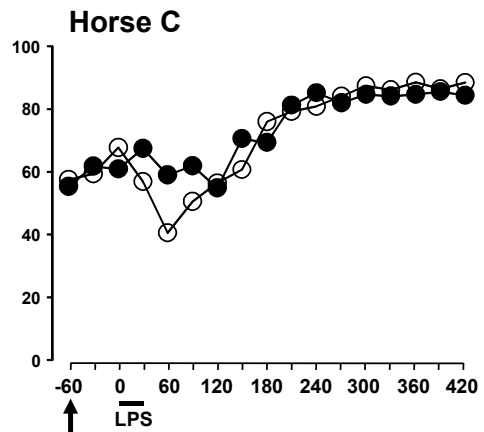
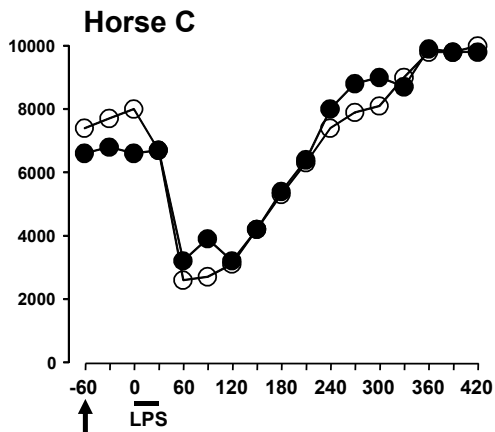
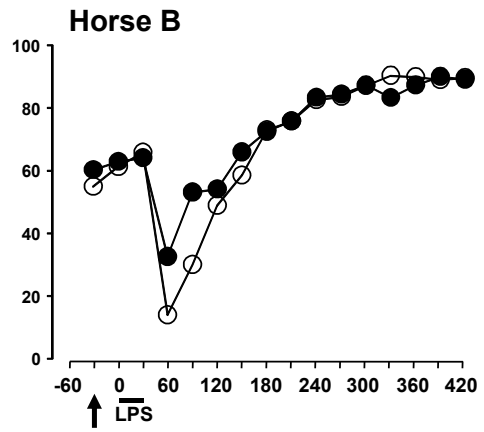
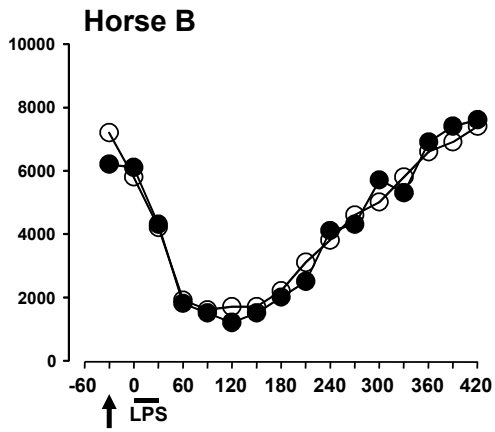
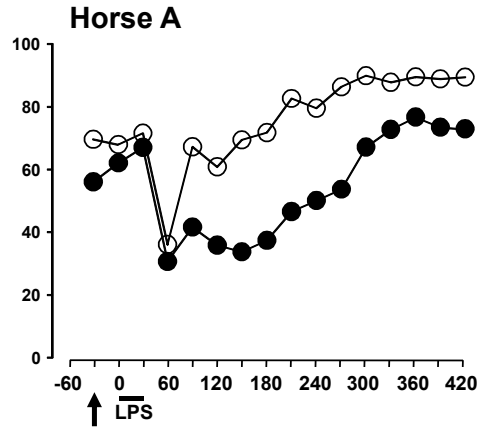
図 18 ボルテゾミブの蹄壁表面温度に対する効果

0 時点から 30 分かけて LPS (30 ng/kg bwt) を投与した。矢印はボルテゾミブの投与タイミングを示している。蹄壁表面温度は、実験開始時の測定値と各時点の測定値の差として算出した。各馬のデータをそれぞれ個別に提示した。ボルテゾミブは全頭において LPS 誘導性の蹄壁表面温度低下を抑制した。

Leukocyte count (cells/ μ l)



Granulocyte (%)



Time (min)

Time (min)

○ Placebo

● Bortezomib

図 19 ボルテゾミブの白血球動態に対する効果

0 時点から 30 分かけて LPS (30 ng/kg bwt) を投与した。矢印はボルテゾミブの投与タイミングを示している。各馬のデータをそれぞれ個別に提示した。ボルテゾミブは、A 馬においては LPS 誘導性の白血球減少を増悪化した。一方、B 馬および C 馬では、顆粒球比率の低下を抑制する傾向がみられた。

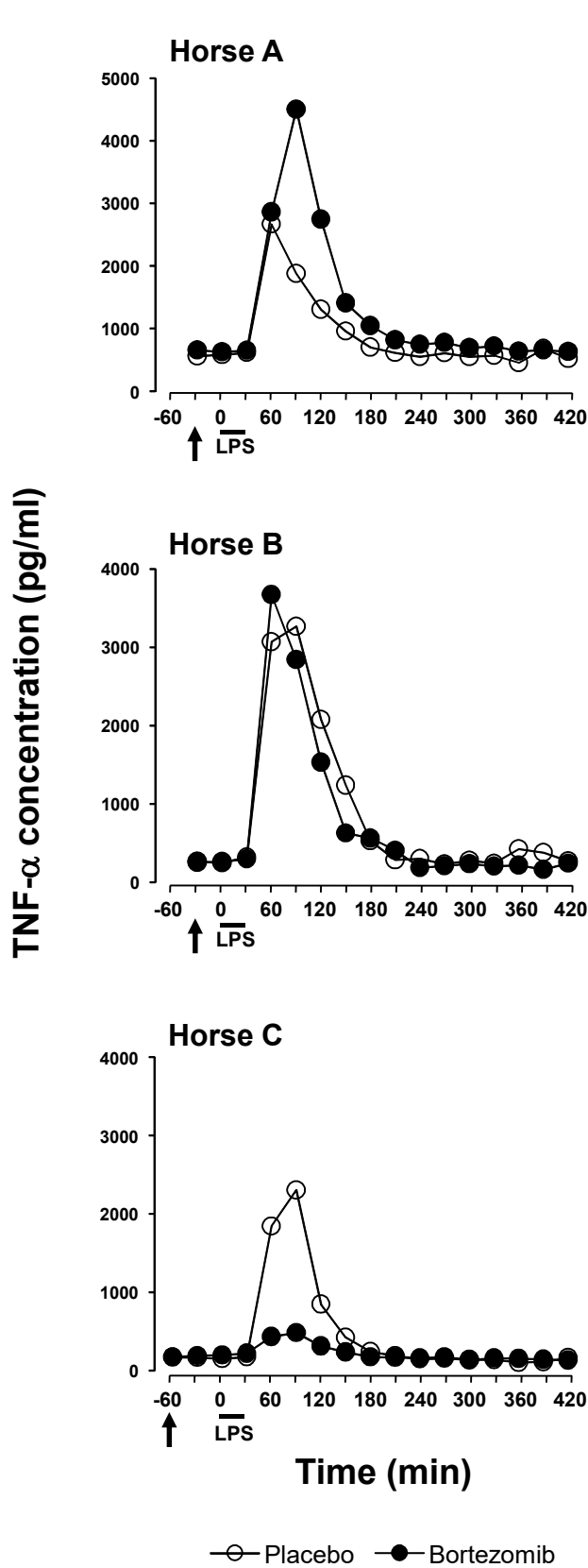


図 20 ボルテゾミブの血漿中 TNF- α 濃度に対する効果

0 時点から 30 分かけて LPS (30 ng/kg bwt) を投与した。矢印はボルテゾミブの投与タイミングを示している。各馬のデータをそれぞれ個別に提示した。A 馬では、ボルテゾミブ投与により LPS 誘導性の TNF- α 産生が増加した。一方、C 馬では TNF- α 産生が著しく抑制された。

3. 考察

本実験の結果は、ボルテゾミブの全身投与がエンドトキセミアモデルの疼痛反応や蹄壁表面温度低下に対して改善効果を有していることを明らかにした。この結果は、ボルテゾミブがウマのエンドトキセミアの臨床症状を緩和する潜在的可能性を秘めていることを示唆している。

ボルテゾミブの効果解析に利用した低用量 LPS 刺激によるエンドトキセミアモデルは、体温上昇、疼痛スコア増加、指灌流低下などの臨床症状および白血球活性化、炎症性サイトカイン産生増加などの炎症性反応を容易に再現できる特徴を有し、それ故にエンドトキセミア治療薬の効果判定に選択的に利用されている。今回の研究において観察された所見は、既報のものと同様であった。

NF- κ B を直接的に阻害する分子標的薬の内、現在市販されているのはボルテゾミブ（ベルケイド[®]; Janssen Pharmaceutical K. K.）だけである。ボルテゾミブは、プロテアソームを阻害することにより、NF- κ B 抑制作用を有す。ウマのエンドトキセミアに対する有効性が確立できた場合、容易に入手可能な薬でなければ臨床の場で使用されないことから、すでに市販されており、なおかつ、NF- κ B 関連炎症生疾患への効果が期待できるボルテゾミブの効果を検証した。ヒト多発性骨髄腫治療における投与量[32]と *in vitro* の結果を参考に、今回の *in vivo* 実験の投与量を決定した。ヒトの体内薬物動態では、1.3 mg/m² 投与時の初期血中濃度が 185.84 ± 57.65 ng/ml（約 483 nM）に達する事が報告されている[32]。I 章で示した通り、その濃度

は *in vitro* 下でのウマの単球に対する有効濃度の範囲内 (100–1,000 nM) になる。ウマとヒトでは薬物代謝が必ずしも一致する訳ではないが、この用量を採用した根拠とした。ボルテゾミブの血漿中濃度動態は、速やかな分布相とそれに続く緩く長い消失相を特徴とする二相性変化を示す。最適なボルテゾミブの投与のタイミングが不明であったため、今回の実験では LPS 刺激の 30 分または 60 分前の二種類を試行した。

今回の *in vivo* 実験に供したウマは 3 頭のみであった。これまでウマにおけるボルテゾミブの投与例が皆無であることから、慎重を期して投与実験を行う必要があり、予期しないボルテゾミブの副作用のリスクを抑えるために、少頭数によるパイロット実験として実施した。ボルテゾミブ投与実験による重大な副作用は一切認めず、実験後 1 ヶ月間の経過観察においてもウマの状態に異常は認めなかった。

現在のエンドトキセミアに対する主要な治療アイテムは、フルニキシニンメグルミンと輸液療法である[4]。しかしながら、フルニキシニンメグルミンは、強い抗炎症作用および鎮痛作用を有すものの、血中白血球活性化や TNF- α に対する抑制効果をあまり有していない[11, 55, 56]。さらに、フルニキシニンメグルミンは、腸粘膜透過性を亢進し、LPS の流入を容易にさせることによって、小腸に対する有害作用を有しており、既発のエンドトキセミアを悪化させる可能性が指摘されている[5, 6]。エンドトキセミア治療において、白血球活性化を抑制する効果を有す別の治療薬をフルニキシニンメグルミンと併用する必要性が指摘されている。より効果的な治療法の確立を目指して、これまでウマのエンドトキセミアに対し、ポリミキシニン B、

DMSO、チロキサポール、リン酸化乳化剤、血液濾過など様々な薬剤が試されてきたものの、有効な治療法として確立されたものは未だに極僅かである[4]。最近の研究では、*in vivo* モデルにおける高免疫血漿[33]、クレンブテロール[13]およびピルビン酸エチル[14]の効果が報告されているが、臨床例において幅広く応用されるまでには至っていない。すなわち、ウマに重篤な障害を与えるエンドトキセミアに対する効果的な根治療法の確立が急務となっている。

本実験においてボルテゾミブは疼痛スコアを改善した。エンドトキセミアにおける疼痛は、プロスタグランジンが関与している[57]。LPS や TNF- α によって活性化された NF- κ B が COX-2 の発現を誘導し、その結果、プロスタグランジンの産生を引き起こす。ボルテゾミブの疼痛軽減効果は、NF- κ B 阻害による COX-2 発現抑制によるものかもしれない。

指灌流の指標の一つである蹄壁表面温度[58]に対するボルテゾミブの効果はさらに顕著であった。LPS によって誘導される炎症因子の一つに強力な血管収縮作用を有すエンドセリン-1 がある。エンドトキセミア罹患馬においてエンドセリン-1 の血中濃度が増加していることが報告されており、内臓低灌流（血液循環低下）や DIC 等の症状との関連性が指摘されている[1, 42, 43]。LPS を感知したマクロファージがエンドセリン-1 の産生源となるが、TNF- α により刺激された血管内皮細胞も NF- κ B 活性化を介してエンドセリン-1 を産生する[59, 60]。従って、ボルテゾミブは NF- κ B 阻害によって多角的にエンドセリン-1 の産生を抑制し、その結果、指灌流低下を抑制すると考えられる。エンドトキセミアに続発する代表的疾患が蹄葉炎で

ある[36]。蹄葉炎の前駆期において観察される指灌流低下には LPS が関与していることが示唆されている[39–41]。それ故、ボルテゾミブは、指灌流低下を抑制することによってエンドトキセミア続発性蹄葉炎の病態形成を阻止できるかもしれない。

白血球動態に対するボルテゾミブの影響は、1 頭のウマ (A 馬) で LPS の作用を増悪化させる結果となった。一方で、他の 2 頭ではマージナルプールへの顆粒球の移行を抑制する可能性が伺えた。A 馬で観察された白血球動態への悪影響は、エンドトキセミアの病態悪化に繋がる真があることから、副作用の可能性として考慮する必要がある。

LPS 刺激 60 分前にボルテゾミブを投与したウマ (C 馬) において、ボルテゾミブは LPS 刺激による血漿中 TNF- α 上昇を顕著に抑制した。LPS 刺激 30 分前にボルテゾミブを投与した 2 頭の内 1 頭において、逆に TNF- α 産生が増悪化する現象を示した (A 馬)。この馬においては、TNF- α 濃度と関連するように白血球のリバウンド回復が遅延していた。

TNF- α 産生における相反する現象 (個体間の差異) を説明するのは困難だが、ヒトにおいてボルテゾミブに対する感受性および副作用発現における個体差が認知されており、ウマにおいてもいくつかの要因によってボルテゾミブに対する反応の個体差が存在するのかもしれない。その要因として、遺伝的要因、性差、ボルテゾミブの二面的作用などの関与が推測される。

一般的な薬物代謝の個体差における遺伝的要因として、代謝酵素チトクローム P450 (CYP) ファミリーの遺伝子多型がヒトでは多数報告されてお

り、遺伝子多型に起因する代謝活性低下が薬物体内動態の個体差として表現される。ヒトにおけるボルテゾミブの代謝には、CYP3A4、CYP2C19、CYP1A2 等が関与している[61]。ウマにおけるボルテゾミブの代謝系については明らかにされていない。ウマ CYP ファミリーの遺伝子多型に関する情報はヒトや実験動物と比較して不足しているが、CYP3A の複数のサブファミリー（CYP3A93, CYP3A89, CYP3A94, CYP3A95, CYP3A96）や CYP2B6 の遺伝子多型の存在が示されている[62, 63]。全ての遺伝子多型が代謝活性の変化として表現される訳ではないが、実際に薬物代謝に影響を及ぼす事例も報告されている[63]。従って、ウマ CYP ファミリーにおける未知の遺伝子多型に起因するボルテゾミブ感受性の個体差が存在する可能性は否定できない。ウマにおけるボルテゾミブの代謝に関与する CYP の同定と遺伝子多型性の有無について解明することが、今後の課題の一つである。

ヒトでは、性差による薬物代謝への影響も指摘されており、薬物トランスポーターの発現量や CYP ファミリーの代謝活性の違いが、薬物代謝における性差の要因として知られている。ウマの薬物代謝における性差については明らかにされていないが、ヒト同様に性別が影響し得ることも考えられる。

薬物側の要因として、NF- κ B シグナルカスケードに対するボルテゾミブのユニーク（二面的）な作用が関係している可能性が挙げられる。NF- κ B 活性化経路には、canonical 経路と non-canonical 経路の二つが存在する。ボルテゾミブは、二つの経路をブロックすることで、TNF- α によって著しく活性化された NF- κ B を抑制する[23-25]。逆に、非刺激下では canonical 経

路を活性化することで NF- κ B 活性化を誘導することが報告されている[64]。エンドトキセミアの NF- κ B 活性化において、canonical 経路と non-canonical 経路のどちらが優位になっているのかについては明らかにされていない。優位に活性化されている経路のタイプとボルテゾミブ投与のタイミングの違いが、今回の TNF- α 産生における相反する所見が観察された原因の一つかもしれない。エンドトキセミアにおける NF- κ B 活性化メカニズムのさらなる研究が必要と考えられる。

本節の実験結果は、エンドトキセミア治療薬としてのボルテゾミブの潜在的能力を十分に期待させ、その有効性を評価する研究を継続する根拠となり得る。今後の課題として、TNF- α 以外の炎症性メディエーター (IL-1 β , IL-6, エンドセリン-1, 接着因子) への作用を検証することに加え、頭数を増やしてウマにおける薬物動態を検証し、効果的な投与量と投与タイミングを決定する必要がある。また、ヒトにおいてはボルテゾミブの感受性や副作用を予測するバイオマーカーの探索の解析が進行している。将来的には、ウマにおいても患馬毎にボルテゾミブの感受性や副作用の決定因子を検査し、個体に合わせた適正投与量を決定するテーラーメイド的な投薬法の確立が望まれる。

[4] 小括

本章では、ボルテゾミブが、ウマのエンドトキセミアモデルにおける疼痛反応および指灌流低下に対して改善効果を有すことを初めて明らかにした。これは、NF- κ B をターゲットとする分子標的薬ボルテゾミブが、ウマのエンドトキセミアの有望な治療候補薬となることを示している。

総括

ウマのエンドトキセミアは、確立された有効な治療法が少なく、未だに致死率の高い難治性疾患である[1, 3]。競馬施行を通じて人間社会に多大な貢献をしているウマの福祉と健康の向上に努力することは、ウマに携わる獣医師にとって責務である。QOLの低下に加え経済的損失規模の大きさから、ウマのエンドトキセミアの効果的な治療法の確立は、獣医学的な枠組みを超えた早急に解決すべき重要課題の一つと言える。

エンドトキセミアの病態発現には多数の因子が複雑に関与しているため、これまで様々な因子を標的とした治療法の開発が試みられてきたが、そのほとんどが失敗に終わっている[4]。失敗の原因の一つに、エンドトキシンによって一度惹起された過剰な炎症状態を単元的なアプローチで沈静化することは困難であるということが推察される。エンドトキシンの化学的本体であるLPSが体内に侵入すると生体は自然免疫反応を発動させ、単球・マクロファージ・樹状細胞等の免疫担当細胞内においてNF- κ Bを活性化させ、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、Granulocyte-colony stimulating factor、エンドセリン-1等の様々な炎症性サイトカインやメディエーターを産生する[7, 8]。これらの因子のいくつかは、標的細胞における自身のシグナル伝達経路においてもNF- κ Bを活性化させることから、LPSによって誘導される一連の炎症カスケードにおいてNF- κ Bが共通因子として作用し、その過剰活性化がエンドトキセミアの病態形成の主役を担っていると考えられる。従って、個別のサイトカインをターゲットとするのではなく、共通因子NF- κ Bをタ

ターゲットとした治療戦略こそが炎症状態の沈静化には有効であると期待される。本研究では、この NF- κ B 過剰活性に着目し、NF- κ B 阻害剤によるエンドトキセミアの分子標的治療の確立を目指して研究を行った。

ウマは LPS 高感受性の動物であり、エンドトキセミアから容易に SIRS に進行する。ヒトもウマ同様に LPS 高感受性であり、ヒトにおける敗血症・エンドトキセミアは未だに罹患率と死亡率の高い症候群として世界規模での対策が急務とされている[15–17, 65]。ヒトのエンドトキセミア治療に関する研究が停滞している理由の一つに、実験動物である齧歯類とヒトとの種差に起因するミスマッチが考えられる。マウスでの研究成果が頻繁にヒトに外挿されているが、そもそもマウスは LPS 耐性動物であり、エンドトキセミア関連遺伝子の反応性の違いからも、エンドトキセミア研究においてマウスの結果をヒトに応用することは妥当ではないとの指摘もある[16, 18]。LPS 感受性や病態発現の類似性から、ヒトのエンドトキセミアモデルとして、ウマ属の積極的活用がこの問題を解決する糸口になるかもしれない。すなわち、ウマのエンドトキセミア治療に関する研究は、ヒト医療に対しても有益な情報を提供し、医学への貢献が期待できる。

本研究において、筆者は *in vitro* で NF- κ B 阻害剤ボルテゾミブが LPS 誘導性の炎症反応を抑制することを証明し、*in vivo* においてもエンドトキセミアの臨床症状である疼痛反応や指灌流低下を改善し得ることを立証した。本研究で得られた新知見は、ウマのエンドトキセミアおよび蹄葉炎に対する治療法確立の一助となるものであり、ウマの LPS 関連性炎症疾患に対し NF- κ B を標的とする新しい治療戦略の有効性を提唱するものである。

謝辞

本研究を遂行し学位論文をまとめるにあたり、多大なるご指導ご鞭撻を賜りました東京農工大学獣医分子病態治療学研究室の松田浩珍教授に深い感謝と敬意の意を表します。仕事に行き詰まり、ウマのために役立つ研究がしたいという想いに駆られた私を、大学院の社会人課程に導き、ウマの獣医師として蹄跡を残す機会を与えて下さったことは、一生の糧となりました。前進氣勢溢れる松田先生のご指導の下でこそ、私の研究生活が完結できたものと感謝の念に堪えません。

また、学位論文審査に際し副査を務めてくださり、的確かつ貴重なご助言を賜りました東京農工大学比較動物医学研究室の田中あかね教授、早稲田大学理工学術院の竹山春子教授、東京農工大学工学研究院の田中秀幸教授および稲田全規准教授に感謝の意を表します。

さらに、研究の遂行に際して、多大なるご協力とご支援を直接いただいた雨貝陽介博士、石坂さおり博士、張孝善博士ならびに松田研史郎博士に深謝いたします。雨貝陽介博士にはウェスタプロット法において、石坂さおり博士と張孝善博士には単球の分離や ELISA において、非常に親身になってご指導いただき、心強いご支援を賜りました。一人では実施不可能だった *in vivo* 実験では、松田研史郎博士に献身的なご協力を賜りました。一緒に苦労しながらも楽しくサンプリングした日々は、感謝の念と共に忘れ得ぬ思い出として胸に刻まれました。また、研究の進行に際し、温かいご

支援を賜りました東京農工大学獣医分子病態治療学研究室ならびに比較動物医学研究室内の皆様に御礼申し上げます。

ここに至るまでの長く苦しかった道のりを踏破する上で、家族の存在が大きな励みになりました。40歳を過ぎてからプライベートで博士課程に進学するという無謀な挑戦を快諾してくれて、家庭を顧みずに貴重な休日を研究生生活に費やす私を辛抱強くかつ温かく見守り、支援してくれた妻 智子と息子 誠馬に心からの謝意を記します。

最後に、本研究は多くのウマ達の協力なくして成し遂げることは不可能でした。特に、全身投与試験の被験馬であるスカイウォーカー、チューバッカおよびレイアの3頭に深い感謝の意を表します。そして、臨床獣医師として診療現場で奮闘していた当時、私の力及ばず、エンドトキセミアにより命を落としていったウマ達に本論文を捧げます。

2017年9月

佐藤 宏昭

引用文献

1. Werners, A.H., Bull, S. and Fink-Gremmels, J. (2005) Endotoxaemia: A review with implications for the horse. *Equine Vet. J.* **37**, 371-383.
2. Moore, J.N. and Vandenplas, M.L. (2014) Is it the systemic inflammatory response syndrome or endotoxemia in horses with colic? *Vet. Clin. North Am.: Equine Pract.* **30**, 337-351.
3. Sykes, B.W. and Furr, M.O. (2005) Equine endotoxaemia - A state-of-the-art review of therapy. *Austr. Vet. J.* **83**, 45-50.
4. Kelmer, G. (2009) Update on Treatments for Endotoxemia. *Vet. Clin. North Am.: Equine Pract.* **25**, 259-270.
5. Tomlinson, J.E., Wilder, B.O., Young, K.M. and Blikslager, A.T. (2004) Effects of flunixin meglumine or etodolac treatment on mucosal recovery of equine jejunum after ischemia. *Am. J. Vet. Res.* **65**, 761-769.
6. Tomlinson, J.E. and Blikslager, A.T. (2005) Effects of cyclooxygenase inhibitors flunixin and deracoxib on permeability of ischaemic-injured equine jejunum. *Equine Vet. J.* **37**, 75-80.
7. Akira, S., Uematsu, S. and Takeuchi, O. (2006) Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.* **124**, 783-801.
8. Sasai, M. and Yamamoto, M. (2013) Pathogen recognition receptors: Ligands and signaling pathways by toll-like receptors. *Int. Rev. Immunol.* **32**, 116-133.

9. Figueiredo, M.D., Vandenplas, M.L., Hurley, D.J. and Moore, J.N. (2009) Differential induction of MyD88-and TRIF-dependent pathways in equine monocytes by Toll-like receptor agonists. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **127**, 125-134.
10. Morris, D.D., Crowe, N. and Moore, J.N. (1990) Correlation of clinical and laboratory data with serum tumor necrosis factor activity in horses with experimentally induced endotoxemia. *Am. J. Vet. Res.* **51**, 1935-1940.
11. Baskett, A., Barton, M.H., Norton, N., Anders, B. and Moore, J.N. (1997) Effect of pentoxifylline, flunixin meglumine, and their combination on a model of endotoxemia in horses. *Am. J. Vet. Res.* **58**, 1291-1299.
12. Menzies-Gow, N.J., Bailey, S.R., Katz, L.M., Marr, C.M. and Elliott, J. (2004) Endotoxin-induced digital vasoconstriction in horses: associated changes in plasma concentrations of vasoconstrictor mediators. *Equine Vet. J.* **36**, 273-278.
13. Cudmore, L.A., Muurlink, T., Whittam, T. and Bailey, S.R. (2013) Effects of oral clenbuterol on the clinical and inflammatory response to endotoxaemia in the horse. *Res. Vet. Sci.* **94**, 682-686.
14. Jacobs, C.C., Holcombe, S.J., Cook, V.L., Gandy, J.C., Hauptman, J.G. and Sordillo, L.M. (2013) Ethyl pyruvate diminishes the inflammatory response to lipopolysaccharide infusion in horses. *Equine Vet. J.* **45**, 333-339.
15. Suffredini, A.F., Hochstein, H.D. and McMahon, F.G. (1999) Dose-related inflammatory effects of intravenous endotoxin in humans: evaluation of a

- new clinical lot of *Escherichia coli* O:113 endotoxin. *J. Infect. Dis.* **179**, 1278-1282.
16. Copeland, S., Warren, H.S., Lowry, S.F., Calvano, S.E., Remick, D. and Inflammation and the Host Response to Injury Investigators. (2005) Acute inflammatory response to endotoxin in mice and humans. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **12**, 60-67.
17. Lowry, S.F. (2005) Human endotoxemia: a model for mechanistic insight and therapeutic targeting. *Shock.* **24**, 94-100.
18. Junhee Seok, H. Shaw Warren, Alex G. Cuenca, Michael N. Mindrinos, Henry V. Baker, Xu, W., Richards, D.R., McDonald-Smith, G.P., Gao, H., Hennessy, L., Finnerty, C.C., López, C.M., Honari, S., Moore, E.E., Minei, J.P., Cuschieri, J., Bankey, P.E., Johnson, J.L., Sperry, J., Nathens, A.B., Billiar, T.R., West, M.A., Jeschke, M.G., Klein, M.B., Gamelli, R.L., Gibran, N.S., Brownstein, B.H., Miller-Graziano, C., Calvano, S.E., Mason, P.H., Cobb, J.P., Rahme, L.G., Lowry, S.F., Maier, R.V., Moldawer, L.L., Herndon, D.N., Davis, R.W., Xiao, W. and Tompkins, R.G. (2013) Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 3507-3512.
19. Tanaka, A., Muto, S., Konno, M., Itai, A. and Matsuda, H. (2006) A new I κ B kinase β inhibitor prevents human breast cancer progression through negative regulation of cell cycle transition. *Cancer Res.* **66**, 419-426.

20. Tanaka, A., Muto, S., Jung, K., Itai, A. and Matsuda, H. (2007) Topical application with a new NF- κ B inhibitor improves atopic dermatitis in NC/NgaTnd mice. *J. Invest. Dermatol.* **127**, 855-863.
21. Adams, J. (2004) The development of proteasome inhibitors as anticancer drugs. *Cancer Cell.* **5**, 417-421.
22. Adams, J. and Kauffman, M. (2004) Development of the proteasome inhibitor Velcade™ (Bortezomib). *Cancer Invest.* **22**, 304-311.
23. Hideshima, T., Richardson, P., Chauhan, D., Palombella, V.J., Elliott, P.J., Adams, J. and Anderson, K.C. (2001) The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. *Cancer Res.* **61**, 3071-3076.
24. Hideshima, T., Chauhan, D., Schlossman, R., Richardson, P. and Anderson, K.C. (2001) The role of tumor necrosis factor α in the pathophysiology of human multiple myeloma: Therapeutic applications. *Oncogene.* **20**, 4519-4527.
25. Hideshima, T., Chauhan, D., Richardson, P., Mitsiades, C., Mitsiades, N., Hayashi, T., Munshi, N., Dang, L., Castro, A., Palombella, V., Adams, J. and Anderson, K.C. (2002) NF- κ B as a therapeutic target in multiple myeloma. *J. Biol. Chem.* **277**, 16639-16647.
26. Kumar, H., Kawai, T. and Akira, S. (2011) Pathogen recognition by the innate immune system. *Int. Rev. Immunol.* **30**, 16-34.

27. Figueiredo, M.D., Moore, J.N., Vandenplas, M.L., Sun, W.C. and Murray, T.F. (2008) Effects of the second-generation synthetic lipid A analogue E5564 on responses to endotoxin in [corrected] equine whole blood and monocytes. *Am. J. Vet. Res.* **69**, 796-803.
28. Sun, W.C., Moore, J.N., Hurley, D.J., Vandenplas, M.L., Linden, J., Cao, Z. and Murray, T.F. (2008) Adenosine A_{2A} receptor agonists inhibit lipopolysaccharide-induced production of tumor necrosis factor- α by equine monocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **121**, 91-100.
29. Nencioni, A., Schwarzenberg, K., Brauer, K.M., Schmidt, S.M., Ballestrero, A., Grünebach, F. and Brossart, P. (2006) Proteasome inhibitor bortezomib modulates TLR4-induced dendritic cell activation. *Blood.* **108**, 551-558.
30. Wang, Y., Liang, Y., Zhang, Y., Wu, D. and Liu, H. (2015) Bortezomib inhibits bone marrow-derived dendritic cells. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **8**, 4857-4862.
31. van der Heijden, J.W., Oerlemans, R., Lems, W.F., Scheper, R.J., Dijkmans, B.A.C. and Jansen, G. (2009) The proteasome inhibitor bortezomib inhibits the release of NF κ B-inducible cytokines and induces apoptosis of activated T cells from rheumatoid arthritis patients. *Clin. Exp. Rheumatol.* **27**, 92-98.
32. Ogawa, Y., Tobinai, K., Ogura, M., Ando, K., Tsuchiya, T., Kobayashi, Y., Watanabe, T., Maruyama, D., Morishima, Y., Kagami, Y., Taji, H., Minami, H., Itoh, K., Nakata, M. and Hotta, T. (2008) Phase I and II pharmacokinetic and pharmacodynamic study of the proteasome inhibitor bortezomib in

- Japanese patients with relapsed or refractory multiple myeloma. *Cancer Sci.* **99**, 140-144.
33. Forbes, G., Church, S., Savage, C.J. and Bailey, S.R. (2012) Effects of hyperimmune equine plasma on clinical and cellular responses in a low-dose endotoxaemia model in horses. *Res. Vet. Sci.* **92**, 40-44.
34. Nishikawa, S., Tanaka, A., Matsuda, A., Oida, K., Jang, H., Jung, K., Amagai, Y., Ahn, G., Okamoto, N., Ishizaka, S. and Matsuda, H. (2014) A molecular targeting against nuclear factor- κ B, as a chemotherapeutic approach for human malignant mesothelioma. *Cancer Med.* **3**, 416-425.
35. Rucker, A. (2010) Equine venography and its clinical application in North America. *Vet. Clin. North Am.: Equine Pract.* **26**, 167-177.
36. Parsons, C.S., Orsini, J.A., Krafty, R., Capewell, L. and Boston, R. (2007) Risk factor for development of acute laminitis in horses during hospitalization: 73 Cases (1997-2004). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **230**, 885-889.
37. Tóth, F., Frank, N., Elliott, S.B., Geor, R.J. and Boston, R.C. (2008) Effects of an intravenous endotoxin challenge on glucose and insulin dynamics in horses. *Am. J. Vet. Res.* **69**, 82-88.
38. Tóth, F., Frank, N., Chameroy, K.A. and Boston, R.C. (2009) Effects of endotoxaemia and carbohydrate overload on glucose and insulin dynamics and the development of laminitis in horses. *Equine Vet. J.* **41**, 852-858.
39. Hood, D.M., Wagner, I.P. and Brumbaugh, G.W. (2001) Evaluation of hoof wall surface temperature as an index of digital vascular perfusion during the

- prodromal and acute phases of carbohydrate-induced laminitis in horses. *Am. J. Vet. Res.* **62**, 1167-1172.
40. Bailey, S.R. (2004) The pathogenesis of acute laminitis: Fitting more pieces into the puzzle. *Equine Vet. J.* **36**, 199-203.
41. Katz, L.M. and Bailey, S.R. (2012) A review of recent advances and current hypotheses on the pathogenesis of acute laminitis. *Equine Vet. J.* **44**, 752-761.
42. Ramaswamy, C.M., Eades, S.C., Venugopal, C.S., Hosgood, G.L., Garza Jr., F., Barker, S.A. and Moore, R.M. (2002) Plasma concentrations of endothelin-like immunoreactivity in healthy horses and horses with naturally acquired gastrointestinal tract disorders. *Am. J. Vet. Res.* **63**, 454-458.
43. Menzies-Gow, N.J., Bailey, S.R., Stevens, K., Katz, L., Elliott, J. and Marr, C.M. (2005) Digital blood flow and plasma endothelin concentration in clinically endotoxemic horses. *Am. J. Vet. Res.* **66**, 630-636.
44. Treffkorn, L., Scheibe, R., Maruyama, T. and Dieter, P. (2004) PGE₂ exerts its effect on the LPS-induced release of TNF- α , ET-1, IL-1 α , IL-6 and IL-10 via the EP2 and EP4 receptor in rat liver macrophages. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **74**, 113-123.
45. Wilson, S.H., Simari, R.D. and Lerman, A. (2001) The effect of endothelin-1 on nuclear factor kappa B in macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **286**, 968-972.

46. Ding, J., Song, D., Ye, X. and Liu, S.F. (2009) A pivotal role of endothelial-specific NF- κ B signaling in the pathogenesis of septic shock and septic vascular dysfunction. *J. Immunol.* **183**, 4031-4038.
47. Macias, W.L., Nelson, D.R., Williams, M., Garg, R., Janes, J. and Sashegyi, A. (2005) Lack of evidence for qualitative treatment by disease severity interactions in clinical studies of severe sepsis. *Crit. Care.* **9**, R607-622
48. Panacek, E.A., Marshall, J.C., Albertson, T.E., Johnson, D.H., Johnson, S., MacArthur, R.D., Miller, M., Barchuk, W.T., Fischkoff, S., Kaul, M., Teoh, L., Van Meter, L., Daum, L., Lemeshow, S., Hicklin, G. and Doig, C. (2004) Efficacy and safety of the monoclonal anti-tumor necrosis factor antibody F(ab')₂ fragment afelimomab in patients with severe sepsis and elevated interleukin-6 levels. *Crit. Care Med.* **32**, 2173-2182.
49. Rice, T.W., Wheeler, A.P., Morris, P.E., Paz, H.L., Russell, J.A., Edens, T.R. and Bernard, G.R. (2006) Safety and efficacy of affinity-purified, anti-tumor necrosis factor- α , ovine fab for injection (CytoFab) in severe sepsis. *Crit. Care Med.* **34**, 2271-2281.
50. Barton, M.H., Bruce, E.H., Moore, J.N., Norton, N., Anders, B. and Morris, D.D. (1998) Effect of tumor necrosis factor antibody given to horses during early experimentally induced endotoxemia. *Am. J. Vet. Res.* **59**, 792-797.
51. Chen, F., Liu, Y., Yang, C. and Yang, C. (2012) Anti-inflammatory effect of the proteasome inhibitor bortezomib on endotoxin-induced uveitis in rats. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **53**, 3682-3694.

52. Han, S.H., Kim, J.S., Woo, J.H., Jeong, S.J., Shin, J., Ahn, Y.S. and Kim, J.M. (2015) The effect of bortezomib on expression of inflammatory cytokines and survival in a murine sepsis model induced by cecal ligation and puncture. *Yonsei Med. J.* **56**, 112-123.
53. Knottenbelt, D.C., Patterson-Kane, J.C. and Snalune, K. L. (2015) Principles of oncological therapy. In: *Clinical Equine Oncology*, 1st edn, Eds: D.C. Knottenbelt, J.C. Patterson-Kane and K.L. Snalune, Elsevier, Edinburgh. pp 118-197.
54. Pritchett, L.C., Ulibarri, C., Roberts, M.C., Schneider, R.K. and Sellon, D.C. (2003) Identification of potential physiological and behavioral indicators of postoperative pain in horses after exploratory celiotomy for colic. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **80**, 31-43.
55. Jackman, B.R., Moore, J.N., Barton, M.H. and Morris, D.D. (1994) Comparison of the effects of ketoprofen and flunixin meglumine on the *in vitro* response of equine peripheral blood monocytes to bacterial endotoxin. *Can. J. Vet. Res.* **58**, 138-143.
56. Bailey, S., Forbes, G., Church, S. and Savage, C. (2009) Equine leukocyte activation in response to low-dose endotoxaemia *in vivo*: effects of flunixin meglumine. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **32** (Suppl. 1), 98.
57. Moore, J.N. and Barton, M.H. (1998) An update on endotoxaemia part 1: Mechanisms and pathways. *Equine Vet. Educ.* **10**, 300-306.

58. Douthit, T.L., Bormann, J.M. and Bello, N.M. (2014) Assessing the association between hoof thermography and hoof doppler ultrasonography for the diagnosis of lameness in horses. *J. Equine Vet. Sci.* **34**, 275-280.
59. Ohkita, M., Takaoka, M., Shiota, Y., Nojiri, R., Sugii, M. and Matsumura, Y. (2002) A nuclear factor- κ B inhibitor BAY 11-7082 suppresses endothelin-1 production in cultured vascular endothelial cells. *Jpn. J. Pharmacol.* **89**, 81-84.
60. Ohkita, M., Takaoka, M., Kobayashi, Y., Itoh, E., Uemachi, H. and Matsumura, Y. (2002) Involvement of proteasome in endothelin-1 production in cultured vascular endothelial cells. *Jpn. J. Pharmacol.* **88**, 197-205.
61. Uttamsingh, V., Lu, C., Miwa, G. and Gan, L.S. (2005) Relative contributions of the five major human cytochromes P450, 1A2, 2C9, 2C19, 2D6, and 3A4, to the hepatic metabolism of the proteasome inhibitor bortezomib. *Drug Metab. Dispos.* **33**, 1723-1728.
62. Schmitz, A., Demmel, S., Peters, L.M., Leeb, T., Mevissen, M. and Haase, B. (2010) Comparative human-horse sequence analysis of the CYP3A subfamily gene cluster. *Anim. Genet.* **41**, 72-79.
63. Corado, C.R., Mckemie, D.S., Young, A. and Knych, H.K. (2016) Evidence for polymorphism in the cytochrome P450 2D50 gene in horses. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **39**, 245-254.
64. Hideshima, T., Ikeda, H., Chauhan, D., Okawa, Y., Raje, N., Podar, K., Mitsiades, C., Munshi, N.C., Richardson, P.G., Carrasco, R.D. and Anderson,

K.C. (2009) Bortezomib induces canonical nuclear factor- κ B activation in multiple myeloma cells. *Blood*. **114**, 1046-1052.

65. Barie, P.S. (2012) World Sepsis Day: September 13, 2012. *Surgical infections*. **13**, 185-186.