

Title	Phorbol myristate acetate惹起性胃潰瘍におけるnuclear factor kappa Bとtumor necrosis factor- α の役割
Sub Title	
Author	竹内, 哲(Takeuchi, Tetsu) 石井, 裕正(Ishii, Hiromasa)
Publisher	慶應医学会
Publication year	2003
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.80, No.2 (2003. 6) ,p.T51- T61
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	学位論文
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20030601-0051

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

学位論文

Phorbol myristate acetate 惹起性胃潰瘍における
nuclear factor kappa B と tumor necrosis factor- α の役割

慶應義塾大学医学部内科学教室

(指導：石井裕正教授)

たけ うち てつ
竹 内 哲

(平成 14 年 6 月 29 日受付)

Key Word : gastric ulcer, phorbol ester, nuclear factor kappa B, tumor necrosis factor- α , protein kinase

胃潰瘍の発生機序に関してはいまだ不明の点が多い。著者らの教室では、長年にわたり種々の実験胃潰瘍モデルを用いてその病態生理の解明を試みてきた。それは山口・土屋らによる、腹腔神経節をクロトン油などで刺激し腹部諸臓器に微小循環障害による出血性病変をきたす研究にはじまるが、とくに自律神経障害と胃粘膜病変に着目し、石膏拘束潰瘍モデルを用いストレス負荷時の自律神経の過剰刺激と胃潰瘍の発症の関係につき検討してきた^{1,2)}。さらに自律神経過剰刺激による胃粘膜病変形成過程を解明する目的で、胃の自律神経に直接、反復電気刺激を加えることにより胃粘膜に出血性病変を惹起するモデルを作り、その形成過程における虚血・再還流に伴う微小循環障害および活性酸素の役割などにつき報告してきた³⁻⁵⁾。近年、Helicobacter pylori が、消化性潰瘍の成因の一つとして注目されてきたが、本菌の感染がどのように組織傷害に関与しているかは不明である。胃の実験潰瘍モデルとしては水浸ストレス潰瘍、エタノール潰瘍などの急性潰瘍モデルや酢酸潰瘍のような慢性潰瘍モデルが従来より知られている。水浸ストレス潰瘍は石膏拘束潰瘍と同様にストレスによる自律神経系を介した胃粘膜傷害の発生機序の解明に用いられ⁶⁾、またエタノール潰瘍は、胃粘膜におけるサイトプロテクション低下の機序の検討などに用いられている⁷⁾。一方、酢酸潰瘍は慢性潰瘍モデルとして、臨床の場でしばしば遭遇するヒトの慢性再発性胃潰瘍の発症および治癒過程を解明するうえで、繁用されてきたモデルである。この潰瘍モ

デルは、H₂ ブロッカーやプロトンポンプインヒビターなどの抗潰瘍薬の効果の判定や、非ステロイド系抗炎症薬による胃潰瘍治癒を遷延化させる機序の解明などに用いられている⁸⁻¹⁰⁾。またその潰瘍形成過程に微小循環障害が関与していること、炎症が惹起される際に産生される活性酸素や Interleukin-1 (IL-1), Tumor necrosis factor- α (TNF- α) のような炎症性サイトカインが様々な局面で役割を演じていることが明らかとされてきた¹¹⁻¹³⁾。しかし、これらの実験潰瘍モデルの潰瘍形成過程においては、多くの因子が相互に複雑に影響していることが考えられ、活性酸素や炎症性サイトカインなどの産生に関する *in vivo* での細胞内シグナル伝達機構およびそれに伴う細胞内での転写機構に関する直接的な研究はほとんどなされていない。このため潰瘍形成に至る過程における細胞内シグナル伝達機構に関し、容易に情報が得られる確実で再現性のある胃潰瘍モデルが必要である。

クロトン油の有効成分であるホルボールエステル (phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)) はプロテインキナーゼ C (PKC) を活性化し^{14,15)}、種々の組織において炎症を惹起したりまた組織の増殖を促進する物質として知られている¹⁶⁻¹⁸⁾。PMA は種々の細胞表面に存在する特異的レセプターを介して直接 PKC を活性化し、それに伴うシグナル伝達を誘導する^{19,20)}。Fretland ら²¹⁾ は、消化管において、モルモットの直腸内への PMA 投与により生じる急性直腸炎が著明な好中球の浸

本論文は、Takeuchi T, Miura S, Wang L, Uehara K, Mizumori M, Kishikawa H, Hokari R, Higuchi H, Adachi M, Nakamizo H, Ishii H. : Nuclear Factor- κ B and TNF- α Mediate Gastric Ulceration Induced by Phorbol Myristate Acetate. Dig Dis Sci 47 : 2070-8, 2002 の一部を含む。

潤と関係していることを実証した。また近年, nuclear factor kappa B (NF- κ B) はPMAにより惹起される炎症における様々な細胞活性化過程においてその基本的な役割を果たしており, 接着分子の発現にもその活性化を要すると考えられている²²⁾。以上の知見から, PMAはPKCおよびNF- κ Bを活性化することにより炎症を惹起する物質であることが明らかとなった。そこで著者は, PMAをラットの胃に投与することによっても, PKCおよびNF- κ Bの活性化が生じ, これにより惹起された炎症および組織傷害により胃潰瘍が形成されるのではないかと考え, この経路による胃潰瘍が, 新しい実験潰瘍モデルになり得るかどうかにつき本実験で検討することとした。

NF- κ Bは複数のサブユニットから構成され, 様々な炎症性サイトカイン, 接着分子, ケモカインを速やかに活性化する。少なくとも5個の異なる遺伝子がNF- κ Bをコードしており, 多くの場合, NF- κ B二量体はRelA (p65)とNF- κ B1 (p50)またはNF- κ B2 (p52)から構成されている^{23,24)}。多くの細胞でNF- κ B二量体はその活性化の阻害サブユニットであるI κ Bと結合した状態で不活性細胞質複合体より分離される。NF- κ Bが活性化される際, I κ Bはリン酸化を受け, それに引き続きユビキチン化され, プロテアゾーム依存性経路を介し速やかに分解される^{25~28)}。この経路により活性化されたNF- κ B複合体は核内へ移動し, ターゲット遺伝子のプロモーター/エンハンサー領域内にある特異的なDNA配列に結合し, 転写を誘導することが知られている。

最近, *Helicobacter pylori*の感染後に, 胃粘膜内にInterleukin-8 (IL-8)の増加を伴うNF- κ Bの活性化が生じるという報告が散見される^{29~31)}。これらの報告は, 胃粘膜内におけるNF- κ Bの活性化が胃粘膜傷害の病態生理に関与していることを示唆している。しかしながら, 生体内においてNF- κ Bの活性化が胃潰瘍の誘発に直接関係するかどうかについての研究は現在までなされていない。

多くの細胞でNF- κ Bの活性化はIL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α などの遺伝子を含むproinflammatory cytokineの遺伝子発現を誘導するという意味において極めて重要である^{32,33)}。特にTNF- α は急性炎症反応の主要なメディエーターであり, 感染や炎症などの, 多くの病的状態において産生される^{34~36)}。In vitroではTNF- α は多くの細胞でネクロシスやアポトーシスによる細胞死を誘発することも証明されている^{37~41)}。NF- κ Bの活性化はTNF- α の作用, 特にTNF- α によって誘発され

る細胞障害過程に介在しているものと考えられている⁴²⁾。しかし, 胃粘膜傷害の形成過程, 特に生体内での実験的胃潰瘍形成におけるTNF- α の役割は明らかではない。

そこで本研究においては, ①PMAを胃壁の漿膜下に局注することにより誘発される新たな実験的胃潰瘍モデルを作製し, そのモデルにおいて胃粘膜内のNF- κ Bの活性化が生じるかどうかにつき検討する。②このモデルにおける胃潰瘍形成過程において, NF- κ BとTNF- α が果たす役割につき解明する, 以上のことを目的として検討を行った。

研究方法

1. 動物と胃潰瘍作成

本動物実験は「慶應義塾大学医学部動物実験ガイドライン」に準拠し施行した。実験動物としてはウィスター系雄性ラット200~250gを使用し, 実験の24時間前より絶食とし自由に飲水のみ摂取可能とした。ペントバルビタールナトリウム30mg/kg麻酔下に腹部を5cm正中切開した。そこより胃を視野上に引き出して展開し, PMA (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 1-50 μ g またはその溶媒である20%アルコールをマイクロシリンジにて腺胃前壁の漿膜下に注入し, 再び閉腹した。

2. 肉眼的および組織学的評価

PMAまたは溶媒を注入後, 異なる時間間隔(1h, 3h, 6h, 12h, 24h, 48h, 3 days, 1 wk, 2wk)でペントバルビタールナトリウム(50mg/kg)麻酔下に無痛性にラットを屠殺した。開腹後, 胃を速やかに除去し, 大彎側より展開した。生食にて洗浄し, コルク板にピン固定した。胃粘膜表面を肉眼的に評価した。PMAによる胃粘膜傷害を組織学的に確認するため, 胃体部を切除し, 10%ホルマリンにて1時間固定後, パラフィンにて包埋した後, 染色を施行した。組織切片は光学顕微鏡下に観察し, 以下に示す組織傷害スコアにもとづき5段階に評価した。0=正常; 1=表層の斑状のびらん; 2=胃壁の厚さの1/3以下の深さの局所的な壊死とうっ血; 3=胃壁の厚さの1/3以上の深さに及ぶが全層に達しない局所的な壊死とうっ血; 4=胃壁全層におよぶ広汎な壊死とうっ血。

3. 各種阻害剤の投与

本モデルにおけるPKCの活性化を検討するため, PKC阻害剤のcalphostin C (5 μ g) (Sigma)をPMA

と同時に胃壁漿膜下に局注した。PMA 惹起性胃潰瘍形成過程における NF- κ B の役割を検討するために、NF- κ B 阻害剤である pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) (Sigma) (100 mM), proteasome inhibitor (MG132 ; Z-Leu-Leu-Leu-CHO, BIOMOL Research Lab. Inc., Plymouth Meeting, PA, USA) (0.5 μ M) と NF- κ B decoy (15 mM) をそれぞれ PMA と同時に胃壁漿膜下に局注した。合成した double-stranded oligodeoxynucleotides である NF- κ B decoy の塩基配列は以下のとおりである⁴⁹⁾。

5'-CCTTGAAGGGATTTCCCTCC-3'

3'-GGAAGTCCCTAAAGGGAGG-5'

オメプラゾール (Mitsubishi Pharma Co. Ltd., Osaka) は使用直前に蒸留水に溶解した。オメプラゾール投与群では、前処置として PMA 局注 3 日前よりオメプラゾール (30mg/kg/day) を連日胃内投与した。

潰瘍形成における TNF- α の役割を検討するために、抗 TNF- α 抗体による潰瘍阻害実験を施行した。抗マウス TNF- α 抗体 (G281-2626 ; Rat IgG1, PharMingen, San Diego, CA, USA) を 0.005-0.5 μ M の濃度で胃粘膜内に PMA と同時に局注した。無関係な isotype の合致した抗体 (R3-34 ; Rat IgG1, PharMingen) を対照として使用した。

4. NF- κ B の活性化

NF- κ B の活性化は、PMA 局注後の胃粘膜において、electrophoretic mobility shift assay (EMSA) および in situ fluorescence DNA binding assay により検討した。

EMSA を施行するにあたり、PMA 局注後のラット胃をペントバルビタール麻酔下に、異なる時間間隔 (15 分~6 時間) で摘出した。腺胃を氷上で 10 mM HEPES (pH7.9), 10 mM KCl, 0.1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 0.1 mM ethylene glycol-bis- β -aminoethyl ether-N, N, N', N'-tetraacetic acid (EGTA), 1 mM dithiothreitol (DTT), 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) に 2 μ g/ml の antipain, chymostatin, pepstatin, leupeptin をそれぞれ加えたバッファ 3.5 μ l/mg 中でホモジネートした。溶液を遠心分離 (8000 \times g, 2 min, 4 $^{\circ}$ C) し細胞質を含む上清を除去後、冷凍保存した。核ペレットを 20 mM HEPES (pH7.9), 0.4 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF に 2 μ g/ml の antipain, chymostatin, pepstatin, leupeptin をそれぞれ加えたバッファ 1.5 μ l/mg 中で再度均質化した

後、振盪攪拌した (20 min, 4 $^{\circ}$ C)。核分画溶液を遠心分離 (14000 \times g, 5 min, 4 $^{\circ}$ C) し核内抽出液の一部を -80 $^{\circ}$ C で冷凍保存した。ゲルシフトアッセイを施行するにあたり、FITC-labeled synthetic double-stranded oligodeoxynucleotides (AGTTGAGGGGACTTTC CAGGC) を作成した。核抽出液 20 μ g に 1 pmol の標識 NF- κ B 合成ヌクレオチドを加え、室温で 30 分間インキュベートした。インキュベート後 6% のポリアクリルアミドゲルを用い、4 $^{\circ}$ C, 160V で 2 時間電気泳動を行った。スーパーシフトアッセイを行うために、核抽出液に抗 p50 抗体および抗 p65 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) を 20 μ g 加え、室温で 30 分間インキュベートし、その後標識 NF- κ B 合成ヌクレオチドを加えインキュベートした。競合阻害効果につき検討するため、100 倍量の無標識 NF- κ B 合成ヌクレオチドを試料に加えた。蛍光強度はコンピュータイメージアナライザーを装備した蛍光レーザースキャン装置 (FluorImager 575 ; Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA) にて測定した。

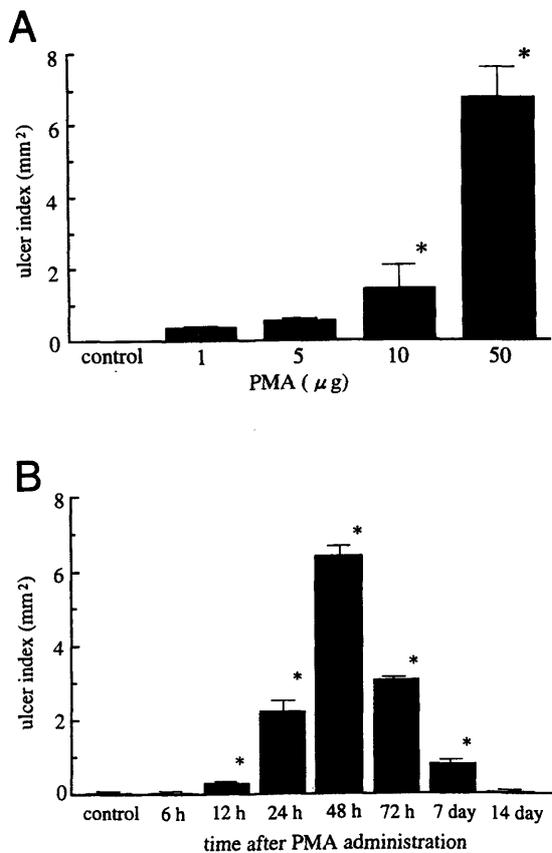
In situ fluorescence DNA binding assay を施行するため、ラット胃を PMA 局注 3 時間後にペントバルビタール麻酔下に摘出した。胃粘膜に付着した残渣を生理食塩水で洗浄除去後、過ヨウ素酸リジンパラホルムアルデヒド溶液にて 8 時間固定した。HEPES バッファ pH7.4 で 3 回洗浄した後、1 mg/ml の DNase I (Sigma) を含む HEPES バッファを用い 30 $^{\circ}$ C で 30 分間インキュベートした。3 回洗浄後、さらに、0.25% の牛血清アルブミン (Sigma), 100 μ g/ml の polydeoxyinosinic-polydeoxycytidylic acid (poly [dI-dC]) (Sigma), 20 μ g/ml の polydeoxycytidylic acid (poly dC) (Sigma) に 1ng/ml の NF- κ B の結合部位に相同の塩基配列を有する FITC-labeled synthetic double-stranded oligodeoxynucleotides (5'-TGG GGA CTC TCC CTT TGG GAA CAG TTA TGC AAA ATA GCT CTG-3'-FITC) を加えた反応液で暗所にて 30 $^{\circ}$ C で 60 分間インキュベートした。NF- κ B の結合の特異性は NF- κ B に一致する cold oligonucleotides との競合により確認した。試料を再度洗浄し、スライドガラス上に無蛍光のカバーガラスを静置した。63 倍の油浸レンズを有する倒立型蛍光顕微鏡上に設置した MRC600 共焦点顕微鏡にて共焦点像を得た。エミッションフィルターで 488 nm に励起したマルチラインアルゴンレーザー (25 mW) を単一の蛍光発色を得るために使用した。

5. 統計学的解析

すべての結果は平均値±標準誤差で表した。各群間の差はANOVAの分散分析を行い、Fisher's post hoc testで解析した。p<0.05を統計学的有意差ありとした。

結果

第1図(A)は異なる量のPMAを漿膜下に局注し、48時間後の胃粘膜傷害を肉眼的に観察し、検討したものである。PMAは用量依存性に胃粘膜傷害を惹起し、10µg以上で肉眼的に明らかな傷害を生じ、特に50µgで著明な傷害を生じた。潰瘍は胃内のPMA局注部

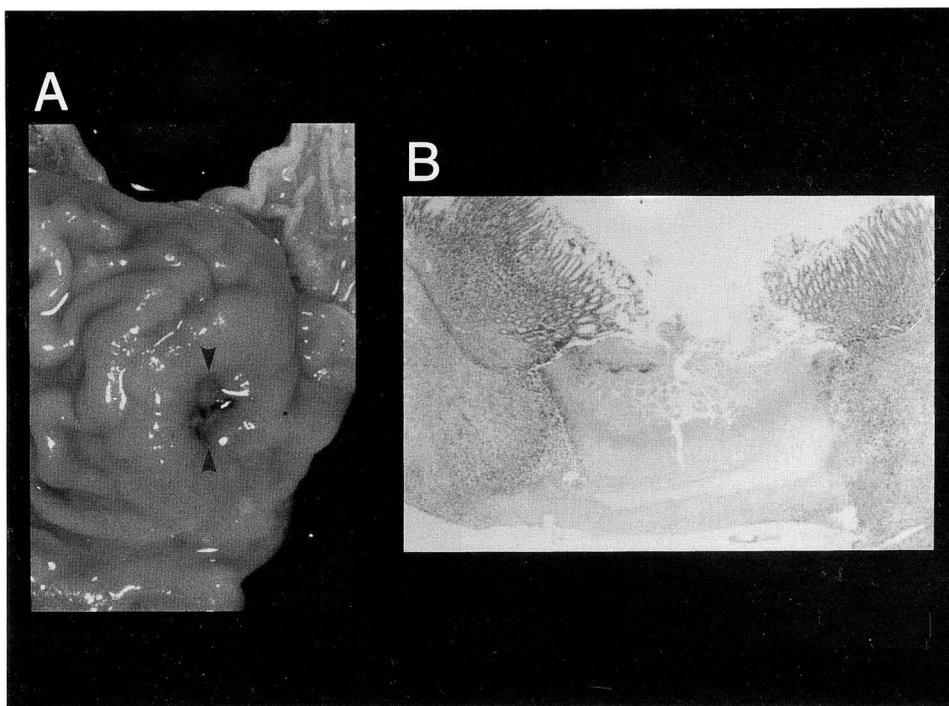


第1図 PMA局注後の胃潰瘍の形成。(A)異なる量のPMAを胃漿膜下に局注し、48時間後の胃粘膜を肉眼的に観察し、潰瘍係数として評価した。潰瘍係数は粘膜の傷害面積(mm²)で表した。PMAを腺胃前壁の漿膜下層に局注した。また溶媒(20% ethanol in saline)をコントロールとして局注した。(B)PMA(50µg)局注後の潰瘍係数(胃粘膜傷害面積)の時間経過による変化。p<0.05でPMA単独で局注した場合と比較し、統計学的有意差ありとした。すべての結果は5匹のラットの平均値±標準誤差で表した。(Takeuchi T et al : Dig Dis Sci 47 : 2070-8, 2002のFig. 1を許可を得て転載)

位に一致して認められた。第1図(B)はPMA50µgを局注後の胃粘膜傷害範囲の時間経過による変化を示したものである。粘膜傷害はPMA局注12時間後に明らかとなり、48時間後に最大となった。その後、潰瘍径は減少し、14日後には癒痕となった。第2図(A)に示すように、PMA50µgの局注後48時間で、著明な深い潰瘍が生じた。また第2図(B)に示すように、胃粘膜切片の組織学的検査では、同量のPMAにより、筋層の破壊を伴う深く広い範囲の粘膜壊死が生じることが示された。これらの所見に基づき、その後の実験では50µgのPMAを用いて検討を行った。PMA50µgを局注後の経時的な組織学的観察では、局注6時間後より粘膜上皮側よりびらんが生じ、時間経過とともに漿膜側へと進展する潰瘍像を認めた(結果呈示せず)。

第3図(A)はオメプラゾール、calphostin CおよびNF-κB阻害剤(PDTC, MG132, NF-κB decoy)のPMA投与48時間後の潰瘍形成における肉眼的阻害効果を示している。潰瘍形成はプロトンポンプ阻害剤のオメプラゾールでは阻害されなかったがcalphostin Cによって著明に阻害された。NF-κB阻害剤であるPDTC, MG132およびNF-κB decoyもまたPMAによる潰瘍形成を著明に抑制した。第3図(B)は潰瘍形成における抗TNF-α抗体の効果をPMA投与48時間後に検討したものである。PMA単独投与では7.3mm²であったulcer indexは、0.05µMの抗TNF-α抗体の同時投与にて4.8mm²と有意に低下し、抗TNF-α抗体は用量依存性にPMA惹起性潰瘍形成を抑制した。第1表はPMA局注48時間後の胃粘膜における各種阻害剤の効果を組織学的傷害スコアを用いて示したものである。肉眼的に観察した場合と同じように、オメプラゾールはPMAにより惹起される組織学的変化に影響を及ぼさなかった。対照的にPMAにより惹起される組織学的傷害は、calphostin Cと各種NF-κB阻害剤で著明に抑制された。また抗TNF-α抗体の投与によっても著明な抑制効果が認められた。

第4図はFITC-labeled NF-κB consensus oligodeoxynucleotidesを用いたEMSAにより確認されたPMA局注後の胃粘膜における、NF-κBの活性化を示している。第4図(A)が示すように、コントロールと比較して、PMAによりNF-κB結合能は著明に増加した。偏位したDNA-protein複合体のバンドがNF-κBであることを証明するために、PMAを局注した胃粘膜からの核抽出液にsupershift assayを施行した。抗p50および抗p65抗体を加えインキュベートした試料では偏位したバンドの蛍光強度が減少し、スーパーシフトした。

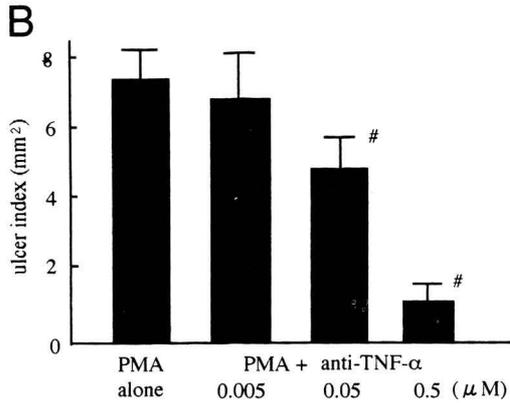
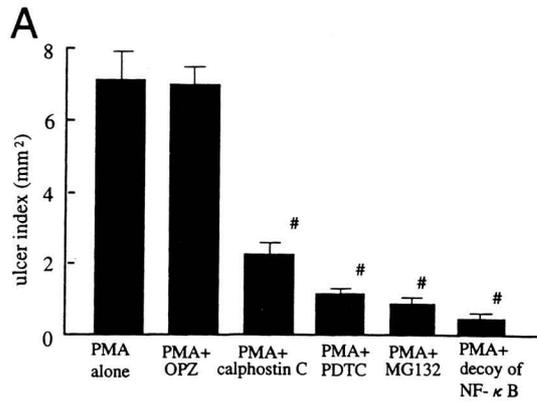


第 2 図 PMA 惹起性胃潰瘍の組織学的所見. (A) PMA (50 µg) 局注 48 時間後の典型的な胃粘膜の全体像である. 浮腫性の粘膜に囲まれた活動性の潰瘍を認める (arrowhead). (B) H-E 染色されたラット胃粘膜の顕微鏡写真 (×40) である. PMA (50 µg) 局注 48 時間後で潰瘍が発現した. 筋層の破壊を伴う, 深く広範な粘膜壊死を認める. (Takeuchi T et al : Dig Dis Sci 47 : 2070-8, 2002 の Fig. 2 を許可を得て転載)

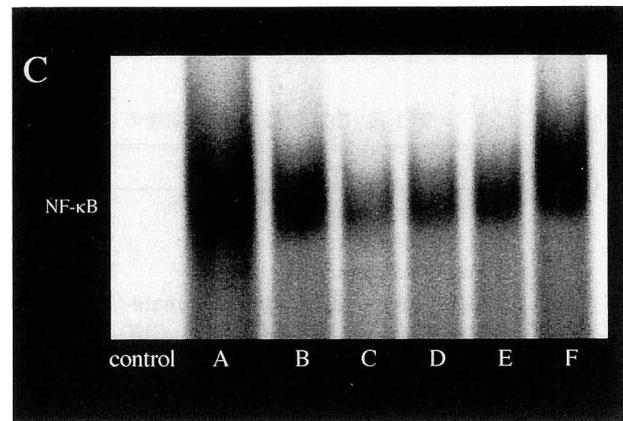
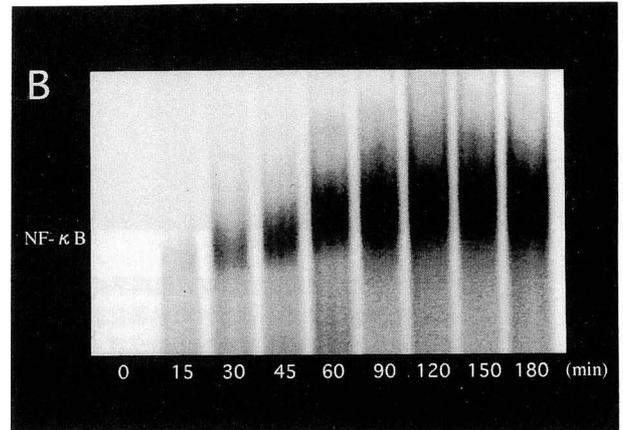
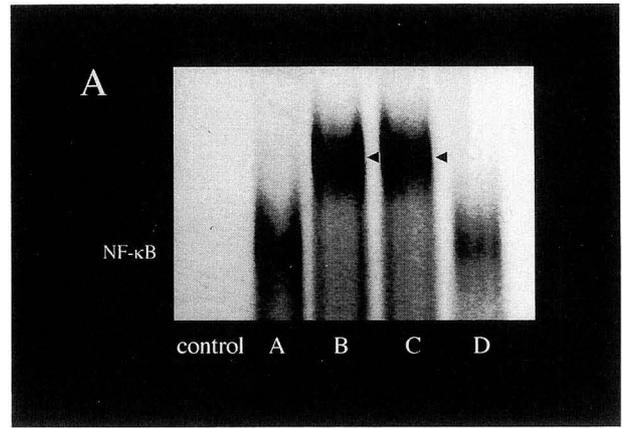
第 1 表 PMA 局注 48 時間後のラット胃粘膜病変の組織学的傷害スコア：各種阻害剤の影響

	組織傷害スコア
PMA only (50 µg)	3.8±0.2
PMA + omeprazole	3.6±0.2
PMA + calphostin C	2.6±0.4*
PMA + pyrrolidinedithiocarbamate (PDTC)	2.2±0.2*
PMA + MG132 (Z-Leu-Leu-Leu-CHO)	1.4±0.2*
PMA + decoy of NF-κB	1.0±0.3*
PMA + anti-TNF-α antibody	2.0±0.4*

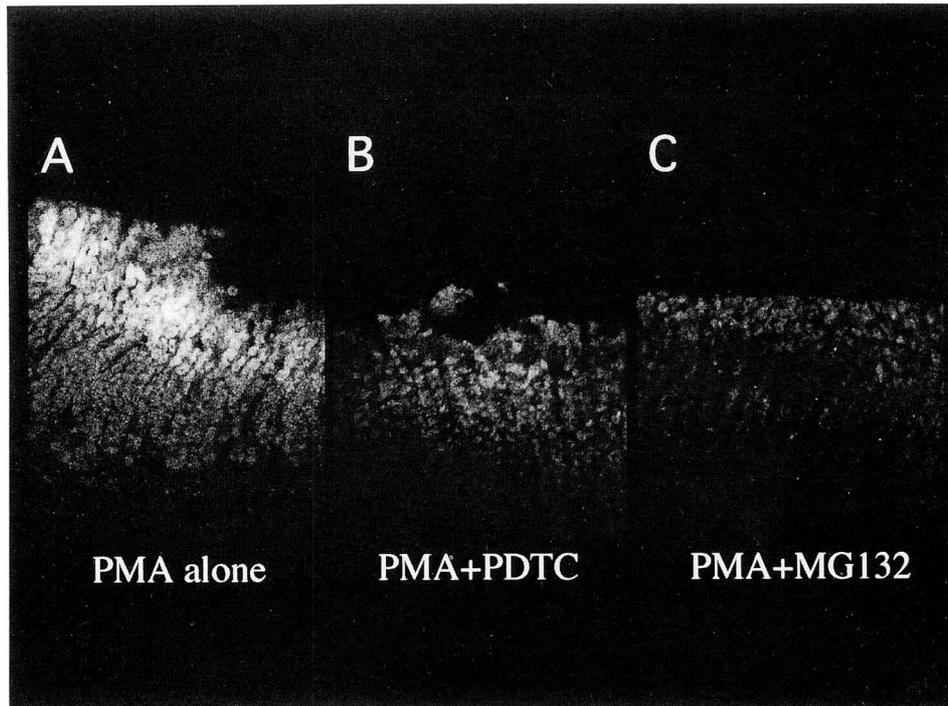
*p<0.05 vs PMA only 平均値±標準誤差で表した (n=5). ヘマトキシリン・エオジン染色を施行した組織切片を光学顕微鏡下に観察し, 以下に示す組織傷害スコアにもとづき五段階に評価した. 0=正常; 1=表層の斑状のびらん; 2=胃壁の厚さの 1/3 以下の深さの局所的な壊死とうっ血; 3=胃壁の厚さの 1/3 以上の深さに及ぶが全層に達しない局所的な壊死とうっ血; 4=胃壁全層におよぶ広汎な壊死とうっ血. オメプラゾールは, 30 mg/kg/day を 3 日間経口投与した. calphostin C (5 µg), PDTC (100 mM), MG132 (0.5 µM) と NF-κB decoy (15 mM) は, PMA と同時に局注した. 抗 TNF-α 抗体は, 0.5 µM の濃度で PMA と同時に局注した. (Takeuchi T et al : Dig Dis Sci 47 : 2070-8, 2002 の Table 1 を許可を得て転載)



第3図 PMA 惹起性胃潰瘍に対する各種阻害剤の効果。
 (A) PMA 惹起性胃潰瘍の形成面積に対する各種阻害剤の影響。潰瘍係数はPMA (50 μg) 局注48時間後に測定した。オメプラゾール (30mg/kg/day) はPMA 局注3日前より連日胃内に投与した。calphostin C (5 μg), NF-κB 阻害剤 (pyrrolidinedithiocarbamate (PDTC ; 100 mM), Z-Leu-Leu-Leu-CHO (MG132 ; 0.5 μM), NF-κB decoy (15 mM) を胃粘膜にPMA と同時に局注した。(B) PMA (50 μg) 局注48時間後に肉眼的に評価した抗 TNF-α 抗体の影響。抗 TNF-α 抗体もまたPMA と同時に局注した。p<0.05 でPMA 単独で局注した場合と比較し、統計学的有意差ありとした。すべての結果は5匹のラットの平均値±標準誤差で表した。(Takeuchi T et al : Dig Dis Sci 47 : 2070-8, 2002 の Fig. 3 を許可を得て転載)



第4図 EMSA によるNF-κB 活性化および各種阻害剤による抑制効果。FITC 標識NF-κB consensus oligonucleotide を用い、electrophoretic mobility shift assay (EMSA) により評価した、PMA を局注した胃粘膜におけるNF-κB の活性化。(A) NF-κB の発現を確認するため、PMA を局注した胃粘膜に対し、抗 p50 および p65 抗体を用いた supershift assay を施行した。DNA タンパク複合体が偏移したバンドによって示されている (arrowhead)。結合反応の特異性は過剰量の無標識NF-κB consensus oligonucleotide (competitive inhibitor) によってもまた確かめられた。コントロールとして、溶媒 (20% ethanol) を局注した (A : PMA only, B : PMA+anti-p50, C : PMA+anti-p65, D : competitive inhibitor)。(B) PMA (50 μg) 局注後のNF-κB 活性化の時間経過。0 : 局注前。(C) PMA 局注3時間後におけるNF-κB 結合活性に対する各種阻害剤の抑制効果。calphostin C (5 μg), PDTC (100 mM), MG132 (0.5 μM), NF-κB decoy (15 mM), 抗 TNF-α 抗体 (0.5 μM) をPMA と同時に胃粘膜に局注した (A : PMA only, B : PMA+calphostin C, C : PMA+PDTC, D : PMA+MG132, E : PMA+decoy of NF-κB, F : PMA+anti-TNF-α antibody)。4回の阻害実験より得られた同様の結果から、典型的な写真を示した。(Takeuchi T et al : Dig Dis Sci 47 : 2070-8, 2002 の Fig. 4 を許可を得て転載)



第5図 In situ fluorescence DAN binding assay により観察された PMA 局注胃粘膜における NF- κ B 活性化の分布. NF- κ B の結合部位に相同な塩基配列を有する FITC-labeled oligodeoxynucleotides を用いた. (A) PMA (50 μ g) を腺胃前壁の漿膜下層に局注後の顕微鏡写真である. 局注 3 時間後において著明な NF- κ B 活性化が, 主に腺胃の PMA 局注分位近傍の中央部に生じた ($\times 100$). (B) PMA 局注 3 時間後における, PMA により惹起性された NF- κ B 活性化の PDTC (100 mM) による抑制効果. (C) PMA 局注 3 時間後における, MG132 (0.5 μ M) による阻害効果. 3 回の実験より得られた同様の結果より, 典型的な写真を示す. (Takeuchi T et al : Dig Dis Sci 47 : 2070-8, 2002 の Fig. 5 を許可を得て転載)

バンドが出現した. 結合作用の特異性は, 過剰量の unlabeled NF- κ B consensus oligodeoxynucleotides を加えた試料において, バンドの蛍光強度の減少が生じたことから証明された. 第4図 (B) は, PMA 局注後の時間経過における NF- κ B 結合能の変化を示している. PMA 局注 30 分後に NF- κ B の活性化が生じ始め, 時間経過とともに 3 時間後まで増加し続けた. 3 時間後における増加した NF- κ B 結合能は, calphostin C および NF- κ B 阻害剤である PDTC, MG132 および NF- κ B decoy にて著明に抑制された (第4図 (C)). しかしながら, PMA により惹起される NF- κ B の活性化は抗 TNF- α 抗体では著明な抑制を認めなかった (第4図 (C)).

さらに, 胃粘膜における NF- κ B 活性化の分布を調べる目的で, 胃粘膜切片に NF- κ B 結合部位に相同な塩基配列を有する FITC 標識オリゴヌクレオチドを用い, in situ fluorescence DAN binding assay を施行した.

PMA 投与 1, 2 時間後では明らかな NF- κ B 活性化を認めなかったが (結果呈示せず), 5A 図に示すように PMA 投与 3 時間後に PMA 局注部位近傍の腺胃粘膜の中央部を中心に NF- κ B の著明な活性化が認められた. しかし, コントロールでは著明な NF- κ B 活性化は見られなかった (結果呈示せず). 第5B 図および第5C 図で示すように, PMA によって惹起された NF- κ B の活性化は PDTC および MG132 により著明に阻害された. また NF- κ B が活性化された部位の強拡大 ($\times 630$) では, 主に核に移動した NF- κ B の活性化像を認めたが, 細胞質にも NF- κ B の活性化像は認められた (結果呈示せず).

考 察

本研究により胃漿膜下への PMA の局注により潰瘍が形成されることが, 肉眼的および組織学的に初めて示さ

れた。本研究の結果、PMAが胃粘膜内の転写因子であるNF- κ Bを活性化することおよびNF- κ Bの活性化に引き続き生じるTNF- α の産生が、PMA惹起性胃潰瘍の形成過程における組織傷害の一因となっていることが示された。胃潰瘍の形成過程は、Shay⁴⁴⁾が提唱した攻撃因子と防御因子のbalance theoryが有名である。Helicobacter pyloriの発見により粘膜傷害機序をbalance theoryのみで論じることは困難となつてはきたものの、攻撃因子としての胃酸分泌と、また防御因子である胃粘膜の血流調節の破綻による粘膜微小循環傷害が胃粘膜傷害の主な決定因子として重要な位置を占めることは、実験的に惹起された潰瘍における研究結果から明らかである^{4,5,9,11,45-49)}。しかしながら、本研究においてはオメプラゾールによる酸分泌抑制に伴う胃粘膜保護作用は十分ではなく、傷害の大きさや程度を軽減することはできなかった。このことはPMAの潰瘍誘発作用は胃酸に起因するものではない可能性を示唆している。

PKCはセリンとスレオニンの蛋白質リン酸化を促進する幾つかのリン脂質依存性のアイソエンザイムを代表し、細胞内シグナル伝達の鍵をにぎる物質である^{20,50,51)}。ホルボールエステルはPKCを活性化することが知られており、生理的活性物質であるジアシルグリセロールに似た作用を有するため、PKCは転写因子やサイトカインの活性化などのPMAによって活性化される生物学的作用の発現経路に介在していると考えられている^{50,51)}。不活性な状態で細胞質に存在するNF- κ B/I- κ B複合体は、活性化されたPKCによる直接的なI- κ Bリン酸化により解離される。これは細胞表面上で活性化されたPKCが単純かつ直接的に核内に作用する手段となっている⁵¹⁾。本研究における、PKCのregulatory siteに作用するcalphostin CによるNF- κ B活性化の著明な抑制は、PKCがI- κ Bのリン酸化、分解とそれに引き続くNF- κ Bの核内への過剰移行による潰瘍誘発作用に影響を及ぼしている可能性を示唆している。本研究において、漿膜側から投与したPMAがどのように粘膜側の細胞へ作用するかについての正確な機序は明らかではないが、1つの可能性として、in situ DNA-binding assayによりPMA投与3時間後に胃粘膜の上皮側の胃腺領域でNF- κ Bの活性化を認めたことより、漿膜側から投与したPMAが濃度勾配により粘膜側へ浸透し、そこで最も感受性の高い細胞が粘膜上皮側領域の細胞であったため同部位のNF- κ B活性化を強くきたした可能性が考えられた。また他の可能性として、PMA局注が自律神経刺激などを介して胃粘膜微小循環障害を引き起こし、その結果産生された炎症性メディエーターが粘膜組織に作用し、

さら微小循環障害を悪化させた可能性も考えられる。実際、胃粘膜血流をレーザードップラー法を用いて測定すると、PMA局注後1時間以内に血流の低下が認められ、NF- κ B阻害剤であるPDTC、MG132、NF- κ B decoyによりこの血流の低下は抑制された(結果呈示せず)。EMSAによる実験結果よりNF- κ BはPMA局注後早期(30分以内)より胃壁で活性化を認めるにもかかわらず、組織学的には3時間後に主として粘膜上皮側の胃腺領域で観察されることより、PMA局注によって早期に胃壁にNF- κ B活性化が生じるが、その後の微小循環障害が粘膜側においてさらにNF- κ B活性化を増強させ、胃粘膜上皮側のびらんへ進展してゆく可能性が考えられた。正確なNF- κ Bの産生源はこの実験においては同定されていないが、胃粘膜内の多種の細胞が、この反応に関わっていると考えられる。Teshimaら⁵²⁾は、活性酸素依存性のNF- κ B活性化がモルモット胃粘膜上皮細胞および胃小窩細胞で生じることを実証した。最近、NF- κ B活性化が、炎症性サイトカインと過酸化水素で刺激した純粋培養ラット胃壁細胞でも生じることが証明された⁵³⁾。このように、胃粘膜細胞におけるNF- κ B活性化と炎症反応の密接な関係は、特にHelicobacter pyloriの感染に関係していると考えられている。Keatesら³¹⁾はHelicobacter pyloriを感染させた胃粘膜上皮細胞と、IL-1 β を付加した胃粘膜上皮細胞のそれぞれで転写因子NF- κ Bの活性化が生じ、NF- κ Bの核内への移行に引き続き、IL-8のメッセンジャーRNAとタンパク量の増加が誘導されることを報告した。彼らはまた、Helicobacter pyloriに感染した人胃生検組織の上皮細胞の細胞質と核内における活性化されたNF- κ Bの存在をp65に対するモノクローナル抗体(α -p65)を用いた蛍光染色にて証明した。Sharmaら³⁰⁾はNF- κ BとNF-IL-6がIL-8の遺伝子発現の活性化に不可欠であり、cag陽性株によって表出されたpicB決定因子がNF- κ Bを介したIL-8表出を増加させる調節において、非常に重要な役割を果たしていることを示した。

PDTCはNF- κ Bの活性化やupstream regulatory binding siteにおけるNF- κ Bの相互作用を強く阻害し、その結果NF- κ Bを介した転写活性を抑制する^{31,54)}。本実験において、著者は、NF- κ Bの活性化と胃粘膜傷害の直接的な関係をPDTCがその傷害を著明に抑制することにより示した。著者はまた、MG132による26Sプロテアゾームの選択的阻害とその結果としてのNF- κ B活性化の阻害が、PMA局注によって生じる胃潰瘍形成を著明に抑制することを、肉眼的および組織学的スコアの劇的な減少を指標として明らかにした。これらの所見

は、PMA による急性胃潰瘍の形成が、*in situ* での NF- κ B の強い活性化を介していることを示している。しかし、組織傷害が生じる上で、その下流領域で起きている現象の正確な機序は完全には解明されていない。

NF- κ B の活性化は TNF- α 、IL-2、IL-6、iNOS などの様々な炎症惹起物質や走化性物質の活性化を誘導する⁵⁵⁾。NF- κ B に反応する遺伝子は白血球内皮細胞相互作用の原因となる接着分子の転写もまた調節している。NF- κ B の活性化は TNF- α のシグナリングに関わる第一段階の一つであり^{39,42)}、その活性化は TNF- α の影響、特に TNF- α により惹起される細胞傷害過程に介在していると考えられている。IL-1 と TNF- α もまた NF- κ B を活性化する、これは、それらのサイトカインが自身の発現量の自己調節を行うためであり、炎症反応の規模が増大することの原因になっていると考えられている⁵⁶⁾。しかしながら、本研究における著者の結果においては、抗 TNF- α 抗体は NF- κ B の活性化を抑制しないことを示している。これは TNF- α が粘膜傷害において、主に NF- κ B 活性化の下流域に関わっている可能性があることを示唆している。ヒト胃粘膜生検組織における TNF- α の産生は、*Helicobacter pylori* 感染例の方が非感染例と比較して多いことが報告されている⁵⁷⁾。その急性催炎症性の作用に加えて、*in vitro* で TNF- α は壊死やアポトーシスにより細胞死を誘発することでも知られている。事実、TNF- α が胃上皮細胞に直接、細胞毒性作用を及ぼすことが、LPS で処理されたラットの胃粘膜細胞でその生存率の低下を認めたことや、また胃粘膜細胞に直接 TNF- α を加えて培養した系において、TNF- α の濃度の上昇に伴い細胞の生存度が低下したことにより示された⁵⁸⁾。

本研究によって、*in vivo* で NF- κ B が胃粘膜傷害を起し得るということが初めて実証された。今後、胃粘膜内の PMA 惹起性胃潰瘍形成過程における、NF- κ B と TNF- α の活性化後にその下流で生じている正確な機序を解明していくことが必要であると考えられる。

総括

Phorbol ester を胃壁漿膜下に投与することにより胃粘膜に生じた急性潰瘍の発生機序を検討することにより以下の結論を得た。

1. PMA の胃粘膜への局注後約 24 時間で著明な潰瘍が生じ、約 72 時間後には治癒段階に至ることにより、PMA 投与によって生じる本胃潰瘍は急性胃潰瘍モデルのひとつであると考えられた。

2. 本潰瘍はプロトンポンプ阻害剤にて抑制されなかったことより、本潰瘍の形成過程における胃酸の関与は否定的であった。

3. PKC 阻害剤である calphostin C にて潰瘍の形成が抑制されたことより PMA により直接活性化された PKC が、本潰瘍の形成初期段階に関与していることが明らかとなった。

4. NF- κ B 阻害剤である PDTC、MG132、NF- κ B decoy により潰瘍形成が著明に抑制されたことより本潰瘍の形成過程において、PKC により活性化された NF- κ B が中心的役割を果たしていることが示された。

5. 抗 TNF- α 抗体投与による本潰瘍の抑制効果は軽度であったことより、本潰瘍における TNF- α は、その NF- κ B 活性化の作用よりも、NF- κ B によって活性化された様々な炎症性サイトカインのひとつとして、その炎症誘発過程の下流域で主な役割を果たしているものと考えられた。

最近、*Helicobacter pylori* による胃潰瘍形成過程に NF- κ B の関与を示す報告が認められる。本研究によって、*in vivo* で NF- κ B が胃粘膜傷害を起し得ること、およびその下流の TNF- α の活性化が胃潰瘍発生に重要であることを初めて実証した。本潰瘍モデルは潰瘍発生機序を解明する有用な手段となる可能性が考えられた。

本稿を終えるに当たり、御指導、後校閲を賜りました慶應義塾大学医学部内科学教室石井裕正教授に深甚なる謝意を表します。また本研究を遂行するにあたり直接御指導をいただいた防衛医科大学校内科学第二講座三浦総一郎教授に深謝申し上げます。本研究に御協力と御助言をいただきました研究室各位に感謝いたします。

文献

- 1) 土屋雅春：Irritation syndrome と消化性潰瘍。生体反応とアグレッションロジー。日本医学館，p.117-120，1994
- 2) 土屋雅春，織田正也，中村正彦，渡辺勲史，永田博司，柏崎一男，大塚友二：ラット胃粘膜微小循環の自律神経統御について－特に実験的ストレス潰瘍発生機構に関連して－。日本消化器病学会雑誌，78：1000-1014，1981
- 3) 鈴木雅之，末松 誠，三浦総一郎，永田博司，森下鉄夫，織田正也，土屋雅春：急性胃粘膜病変形成時の活性酸素産生における xanthine oxidase 系および好中球の役割。日本消化器病学会雑誌，85：835-842，1988
- 4) Fukumura D, Kurose I, Miura S, Tsuchiya M, Ishii H：Oxidative stress in gastric mucosal injury：role of platelet-activating factor-activated granulocytes。J Gastroenterol 30：565-571，1995

- 5) Fukumura D, Kurose I, Miura S, Serizawa H, Sekizuka E, Nagata H, Tsuchiya M, Ishii H : Role of endothelin-1 in repeated electrical stimulation-induced microcirculatory disturbance and mucosal damage in rat stomach. *J Gastroenterol Hepatol* 11 : 279-285, 1996
- 6) Sugitani A, Donahue PE, Doyle MD, Anan K, Nyhus LM : The ipsilateral organization of the afferent nerves to the stomach. *J Surg Res* 54 : 212-221, 1993
- 7) Lacy ER, Ito S : Microscopic analysis of ethanol damage to rat gastric mucosa after treatment with a prostaglandine. *Gastroenterology* 83 : 619-625, 1982
- 8) Ito A, Kakizaki M, Nagase H, Murakami S, Yamada H, Mori Y : Effects of H₂-receptor antagonists on matrix metalloproteinases in rat gastric tissues with acetic acid-induced ulcer. *J Pharmacobiodyn* 14 : 285-291, 1991
- 9) Yamamoto O, Okada Y, Okabe S : Effect of a proton pump inhibitor, omeprazole, on gastric secretion and gastric and duodenal ulcers or erosions in rats. *Dig Dis Sci* 29 : 394-401, 1984
- 10) Wang JY, Yamasaki S, Takeuchi K, Okabe S : Delayed healing of acetic acid-induced gastric ulcers in rats by indomethacin. *Gastroenterology* 96 : 393-402, 1989
- 11) Tarnawski A, Hollander D, Stachura J, Krause WJ, Eltorai M, Dabros W, Gergely H : Vascular and microvascular changes-key factors in the development of acetic acid-induced gastric ulcers in rats. *J Clin Gastroenterol* 12 : S148-157, 1990
- 12) Motilva V, Martin MJ, Luque MI, Alarcon de la Lastra C : Role of polymorphonuclear leukocyte and oxygen-derived free radicals in chronic gastric lesion induced by acetic acid in rat. *Gen Pharmacol* 27 : 545-550, 1996
- 13) Takahashi S, Shigeta J, Inoue H, Tanabe T, Okabe S : Localization of cyclooxygenase-2 and regulation of its mRNA expression in gastric ulcer in rats. *Am J Physiol* 275 : G1137-1145, 1998
- 14) Nishizuka Y : The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature* 308 : 693-698, 1984
- 15) Ashendel CL : The phorbol ester receptor : a phospholipid-regulated protein kinase. *Biochim Biophys Acta* 822 : 219-242, 1985
- 16) Takeuchi T, Miura S, Wang L, Uehara K, Mizumori M, Kishikawa H, Hokari R, Higuchi H, Adachi M, Nakamizo H, Ishii H : Nuclear Factor- κ B and TNF- α Mediate Gastric Ulceration Induced by Phorbol Myristate Acetate. *Dig Dis Sci* 47 : 2070-8, 2002
- 17) Bourin MC, Delescluse C, Fustenberger G, Marks F, Schweizer J, Klein-Szanto AJP, Prunieras M : Effect of phorbol esters on guinea pig skin *in vivo*. *Carcinogenesis* 3 : 671-676, 1982
- 18) Griffiths RJ, Woods BE, Li S, Blackman A : Pharmacological modification of 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate induced inflammation and epidermal cell proliferation in mouse skin. *Agents Actions* 25 : 344-351, 1988
- 19) Niedel JE, Kuhn LJ, Vandenberg GR : Phorbol diester receptor copurifies with protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci USA* 80 : 36-40, 1983
- 20) Nishizuka Y : The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implication for cellular regulation. *Nature* 334 : 661-665, 1988
- 21) Fretland DJ, Widomski DL, Levin S, Gaginella TS : Colonic inflammation in the rabbit induced by phorbol-12-myristate-13-acetate. *Inflammation* 14 : 143-150, 1990
- 22) Eck SL, Perkins ND, Carr DP, Nabel GJ : Inhibition of phorbol ester-induced cellular adhesion by competitive binding of NF- κ B *in vivo*. *Mol Cell Biol* 13 : 6530-6536, 1993
- 23) Siebenlist U, Franzoso G, Brown K : Structure, regulation and function of NF- κ B. *Ann Rev Cell Biol* 10 : 405-455, 1994
- 24) Baeuerle PA, Baltimore D : NF- κ B : ten years after. *Cell* 87 : 13-20, 1996
- 25) Beg AA, Finco TS, Nantermet PV, Baldwin Jr AS : Tumor necrosis factor and interleukin-1 lead to phosphorylation and loss of I κ B α : a mechanism for NF- κ B activation. *Mol Cell Biol* 13 : 3301-3310, 1993
- 26) Palombella V, Rando O, Godberg A, Taniatis T : The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF- κ B1 precursor protein and the activation of NF- κ B. *Cell* 78 : 773-785, 1994
- 27) Brown K, Gerstberger S, Carlson L, Franzoso G, Siebenlist U : Control of I κ B- α proteolysis by site-specific, signal-induced phosphorylation. *Science* 267 : 1485-1488, 1995
- 28) Thompson JE, Phillips RJ, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Ghosh S : I κ B- β regulated the persistent response in a biphasic activation of NF- κ B. *Cell* 80 : 573-582, 1995
- 29) Munzenmaier A, Lange C, Glocker E, Covacci A, Moran A, Bereswill S, Baeuerle PA, Kist M, Pahl HL : A secreted/shed product of *Helicobacter pylori* activates transcription factor nuclear factor-kappa B. *J Immunol* 159 : 6140-6147, 1997
- 30) Sharma SA, Tummuru MK, Blaser MJ, Kerr LD : Activation of IL-8 gene expression by *Helicobacter pylori* is regulated by transcription factor nuclear factor-kappa B in gastric epithelial cells. *J Immunol* 160 : 2401-2407, 1998
- 31) Keates S, Hitti YS, Upton M, Kelley CP : *Helicobacter pylori* infection activates NF- κ B in gastric epithelial cells. *Gastroenterology* 113 : 1099-1109, 1997
- 32) Kopp EB, Ghosh S : NF- κ B and Rel proteins in innate immunity. *Adv Immunol* 58 : 1-27, 1995
- 33) Busam K, Gieringer C, Freudenberg M, Hohmann H-P : *Staphylococcus aureus* and derived exotoxins induce nuclear factor kappa B-like activity in murine

- bone marrow macrophages. *Infect Immun* 60 : 2008-2015, 1992
- 34) Beutler B, Grau GE : Tumor necrosis factor in the pathogenesis of infectious diseases. *Crit Care Med* 10 : S423-S425, 1993
- 35) Vassalli P : The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Ann Rev Immunol* 10 : 411-452, 1992
- 36) Tracey KJ, Cerami A : Tumor necrosis factor : a pleiotropic cytokine and therapeutic target. *Ann Rev Med* 45 : 491-503, 1994
- 37) Baker SJ, Reddy EP : Transducers of life and death : TNF receptor superfamily and associated proteins. *Oncogene* 12 : 1-9, 1996
- 38) Bour ES, Ward LK, Cornman GA, Isom HC : Tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in hepatocytes in long-term culture. *Am J Pathol* 148 : 485-495, 1996
- 39) Laster SN, Wood JG, Goding LR : Tumor necrosis factor can induce both apoptotic and necrotic form of cell lysis. *J Immunol* 141 : 2629-2634, 1988
- 40) Reid TR, Torti FM, Ringold GM : Evidence for two mechanisms by which tumor necrosis factor kills cells. *J Biol Chem* 264 : 4583-4589, 1989
- 41) Woods KM, Chapes SK : Three distinct cell phenotypes of TNF-induced cytotoxicity and their relationship to apoptosis. *J Leukocyte Biol* 53 : 37-44, 1993
- 42) Gukovskaya AS, Gukovsky I, Zaninovic V, Song M, Sandoval D, Gukovsky S, Pandol SJ : Pancreatic acinar cells produce, release, and respond to tumor necrosis factor- α . Role in regulating cell death and pancreatitis. *J Clin Invest* 100 : 1853-1862, 1997
- 43) Morishita R, Sugimoto T, Aoki M, Kida I, Tomita N, Moriguchi A, Maeda K, Sawa Y, Kaneda Y, Higaki J, Ogihara T : In vivo transfection of cis element "decoy" against nuclear factor- κ B binding site prevents myocardial infarction. *Nature Med* 3 : 894-899, 1997
- 44) Shay H : Etiology of peptic ulcer. *Am J Dis N Series* 6 : 29-49, 1961
- 45) Bunce KT, Daly MJ, Humphray JM, Stables R : H2-receptor antagonists protect against aspirin-induced gastric lesions in the rat. *Agents Actions* 11 : 167-170, 1981
- 46) Brzozowski T, Konturek PC, Konturek SJ, Drozdowicz D, Kwiecien S, Pajdo R, Bielanski W, Hahn EG : Role of gastric acid secretion in progression of acute gastric erosions induced by ischemia-reperfusion into gastric ulcers. *Eur J Pharmacol* 398 : 147-158, 2000
- 47) Jacobson ED : Circulatory mechanisms of gastric mucosal damage and protection. *Gastroenterology* 102 : 1788-1800, 1992
- 48) Lazaratos S, Kashimura H, Nakahara A, Fukutomi H, Osuga T, Urushidani T, Miyauchi T, Goto K : Gastric ulcer induced by submucosal injection of ET-1 : role of potent vasoconstriction and intraluminal acid. *Am J Physiol* 265 : G491-G498, 1993
- 49) Sato N, Kawano S, Tsuji S, Ogihara T, Yamada S : Gastric blood flow in ulcer diseases. *Scand J Gastroenterol Suppl* 208 : 14-20, 1995
- 50) Gschwendt M, Furstenberger G, Leibersperger H, Kittstein W, Lindner D, Rudolph C, Barth H, Kleinschroth J, Marme D, Schachtele C, Marks F : Lack of an effect of novel inhibitors with high specificity for protein kinase C on the action of the phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate on mouse skin *in vivo*. *Carcinogenesis* 16 : 107-111, 1995
- 51) Stabel S, Parker PJ : Protein kinase C. *Pharmacol Ther* 51 : 71-95, 1991
- 52) Teshima S, Rokutan K, Nikawa T, Kishi K : Guinea pig mucosal cells produce abundant superoxide anion through an NADPH oxidase-like system. *Gastroenterology* 115 : 1186-1196, 1998
- 53) Puschmann AJ, Dehne K, Page S, Classen M, Schepp W : In purified rat parietal cells NF- κ B is activated by proinflammatory cytokines and H₂O₂. *Gastroenterology* 114 : A1173, 1998 (Abstract)
- 54) Schreck R, Meier B, Mannel DN, Droge W, Baeuerle PA : Dithiocarbamates as potent inhibitors of nuclear factor κ B activation in intact cells. *J Exp Med* 175 : 1181-1194, 1992
- 55) Jourd'heuil D, Morise Z, Conner EM, Kurose I, Grisham MB : Oxidant-regulation of gene expression in the chronically inflamed intestine. *Keio J Med* 46 : 10-15, 1997
- 56) Barnes PJ, Karin M : Nuclear factor- κ B : a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 336 : 1066-1071, 1997
- 57) Noach LA, Bosma NB, Jansen J, Hoek FJ, van Deventer SJH, Tytgat GNJ : Mucosal tumor necrosis factor- α , interleukin-1 β , and interleukin-8 production in patients with *Helicobacter pylori* infection. *Scand J Gastroenterol* 29 : 425-429, 1994
- 58) Fiorucci S, Antonelli E, Migliorati G, Santucci L, Morelli O, Federici B, Morelli A : TNF alpha processing enzyme inhibitors prevent aspirin-induced TNFalpha release and protect against gastric mucosal injury in rats. *Aliment Pharmacol Ther* 12 : 1139-1153, 1998