

博士論文

カハール介在細胞における Th1 型炎症を介した
機能異常の分子機構

梶 典幸

目次

【第1章 諸言】	4
1-1 消化管運動	4
1-2 ICC	4
1-3 消化管運動機能障害と炎症	6
1-4 術後イレウス	7
1-5 本研究の目的	8
【第2章 材料および実験方法】	11
2-1 使用動物	11
2-2 Cell cluster の作製	11
2-3 Cell cluster への炎症刺激および各種試薬の処置	12
2-4 細胞内カルシウムイメージング	12
2-5 POI モデルマウスの作製および筋層標本作製	13
2-6 免疫染色および Myeloperoxidase 染色	13
2-7 電子顕微鏡解析	14
2-8 Real-time PCR による定量的 mRNA 発現量の測定	14
2-9 細胞外膜電位測定	15
2-10 統計処理	15
【第3章 小腸 cell cluster 標本における Th1 型炎症刺激による ICC のペースメーカー機能異常の分子機構】	19
3-1 Cell cluster を構成する細胞群の同定	19
3-2 Cell cluster における ICC のペースメーカー機能測定法の樹立	21
3-3 Th1 型炎症刺激による ICC のペースメーカー機能異常	23
3-4 Th1 型炎症刺激による Th1 サイトカイン発現の同定	25

3-5	ICC ペースメーカー機能に対する各種 Th1 サイトカインの影響	27
3-6	ICC のペースメーカー機能に対する NO の影響	29
3-7	Th1 型炎症刺激による iNOS 発現誘導	31
3-8	Th1 型炎症刺激による iNOS 発現細胞の同定	33
3-9	Th1 型炎症刺激による ICC のペースメーカー機能障害における cGMP/G kinase 経路の関与	36
3-10	Th1 型炎症刺激による ICC のペースメーカー機能障害における ATP 感受性カリウムチャネルの関与	38
3-11	Th1 型炎症刺激による ICC のペースメーカー機能障害における S-ニトロシル化の関与	40
3-12	Th1 型炎症刺激による ICC のペースメーカー機能障害における酸化ストレスの関与	42
3-13	c-Kit 陽性 ICC ネットワークに対する Th1 型炎症刺激の影響	44
3-14	ICC バイオマーカー mRNA 発現に対する Th1 型炎症刺激の影響	46
3-15	ICC 微細構造に対する Th1 型炎症刺激の影響	48
3-16	考察	50

【第 4 章 マウス POI モデルにおける ICC の病態発現解析とその分子機構】

.....		55
4-1	回腸筋層における炎症細胞浸潤	55
4-2	回腸筋層における Th1 サイトカイン mRNA 発現	58
4-3	回腸筋層の c-Kit 陽性 ICC ネットワークに対する腸管操作の影響	60
4-4	回腸筋層の ICC バイオマーカー発現に対する腸管操作の影響	62
4-5	回腸筋層の ICC 微細構造に対する腸管操作の影響	64
4-6	回腸筋層の ICC ペースメーカー機能に対する腸管操作の影響	66
4-7	腸管操作 48 時間後の回腸筋層における c-Kit 陽性 ICC ネットワーク	68
4-8	腸管操作 48 時間後の回腸筋層における ICC バイオマーカー mRNA 発現	70

4-9 腸管操作 48 時間後の回腸筋層における ICC のペースメーカー機能	72
4-10 回腸筋層における iNOS mRNA 発現量の変動	74
4-11 腸管操作による c-Kit 陽性 ICC ネットワーク障害への NO の関与.....	76
4-12 考察.....	78
【第 5 章 総合考察】	82
① ICC と炎症反応	82
② ICC 病態解析における cell cluster method の有効性.....	82
③ ICC と Th1 サイトカイン	84
④ ICC と NO	85
⑤ ICC 可塑性	86
⑥ まとめ.....	87
【第 6 章 総括】	89
【第 7 章 引用文献】	94
謝辞.....	105

【第1章 諸言】

1-1 消化管運動

消化管は摂取した食物の消化、栄養吸収および排泄物の輸送を担う生命活動において重要な臓器であり、これらの機能を果たすためには正常な消化管運動が不可欠である。消化管運動系を構成する細胞群として平滑筋と神経ネットワークが古くから知られている。平滑筋細胞は消化管筋層を構成する最も基本的な細胞であり、消化管運動における駆動力となる(1)。神経は食物による腸内圧増加に対する反射や中枢からの情報を平滑筋に伝えて消化管運動全体を調節する(2, 3)。近年ではこれらの細胞群に加えて消化管運動のペースメーカー機能を担うカハール介在細胞 (interstitial cells of Cajal; ICC) や消化管運動を負に調節している platelet-derived growth factor receptor α 陽性筋線維芽細胞 (PDGFR α ⁺ MF) など様々な細胞群の緻密な連携によって正常な消化管運動が生み出されていることが明らかとなっている(4)。従って、いずれか一つの要素が障害されただけでも、正常な消化管運動は破綻してしまう。

1-2 ICC

ICCは19世紀にSantiago Ramón y Cajal によって報告された消化管に存在する間質細胞である。ICCは胃から大腸にかけて全ての消化管領域に存在しており、その解剖学的位置も深部粘膜層、筋層間、漿膜下とさまざまである(5)。発見当初、ICCの機能については十分に明らかとなっていなかった。これは、ICCを同定する手段が形態学的手法以外になかったためであり、その後、c-Kit (CD117) がICCのマーカータンパク質となることが報告されたことが契機となり急速に研究が進んだ(6-8)。加えて、電気生理学的解析技術の向上も寄与して、近年では小腸のmyenteric plexusに存在するICC (ICC-MY) が消化管運動におけるペースメーカー機能を担っていることが広く認識されるようになった。

ICC-MYは互いに突起を伸ばしギャップ結合を介して結合することで網目状のネット

ワークを形成する。さらにICCネットワークは平滑筋ともギャップ結合することで電氣的カップリングを形成する。ICC-MYは自発的かつ律動的なslow waveと呼ばれる電氣的活動を示し、このslow waveがギャップ結合を介して平滑筋に伝わることで平滑筋の自発性収縮が生じる。電気生理学的なICCのslow waveの発生機序は完全に解明されていないが、概ね以下のように理解されている（概略図を図1に示す）：①小胞体に存在するリアノジン受容体やIP₃受容体からCa²⁺が放出される（細胞質内に放出されたCa²⁺はCa²⁺ポンプを介して能動的に小胞体に取り込まれる）、②細胞膜上のCa²⁺活性化Cl⁻チャンネル（ANO1）が活性化することでspontaneous transient inward currents (STICs)が生じ、spontaneous transient depolarizations (STDs)が発生する、③STDsによりT-type voltage dependent Ca²⁺チャンネル（VDCC）が活性化し、Ca²⁺が細胞質内に流入する、④Ca²⁺流入に同調して近傍の小胞体からCa²⁺が放出され、ANO1が活性化することで細胞全体に脱分極が広がりslow waveが形成され、さらに脱分極が隣接するICCのVDCCを活性化することでICCネットワークにslow waveが伝搬される。近年、ANO1はslow waveの形成において特に重要であることに加えて、ICCのバイオマーカーとしても注目されている(9)。ICC-MYがペースメーカー機能を担う一方で、輪走筋層内に分布するICC-IMまたはICC-DMPと呼ばれるICCサブタイプは神経入力を介在し、情報を平滑筋へと伝える機能を持つことが示唆されている(10)。このようにICCの消化管運動における役割は多岐にわたっており、また、消化管部位によってもICCサブクラスの分布や消化管運動への寄与度が異なっているため、現在もICCの消化管運動における機能的役割に関して研究が進められている。ICCは間葉系幹細胞由来の細胞であり、その発生・分化にはチロシンキナーゼ受容体であるc-Kitおよびそのリガンドであるstem cell factor（SCF）によるシグナルが重要である(11)。c-Kit発現を遺伝的に欠損したW/W^vマウスはICC-MYを欠いており、消化管運動不全を示すことが知られている(7)。また、c-Kitは成熟したICCにも発現しており、成熟マウスから単離した小腸平滑筋標本にc-Kitチロシンキナーゼ阻害剤であるimatinibを処置することで自発性収縮が抑制されることから、成熟したICCにおいてSCF/c-Kitシグナルはペ

ースメーカー機能の発揮に重要であるという報告がある(12)。しかし、*imatinib*のチロシンキナーゼ阻害作用以外の非特異的な作用による可能性も考えられるため、現在も成熟したICCに発現するc-Kitのペースメーカー機能における役割は明らかではない。

1-3 消化管運動機能障害と炎症

消化管運動機能が障害されると食物の消化障害や栄養吸収不良、嘔吐や下痢、便秘などが引き起こされる。このような消化管運動機能障害は一般的に消化管炎症に付随してみられる。また、炎症によって誘発された消化管運動機能障害は腸内フローラの構成の変化を誘発し、それにより更なる消化管炎症の悪化を招く可能性も指摘されており(13-15)、消化管運動機能障害と炎症は密接に関係していると考えられている。炎症の誘発および促進または抑制には免疫担当細胞から産生されるサイトカインやケモカインといった炎症性メディエーターが働く。炎症はその性質によって大きくTh1、Th2、Th17型に分類され、それぞれに特徴的なサイトカインが産生される。Th1サイトカインとしてはIL-1 β 、TNF- α 、IL-6およびINF- γ 、Th2サイトカインとしてはIL-4、IL-5、IL-10およびIL-13、Th17サイトカインとしてはIL-17が最も代表的である。例えば、炎症性腸疾患の中でもクローン病患者ではTh1型が優勢であり、逆に潰瘍性大腸炎ではTh2およびTh17型が優勢であると考えられているが、実際にはTh1、Th2、Th17サイトカインが入り混じる状態で産生されており、一概に区分することができないとも考えられている(16-19)。これらの炎症性サイトカインは主に免疫担当細胞であるリンパ球やマクロファージ上に存在する受容体に作用することで炎症反応を引き起こす。一方で、近年、これらの炎症性サイトカイン、特にTh1サイトカインが非免疫担当細胞である消化管運動系を構成する細胞群にも作用し、機能を障害することが明らかになってきた。例えば、所属研究室はTNF- α が平滑筋における収縮関連タンパクCPI-17の発現を減少させ、この収縮機構を抑制することを報告した(20-22)。また、腸管神経においてもIL-1 β が神経の神経伝達物質に対する反応性を変化させることが報告されている(23)。一方、

カハール介在細胞も炎症性腸疾患や慢性腸閉塞などの様々な消化管炎症病態において、その機能やネットワーク構造が障害されることがこれまでに報告されているが(24-26)、どのような炎症性メディエーターが原因となって障害を生じるかは未だに明らかにされていない。ICCの機能障害を誘発する炎症性メディエーターの同定および詳細な分子機構を解明することができれば、ICCを標的細胞とした腸炎に付随する消化管運動不全の予防および治療戦略を確立することができる。このような試みは世界的にみても行われておらず、消化管の基礎研究領域だけでなく、臨床的意義も高いと考えられる。

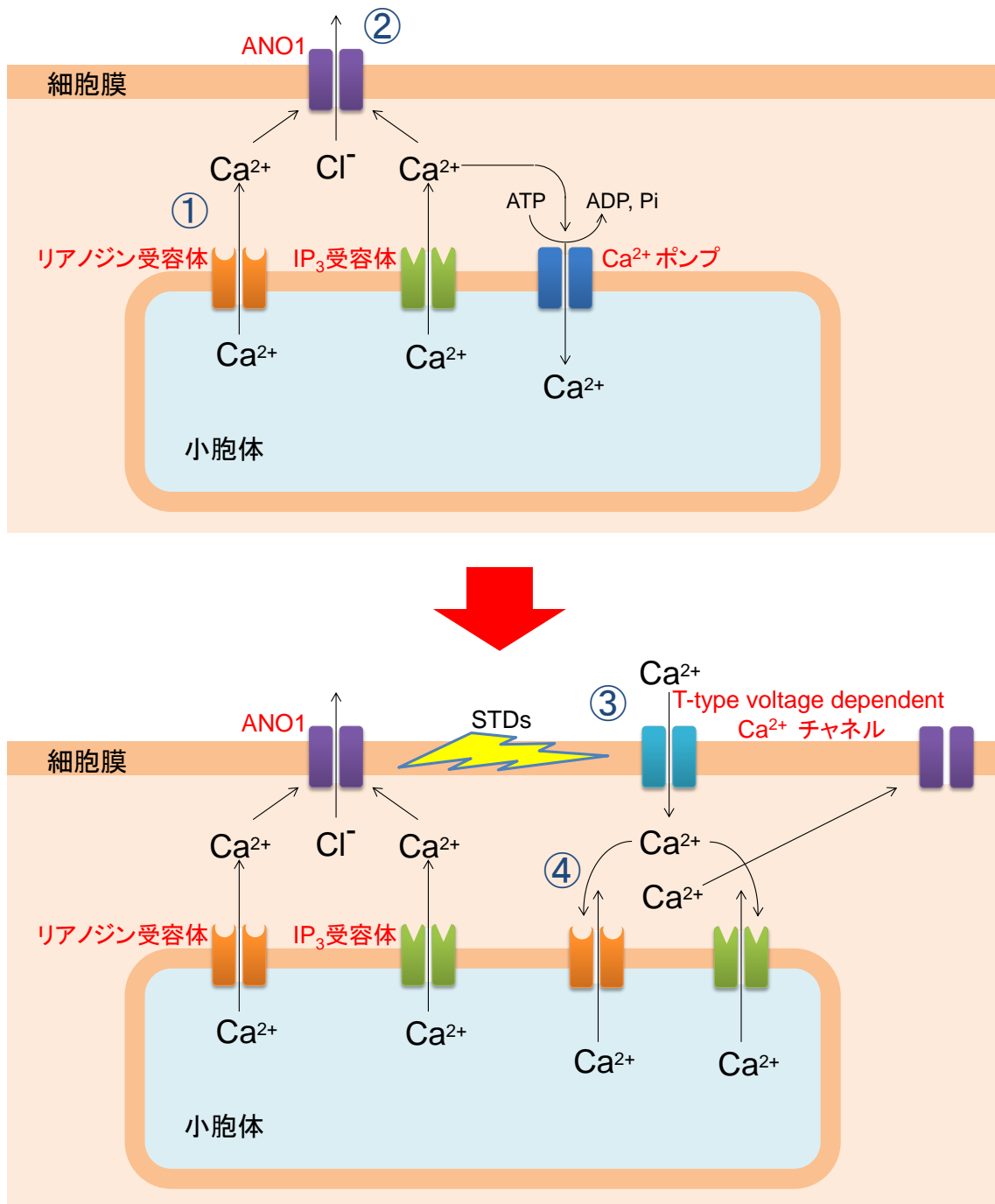
1-4 術後イレウス

術後イレウス (post-operative ileus; POI) は腹腔内手術後に生じる消化管運動機能不全である。POIは腹痛、嘔吐、排便途絶、腹部膨満などの症状により患者のquality of lifeの低下を招く(27)。多くは自然に回復するが、長期化することで腸管癒着や敗血症に移行するケースもあり、古くから外科分野で問題となっている術後合併症である(28)。POI病態の初期は麻酔や外科的侵襲による交感神経の緊張が原因で引き起こされているが、中期以降の主な原因は手術時に行われた腸管操作 (intestinal manipulation; IM) 刺激による局所の炎症であることが明らかとなっている(29)。発症機序として、以下のような可能性が考えられている；①IM刺激が消化管筋層に分布する常在性マクロファージを活性化することでサイトカインやケモカインが産生され、炎症反応が生じる、②この炎症に応答し、血中や脾臓から好中球やマクロファージが消化管筋層部へ浸潤する(30)、③炎症細胞がプロスタグランジン類や一酸化窒素 (NO) を産生することで平滑筋の収縮機構が抑制され、消化管運動不全が生じる (31, 32)。このように、POI病態の形成における主な要因は炎症誘導性に産生されたNOによる平滑筋機能抑制であると考えられているが、先に述べたように、消化管運動は様々な細胞群の連携によって生み出されているため、平滑筋に加え、他の細胞の機能異常がPOIの病態形成に関与している可能性が考えられる。ICCは様々な消化管炎症において機能および

ネットワーク構造の異常を示すため、POIにおいてもICCの機能障害が生じている可能性がある。
ある。

1-5 本研究の目的

本研究は①*in vitro* 実験系を用いた Th1 型炎症刺激による ICC の機能や形態の異常 (3 章) と、②Th1 型 *in vivo* 炎症病態を引き起こす POI モデルにおける ICC の病態発現を詳細に解析する (4 章) ことで、Th1 型炎症刺激による ICC のペースメーカー機能障害の分子機構を解明することを目的とした。



Sanders KM et al., Physiol Rev. 2014 Jul;94(3):859-907 より一部改編

図 1. ICC における slow wave の発生機序

①小胞体に存在するリアノジン受容体やIP₃受容体からCa²⁺ が放出される（細胞質内に放出されたCa²⁺はCa²⁺ ポンプを介して能動的に小胞体に取り込まれる）、②細胞膜上のCa²⁺活

性化Cl⁻ チャンネル (ANO1) が活性化することでspontaneous transient inward currents (STICs) が生じ、spontaneous transient depolarizations (STDs) が発生する、③STDsによりT-type voltage dependent Ca²⁺ チャンネル (VDCC) が活性化し、Ca²⁺ が細胞質内に流入する、④Ca²⁺ 流入に同調して近傍の小胞体からCa²⁺ が放出されANO1が活性化することで細胞全体に脱分極が広がりslow waveが形成され、さらに脱分極が隣接するICCのVDCCを活性化することでICCネットワークにslow waveが伝搬される。

【第2章 材料および実験方法】

2-1 使用動物

雌性および雄性 BALB/c マウス（三共ラボサービス株式会社より購入）を交配させることで得た生後 7-10 日齢の雄性または雌性 BALB/c マウスを cell cluster の作製に用いた。POI モデルの作製には 8 週齢の雄性または雌性 BALB/c マウスを用いた。動物は標準的な飼育ケージ内で自由摂食、飲水の条件下で飼育し、飼育室の明暗周期は 12 時間毎とした。動物の扱いに関しては東京大学動物実験実施マニュアルに則り行った。また、全ての動物実験は東京大学農学生命科学研究科動物実験委員会の実験動物計画書の承認（No.P14-995）を得て実施した。

2-2 Cell cluster の作製

新生児マウスを断頭にて安楽死処置した後に、空腸を摘出した。以下の操作は氷冷した栄養液中で行った。栄養液の組成は以下に示す;135 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM glucose, 2 mM CaCl₂, 1.2 mM MgCl₂, 10 mM HEPES、95% O₂-5% CO₂ 通気後 4°C 時に pH 7.35 になるように Tris にて調節した。摘出した空腸は腸間膜脂肪を切除した後に腸間膜付着面から切開し、シリコンコートディッシュにシート状に広げ、虫ピンで固定した。ピンセットを用いて粘膜面を剥離することで、平滑筋層標本を得た。平滑筋層標本をハサミで約 0.5 mm に細切し、1.3 mg collagenase type 4 (Worthington Biochemical, Freehold, NJ, USA)、0.5 mg papain (Worthington Biochemical)、0.5 mg trypsin inhibitor (Sigma, St. Louis, MO, USA)、0.2 mg dithiothreitol (Wako, Tokyo, Japan)、1.0 mg BSA (Prospec-Tany Technogene LTD, Rehovot, Israel) を含む 1 mL 栄養液に入れて、恒温槽にて 37°C、21 分間消化した。消化後、15 μg DNase を加えて数回ピペッティングした後に、300×g、3 分間遠心した。以下はクリーンベンチ内で無菌操作をした。遠心後の上清を吸引除去した後に 1 mL の DMEM (Sigma) を加えて 300×g、2 分間遠心した。この操作を 4 回繰り返した後に得られた cell cluster をコラーゲンコ

ート済みの直径 25 mm カバーグラスに播種した。Cell cluster は 10% FBS、1% penicillin および streptomycin を含有した DMEM で維持し、37°C、95% O₂-5% CO₂ インキュベーター内で静置し 48 時間培養した。

2-3 Cell cluster への炎症刺激および各種試薬の処置

48 時間の培養後に新たな DMEM へと交換し、25 ng/mL IL-1 β (Acris Antibodies, Herford, Germany)、TNF- α (Calbiochem, San Diego, CA, USA)、IL-6 (PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA)、IFN- γ (ProSpec) または 10 μ g/mL LPS (Sigma) を添加し、24-48 時間培養した。300 μ M L-NAME (Alexis Corporation, San Diego, CA, USA)、10 μ M ODQ (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA)、10 μ M glibenclamide (Sigma) および 300 μ M Apocynin (Sigma) は炎症刺激の 30 分前に添加した。遊離 NO を発生することなくタンパク質を S-ニトロシル化することができる新規 NO ドナーである NNO-ABBH1(33, 34)は 30、50、100 μ M で処置し 24 時間培養した。NNO-ABBH1 は東京大学大学院薬学系研究科の大和田智彦教授より提供を受けた。

2-4 細胞内カルシウムイメージング

Cell cluster を 10 μ M fluo-3/ acetoxymethyl (Dojindo, Kumamoto, Japan)、0.02% pluronic F-127 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) および 0.02% cremophor EL (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を含有した栄養液にて室温、3.5 時間インキュベートし、カルシウムインジケータを細胞内にロードした。ロード後にカバーグラスを 37°C に温めた恒温チャンバーに設置し、蛍光イメージングシステム (Hamamatsu Photonics KK, Hamamatsu, Japan) を用いて 480 nm 励起光における 515-565 nm の蛍光を観察した。画像は 0.5 秒に 1 枚撮影した。実験は 1 μ M nifedipine (Sigma) 存在下で行うことで平滑筋由来のカルシウムの変化を除外した。得られた Ca²⁺ oscillation の頻度(/min)および振幅($\Delta F/F_0 = (F_{\text{peak}} - F_{\text{base}}) / F_0$)を ICC 機能の指標として用いた。

2-5 POI モデルマウスの作製および筋層標本作製

8 週齢の BALB/c マウスを 18 時間絶食後、pentobarbital 40 mg/kg を腹腔内投与し、全身麻酔を行った。麻酔後に腹部体毛を剃り、皮膚を 70% ethanol にて消毒した上で腹部正中を約 1.5 cm 切開し、開腹した。回腸遠位部を腹腔外に露出させ、生理食塩水で湿らせた滅菌綿棒を使用して回腸遠位部（約 10 cm）の表面全体を 3 往復擦ることで IM 刺激を行った。IM 刺激後に回腸を腹腔内に戻し、腹壁および皮膚をそれぞれ 3-0 絹糸にて単結節縫合し、閉腹した。IM の 24 時間後または 48 時間後に頸椎脱臼にてマウスを安楽死処置し、IM 刺激を施した部位を採取した。平滑筋層標本は 2-3 で記述した方法により作製した。iNOS 阻害剤である aminoguanidine (sigma) は手術の 30 分前および 4 時間後に 20 mg/kg 皮下投与した。溶媒には生理食塩水を用い、control 群には溶媒のみを投与した。投与量は過去の文献および予備検討の結果を参考に決定した(35)。

2-6 免疫染色および myeloperoxidase 染色

Cell cluster は氷冷 acetone または 5% neutral buffered formalin にて 5 分間処置、平滑筋層標本はシリコンラバーに虫ピンで伸展固定した後に、氷冷 acetone にて 10 分間処置することで固定した。TBS で固定液を洗浄した後に、formalin 固定標本のみ 0.1% tween-20 または 0.2% triton X-100 含有 TBS にて 5 分間脱膜化処理を行った。Acetone 固定標本および脱膜化後 formalin 固定標本を 2% BSA 含有 TBS (pH 7.6) にて室温、1 時間処置することで抗体の非特異的結合を抑えた。1 次抗体を 4°C、一晚反応させた後に、TBS にて未結合の抗体を洗浄し、次に 2 次抗体を遮光下で室温、1 時間反応させた。未反応 2 次抗体を TBS にて洗浄した後に封入し、共焦点顕微鏡 (CZ-E1, Nikon, Tokyo, Japan) にて観察、画像撮影を行った。使用した 1 次抗体と 2 次抗体の詳細は表 1 に示す。

Myeloperoxidase (MPO) 染色には formalin 固定した平滑筋層標本を用いた。固定標本は TBS にて洗浄し、0.1% Hanker-Yates 試薬 (Polysciences, Warrington, PA) および 0.03% 過酸化水素を含有した TBS に浸漬し、室温 5 分間反応させた。染色後の組織を TBS にて洗浄し、

スライドガラスに伸展させ、封入した。観察は光学顕微鏡（ACT-10、Nikon）にて行った。

2-7 電子顕微鏡解析

Cell clusterおよび平滑筋層標本は3% glutaraldehyde（Wako）および4% paraformaldehyde（Wako）を含有したPBSにて室温で2時間固定した。固定したサンプルは1% osmium tetroxide 含有PBSにて後固定し、uranyl acetateにてブロック染色した後に、エポン樹脂に包埋した。超薄切片は電子顕微鏡（H-7650, Hitachi, Tokyo, Japan）にて観察した。なお、後固定以降の工程は福井大学形態医科学講座にて実施した。

2-8 Real-time PCR による定量的 mRNA 発現量の測定

Total RNAの回収にはTRI Reagent（Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA）を用いた。Cell clusterは実体顕微鏡下でピペッティングにより剥離・回収した後に、1 mLのTRI Reagentを加え、ピペッティングにて溶解した。平滑筋層標本は1 mLのTRI Reagentを加え、Polytron（PT-MR 2100, KINEMATICA, Lucerne, Switzerland）を用いてホモジナイズした。サンプルが均一に溶解したTRI Reagentに0.2 mLのchloroform（Wako）を加えて攪拌し、これを17000×g 15分間遠心した。遠心後、mRNAが溶解した水層部を新たなチューブに移し、2-propanol（Wako）および80% ethanolを用いてethanol沈殿法を行い、total mRNAを得た。Total mRNAはDNase/RNase-free distilled waterに溶解し、吸光度測定により濃度を算出した。500 ngのmRNAを鋳型としてReverTra Aceおよびrandom 9-mer oligonucleotide primers（TOYOBO, Osaka, Japan）を用いた逆転写反応によりcDNAを合成した。逆転写反応はサーマルサイクラー（TP600, TAKARA, Kusatsu, Japan）を用いて30°C 10分、42°C 60分、99°C 5分反応させた。得られたcDNAはTHUNDERBIRD[®] SYBR[®] qPCR Mix（TOYOBO）を用いてABI Prism 7000（Applied Biosystems, Foster City, CA., USA）にてPCR反応を行った。反応は95°C 10分の後に、95°C 15秒、59°C 1分の2-step反応を40サイクル繰り返した。mRNA発現量は各種mRNAのCt値をRNA18S5のCt値で補正し、 $\Delta\Delta C_t$ 法にて発現量を比較した。プライマー配列は表2に

示す。

2-9 細胞外膜電位測定

細胞外膜電位の測定には MED 64 system (Alpha Med Science, Osaka, Japan) を用いた。システムの概略図を図 1 に示す。測定チャンバー内には 37°C に加温した 1 μ M nifedipine 添加栄養液を還流した。平滑筋層標本を脳切片用スライスアンカー (SDH series, Harvard Apparatus Japan, Tokyo, Japan) に固定し、8×8 微小電極アレイ (測定面積 1 mm²、電極間距離 150 μ m) に設置した。測定時には 0.1 Hz の高域フィルターをかけることで基線を安定させ、サンプリングレートは 20 kHz とした。

2-10 統計処理

実験成績は平均値 \pm 標準誤差 (SEM) で示した。2 群間の有意差検定は unpaired Student's t-test を用いた。3 群間以上での有意差検定には one-way analysis of variance (ANOVA) を用いた後、Tukey's test を行った。危険率 (P) が 5% 未満の場合を統計学的に有意とした。

表1. 免疫染色に用いた抗体

Type	Target	Host	Clone	Label	Dilution	Supplier	
Primary antibody	c-Kit	Rat monoclonal	ACK2		1:500	Panapharm Laboratories, Kumamoto, Japan	
	c-Kit	Rat monoclonal	ACK4		1:500	Acris Antibodies GmbH, Hiddenhausen, Germany	
	α -SMA	Mouse monoclonal	1A4		1:500	DAKO, Kyoto, Japan	
	CD68	Rat monoclonal	FA-11		1:500	AbD Serotec, Oxford, UK	
	PGP 9.5	Rabbit polyclonal			1:200	UltraClone Limited, Isle of Wight, UK	
	PDGFR α	Goat polyclonal			1:200	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA	
	iNOS	Rabbit polyclonal			1:200	BD Transduction Laboratories, Lexington, KY, USA	
	iNOS	Mouse monoclonal	54		1:200	BD Transduction Laboratories, Lexington, KY, USA	
	Secondary antibody	Rat IgG (H+L)	Goat polyclonal		Alexa Fluor 488	1:500	Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA
		Rat IgG (H+L)	Goat polyclonal		Alexa Fluor 594	1:500	Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA
Mouse IgG (H+L)		Goat polyclonal		Alexa Fluor 488	1:500	Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA	
Mouse IgG (H+L)		Goat polyclonal		Alexa Fluor 568	1:500	Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA	
Rabbit IgG (H+L)		Goat polyclonal		Alexa Fluor 488	1:500	Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA	
Rabbit IgG (H+L)		Goat polyclonal		Alexa Fluor 594	1:500	Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA	
Goat IgG (H+L)		Rabbit polyclonal		Alexa Fluor 488	1:500	Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA	

表 2. Real-time PCR に用いたプライマー配列

Gene name	Forward / Revers	Sequences (5' to 3')
<i>Il1b</i>	Forward	GACGGACCCCAAAAGATGAA
	Revers	ACAGCTTCTCCACAGCCACA
<i>Tnf</i>	Forward	CAAACCACCAAGTGGAGGAG
	Revers	GTAGACAAGGTACAACCCATCG
<i>Il6</i>	Forward	GCCAGAGTCCTTCAGAGAGATACA
	Revers	CTTGGTCCTTAGCCACTCCTTC
<i>Ifng</i>	Forward	ACAATCAGGCCATCAGCAAC
	Revers	TGACCTCAAACCTTGGAATACTC
<i>Nos2</i>	Forward	CAAACCCAAGGTCTACGTTT
	Revers	CCACCAGCTTCTTCAATGTG
<i>Kit</i>	Forward	GGAGGCACTTATACCTTTCTGGTG
	Revers	TGCCATTTATGAGCCTGTCGT
<i>Ano1</i>	Forward	ACTCTTCGCCCTGCTAAACAAC
	Revers	AGCCAGCTTCCCAACACCT
<i>RNA18S5</i>	Forward	GACTCAACACGGGAAACCTCAC
	Revers	CACCCACGGAATCGAGAAAG

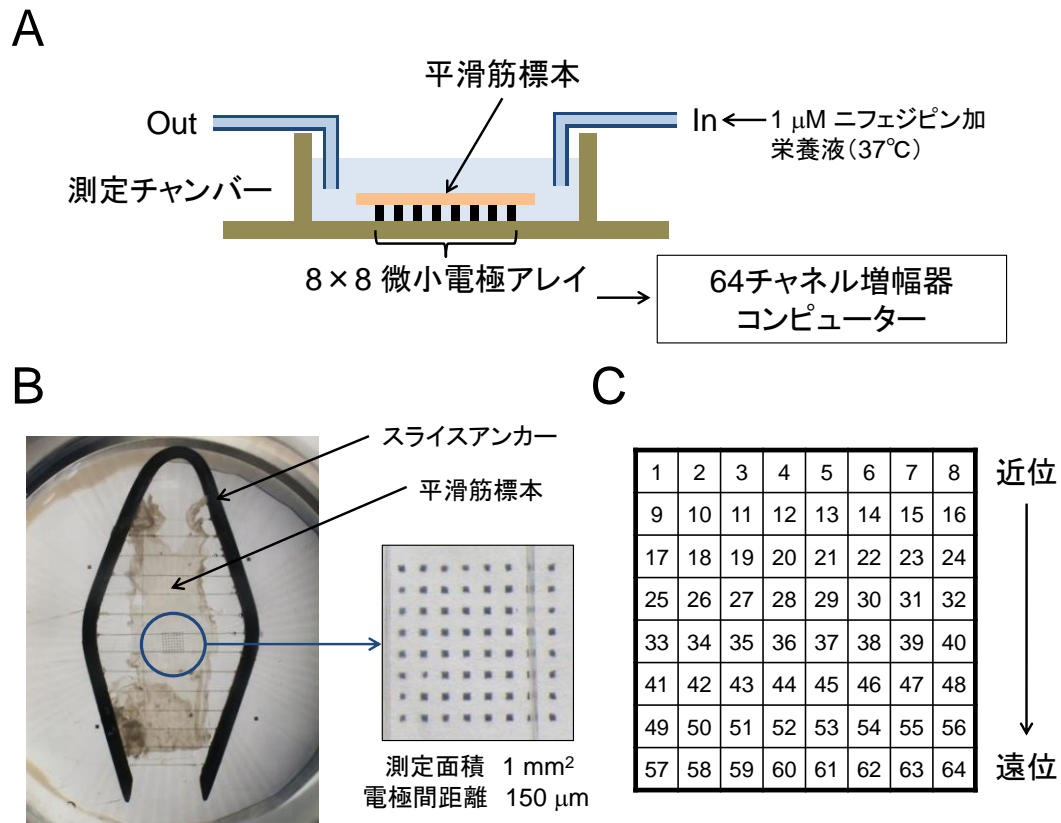


図 1. MED 64 system による細胞外膜電位測定

A : システムの概略図を示す。測定チャンバー内には 37°C に加温した 1 μ M nifedipine 添加栄養液を還流した。B : 平滑筋層標本を脳切片用スライスアンカーに固定し、8 × 8 微小電極アレイ (測定面積 1 mm²、電極間距離 150 μ m) に設置した。C : 電極番号 1-8 側が近位部 (吻側)、57-64 側が遠位部 (肛門側) となるように筋層を設置した。

【第3章 小腸 cell cluster 標本における Th1 型炎症刺激による ICC のペースメーカー機能異常の分子機構】

Th1 型炎症における ICC の病態発現機構を明らかにするために、本章では *in vitro* における ICC 機能評価系を確立し、それを用いて Th1 型炎症による ICC のペースメーカー機能障害の分子機構の解析を試みた。

3-1 Cell cluster を構成する細胞群の同定

マウス消化管平滑筋層から作製される cell cluster は鳥橋と中山らによって報告された *in vitro* の ICC 機能評価系である(36, 37)。Cell cluster を作製した後、免疫染色により cluster を構成する細胞群を同定した。Cell cluster は直径約 100-300 μm の球形から楕円形を示す (図 1A)。c-Kit、 α smooth muscle actin (α -SMA)、CD68、PGP9.5 および PDGFR α はそれぞれ ICC、平滑筋、マクロファージ、神経および PDGFR α^+ MF のマーカータンパクであり、cell cluster はこれらの細胞を含んでいた (図 1B-F)。

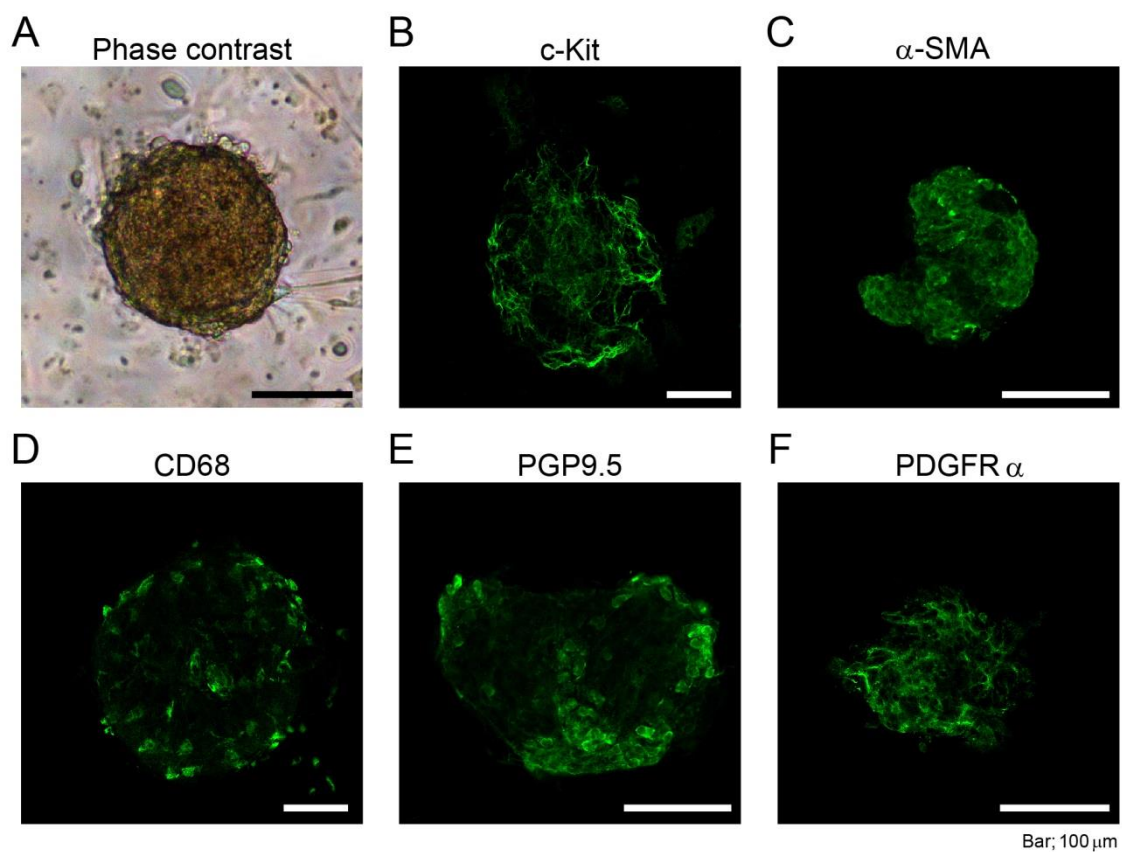


図 1. Cell cluster を構成する細胞群の同定

A は位相差顕微鏡、明視野下における典型的な cell cluster を示す。B-F は c-Kit、α-SMA、CD68、PGP9.5 および PDGFRα に対する免疫染色の結果を示し、それぞれ ICC、平滑筋、マクロファージ、神経および PDGFRα⁺ MF のマーカータンパク質として用いた。

3-2 Cell cluster における ICC のペースメーカー機能測定法の樹立

次に、cell cluster に含まれる ICC がペースメーカー機能を保持しているか確認した。ICC の細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化は slow wave を反映していることが知られている(38)。従って、cell cluster に対して Ca^{2+} イメージングを実施することで ICC ペースメーカー機能測定法の樹立を行った。明視野での観察結果より、cell cluster は自発性の収縮・弛緩反応を発生していた。平滑筋細胞の Ca^{2+} 動態を消去する目的で 1 μM nifedipine を加え、その存在下で cluster における Ca^{2+} イメージングを実施すると、自発性の律動的な Ca^{2+} 濃度変化 (Ca^{2+} oscillation) が確認された (図 2A)。また、測定後の免疫染色実験から、 Ca^{2+} oscillation が認められた部位の細胞は c-Kit 陽性細胞であった (図 2B)。以上の結果から、本研究において、nifedipine 存在下で生じる Ca^{2+} oscillation は ICC 由来であり、cell cluster を用いた ICC のペースメーカー機能評価が可能であることが分かった。

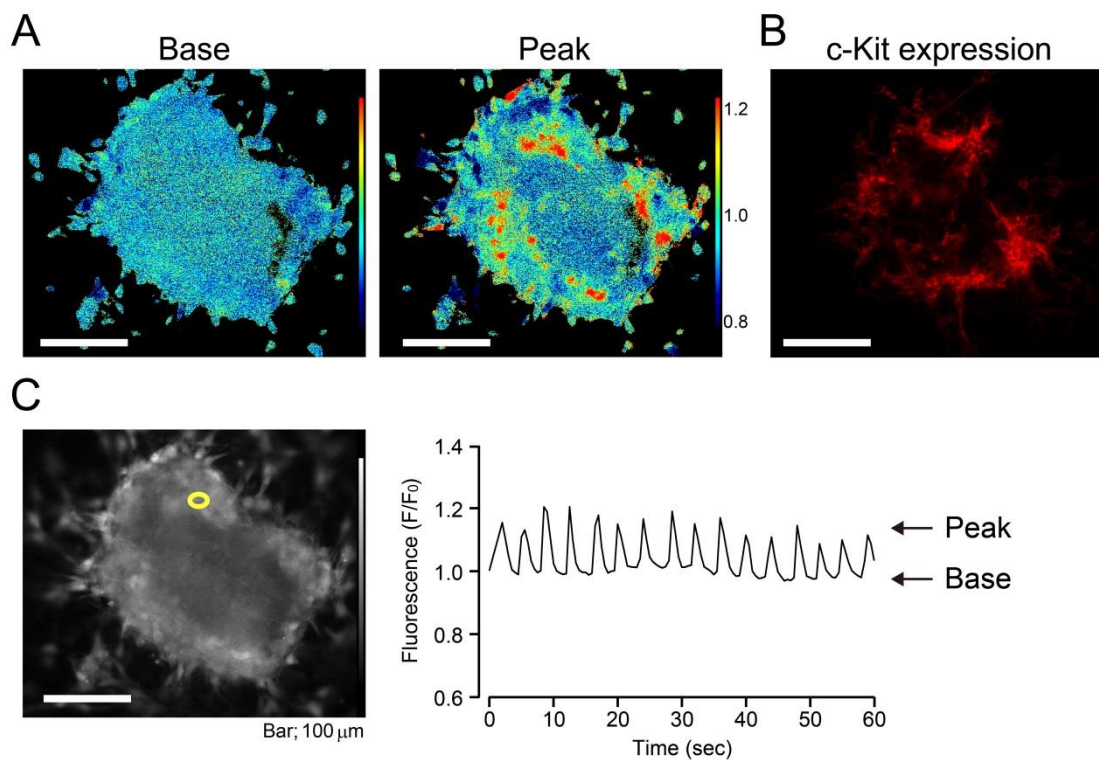


図 2. Cell cluster に含まれる ICC ペースメーカー機能の Ca^{2+} イメージングによる測定

A は Ca^{2+} イメージングを実施した際の蛍光強度 (ratio) の疑似カラー画像である。Base と Peak はそれぞれ Ca^{2+} oscillation の基底とピーク時を示す。B は Ca^{2+} イメージングを実施した後の cell cluster (A) に対する c-Kit 免疫染色像 (赤色蛍光) を示す。C は左写真の黄色の丸は Ca^{2+} イメージングの際の regions-of-interest (ROIs) を示し、右はその部位での Ca^{2+} イメージングの蛍光強度の推移を示す。

3-3 Th1 型炎症刺激による ICC のペースメーカー機能異常

これまでの検討により cell cluster は消化管筋層の細胞ネットワークを保持しており、ICC ペースメーカー機能を評価できることが示された。そこで次に cell cluster を用いて、Th1 型炎症刺激が ICC のペースメーカー機能におよぼす影響を検討した。Cell cluster に IFN- γ と LPS を 24 時間同時処置することで Th1 型炎症刺激を行った。これらは主にマクロファージを活性化させ、Th1 型の炎症反応を引き起こす(39)。IFN- γ (25 ng/mL) または LPS (10 μ g/mL) の 24 時間単独処置は、ICC のペースメーカー機能の指標である Ca²⁺ oscillation の頻度および振幅に影響を与えなかった (Control: frequency; 19.9 ± 1.2 cycle/min, amplitude; 0.12 ± 0.02 , n=7. IFN- γ : frequency; 21.4 ± 1.4 cycle/min, amplitude; 0.14 ± 0.05 , n=5. LPS : frequency; 16.6 ± 1.4 cycle/min, amplitude; 0.14 ± 0.02 , n=5. いずれも control 群と有意差なし)。一方、IFN- γ (25 ng/mL) と LPS (10 μ g/mL) の同時処置 (IFN- γ + LPS ; Th1 型炎症刺激) は Ca²⁺ oscillation の頻度および振幅を有意に減少させた (IFN- γ + LPS : frequency; 1.0 ± 0.8 cycle/min, amplitude; 0.010 ± 0.001 , n=6. control 群と有意差あり)。

以上の結果により、IFN- γ + LPS 処置による Th1 型炎症刺激は ICC ペースメーカー機能を障害することが明らかとなった。

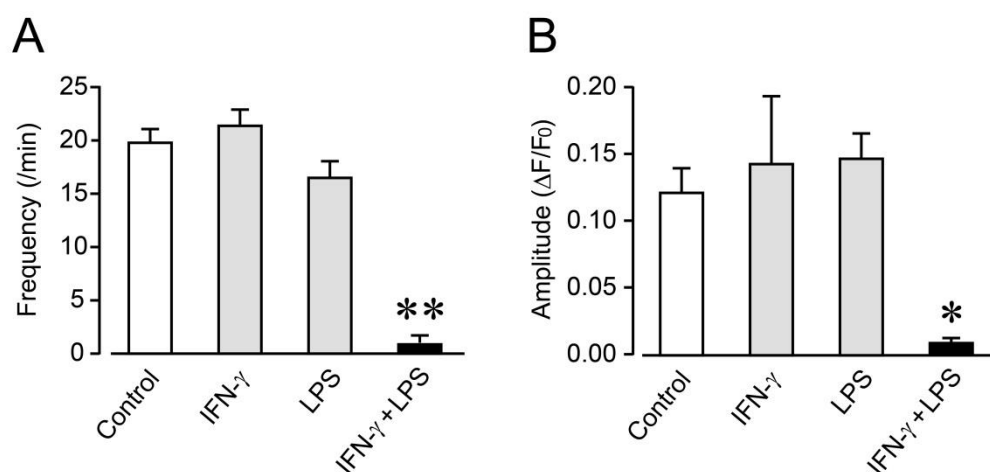


図3. ICCペースメーカー機能に対するTh1型炎症刺激の影響

Cell clusterにIFN- γ (25 ng/mL)、LPS (10 μ g/mL) およびIFN- γ +LPSを24時間処置した後にCa²⁺イメージングを実施した。Aは1分当たりのCa²⁺ oscillationの頻度 (frequency/min) を、Bは2分当たりの振幅の平均値 (Amplitude; $\Delta F/F_0$) を定量した結果を示す (n = 5-7)。各カラムはmean \pm SEMを示す。

* : P < 0.05、** : P < 0.01 ; Control群との比較

3-4 Th1 型炎症刺激による Th1 サイトカイン発現の同定

次に、IFN- γ + LPS 処置により、どのような Th1 サイトカインが生じているか明らかにするため、IFN- γ + LPS 刺激後に、ディッシュから約 50 個の cell cluster を回収して total RNA を抽出し、Th1 サイトカインの mRNA 発現変動を real-time PCR を用いて検討した。

IFN- γ + LPS 処置後の cell cluster において、*I1b* (IL-1 β 遺伝子)、*Tnf* (TNF- α 遺伝子)、*I16* (IL-6 遺伝子) mRNA の発現がそれぞれ control 群に比べて 88 倍、4.0 倍、75 倍と有意に増加していた (図 4A-C)。*I1ng* (IFN- γ 遺伝子) mRNA 発現量は control 群に比べて増加傾向を示したが、有意な差ではなかった (図 4D)。以上の結果から、IFN- γ + LPS 処置により Th1 サイトカインである IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 の発現増加が示唆され、Th1 型炎症が cell cluster 内に生じていることが示唆された。

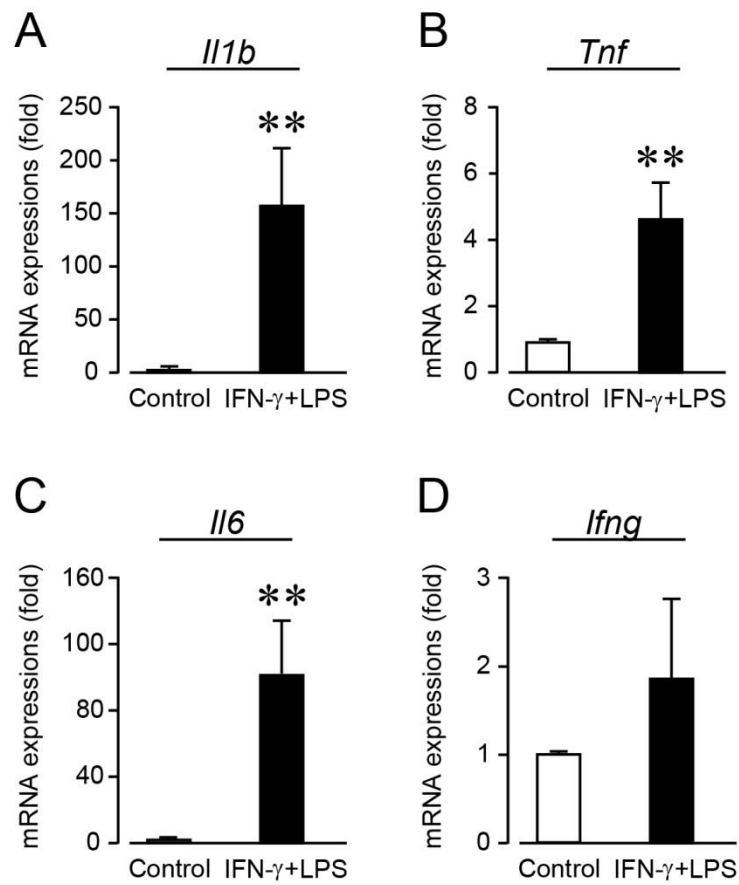


図 4. Th1 型炎症刺激後の Th1 型サイトカイン類の mRNA 発現

IFN- γ + LPS を 24 時間処置した cell cluster における各種 Th1 サイトカインの発現を real-time PCR を用いて測定した。A-D は各 mRNA 発現量の定量結果である。縦軸は control 群に対する IFN- γ + LPS 処置群の発現量比で示した (n = 4-11)。

各カラムは mean \pm SEM を示す。

** : P < 0.01 ; Control 群との比較

3-5 ICC ペースメーカー機能に対する各種 Th1 サイトカインの影響

次に IFN- γ + LPS 処置により発現上昇が認められた Th1 サイトカインをそれぞれ単独で cell cluster に処置した際の ICC ペースメーカー機能に与える影響について検討した。IL-1 β (25 ng/mL) および TNF- α (25 ng/mL) の単独 48 時間処置は ICC 機能に影響をおよぼさなかった (図 5A, B)。一方、IL-6 (25 ng/mL) は Ca²⁺ oscillation の振幅のみ (Control amplitude : 0.23 ± 0.05 , n=11. IL-6 amplitude : 0.12 ± 0.02 , n=12. 有意差あり、図 5C) を、IFN- γ (25 ng/mL) は Ca²⁺ oscillation の頻度のみ (Control frequency : 19.1 ± 1.67 cycle/min, n=7. IFN- γ frequency : 11.7 ± 2.26 cycle/min, n=11. 有意差あり、図 5D) を有意に減少させた。しかしながら、これらのサイトカインによって引き起こされる ICC ペースメーカー機能障害は IFN- γ + LPS 処置によるものに比べて小さかった。

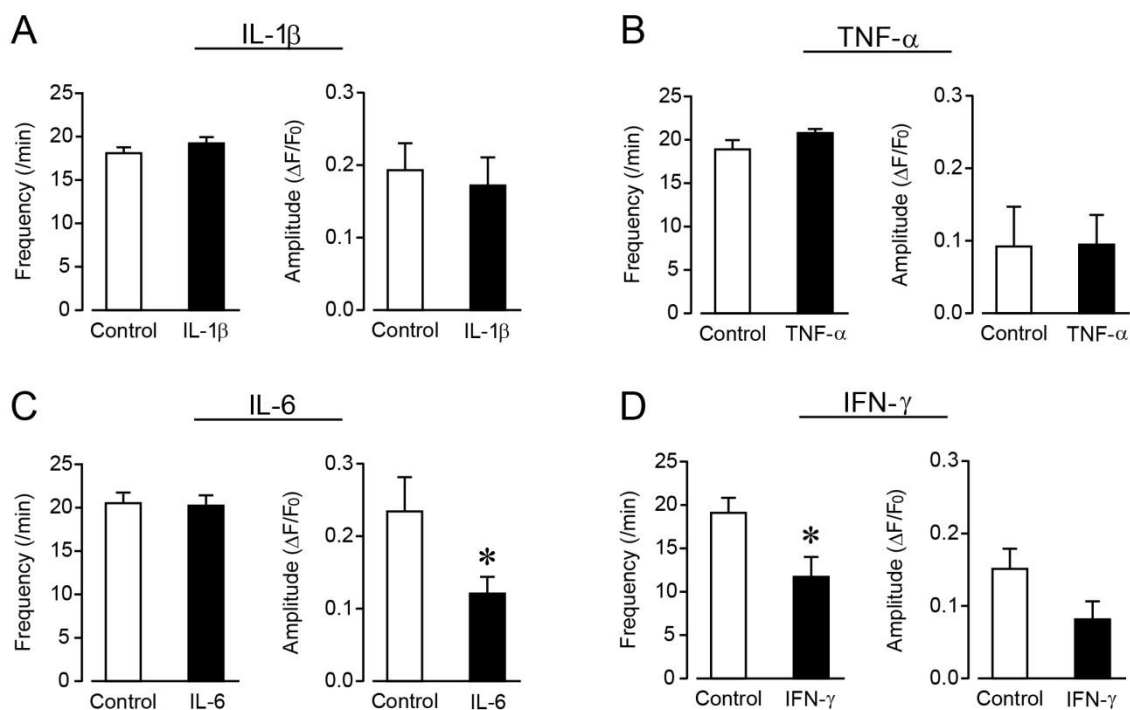


図 5. ICC ペースメーカー機能に対する Th1 サイトカインの影響

Cell cluster に 25 ng/mL IL-1β、TNF-α、IL-6 および IFN-γ を 48 時間単独処置した後に Ca²⁺ イメージングを実施した。A-D の各パネルの左グラフは 1 分当たりの Ca²⁺ oscillation の頻度 (frequency/min) を、右グラフは 2 分当たりの振幅の平均値 (Amplitude; ΔF/F₀) を定量した結果を示す (n = 7-11)。

各カラムは mean ± SEM を示す。

* : P < 0.05 ; Control 群との比較

3-6 ICC のペースメーカー機能に対する NO の影響

Th1 型炎症において、様々な細胞で誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) の発現が増加し、多量の NO が産生されることが知られている(40-42)。そこで次に Th1 型炎症によって生じた NO が ICC のペースメーカー機能におよぼす影響を検討した。実験には NOS 阻害剤である L-NAME (300 μ M) および iNOS 特異的阻害剤である 1400W (100 μ M) を用い、IFN- γ + LPS 処置の 30 分前に添加した。IFN- γ + LPS によって生じた ICC の機能障害は L-NAME の前処置により有意に抑制された (IFN- γ + LPS frequency : 6.2 ± 2.9 cycle/min, amplitude : 0.022 ± 0.007 , n=7. L-NAME + IFN- γ + LPS frequency : 20.4 ± 0.5 cycle/min, amplitude : 0.128 ± 0.025 , n=8. 有意差あり、図 6A)。同様に、1400W の前処置も IFN- γ + LPS 処置によって生じた ICC 機能障害を有意に抑制した (IFN- γ + LPS frequency : 1.4 ± 0.7 cycle/min, amplitude : 0.005 ± 0.003 , n=7. 1400W + IFN- γ + LPS frequency : 18.1 ± 0.7 cycle/min, amplitude : 0.063 ± 0.009 , n=8. 有意差あり、図 6B)。一方、IFN- γ + LPS を 24 時間処置した後に L-NAME (300 μ M) を 20 分処置したが、IFN- γ + LPS によるペースメーカー機能抑制は解除されなかった (IFN- γ + LPS frequency : 2.2 ± 1.9 cycle/min, amplitude : 0.012 ± 0.008 , n=4. post-L-NAME + IFN- γ + LPS frequency : 1.8 ± 0.8 cycle/min, amplitude : 0.025 ± 0.015 , n=4. 有意差なし)。以上の結果から、IFN- γ + LPS 処置による ICC ペースメーカー機能障害は、iNOS によって産生された NO を介して発生していることが示唆された。

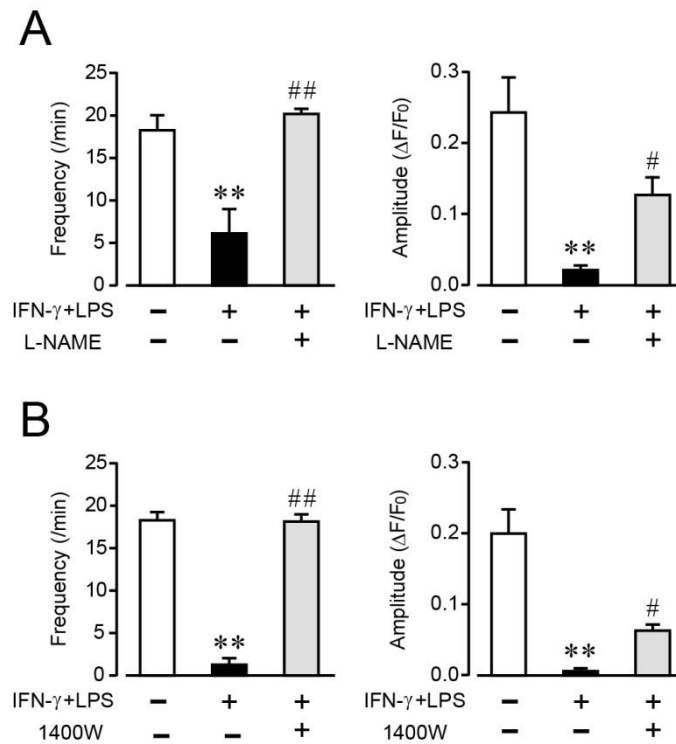


図 6. Th1 型炎症による ICC 機能障害に対する NOS 阻害剤の影響

Cell clusterをIFN- γ + LPS処置 (24時間) した後にCa²⁺イメージングを実施した。L-NAME (300 μ M) および1400W (100 μ M) はIFN- γ + LPS処置の30分前に培養液に添加した。AはL-NAME、Bは1400Wを用いた検討の結果であり、各パネルの左グラフは1分当たりのCa²⁺ oscillationの頻度 (frequency/min) を、右グラフは2分当たりの振幅の平均値 (Amplitude; $\Delta F/F_0$) を定量した結果を示す (n = 7-8)。

各カラムはmean \pm SEMで示す。

** : P <0.01 ; Control群との比較、# : P <0.05、## : P <0.01 ; IFN- γ + LPS群との比較

3-7 Th1 型炎症刺激による iNOS 発現誘導

次に、IFN- γ + LPS 処置後の cell cluster において iNOS が誘導されるか否かを、免疫染色および real-time PCR を用いて検討した。Control 群である無刺激時の cell cluster において免疫染色により iNOS 発現細胞は検出されなかった。一方、IFN- γ + LPS 処置後の cell cluster において、iNOS 発現細胞が多数認められた (図 7A)。タンパク質発現と同様に *Nos2* (iNOS 遺伝子) mRNA 発現量は control 群に比べて IFN- γ + LPS 処置群で約 3000 倍と有意に増加した (図 7B)。

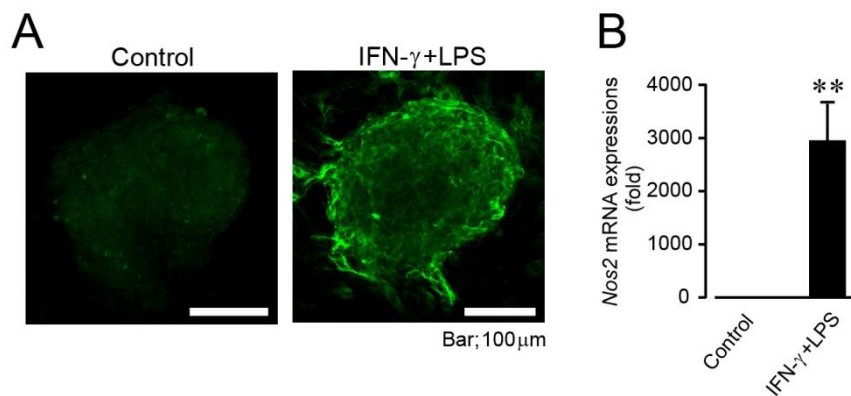


図 7. Th1 型炎症刺激による iNOS 発現

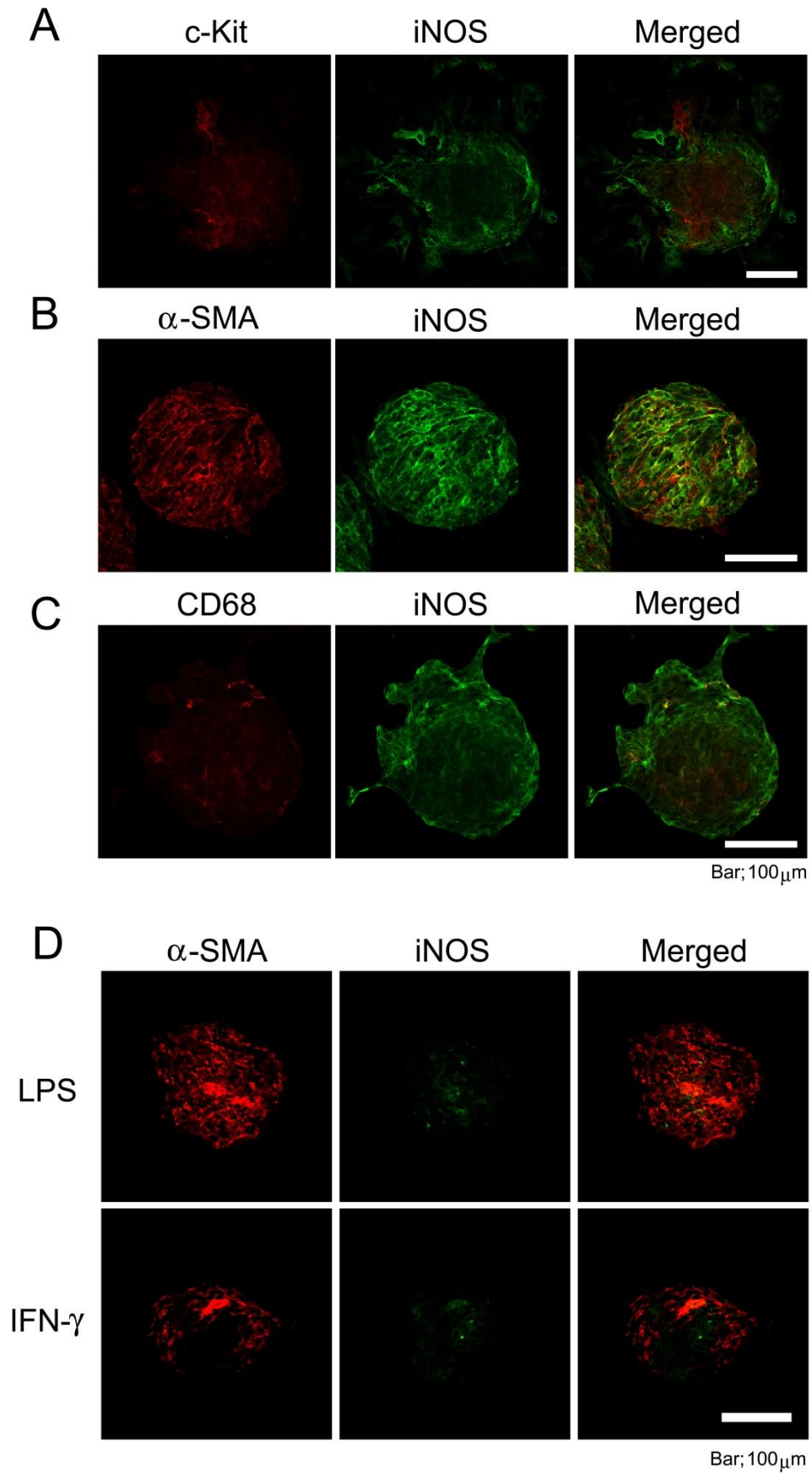
Cell cluster を IFN- γ + LPS 処置 (24 時間) した後に、免疫染色および real-time PCR を実施した。A は cell cluster に対する典型的な iNOS 免疫染色像 (緑色蛍光) を示す (n=4)。B は *Nos2* (iNOS 遺伝子) mRNA 発現量の定量結果である。縦軸は control 群に対する IFN- γ + LPS 処置群の *Nos2* mRNA 発現量比で示した (n = 4)。

カラムは mean \pm SEM を示す。

** : P < 0.01 ; Control 群との比較

3-8 Th1 型炎症刺激による iNOS 発現細胞の同定

さらに IFN- γ + LPS 処置後の cell cluster において、どのような細胞種が iNOS を発現しているか免疫染色を用いて検討した。c-Kit、 α -SMA、CD68 はそれぞれ ICC、平滑筋細胞、マクロファージのバイオマーカーとして用いた。IFN- γ + LPS 処置後の cell cluster において c-Kit 陽性細胞は iNOS を発現していなかった (図 8A)。一方、 α -SMA 陽性細胞および CD68 陽性細胞において iNOS の発現が認められた (図 8B、C)。一方、IFN- γ または LPS の単独処置によっても CD68 陽性細胞における iNOS 発現を認めたが、 α -SMA 陽性細胞での iNOS 発現はほとんど認められなかった (図 8D、E)。以上の結果より、IFN- γ + LPS 処置後の cell cluster において iNOS を発現するのは主に平滑筋とマクロファージであり、ICC ではないことが明らかとなった。



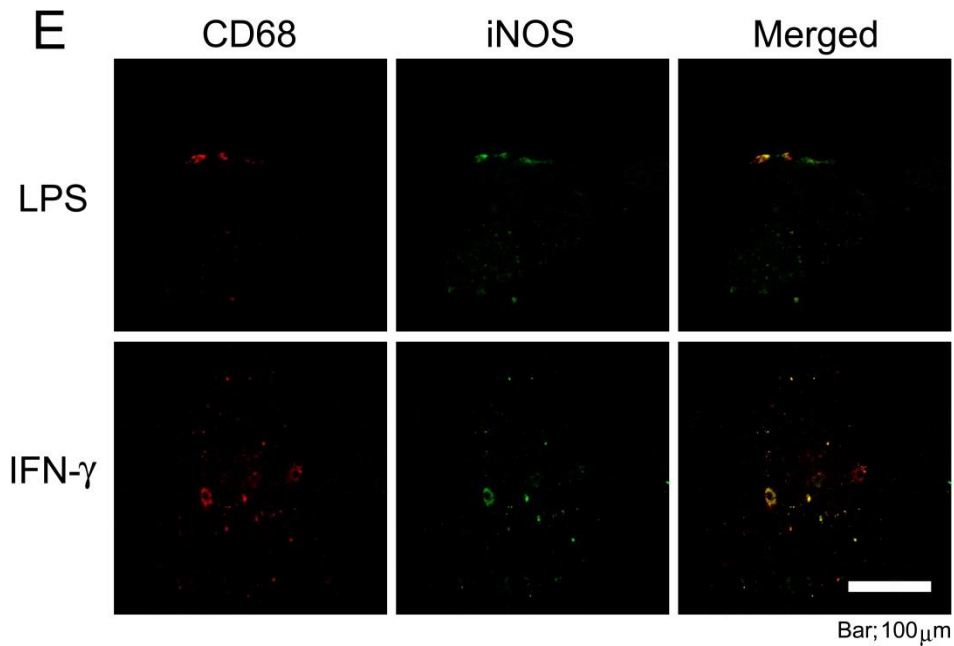


図 8. Th1 型炎症刺激による iNOS 発現細胞の同定

A-C は cell cluster を IFN- γ + LPS 処置 (24 時間) した後に各種細胞マーカーに対する抗体 (A: c-Kit; ICC マーカー、B : α -SMA; 平滑筋マーカー、C : CD68; マクロファージマーカー) および抗 iNOS 抗体を用いて免疫染色した際の典型例を示す (n=4)。D および E は cell cluster を LPS または IFN- γ 単独処置した後に各種細胞マーカーに対する抗体 (D: α -SMA、E: CD68) および抗 iNOS 抗体を用いて免疫染色した際の典型例を示す (n=2)。各パネルの最右図は重ね合わせ図 (黄色) である。

3-9 Th1 型炎症刺激による ICC のペースメーカー機能障害における cGMP/G kinase 経路の関与

これまでの検討において cell cluster において Th1 型炎症刺激による ICC のペースメーカー機能障害には iNOS より産生された NO が関与していることが明らかとなった。そこで次に NO の下流シグナルの解析を行った。まず始めに、NO の下流シグナルとして cGMP/G kinase 経路の関与について検討した。実験には cGMP 合成酵素阻害剤である ODQ (10 μ M) を用い、IFN- γ + LPS 処置の 30 分前に添加した。IFN- γ + LPS によって生じた Ca²⁺ oscillation の頻度ならびに振幅の低下は、ODQ の前処置により抑制傾向がみられたが、有意な差ではなかった (IFN- γ + LPS frequency : 3.7 ± 2.4 cycle/min, amplitude : 0.012 ± 0.008 , n=6. ODQ + IFN- γ + LPS frequency : 11.7 ± 2.4 cycle/min, amplitude : 0.072 ± 0.021 , n=11. 有意差なし、図 9)。以上の結果から、IFN- γ + LPS 処置によって生じた ICC のペースメーカー機能障害には NO/cGMP/G kinase 経路の関与は小さいことが示唆された。

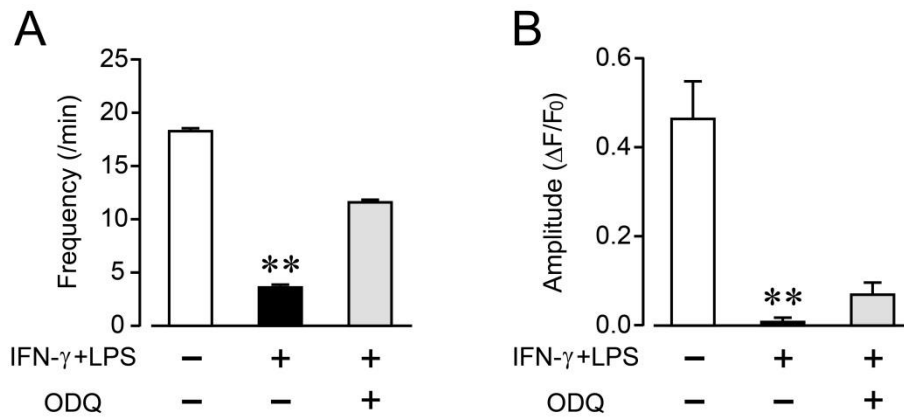


図9. Th1型炎症刺激によるICCのペースメーカー機能障害におけるcGMP/G kinase経路の関与

Cell clusterをIFN-γ+LPS処置(24時間)した後に、Ca²⁺イメージングを実施した。ODQ(10 μM)はIFN-γ+LPS処置の30分前に培養液に添加した。Aは1分当たりのCa²⁺ oscillationの頻度(frequency/min)を、Bは2分当たりの振幅の平均値(Amplitude; ΔF/F₀)を定量した結果を示す(n=6-11)。

カラムはmean ± SEMを示す。

** : P < 0.01 ; Control群との比較

3-10 Th1 型炎症刺激による ICC のペースメーカー機能障害における ATP 感受性カリウムチャンネルの関与

これまでに NO/cGMP シグナルにより、ATP 感受性カリウム (K_{ATP}) チャンネルが開口し ICC ペースメーカー機能が抑制されることが報告されている(43, 44)。そこで、Th1 型炎症刺激により生じる ICC ペースメーカー機能障害において K_{ATP} チャンネルが関与するか検討した。実験には K_{ATP} チャンネル阻害剤の glibenclamide (GBC, 10 μ M) を用い、IFN- γ + LPS 処置の 30 分前に添加した。IFN- γ + LPS によって生じた ICC 機能障害は GBC の前処置によっても抑制されなかった (IFN- γ + LPS frequency : 0.88 ± 0.59 cycle/min, amplitude : 0.006 ± 0.003 , n=4. GBC + IFN- γ + LPS frequency : 0.50 ± 0.29 cycle/min, amplitude : 0.005 ± 0.003 , n=4. 有意差なし、図 10)。以上の結果から、IFN- γ + LPS 処置によって生じる ICC のペースメーカー機能障害には K_{ATP} チャンネルは関与していないことが示された。

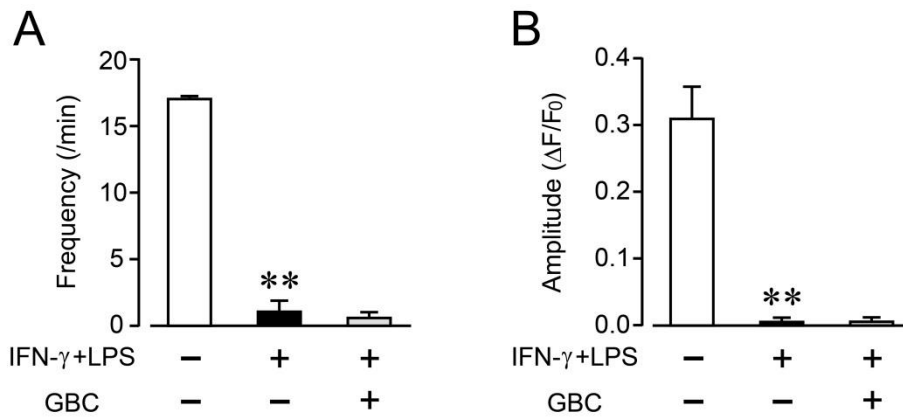


図 10. Th1 型炎症刺激による ICC のペースメーカー機能障害における K_{ATP} チャンネルの関与

Cell cluster を IFN-γ + LPS 処置 (24 時間) した後に、Ca²⁺イメージングを実施した。GBC (10 μM) は IFN-γ + LPS 処置の 30 分前に培養液に添加した。A は 1 分当たりの Ca²⁺ oscillation の頻度 (frequency/min) を、B は 2 分当たりの振幅の平均値 (Amplitude; ΔF/F₀) を定量した結果を示す (n=4)。

カラムは mean ± SEM を示す。

** : P < 0.01 ; Control 群との比較

3-11 Th1 型炎症刺激による ICC のペースメーカー機能障害における S-ニトロシル化の関与

次に NO の下流シグナルとして S-ニトロシル化を検討した。S-ニトロシル化は NO がタンパク質のチオール基を修飾する反応であり、修飾されたタンパク質の機能が変化することで細胞機能を調整する。そこで S-ニトロシル化の関与を検討するために NO を発生させることなく、S-ニトロシル化のみを起こすことができる新規 NO ドナーである NNO-ABBH1 (33, 34)を用いて検討した。NNO-ABBH1 を様々な濃度 (30、50、100 μM) で cell cluster に処置し、24 時間後に Ca^{2+} イメージングを実施した。その結果、NNO-ABBH1 はいずれの濃度においても ICC ペースメーカー機能に影響をおよぼさなかった (図 11)。以上の結果から、Th1 型炎症によって生じる ICC のペースメーカー機能障害には S-ニトロシル化は関与していないことが示された。

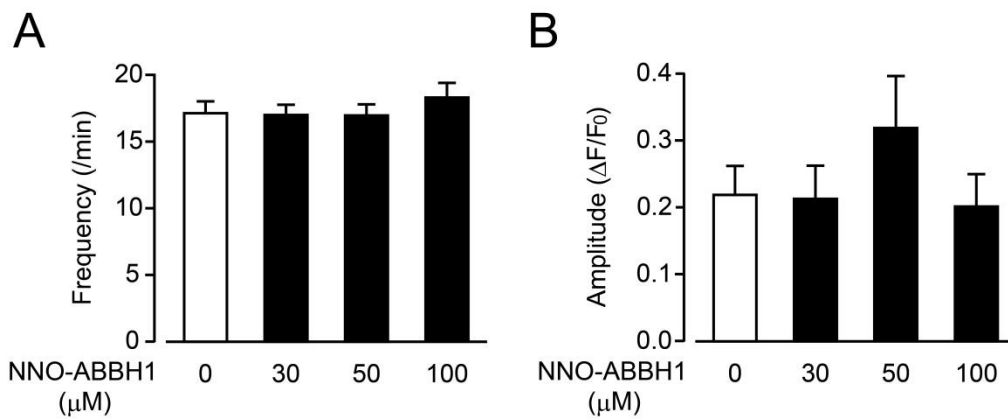


図 11. Th1 型炎症刺激による ICC のペースメーカー機能障害における S-ニトロシル化の関与

Cell cluster に NNO-ABBH1 を様々な濃度 (30、50、100 μM) で 24 時間処置した後に、Ca²⁺ イメージングを実施した。A は 1 分当たりの Ca²⁺ oscillation の頻度 (frequency/min) を、B は 2 分当たりの振幅の平均値 (Amplitude; ΔF/F₀) を定量した結果を示す (n=5)。

カラムは mean ± SEM を示す。

3-12 Th1 型炎症刺激による ICC のペースメーカー機能障害における酸化ストレスの関与

NO は不対電子を有しており、自身が酸化能を持つことに加え、superoxide と反応することでより強力な酸化能を持つ peroxynitrite となることが知られている(45)。そこで Th1 型炎症刺激により生じる ICC のペースメーカー機能障害に酸化ストレスが関与しているか検討した。実験には NADPH oxidase 4 (NOX4) の阻害剤である apocynin (300 μ M) を用い、IFN- γ + LPS 処置の 30 分前に添加した。Apocynin は superoxide の産生を抑制することで peroxynitrite の生成を阻止することができる。IFN- γ + LPS によって生じた ICC 機能障害は apocynin の前処置によって有意に抑制された (IFN- γ + LPS frequency : 0.75 ± 0.48 cycle/min, amplitude : 0.005 ± 0.003 , n=4. apocynin + IFN- γ + LPS frequency : 16.2 ± 0.8 cycle/min, amplitude : 0.137 ± 0.021 , n=6. 有意差あり、図 12)。以上の結果から、IFN- γ + LPS 処置によって生じた ICC 機能障害には酸化ストレスが大きく関与していることが示された。

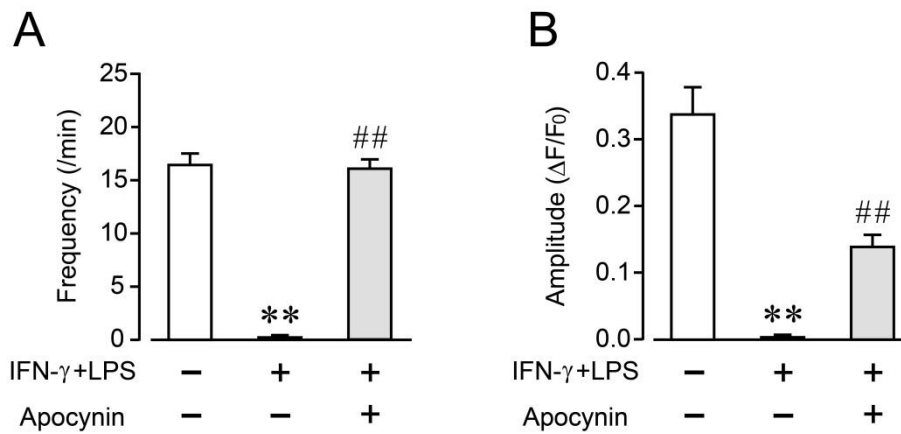


図 12. Th1 型炎症刺激による ICC のペースメーカー機能障害における酸化ストレスの関与
Cell cluster に IFN- γ + LPS を 24 時間処置した後に、Ca²⁺イメージングを実施した。Apocynin
(300 μ M) は IFN- γ + LPS 処置の 30 分前に培養液に添加した。A は 1 分当たりの Ca²⁺
oscillation の頻度 (frequency/min) を、B は 2 分当たりの振幅の平均値 (Amplitude; $\Delta F/F_0$)
を定量した結果を示す (n=4-6)。

カラムは mean \pm SEM を示す。

** : P < 0.01 ; Control 群との比較、## : P < 0.01 ; IFN- γ + LPS 群との比較

3-13 c-Kit 陽性 ICC ネットワークに対する Th1 型炎症刺激の影響

Th1 型炎症刺激により c-Kit 陽性 ICC ネットワークが障害されるか検討するため、IFN- γ + LPS を 24 時間処置した cell cluster に対して抗 c-Kit 抗体による免疫染色を実施した。Control 群においてがネットワーク構造を示す c-Kit 陽性 ICC を含む cell cluster (normal cell cluster、図 13A 左図) が最も多く認められたのに対し、IFN- γ + LPS 群では c-Kit 陽性細胞を欠く cell cluster (cell cluster lacking c-Kit⁺ cells、図 13A 右図) が多く認められた。ディッシュ中の cell cluster 総数に対する c-Kit 陽性細胞を欠く cell cluster 数の割合を算出すると、その割合は control 群で 10% 前後であったのに対し、IFN- γ + LPS 処置群では約 50% に増加した (図 13B)。一方、NO 産生を阻止するために L-NAME (300 μ M) を IFN- γ + LPS の 30 分前に前処置しておくことで c-Kit 陽性細胞を欠く cell cluster は 20% 程度まで減少した (図 13B)。以上の結果から、Th1 型炎症刺激によって c-Kit 陽性 ICC ネットワークが障害されることが明らかとなった。さらに、この c-Kit 陽性 ICC ネットワークの障害は NO を介して引き起こされていることが示唆された。

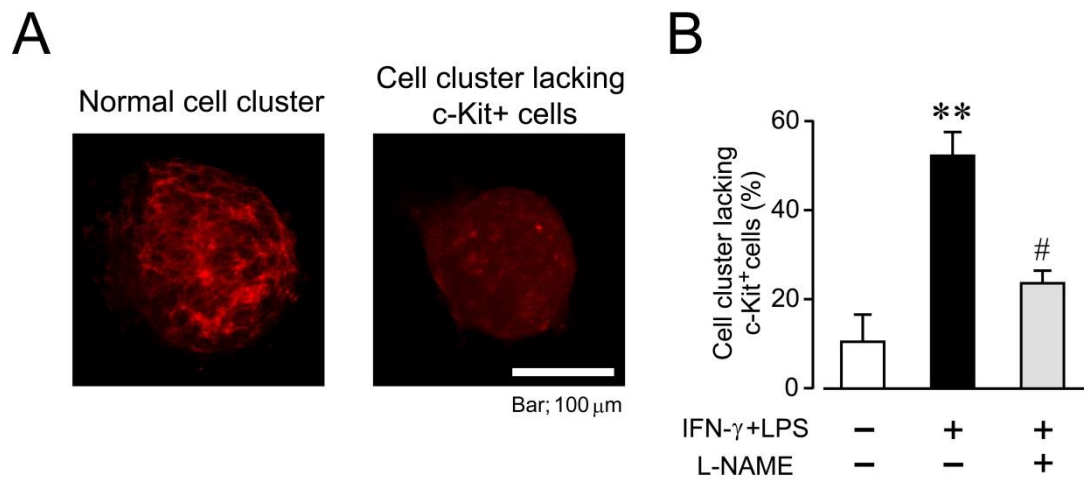


図 13. ICC の c-Kit 発現に対する Th1 型炎症刺激の影響

Cell cluster に IFN- γ + LPS を 24 時間処置した後に、免疫染色を実施した。A の右図は c-Kit 陽性 ICC を含む cell cluster (normal cell cluster)、左図は c-Kit 陽性 ICC を欠いた cell cluster (cell cluster lacking c-Kit⁺ cells) の典型的な免疫染色像 (赤色蛍光) を示す。B はディッシュ中の cell cluster 総数に対する c-Kit 陽性細胞を欠く cell cluster (cell cluster lacking c-Kit⁺ cells) 数の割合を定量した結果を示す (n=4-9)。

カラムは mean \pm SEM を示す。

** : P < 0.01 ; Control 群との比較、# : P < 0.05 ; IFN- γ + LPS 群との比較

3-14 ICC バイオマーカー mRNA 発現に対する Th1 型炎症刺激の影響

同様に ICC バイオマーカーの mRNA 発現に対する Th1 型炎症の影響について検討した。Cell cluster に対し IFN- γ + LPS を 24 時間処置した後に、real-time PCR により *Kit* (c-Kit 遺伝子) と *Ano1* (ANO1 遺伝子) の mRNA 発現量を調べた。Control 群に比べ、IFN- γ + LPS 処置群において *Kit* および *Ano1* mRNA 発現が有意に減少していることが明らかとなった (図 14A、B)。

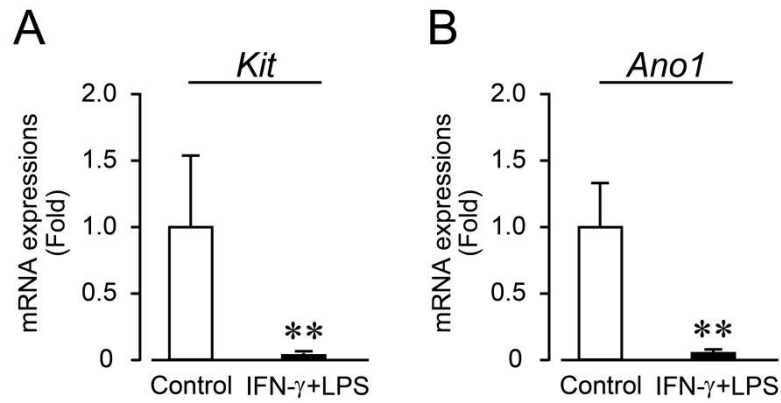


図 14. ICC のバイオマーカー mRNA 発現に対する Th1 型炎症刺激の影響

Cell cluster に IFN- γ + LPS を 24 時間処置した後に、real-time PCR を実施した。A は *Kit* (c-Kit 遺伝子)、B は *Ano1* (ANO1 遺伝子) mRNA 発現量の定量結果である。縦軸は control 群に対する IFN- γ + LPS 処置群の各 mRNA 発現量比で示した (n = 5)。

カラムは mean \pm SEM を示す。

** : P < 0.01 ; Control 群との比較

3-15 ICC 微細構造に対する Th1 型炎症刺激の影響

最後に ICC の微細構造に対する Th1 型炎症の影響を検討するために cell cluster に IFN- γ + LPS を 24 時間処置した後に、電子顕微鏡解析を実施した。ICC は電子顕微鏡下でミトコンドリアが豊富な細胞質、細胞膜上のカベオラ、平滑筋とのギャップ結合形成といった特徴が認められる。Control 群において、このような特徴的な微細構造を持つ ICC が観察された (図 15A)。さらに IFN- γ + LPS 処置群においても、このような正常な構造を示す ICC が多く観察された (図 15A、B)。以上の検討より、Th1 型炎症は ICC 自身の微細構造に影響を与えないことが示された。

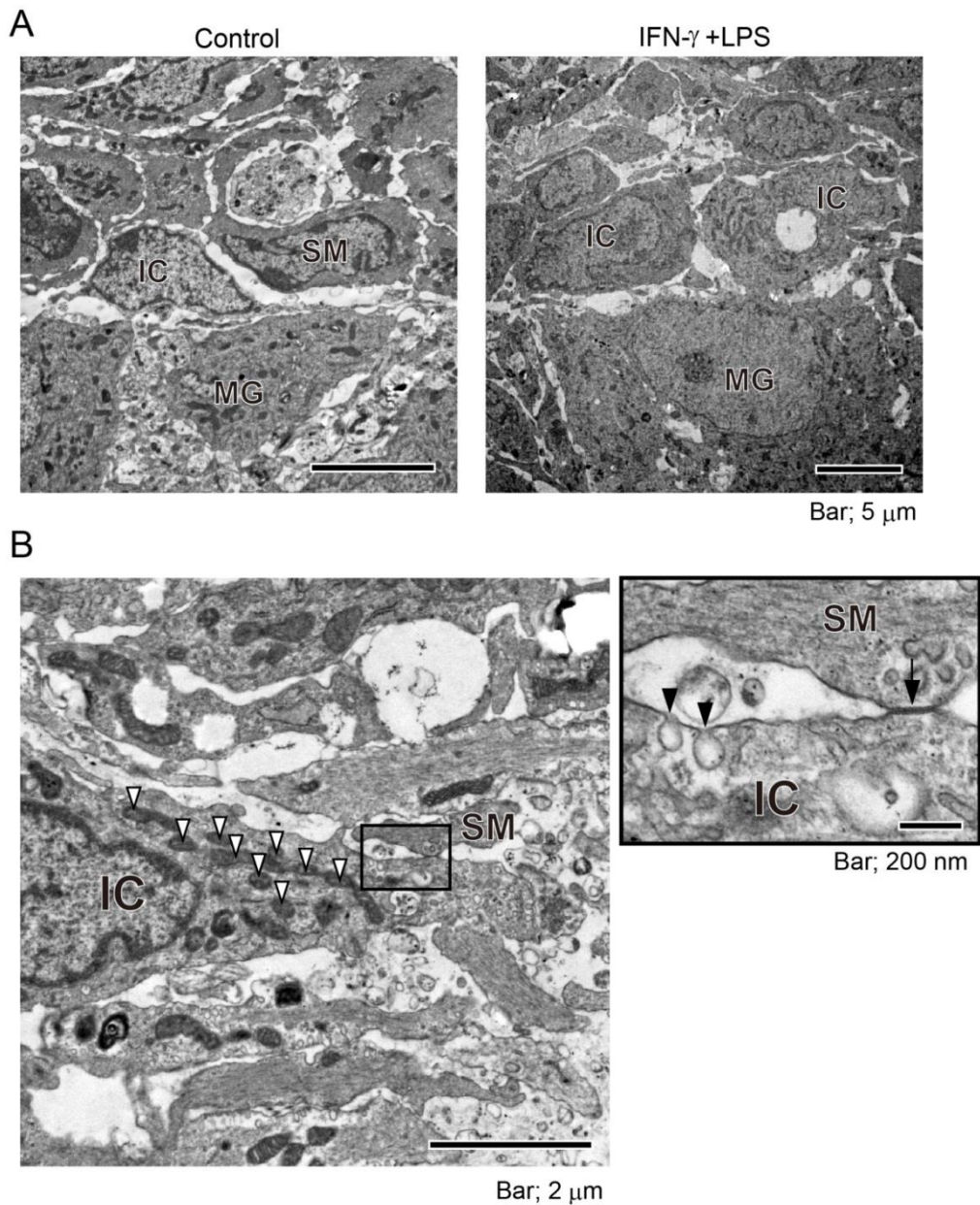


図 15. ICC の微細構造に対する Th1 型炎症刺激の影響

Cell cluster に IFN- γ + LPS を 24 時間処置した後に、電子顕微鏡解析を実施した。A はそれぞれの群の典型的な cluster の電子顕微鏡像であり、B は IFN- γ + LPS 処置群の cluster 内にみられた ICC を拡大したものである。B の右のパネルは左の四角で囲った部分をさらに強拡大したものである。白矢頭は細胞質内の豊富なミトコンドリア、黒矢頭は細胞膜上のカベオラ、黒矢印は平滑筋とのギャップ結合を示している。

IC; ICC、SM; 平滑筋、MG; 筋層間神経叢

3-16 考察

本章では、回腸筋層由来 cell cluster を用いて薬理的に Th1 型炎症刺激を加え、その時の ICC のペースメーカー機能異常の分子機構を解析した。その結果、Th1 型炎症刺激による ICC のペースメーカー機能障害が NO 由来酸化ストレスを介して生じることが明らかとなった。

Cell cluster の作製、および ICC のペースメーカー機能評価系としての有用性は、鳥橋と中山らによって初めて報告された(36, 37)。この報告のなかで cell cluster は以下のような特性を持つことが示されている：①実際の消化管筋層が示す頻度と同程度の自発性収縮を示す、②ICC 由来 Ca^{2+} oscillations が観察される、③ Ca^{2+} oscillation には温度感受性がある、④ Ca^{2+} oscillation はテトロドトキシンやジヒドロピリジン系カルシウム拮抗薬に対して抵抗性を示す。これらの特性は cell cluster に含まれる ICC が生体内での特性をそのまま変わらず保持していることを示している。また、本研究では免疫組織学的解析により cell cluster は平滑筋細胞や ICC だけでなく、消化管運動の制御に関与する神経細胞や $PDGFR\alpha^+$ MF、消化管筋層部の免疫に関与する常在性マクロファージといった細胞群を含むことを明らかにした (図 1)。これは cell cluster が消化管筋層における微小環境を高度に保持していることを示唆している。近年、消化管運動は消化管運動系を構成する細胞群だけでなく、マクロファージが神経とのクロストークを介して消化管運動を制御していることも明らかとなっている(46)。消化管運動は様々な細胞のコミュニケーションにより調節されており、cell cluster がこのような微小環境を保持していることは、実験により得られた結果を *in vivo* へ外挿する上で非常に重要であると考えられた。

以前より *in vivo* において、Th1 型炎症が ICC 機能およびネットワークを障害することが報告されている(21, 47)。本研究において、 $IFN-\gamma$ と LPS を cell cluster に同時処置することで Th1 型炎症が誘導され ICC 機能障害が引き起こされることを明らかにした (図 3, 4)。この結果から cell cluster への $IFN-\gamma$ + LPS 処置が、消化管筋層における Th1 型炎症の *in vitro* モデルとして有効であると考えられた。

Zuo らは筋層より単離培養した ICC への高濃度 LPS (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 処置が ICC の iNOS 発現を誘導し、ペースメーカー機能を可逆的に抑制することを報告している(43)。しかしながら、本研究で用いた病態生理学的レベルの LPS 濃度 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) では ICC 機能に影響を与えなかった (図 3)。これらの結果から LPS 処置が高濃度であれば iNOS を誘導し ICC 機能を障害し得るが、基本的に ICC は LPS に対して感受性が低いと考えられた。これは、ICC の toll-like 受容体発現レベルが低いことを示唆する。一方で、*in vivo* 実験系においても LPS が ICC の機能的、形態学的障害を引き起こすことがいくつか報告されている。例えば、マウスへの LPS 腹腔内投与は c-Kit 陽性 ICC 数を減少させ、その ICC 障害には TNF- α が大きく関与していることが報告されている(48)。また所属研究室においてもヒルシュスプルング病モデルラットにおいて血漿中 LPS 濃度の増加に伴い c-Kit 陽性 ICC 数が減少することを報告している(49)。このように LPS によって誘導される Th1 型炎症において、ICC 障害が報告されているが、*in vivo* 実験系においては炎症反応性に複数のサイトカインが産生されるため、LPS がどのような因子を介して ICC 機能を障害しているか特定することは困難である。Cell cluster 実験系を用いた本研究において、IFN- γ + LPS 処置により Th1 型炎症が誘導され、ICC のペースメーカー機能障害が引き起こされた一方で、個々の Th1 サイトカインは ICC の機能に大きな影響を与えなかった (図 5)。これらの結果から、ICC 自身は Th1 サイトカインに対して感受性が低いことが示唆され、IFN- γ + LPS 処置によって生じた ICC の機能障害は、少なくとも LPS または個々の Th1 サイトカインの ICC に対する直接的な作用によるものではない可能性が示唆された。今後、IL-12 や IL-23 といった他の Th1 サイトカインについても同様に検討する必要がある。

本研究において、IFN- γ + LPS 処置はマクロファージだけでなく平滑筋細胞においても iNOS の発現を誘導した (図 8B、C)。一方で、IFN- γ または LPS の単独処置は平滑筋において iNOS の発現を誘導しなかった (図 8D)。以前の研究において、ラットおよびマウスより単離した消化管平滑筋層標本への LPS 処置は、マクロファージの iNOS 発現を上昇さ

せるが、平滑筋細胞の iNOS 発現には影響を与えないことを報告しており(50, 51)、今回の結果と合致する。一方、ヒトの培養平滑筋細胞はサイトカイン曝露によってサイトカインやケモカイン、成長因子といった炎症性メディエーターを産生し、免疫担当細胞のように働くことが報告されている(51)。このことから IFN- γ と LPS という複合シグナルが消化管平滑筋細胞における iNOS 発現の誘導因子であることが示唆された。

ICC のペースメーカー機能は、NO/cGMP シグナル経路によって抑制的に制御されており、近年では ICC が神経由来 NO の標的であることが明らかとなっている(52, 53)。また、神経型 NOS の欠損マウスでは、ICC ネットワークの発達不良が報告されている(54)。これらの報告は正常な ICC のペースメーカー機能制御や分化、発達には NO が重要であることを示唆している。一方、本研究において、炎症下で iNOS より産生された多量の NO が ICC 機能および c-Kit 陽性 ICC ネットワークを障害することを明らかにした(図 6-8、13)。これまでに、iNOS 由来の NO が cGMP シグナル経路を介して K_{ATP} チャネルを活性化、ICC 機能障害を引き起こすことが報告されているが(43, 44)、本研究においては NO による ICC 障害が K_{ATP} チャネルの活性化を介さないことが K_{ATP} チャネル阻害剤 (GBC) を用いた検討により明らかとなった(図 10)。一方、本研究において、NO による ICC の機能障害には酸化ストレスが大きく関与していることが示唆された(図 12)。NO は不対電子を持つ活性酸素種 (reactive oxygen species; ROS) であるが、同じく ROS である superoxide と反応することで、より強力な酸化能を持つ peroxynitrite を生成する(45)。このような酸化物質は細胞膜を構成するタンパク質や脂質、さらには DNA を障害することで細胞機能や形態を障害する。ICC は ROS の主な発生源であるミトコンドリアを細胞質内に豊富に持っているため、特に ROS の影響を受けやすい細胞であると考えられる。実際に、ICC は消化管筋層を構成する細胞群のなかでも superoxide の産生酵素である NOX4 の発現が高いことが報告されている(55)。生理的状态において、ミトコンドリアから発生した ROS は superoxide dismutase や catalase、glutathione peroxidase によって消去されるため、神経由来 NO が peroxynitrite となることはな

い。一方、炎症病態時には ICC 内での ROS の産生が増加するため、ROS の消去が間に合わなくなり、superoxide が平滑筋やマクロファージの発現する iNOS より産生された NO と反応することで peroxynitrite となり、ICC を障害する可能性が考えられる。実際に、糖尿病においてみられる ICC 障害には酸化ストレスが関与していることが報告されている(56)。以上のことから、NO の ICC に対する作用は、NO への曝露量および ICC 自身の ROS 産生量に依存しており、神経由来 NO のように少量の場合は ICC に対し生理機能や分化誘導の面で有益に働くが、炎症時には iNOS 由来の多量の NO と ROS 産生増加により ICC が障害されることが示唆された。

S-ニトロシル化は様々な細胞内シグナリングの制御に関与しており、NO による ICC 機能障害の可能性として、S-ニトロシル化も考えられた。例えば、血管において内皮細胞と平滑筋細胞の細胞間コミュニケーションは connexin 43 の S-ニトロシル化によって制御されていることが報告されている(57)。この connexin 43 はギャップ結合構成タンパクの一種であり、ICC と平滑筋細胞間のギャップ結合にも使われている(58)。他にも、TNBS 誘発性腸炎モデルにおいて、S-ニトロシル化は消化管平滑筋の収縮機構抑制に関与していることも報告されている(59)。しかしながら本研究において、S-ニトロシル化剤である NNO-ABBH1 の処置は ICC 機能には影響をおよぼさなかったことから、NO による ICC 機能障害には S-ニトロシル化が関与していないことが示唆された (図 11)。

IFN- γ + LPS 処置は ICC 機能だけでなく、cell cluster における c-Kit タンパク質および *Kit* mRNA の発現を減少させた (図 13、14)。これまでに、c-Kit シグナルを中和抗体や遺伝学的手法を用いて欠損したマウスでは、ICC が平滑筋様のフェノタイプに変化することが報告されている(11)。また、消化管切除術後や慢性腸閉塞、TNBS 誘発性腸炎において c-Kit 発現を持たない ICC 様細胞の存在が示唆されている(47, 60, 61)。さらに IFN- γ + LPS 処置は *Ano1* mRNA も同様に減少させた (図 14)。薬理的解析や遺伝的ノックアウトにより、ANO1 は ICC が slow wave を生み出すために必須のチャネルであることが分かっており(62)、Th1

型炎症による ICC 機能障害の発生には、この ANO1 発現の減少が大きく関わっている可能性も考えられる。本研究において、IFN- γ + LPS が c-Kit や ANO1 発現を減少させた一方で、ICC の微細構造には影響しないことが明らかとなった (図 15)。この結果は炎症応答性に ICC の形質が変化したことを示唆する。すなわち、Th1 型炎症刺激により ICC はペースメーカー機能や c-Kit および ANO1 の発現を欠いた細胞に変化したと考えられる。ICC のペースメーカー機能障害は c-Kit や ANO1 だけでなく、T-type voltage dependent Ca²⁺チャネルなどのペースメーカー機能の発揮と維持に必要ないくつかのタンパク質の発現低下に由来している可能性も考えられた。今後、Th1 型炎症刺激による ICC の形質変化の有無やその分子機構の解明には更なる検証が必要である。

以上を要するに、本章において、Th1 型炎症にみられる ICC の機能障害は NO 由来酸化ストレスに起因していることが明らかになった。これらの結果は抗酸化剤や iNOS 阻害剤が消化管の Th1 型炎症における ICC 機能障害を抑制できる可能性を示すものである。

【第4章 マウス POI モデルにおける ICC の病態発現解析とその分子機構】

POI における ICC の病態発現を解析するため、本章ではマウス POI モデルを作製し、ICC の細胞生物学的解析および機能解析を実施した。また、前章で得られた結果をもとに、POI における ICC の病態発現の分子機構を検討した。

4-1 回腸筋層における炎症細胞浸潤

まず始めに、マウス POI モデルの回腸筋層における炎症応答について検討した。IM 24 時間および 48 時間後の回腸筋層より whole-mount 標本を作製し、化学染色および免疫染色により MPO 陽性好中球および CD68 陽性マクロファージ数を調べた。Control 群において MPO 陽性好中球は観察されず (図 16A)、CD68 陽性の常在性マクロファージのみが観察された (図 16B)。一方、IM 24 時間後の回腸筋層においては多数の MPO 陽性好中球および CD68 陽性マクロファージの浸潤を認め、その細胞数は control 群に比べて有意に増加していた (Control : MPO positive cells; 0.0 ± 0.0 cells/mm², CD68 positive cells 326.0 ± 35.0 cells/mm², n=7. IM 24 h : MPO positive cells; 783.5 ± 128.0 cells/mm², CD68 positive cells 3705.7 ± 1041.8 cells/mm², n=7. 有意差あり、図 16C、D)。一方、IM 48 時間後の回腸筋層においても MPO 陽性好中球が認められたが、その数は IM 24 時間後に比べて有意に減少していた (IM 48 h : MPO positive cells; 353.5 ± 49.7 cells/mm², n=4. IM 24 h と有意差あり)。CD68 陽性マクロファージも同様に減少傾向を示したが有意な差ではなかった (IM 48 h : CD68 positive cells 1245.6 ± 136.4 cells/mm², n=4. IM 24 h と有意差なし)。以上の結果より、POI モデルの回腸筋層部において、IM 24 時間後には好中球とマクロファージを主体とした顕著な炎症細胞の浸潤が認められ、その白血球浸潤は IM 48 時間後には減少することが示された。

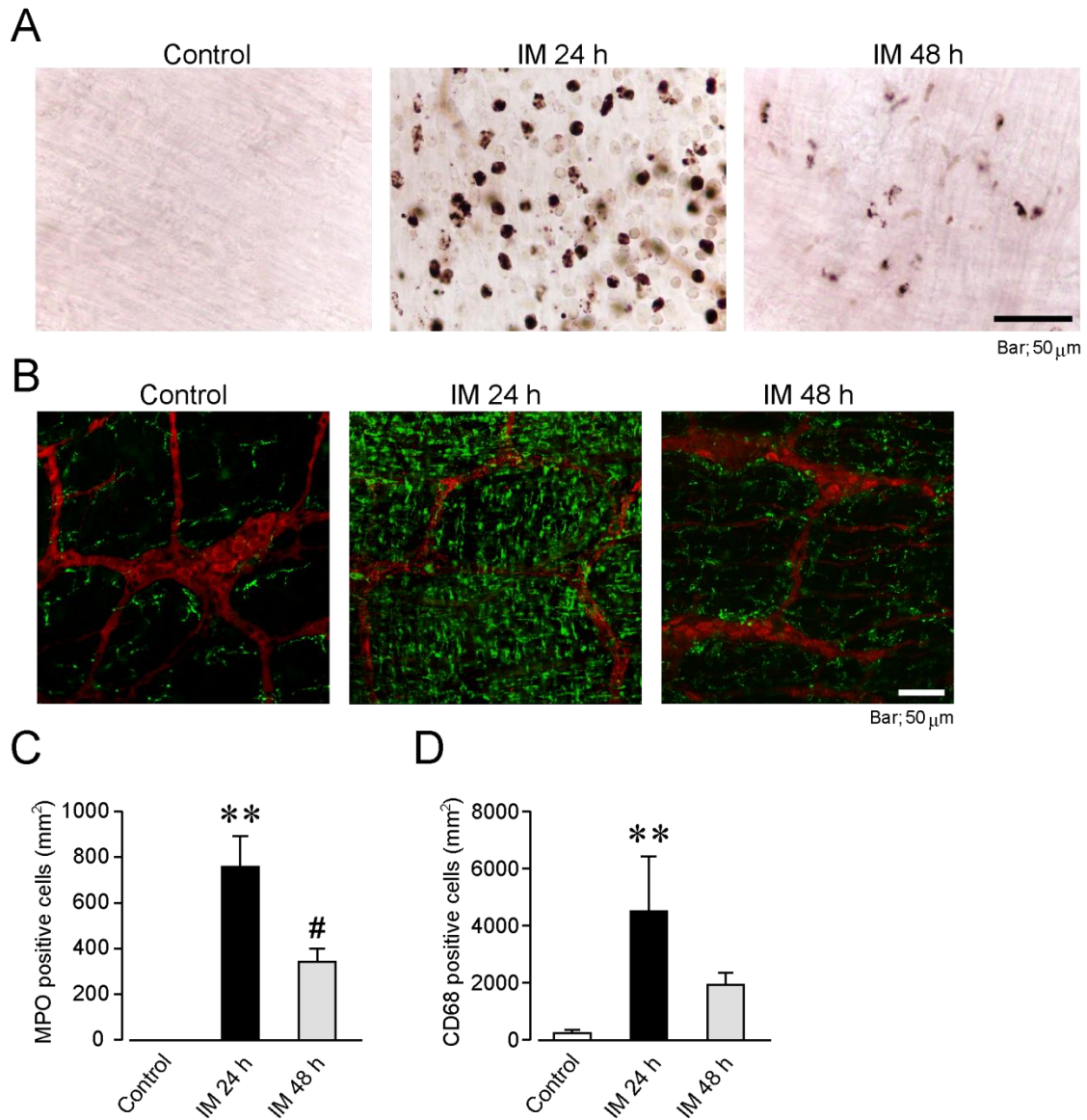


図 16. IM による回腸筋層における炎症細胞浸潤

IM 24 時間 (IM 24 h) および 48 時間後 (IM 48 h) の回腸筋層から whole-mount 標本を作製し、化学染色および免疫染色を実施した。A は MPO (好中球マーカー) 染色像、B は CD68 (緑色蛍光: マクロファージマーカー) 免疫染色像の典型例を示す。PGP9.5 (赤色蛍光) は神経マーカーとして用い、神経層周囲に浸潤したマクロファージを観察した。C、D は好中球とマクロファージ数の定量結果を示す。縦軸は任意に選んだ 5 視野から画像を取得した後、細胞数を測定し、その平均値を 1 mm^2 あたりの細胞数に換算して示した (n=4-7)。

各カラムは mean \pm SEM を示す。

** : P < 0.01 ; Control 群との比較、# : P < 0.01 ; IM 24 h 群との比較

4-2 回腸筋層における Th1 サイトカイン mRNA 発現

IM 3 時間後の回腸筋層より mRNA を抽出し、Th1 サイトカイン mRNA 発現の変動を real-time PCR を用いて検討をした。Control 群に比べて IM 3 時間後の回腸筋層において *Il1b* (IL-1 β 遺伝子)、*Tnf* (TNF- α 遺伝子)、*Il6* (IL-6 遺伝子) および *Ifng* (IFN- γ 遺伝子) mRNA 発現量がそれぞれ 99 倍、12 倍、266 倍、3.8 倍と有意に増加した (図 17A-D)。以上の結果より、IM により Th1 サイトカインの発現が増加することが示唆され、IM が回腸筋層における Th1 型炎症を引き起こすことが明らかとなった。

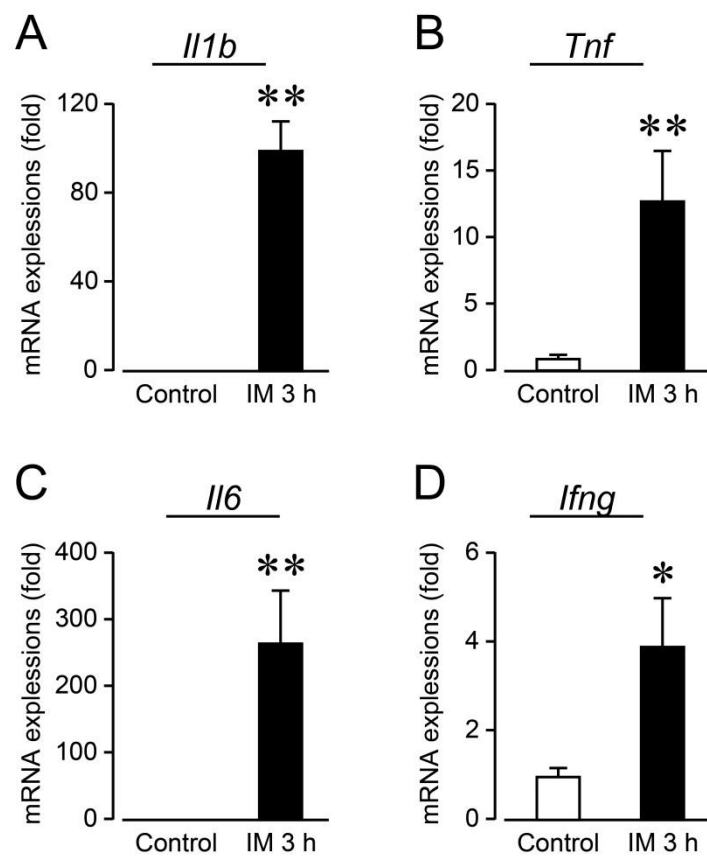


図 17. IM 3 時間後の回腸筋層におけるサイトカイン mRNA 発現

IM 3 時間後 (IM 3 h) の回腸筋層における各種 Th1 サイトカインの発現を real-time PCR を用いて測定した。A-D は mRNA 発現量の定量結果である。縦軸は control 群に対する IM 3 h 群の発現量比で示した (n = 4)。

各カラムは mean ± SEM を示す。

* : P < 0.05, ** : P < 0.01 ; Control 群との比較

4-3 回腸筋層の c-Kit 陽性 ICC ネットワークに対する IM の影響

次に c-Kit 陽性 ICC ネットワークに対する IM の影響を検討するため、IM 24 時間後の回腸筋層から作製した whole-mount 標本を用いて c-Kit 免疫染色を実施した。Control 群において、c-Kit 陽性 ICC によって構成される網目状のネットワーク構造が確認された (図 18A 左図)。一方、IM 24 時間後の回腸筋層では c-Kit 陽性 ICC によるネットワーク構造の減少が認められた (図 18A 右図)。c-Kit 陽性 ICC ネットワークの全体に占める面積の割合を定量すると control 群に比べて IM 24 時間後の回腸筋層で有意にその面積比が減少していた (Control : $58.0 \pm 3.3\%$, n=4. IM 24 h : $20.0 \pm 5.3\%$, n=4. 有意差あり、図 18B)。以上の結果より、IM により c-Kit 陽性 ICC ネットワーク構造が障害されることが明らかとなった。

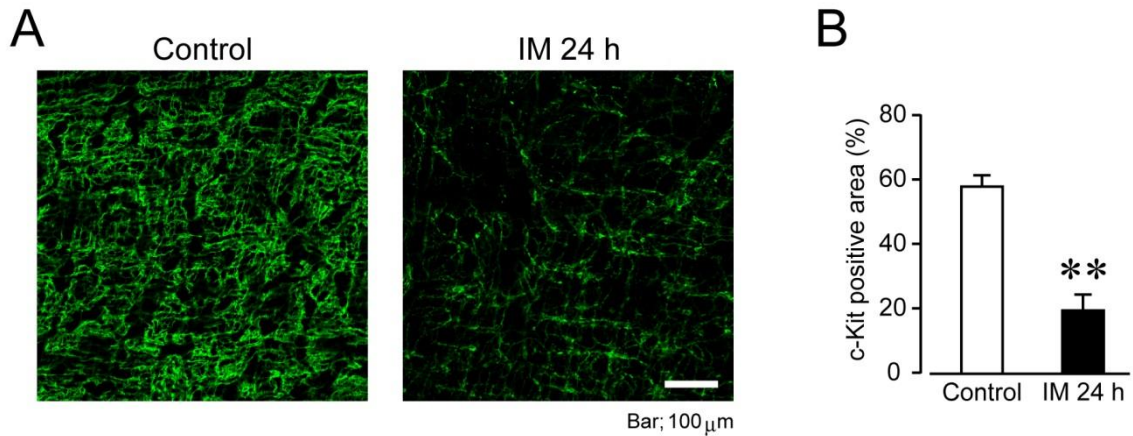


図 18. IM 24 時間後の回腸筋層における c-Kit 陽性 ICC ネットワーク

IM 24 時間後 (IM 24 h) の回腸筋層から whole-mount 標本を作製し、免疫染色を実施した。

A は典型的な c-Kit (緑色蛍光 : ICC マーカー) 免疫染色像を示す。B は c-Kit 陽性 ICC ネットワークの全体に占める面積の割合を定量した結果である (n=4)。縦軸は c-Kit 陽性ネットワーク面積比であり、任意に選んだ 4 視野から取得した画像を二値化処理することにより定量し、その平均値を算出した。

各カラムは mean ± SEM を示す。

** : P < 0.01 ; Control 群との比較

4-4 回腸筋層の ICC バイオマーカー発現に対する IM の影響

回腸筋層の ICC バイオマーカー発現に対する IM の影響を検討するため、IM 24 時間後の回腸筋層より mRNA を抽出し、real-time PCR を実施した。IM 24 時間後の回腸筋層において *Kit* (c-Kit 遺伝子) および *Ano1* (ANO1 遺伝子) mRNA 発現が control 群に比べて有意に減少した (図 19A、B)。以上の結果より、IM により回腸筋層における ICC 特異的な機能分子が減少していることが明らかとなった。

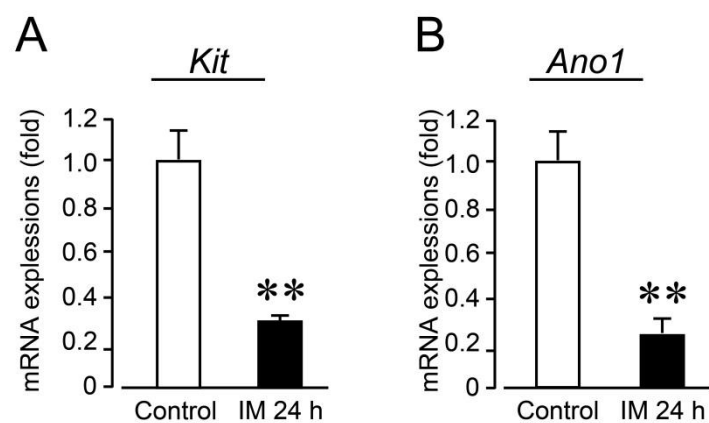


図 19. IM 24 時間後の回腸筋層における ICC バイオマーカーの mRNA 発現

IM 24 時間後 (IM 24 h) の回腸筋層における ICC バイオマーカーの mRNA 発現を real-time PCR を用いて測定した。A は *Kit* (c-Kit 遺伝子)、B は *Ano1* (ANO1 遺伝子) mRNA 発現量の定量結果である。縦軸は control 群に対する IM 24 h 群の mRNA 発現量比で示した (n = 4)。各カラムは mean ± SEM を示す。

** : P < 0.01 ; Control 群との比較

4-5 回腸筋層の ICC 微細構造に対する IM の影響

回腸筋層の ICC 微細構造に対する IM の影響を検討するため、IM 24 時間後の回腸筋層より作製した超薄切片を用いて電子顕微鏡解析を実施した。Control 群においてミトコンドリアを豊富に含む細胞質や細胞膜上のカベオラ、平滑筋とのギャップ結合といった典型的な特徴を備えた ICC (ICC-MY) が認められた (図 20 左図)。IM 24 時間後の回腸筋層においても同様に、このような特徴を示す ICC が認められたが、細胞質内に異常な空胞 (図 20 右図、矢頭) を持つものが多数存在していた。以上の結果より、IM により ICC 特異的な微細構造は保たれているが、細胞質内に異常な空胞が形成される病理変化が認められることが明らかとなった。

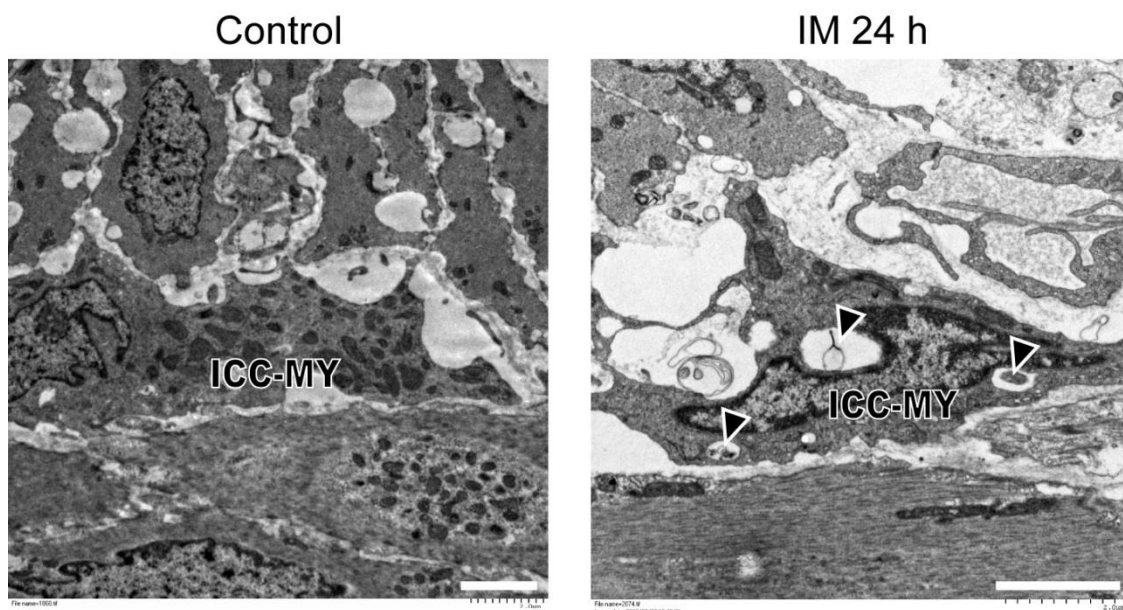


図 20. IM 24 時間後の回腸筋層における ICC 微細構造

IM 24 時間後 (IM 24 h) の回腸筋層から超薄切片を作製し、電子顕微鏡解析を実施した。写真は典型的な ICC の電子顕微鏡像を示す (n=4)。ICC はミトコンドリアを豊富に含む細胞質、細胞膜上のカベオラ構造、平滑筋とのギャップ結合形成といった特異的構造を持つ。矢頭は細胞質内に形成された異常な空胞を示す。

4-6 回腸筋層の ICC ペースメーカー機能に対する IM の影響

これまでの検討から、IM により ICC の形態学的な異常が生じることが明らかとなった。そこで次に ICC のペースメーカー機能に対する IM の影響を検討した。ICC のペースメーカー機能評価は微小電極アレイシステムによる細胞外膜電位の測定により行った。測定は 1 μ M nifedipine 存在下で行うことで平滑筋由来の電気的な活動を除いた。Control 群において自発的、律動的な slow wave が認められた (図 21A)。また、隣接するチャンネルから得られた slow wave のピークは若干の遅延を伴って同期しており、slow wave の伝搬が認められた (図 21B)。一方、IM 24 時間後の回腸筋層において slow wave の消失が認められた (図 21A)。さらに、不整な slow wave の発生および伝搬の途絶が認められた。以上の結果より、IM 24 時間後の回腸筋層部において ICC のペースメーカー機能が障害されることが明らかとなった。

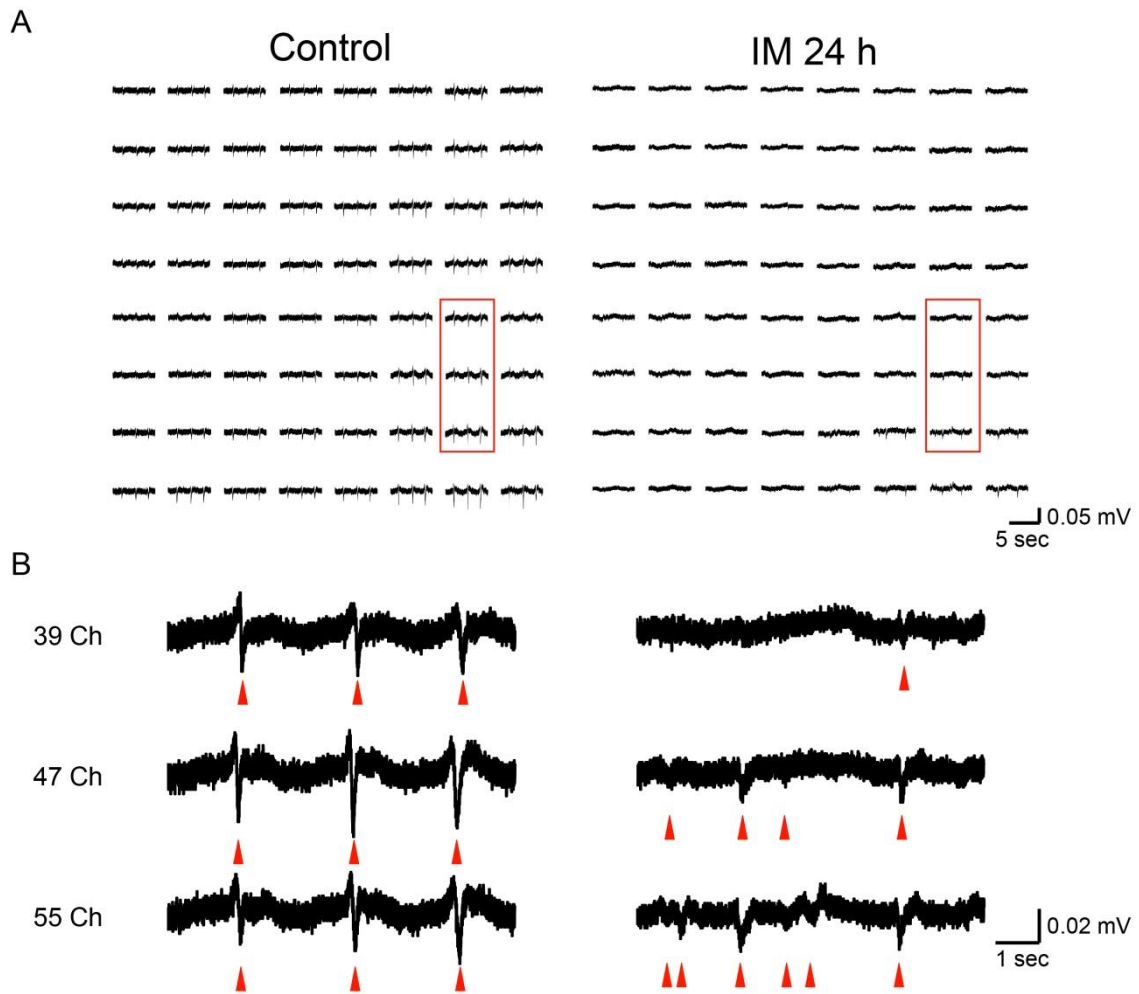


図 21. IM 24 時間後の回腸筋層における ICC ペースメーカー機能

IM 24 時間後 (IM 24 h) の回腸筋層を用いて微小電極アレイにより細胞外膜電位を測定した。A は 64 チャンネルから得られた典型的な細胞膜外電位の推移を示す。B は隣接する 3 つのチャンネル (A に示した四角枠内 : Ch39、47、55) から記録された細胞外膜電位の推移を拡大したものである。赤矢頭は slow wave のピークを示す。

4-7 IM 48 時間後の回腸筋層における c-Kit 陽性 ICC ネットワーク

外科手術に伴って生じる POI は、重篤化しなければ 12 時間から 120 時間以内に改善することが報告されている(63)。実際、IM 48 時間後には炎症が改善していたことから、それにもなった ICC 障害の改善が考えられる。そこで IM 24 時間後および 48 時間後の回腸筋層から作製した whole-mount 標本を用いて免疫染色を実施し、c-Kit 陽性 ICC ネットワークの回復があるか否かを調べた。Control 群において、c-Kit 陽性 ICC によって構成される網目状のネットワーク構造が確認され (図 22A 左図)、IM 24 時間後の回腸筋層では c-Kit 陽性 ICC によるネットワーク構造の減少が認められた (図 22A 中央図)。一方、IM 48 時間後の回腸筋層において、control と同様な c-Kit 陽性 ICC によって構成される網目状のネットワーク構造が確認された (図 22A 右図)。c-Kit 陽性 ICC ネットワークの全体に占める面積の割合を定量すると control 群に比べて IM 24 時間後の回腸筋層で有意に c-Kit 陽性 ICC ネットワークの面積比が減少しており (Control : $51.3 \pm 1.3\%$, n=4. IM 24 h : $23.4 \pm 4.6\%$, n=4. 有意差あり)、その減少は IM 48 時間後の回腸筋層で control レベルまで改善していた (IM 48 h : $46.5 \pm 2.1\%$, n=4. IM 24 h 群と有意差あり、図 22B)。以上の結果から、IM による c-Kit 陽性 ICC ネットワークの障害は IM 48 時間後には改善していることが明らかとなった。

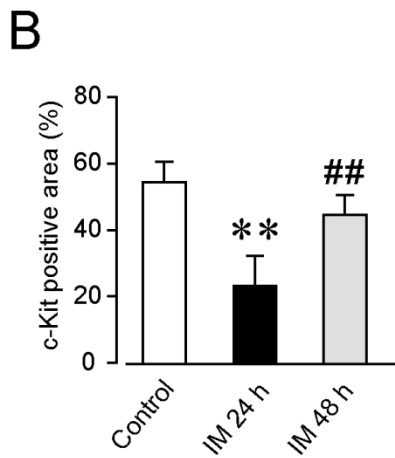
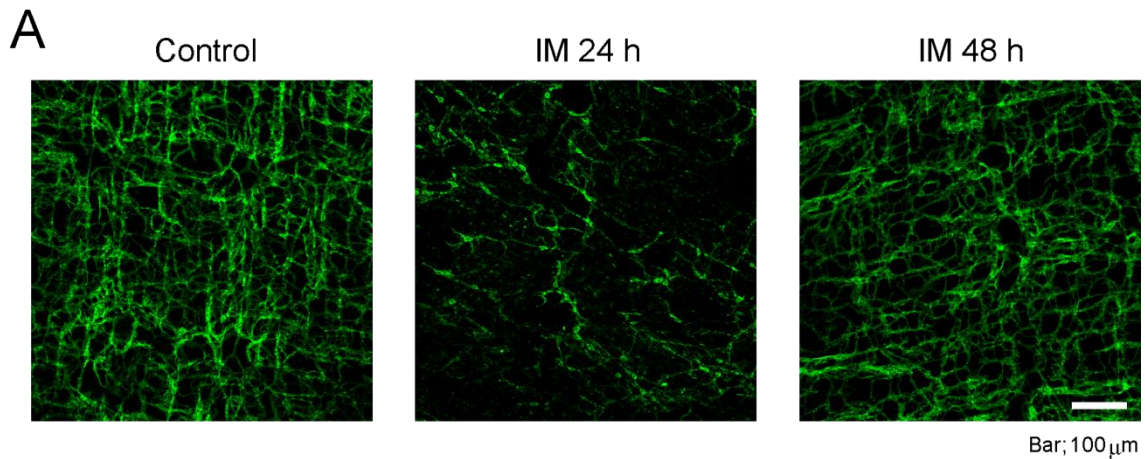


図 22. IM 48 時間後の回腸筋層における c-Kit 陽性 ICC ネットワーク

IM 24 時間後 (IM 24 h) および 48 時間後 (IM 48 h) の回腸筋層を用いて c-Kit 免疫染色および real-time PCR を実施した。A は典型的な c-Kit (緑色蛍光: ICC マーカー) 免疫染色像を示す。B は c-Kit 陽性 ICC ネットワークの全体に占める面積の割合を定量した結果である (n=4)。縦軸は c-Kit 陽性ネットワーク面積比であり、任意に選んだ 4 視野から取得した画像を二値化処理することにより定量し、その平均値を算出した。

各カラムは mean \pm SEM を示す。

** : P < 0.01 ; Control 群との比較、## : P < 0.01 ; IM 24 h 群との比較

4-8 IM 48 時間後の回腸筋層における ICC バイオマーカー mRNA 発現

次に IM 24 時間後および 48 時間後の回腸筋層から mRNA を抽出し、real-time PCR を実施することで ICC バイオマーカー発現が回復するか否かを検討した。IM 24 時間後の回腸筋層において *Kit* (c-Kit 遺伝子) および *Ano1* (ANO1 遺伝子) mRNA 発現が control 群に比べて有意に減少し、IM 48 時間後の回腸筋層においてもこれらの mRNA 発現は IM 24 時間後と同じく低いレベルを示した (図 23A、B)。

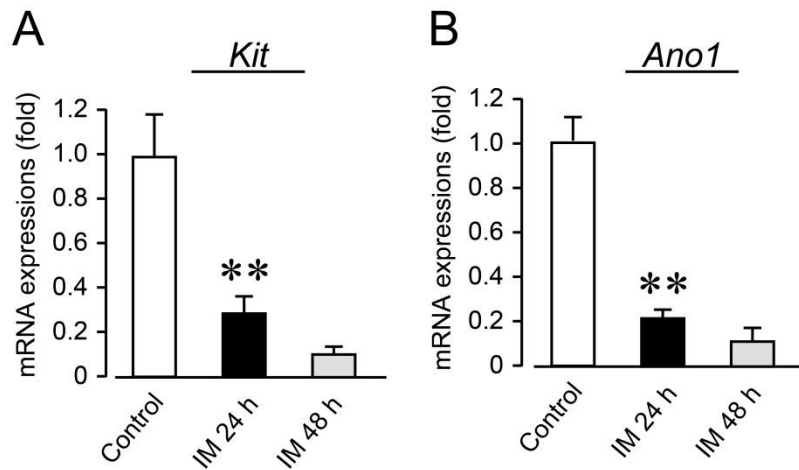


図 23. IM 48 時間後の回腸筋層における ICC バイオマーカー mRNA の発現

IM 24 時間後 (IM 24 h) および 48 時間後 (IM 48 h) の回腸筋層における ICC バイオマーカーの mRNA 発現を real-time PCR を用いて測定した。A は *Kit* (c-kit 遺伝子)、B は *Ano1* (ANO1 遺伝子) mRNA 発現量の定量結果である。縦軸は control 群に対する各群の mRNA 発現量比で示した (n = 5-10)。

各カラムは mean ± SEM を示す。

** : P < 0.01 ; Control 群との比較

4-9 IM 48 時間後の回腸筋層における ICC のペースメーカー機能

次に IM 48 時間後の回腸筋層における ICC のペースメーカー機能の変化を検討した。ICC のペースメーカー機能評価は微小電極アレイシステムによる細胞外膜電位の測定により行った。測定は 1 μ M nifedipine 存在下で行うことで平滑筋由来の電気的な活動を除いた。IM 24 時間後の回腸筋層部において slow wave の欠損や不整な発生、伝搬の途絶がみられたが (図 21A、B)、IM 48 時間後では自発的、律動的な slow wave が発生しており、その伝搬も正常レベルまで戻っていた (n=2、図 24A、B)。以上の検討から、IM 24 時間後にみられた ICC のペースメーカー機能障害は IM 48 時間後には改善する傾向が認められた。

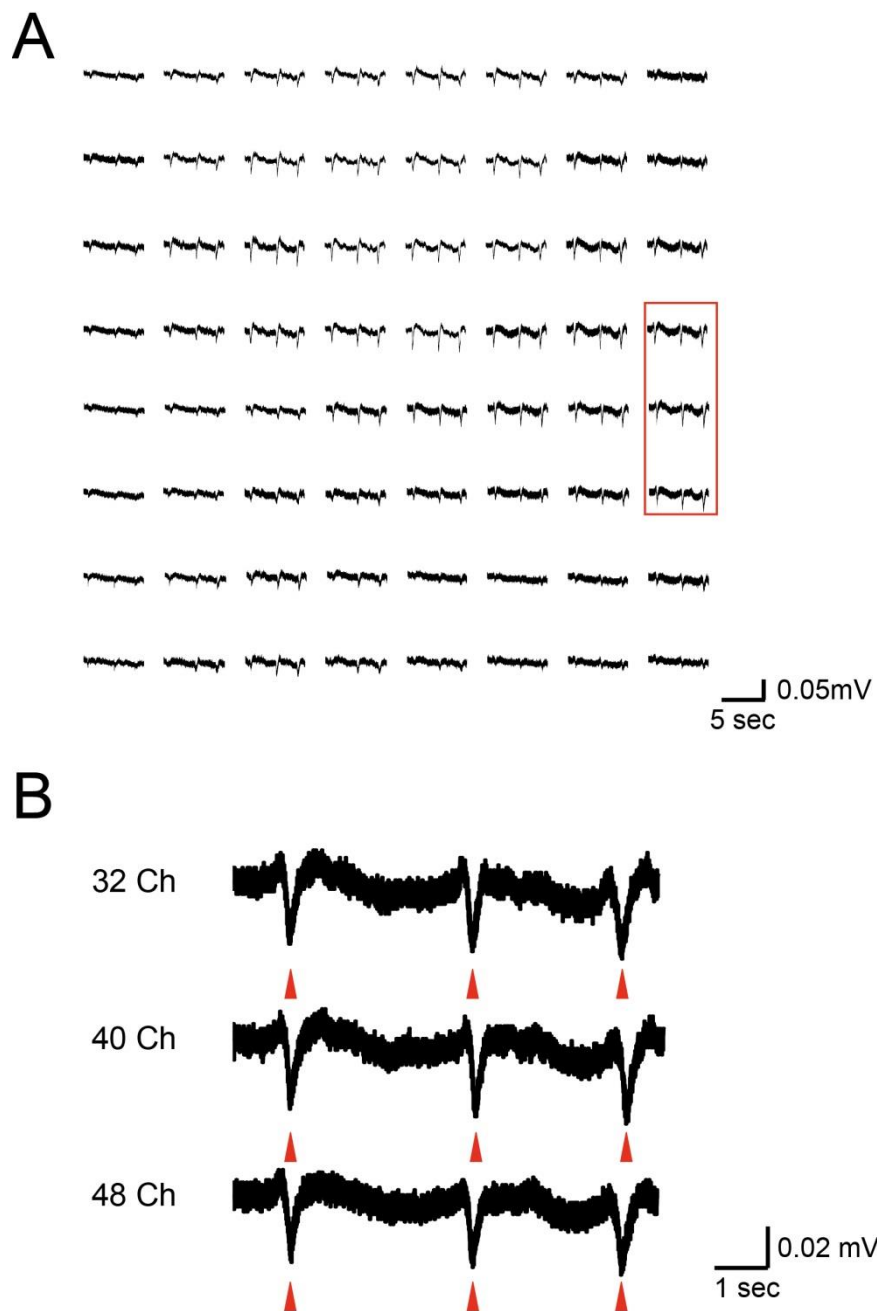


図 24. IM 48 時間後の回腸筋層におけるペースメーカー機能

IM 48 時間後 (IM 24 h) の回腸筋層を用いて微小電極アレイによる細胞外膜電位の測定を実施した。A は 64 チャンネルから得られた典型的な細胞膜外電位の推移を示す。B は隣接する 3 つのチャンネル (A に示した四角枠内 : Ch32、40、48) から記録された細胞外膜電位の推移を拡大したものである。赤矢頭は slow wave のピークを示す。

4-10 回腸筋層における iNOS mRNA 発現量の変動

IM による c-Kit 陽性 ICC ネットワーク障害の発生機構を検討するため、IM 24 時間後および IM 48 時間後の回腸筋層より mRNA を抽出し *Nos2* (iNOS 遺伝子) mRNA 発現を real-time PCR により調べた。*Nos2* mRNA 発現は IM 24 時間後の回腸筋層において control 群の 2.9 倍に増加 (Control : n=7. IM : n=4. 有意差あり) した。一方で、IM 48 時間後の回腸筋層において *Nos2* mRNA 発現は control レベル (Control 群の 0.8 倍、IM 48 h : n=6. IM 24 h と有意差あり、control と有意差なし) まで減少していた (図 25A)。以上の結果より、IM により 24 時間後に iNOS 発現が増加し、その増加は 48 時間後には control レベルまで減少することが明らかとなった。

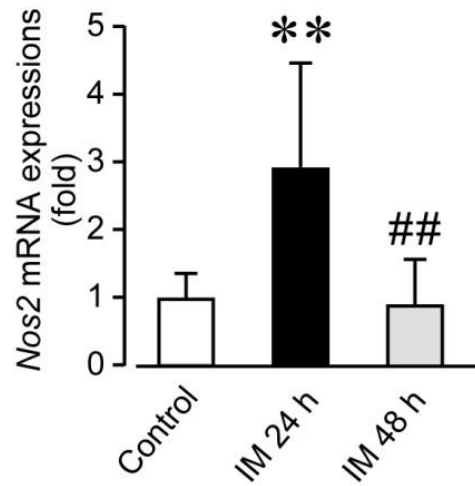


図 25. IM による回腸筋層の Nos2 mRNA 発現量の変動

IM 24 時間後 (IM 24 h) および 48 時間後 (IM 48 h) の回腸筋層における Nos2 (iNOS 遺伝子)mRNA 発現を real-time PCR を用いて測定した。縦軸は control 群に対する各群の mRNA 発現量比で示した (n = 4-7)。

各カラムは mean ± SEM を示す。

** : P < 0.01 ; Control 群との比較、## : P < 0.01 ; IM 24 h 群との比較

4-11 IM による c-Kit 陽性 ICC ネットワーク障害への NO の関与

IM による iNOS 発現の変動と c-Kit 陽性 ICC ネットワークの障害が連動したため、NO が c-Kit 陽性 ICC ネットワークの障害に関与している可能性が考えられる。そこで、iNOS 阻害剤である aminoguanidine を投与し IM による回腸筋層における c-Kit 陽性 ICC ネットワーク障害の抑制効果を検討した。IM 24 時間後の回腸筋層から作製した whole-mount 標本を用いて免疫染色を実施した。Aminoguanidine は IM の 30 分前および 4 時間後に 20 mg/kg 皮下投与した。Control 群で認められた網目状の c-Kit 陽性 ICC ネットワークは IM 24 時間後において顕著に減少した (図 26A 中央図)。一方、aminoguanidine 投与群の回腸筋層において control 群と同様な c-Kit 陽性 ICC ネットワークが認められた。c-Kit 陽性 ICC ネットワークの面積比を定量した結果、IM 24 時間後において面積比が control 群に比べて有意に減少しており (Control : $48.5 \pm 0.3\%$, n=4. IM : $24.3 \pm 1.1\%$, n=4. 有意差あり)、この減少は aminoguanidine の投与により有意に抑制された (IM + AG : $38.9 \pm 2.3\%$, n=4. IM と有意差あり、図 26B)。以上の結果より、IM による c-Kit 陽性 ICC ネットワークの障害に NO が関与していることが明らかとなった。

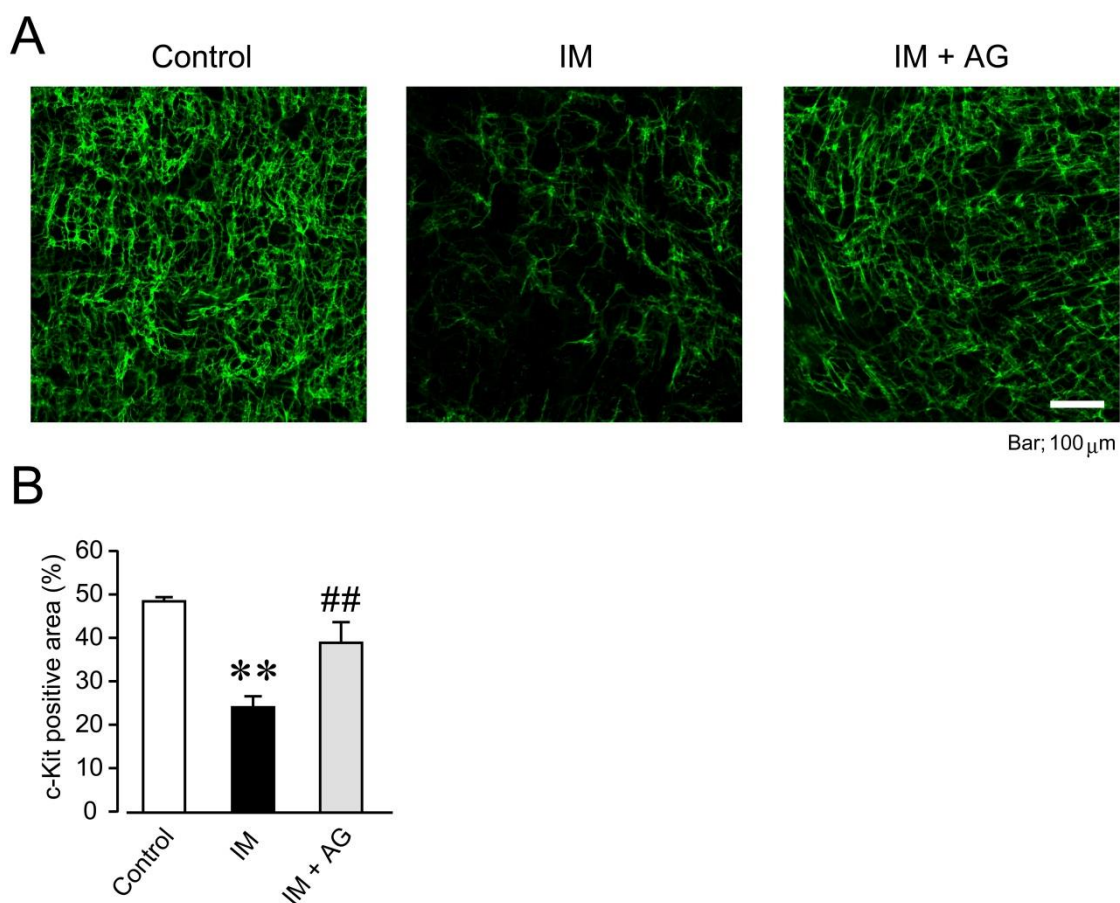


図 26. IM による c-Kit 陽性 ICC ネットワーク障害への NO の関与

iNOS 阻害剤である aminoguanidine をマウスに投与し、IM 24 時間後の回腸筋層を用いて c-Kit 免疫染色を実施した。Aminoguanidine は IM の 30 分前および 4 時間後に 20 mg/kg 皮下投与した。A は典型的な c-Kit (緑色蛍光 : ICC マーカー) 免疫染色像を示す。B は c-Kit 陽性 ICC ネットワークの全体に占める面積の割合を定量した結果である (n=4)。縦軸は c-Kit 陽性ネットワーク面積比であり、任意に選んだ 4 視野から取得した画像を二値化処理することにより定量し、その平均値を算出した。

各カラムは mean \pm SEM を示す。

** : P < 0.01 ; Control 群との比較、## : P < 0.01 ; IM 24 h 群との比較

4-12 考察

本章では、マウス POI モデルを作製し、その時の ICC の形態学的解析および機能解析を行うことにより、POI において ICC が形態的、機能的に障害されていること、さらにその障害には NO が関与していることを明らかにした。

POI は開腹手術後に生じる消化管運動不全であり、その大きな発生要因は消化管筋層に生じる局所の炎症である(29)。本研究において、IM 24 時間後の消化管筋層への好中球やマクロファージの浸潤 (図 16A-D) および、Th1 サイトカインの mRNA 発現上昇 (図 17) が認められた。この結果から POI において、IM は消化管筋層における Th1 型炎症を引き起こすと考えられた。これまでの研究や過去の報告において、炎症細胞から産生されるプロスタグランジン類や NO が平滑筋細胞に作用することで収縮機構が抑制され、消化管運動不全が生じると考えられてきた(31, 32)。しかしながら、本研究において IM 後に c-Kit 陽性 ICC ネットワークの減少 (図 18)、ICC バイオマーカーである *Kit* および *Ano1* mRNA の発現低下 (図 19) および ICC の病理学的変化 (細胞質内空胞形成、図 20) を明らかにした。さらに、ペースメーカー機能解析の結果より、ICC の slow wave 発生、およびその伝搬機能に異常が発生していることも明らかにした (図 21)。これらの結果は POI における消化管運動不全には平滑筋の機能障害に加えて、ICC のペースメーカー機能障害もまた大きく関与していることを示す。ANO1 は ICC の slow wave 発生に必須のチャンネルであるため(62)、ANO1 の発現低下が ICC のペースメーカー機能障害に直結していることが推測される。さらに IM 24 時間後に回腸筋層において、slow wave の伝搬障害も認められた (図 21)。ヒルシュスプルング病患者の大腸筋層において、ICC のギャップ結合構成タンパク質である connexin43 の発現が減少しており、これが消化管運動障害に関与していることが示唆されている(64, 65)。このことから、IM 後の回腸筋層においてもギャップ結合に障害が生じており、これが slow wave の伝搬が途絶する原因となっている可能性が考えられた。しかしながら、電子顕微鏡解析の結果からは ICC 同士や ICC と平滑筋細胞の間に存在するギャップ結合に形態学的な

変化は認められなかった (図 20)。この結果から slow wave の伝搬障害にはギャップ結合の形態学的な障害ではなく機能的な障害が関与している可能性が考えられる。ギャップ結合の細胞間伝達能は細胞内 pH や connexin のリン酸化状態などによって変化する(66)。アストロサイトや心筋に発現する connexin43 は虚血や低酸素などの病的環境下において、リン酸化状態の変化を介してギャップ結合機能が低下することが報告されている(67, 68)。今後、POI 病態における ICC に発現する connexin43 のリン酸化状態を検討することで、slow wave の伝搬障害の原因を明らかにすることができる可能性が考えられる。

POI は一般に長期化することなく治癒する。その消化管運動機能の回復にかかる時間は部位によって異なっており、胃で 24-48 時間、小腸で 24 時間、大腸で最も長く 120 時間と報告されている(63)。従って、時間の経過とともに ICC のペースメーカー機能も改善することが予想された。本研究において、IM 24 時間後に認められた c-Kit 陽性 ICC ネットワークの障害が IM 48 時間後には正常レベルまで回復していることを明らかにした (図 22)。また、ペースメーカー機能解析においても同様に、slow wave 発生およびその伝搬ともに正常レベルまで改善していることが示唆された (図 24)。IM 48 時間後の回腸筋層部における好中球およびマクロファージ数は減少傾向を示しており、実際に炎症が終息に向かっていることが示唆される (図 16)。この炎症の終息にともない、ICC の c-Kit 発現やペースメーカー機能が改善したことから、IM による ICC の形態的、機能的な障害は回腸筋層における炎症によって生じていることが示唆される。一般に組織障害により細胞死が引き起こされた場合、組織の再生まではある一定以上の時間を要するが、IM 24 時間後にみられた ICC の障害は 48 時間以内に回復していた。IM 24 時間後の回腸筋層において ICC バイオマーカーの発現低下およびペースメーカー機能の異常を認めた一方、電子顕微鏡解析の結果から、ICC は異常空胞を持つものの、ICC 特異的な微細構造には大きな障害が認められず、比較的的正常個体の ICC と同じ微細構造を保持していた。すなわち、IM 24 時間後の回腸筋層において ICC が細胞死している可能性が低いことが示唆される。これらのことから、POI において ICC

は細胞死することなく、c-Kit や ANO1 といった正常の ICC に認められるバイオマーカーの発現を欠いたペースメーカーを示さない表現型（以下、非機能型と呼ぶ）へと変化している可能性が考えられる。前章の考察の項でも述べたように、様々な病態モデルにおいてこのような非機能型 ICC が存在する可能性が示唆されている(11, 47, 60, 61)。従って、IM 後に生じる炎症により、正常な ICC は非機能型 ICC へと変化し、炎症の終息にともなって正常な ICC へと再び回復した可能性が考えられる。このように周囲環境に応じて素早く自身の形質を変化させる ICC の特性は「ICC 可塑性 (plasticity)」と呼ばれている(69)。しかしながら、ICC 可塑性はその可能性の有無を含めて不明な点が多い。腸管切除術に伴う ICC の障害において、c-Kit 陽性 ICC の減少および ICC のペースメーカー機能の低下が術後 5 時間に認められ、術後 24 時間では c-Kit 陽性 ICC や ICC 機能が回復することが報告されている(60)。この時、c-Kit 陽性細胞が減少するにもかかわらず、電子顕微鏡解析により、正常な微細構造をもつ ICC が確認されており、本研究の結果と類似している。POI および腸管切除術を用いた検討から ICC 可塑性が支持されるが、その根拠は電子顕微鏡解析の結果をもとにしており、十分な証拠であるとは言えない。今後、ICC 可塑性の有無を解明するためには、Cre-Loxp システムを用いた細胞運命追跡や死細胞・細胞再生マーカーを用いた更なる検討が必要であろう。しかしながら、マウス POI モデルが ICC 可塑性を検討する上での重要なモデルとなり得ると考えられる。

前章において、ICC のペースメーカー機能障害には iNOS 由来の NO が大きく関与していることを示した。POI においても iNOS 由来 NO がその病態形成に大きく関与していることから、IM による ICC の障害に NO が関与している可能性が考えられた。本章において、iNOS 阻害剤である aminoguanidine が IM による c-Kit 陽性 ICC ネットワークの障害を抑制する結果を得た (図 25)。このことから、POI における ICC 障害には NO が大きく関与している可能性が考えられた。腸管切除術によって生じる c-Kit 陽性 ICC ネットワークの減少および機能障害もまた iNOS 阻害剤の投与によって抑制されることが報告されている(35)。一般に iNOS

は主にサイトカインやプロスタグランジン類によってその発現が制御されている。本研究において、NOの産生阻止がIMによるICCの障害を抑制したことから、ICCの機能的、形態的な障害を誘発する因子はサイトカインよりもNOが重要であることが示唆される。

POIの病態形成にICCのペースメーカー機能障害が関与していることが明らかとなったことから、POIの予防および治療戦略として、ICCが新たな標的細胞となることが示唆される。現在、POIの予防戦略の一つとしてEnhanced Recovery After Surgery (ERAS)が挙げられる(70)。このプログラムは術後早期に経口栄養を開始することで消化管運動を早期に回復させるという考えにもとづくものであるが、普及が進んでいないのが現状である。また、治療薬として末梢 μ オピオイド受容体阻害剤であるalvimopan(71)、消化管運動亢進薬であるmosapride(72, 73)および大建中湯(74)が挙げられるが、有効な薬物治療法は確立されていない。本研究から得られた知見から、神経や平滑筋だけを標的細胞にしたPOIの予防・治療戦略は十分でない可能性が考えられる。すなわち、POIにおける消化管運動不全の予防や治療を達成するためには、平滑筋や神経だけでなくICCを含む消化管運動系を構成する細胞群の機能を亢進する薬物を模索する必要があると考えられた。一方、これらの細胞機能異常の根源は消化管筋層に生じる炎症であるため、抗炎症作用を持つ薬物が包括的にこれらの問題を解決できる可能性が高い。

以上を要するに、POIにおいてICCの形態的、機能的障害が認められ、POIの病態形成にICCの障害が大きく関与していることが明らかとなった。さらにこのICCの障害にはNOが大きく関与していることが示唆された。

【第5章 総合考察】

① ICC と炎症反応

これまでに、ICC のペースメーカー機能やネットワーク構造の障害がヒトの炎症性腸疾患や慢性偽性腸閉塞、ヒルシュスプルング病において報告されている(24, 26, 75)。また、実験動物を用いた検討においても、これらの病態モデルに加えて、LPS 誘発性敗血症モデルや寄生虫感染モデルといった様々な消化管炎症病態において ICC の障害が生じることが報告されている(43, 48, 76)。一方で、前述のとおり、その病態発生の分子機構に関しては不明な点が多く、このような病態にみられる ICC の障害を予防または治療する方法は確立されていない。本研究は炎症病態における ICC の病態発生とその分子機構について *in vitro* および *in vivo* の二つの観点から解明を試みた。

② ICC 病態解析における cell cluster method の有効性

正常な消化管運動は生命にとって基礎的で欠かすことのできない生理現象であり、古くから多くの研究がなされてきた。ICC は平滑筋や神経に遅れて 19 世紀後半になって発見されたため、これらの細胞に比べて未だにその知見は少ない。しかしながら、c-Kit が ICC のバイオマーカーであることの発見を契機に、近年の電気生理学的解析技術の向上も加わり、生理的状态下における ICC の消化管運動におけるペースメーカーとしての機能が明らかになってきた。また、非生理的状态、つまり病的状態下において ICC のネットワーク構造やペースメーカー機能障害が生じることも明らかになってきた(77)。しかし、現在、ICC の病態発生の詳細な分子機構に関しては十分な知見が得られていない。その原因として ICC は単離培養系の確立が困難であるという点が挙げられる。ICC の単離培養に関しては fluorescence activated cell sorting (FACS)や磁気細胞分離を用いた方法が報告されているが(78, 79)、その後、これらの単離培養法を用いた ICC に関する研究報告がほとんどないことから、世界的にみても非常に困難な技術であると言える。また、仮に c-Kit 陽性細胞を単離するこ

とができて、ペースメーカー機能が保持されていないことが多いという問題もある。培養に成功した報告においても、単独の ICC よりも培養 1-3 日後のネットワークを形成した ICC の方が slow wave を検出できる確率が高いことを明らかにしている(80)。これらの点から、ペースメーカー機能を保持した状態での ICC の単離培養が困難である理由は、生体内で ICC 同士がネットワークを形成し、個ではなく集合体として振る舞い、機能を発揮するためであると考えられる。そのため、ICC の培養系を確立するためには ICC ネットワークをできるだけ維持した状態で *in vitro* まで持ち込まなければならない。また、消化管運動機能を考慮する際には ICC 同士の細胞間コミュニケーションだけでなく、消化管筋層を構成する平滑筋細胞や神経細胞、PDGFR α ⁺ MF、常在性マクロファージといった異種細胞間コミュニケーションにも留意する必要がある。このような背景から、本研究は cell cluster を用いた *in vitro* 実験系を採用した。

Cell cluster は消化管筋層を細切した後に collagenase を短時間処置 (約 20 分) することによって得られる小細胞塊である。従って、*in vitro* への移行の際に消化管内のネットワークへ与える影響が非常に少なく、形態的・機能的に生体内に近い環境で ICC を培養することができる。反面、炎症病態における ICC を検討する上で cell cluster は消化管筋層を構成するさまざまな細胞群から成るため、通常の培養細胞を用いた *in vitro* 実験系に比べて異種細胞間のクロストークにより反応が複雑化し、個々の細胞の反応を追うことが困難という側面もある。しかしながら、炎症は常に一方向だけの反応ではなく様々な細胞群との相互作用の重積である。従って、cell cluster は消化管筋層の炎症反応を *in vitro* で再現するのに適していると考えられる。一方で炎症には血流を介して浸潤する免疫担当細胞がきわめて重要な役割を担っているため、常在性マクロファージ活性化後の消化管筋層における炎症を完全に模しているとは言い難い。本研究において cell cluster に Th1 型炎症刺激を加えることにより、*in vivo* と同様に ICC の機能的、形態的な障害を引き起こすことができたことから、消化管における Th1 型炎症モデルとして解析に使用できると考えられた。今後、cell cluster

を様々な病態条件下に曝露させることで、さらなる ICC の病態発生の分子機構が明らかとなることが期待される。

③ ICC と Th1 サイトカイン

炎症時に産生される炎症性サイトカインは免疫担当細胞に作用して炎症反応を調節するだけでなく、非免疫担当細胞にも作用することで、その細胞機能を変化させることが報告されている(20, 21, 23)。従って、本研究は Th1 型炎症における ICC のペースメーカー機能障害発生にも、サイトカインが関与していると仮説を立て、検証を行った。しかしながら、cell cluster を用いた検討において Th1 サイトカインの単独処置は ICC 機能に大きな影響をおよぼさなかった。また、POI モデルを用いた検討においても、NO 産生阻害により ICC の c-Kit 発現の減少が顕著に抑制されたことから、Th1 サイトカインの ICC に対する直接的な作用は少ないと考えられた。また、強力に Th1 型炎症を誘導する LPS も単独処置では ICC のペースメーカー機能に影響をおよぼさなかった。これらの結果から、ICC は Th1 サイトカインや LPS に対して感受性が低いことが示唆された。培養平滑筋細胞はサイトカイン刺激に反応し自身も炎症細胞のように振る舞うことが報告されている(81)。さらに平滑筋に加えて同じく間質細胞である線維芽細胞もサイトカイン、特に TGF- β の刺激により筋線維芽細胞へと形質を転換し、線維化や炎症調節に寄与する(82)。このように、一般的に間質細胞は病態時に自身の形質を転換して、炎症反応の調節に寄与することが知られている。ICC と平滑筋細胞は共通の間葉系幹細胞から分化しており、PDGF および Bone Morphogenetic Protein シグナルにより平滑筋へ、SCF/c-kit シグナルにより ICC へと分化する(83, 84)。このように両者は細胞系譜上、近縁であるにも関わらず、ICC は Th1 サイトカインや LPS に感受性が低く、炎症下において NO に反応し細胞形質の変化を示すが、炎症反応の調節に寄与している可能性が低いという本研究の結果は興味深い。これまで、ICC に対する Th1 サイトカインの影響に関して報告がほとんどなかったことから、本研究によって得られた ICC が代表

的な Th1 サイトカインに対して感受性が低いという結果は、ICC の病態を考える上で極めて新規性の高い重要な知見と考えられた。

本研究において Th2、Th17 型炎症の ICC に対する影響については検討していない。また、実際に生体内で生じる炎症は完全に Th1、Th2、Th17 が区別されておらず、これらが複合的に働いていることも報告されている(16-19)。今後、ICC に対する Th2 および Th17 型炎症の影響について検討することで、より詳細な ICC の病態発生の分子機構が明らかになると考えられる。

④ ICC と NO

ICC は Th1 サイトカインや LPS に対して感受性が低い一方で、本研究の *in vitro*、*in vivo* どちらの検討からも ICC は NO に対して高い感受性を示すことが明らかとなった。また、*in vitro* の検討において、ICC が NO 由来酸化ストレスにより機能的、形態的な障害を受けることが示唆された。本研究では平滑筋機能に関して検討をしていないため、NO 由来酸化ストレスが平滑筋の収縮機能を障害しているかを明らかにしていない。POI において少なくとも消化管運動抑制が iNOS 由来 NO に起因することが示唆されているが(32)、NO がどのような下流シグナルによって平滑筋機能を低下しているか明らかとなっていない。IM 後に ROS の産生が増加することが報告されているため(85)、POI においても平滑筋が酸化ストレスの影響をうけている可能性が考えられる。一方で、その感受性に関しては平滑筋と ICC で異なっている可能性が考えられるため、今後更なる検討が必要である。また、クローン病や潰瘍性大腸炎、慢性偽性腸閉塞といった他の病態においても ICC の障害に NO および NO 由来酸化ストレスが関与しているのか明らかにすることで、iNOS 阻害剤や抗酸化剤がこれらの消化管運動不全の治療へと応用できる可能性が広がる。

In vitro 実験系において NO の産生源が平滑筋細胞やマクロファージの iNOS であることを明らかにした。一方、POI モデルを用いた検討においては、NO が ICC の病態発生の関与し

ていることを明らかにしたが、その産生源までは明らかにしていない。IM 24 時間後の回腸筋層へ好中球やマクロファージが多数浸潤していることから、これらの炎症細胞が iNOS を発現しており、NO を多量に産生していることが推測される。IM 48 時間後においても炎症細胞の浸潤は完全に消失していないにも関わらず、*Nos2* mRNA は正常レベルまで低下していたことを考慮すると、*in vitro* 実験系で認められたような平滑筋における iNOS 発現が NO の主な産生源となる可能性も考えられる。NO はその半減期が 3-6 秒と非常に短い。*In vitro* 実験系において ICC では iNOS の発現が認められなかったことから、NO が ICC に作用するためには ICC と NO 産生源が極めて近傍に存在している必要があると考えられる。POI において、これらの炎症細胞はペースメーカー機能を担っている ICC-MY の存在する myenteric plexus にも浸潤しており、ICC 障害を引き起こす NO の産生源である可能性は高い。一方で平滑筋細胞は ICC と非常に密に接しており、iNOS を発現する平滑筋が ICC に与える影響は大きいと考えられる。今後、遺伝的 iNOS 欠損マウスを用いた骨髄移植実験等を行うことで ICC 障害を引き起こす NO の産生源を明らかにできると考えられる。

⑤ ICC 可塑性

Cell cluster 実験系および POI モデルの両方において、Th1 型炎症下で NO シグナルにより ICC がペースメーカー機能および c-Kit や ANO1 発現を持たない表現型（非機能型）へと変化することが示唆された。一方、POI モデルにおいて IM 24 時間後にみられた c-Kit 陽性 ICC ネットワークやペースメーカー機能の障害は、IM 48 時間後には正常レベルまで改善していた。すなわち、この非機能型 ICC が再びペースメーカー機能を持つ ICC へと回復した可能性が示唆された。炎症下における非機能型 ICC への形質転換がどのような意義を持っているか明らかではないが、炎症による機能低下は生理学的には臓器の「休息」という意味を持つとも考えられている。生理的狀態下において ICC の生み出す slow wave の標的は平滑筋であるが、炎症下において平滑筋が本来もつ収縮能を減弱し、逆に免疫細胞としての性質

を高めるとすれば、ICC によるペースメーカー機能の維持は意味を成さなくなる。ICC はペースメーカー機能を持たない非機能型へと形質を転換し、炎症の終息により平滑筋機能が再び回復するまで休止することで、エネルギーの浪費を抑えている可能性が考えられる。本研究において ICC が酸化ストレスに感受性が高いことが示唆されたが、これは ICC が炎症反応に対するセンサーとして酸化ストレスを利用することで消化管保護の役割を担っている可能性が考えられた。

NO およびそれに付随する酸化ストレスによって ICC は非機能型へと変化することが示唆されたが、この回復過程は非常に短い時間で起こるため、NO によるシグナルが消失したことに加えて、何らかのシグナルが活性化することで ICC の回復を助けている可能性が考えられる。ICC の分化には SCF/c-Kit のほかに、インスリンやインスリン様成長因子によるシグナルも関与していることが明らかとなっているため、これらの発現変化についても今後、検討していくことが重要であると考えられる。非機能型 ICC を再びペースメーカー機能を持つ正常な ICC へと変化させることができれば、炎症下における ICC の機能不全による消化管運動障害を治療することができると考えられる。一方、このような非機能型 ICC を何らかのマーカーを用いて検出することができれば ICC の病態発生に関して、より詳細な検討を行うことが可能となる。今後、Cre-Loxp システムを用いた細胞運命追跡と FACS およびチップ解析を組み合わせることで非機能型 ICC 特異的マーカーを発見できると考えられる。

⑥ まとめ

本研究により、①ICC が Th1 サイトカインや LPS に対し抵抗性が高いこと、②NO が ICC のペースメーカー機能やネットワーク構造の障害発生に関与していること、③その分子機構には NO/cGMP 経路よりも NO 由来酸化ストレスが関与していること、④Th1 型炎症において ICC はペースメーカー機能や c-Kit および ANO1 発現といった正常な ICC が示す表現

型を失うことが明らかとなった。これらの知見から消化管運動障害に対する ICC を標的とした新たな創薬の可能性が生まれることが期待される。

【第6章 総括】

背景および目的

消化管運動は、平滑筋、腸管神経、カハール介在細胞（Interstitial cells of Cajal; ICC）など様々な細胞の連携によって制御されている。筋層間神経叢に存在する ICC は消化管運動のペースメーカー機能を担う細胞であり、平滑筋とギャップ結合により電気的カップリングを形成し、自発的な周期性のある電気的活動（slow wave）を平滑筋へ伝搬することで消化管の自発性収縮運動を生じる。

クローン病や慢性腸閉塞などの消化管炎症を持つ患者、およびこれらの病態を再現したモデル動物において、ICC のペースメーカー機能やそのネットワーク構造が障害されることが知られている。しかしながら、ICC の障害発生における分子機構は明らかとなっていない。一方、炎症病態において Th1 サイトカインである TNF- α や IL-1 β が消化管運動系を構成する平滑筋や腸管神経に直接作用することで、それらの機能を障害することが報告されている。従って、消化管炎症における ICC の機能障害に Th1 サイトカインが関与している可能性が考えられる。

本研究は① *in vitro* 実験系を用いた Th1 型炎症刺激による ICC の機能や形態の異常と、② Th1 型 *in vivo* 炎症病態モデルとして術後イレウス（post-operative ileus; POI）モデルにおける ICC の病態発生を詳細に解析することで、Th1 型炎症による ICC のペースメーカー機能障害の分子機構を解明することを目的とした。

実験結果

① 小腸 cell cluster 標本における Th1 型炎症刺激による ICC のペースメーカー機能異常の分子機構

(1) *In vitro* の ICC 機能評価系を確立するため、マウス小腸筋層条片から直径 200-300 μm の cell cluster を作製した。免疫染色により、cell cluster は平滑筋細胞や神経細胞、ICC、常

在性マクロファージおよび platelet-derived growth factor receptor α 陽性筋線維芽細胞といった実際に消化管筋層を構成する細胞群と同様の細胞から構成されることが明らかとなった。

(2) Cell cluster は明視野において自発性収縮を示し、 Ca^{2+} イメージングにより 1 μM nifedipine 存在下で Ca^{2+} oscillation が観察された。さらに、この Ca^{2+} oscillation が観察された領域は ICC のマーカータンパク質である c-Kit に陽性であったことから、 Ca^{2+} oscillation は ICC 由来であることが示唆された。以上の結果から、マウス消化管筋層由来 cell cluster は消化管筋層を構成する細胞群のネットワークを保持し、ICC のペースメーカー機能を評価することのできる *in vitro* モデルであることが示された。

(3) この cell cluster を用いて ICC のペースメーカー機能に対する Th1 炎症刺激の影響を検討した。Th1 型炎症を引き起こすために IFN- γ (25 ng/mL) と LPS (10 $\mu\text{g/mL}$) を 24 時間同時処置 (IFN- γ + LPS) した結果、 Ca^{2+} oscillation の頻度および振幅が有意に減少し、ICC のペースメーカー機能が著しく低下した。この時、cell cluster において Th1 サイトカインである IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 の mRNA 発現が有意に増加しており、実際に Th1 型炎症が引き起こされていることが示唆された。次に、ICC のペースメーカー機能に対する Th1 サイトカインの影響を検討するために、これらのサイトカインの 48 時間単独処置を行ったが ICC ペースメーカー機能に顕著な機能異常を示さなかった。

(4) Th1 型炎症において、様々な細胞で誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) の発現が上昇し、NO が多量に産生される。そこで次に、Th1 型炎症における ICC の機能障害に対する NO の関与について検討した。NOS 阻害剤である L-NAME (300 μM) または iNOS 阻害剤である 1400W (100 μM) の前処置は IFN- γ + LPS による ICC の機能障害を有意に抑制したことから、NO の関与が示唆された。また、免疫染色および定量的 PCR により、IFN- γ + LPS 処置後の cell cluster で iNOS の発現上昇が確認された。

(5) Th1 型炎症における ICC の機能障害に関わる NO の下流シグナルとして、cGMP 経路および S-ニトロシル化について検討した。cGMP 合成酵素阻害剤である ODQ (10 μM)

の前処置は、IFN- γ + LPS による ICC の機能障害を抑制する傾向を示したが、有意な差ではなかった。また、遊離 NO を産生することなくタンパク質を S-ニトロシル化することができる新規 NO ドナー NNO-ABBH1 (30、50、100 μ M) の 24 時間処置も ICC のペースメーカー機能に影響しなかった。従って、NO の下流シグナルとして cGMP 経路と S-ニトロシル化は重要な役割を担っていないと考えられた。

(6) 次に NO を介した酸化ストレスの関与について検討した。NO は自身が不対電子を持ち酸化能を持つのに加え、superoxide と反応することで、より強力な酸化能を有する peroxynitrite を生成する。そこで、peroxynitrite の産生を阻止するために抗酸化剤である apocynin を用いた検討を実施した。Apocynin (300 μ M) の前処置は IFN- γ + LPS による ICC の機能障害を有意に抑制した。これらの結果から、Th1 型炎症における ICC の機能障害に NO 由来の酸化ストレスが大きく関与していることが示唆された。

(7) Th1 型炎症において c-Kit 陽性 ICC ネットワークに障害が生じることが知られているため、cell cluster においても同様に障害が生じるか検討した。免疫染色により、IFN- γ + LPS 処置後の cell cluster において c-Kit 陽性 ICC を持たない cell cluster が有意に増加することが示された。またこの時、ICC のマーカー遺伝子である *Kit* および *Ano1* の mRNA 発現も有意に減少した。

(8) Cell cluster の電子顕微鏡解析を行い、ICC の微細構造に対する IFN- γ + LPS の影響を検討した。無刺激時の cell cluster における ICC は、ミトコンドリアを豊富に含む細胞質、細胞膜上のカベオラ構造および平滑筋とのギャップ結合形成といった ICC 特異的な構造を示した。また、IFN- γ + LPS 処置後の cell cluster においても、ICC 特異的な微細構造を呈していた。

以上の結果から、Th1 型炎症における ICC の機能障害には NO 由来の酸化ストレスが大きく関与していることが明らかとなった。また、Th1 型炎症において、ICC 自身が消失するこ

とはないが、ペースメーカー機能や c-Kit 発現を持たない形質に変化している可能性が考えられた。

② マウス POI モデルにおける ICC の病態発生解析とその病態発現機構

(1) 腸管操作 (intestinal manipulation; IM) を行うことにより POI モデルを作製した。IM24 時間後の回腸筋層において、多数の好中球とマクロファージの浸潤が認められ、IM 48 時間後にはその細胞数は減少傾向を示した。また、IM 3 時間後の回腸筋層において Th1 サイトカインの mRNA 発現が有意に増加しており、IM により回腸筋層に Th1 型炎症が生じることが明らかとなった。

(2) c-Kit 陽性 ICC のネットワークに対する IM の影響を検討した。IM 24 時間後の回腸筋層において c-Kit 陽性細胞ネットワークが著しく減少し、同様に *Kit* および *Ano1* の mRNA 発現も減少していた。さらに電子顕微鏡解析により、IM 24 時間後の回腸筋層において ICC に特徴的な微細構造を示す細胞が認められたが、細胞質内に異常な空胞が散見された。

(3) ICC のペースメーカー機能に対する IM の影響を検討するために微小電極アレイを用いて slow wave の発生とその伝搬機能の解析を行った。IM 24 時間後の回腸筋層において、slow wave の不整な発生や欠如およびその伝搬の途絶が認められた。従って、IM 24 時間後の回腸筋層において ICC のペースメーカー機能に障害が生じていることが明らかとなった。

(4) IM 24 時間後で認められた ICC の障害が IM 48 時間後に改善するか否か検討した結果、IM 48 時間後の c-Kit 陽性 ICC ネットワークおよび slow wave の発生やその伝搬がほぼ正常レベルまで回復していることが明らかとなった。

(5) IM による c-Kit 陽性 ICC ネットワークの障害に NO が関与しているか検討した。回腸筋層における iNOS の mRNA 発現は IM 24 時間後に有意に増加し、IM 48 時間後には正常レベルまで減少していた。iNOS 阻害剤である aminoguanidine の投与は IM 24 時間後の回腸筋層における c-Kit 陽性 ICC ネットワークの減少を有意に抑制した。

以上の検討により、IMによりICCの形態学的、機能的な障害が生じることが明らかとなった。さらにc-Kit陽性ICCネットワークの障害にNOが関与することが明らかとなった。

考察

本研究から、Th1型炎症におけるICCの機能障害にはiNOS由来のNOが大きく関与していることが明らかとなった。さらに*in vitro*の検討により、NOは酸化ストレスを介してICCの機能を障害している可能性が示唆された。また、Th1型炎症時にはICCがペースメーカー機能やICCのマーカー遺伝子である*Kit*や*Ano1*の発現を持たない形質に転換している可能性が考えられた。本研究は、腸炎にみられる消化管運動機能障害治療の標的細胞の一つとして新たにICCが候補となることを示しており、ICC機能障害の予防または治療にはiNOS阻害剤や抗酸化剤が有効である可能性が示唆された。

【第7章 引用文献】

1. Sanders KM, Koh SD, Ro S, & Ward SM (2012) Regulation of gastrointestinal motility--insights from smooth muscle biology. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* 9(11):633-645.
2. Rattan S (1981) Neural regulation of gastrointestinal motility: nature of neurotransmission. *The Medical clinics of North America* 65(6):1129-1147.
3. Roman C (1987) [Neural control of gastrointestinal motility]. *Gastroenterologie clinique et biologique* 11(3 Pt 2):27B-34B.
4. Sanders KM, Ward SM, & Koh SD (2014) Interstitial cells: regulators of smooth muscle function. *Physiological reviews* 94(3):859-907.
5. Sanders KM, Koh SD, & Ward SM (2006) Interstitial cells of cajal as pacemakers in the gastrointestinal tract. *Annual review of physiology* 68:307-343.
6. Maeda H, *et al.* (1992) Requirement of c-kit for development of intestinal pacemaker system. *Development* 116(2):369-375.
7. Ward SM, Burns AJ, Torihashi S, & Sanders KM (1994) Mutation of the proto-oncogene c-kit blocks development of interstitial cells and electrical rhythmicity in murine intestine. *The Journal of physiology* 480 (Pt 1):91-97.
8. Huizinga JD, *et al.* (1995) W/kit gene required for interstitial cells of Cajal and for intestinal pacemaker activity. *Nature* 373(6512):347-349.
9. Gomez-Pinilla PJ, *et al.* (2009) Ano1 is a selective marker of interstitial cells of Cajal in the human and mouse gastrointestinal tract. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 296(6):G1370-1381.
10. Sanders KM (1996) A case for interstitial cells of Cajal as pacemakers and mediators of neurotransmission in the gastrointestinal tract. *Gastroenterology*

- 111(2):492-515.
11. Torihashi S, *et al.* (1999) Blockade of kit signaling induces transdifferentiation of interstitial cells of cajal to a smooth muscle phenotype. *Gastroenterology* 117(1):140-148.
 12. Shimojima N, Nakaki T, Morikawa Y, Hoshino K, & Kitajima M (2005) Imatinib blocks spontaneous mechanical activities in the adult mouse small intestine: possible inhibition of c-Kit signaling. *Pharmacology* 74(2):95-99.
 13. Rath HC, *et al.* (2001) Different subsets of enteric bacteria induce and perpetuate experimental colitis in rats and mice. *Infection and immunity* 69(4):2277-2285.
 14. Madsen KL, *et al.* (2000) Antibiotic therapy attenuates colitis in interleukin 10 gene-deficient mice. *Gastroenterology* 118(6):1094-1105.
 15. Won KJ, Suzuki T, Hori M, & Ozaki H (2006) Motility disorder in experimentally obstructed intestine: relationship between muscularis inflammation and disruption of the ICC network. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society* 18(1):53-61.
 16. Strober W & Fuss IJ (2011) Proinflammatory cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 140(6):1756-1767.
 17. Sanchez-Munoz F, Dominguez-Lopez A, & Yamamoto-Furusho JK (2008) Role of cytokines in inflammatory bowel disease. *World journal of gastroenterology : WJG* 14(27):4280-4288.
 18. Sakuraba A, *et al.* (2009) Th1/Th17 immune response is induced by mesenteric lymph node dendritic cells in Crohn's disease. *Gastroenterology* 137(5):1736-1745.

19. Verma R, Verma N, & Paul J (2013) Expression of inflammatory genes in the colon of ulcerative colitis patients varies with activity both at the mRNA and protein level. *European cytokine network* 24(3):130-138.
20. Ohama T, *et al.* (2007) Intestinal inflammation downregulates smooth muscle CPI-17 through induction of TNF- α and causes motility disorders. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 292(5):G1429-1438.
21. Kinoshita K, *et al.* (2006) Role of TNF- α in muscularis inflammation and motility disorder in a TNBS-induced colitis model: clues from TNF- α -deficient mice. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society* 18(7):578-588.
22. Ohama T, *et al.* (2008) Downregulation of CPI-17 contributes to dysfunctional motility in chronic intestinal inflammation model mice and ulcerative colitis patients. *Journal of gastroenterology* 43(11):858-865.
23. Kindt S, Vanden Berghe P, Boesmans W, Roosen L, & Tack J (2010) Prolonged IL-1 β exposure alters neurotransmitter and electrically induced Ca(2+) responses in the myenteric plexus. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society* 22(3):321-e385.
24. Porcher C, *et al.* (2002) Deficiency of interstitial cells of Cajal in the small intestine of patients with Crohn's disease. *The American journal of gastroenterology* 97(1):118-125.
25. Bernardini N, *et al.* (2012) Immunohistochemical analysis of myenteric ganglia and interstitial cells of Cajal in ulcerative colitis. *Journal of cellular and molecular medicine* 16(2):318-327.
26. Feldstein AE, *et al.* (2003) Chronic intestinal pseudoobstruction associated with

- altered interstitial cells of cajal networks. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 36(4):492-497.
27. Livingston EH & Passaro EP, Jr. (1990) Postoperative ileus. *Digestive diseases and sciences* 35(1):121-132.
 28. Mattei P & Rombeau JL (2006) Review of the pathophysiology and management of postoperative ileus. *World journal of surgery* 30(8):1382-1391.
 29. Zittel TT, Reddy SN, Plourde V, & Raybould HE (1994) Role of spinal afferents and calcitonin gene-related peptide in the postoperative gastric ileus in anesthetized rats. *Annals of surgery* 219(1):79-87.
 30. Kalff JC, *et al.* (1999) Surgically induced leukocytic infiltrates within the rat intestinal muscularis mediate postoperative ileus. *Gastroenterology* 117(2):378-387.
 31. Schwarz NT, *et al.* (2001) Prostanoid production via COX-2 as a causative mechanism of rodent postoperative ileus. *Gastroenterology* 121(6):1354-1371.
 32. Turler A, *et al.* (2006) Leukocyte-derived inducible nitric oxide synthase mediates murine postoperative ileus. *Annals of surgery* 244(2):220-229.
 33. Kozai D, *et al.* (2014) Transnitrosylation directs TRPA1 selectivity in N-nitrosamine activators. *Molecular pharmacology* 85(1):175-185.
 34. Yanagimoto T, *et al.* (2007) Transnitrosation of thiols from aliphatic N-nitrosamines: S-nitrosation and indirect generation of nitric oxide. *Journal of the American Chemical Society* 129(4):736-737.
 35. Yanagida H, Sanders KM, & Ward SM (2007) Inactivation of inducible nitric oxide synthase protects intestinal pacemaker cells from postoperative damage. *The Journal of physiology* 582(Pt 2):755-765.

36. Torihashi S, Fujimoto T, Trost C, & Nakayama S (2002) Calcium oscillation linked to pacemaking of interstitial cells of Cajal: requirement of calcium influx and localization of TRP4 in caveolae. *The Journal of biological chemistry* 277(21):19191-19197.
37. Nakayama S & Torihashi S (2002) Spontaneous rhythmicity in cultured cell clusters isolated from mouse small intestine. *The Japanese journal of physiology* 52(2):217-227.
38. Park KJ, *et al.* (2006) Spatial and temporal mapping of pacemaker activity in interstitial cells of Cajal in mouse ileum in situ. *American journal of physiology. Cell physiology* 290(5):C1411-1427.
39. Striz I, Brabcova E, Kolesar L, & Sekerkova A (2014) Cytokine networking of innate immunity cells: a potential target of therapy. *Clin Sci (Lond)* 126(9):593-612.
40. Kilbourn RG & Griffith OW (1992) Overproduction of nitric oxide in cytokine-mediated and septic shock. *Journal of the National Cancer Institute* 84(11):827-831.
41. Forstermann U, *et al.* (1994) Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension* 23(6 Pt 2):1121-1131.
42. Kleinert H, Schwarz PM, & Forstermann U (2003) Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Biological chemistry* 384(10-11):1343-1364.
43. Zuo DC, *et al.* (2012) Action of lipopolysaccharide on interstitial cells of cajal from mouse small intestine. *Pharmacology* 90(3-4):151-159.
44. Zuo DC, *et al.* (2013) Inhibition of pacemaker activity in interstitial cells of Cajal

- by LPS via NF-kappaB and MAP kinase. *World journal of gastroenterology* : *WJG* 19(8):1210-1218.
45. Pacher P, Beckman JS, & Liaudet L (2007) Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiological reviews* 87(1):315-424.
 46. Muller PA, *et al.* (2014) Crosstalk between muscularis macrophages and enteric neurons regulates gastrointestinal motility. *Cell* 158(2):300-313.
 47. Kiyosue M, Fujisawa M, Kinoshita K, Hori M, & Ozaki H (2006) Different susceptibilities of spontaneous rhythmicity and myogenic contractility to intestinal muscularis inflammation in the hapten-induced colitis. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society* 18(11):1019-1030.
 48. Wei J, *et al.* (2014) Effects of lipopolysaccharide-induced inflammation on the interstitial cells of Cajal. *Cell and tissue research* 356(1):29-37.
 49. Suzuki T, *et al.* (2004) Muscularis inflammation and the loss of interstitial cells of Cajal in the endothelin ETB receptor null rat. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 287(3):G638-646.
 50. Hori M, *et al.* (2001) Upregulation of iNOS by COX-2 in muscularis resident macrophage of rat intestine stimulated with LPS. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 280(5):G930-938.
 51. Tajima T, *et al.* (2012) EP2 and EP4 receptors on muscularis resident macrophages mediate LPS-induced intestinal dysmotility via iNOS upregulation through cAMP/ERK signals. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 302(5):G524-534.
 52. Klein S, *et al.* (2013) Interstitial cells of Cajal integrate excitatory and inhibitory

- neurotransmission with intestinal slow-wave activity. *Nature communications* 4:1630.
53. Koh SD, *et al.* (2000) Regulation of pacemaker currents in interstitial cells of Cajal from murine small intestine by cyclic nucleotides. *The Journal of physiology* 527 Pt 1:149-162.
 54. Choi KM, *et al.* (2007) Regulation of interstitial cells of Cajal in the mouse gastric body by neuronal nitric oxide. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society* 19(7):585-595.
 55. Chen H, *et al.* (2007) Differential gene expression in functional classes of interstitial cells of Cajal in murine small intestine. *Physiological genomics* 31(3):492-509.
 56. Choi KM, *et al.* (2008) Heme oxygenase-1 protects interstitial cells of Cajal from oxidative stress and reverses diabetic gastroparesis. *Gastroenterology* 135(6):2055-2064, 2064 e2051-2052.
 57. Gaston BM, Carver J, Doctor A, & Palmer LA (2003) S-nitrosylation signaling in cell biology. *Molecular interventions* 3(5):253-263.
 58. Straub AC, *et al.* (2011) Compartmentalized connexin 43 s-nitrosylation/denitrosylation regulates heterocellular communication in the vessel wall. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 31(2):399-407.
 59. Rajagopal S, *et al.* (2015) Cytokine-induced S-nitrosylation of soluble guanylyl cyclase and expression of phosphodiesterase 1A contribute to dysfunction of longitudinal smooth muscle relaxation. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 352(3):509-518.
 60. Yanagida H, Yanase H, Sanders KM, & Ward SM (2004) Intestinal surgical

- resection disrupts electrical rhythmicity, neural responses, and interstitial cell networks. *Gastroenterology* 127(6):1748-1759.
61. Chang IY, *et al.* (2001) Loss of interstitial cells of Cajal and development of electrical dysfunction in murine small bowel obstruction. *The Journal of physiology* 536(Pt 2):555-568.
 62. Hwang SJ, *et al.* (2009) Expression of anoctamin 1/TMEM16A by interstitial cells of Cajal is fundamental for slow wave activity in gastrointestinal muscles. *The Journal of physiology* 587(Pt 20):4887-4904.
 63. Lubawski J & Saclarides T (2008) Postoperative ileus: strategies for reduction. *Therapeutics and clinical risk management* 4(5):913-917.
 64. Yang Y, Hou Y, Zhao X, Zhang W, & Wang BX (2009) [Distribution of connexin 43 and interstitial cells of Cajal in bowels of children with Hirschsprung's disease]. *Zhongguo dang dai er ke za zhi = Chinese journal of contemporary pediatrics* 11(3):213-216.
 65. Nemeth L, Maddur S, & Puri P (2000) Immunolocalization of the gap junction protein Connexin43 in the interstitial cells of Cajal in the normal and Hirschsprung's disease bowel. *Journal of pediatric surgery* 35(6):823-828.
 66. Solan JL & Lampe PD (2009) Connexin43 phosphorylation: structural changes and biological effects. *The Biochemical journal* 419(2):261-272.
 67. Li W, Hertzberg EL, & Spray DC (2005) Regulation of connexin43-protein binding in astrocytes in response to chemical ischemia/hypoxia. *The Journal of biological chemistry* 280(9):7941-7948.
 68. Matsushita S, *et al.* (2006) Alterations of phosphorylation state of connexin 43 during hypoxia and reoxygenation are associated with cardiac function. *The*

journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society 54(3):343-353.

69. Sanders KM, Ordog T, Koh SD, Torihashi S, & Ward SM (1999) Development and plasticity of interstitial cells of Cajal. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society* 11(5):311-338.
70. Mortensen K, *et al.* (2014) Consensus guidelines for enhanced recovery after gastrectomy: Enhanced Recovery After Surgery (ERAS(R)) Society recommendations. *The British journal of surgery* 101(10):1209-1229.
71. Zeinali F, Stulberg JJ, & Delaney CP (2009) Pharmacological management of postoperative ileus. *Canadian journal of surgery. Journal canadien de chirurgie* 52(2):153-157.
72. Narita K, *et al.* (2008) Effect of mosapride on recovery of intestinal motility after hand-assisted laparoscopic colectomy for carcinoma. *Diseases of the colon and rectum* 51(11):1692-1695.
73. Toyomasu Y, *et al.* (2011) Mosapride citrate improves postoperative ileus of patients with colectomy. *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract* 15(8):1361-1367.
74. Okada K, *et al.* (2015) Perioperative administration of Daikenchuto (TJ-100) reduces the postoperative paralytic ileus in patients with pancreaticoduodenectomy. *Hepato-gastroenterology* 62(138):466-471.
75. Piotrowska AP, Solari V, & Puri P (2003) Distribution of interstitial cells of Cajal in the internal anal sphincter of patients with internal anal sphincter achalasia and Hirschsprung disease. *Archives of pathology & laboratory medicine*

- 127(9):1192-1195.
76. Der T, *et al.* (2000) Interstitial cells of cajal and inflammation-induced motor dysfunction in the mouse small intestine. *Gastroenterology* 119(6):1590-1599.
 77. Burns AJ (2007) Disorders of interstitial cells of Cajal. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 45 Suppl 2:S103-106.
 78. Ordog T, *et al.* (2004) Purification of interstitial cells of Cajal by fluorescence-activated cell sorting. *American journal of physiology. Cell physiology* 286(2):C448-456.
 79. Ordog T, Redelman D, Horowitz NN, & Sanders KM (2004) Immunomagnetic enrichment of interstitial cells of Cajal. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 286(2):G351-360.
 80. Koh SD, Sanders KM, & Ward SM (1998) Spontaneous electrical rhythmicity in cultured interstitial cells of cajal from the murine small intestine. *The Journal of physiology* 513 (Pt 1):203-213.
 81. Singer CA, Salinthon S, Baker KJ, & Gerthoffer WT (2004) Synthesis of immune modulators by smooth muscles. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 26(6):646-655.
 82. Van Linthout S, Miteva K, & Tschöpe C (2014) Crosstalk between fibroblasts and inflammatory cells. *Cardiovascular research* 102(2):258-269.
 83. Kurahashi M, *et al.* (2008) Platelet-derived growth factor signals play critical roles in differentiation of longitudinal smooth muscle cells in mouse embryonic gut. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society* 20(5):521-531.
 84. Torihashi S, *et al.* (2009) The expression and crucial roles of BMP signaling in

development of smooth muscle progenitor cells in the mouse embryonic gut.

Differentiation: research in biological diversity 77(3):277-289.

85. Cosyns SM, Shiva S, & Lefebvre RA (2015) Protective effect of exogenous nitrite in postoperative ileus. *British journal of pharmacology* 172(20):4864-4874.

謝辞

稿を終えるに際して、本研究を進めるにあたり懇切なる御指導を賜りました東京大学大学院農学生命科学研究科 獣医薬理学教室の尾崎博教授、堀正敏准教授、放射線動物科学研究室の村田幸久准教授に厚く御礼申し上げます。ICC の電子顕微鏡解析においては切片の作製から観察まで引き受けて下さった福井大学医学部医学科 形態機能医科学講座の飯野哲教授、堀口和秀准教授に厚く御礼申し上げます。ICC のペースメーカー機能解析においては名古屋大学大学院医学系研究科細胞生理学研究室 中山晋介准教授のご厚意によりマウスおよび実験機材の提供をしていただき、厚く御礼申し上げます。新規 NO ドナーを提供して下さった東京大学大学院薬学系研究科薬化学教室 大和田智彦教授、尾谷裕子助教、Firman 研究員に厚く御礼申し上げます。稿の修正・加筆を行うに際し、貴重な助言をして下さったネバダ大学医学部細胞生物・生理学研究室の Sanders 先生にも御礼申し上げます。また、様々な面でご協力を頂き、公私に渡って私の研究生活を支えて下さった研究室員の皆様と家族に心から感謝いたします。最後に、本研究を進めるにあたり、犠牲となった多くの動物たちに心から感謝するとともに、その霊が慰められるよう心からお祈りいたします。