

## 論文の内容の要旨

獣医学専攻

平成 24 年度博士課程入学

氏名 梶 典幸

指導教員名 尾崎 博

論文題目 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

### 背景・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氣的活動 (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といった消化管における炎症病態を持つ患者および、これらの病態モデル動物において、ICC のネットワーク構造やその機能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。一方で近年、炎症病態において Th1 サイトカインである TNF- $\alpha$  や IL-1 $\beta$  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。

以上の背景より、本研究は①*in vitro* 実験系を用いた Th1 型炎症刺激による ICC のペースメーカー機能異常と、②Th1 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

*In vitro* の ICC 機能評価系を樹立するため、マウス小腸筋層条片から直径 200-300  $\mu\text{m}$  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  $\alpha$  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。Cell cluster は明視野において自発性収縮を示し、Ca<sup>2+</sup>イメージングにより 1  $\mu\text{M}$  nifedipine 存在下で Ca<sup>2+</sup> oscillation が観察された。さらにこの Ca<sup>2+</sup> 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<sup>2+</sup> oscillation は ICC 由来であることが示唆された。これらの結果から、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高度に保持し、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。

次に、cell cluster を用いて ICC のペースメーカー機能に対する Th1 型炎症の影響を検討した。Th1 型炎症を引き起こすために IFN- $\gamma$  (25 ng/mL) と LPS (10  $\mu$ g/mL) を 24 時間同時処置 (IFN- $\gamma$  + LPS) した結果、Ca<sup>2+</sup> 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。また、cell cluster において Th1 サイトカインである IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6 の mRNA 発現が有意に増加しており、Th1 型炎症が引き起こされていた。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。

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  $\mu$ M)、または iNOS 阻害剤である 1400W (100  $\mu$ M) の前処置は IFN- $\gamma$  + LPS による ICC の機能障害を有意に抑制したことから、Th1 炎症における ICC の機能障害への 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- $\gamma$  + LPS 処置後の cell cluster における iNOS の発現上昇が確認された。

次に 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  $\mu$ M) の前処置は、IFN- $\gamma$  + LPS による ICC の機能障害を抑制する傾向を示したが、有意な差は認められなかった。また、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 (30、50、100  $\mu$ 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。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  $\mu$ M) の前処置は IFN- $\gamma$  + 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 由来酸化ストレスが大きく関与していることが示唆された。

Th1 型炎症刺激により 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- $\gamma$  + 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、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。次に cell cluster の電子顕微鏡解析を行い、ICC の微細構造に対する IFN- $\gamma$  + 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- $\gamma$  + LPS 処置後の cell cluster における ICC も同様な微細構造を呈したことから、ICC の微細構造に対する

IFN- $\gamma$  + LPS の影響は小さいことが示唆された。

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 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

腸管操作 (intestinal manipulation; IM) を行うことにより POI モデルを作製した。IM 24 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。

次に c-Kit 陽性 ICC 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ており、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。次に 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。

次に 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 の発生やその伝搬は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。

最後に、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。iNOS 阻害剤である aminoguanidine の投与は IM による 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。

## 総括

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 型炎症において ICC は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。