

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名

梶 典幸

小腸の筋層間神経叢に存在するカハール介在細胞 (ICC) は消化管運動においてペースメーカー機能を担っている。消化管の Th1 型炎症病態において、ICC の機能障害が生じることが知られているが、その詳細な分子機構は明らかとなっていない。本研究は、小腸 cell cluster 標本における in vitro 研究とマウス術後イレウスモデルにおける in vivo 研究の 2 つから構成され、Th1 型炎症を介した ICC の機能異常の機構を明らかにすることを目的としている。

第 1 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

In vitro の ICC 機能評価系としてマウス小腸筋層由来の小細胞塊 cell cluster を作製し、その特性を解析した。Cell cluster は平滑筋、神経、ICC、常在型マクロファージなど消化管筋層の構成細胞群を含むこと、また Ca^{2+} oscillation 測定により ICC のペースメーカー機能を評価できることをはじめに確認した。

Cell cluster に対する IFN- γ および LPS の 24 時間同時処置 (Th1 型炎症刺激と定義) は、ICC のペースメーカー機能を著しく障害した。c-Kit 免疫染色により、IFN- γ および LPS の 24 時間同時処置によってネットワーク構造 (c-Kit の網目状分布) が障害されることも確認した。しかし、電子顕微鏡解析により、ICC の微細構造には特段の変化は認められず、ICC の細胞体が消失するといった現象ではないことを確認した。この時、cell cluster において IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 などの Th1 サイトカインの mRNA 発現が増加していた。

次に、Th1 型炎症における ICC の機能障害に対する一酸化窒素 (NO) の関与の可能性について検討した。誘導型 NO 合成酵素 (iNOS) 阻害剤である 1400W の前処置は、Th1 型炎症刺激による ICC の機能障害を有意に抑制した。また、免疫染色および定量的 PCR により Th1 型炎症刺激後の cell cluster における iNOS の発現上昇が明らかとなった。以上より、Th1 炎症時における ICC の機能障害への iNOS 由来 NO の関与が示唆された。

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/G kinase 経路および S-ニトロシル化について各種阻害剤を用いて検討したが、これらの関与は認められなかった。そこで次に NO を介した酸化ストレスの関与について検討した。NO は superoxide と反応することで、強力な酸化能を有する peroxynitrite となり細胞障害を生じる。抗酸化剤である apocynin の前処置は Th1 型炎症刺激による ICC の機能障害を有意に抑制したことから、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関与することが示唆された。

以上、Th1 型炎症刺激後の cell cluster において c-Kit 陽性 ICC のネットワーク構造が

障害され、またペースメーカー機能も障害されることが明らかとなった。ICCの機能障害には、iNOSから産生されるNO由来の酸化ストレスが関与することも明らかとなった。

第2章

マウス術後イレウスモデルにおけるICCの病態発現解析

In vitroのcell clusterを用いて得られた結果が、生体における病態反応にも適用できるかどうかを調べるために、in vivo消化管炎症モデルとして術後イレウスモデルを用いた検討を行った。まず、腸管操作(IMと略す)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およびTh1サイトカインのmRNA発現の増加が認められ、Th1型炎症が生じることを確認した。一方、この炎症はIM48時間後には改善傾向を示した。

IM24時間後の回腸筋層においてc-Kit陽性ICCネットワーク構造が著しく障害されていた。さらに電子顕微鏡解析により、IM24時間後の回腸筋層においてICCは基本的な微細構造は保持しているが、細胞質内に異常な空胞を有することも明らかとなった。また、微小電極アレイを用いた細胞外膜電位測定により、IM24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生じることが明らかとなった。以上より、IM24時間後の回腸筋層においてICCの形態的・機能的障害が生じることが明らかとなった。

IM48時間後の回腸筋層において、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た。また、IM24時間後におけるc-Kit陽性ICCネットワーク構造の障害は、iNOS阻害剤であるaminoguanidineの投与により有意に抑制された。

以上の成績から、Th1型炎症におけるICCの機能障害にはiNOS由来NOによる酸化ストレスが関与することが明らかとなった。また、Th1型炎症においてICCは細胞死せずにc-Kit陰性のペースメーカー機能を失った形質へと変化している可能性が考えられた。本研究からICC機能障害の予防または治療にはNOS阻害剤や抗酸化剤が有効である可能性も示唆され、学術上寄与するところは少なくない。よって審査委員一同は本論文が博士(獣医学)の学位に値するものと判断した。