

## 論文の内容の要旨

論文題目 過敏性腸症候群（IBS）モデル動物における下痢発症のメカニズムについて

氏名 屋嘉比 聖一

過敏性腸症候群（Irritable Bowel Syndrome, IBS）は明らかな器質的異常がなく、慢性的に便秘や下痢を繰り返す症候群であり、日本人を含め西側諸国の 10-20%前後の人が罹患している。また、明らかな原因遺伝子などはみつかっていないが、その発症にストレスが深く関与しており、IBS 患者はストレスによって高頻度に急激な下痢を生じることが知られている。副腎皮質刺激ホルモン放出因子（Corticotropin-Releasing Factor, CRF）はストレスに関係し、消化管運動や消化管での分泌に深く関与しており、IBS の発症に強く関与していることが報告されている。今回、我々は、ストレスと関係する副腎皮質刺激ホルモン放出因子（CRF）に注目し、ストレスを直接負荷するのではなく、CRF 投与下痢を誘発するラットを IBS のモデル動物として、ストレス下の急激な下痢発症のメカニズム解明のための研究を行った。

IBS の下痢発症の機序としては消化管運動が深く関係していると考えられているが、詳細な機序についてはまだ不明な点が多く、現在治療に用いられている薬剤も、十分な効果を示しているとは言えない。副腎皮質刺激ホルモン（CRF）は消化管運動だけでなく消化管分泌にも関与していることが知られており、また、ストレス下における排便の多くは水分を多く含んでいる下痢便である。これらのことに着目し、我々は、「ストレスにより誘発される下痢が消化管運動の亢進だけでなく、消化管における水分分泌の亢進も発症の機序に深く関係しているのではないか」という仮説のもと、消化管分泌と IBS の下痢との関係性に着目し、研究を進めていくこととした。

消化管分泌に関係する因子の一つとして、血管作動性腸管ペプチド（Vasoactive Intestinal Peptide, VIP）がある。VIP は VIPoma の患者に水様性下痢を誘発することが知られており、感染性腸炎に罹患した実験動物に VIP アンタゴニストを用いることで下痢を抑制したという報告もある。IBS の患者では健常者と比較し VIP の血中濃度が高いという報告も存在するが、IBS 患者の下痢の発症において、ストレスや CRF と VIP の関係の解析は、これまで報告されていない。そこで我々は、CRF の末梢投与における排便及び下痢の発症に VIP が関与しているとの仮説を立てて、IBS 患者の下痢発症の機序を検証していくこととした。IBS における下痢の発症には CRF1 が主に関与すると考えられており、本研究においても、CRF の中でも特に CRF1 との関係

性に注目した。IBS の発症機序としては、大腸の消化管運動の関与が最も重要と考えられてきたが、本研究では消化管分泌には着目しており、病態と強く関連している消化管の部位についても評価していくこととした。

まず初めに、VIP の働きを抑制することで CRF が誘発する下痢を抑制出来るかどうかを検討した。ラットに CRF (10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) を腹腔内投与したところ、排便数の増加及び下痢の誘発を認めしたが、VIP アンタゴニスト [4Cl-D-Phe<sup>6</sup>, Leu<sup>17</sup>]VIP を同時投与することにより、排便数の増加 (8.5 $\pm$ 1.0 pellets/h vs 2.5 $\pm$ 0.8, n=11-13/group;  $p<0.01$ )、及び、下痢の誘発 (1.7 $\pm$ 0.3 vs 0.0 $\pm$ 0.0 score/h, 10/11 vs 0/13 rats,  $p<0.01$ ) は、完全に抑制された。これらの結果から CRF により誘発される排便及び下痢は VIP を介して誘導されている可能性が示唆された。

次に我々は CRF による下痢の誘発に消化管のどの部位が主に関与しているのかの検討をすることとし、免疫染色法を用いて c-Fos の発現を評価することで、活性化部位を評価していくこととした。ラットに CRF を腹腔内投与し、十二指腸・空腸・回腸・近位結腸・遠位結腸の 5 箇所より消化管を切除し、それらの部位を粘膜下層及び筋層に分けて c-Fos の発現を評価した。その結果、小腸の粘膜下層に有意な c-Fos の発現を認め、その中でも特に回腸において顕著な c-Fos の発現を認めたが、結腸粘膜下層には c-Fos の発現は認めなかった。反対に筋層においては結腸において有意な c-Fos の発現を認め、小腸では c-Fos の発現は認めなかった。また、これら c-Fos の発現と排便や下痢の出現との間には高い相関性を認めた。VIP アンタゴニストを CRF の直前に同時投与することにより、この c-Fos の発現は有意に抑制された。これらの結果より、CRF は回腸末端粘膜下層及び近位結腸の筋層を刺激し活性化することによって、下痢の誘発に関与していることが強く示唆された。また、VIP の働きを抑制することにより、この下痢の発症が抑制されることが明らかとなった。

次に我々は、CRF 刺激により活性化された神経と VIP の関係を検証するため、免疫染色法を用いて c-Fos の発現と VIP との関係について評価した。CRF を腹腔内投与することにより回腸末端粘膜下層の VIP 陽性神経の 92.2% に c-Fos の発現を認め、VIP 陽性神経と CRF-R1 が共発現していることが確認された。これらの結果から、CRF は回腸末端の VIP 陽性神経を CRF-R1 を介して直接刺激することによって、活性化していることが示唆された。

さらに我々は、この活性化された回腸末端粘膜下層の VIP 陽性神経がどのように作用しているかを検証するため、門脈中及び回腸の VIP 濃度及び回腸における VIP mRNA を測定し、VIP がどのように作用しているのかを評価することとした。また、CRF 投与後 15 分より下痢症状が出現し、30 分をピークに 60 分にて元の状態に戻るため、まずは、CRF 投与後 15 分における門脈中及び回腸末端の VIP 蛋白濃度を評価したが、CRF 投与群と生理食塩水投与群において有意な差は認めなかった (1.20 $\pm$ 0.02 vs. 1.22 $\pm$ 0.04 ng/ml, n=5-7 ; 2.11 $\pm$ 0.39 vs. 1.64 $\pm$ 0.15 ng/g, n=5-7)。同様に CRF 投与後 60 分における門脈中の VIP 蛋白濃度に CRF 投与群と生理食塩水投与群で有意

な差は認めなかったが ( $1.07 \pm 0.25$  vs.  $0.94 \pm 0.10$  ng/ml,  $n=7-9$ ; )、回腸末端では生理食塩水投与群と比較し、CRF 投与群で VIP 蛋白の濃度の有意な低下を認めた ( $2.46 \pm 0.69$ , vs  $0.83 \pm 0.31$  ng/g,  $n=7-8$ ,  $p<0.05$ )。また、CRF 投与後 60 分における回腸末端の VIP mRNA の濃度に CRF 投与群と生理食塩水投与群で有意な差は認めなかった。これらの結果より、CRF を腹腔内投与することにより、回腸末端粘膜下層において VIP を新たに合成するのではなく、元々局所に存在する VIP を放出することにより腸管分泌を刺激し下痢を誘発している可能性が示唆された。

今回の我々の実験では、ラットに CRF を腹腔内投与することにより、小腸その中でも特に回腸の粘膜下層、及び、近位結腸の筋層の神経叢を活性化していることが示された。また、この活性化された回腸粘膜下層神経叢の大部分は VIP 陽性神経であり、かつ CRF-R1 を共発現していた。また、この神経叢の活性化と下痢や排便との間には強い相関関係を認めた。これらのことより、CRF による下痢の誘発には CRF-R1 を介した回腸粘膜下層における VIP 陽性神経の活性化が深く関与している可能性が強く示唆された。また、CRF 投与により回腸末端粘膜下層の VIP の含有量が減少しており、同時に VIP mRNA には有意な変化を認めていないことから、この回腸粘膜下層の VIP 陽性神経では VIP は新たに合成されるのではなく、回腸粘膜下層神経叢に元々存在する VIP を放出することにより下痢を誘発している可能性が示唆された。それと同時に、門脈中 VIP 濃度に VIP の有意な変化は認めていないことから、この放出された VIP はそのまま局所で作用していることが示唆された。VIP レセプターアンタゴニストを投与することにより、CRF の腹腔内投与によって生じた下痢や排便を抑制することが確認できており、同時に回腸粘膜下層や結腸筋層で見られた神経叢の活性化の抑制も認めた。これらの結果から VIP を抑制することで CRF により腸管神経の活性化に伴う下痢を抑制出来る可能性が示唆された。今回の結果より、CRF によって誘発される排便や下痢の発症に VIP が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。また、VIP を抑制することで IBS 患者の突然の下痢の発症を抑制できる可能性が示唆された。現在臨床現場で使用されている VIP アンタゴニストはないが、VIP アンタゴニストは下痢型 IBS 患者の新たな治療薬の一つになる可能性があると考えられる。