

論文の内容の要旨

論文題目 心不全における腸上皮バリア機能の役割の解明

氏名 嵯峨 (加茂) 亜希子

心不全では心拍出量低下およびうっ血が起こり、腸では腸絨毛の虚血やうっ血による腸上皮障害や、腸内細菌叢の構成異常が起こる。腸上皮障害によって腸上皮からの吸収が低下すると、栄養不良となり、心臓悪液質という病態に陥りやすくなる。そして腸上皮バリアが破綻すると、腸内細菌の循環血中への移行が起こりやすくなり、腸内細菌由来のエンドトキシンが循環血中に増え、全身の炎症反応が活性化され、心不全がさらに悪化すると考えられている。また、腸内細菌叢の構成異常がおこると、エンドトキシンの他にも腸内細菌の代謝によって産生された化学物質(尿毒症毒素、トリメチルアミン-N-オキシドなど)が循環血中に移行し、心不全悪化の一因になるとも考えられている。

しかし心不全の病態における腸上皮機能障害の分子機構は全く明らかにされていない。本研究ではこれを明らかにするために、心不全モデルマウスにおける腸上皮機能の解析を行った。

本研究では、まず心不全モデルとして拡張型心筋症(以下、DCM)モデルマウス(n=2)および同腹子の野生型マウス(n=2)の腸上皮から採取した RNA で網羅的遺伝子発現解析を行った。DCM と野生型の同腹子同士をペアとして発現量を比較したところ、DCM モデルマウスの小腸上皮では、*Reg3a*、*Nts* の発現量が 2 ペアともに減少し、*Reg3b*、*Reg3g* は 1 ペアで減少していた。また、DCM マウスの大腸上皮では、*Reg3b*、*Reg3g*、*Nts*、*Tph1* の発現量が 2 ペアともに減少し、*Saal* の発現量が 2 ペアともに増加していた。

腸上皮における *Reg3a*、*Reg3b*、*Reg3g*、*Tph1*、*Nts*、*Saal* の発現量を、DCM モデルマウスおよび同腹子の野生型マウスの各群を n=5~9 に増やして、定量 RT-PCR で比較したところ、*Tph1*、*Nts*、*Saal* に関しては、小腸、大腸ともに両群間で差は認められなかった。一方、*Reg3* ファミリーの発現量は、小腸では DCM モデルマウスと野生型マウスで発現量に差は認められなかったものの、大腸では DCM モデルマウスにおいて *Reg3a*、*Reg3b*、*Reg3g* 発現量の減少傾向が見られた。

しかし DCM モデルマウスが心不全を発症するまで 40 週は必要であり、それと同腹子である高齢の野生型マウスでは個体差が大きく、有意差は認められなかった。よって、個体差を小さくするべく他の心不全モデルでの検討を行う方針とし、高用量イソプロテレノール負荷モデルマウス(以後、ISO 群マウス)を用いるとともに、経時的変化を確認する目的で、高用量イソプロテレノールを負荷して 3 日目のモデル(以後、ISO 群マウス day3)と 28 日目のモデル(以後、ISO 群マウス day28)を作成した。また対照群としては同量 PBS 投与マウス(以下、PBS 群マウス)を用意した。

ISO 群マウスが心不全モデルマウスとして適しているか判断するため、day3、day28 において各臓器重量(心体重比、肺体重比、肝体重比)、収縮期血圧、左室内径短縮率を確認したところ、

ISO 群マウスは、day3 の時点で心体重比、肺体重比、肝体重比の増加と、収縮期血圧および左室内径短縮率の低下を認め、day28 においても肝体重比の増加、収縮期血圧および左室内径短縮率の低下は継続していた。これらの結果から、ISO 群マウスは心不全モデルマウスとして適していると判断し、以後の実験を進める方針とした。

まず ISO 群マウス day3 における小腸、大腸の組織学的変化をみるため、線維化についてはマッソントリクローム染色を用い、粘膜筋層の厚さ、杯細胞の数、小腸の絨毛の長さ、大腸の陰窩の深さについては HE 染色を用いた。小腸では、PBS 群マウスおよび ISO 群マウス day3 とともに線維化はほとんど認められず、粘膜筋層の厚さも両群ともに有意差は認められなかった。一方、ISO 群 day3 マウスの絨毛は密度がまばらで、長さも短く、杯細胞の数も少ない傾向があった。大腸では、PBS 群マウスおよび ISO 群マウス day3 とともに線維化はほとんど認められず、粘膜筋層の厚さ、杯細胞の数に関しても両群ともに差は認められなかった。一方、陰窩の深さは ISO 群 day3 の方がより浅かった。

次に、ISO 群マウス day3、day28 の小腸、大腸上皮での *Reg3a*、*Reg3b*、*Reg3g* の発現量を定量 RT-PCR で確認した。小腸では、*Reg3a*、*Reg3b*、*Reg3g* の発現量は day3、day28 いずれにおいても PBS 群マウスと ISO 群マウスで差は認められなかった。一方、大腸では、ISO 群マウスにおける *Reg3b*、*Reg3g* の発現量が PBS 群マウスと比較して day3 で有意に低下しており、day28 で低下傾向であった。

腸上皮における代表的な抗菌ペプチドである *Reg3b*、*Reg3g* の減少が腸上皮バリアに及ぼす影響をみるため、FISH 法を用いて ISO 群マウス day3 の腸上皮付近の細菌量の確認を行ったところ、*Reg3b*、*Reg3g* 発現量が減少していた大腸では本来無菌であるはずの腸上皮付近への腸内細菌の部分的な付着が認められ、腸上皮バリアの破綻が示された。さらに、FITC デキストランを用いて腸透過性を調べたところ、PBS 群マウス day3 と比較して ISO 群マウス day3 での腸透過性の亢進が認められた。そして、PBS 群マウス day3 と比較して ISO 群マウス day3 の血中エンドトキシン濃度の上昇も確認された。

これらの結果から、心不全では抗菌ペプチドである *Reg3b*、*Reg3g* の発現量の減少が一因となり、大腸上皮に付着する細菌量の増加を来し、腸上皮透過性の亢進と合わせて、血中エンドトキシン濃度が上昇した可能性が考えられた。本研究によってこれまで全く明らかにされていなかった心不全における腸上皮バリア破綻の分子機構を解明する手がかりが得られた。

本研究の結果から腸上皮バリア機能の制御という全く新しいアプローチによる心不全治療の開発につながることを期待される。