

博士論文（要約）

Th2 および Th17 型免疫応答による消化管運動機能異常に関する研究

森 大祐

本論文の全文に関し、インターネット公表に対する共著者全員の同意が得られていないため公表できない。

第1章は学術雑誌に掲載されている (Neurogastroenterology & Motility 誌 vol. 23, issue 12, pp. 1111-1122)。

第2章および第3章に関しては現在共同著作物として学術雑誌に投稿準備中である。

#### 【論文の要旨】

消化管運動機能の異常は嘔吐、下痢、便秘、吸収障害などを引き起こす。また炎症時の消化管運動機能の異常は腸内フローラの構成を変え、腸内フローラ構成の変化がさらに炎症の悪化を招く要因となると考えられている。従って、消化管収縮を正常に保つことは、消化管炎症を呈する患者の QOL の向上および腸炎の改善において重要であると理解されている。これらの背景から、消化管の収縮制御とその異常の仕組みについて正しい見識を得ることは、消化管運動機能異常を伴う消化器疾患の治療を考える上でも重要である。

炎症時に活性化される T 細胞は、それぞれの細胞が産生するサイトカインにより Th1、Th2 および Th17 に分類され、それぞれの T 細胞から産生されるサイトカインが腸疾患に関与していることが知られている。本研究では、消化管運動機能の実行細胞である消化管平滑筋細胞における収縮機構の詳細な仕組みを明らかにするとともに、消化管運動機能への作用が明確となっていない Th2 ならびに Th17 細胞によって誘導されるサイトカインによる消化管運動機能異常の機構を解明することを目的とした。

### 消化管平滑筋の収縮機構に関する研究

#### 【背景・目的】

ミオシン軽鎖 (MLC) のリン酸化は平滑筋の収縮を引き起こし、MLC の脱リン酸化酵素 (MLCP) の阻害は平滑筋の収縮を増強する。MLCP 阻害による収縮張力増強機構は平滑筋の  $Ca^{2+}$  感受性増加機構と呼ばれ、CPI-17 (Thr38)、MYPT1 (Thr696) および MYPT1 (Thr853) のリン酸化が MLCP 活性阻害に関与する。しかし、消化管平滑筋の収縮における CPI-17 と MYPT1 を介した MLCP 活性阻害による収縮制御機構についての詳細は明らかとなっていない。そこで消化管平滑筋の収縮における CPI-17 と MYPT1 のリン酸化を介した MLCP 活性阻害による収縮制御機構について解明することを目的とした。

#### 【方法・結果】

SD ラットの回腸を採取し、粘膜層を除去した平滑筋層標本を作成した。以下、この標本を用いて実験を行った。回腸平滑筋の輪走筋方向の収縮を観察すると、回腸平滑筋標本は

carbachol (CCh) (1  $\mu\text{M}$ ) の刺激により、一過性の収縮と、その後、律動性収縮を含む比較的大きな持続性の収縮を起こした。そこで、回腸平滑筋の収縮に伴う CPI-17 と MYPT1 のリン酸化反応を測定した。無刺激時には CPI-17 (Thr38) のリン酸化は認められなかった。一方、MYPT1 (Thr696) と MYPT1 (Thr853) においては無刺激時から一定量のリン酸化が認められた。回腸平滑筋を carbachol で刺激し収縮を引き起こすと CPI-17 (Thr38) と MYPT1 (Thr853) においてリン酸化量は増加したが、MYPT1 (Thr696) のリン酸化量は変化しなかった。また、高濃度  $\text{K}^+$  (65.4 mM) 溶液による収縮では CPI-17 と MYPT1 のリン酸化量に変化は生じなかった。

Carbachol (1  $\mu\text{M}$ ) 刺激 5 分後の回腸平滑筋の収縮は PKC 阻害剤である Go6976 (1  $\mu\text{M}$ ) と ROCK 阻害剤である Y-27632 (10  $\mu\text{M}$ ) の処置により抑制された。この時の CPI-17 と MYPT1 のリン酸化量を測定すると CPI-17 (Thr38) は Go6976 および Y-27632 によりリン酸化が抑制された。また MYPT1 (Thr696) と MYPT1 (Thr853) のリン酸化は Y-27632 のみによって抑制された。

$\beta$ -escin により脱膜化した回腸平滑筋に GTP (100  $\mu\text{M}$ ) + CCh (1  $\mu\text{M}$ ) を処置すると  $\text{Ca}^{2+}$  感受性増加による収縮を生じた。CPI-17 (Thr38) と MYPT1 (Thr696) および MYPT1 (Thr853) のリン酸化抗体 (1:200) を中和抗体として各々単独で処置すると、いずれの場合も  $\text{Ca}^{2+}$  感受性増加による収縮は消失した。

#### 【小括】

無刺激時の回腸平滑筋において、MYPT1 (Thr696) と MYPT1 (Thr853) は一定量リン酸化されていた。受容体刺激により収縮が生じると PKC と ROCK を介して CPI-17 (Thr38) がリン酸化され、ROCK を介し MYPT1 (Thr853) のリン酸化量が増加することが明らかとなった。また回腸平滑筋の収縮においては  $\text{Ca}^{2+}$  依存的な CPI-17 と MYPT1 のリン酸化経路はないと考えられた。

回腸平滑筋の収縮における  $\text{Ca}^{2+}$  感受性増加機構には、受容体刺激によってリン酸化量が増加する CPI-17 (Thr38) と MYPT1 (Thr853) のリン酸化のみならず、無刺激時の MYPT1 (Thr696) と MYPT1 (Thr853) のリン酸化も必須であり、これらのリン酸化がすべて同時に生じることで十分な MLCP 活性阻害がおこり、収縮の  $\text{Ca}^{2+}$  感受性増加が生じると考えられ、これを Cooperative regulation 説として提唱した。

## Th2 型免疫応答による消化管運動異常に関する研究

### 【背景・目的】

Th2 サイトカインが関与する腸疾患には食物アレルギーや寄生虫感染症が挙げられる。これらの疾患では消化管運動の亢進が報告されている。しかし、Th2 サイトカインが直接消化管平滑筋の収縮に与える影響は不明である。そこで、Th2 サイトカインの IL-4 と IL-13 が消化管平滑筋の収縮に与える影響を解明することを目的とした。

### 【方法・結果】

IL-4 および IL-13 の 3 日間処置は培養組織回腸平滑筋標本の収縮に影響を与えなかった。OVA peptide (323-339) 特異的 TCR を発現する RAG2<sup>-/-</sup>/OVA23.3 マウスに卵白食 (EW) を与えると空腸炎を発症し、EW 給餌 4 日目 (EW4 日) から体重減少がみられたが、EW24 日では体重は回復した。サイトカイン mRNA 発現量を real-time PCR 法で測定すると、EW 群では EW3 日と 7 日で IL-4 と IL-13 の mRNA 量が増加した。それと同時に EW3 日では TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ が、EW7 日では IL-17A の mRNA 発現が増加した。IL-17A の mRNA は EW28 日でも増加した。次に消化管の収縮張力を検討した。空腸平滑筋輪走筋方向の CCh (1  $\mu$ M) および高濃度 K<sup>+</sup> (65.4 mM) 溶液による収縮は EW3、7 日で低下した。一方、EW28 日では空腸平滑筋の収縮に EW 群と対照群で差はなかった。Th1 サイトカインの影響で低下することが知られている CPI-17 のタンパク質発現量は、EW7 日で低下していた。

#### 【小括】

Th2 サイトカインである IL-4 および IL-13 は消化管平滑筋に直接的には作用せず収縮に影響を与えなかった。そのため、食物アレルギーや寄生虫感染モデルで報告される消化管運動の亢進は Th2 サイトカインが神経などを介して間接的に消化管平滑筋に作用した結果と考えられた。また、IL-4 や IL-13 サイトカイン発現が大きく上昇する Th2 優位の腸炎においても短期間にわずかに増加する TNF- $\alpha$ による CPI-17 の低下が消化管の収縮に大きな影響を与えたと考えられた。

### Th17 型免疫応答による消化管運動異常に関する研究

#### 【背景・目的】

近年 Th1 と Th2 と異なる T 細胞として Th17 が同定され、それから産生される IL-17 が炎症性腸疾患に深く関わる事が判明してきた。しかし、IL-17A が消化管運動機能に与える影響については不明である。そこで、IL-17A が消化管平滑筋の収縮に与える影響を解明することを目的とした。

#### 【方法・結果】

IL-17A (10 ng/ml) を 12 時間または 3 日間処置し組織培養したラット回腸平滑筋組織の CCh (1  $\mu$ M) および高濃度 K<sup>+</sup> (65.4 mM) 溶液による収縮は低下した。この収縮抑制効果は NF- $\kappa$ B 阻害剤の BAY 11-7082 (20  $\mu$ M) 処置により消失した。また、L-NAME (100  $\mu$ M) の前処置によっても IL-17A の収縮抑制作用は消失した。IL-17A 処置により、培養回腸平滑筋標本で iNOS mRNA およびタンパク質量が増加した。Whole mount 免疫染色で IL-17A により、iNOS 活性が上がる細胞は、ED2 抗体陽性の消化管常在型マクロファージであることが判明した。OVA peptide (323-339) 特異的 TCR を発現する Th17 細胞を移入した BALB/c マウスに経肛門的に OVA を処置するとマウスは大腸炎を発症した。このマウスの結腸平滑筋では iNOS mRNA 量が増加し、収縮は低下傾向を示した。

#### 【小括】

IL-17A は消化管常在マクロファージの iNOS 活性を介した NO 産生により収縮を低下させ

る。また iNOS の活性化は NF- $\kappa$ B シグナルを介して生じている。このメカニズムを介した IL-17A による消化管の収縮抑制が腸炎の悪化に寄与している可能性が動物モデルを用いた実験から示唆された。

以上の結果から、消化管平滑筋の収縮には CPI-17 および MYPT1 のすべてのリン酸化が必須であることが明らかとなった (Cooperative regulation)。また、IL-4、IL-13 は消化管平滑筋を直接的に収縮させないこと、IL-17A は消化管常在型マクロファージの iNOS 活性を介した NO により消化管収縮を抑制することが明らかとなった。これらの成果は腸炎における消化管運動異常の解明に重要な知見となり得ると考える。