

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 鈴木 敏彦

### 消化管筋層間常在型マクロファージの機能に関する研究

マクロファージは食能や抗原提示機能を有し、免疫の中心的な役割を担い、炎症反応に関与する滲出マクロファージ、および非感染時でも組織に常在する組織常在型マクロファージに大別される。腸管の筋層にも組織常在型マクロファージが存在するが、その機能についてはこれまで不明であった。近年、この筋層間常在型マクロファージ **muscularis resident macrophage (MRM)** は LPS により活性化され、NO 等を放出し腸管の収縮運動を抑制することが報告され、腸炎時の消化管運動機能の障害に深く関わる可能性が示唆された。本研究は、この MRM の機能を明らかにすることを目的としている。

#### 1. 実験方法

常在型マクロファージの特異抗体 (ED2) で腸管筋層を免疫染色し、さらに電子顕微鏡により、その微細構造を観察した。次に、MRM を筋層から単離・培養し、蛍光標識されたデキストランを与え、その食能を調べた。また、ATP、PAF、LPS 刺激による細胞内 Ca 動態を調べ、さらに ATP による活性酸素種の産生と細胞内酸性化を調べた。

MRM の炎症への関与を調べるため、先天的腸管神経節欠損による腸管の狭窄および膨大を引き起こす **Aganglionosis Rat (AR)** およびラットの回腸末端の一部を人工的に狭めた狭窄モデルを用いた。

AR の血中エンドトキシン濃度をリムルステストにより測定した。ED2 および LPS 受容体 (CD14) の特異抗体 (ED9) で腸管筋層を免疫染色し、これらの数と発現量を調べた。炎症性サイトカインである IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF $\alpha$  の mRNA および、抗炎症性サイトカインである IL-10 mRNA の発現量を RT-PCR により調べ、またこれらのサイトカインに対する抗体で免疫染色し、タンパク質発現量を調べた。

マグヌス法で、AR と狭窄モデルでの腸管輪走筋の自発性収縮頻度と、カルバコールによる収縮張力を測定した。さらに、消化管運動のペースメーカー機能を持つカハール介在細胞 (ICC) に発現している c-Kit 受容体を特異抗体で免疫染色し、ICC および MRM と収縮運動との関連を検討した。

#### 2. 実験結果

MRM は漿膜部位、筋層間神経叢、および輪走筋層内で見られた。また、偽足様突起やライゾーム、被覆小胞など MRM に特徴的な微細構造が見られた。また、筋層間神経叢では、MRM と ICC の突起との密接な接触が見られた。単離・培養した MRM は、単離直後は円形で明瞭な境界を有していたが、培養するに従い典型的なマクロファージの様相を呈した。これらの細胞はデキストランを取り込み、食能を持つことが示唆された。また、ATP、LPS および PAF 刺激により細胞内 Ca 濃度が増加しており、MRM にこれらの受容

体が存在することが示唆された。さらに、ATP によって活性酸素種が増加し細胞内 pH が低下した。以上の成績より、MRM は、他の組織マクロファージと同様の特徴を有し、食食能や oxidative burst 機構を持つことから、腸管筋層が病原体に曝露された際は、これを殺菌する役割を持つことが示唆された。

AR では、腸管膨大部の HE 染色により、粘膜層および筋層に炎症像が見られた。血中エンドトキシン濃度は対照と比べ有意に増加していた。回腸部筋層では MRM および CD14 はともに対照に比べ有意に増加していた。腸管筋層の狭窄部および膨大部でのサイトカインの mRNA の発現量は、IL-1 $\beta$  は両部位ともに、IL-6 は膨大部でのみ、IL-10 は狭窄部でのみ、対照に比べ増加していた。一方、膨大部では漿膜で、IL-6 および IL-10 が同定され、さらに漿膜の MRM で IL-10 が同定された。以上の成績より、AR では腸管膨大部で腸内細菌が増加し、一部は血中に侵入している可能性が示唆された。また、筋層中の CD14 が増加し、IL-1 $\beta$  mRNA が発現し、IL-6 も漿膜に発現しており、筋層で炎症反応が進んでいることが示唆された。さらに、漿膜の MRM に IL-10 が発現しており筋層の炎症反応を漿膜部位で、くい止める働きがあることが示唆された。

狭窄モデルの回腸部筋層では、MRM および CD14 は両者とも、対照に比べ有意に増加していた。また、筋層中の TNF $\alpha$  mRNA の発現量は、膨大部で対照より有意に増加していた。また漿膜の MRM で IL-10 が同定された。以上の成績より AR と同様、狭窄モデルでも筋層において炎症反応が進んでおり、これを漿膜部位でくい止める働きがあることが示唆された。

AR および狭窄モデルの自発性収縮頻度は、両者とも対照に比べ有意に減少していたが、カルバコール 0.1 $\mu$ M および 1 $\mu$ M による収縮反応は狭窄モデルのみ、対照に比べ有意に減少していた。以上の成績より AR および狭窄モデルの筋層では、c-Kit 陽性細胞が減少しネットワークの構造も変化していたことから、ICC の減少による腸管運動機能の低下が示唆された。

以上の実験結果から、MRM は、他のマクロファージ同様に免疫機能を持つことが示唆された。AR および狭窄モデルでは、膨大部筋層で炎症が起こり、MRM が活性化し、サイトカインなどの生理活性物質を介してこれに密接に接触している ICC を減少させ、腸管運動を抑制している可能性が示唆された。これらの知見は、これまで不明であった MRM の役割をはじめ明らかにしたものであり、学術上の重要性はいうに及ばず、今後の消化管作動薬の開発にとっても有用な知見と考えられる。よって、審査員一同は本論文が博士（獣医学）の論文として価値あるものと認めた。