

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 大瀧 剛

論文題目 腸炎時の消化管運動機能障害における IL-1 β の役割

腹痛や下痢などの症状を伴う軽度の胃炎・腸炎は誰もが経験する身近なものである。一方で深刻な腸炎疾患として、原因不明の慢性炎症であるクローン病や潰瘍性大腸炎といった炎症性腸疾患 (IBD) がある。欧米では有病率が 100-200 人に 1 人という一般的な疾患であるが、日本においてはまれであったため近年まで一般にはあまりなじみのない疾患であった。しかし生活習慣の欧米化に伴い、現在本邦のクローン病患者数は 20 年前の約 3 千人から約 2 万 5 千人に、潰瘍性大腸炎患者数は約 1 万人から約 8 万人へと急激に増加し大きな問題となっている。

一方畜産の世界では、消化器症状を呈するウィルス性および細菌性疾患に加え、多頭飼育に伴うストレスや感染症により発生する消化器障害が問題となっている。ウシのヨーネ病は症状が慢性的に推移することから特に問題となるが、近年その発生頭数が増加しており、3-6 年といった長い潜伏期ののちに慢性の下痢による消瘦、乳量の低下といった症状を起こすことから、日本のみならず世界的にも畜産業に与える打撃は大きく、慢性的な炎症のメカニズムの解明が望まれる。

慢性腸炎では、消化管における免疫異常が重要な役割を果たしており、世界的に粘膜免疫に着目した研究が精力的に行われている。一方で、これら腸炎疾患では消化管運動機能障害が観察され、腸内容の滞留などによる腸内フローラの乱れをきたすことで、病態の悪化を引き起こす原因となっている。しかし腸炎疾患において平滑筋層の炎症による消化管運動機能障害に関する研究は驚くほど遅れており、統一された見解は得られていない。

これらの背景を踏まえ、本研究は消化管平滑筋層が炎症性サイトカインに長期間暴露されることで平滑筋細胞自身に機能異常をきたすとの仮説のもと、「腸炎時の消化管運動機能障害における IL-1 β の役割」を解明することを目的として実施された。

1. 消化管平滑筋収縮機構における CPI-17 および MYPT1 の制御機構

ラット回腸平滑筋組織を carbachol で刺激すると、PKC、ROCKs、PKN 依存的に CPI-17 のリン酸化が、ROCKs 依存的に MYPT1 のリン酸化が引き起こされた。 β -escin 脱膜化標本に各種抗体を処置することで CPI-17 または MYPT1 の活性を抑制すると、Ca²⁺感受性の増加が完全に抑制された。以上の結果から、回腸平滑筋収縮において CPI-17 および MYPT1 が重要な役割を果たすことが明らかとなった。

2. IL-1 β の長期的な暴露が消化管平滑筋細胞収縮機能に及ぼす影響

ラット回腸平滑筋組織培養法により平滑筋組織を IL-1 β で 3 日間処置したところ、収縮力の抑制および MLC のリン酸化レベルの低下が認められた。 α -toxin 脱膜化標本を用いた Ca²⁺感受性の検討から、IL-1 β は RhoA/ROCKs の経路を抑制する可能性が示唆された。IL-1 β は RhoA、ROCK1/2、MYPT1 などの平滑筋収縮に関与するタンパク質の発現量に影響を与えなかったが、CPI-17 のタンパク質発現量を強く抑制した。また CPI-17 および MYPT1 のリン酸化レベルを低下させた。以上の結果から、IL-1 β の消化管への長期暴露は、平滑筋収縮機構の中で特に MLCP を阻害する内在性タンパク質 CPI-17 の発現量を顕著に減少させるとともに、MLCP の調節因子である MYPT1 と CPI-17 のリン酸化を減弱させることで MLCP 活性を増強させ、平滑筋収縮能を低下させることが示唆された。

3. 腸炎時の CPI-17 発現量と運動機能障害と CPI-17 発現抑制メカニズム

急性腸炎モデルである TNBS 誘発腸炎、慢性炎症モデルである IL-10 KO マウスにおいて収縮力と CPI-17 発現量の低下が認められた。IL-1 α/β KO マウスの回腸平滑筋組織に TNF- α を処置すると、収縮力および CPI-17 発現量が低下したのに対し、TNF- α KO マウスの回腸平滑筋組織に IL-1 β を処置しても影響がなかった。TNBS 誘発腸炎により、TNF- α KO マウスでは CPI-17 発現および収縮力が変化しなかったのに対して、IL-1 α/β KO マウスでは顕著な CPI-17 発現量および収縮力の低下が観察された。以上の結果から、*in vivo* の腸炎においても CPI-17 が運動機能障害に関与すること、さらに TNF- α が CPI-17 発現抑制に必須であり、IL-1 β は TNF- α を介してこの経路に関与することが示唆された。

4. 組織レベルでの平滑筋細胞増殖に対する IL-1 β の作用

ラット平滑筋単離培養細胞に IL-1 β を処置すると、細胞増殖の促進が認められた。回腸平滑筋組織を 10% FBS で 3 日間培養すると、無血清のコントロール群に比べ単位面積あたりの平滑筋細胞数の増加、増殖マーカーである PCNA および BrdU 陽性の平滑筋細胞数の増加が認められた。IL-1 β 、NO、PGE₂ を 10% FBS とともにそれぞれ単独で処置すると、FBS による平滑筋細胞の増殖はいずれの処置によっても抑制された。IL-1 β は平滑筋組織内常在型マクロファージの iNOS および COX-2 の発現、NO および PGE₂ 産生を誘導した。以上の結果から、消化管において IL-1 β は、培養細胞レベルでは平滑筋細胞増殖を誘導するが、組織レベルでは、IL-1 β の平滑筋細胞増殖を誘導する直接的な作用よりも、常在型マクロファージにおける一酸化窒素 (NO)・プロスタグランジン類の産生を介した、平滑筋細胞増殖を抑制する作用の方が強く現われることが示唆された。

以上のように本研究は、これまであまり研究のされてこなかった消化管筋層部の免疫応答に注目し、IL-1 β を中とする炎症性サイトカインの長期的な暴露が平滑筋細胞に直接作用してその収縮機構を抑制することを明らかにしたものであり、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。