

論文の内容の要旨

論文題目 クロウン病モデル動物における消化管運動機能障害に関する研究

氏名 木 下 一 哉

クローン病は口腔から肛門まで広範囲にわたり全層性の炎症を引き起こす疾患で、本邦では厚生労働省の特定疾患（難病）に指定されている。クローン病患者では消化管運動の抑制が報告されており、その結果、下痢やイレウスの発生がみられる。しかし、クローン病患者における消化管運動機能不全の詳細なメカニズムは不明である。

消化管は自動能を持ち自発的に収縮を繰り返す。この自発収縮が神経ネットワーク(アウエルバッハ神経叢あるいは筋層間神経叢)で統合化され、システム化された蠕動運動となって消化管内内容物の攪拌や輸送が可能となる。消化管の自発収縮は、カハールの介在細胞(以下 ICC)の律動的な電気興奮によりなされている。ICC はアウエルバッハ神経叢と同一平面上にネットワーク構造を形成するが、実はこのネットワーク上には常在型マクロファージが多数分布し、このマクロファージが消化管運動に関与する可能性が示唆されている。

本研究ではクローン病による消化管運動機能障害のメカニズムを明らかにする目的で、消化管運動に関与する上述の細胞群の炎症による変化、消化管運動の変化及び炎症性サイトカインの関わりについて、ハプテンである 2,4,6, trinitrobenzenesulfonic acid(以下 TNBS)誘発クローン病モデルラットあるいはマウスから摘出した消化管平滑筋を用い、特に以下の 3 点に着目し実験を行った。

(1)ICC、アウエルバッハ神経叢、常在型マクロファージ、自発収縮および蠕動運動がどのように変化するか。

(2) 消化管平滑筋の刺激誘発収縮に対する炎症性変化とその分子機構。

(3) TNF α 欠損マウスを用いた TNBS 誘発腸炎における TNF α の役割。

(1) TNBS 誘発腸炎における ICC、神経、筋層間常在型マクロファージの変化

(方法)

TNBS により結腸に炎症を惹起し、2 及び 7 日後の結腸平滑筋標本の ICC、神経叢、常在型マクロファージを免疫染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用い、形態学的変化を検討した。また、結腸輪走筋標本の自発収縮、結腸全標本の蠕動運動の変化についても検討した。

(結果と考察)

TNBS 処置により、ICC と神経のネットワーク構造の破綻、消失などの変化が見られた。また、常在型マクロファージの数が増加し、形態変化も認められた。さらに、ICC あるいは神経と常在型マクロファージを二重染色すると、TNBS 処置により筋層間の ICC や神経の形態変化が特に顕著に見られた部位では、常在型マクロファージの変化も強かった。さらに、TNBS 処置した結腸輪走筋の自発収縮は強く抑制され、結腸全標本の tetrodotoxin 感受性(神経性)の蠕動運動も抑制された。

(2) TNBS 誘発腸炎における結腸輪走筋の収縮性の変化とその分子機構

(方法)

TNBS 誘発クローン病モデルラットより結腸輪走筋を摘出し、各種刺激による収縮反応を測定した。また、収縮蛋白系の変化を検討する目的で、Staphylococcal α -toxin (α -toxin) で脱膜化した輪走筋標本の収縮能についても検討した。次に、収縮に重要な因子である電位依存性 L 型 Ca チャネルの変化を検討するために単離結腸輪走筋細胞を作製し、パッチクランプ法を用いた電気生理学的解析と生化学的解析を行った。

(結果と考察)

TNBS 誘発クローン病モデルラット結腸より摘出した結腸輪走筋標本では高濃度カリウム、carbachol による収縮が抑制された。この収縮抑制は、炎症性のメディエーターとして知られている prostaglandin や nitric oxide の阻害剤処置により影響を受けなかった。このことより TNBS による収縮の抑制は筋原性(平滑筋自身)の変化によるものであることが示唆された。

α -toxin により脱膜化したラット結腸輪走筋標本において、Ca 収縮の絶対張力と Ca 感受性は TNBS 処置により変化しなかった。このことより、TNBS 誘発腸炎による収縮の抑制に平滑筋収縮蛋白系の変化は関与しないと考えられた。

次に、消化管平滑筋の興奮-収縮連関を調節している電位依存性 L 型 Ca チャネル活性に対する TNBS 処置の影響を検討した。Vehicle 処置したラット結腸輪走筋標本における自発性収縮は、L 型 Ca チャネル活性化薬 BayK8644 により増強したが、TNBS 処置した標本ではこの作用は消失

した。さらに、ホールセルパッチクランプ法でL型Caチャンネル電流を観察したところ、TNBS処置したラット結腸より単離した輪走筋細胞では、vehicle処置と比べ脱分極パルスによるCaチャンネル電流が有意に小さかった。また、vehicle処置ラットより単離した輪走筋細胞ではBay K 8644によりCaチャンネル電流の増強が見られたが、TNBS処置した輪走筋細胞では電流の増強は見られなかった。

リアルタイムRT-PCR法、ウエスタンブロット法によりL型Caチャンネルのpore-formingサブユニットである $\alpha 1c$ サブユニットの発現を検討したが、mRNAならびに蛋白の発現はともにTNBS処置により変化しなかった。以上の成績から、TNBS処置によるL型Caチャンネル電流の抑制はL型Caチャンネルの機能異常により生じると考えられた。

NF- κ Bは炎症性サイトカイン等の炎症性メディエーターの発現に関与する転写因子であり、クローン病炎症にNF- κ Bが深く関与することが報告されている。しかし、消化管運動機能不全とNF- κ Bとの関連についての報告はない。本研究では、TNBS処置による平滑筋収縮とCaチャンネル活性の障害に、NF- κ Bが関与するかどうかを検討する目的でNF- κ B阻害剤(PDTC、sulfasalazine)の影響について検討した。NF- κ B阻害剤をTNBS処置2時間前と24時間後に腹腔内投与すると、TNBS処置による高濃度カリウム、carbachol、BayK8644収縮の減弱、Caチャンネル電流の減少はともに部分的ではあるが回復した。

以上の成績から、TNBS処置による結腸輪走筋の運動機能異常はL型Caチャンネルの機能的変化が原因と考えられた。さらに、L型Caチャンネルの機能的変化にはNF- κ B依存性の炎症性サイトカインの関与の可能性が示唆された。

(3) TNBS誘発腸炎におけるTNF α の機構解析:TNF α 欠損マウスを用いた検討

(方法)

野生型マウスおよびTNF α 欠損マウスの結腸にTNBSを注入し、2日後に結腸を摘出し、ヘマトキシリン-エオジン染色による組織学的検討を行った。さらに、好中球遊走の指標となるミエロペルオキシダーゼ(MPO)活性、ELISA法による炎症性サイトカイン量、結腸輪走筋の収縮などの測定を行った。

(結果と考察)

TNF α 欠損マウスでは野生型マウスと比較してTNBS処置による大腸の炎症が肉眼的にも軽度であり、大腸炎に特徴的な大腸の長さの短縮も見られなかった。組織学的検討でも野生型マウスではTNBS処置により上皮細胞の損傷、壊死、平滑筋層の水腫、炎症性細胞浸潤が見られたが、TNF α 欠損マウスでは粘膜下織に水腫、炎症性細胞の浸潤が見られるものの、上皮の損傷は軽度であった。また、平滑筋層の変化も野生型マウスと比較すると軽度であった。さらに、炎症の指標であるMPO活性は、TNF α 欠損マウスの粘膜層、平滑筋層ともに野生型マウスよりも有意に低値であ

った。

次に、TNBS 処置した時の粘膜、平滑筋層の炎症性サイトカインの上昇について検討した。野生型マウスでは TNBS 処置により炎症性サイトカインである $\text{TNF}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\beta$ 及び IL-6 の発現量が結腸粘膜および平滑筋層で上昇したが、 $\text{TNF}\alpha$ 欠損マウスではその上昇は野生型マウスと比較すると弱かった。また、粘膜層と平滑筋層ではサイトカイン変化のプロファイルには差が認められた。

野生型マウスの結腸輪走筋では、TNBS 処置により高濃度カリウム、carbachol、BayK8644 による収縮が有意に抑制されたが、 $\text{TNF}\alpha$ 欠損マウスでは収縮の抑制は見られなかった。さらに、器官培養法を用いた検討では、 $\text{TNF}\alpha$ 処置により結腸縦走筋収縮が抑制され、 $\text{TNF}\alpha$ が直接平滑筋に作用して収縮抑制をもたらしている可能性が示唆された。

以上の成績から、TNBS で惹起される炎症、炎症性サイトカインの上昇、消化管運動機能障害は $\text{TNF}\alpha$ が深く関与することが示唆された。さらに、粘膜層と平滑筋層ではサイトカインプロファイルに差が認められたが、このことから平滑筋層には粘膜層とは性質を異にするに独自の免疫系が存在することが示唆された。

(まとめ)

本研究より、消化管の運動機能障害に関わる筋層に炎症が生じること、そしてこの炎症には $\text{TNF}\alpha$ が主要な役割をはたすことが明らかとなった。消化管に炎症が発症すると $\text{TNF}\alpha$ や $\text{IL-1}\beta$ をはじめとする様々な炎症性サイトカインが産生され、これによって ICC、アウエルバツハ神経叢、常在型マクロファージ、平滑筋細胞などが二次的に障害を受け、その結果として消化管の運動機能不全が惹起されると想像される。TNBS による炎症は形態学的、免疫学的にクローン病と酷似していることが報告されている。ヒトにおけるクローン病の症例においても同様の分子機構で消化管運動機能障害が起こっている可能性が考えられ、今後検証されることが期待される。本研究により、これまで蓄積された粘膜病変の研究に加えて筋層病変の重要性が再認識された。これらの成果がクローン病の薬物治療あるいは病態管理に役立てられることが望まれる。