

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 木下 一哉

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

クローン病は口腔から肛門までの広範囲に全層性の炎症を引き起こす疾患で、消化管運動抑制が報告されている。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。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細胞群の炎症性変化、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、2,4,6, trinitrobenzenesulfonic acid (以下 TNBS) 誘発腸炎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、実験を行っている。

1. TNBS 誘発腸炎におけるカハールの介在細胞 (ICC)、神経、筋層間常在型マクロファージの変化

ここでは、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、常在型マクロファージを免疫染色し、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。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、TNBS 処置により筋層間の ICC や神経の形態変化が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く、TNBS 処置した結腸輪走筋の自発収縮 (筋原性) と結腸全標本の蠕動運動 (神経性) が抑制されていた。

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

TNBS 誘発腸炎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、L 型 Ca チャネル活性の変化をパッチクランプ法を用いて検討した。TNBS 処置したラット結腸輪走筋標本では高濃度カリウム、carbachol、L 型 Ca チャネル活性薬 Bay K 8644 による収縮が抑制された。L 型 Ca チャネル電流の観察では、TNBS 処置した結腸輪走筋細胞の Ca チャネル電流は vehicle 処置と比べ小さかった。また、TNBS 処置した輪走筋細胞では Bay K 8644 による電流の増強は見られなかった。しかし、チャネルの発現は 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 チャネル電流の抑制はチャネルの機能異常によると考察した。

次に、TNBS 処置による平滑筋収縮と Ca チャネル活性の障害に対する NF- κ B 阻害剤 (PDTC、sulfasalazine) の影響について検討した。NF- κ B 阻害剤投与により、TNBS 処置による高濃度カリウム、carbachol、BayK8644 収縮の減弱、Ca チャ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 チャネルの機能変化が原因と考えられ、それには NF- κ B を介した経路の関わる可能性を示唆している。

3. TNBS 誘発腸炎における TNF α の機構解析

野生型および 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、組織学的検討、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。TNF α 欠損マウスでは野生型マウスと比較すると TNBS による炎症は軽度であり、細胞浸潤の指標である MPO 活性も、TNF α 欠損マウスの粘膜、平滑筋層ともに野生型マウスよりも低値であった。

次に、TNBS 処置した野生型マウスの粘膜、平滑筋層では TNF α 、IL-1 β 及び IL-6 の発現量が上昇したが、TNF α 欠損マウスではその上昇は野生型マウスより弱かった。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、TNF α 欠損マウスでは収縮の抑制は見られなかった。器官培養法を用いた検討では、TNF α 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 で惹起される炎症性変化と消化管運動機能障害は TNF α が深く関わることを示唆された。さらに、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。

以上の成績より、消化管の運動機能障害に関わる筋層の炎症には TNF α が主要な役割をはたすことが明らかとなった。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、粘膜病変に加えて筋層病変の重要性が再認識された。これらの知見は、学術上の重要性はいうに及ばず、今後の消化器系作用薬の開発にとっても有用な知見と考えられる。よって、審査委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。