

## 論文の内容の要旨

獣医学 専攻  
平成 21 年度博士課程 入学  
氏 名 岩永 剛一  
指導教員名 尾崎 博

論文題目 消化管粘膜損傷回復機構における腸筋線維芽細胞の薬理学的研究

【緒言】腸筋線維芽細胞は粘膜上皮細胞直下に存在する間葉系由来の細胞である。腸筋線維芽細胞の機能を解析するために、マウスやラット等の実験動物から単離した腸筋線維芽細胞が実験に用いられている。しかし、これらの実験動物の消化管は小さいため、多数の細胞を得るためには一度に多くの動物から単離する必要がある。したがって、より多くの細胞を一個体から得られる単離腸筋線維芽細胞を樹立する必要がある。

腸筋線維芽細胞は粘膜上皮細胞とともに粘膜バリア機能を担う。例えば、腸筋線維芽細胞は粘膜上皮細胞同士が形成する **tight junction** の強度を高める。また、粘膜上皮細胞の増殖活性や遊走活性を調節することで、粘膜上皮細胞が損傷した際に、損傷からの回復を促進する。潰瘍性大腸炎やクローン病等の慢性腸炎の罹患患者数が近年増加している。慢性腸炎時には粘膜バリア機能が破綻して、感染症罹患の危険性が高まる。そのため、粘膜バリア機能回復促進機構を解明することは非常に重要である。しかし、腸筋線維芽細胞の損傷回復機構に関しては未解明な点が多い。

Cyclooxygenase (COX) はアラキドン酸を代謝してプロスタグランジン類 (PGs) を産生する酵素である。COX には恒常的に発現している COX-1 と、炎症時に発現が誘導される

COX-2 の 2 つのサブタイプがある。PGE<sub>2</sub> は COX によって産生される主要な PG であり、4 つの受容体 EP1-4 に作用して機能を発揮する。マウスの消化管潰瘍モデルにおいて、PGE<sub>2</sub> は EP4 を介して潰瘍の治癒促進に関与することが報告されている。また、マウス慢性腸炎モデルにおいて、腸筋線維芽細胞は COX-2 を強く発現していることが明らかとなっている。以上から腸筋線維芽細胞における COX-PGE<sub>2</sub> シグナル経路が粘膜損傷治癒に重要であることが示唆される。

ATP をはじめとするヌクレオチドは、細胞外において炎症性メディエータや神経伝達物質として働く。細胞外ヌクレオチドは P2 受容体を介して機能を発揮することが知られている。P2 受容体はイオンチャネル型の P2X (P2X<sub>1-7</sub>) と G 蛋白質共役型の P2Y (P2Y<sub>1, 2, 4, 6, 11-14</sub>) に分類される。マクロファージや好中球等の炎症細胞は ATP を放出することが知られている。また、ダメージを受けた死細胞からも ATP は放出される。放出された ATP は炎症反応を増強してアレルギー性の喘息等を悪化させる一方で、組織の損傷回復を促進することも分かってきた。例えば、ATP は角膜上皮細胞の P2X<sub>7</sub> や気道の上皮細胞の P2Y<sub>2</sub> を介して、細胞の損傷回復を促進するという報告がある。以上より ATP が腸管の粘膜損傷回復過程においても重要な役割を果たしている可能性が考えられる。

【目的】 これらの背景を踏まえて、本研究では以下を目的とした。

- ① 一個体のウシ結腸からは多くの腸筋線維芽細胞を単離できる。さらに、ウシの結腸は食用として採取されているため、新たに実験動物の命を奪う必要がない。以上の理由から、ウシの結腸より腸筋線維芽細胞の単離を試み、その細胞の特徴解析を行う。
- ② 腸筋線維芽細胞の損傷回復機構を明らかにするため、腸筋線維芽細胞の損傷回復過程における COX とその代謝産物 PGE<sub>2</sub> の役割について検討する。
- ③ 腸筋線維芽細胞の損傷回復過程におけるヌクレオチドの役割について検討する。

【方法と結果】 EDTA 処置により上皮細胞を除去したウシ結腸粘膜層を explant 法により培養して、ウシ腸筋線維芽細胞を単離した。RT-PCR 法と免疫染色法により、単離細胞が腸筋線維芽細胞のマーカーである  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) と vimentin を発現していることを確認した。続いて、細胞の形態や増殖活性に対する継代の影響を検討した。その結果、passage 3 と passage 7 の細胞では形態や増殖活性に違いは見られなかったが、passage 11 の細胞では細胞の老化の特徴とされる、円形化や巨大化といった形態の変化や増殖活性の低下が観察された。一方で、ラット腸筋線維芽細胞では、より早期から (passage 4) 細胞の老化の特徴が観察された。細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度 ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) 測定により、ATP (0.3-1  $\mu$ M)、serotonin (0.1-1  $\mu$ M)、endothelin-1 (10-100 nM)、bradykinin (1-10 nM) は濃度依存的にウシ腸筋線維芽細胞の [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> を上昇させることが分かった。しかし、passage 11 の細胞ではこれらの生理活性物質に対する [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 応答が低下していた。

以上より、ウシ腸筋線維芽細胞はラットの細胞と比べてより長期間、形態や増殖活性、生理活性物質に対する反応性を維持していることが分かった。

続いて単離したウシの腸筋線維芽細胞を用いて、腸筋線維芽細胞の損傷回復に対する COX とその代謝産物 PGE<sub>2</sub> の影響について第 4 章で検討した。細胞にピペットチップで傷をつけて損傷刺激を与えた。その結果 COX-2 の mRNA 発現量と培養上清中への PGE<sub>2</sub> 分泌量が損傷刺激 1 および 6 時間後にそれぞれ増加していることを RT-PCR 法と EIA 法により確認した。コンフルエントに培養した細胞にピペットチップで傷をつけて 24 時間培養した所、傷口は小さくなっていた。COX-1/2 阻害薬の indomethacin (1 μM) は細胞の損傷回復を約 4 割抑制した。COX-2 阻害薬の CAY10404 (10 μM) も indomethacin (1 μM) と同等の細胞の損傷回復阻害効果を示した一方で、COX-1 阻害薬の SC560 (100 nM) は細胞の損傷回復に影響を与えなかった。

次に、EP1-4 のどの受容体サブタイプが細胞の損傷回復に関与しているかを各受容体拮抗薬および 作動薬を用いて検討した。その結果、EP2 拮抗薬 (10 μM) 、EP3 拮抗薬 (1 μM) 、EP4 拮抗薬 (10 μM) は細胞の損傷回復を阻害した。また、indomethacin (1 μM) による細胞の損傷回復阻害効果を EP2、EP3、EP4 の各作動薬 (1 μM) は解除した。細胞の損傷回復は一般的に傷口周辺の細胞が増殖または傷口に遊走した結果生じる。EP2、EP3、EP4 の各作動薬 (1 μM) は腸筋線維芽細胞の遊走活性を上昇させた。一方で、PGE<sub>2</sub> は増殖活性には影響を与えなかった。チロシンキナーゼ型受容体阻害薬は EP2/EP4 の活性化による遊走活性上昇を阻害したが、EP3 による遊走活性上昇には影響を与えなかった。RT-PCR 法により、EP2/EP4 の活性化は fibroblast growth factor-2 (FGF-2) の発現を誘起することが分かった。また、FGF-2 (10 ng/ml) は細胞の遊走活性を上昇させた。以上から、腸筋線維芽細胞に損傷刺激を与えると COX-2 依存的に PGE<sub>2</sub> を産生することが明らかとなった。産生された PGE<sub>2</sub> はオートクライン的に作用して EP3 を活性化させ、細胞の遊走活性上昇を引き起こした。また、PGE<sub>2</sub> は EP2/EP4 を活性化させて FGF-2 等の成長因子産生を増強することで、二次的に細胞の遊走活性を亢進させ、損傷回復を促進することも分かった。

第 4 章で、損傷刺激によって生じる COX-2 の発現量および PGE<sub>2</sub> の産生量の増加が、腸筋線維芽細胞の損傷回復を促進することが明らかとなった。しかし、損傷刺激によって COX-2 が発現誘導される機構は明らかでない。物理的な損傷を受けた細胞は、細胞外にヌクレオチドを放出することが知られている。そこで第 5 章では、腸筋線維芽細胞の損傷刺激による COX-2 発現誘導に対するヌクレオチドの影響を検討した。損傷刺激 24 時間後の細胞の損傷回復量を測定したところ、P2 受容体の非特異的拮抗薬の suramin (30-100 μM) は濃度依存的に腸筋線維芽細胞の損傷回復を阻害した。第 4 章で確認したように、indomethacin (1 μM) の処置は腸筋線維芽細胞の損傷回復を約 4 割阻害した。しかし、suramin (30 μM) を処置した細胞に、indomethacin (1 μM) を追加処置しても細胞の損傷回復に影響を与えなかった。RT-PCR 法と ELISA 法により、COX-2 の mRNA 発現量および PGE<sub>2</sub> の培養上清中への分泌量が、損傷刺激後 2 および 6 時間後にそれぞれ増加して

おり、この増加は suramin (30  $\mu\text{M}$ ) により完全に抑制されることが分かった。以上から、P2 受容体シグナルが損傷刺激による COX-2 の発現量増加に関与していることが示唆された。

次に、どの P2 受容体サブタイプが損傷刺激による COX-2 の発現量増加に関与しているのかを検討した。安定化 ATP アナログの ATP $\gamma$ S (1  $\mu\text{M}$ ) および P2Y<sub>1</sub>、<sub>11-13</sub> 作動薬の ADP (10  $\mu\text{M}$ ) は COX-2 の mRNA 発現量を増加させた。ATP $\gamma$ S (1  $\mu\text{M}$ ) による COX-2 の mRNA 発現量増加は、suramin (30  $\mu\text{M}$ ) や P2X、P2Y<sub>1</sub>、<sub>4</sub>、<sub>6</sub>、<sub>13</sub> 拮抗薬の PPADS (30  $\mu\text{M}$ ) により完全に抑制された。以上より、P2Y<sub>1</sub> または P2Y<sub>13</sub> が COX-2 の発現量増加に関与していることが示唆された。P2Y<sub>1</sub> は G<sub>q</sub> 蛋白質と共役しており、P2Y<sub>1</sub> の活性化は phospholipase C (PLC) の活性化を引き起こす。P2Y<sub>13</sub> は G<sub>i</sub> 蛋白質と共役している。PLC 阻害薬の U-73122 (1  $\mu\text{M}$ ) は ATP $\gamma$ S (1  $\mu\text{M}$ ) による COX-2 の mRNA 発現量増加を抑制した一方で、G<sub>i</sub> 蛋白質の阻害薬の pertussis toxin (100 ng/ml) は COX-2 の mRNA 発現量に影響を与えなかった。以上から、P2Y<sub>1</sub> が損傷刺激による COX-2 の発現量増加に関与していることが分かった。

続いて、P2Y<sub>1</sub> の活性化がどのような細胞内シグナル経路を介して COX-2 の mRNA 発現を誘起するのかを検討した。その結果、ATP $\gamma$ S (1  $\mu\text{M}$ ) による COX-2 の mRNA 発現量増加は、P38 mitogen-activated protein kinases (P38 MAPK) 阻害薬の PD169316 (10  $\mu\text{M}$ )、protein kinase C (PKC) 阻害薬の bisindolylmaleimide I (1  $\mu\text{M}$ ) によって阻害された。

以上の結果より、損傷刺激による腸筋線維芽細胞の COX-2 の発現量増加は、P2Y<sub>1</sub> シグナルが P38 MAPK と PKC の活性化を介して誘起することが明らかとなった。

【結語】本研究では、まずウシ腸筋線維芽細胞の性状解析を行った (第 3 章)。その結果、ウシの腸筋線維芽細胞の生理活性物質に対する Ca<sup>2+</sup> 応答は、ラットの細胞と同様の応答を示した。また、ウシの腸筋線維芽細胞はラットの細胞と比べて、より長期間形態や増殖活性を維持することも分かった。これらの結果より、腸筋線維芽細胞の機能解析をする上で、この細胞は有用なツールとなりうる。ウシの腸筋線維芽細胞は食用として採取されたウシの結腸から細胞を単離するため、新たに動物の命を奪う必要がない。したがって、本研究の成果は実験動物の使用頭数の削減、ひいては動物福祉の向上につながるであろう。

続いて第 4 章と第 5 章で、腸筋線維芽細胞の損傷回復機構における COX/PGE<sub>2</sub> シグナル経路と細胞外ヌクレオチドの役割を明らかにした。腸筋線維芽細胞の損傷回復促進機構を解明することは、腸管のバリア機能の回復を促進することにつながると考えられる。そのため、本研究でその一端を明らかにすることが出来た点は非常に意義深い。今後、腸筋線維芽細胞を標的とした、破綻した粘膜バリアの修復を促進する新たな治療法の開発に本研究の成果が役立つことを願う。