［別紙２］

論文審査の結果の要旨

申請者氏名　岩永　剛一

【背景･目的】

腸筋線維芽細胞（IMF）は粘膜上皮直下に存在する細胞である。IMF の機能解析に、マウスやラットから単離した細胞が実験に用いられている。しかし、これらの動物の消化管は小さく、得られる細胞数に限りがある。したがって、より多くの細胞を得られる単離 IMF の樹立が必要である。

IMF は粘膜バリア機能を担う。腸炎時にはこの機能が破綻して感染症罹患の危険性が高まるため、粘膜バリア機能回復促進機構を解明することは重要である。しかし、IMF の損傷回復機構に関しては未解明な点が多い。

以上から本研究では、より多くの細胞を単離できる、ウシ結腸より IMF を単離し、特徴解析を行うことを第一の目的とした。さらに、IMF の損傷回復機構を明らかにするため、組織修復を促進するヌクレオチドおよび COX とその代謝産物 PGE2 の、IMF の損傷回復過程における役割検討を第二の目的とした。

【結果】

1)　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 IMF を単離した。継代数 3-7 のウシ IMF では形態や増殖活性、生理活性物質に対する Ca 応答に違いはなかったが、継代数 11 の細胞では細胞の老化に特徴的な形態の変化や、増殖活性、Ca 応答の低下が観察された。一方でラット IMF では、継代数 4 で細胞の老化の特徴が観察された。以上より、ウシの細胞は長期間、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。

2)　続いてウシ IMF を用いて、IMF の損傷回復に対するヌクレオチドおよび COX とその代謝産物 PGE2 の影響について検討した。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（損傷回復）。ヌクレオチド受容体 P2 拮抗薬は細胞の損傷回復を約 5 割阻害した。また、COX 阻害薬と COX-2 阻害薬は細胞の損傷回復を約 4 割抑制した。P2 拮抗薬に加えて COX 阻害薬を追加処置したところ、P2 拮抗薬単独処置と同程度の細胞の損傷回復阻害効果を示した。RT-PCR と ELISA により、COX-2 の mRNA 発現量と PGE2 産生量が、損傷刺激 2、6 時間後に各々増加し、この増加を P2 拮抗薬は完全に抑制することが分かった。以上から、損傷刺激により P2 受容体シグナルを介して COX-2 の発現量および PGE2 産生量増加が誘起され、細胞の損傷回復が促進される可能性が示唆された。

3)　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 ATPγS および P2Y1、11-13 作動薬は COX-2 の発現量を増加させた。ATPγS による COX-2 の発現量増加は P2X、P2Y1、4、6、13 拮抗薬により完全に抑制された。以上より、P2Y1 または P2Y13 が COX-2 の発現量増加に関与していることが示唆された。P2Y1 は Gq 蛋白質と共役し、その活性化は phospholipase C（PLC）の活性化を引き起こす。そして、P2Y13 は Gi 蛋白質と共役している。PLC 阻害薬は ATPγS による COX-2 の発現量増加を抑制した一方で、Gi 蛋白質阻害薬は COX-2 の発現量に影響を与えなかった。以上から、ATP/P2Y1 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。

4) さらに、ATPγS による COX-2 の発現量増加は、P38 mitogen-activated protein kinases（P38 MAPK）阻害薬、protein kinase C（PKC）阻害薬によって阻害された。以上から、損傷刺激による IMF の COX-2 の発現量増加は、ATP/P2Y1 シグナルが P38 MAPK と PKC の活性化を介して誘起することが分かった。

5) 続いて、PGE2 受容体 EP1-4 の損傷回復への関与を検討した。その結果、EP2、EP3 、EP4 の各拮抗薬は細胞の損傷回復を阻害した。さらに、EP2、EP3、EP4 の各作動薬は細胞の遊走活性を上昇させた。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）の発現を誘起し、FGF-2 は細胞の遊走活性を上昇させることが分かった。以上から、損傷刺激により IMF から産生された PGE2 は、オートクライン的に EP3 を活性化させ、細胞の遊走活性上昇を引き起こすことが分かった。また、PGE2 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。

以上を要約すると、本研究は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性質を解明したものであり、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）の学位論文に値するものと判断した。