

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 貴田 大樹

---

### 【背景・目的】

胆汁酸は肝臓・胆管・腸管・門脈で構成される腸肝循環経路内に大量にプールされており、脂質を乳化して腸管壁からの吸収を促進する物質として古くから知られている。近年、この脂質乳化作用だけでなく、胆汁酸が細胞応答を引き起こすシグナル分子として機能することがわかってきた。例えば、胆汁酸受容体として発見された TGR5 や FXR の活性化を介して、胆汁酸が糖や脂質の代謝を制御することが報告されている。

胆汁酸は腸肝循環経路のみならず、全身血中にも大量に存在することが分かっている。つまり、血管の内側を覆う血管内皮細胞は、常に高濃度の胆汁酸に暴露されている。興味深いことに、血管組織においても TGR5 と FXR の発現が確認されている。そこで、本研究は胆汁酸受容体 TGR5 や FXR の刺激が血管組織の機能に与える影響について検討した。

### 【結果】

#### 1) TGR5 の刺激は内皮細胞の NO 産生を促進し、単球の接着を抑制する

高血圧や高脂血症において、刺激を受けた内皮細胞は表面に接着分子を発現する。これが血管への単球の接着、蓄積を促し、動脈硬化症を引き起こす要因となる。一方で内皮細胞は NO を産生して単球の接着を防ぐ機能を持ち合わせており、この機能の維持と強化が動脈硬化症を防ぐ上で重要である。本項目では TGR5 の刺激が内皮細胞の NO 産生と単球の接着反応に与える影響を検討した。炎症刺激を与えた内皮細胞に TGR5 作動薬を処置すると、接着分子の発現量が減少し、単球の接着数が減少した。この現象は TGR5 刺激が内皮細胞の NO 産生を促進し、炎症促進性の転写因子 NF- $\kappa$ B の活性を抑えることで起こることが分かった。また、TGR5 の刺激は細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇と serine/threonine kinase である Akt の活性化を引き起こし、これらを介して NO 合成酵素 (eNOS) を活性化し、NO 産生を促すことが分かった。さらに TGR5 作動薬のマウスへの投与は、炎症刺激を与えた際に観察される腸間膜血管壁への単球の接着を、NO 産生依存的に抑制することが明らかとなった。

#### 2) TGR5 の刺激は内皮細胞の透過性を抑制する

内皮細胞は通常、血液成分が血管外に漏出するのを防ぐバリアとしての機能をもつ。しかし、炎症が起こると内皮細胞が刺激されて透過性が亢進する。その結果、血漿成分や炎症細胞が組織に漏出して炎症反応がさらに加速されるため、内皮細胞の透過性の制御は炎症反応を制御する上で非常に重要な反応である。本項目では、内皮細胞の透過性に TGR5 の刺激がどのような影響を与えるか検討した。内皮細胞に TGR5 作動薬を処置すると、細

胞骨格の actin 線維が細胞辺縁で重合することで細胞間結合が強化され、透過性が抑制された。この反応は TGR5 の刺激によってセカンドメッセンジャーである cAMP の産生量が増加し、Rho GTPase である Rac1 が活性化することで引き起こされることが明らかとなった。さらに TGR5 作動薬の投与は、マウス皮膚において炎症刺激によって起こる血管漏出と浮腫を抑制した。

### 3) FXR の長期刺激は平滑筋の NO への感受性を低下させる

内皮細胞は様々な生理活性物質を産生して平滑筋の収縮・弛緩反応を制御する。その中でも、内皮細胞が産生する NO による平滑筋の弛緩反応は血圧や血流量の制御に重要である。本項目では FXR の長期的な刺激が血管組織の収縮・弛緩反応に与える影響を検討した。ウサギ腸間膜動脈に FXR 作動薬を 7 日間処置すると、血管の収縮反応は変化しなかった一方、内皮依存性弛緩反応が減弱した。この現象は FXR の長期刺激によって平滑筋細胞内の cGMP 産生量が低下することで、内皮細胞が産生する NO への感受性が低下することによって引き起こされることがわかった。

### 【考察】

以上の結果から、1) 血管内皮細胞における TGR5 の刺激は Akt の活性化と細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度の増加を介して eNOS を活性化させ、NO 産生量を増加する。またこれによって内皮細胞への単球の接着が抑制される、2) 血管内皮細胞における TGR5 の刺激は細胞内 cAMP の増加、PKA、Rac1 を介して血管透過性の抑制し炎症反応を抑制する、3) 血管平滑筋細胞における FXR の長期刺激が細胞内 cGMP 産生量を減少させることで NO に対する感受性を低下させ、内皮依存性弛緩反応を抑制する、の 3 点が明らかとなった。

以上を要約すると、本研究は血中の胆汁酸に着目して循環器系に対するその作用を検討し、TGR5 と FXR が胆汁酸のシグナル分子としての多様な作用を担う重要な因子であることが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）の学位論文に値するものと判断した。