

論文の内容の要旨

農学生命科学研究科 獣医学専攻

平成 21 年度博士課程 入学

中村 達朗

指導教員 尾崎 博

腸管粘膜の創傷治癒過程における細胞外ヌクレオチドの役割

【緒言】

腸管粘膜は日々の生活の中で、摂取する食物やそれを消化するための腸管運動によって損傷を受けている。この日常的な粘膜損傷は、主に腸管上皮細胞に起こる。腸管粘膜が再生する過程は創傷治癒と呼ばれ、腸管上皮細胞の遊走、増殖、分化の 3 つの段階から構成されている。これらの段階のうち、細胞遊走が創傷治癒過程における律速段階であり、特に重要な過程である。一方、腸管上皮細胞の直下に存在し、平滑筋細胞と線維芽細胞の中間の特徴をもつ筋線維芽細胞も、上皮細胞の創傷治癒過程に関与している。様々なサイトカインや増殖因子を分泌することにより上皮細胞の遊走・増殖・分化を促進したり、自身が収縮することで損傷面の面積を縮小させるといった働きをもつ。腸管粘膜の創傷治癒は、全身の恒常性維持や二次的な全身疾患を防ぐといった点において重要であるが、その詳細な機構については未だ不明な点が多い。

ヌクレオチドは、生体の全ての細胞内に存在し、普遍的なエネルギー通貨(ATP)として利用されている。一方で、機械刺激やアゴニスト刺激、低酸素などのストレスによって細胞

外へ積極的に放出されることで(細胞外ヌクレオチド)、細胞間の情報伝達物質としても機能していることが知られている。また損傷刺激などにより細胞破壊が生じた場合にも、含有されていたヌクレオチドが放出され、局所的には mM レベルの濃度で周囲に刺激を伝達する「危険信号」としての役割ももつ。この様な細胞外ヌクレオチドによる情報伝達系は、細胞外ヌクレオチドの受容体である P2 受容体を介して行われる。イオンチャネル型の P2X 受容体及び G タンパク共役型の P2Y 受容体があり、それぞれ P2X₁₋₇ の 7 種、P2Y_{1,2,4,6,11-14} の 8 種のサブタイプに分けられる。生体内では、シグナル伝達系の異なるこれら複数の細胞外ヌクレオチド受容体サブタイプが同じ臓器の複数種の細胞に分布し、極めて複雑な系を構築している。

以上の背景から、本研究では日常的に生じる腸管上皮細胞への損傷を想定し、細胞損傷によって瞬間的に放出される細胞外ヌクレオチドが創傷回復機構を開始する因子であると仮定した。腸管粘膜の創傷治癒過程における細胞外ヌクレオチドの役割を、上皮細胞の遊走および筋線維芽細胞の収縮に注目して明らかにすることを目的とした。

【結果】

1) 腸上皮細胞の遊走に対する損傷細胞由来の細胞外ヌクレオチドの作用

腸管上皮細胞株(IEC-6)を用いて検討をおこなった。コンフルエントの状態に培養した IEC-6 に損傷刺激を与え、8 時間後に損傷面から遊走してきた細胞数を定量し細胞遊走を評価する wound-healing migration assay を行った。損傷刺激を与えると自発的な細胞遊走が確認された。この細胞遊走はヌクレオチド分解酵素であるアピラーゼを前処置すると、約 40%抑制された。この結果から、損傷刺激によって生じたヌクレオチドが自発的な細胞遊走に関与していることが示唆された。各種ヌクレオチド受容体遮断薬を同様に処置したところ、P2Y₆ 受容体遮断薬で損傷刺激誘発性の細胞遊走が有意に抑制された。次に、損傷刺激によって細胞外に放出されるヌクレオチドを HPLC で測定したところ、メディウム中に約 1 μM の ATP および UDP の放出が検出された。P2Y₆ 受容体は各種ヌクレオチドの中で特に UDP に親和性が高い。以上のことから、損傷刺激によって放出された UDP が P2Y₆ 受容体を介して細胞遊走を促進している可能性が示唆された。

Boyden chamber を用いた Trans-well migration assay で外因性にヌクレオチドを処置したときの細胞遊走への影響を検討した。その結果、10 μM の UTP および 1-10 μM の UDP で有意な細胞遊走が見られた。さらに、wound-healing migration assay で各種ヌクレオチドの影響を検討した。その結果、UDP(1-100 μM)でのみ濃度依存的に細胞遊走が促進され

た。なお、UDP(1-100 μM)に細胞増殖促進効果はみられなかった。この UDP 誘発性の遊走促進効果は、P2Y₆受容体遮断薬(0.1-1 μM)によって濃度依存的に抑制された。以上の結果より、損傷刺激によって放出された UDP が細胞遊走を促進していることが明らかとなった。

P2Y₆受容体が Gq タンパク結合型受容体であることから、UDP/P2Y₆受容体による細胞遊走促進は細胞内 Ca²⁺濃度([Ca²⁺]_i)上昇によって生じていると予想された。しかしながら、UDP(100 μM)は IEC-6 の[Ca²⁺]_i上昇を誘発しなかった。そこで、腸管上皮細胞の遊走に重要な因子である TGF- β の関与を検討した。その結果、UDP(100 μM)による細胞遊走促進が TGF- β 受容体遮断薬で抑制され、さらに、UDP(100 μM)刺激によって IEC-6 における TGF- β の mRNA 発現量およびタンパク産生量が上昇した。この上昇は P2Y₆受容体遮断薬によって阻害された。以上の結果から、UDP は P2Y₆受容体活性を介して TGF- β の産生および分泌を上昇し細胞遊走を促進していることが明らかとなった。

さらに、P2Y₆受容体の mRNA 発現が UDP によって上昇した。この発現上昇は、P2Y₆受容体遮断薬および TGF- β 受容体遮断薬によって阻害された。これらの結果は、UDP は P2Y₆受容体の発現を TGF- β 産生を介して上昇させることを示している。

以上の結果より、損傷を受けた腸管上皮細胞から放出された UDP が P2Y₆受容体を介して、TGF- β 産生を促進し、細胞遊走を促進していることが明らかとなった。さらに、UDP によって産生・分泌が上昇する TGF- β によって P2Y₆受容体発現が上昇するポジティブフィードバック機構が存在することも明らかとなった。

2) 腸筋線維芽細胞の収縮に対する細胞外ヌクレオチドの作用

腸筋線維芽細胞はラット結腸から単離し、検討に用いた。筋線維芽細胞の収縮は、培養液中に浮遊させたコラーゲンゲル上に単離細胞を播種することで、ゲルの表面積の変化として評価した。筋線維芽細胞を ATP(10 μM)で刺激したところ、刺激 15 分後をピークとした濃度依存的(1-30 μM)な収縮が誘起された。次に、各種ヌクレオチドを用いて同様な検討をおこなったところ、UTP(1-30 μM)によって濃度依存的な収縮が誘起された。ATP および UTP による収縮は Ca²⁺チャンネルブロッカーである LaCl₃の前処置および細胞外の Ca²⁺除去によって抑制された。また、ATP および UTP(1-10 μM)刺激によって濃度依存的に[Ca²⁺]_iが上昇した。さらに、ATP および UTP による収縮および[Ca²⁺]_i上昇は、P2Y₂受容体遮断薬(30-100 μM)によって濃度依存的に抑制された。

以上の結果より、腸筋線維芽細胞は ATP および UTP により P2Y₂受容体を介して[Ca²⁺]_i

依存的に収縮を引き起こすことが明らかとなった。

【結語】

腸管粘膜の恒常性維持は、腸管のみならず全身の恒常性維持に必要不可欠である。本研究は、腸管粘膜の生理的な損傷時において、細胞内から大量に放出される細胞内ヌクレオチドが粘膜の回復過程に果たす役割を、腸管上皮細胞の遊走能とその直下に存在する筋線維芽細胞の収縮能に注目して検討を行った。その結果、腸管上皮細胞の損傷によって細胞内ヌクレオチドの中でも主として、ATP および UDP が放出されること、そのうち UDP が残存した上皮細胞上に発現する P2Y₆ 受容体を介して TGF-β 依存的に上皮細胞の遊走を促進すること、さらに、ATP もしくは UTP が筋線維芽細胞上に発現する P2Y₂ 受容体を介して [Ca²⁺]_i 依存的に収縮を誘起することが明らかとなった。

日常生活の中で「生理的」に損傷を受ける環境下にある腸管において、全ての細胞が含有するクレオチドが、創傷回復機構を通して腸管粘膜の恒常性の維持に寄与することは、非常に合理的なものであると考えられる。また、上皮細胞と筋線維芽細胞で受容する細胞外ヌクレオチドが異なることは、結果として創傷回復機構が効率的に行われることを示しているのかもしれない。つまり、どちらか一方があれば修復機構を開始することができること、作用するヌクレオチド同士の変換・代謝関係により相互で補償し合えること、また、作用する時間的差を生み出すことができることより、修復の確実性を担保していると考えられる。病態時における粘膜障害の回復機構についての研究は、これまで数多くなされてきたが、生理的な粘膜障害を想定した研究は多くない。さらに、細胞への直接的な刺激により放出される細胞内ヌクレオチドを、組織修復の開始因子として想定した検討はほとんど行われてこなかった。本研究の成果は、そういった腸管疾患や全身疾患の予防という観点でも粘膜損傷の回復を促進する医薬品や機能性食品の開発につながる可能性がある。