

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 中村 達朗

【背景・目的】

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。一方、腸管上皮細胞の直下に存在し、平滑筋細胞の特徴をもつ線維芽細胞である筋線維芽細胞も創傷治癒に寄与しており、自身が収縮することで損傷面の面積を縮小させる働きをもつ。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、機械刺激やアゴニスト刺激や損傷刺激によって細胞破壊が生じた場合に細胞外へ放出されることで、細胞間の情報伝達物質として機能する。この情報伝達は、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 受容体を介して行われる。生体内では、シグナル伝達系の異なるこれら複数のヌクレオチド受容体と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と予想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

上皮細胞の遊走は、腸管上皮細胞株(IEC-6)を用いた wound-healing migration assay で検討した。損傷刺激による細胞遊走は、ヌクレオチド分解酵素であるアピラーゼおよび P2Y6 受容体特異的遮断薬である MRS2578 の前処置により抑制された。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、ATP および UDP が検出された。外因性のヌクレオチドによる細胞遊走への影響を trans-well migration assay および wound-healing migration assay で検討した。ともに、UDP で遊走促進が観察され、その効果は MRS2578 により抑制された。外因性の UDP による遊走促進効果は TGF- β 受容体遮断薬で抑制され、また UDP 刺激により上皮細胞による TGF- β の産生分泌を増強した。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。

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

ラット結腸から単離した腸筋線維芽細胞を用いて収縮を測定した。各種ヌクレオチドを

用いて検討をおこなったところ、ATP および UTP で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 Ca チャンネルブロッカーおよび細胞外の Ca 除去によって抑制された。さらに、ATP および UTP による収縮および細胞内 Ca 濃度上昇は、P2Y2 受容体遮断薬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 受容体を介して細胞内 Ca 濃度依存的に収縮を引き起こすことが明らかとなった。

【考察】

本研究の結果から、腸管上皮細胞の損傷によって放出された UDP および ATP がそれぞれ、P2Y6 受容体を介した上皮細胞の遊走、P2Y2 受容体を介した筋線維芽細胞の収縮を引き起こすことで粘膜損傷回復に寄与していることが明らかとなった。上皮細胞と筋線維芽細胞においてそれぞれで異なった細胞外ヌクレオチドが創傷治癒過程を促進することは、修復機構の多様性を示している。さらに、異な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、作用する時間的差違を生み出すことで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、生理的に生じる粘膜障害を想定した研究は多くない。本研究の成果は、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。

以上、本研究は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、粘膜上皮細胞ならびに筋線維芽細胞を用いて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。