氏 名藤田基生

学 位 の 種 類 博士(医学)

学位授与年月日 平成 22 年 3月 25日

学位授与の条件 学位規則第4条第1項

研 究 科 専 攻 東北大学大学院医学系研究科(博士課程)医科学専攻

学位論文題目 Toll-like receptor 4 on intestinal smooth muscle cells directly mediates lipopolysaccharide-induced reduction in intestinal contractility

(LPS 誘因の腸管収縮力低下に関わるメカニズムについての研究)

論 文審 査 委 員 主査 教授 里見 進 教授 永富 良一 教授 福土 審 教授 福島 浩平

論 文 内 容 要 旨

Abstracts

Background and aims: Lipopolysaccharide (LPS) mediates intestinal dysmotility in various pathophysiological conditions such as sepsis or surgical operation. Intestinal muscularis macrophages, upon stimulation with LPS and cytokines, are involved in intestinal dysmotility after several hours after the onset of inflammation. Since Toll-like receptor 4 (TLR4), which specifically recognizes LPS, are located mainly on intestinal smooth muscle cells, we hypothesized that LPS via TLR4 directly act on smooth muscle cells to change the motility in an earlier phase.

Methods: Mid-jejunum whole intestinal segments were excised from either wild-type (WT), or TLR4-/- C57BL/6 mice and C57BL/6 mice depleted of macrophages using clodronate were equilibrated in an organ bath and a maximal contraction was generated by exposing the tissue to bethanechol. RT-PCR was performed to detect TNFalpha, COX2, and iNOS mRNA in intestinal muscular layer.

Results: Intestinal contractility was attenuated in 90 minutes after exposure to LPS. In TLR4 -/- mice, even after exposure to LPS no detectable change in the contractility was observed. Pharmacological deprivation of macrophage did not alter LPS induced suppression of intestinal contractility.

Conclusions: LPS acts on intestinal smooth muscle cells via TLR4 and directly affects the intestinal contractility. A new direct link of LPS and intestinal motility was demonstrated independent of intestinal muscularis macrophage.

審査結果の要旨

Toll-like receptor 4 on intest inal smooth muscle cells direc	專士論文題名	e – i i nal	nduced con <u>tr</u>	reduction	lysaccharid in intesti PS誘因の腸管収縮力低	
		ina	l smoo	th muscle of	cells direc	

所属専攻・分野名 <u>医科学 専攻・ 先進外科学 分野</u> 氏名 藤田 基生

腸管炎症時に消化管運動が低下し腸閉塞等の症状を引き起こすことは、敗血症・周術期等に臨床で見られる現象としては広く知られているものの、そのメカニズムの解明は未だ十分に行われていない。消化管筋層に存在する常在マクロファージが惹起する炎症性メディエーターが消化管運動の低下に関わっているとする報告がある。一方消化管運動低下の原因の一つとして知られている lipopolysaccharide(LPS) のレセプターであるtoll-like receptor 4 (TLR4) は消化管においてはマクロファージだけでなく他の様々な細胞(mast cell や B リンパ球・平滑筋細胞)に発現していることが報告されている。

筆者は消化管筋層の平滑筋細胞に TLR4 が発現していることに着目し、LPS が直接平滑筋細胞の機能変化を起こしている可能性について検証した。特に LPS 曝露による消化管運動の低下の機序を探るために、toll-like receptor 4 (TLR4) ノックアウトマウスとマクロファージ除去の 2 つの操作を加えた時の LPS の影響をマグヌス管等を用いて検証した。

マグヌス管内のマウス小腸標本がムスカリン作動薬の bethanechol によって野生型マウスでは収縮するが、LPS 添加では減弱し、その一方で TLR4 ノックアウトマウスでは LPS 添加による小腸収縮の減弱は見られなかった。マクロファージを除去したマウスを用いた同様の実験では野生型マウスのものと同様に LPS 添加により小腸収縮の減弱を認めた。これらの標本の筋層の iNOS mRNA を測定したところ、野生型マウスの標本では LPS 曝露により iNOS mRNA が有意に上昇し、TLR4 ノックアウトマウスの標本では有意な上昇を認めなかった。マクロファージ除去したマウスの標本では、LPS 曝露により iNOS mRNA の有意な上昇を認めなかった。マクロファージ除去したマウスの標本では、LPS 曝露により iNOS mRNA の有意な上昇を認めた。以上の研究結果より、LPS による腸管収縮の低下には TLR4 を含む経路が関わっていること、結果として産生される iNOS,NO が収縮低下の直接の原因となっている可能性、そしてこれらのメカニズムにはマクロファージよりも TLR4 を発現しているその他の細胞の寄与が大きいこと、つまり収縮に関わる筋層に限って言えば、平滑筋細胞が LPS を認識し収縮低下に直接関わっている可能性があることが示唆された。

本研究は、腸管炎症時の消化管運動低下のメカニズムを検討する上で有意義な知見をもたらした。よって、 本論文は博士(医学)の学位論文として合格と認める。