

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	土屋 慶容
<p>学位論文題目</p> <p>IL-1 receptor antagonist blocks the LPS-induced inhibition of gastric motility in freely moving conscious rats. (無麻酔無拘束下ラットにおいて、IL-1受容体アンタゴニストはLPS誘発の胃運動抑制を遮断する。)</p> <p>共著者名 野津司、桑井志麻、大平賀子、奥村利勝</p> <p>未公表</p> <p>研究目的</p> <p>敗血症性ショックの状態では消化管運動が障害を受けることが知られている。敗血症モデルの実験として汎用されている外因性Lipopolysaccharide (LPS) 投与による敗血症誘発状態が消化管運動に及ぼす影響について過去にいくつかの報告があるが、一定の見解が得られていない。また、それらの報告のほとんどが麻酔下あるいはin vitroの研究であり、より生理的な状態である無麻酔下での研究はほとんどなされていない。ラットの胃運動はmigrating motor complex (MMC)を主体とするphasicな強収縮が認められる空腹期と、持続する収縮で構成される食後期の運動がある。これは、麻酔下の動物では観察されず、生理的な胃運動は無麻酔下での観察が望ましい。今回我々は、無麻酔無拘束下ラットにおけるLPSの食後期胃運動に対する影響とそのメカニズムを解明するために、本研究を行った。</p>			

材 料 ・ 方 法

体重約250g、雄性のSprague - Dawley (SD)ラットを用いた。胃運動測定及び解析は既報(引用文献1)に従って行った。ラットをエーテル麻酔下に開腹し、3Frのカテーテルを胃体部より前庭部に向けて挿入し、腹筋、皮下トンネルを介して後頸部からカテーテルを体外へ誘導した。術後2-4日後にラットを専用のボックスに入れ、無麻酔無拘束の状態ですの内圧の測定を行った。胃内圧の測定はカテーテルに蒸留水を流し、圧トランスデューサーで胃前庭部の内圧を持続的に測定記録した。測定は無麻酔、無拘束で行い、薬剤投与時のみ短時間のエーテル麻酔を施行した。得られた測定記録からarea under manometric trace (AUT)を測定し、薬剤投与前後のAUTの変化率を% Motor index (%MI) と定義し、LPSならびにLPSによって誘導され得る種々のサイトカイン(IL-1 β 、TNF- α 、IL-6)の腹腔内投与が胃運動に及ぼす影響を検討した。さらに、IL-1 Receptor antagonist (IL-1Ra)をLPS投与30分前に腹腔内投与し、IL-1RaがLPSの胃運動変化に及ぼす影響を検討した。

成 績

LPS (0.2 mg/kg以上の容量)腹腔内投与により、有意に%MIが低下した。また、LPS投与による胃運動抑制は60分以上持続した。次にLPSによって誘導され得るサイトカインの内、IL-1 β 、TNF- α 、IL-6の腹腔内投与を行い、LPSによる胃運動抑制のメカニズムを検討した。TNF- α ならびにIL-6の腹腔内投与では胃運動に影響を及ぼさなかったのに対して、IL-1 β の腹腔内投与により容量依存性に胃運動を抑制し、2 μ g/kgの容量では有意に%MIを低下させた。また、その効果はLPS同様60分以上持続した。以上の結果より、LPSによる胃運動抑制のメカニズムに内因性IL-1 β が特異的に関与するという仮説をたて、次の検討を行った。LPS 0.2 mg/kg投与30分前にIL-1Raであるanakinra 20 mg/kgの腹腔内投与を行い、胃運動の測定を行った。IL-1Raそれ自体は胃内圧に影響を及ぼさなかったが、IL-1Raの前投与により、LPSの胃運動抑制が強力にブロックされた。

考 案

本研究では第一に無麻酔、無拘束下ラットにおいてLPS腹腔内投与が胃運動を有意に抑制することを明らかにした。これまで意識下動物において、LPSが胃排出を遅らせることが報告されている。胃前庭部の運動が胃排出に影響することが知られているため、本研究の成績はLPSによる胃排出抑制は胃運動を抑制した結果生じることを

示唆する。

次にLPSによって誘導され得るサイトカインのうち、IL-1 β が特異的に容量依存性に胃運動を抑制することを見いだした。以上の結果より、無麻酔、無拘束下ラットにおけるLPSによる胃運動抑制のメカニズムに内因性IL-1 β が特異的に関与することが示唆され、引き続きその仮説の検証を行った。

IL-1にはIL-1 α とIL-1 β が存在するが、いずれも生体内ではIL-1 receptor 1 (IL-1R1) により認識されることが知られている。これらのIL-1の働きを抑制する内因性のIL-1Raが生体内では存在する(引用文献2)。Recombinant human IL-1Ra (anakinra)はIL-1シグナル伝達をブロックする薬剤で、関節リウマチやクリオピリン関連周期性発熱症候群といったIL-1の作用が過剰に働く疾患で臨床応用されており、その有効性が示されている(引用文献3)。本研究ではこのanakinraを用いてLPSによる胃運動抑制が内因性IL-1を介する反応であることを明らかにした。内因性IL-1が胃運動に影響を及ぼすことを報告した研究は過去にはなく、本研究により内因性IL-1が消化管運動の調節に重要な役割を担っている可能性も示唆された。

結 論

無麻酔無拘束ラットにおいて、LPSならびにIL-1 β が胃運動を有意に抑制した。LPSによる胃運動抑制に内因性IL-1が特異的に関与することが示唆された。これらの知見は敗血症性ショックの病態下でイレウスに代表される消化管運動機能低下の治療にIL-1Raが有効である可能性を示唆した点で臨床的にも重要であると考えられる。




引 用 文 献

1. Nozu, T., S. Kumei, K. Takakusaki, K. Ataka, M. Fujimiya, and T. Okumura. 2011. Central orexin-A increases colonic motility in conscious rats. *Neurosci. Lett.* 498:143-146.
2. Dinarello, C. A. 2005. Blocking IL-1 in systemic inflammation. *J. Exp. Med.* 201:1355-1359.
3. Gabay, C., C. Lamacchia, and G. Palmer. 2010. IL-1 pathways in inflammation and human diseases. *Nat. Rev. Rheumatol.* 6:232-241.

参 考 文 献

1. Okumura T, Ebisawa K, Ohhira M, Nozu T, Tsuchiya Y, Inoue M, Tanaka M. Chronic right lower abdominal pain due to lumbar ossification of the posterior longitudinal ligament (OPLL). *Am J Gastroenterol* in press
2. Nozu, T., Y.Tsuchiya, S. Kumei, K. Takakusaki, K. Ataka, M. Fujimiya, and T. Okumura. Endogenous orexin-A in the brain mediates 2-Deoxy-D-glucose-induced stimulation of gastric motility in freely moving conscious rats. *J. Gastroenterol.* in press.
3. Tanno S, Ohhira M, Tsuchiya Y, Takeuchi T, Tanno S, Okumura T. Frequent early discontinuation of SSRI prescribed by primary care physicians in young males in Japan. *Internal Medicine* 48: 1263-6, 2009.
4. Tsuchiya Y, Takahashi N, Yoshizaki T, Tanno S, Ohhira M, Motomura W, Tanno S, Takakusaki K, Kohgo Y, Okumura T. A Jak2 inhibitor, AG490, reverses lipin-1 suppression by TNF-alpha in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 382: 348-352.

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏名	土屋 慶容
<p>審査委員長 <u>高草木 薫</u> </p> <p>審査委員 <u>奥村 和夫</u> </p> <p>審査委員 <u>藤田 智</u> </p>			
学位論文題目			
<p>IL-1 receptor antagonist blocks the LPS-induced inhibition of gastric motility in freely moving conscious rats. (無麻酔無拘束ラットにおいて、IL-1 受容体アンタゴニストは LPS 誘発の胃運動抑制を遮断する。)</p>			
<p>【背景と目的】敗血症性ショックの状態では消化管運動が障害される。これまでの研究では動物に Lipopolysaccharide (LPS) を投与することにより敗血症と同様の消化管の運動障害が生じることが報告されているが、これがどのようなメカニズムによって誘発されているのか未だ十分な見解は得られていない。これは、過去の研究において適切な敗血症モデル動物を作成できていなかったこと、そして、解析条件が麻酔下であったことなどに起因する。そこで、学位申請者らは、1) 解析に最適な LPS 誘導性敗血症モデル動物を作成し、消化管運動を無麻酔、かつ、無拘束状態で解析すること、そして、2) LPS 投与によって誘発される異常な消化管運動を発現させる分子薬理学的メカニズムを解明すること、の2点を目的として、以下の研究を遂行した。</p>			

【実験方法と結果】 雄性の Sprague - Dawley (SD) ラット (体重約 250g) を実験に用いた。胃内圧の測定用の麻酔下にて、胃内圧の測定用のカテーテルを胃体部に留置した。術後 2-4 日後に、覚醒時において無麻酔・無拘束状態で安定した胃内圧の測定が可能になることを確認した。この実験モデルを用いて、胃運動に対する LPS の作用ならびに LPS 誘導性-サイトカイン (IL-1, TNF- α , IL-6 等) の役割を検討した。LPS (0.2 mg/kg 以上) の腹腔内投与によって胃内圧は有意に低下し、これは 1 時間以上持続した。また IL-1 β を LPS 投与前に腹腔内投与すると、LPS による胃運動の亢進は容量依存的に抑制された。しかし、TNF- α や IL-6 の投与は胃運動を変化させなかった。さらに IL-1 受容体拮抗薬である IL-1Ra を前処置したラットでは LPS による胃運動抑制が強力にブロックされた。

【研究意義と重要性】 これらの研究成績の重要性は、LPS による胃運動の抑制に、内因性 IL-1 が特異的に関与することを世界で初めて示した点にある。この知見は敗血症性ショックに伴う消化管運動不全のメカニズム解明に繋がるだけでなく、敗血症性ショックに対する IL-1 阻害剤の有用性を示唆するものである。今後、IL-1 阻害剤の臨床応用により突然致死率の高い敗血症性ショックの救命率向上につながると期待される。

【学位論文認定の判断理由】 本研究は当該領域における学術性に貢献するだけでなく、敗血症性ショックという致命的病態の克服に寄与する可能性を秘めた重要な知見を提供した。さらに、学位申請者は極めて真摯な姿勢で基礎研究に対峙しており、かつ、関連領域における十分な知識背景を有している。これらの事実に基づき、本研究論文は旭川医科大学の博士課程における学位論文にふさわしいものであると判断した。