

氏名	福本 真延
(ふりがな)	(ふくもと まさのぶ)
学位の種類	博士 (医学)
学位授与番号	甲第 1134 号
学位審査年月日	令和2年1月31日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題名	Induction of brain-derived neurotrophic factor in enteric glial cells stimulated by interleukin-1 $\beta$ via a c-Jun <i>N</i> -terminal kinase pathway (腸管グリア細胞に対する c-Jun <i>N</i> -terminal kinase pathway を介したインターロイキン 1 $\beta$ 刺激は brain-derived neurotrophic factor 産生を誘導する)
論文審査委員	(主) 教授 高井 真司 教授 田中 慶太郎 教授 朝日 通雄

### 学位論文内容の要旨

《緒言》

過敏性腸症候群 (IBS: irritable bowel syndrome) は排便習慣の変化を伴う腹痛、腹部不快感を有する疾患であり、その背景には知覚過敏が関与する。しかし、知覚過敏の細胞レベルでのメカニズムは明らかではない。IBS 患者の腸管組織にはマクロファージや肥満細胞、好中球などの炎症細胞浸潤が認められ、知覚過敏に対する炎症性細胞の介在が推察されている。これらの細胞から産生・分泌される炎症性サイトカインについては、特に Interleukin(IL)-1 の IBS の病態への関与が報告されているが、一方で IL-1 $\beta$ はうつ病患者の血清中で増加するなど、ストレスに関与することも知られている。Brain-derived

neurotrophic factor (BDNF)は主に中枢神経系における神経栄養、神経保護作用を持つ神経栄養因子であるが、疼痛の発生機序にも関与することが知られており、IBS 患者の直腸粘膜での BDNF レベルと腹痛の頻度・重症度の間には正の相関があることが報告されている。中枢神経系においては、astrocyte などのグリア細胞を豊富に含む海馬が IL-1 $\beta$ により刺激されると、BDNF の発現が誘導されるとの報告がある。腸管においても、astrocyte と類似の細胞特性を有する腸管グリア細胞 (EGC: enteric glial cell)が存在するが、EGC における BDNF 産生や発現誘導に関する報告はない。今回、EGC に対する IL-1 $\beta$ 刺激が BDNF 産生を誘導するとの仮説を立て、株化した EGC を用い、IL-1 $\beta$ 刺激下における BDNF の産生誘導とその細胞内シグナル伝達系について検討した。

#### 《方 法》

Rat EGC (CRL-2690)に対して IL-1 $\beta$ 刺激を行い、BDNF mRNA 発現を real-time RT-PCR 法で、mature BDNF 蛋白および proBDNF 蛋白発現、また mitogen-activated protein kinase (MAPK)リン酸化を Western Blotting 法で評価した。EGC 培養上清に存在する BDNF 蛋白量については、ELISA 法にて評価を行った。

#### 《結 果》

BDNF mRNA 発現は IL-1 $\beta$  (50 ng/ml)刺激 24、48 時間後にそれぞれ 2.8 倍、4 倍に増加した。また、IL-1 $\beta$  (50 ng/ml)刺激 48 時間後に mature BDNF 蛋白は 1.7 倍、proBDNF 蛋白は 3 倍に増加した。IL-1 $\beta$  (range: 3.1-75 ng/ml)刺激にて、BDNF mRNA 発現は用量依存的に増加し、mature BDNF 蛋白および proBDNF 蛋白発現はすべての濃度で有意に増加した (mature BDNF: 2.2-2.7 倍、proBDNF: 1.4-1.6 倍)。EGC 培養上清中の total BDNF (mature BDNF + proBDNF)蛋白量は、対照群と比較して IL-1 $\beta$  (50 ng/ml)刺激群で有意な変化を認めなかったが、proBDNF 蛋白量は約 80%の有意な減少を認めた。MAPK の検討では、IL-1 $\beta$ 刺激 5、15 分後に phospho-p38 MAPK は約 2 倍に、phospho-c-jun N-terminal kinase (JNK)は約 5 倍、10 倍に増加したが、phospho-extracellular

signal-regulated kinase (ERK)に関しては変化を認めなかった。JNK 阻害薬である SP600125 (10  $\mu$ M)の 60 分前処置は、IL-1 $\beta$ 刺激による mature BDNF 蛋白および proBDNF 蛋白発現増加を抑制したが、p38MAPK 阻害薬である SB203580 (10  $\mu$ M)は、mature BDNF 蛋白および proBDNF 蛋白発現に影響を与えなかった。

#### 《考 察》

これまでの報告より、BDNF が神経細胞に存在する TrkB 受容体と結合することで、K-Cl 共輸送体である KCC2 (K-Cl cotransporter)の発現量が減少し、細胞内 Cl<sup>-</sup>が増加することで通常は抑制系に働く  $\gamma$ -アミノ酪酸が興奮性に作用し、神経因性疼痛を誘発することが知られている。腸管組織においては、腸管上皮細胞より BDNF が産生されるとの報告があるが、腸管神経系における BDNF の産生源は明らかではなかった。本研究の新規性は、腸管神経叢の構成成分である EGC が BDNF 産生能を有することを示した点にある。EGC より産生された BDNF は、EGC と同じ腸管神経系に属する腸管神経細胞に影響を与え、IBS の症状に寄与する可能性がある。本研究によって、IL-1 $\beta$ が EGC に作用し、mature BDNF 蛋白および proBDNF 蛋白が誘導されることが明らかとなり、また mature BDNF の分泌増加を来している可能性が示された。炎症状態のほか、ストレス環境下においても IL-1 $\beta$  の発現は増加するため、ストレスによって IBS 症状が増悪するという病態の背景に、IL-1 $\beta$  が関与している可能性も示唆された。mature BDNF は神経細胞の密度増加や突起伸長を引き起こすことが知られているが、IBS 患者においては腸管神経繊維密度の増加が認められるとの報告があるなど、腸管神経の形態変化と IBS 症状は関連している可能性があり、今後、EGC と神経細胞との相互作用についての更なる検討が必要であると考え。また、病態のさらなる解明のためには、今回検討した IL-1 $\beta$ に加えて、TNF- $\alpha$ や IL-6、IL-8 などの炎症性サイトカインによる EGC への影響を評価することが重要であろうと考える。

#### 《結 論》

EGC において IL-1 $\beta$ 刺激により BDNF 産生を認め、mature BDNF および proBDNF 産

生は JNK 経路を介して誘導されることが示唆された。ストレス環境下における IL-1 $\beta$ 増加が、IBS の病態に関与している可能性がある。

## 論文審査結果の要旨

過敏性腸症候群(IBS: irritable bowel syndrome)の病態生理の中心にある知覚過敏のメカニズムは、現在明らかではない。IBS 患者の腸管組織では炎症性細胞の微小浸潤が認められ、炎症性の液性因子を介して知覚過敏が惹起されることは知られているが、その受け手である腸管神経叢に与える影響は不明である。IBS の病態への関与には、特に Interleukin(IL)-1 $\beta$ の重要性が報告されているが、一方で IL-1 $\beta$ はストレスとも関連を持つ。中枢神経系における神経栄養因子である brain-derived neurotrophic factor (BDNF)は神経保護作用のほか、疼痛関連因子としても機能する。IL-1 $\beta$ にて astrocyte が豊富な海馬に対して刺激を行うと、BDNF 発現を誘導することが知られている。腸管神経叢に存在する腸管グリア細胞(EGC: enteric glial cell)は、astrocyte と類似した細胞特性を持つことから IL-1 $\beta$ 刺激により BDNF を産生することが予測されるが、その報告はない。本研究では、株化した EGC における IL-1 $\beta$ 刺激による BDNF の産生誘導、および EGC 内での細胞内シグナル伝達系についての検討が行われた。

その結果、EGC において、IL-1 $\beta$ 刺激による BDNF mRNA および mature BDNF 蛋白、proBDNF 蛋白の産生誘導を認め、細胞内シグナル伝達系として JNK と p38 MAPK が関与することが明らかとなり、mature BDNF および proBDNF 産生が JNK 経路を介して誘導されることが示唆された。また、EGC 培養上清において、IL-1 $\beta$ 刺激により mature BDNF の分泌増加を来している可能性を示した。

本研究は、腸管神経叢の構成成分である EGC が BDNF 産生能を有することを明らかにした。このことから、EGC より産生された BDNF が EGC と同じ腸管神経系に属する腸管神経細胞に影響を与え、腹痛などの IBS の症状に寄与する可能性が考えられる。また、その BDNF 産生が IL-1 $\beta$ 刺激により亢進することから、ストレス環境下における IL-1 $\beta$ 増加が、IBS の病態に関与している可能性も示唆している。以上の成果は、消化管における知覚過敏のメカニズム解明の一助となりうる新知見であると考えられる。

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 条第 1 項に定めるところの博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition, 66(1): 1-7, 2020 Jan

doi: 10.3164/jcfn.19-55