

学位授与番号：甲 1 0 2 5 号

氏 名：西條 広起

学位の種類：博士（医学）

学位授与日付：平成 28 年 10 月 12 日

学位論文名：

Microangiopathy triggers, and inducible nitric oxide synthase exacerbates dextran sulfate sodium-induced colitis

学位論文名（翻訳）：

(デキストラン硫酸ナトリウム誘発腸炎は, 微小血管障害によって引き起こされ, 誘導型一酸化窒素合成酵素により増悪する)

学位審査委員長：教授 池上雅博教授

学位審査委員：教授 立花利公教授 教授 矢永勝彦教授

# 論文要旨

論文提出者名	西條 広起	指導教授名 松藤 千弥
<p>主論文</p> <p><b>Microangiopathy triggers, and inducible nitric oxide synthase exacerbates dextran sulfate sodium-induced colitis</b></p> <p>(デキストラン硫酸ナトリウム誘発腸炎は、微小血管障害によって引き起こされ、誘導型一酸化窒素合成酵素により増悪する)</p> <p>Hiroki Saijo, Norifumi Tatsumi, Seiji Arihiro, Tomohiro Kato, Masataka Okabe, Hisao Tajiri, Hisashi Hashimoto</p> <p>Laboratory Investigation, 2015;95;728~748</p> <p>潰瘍性大腸炎 (Ulcerative colitis: UC) は、消化管に慢性炎症を引き起こす炎症性腸疾患 (Inflammatory bowel disease: IBD) の代表的疾患である。DSS (Dextran sulfate sodium) 誘発腸炎マウスは、UC の病理学的所見に類似していることから UC のモデルマウスとして頻用されている。しかしながら、DSS 誘発腸炎の誘発機序は不明である。これまでの研究において、粘膜上皮障害に関して様々な報告があるが、大腸粘膜内の微小循環系の変化と上皮障害との関係性を検討した報告はない。本研究では、腸炎発症における微小循環系の関与を明らかにするために、DSS 誘発腸炎マウスを用いて、腸炎発症過程における粘膜内循環系と微小環境の変化を解析した。さらに、血流障害により誘導される炎症増悪因子を制御することで粘膜障害の悪化を抑制できるかを検討した。</p> <p>その結果、上皮障害に先行して微小血管障害を認め、その後筋層間神経叢の神経細胞に組織障害を誘発する iNOS が過剰発現していた。さらに、抗コリン薬によって神経細胞の活動を抑制すると、iNOS の発現が低減し、炎症の悪化が抑制された。</p> <p>これらのことより、DSS 大腸炎は血管障害による微小循環障害によって上皮障害が誘発され、その後の腸炎悪化には神経細胞の過剰興奮が関与していることが示唆された。人の潰瘍性大腸炎においても炎症寛解期における粘膜微小循環系を観察することで早期に炎症の再燃を発見することができ、早期治療に役立つことが期待される。また神経原性の iNOS を抑制することで炎症の増悪を抑制できる可能性が示唆された。</p>		

## 学位審査の結果の要旨

西條広起（さいじょう ひろき）氏の学位論文は、主論文1編から成る。主論文は、2015年に、Laboratory investigation 誌に掲載され、テーマは、Microangiopathy triggers, and inducible nitric oxide synthase exacerbates dextran sulfate sodium-induced colitis（和文表題：Dextran sulfate sodium 大腸炎マウスにおいて微小血管構造の変化が腸炎発症に及ぼす影響の解析）であり、当時の impact factor は、4.202 である。指導教官は猿田雅之教授である。

審査は、審査委員長 病理学講座 池上雅博、審査委員 基盤研究施設分子細胞生物学研究部 立花利公教授、外科学講座 矢永勝彦教授が担当し、平成28年9月23日に、公開口頭試問の形式で行われた。

西條氏の履歴、詳細な論文内容については、別紙資料の如くである。

試問では、西條氏の論文内容プレゼンテーションの後、口頭試問が行われた。試問の内容は以下に示す33項目で行われた。

### （立花）

- ・モデルマウスとして、何故DSS投与を選択したのか。
- ・DSS投与により遠位大腸のみに変化があるのか。近位大腸や小腸には変化が見られないのか。
- ・粘膜固有層の血管以外の血管に変化は見られないのか。
- ・なぜ他の血管には変化が見られないのか。
- ・Ki-67染色で、粘膜固有層間質の何の細胞に陽性だったのか。
- ・腸炎の経過中に「mast cell が出現してくる」とあるが、特殊染色をおこなってmast cell を同定しているのか。
- ・「神経細胞にiNOSが作用して血管変化が惹起される」が、どのような理由で血管に変化がくるのか。
- ・mast cell は、血管近傍に出現してくるのか。
- ・滲出液が滲出してくる血管は太いものからか、細いものからか。

### （矢永）

- ・DSS投与後3日目にエバンスブルーが粘膜に出てくるが、そのメカニズムは。
- ・出血が起きた後、上皮が剥離し、腸炎が顕在化するという順序で変化が起きているのか。
- ・Fig. 2cにおいて、大半の血管内腔が拡張しているが、iNOSが上昇し、NOが上昇した結果拡張が惹起されたのか。
- ・Fig. 6において、DSS投与後病巣部でVEGF-Aの上昇が見られるが、血中のVEGF-A

の上昇は見られないのはどうしてか。

- 「神経細胞において過剰発現している iNOS に対して、抗コリン薬を投与することにより神経細胞の活動が抑制され炎症の悪化が抑制された」とあるが、今後さらに実証していくことができるか。

(池上)

- DSS 誘発腸炎は、潰瘍性大腸炎とどのような点が似ており、どのような点が異なっているのか。
- DSS 誘発腸炎は、初期に出血が著明となるということは、潰瘍性大腸炎というよりむしろ虚血性変化に類似しているのではないか。
- DSS 誘発腸炎の炎症というのは、出血期のことをさしているのか、それより後のおそらく二次感染ででてくる炎症細胞浸潤のことをさしているのか。
- Fig1A で、DSS 投与後の血管透過性変化について、エバンスブルーは、正常状態では血管外に漏出しないのか。血管拡張・エバンスブルーの漏出、粘膜内出血等の変化が見られたようであるが、大腸のどの部位に見られたのか。
- Fig1B では、組織内のエバンスブルーの量をみているものであるが、日がたつにつれて、エバンスブルーの量が増加している。すなわち出血がおきていると考えてよいのかそれとも滲出がおきているのか。エバンスブルーと出血（赤血球）では、物質の大きさからして異なるのではないか。
- 漏出したエバンスブルーの定量は、大腸全体を評価したのか。出血の強い部分のみか。後者であれば、実験者の都合の良い部分のみを評価したことにならないか。
- 血管分布と粘膜上皮の変化について、Fig. 2 ABC でみると、血管障害がある部分は、大腸全体から見ると非常に focal に見えるように見える。びまん性の変化ではないのか。次第に広がり、瀰漫性になっていくのか。
- どのレベルの血管に変化があるのか、毛細血管か、小動脈あるいは小静脈か。
- Fig. 2 P12 下から 2 行目：「また、樹脂切片では、同部位の陰窩は短縮もしくは消失していたが、粘膜上皮に変化はなかった」とあるが、杯細胞の減少、上皮の萎縮が著しいと考えられ、この表現は不適當。「上皮にも、萎縮・消失が著しい」とすべき。
- Fig. 3 血管構造、 $\alpha$  SMA, PECAM-1 陽性細胞に対する DSS の影響について。A, B, C の図で、粘膜の方向が違うので理解しにくい図になっている。改善が必要。
- Fig. 3 :  $\alpha$  SMA (青) は、血管平滑筋を同定しているのか。PECAM-1 (血漿板内皮細胞接着分子) (緑) は、血管内皮ひいては血管を同定しているのか。
- 「粘膜固有層内にある血管平滑筋細胞の  $\alpha$  SMA シグナルは低下しており」とあ

るが、粘膜内の毛細血管に平滑筋はなく、Fig. 3 の粘膜膜内にみられる  $\alpha$  SMA 青のシグナルは、平滑筋ではなく、腺管周囲の pericryptal fibroblast をみているのではないか。

- Fig. 3 : おそらく粘膜外の、血管平滑筋を有している太い血管に PECAM-1 陽性細胞（血管内皮）が減少し、平滑筋も不明瞭になっているが、このような太い血管からの出血を考えているのか。毛細血管からではないのか。
- Fig. 4 の一連の変化は、虚血性変化による細胞の変性・消失と、今後の再生過程をしめしている。テーシス図の説明で「しかし、病理学的変化は認められない。」は、意味が不明。
- 4日 HIF1 $\alpha$  のシグナルが確かに減少しているが、上皮が脱落して消失しただけではないか。
- テーシス P14 下から 6 行目、Fig. 5→6 の誤りでは。
- ペリフェリンの同定：構造を見ているのか、異常な蛋白同定のために用いているのか。

すなわち、神経線維を同定しているのか、

- ウェスタンブロット解析：1 レーンあたり何頭の解析をしているのか。それぞれの日で、レーンが 2 個ずつある理由は。日を追うごとに、発現量が増えているのは傾向としてわかるが、同一日の左右のレーンで発現量（定量ではないが）に違いがありすぎるのではないか。対象をどのように取っているのか。（それらしいものと、それらしくないもので 2 つ作っているのか）
- iNOS と VEGF-A の解析で、コントロールとしている  $\beta$ -actin の発現状態がほぼ同じように見えるが、それぞれできちんとコントロールを取っているのか。

以上の質問に対して、西條氏は文献引用、自らの実験結果あるいは推論を加え適切に解答した。

尚、テーシス中に数箇所訂正を要する部分があり、その訂正を 10 月 1 日に確認した。

本研究は、従来その機序が不明であった DSS 投与大腸炎マウスの腸炎の発症機序について明らかにし、さらに神経原性の iNOS を抑制することにより炎症の増悪を抑制できる可能性について言及した論文である。立花、矢永両教授と慎重に討議した結果、博士論文として価値あるものと判定した。