

論文内容要旨

ヒト胆管上皮癌細胞株における Lysophosphatidylcholine および酸化遊離
脂肪酸によるアポトーシス誘導機構の解析

主指導教員：木平 健治教授
(病院 病院薬剤学)

副指導教員：田妻 進教授
(病院 総合診療医学)

副指導教員：茶山 一彰教授
(応用生命科学部門 消化器・代謝内科学)

藤田 啓子

(医歯薬学総合研究科 薬学専攻)

【序論】

膵胆管合流異常症や肝内結石症において、胆道悪性腫瘍の発症率が高いといわれているが、そのメカニズムの詳細は不明である。これらの病態下において、胆管への膵液逆流により、膵臓で産生される phospholipase A₂ (PLA₂) の胆汁中濃度が上昇し、lysophosphatidylcholine (LPC) の産生が亢進していると報告されている。LPC は種々の細胞に対してアポトーシスを誘導することが知られている。LPC は胆汁の主要構成成分である phosphatidylcholine (PC) が PLA₂ により加水分解されることにより生じ、LPC と同時に PC 由来の遊離脂肪酸が生成する⁶⁾。そのため、PLA₂ の作用で LPC が生成する際には、PC、遊離脂肪酸および遊離脂肪酸由来の酸化遊離脂肪酸が胆汁中に共存すると考えられる。PC については細胞障害性を有する胆汁酸に対する保護作用が、酸化遊離脂肪酸にはヒト単球性細胞に対するアポトーシス誘導作用が報告されている⁷⁾ が、LPC によるアポトーシス誘導に関与するか否かについては明らかになっていない。

【実験方法】

- 1) 細胞培養法：ヒト胆管上皮細胞株 HuCCT-1 細胞
- 2) 細胞増殖動態測定法：MTT assay
- 3) アポトーシス細胞の検出：フローサイトメトリーにより測定
- 4) LPC 誘導性アポトーシスのシグナル伝達経路関連分子の検討：real-time PCR 法

【結果および考察】

- 1) LPC による細胞障害作用の検討：LPC 100 μM 曝露により、細胞障害作用が認められた。LPC 10、50 μM では 10 時間曝露しても細胞障害作用を示さなかった。
- 2) LPC 誘導性アポトーシスシグナル伝達経路の解析：アポトーシス実行過程に関与する caspase-3、8、9 が活性化されることが示された。Caspase-9 の活性化が起こるアポトーシス経路にはミトコンドリアが関与すると考えられている。ミトコンドリア膜に作用してアポトーシスを促進する分子である Bax の mRNA 発現は約 3 倍まで増加した。この結果より、LPC 誘導性アポトーシス伝達経路にミトコンドリアが関与することが示された。
- 3) LPC 誘導性アポトーシスに及ぼす PC の影響：LPC とその基質である PC を併用すると PC の濃依存的に LPC 誘導性細胞障害が抑制された。膵胆管合流異常で PC の胆汁中濃度が減少していることや LPC が PC の 2 倍以上の濃度となることが報告されており、PC による細胞保護作用が減弱していることが考えられた。
- 4) LPC 誘導性アポトーシス関連受容体 G2A の検討：LPC 100 μM、1、5 時間曝露群において G2A mRNA の発現はコントロールの約 5 倍に著増した。これは、G2A 高発現臓器における発現量と同程度であった。本検討で HuCCT-1 細胞においても、LPC 曝露により発現が誘導されることが明らかとなり、LPC は G2A 受容体の発現を誘導することによってもアポトーシスを引き起こしている可能性が示された。
- 5) LPC 誘導性細胞障害に及ぼす 9-hydroxyoctadecadienoic acid (9-HODE) の影響：9-HODE は G2A のリガンドとして強い活性を示し、LPC 誘導性アポトーシスに関与することが報告されている。PLA₂ の作用により LPC と同時にリノール酸などの遊離脂肪酸が生成する。さらに、リノール酸が酸化されることで 9-HODE が生じる。そのため、PLA₂ の作用により LPC が生じる状況では LPC と遊離脂肪酸や酸化遊離脂肪酸が共存することが考えられる。9-HODE 100 μM と LPC 100 μM を同時に添加し、5 時間曝露すると、LPC 単独添加と比較して顕著に細胞生存率が低下した。この結果から、9-HODE は LPC と共存することにより、LPC の細胞障害を増強することが示唆された。

【結論】

HuCCT-1 細胞において、LPC はミトコンドリアを介したアポトーシス経路を活性化することが示された。また、リノール酸由来の酸化遊離脂肪酸である 9-HODE は LPC と共存することにより、LPC による細胞障害を増強させることが示唆された。一方、細胞膜や胆汁中に豊富に存在し、LPC の基質となる PC は、LPC 誘導性細胞障害に対して保護的な作用を示すことが示された。以上の結果から、膵胆管合流異常などの病態下において、胆汁中 PC 由来 LPC や酸化遊離脂肪酸である 9-HODE が胆管上皮細胞障害を来すことが示唆された。