

論 文 内 容 要 旨

Protective effect of phosphatidylcholine on
lysophosphatidylcholine - induced cellular
senescence in cholangiocyte

(Lysophosphatidylcholine による胆管上皮細胞老
化に対する phosphatidylcholine の保護効果の検討)

Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences,
26:568-577, 2019.

主指導教員：伊藤 公訓 教授
(医系科学研究科 総合診療医学)
副指導教員：松尾 裕彰 教授
(広島大学病院 病院薬剤学)
副指導教員：菅野 啓司 准教授
(医系科学研究科 総合診療医学)

大東 敏和

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

要旨

【目的】 膵胆管合流異常症や肝内胆石症は高率に胆道系悪性腫瘍を合併し、これらの疾患群では、胆汁中の lysophosphatidylcholine (LPC) の濃度が上昇することが報告されている。我々は LPC が胆管上皮細胞に対し、酸化ストレスの誘導を介した細胞障害と、細胞老化に伴う Senescence-associated secretory phenotype (SASP) を惹起することを示した (Shimizu R, et al. J Hepatobiliary Pancreat Sci. 2015)。また、phosphatidylcholine (PC) は、肝細胞において胆汁酸によるアポトーシスの誘導を阻害することを報告した (Tsuboi K, et al. J Gastroenterol. 2004)。本研究では、LPC による胆管上皮細胞障害に対する PC の細胞保護効果について検討を行った。

【方法】 ヒト胆管上皮細胞株 MMNK-1 に対し、LPC 単独または LPC+PC を添加し、活性酸素種 (ROS) 産生、脂質過酸化および DNA 障害について比較検討を行った。細胞老化については、SA- β -gal 活性と SASP 因子の遺伝子・タンパク発現について評価した。さらに、すでに癌化した細胞に対する、胆管上皮細胞からの SASP 因子の影響を検討する目的で、MMNK-1 に LPC、LPC+PC を添加した細胞上清をヒト胆管癌細胞株 HuCCT1, HuH28 に添加し、細胞増殖・細胞遊走への影響について検討した。

【結果】 H₂DCF-DA を用いた ROS 産生の評価では、LPC 単独添加では有意に増加し、PC 併用により抑制された。同様に、TBARS アッセイの結果、LPC によって増加した脂質過酸化は、PC 併用により有意に抑制された。酸化的 DNA 損傷の指標である 8-OHdG 定量においても PC 併用により保護効果を認めた。次に、細胞老化の指標である SA- β -gal 活性は、LPC 単独により有意に増加し、PC 併用により有意に低下した。この変化に伴い、代表的な SASP 因子 (IL-8、TGF- β 、PAI-1、Gro- α) の遺伝子発現も PC 併用により有意に抑制された。SASP 因子の培養上清中蛋白濃度について ELISA にて検討したところ、IL-8、IL-6、CCL2 において PC 併用により有意に抑制された。次に SASP 因子の胆道系癌細胞に対する影響を検討した。HuCCT1、HuH28 ともに、MMNK-1 に LPC を添加した培養上清の添加により細胞増殖能が促進し、PC 併用にて有意に低下した。さらに、細胞遊走能も PC 併用にて低下した。これらの変化に伴い、HuCCT1 において、間葉系マーカーの N-cadherin、Vimentin の発現は PC の同時添加にて低下し、上皮細胞 E-cadherin は増加した。SASP 因子のなかでも IL-8 の中和抗体が HuCCT1、HuH28 における細胞遊走能に抑制的な影響を与えた。

【結論】 PC は LPC による胆管上皮細胞に対する細胞毒性と細胞老化に伴う SASP を抑制した。さらに胆道系癌細胞に対し、胆管上皮細胞由来の SASP 因子は細胞増殖・細胞遊走を亢進したが、PC を併用することで抑制的に働いた。これまでの報告を合わせて、LPC による胆管上皮の癌化とその進展を PC が抑制的に働く可能性が示唆された。