

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（医学）	氏名	大東 敏和
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1・2 項該当		
論文題目 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)			
論文審査担当者			
主査	教授	安井 弥	印
審査委員	教授	浅野 知一郎	
審査委員	准教授	村上 義昭	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>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する。既報によれば、膵胆管合流異常症では 18.5%、肝内結石症では 1.3~5.9%に認めるとされる。胆汁の構成成分はリン脂質が全体の約 20%を占めており、健常者ではその大部分が phosphatidylcholine (PC)である。lysophosphatidylcholine (LPC) は phospholipase A2 (PLA2) の酵素作用により、PC の sn-2 位のエステル結合が加水分解されることで生成される。膵胆管合流異常症では膵液由来の PLA2、肝内結石症では炎症性低分子 PLA2 の胆汁中濃度が上昇し、これに伴い胆汁中の LPC 濃度が有意に上昇していることが報告されている。総合診療医学研究室の先行研究において、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を惹起し、細胞老化に伴う Senescence-associated secretory phenotype (SASP) を誘導し、種々の液性因子の分泌に寄与することが証明されている。さらに、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抑制することを報告している。つまり、PC が LPC による細胞障害を抑制することが示唆された。そこで申請者は、①LPC による胆管上皮細胞障害に対する PC の細胞保護効果と、②胆管上皮細胞から分泌された SASP 因子の胆道系癌細胞に対する細胞増殖能と細胞遊走能への影響について検討を行った。</p> <p>①申請者は、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。細胞老化の評価は、SA-β-gal 活性と SASP 因子の遺伝子・タンパク発現について検討した。②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、申請者は 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 (未分化癌)、HuH28 (中分化癌) に添加し、細胞増殖・細胞遊走への影響を検討した。なお、今回の研究での LPC 100μM /PC 500μM の濃度設定は、先行研究の研究成果を参考にし、いずれの濃度も生理的な胆汁中濃度の範囲内であることを確認している。</p> <p>②2'、7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (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 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、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。</p> <p>②続いて申請者は 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。さらに、申請者は癌細胞の転移と浸潤に大きく関わる Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) マーカーの遺伝子発</p>			

現について評価を行った。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、上皮系マーカーE-cadherinは増加した。最後に、申請者は胆道系癌細胞に対する細胞遊走能と上皮間葉転換促進に影響するSASP因子の検討を行った。検討を行った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。

以上の結果から、本論文は、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を抑制することを明らかにした。また、胆道癌細胞に対し、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、PCを併用することで抑制的に働くことが示された。PCは、LPCにより誘導される胆道系悪性腫瘍の発症とその進展を予防する可能性が示された。このことは、膵胆管合流異常症や肝内結石症をバックグラウンドとした胆道系悪性腫瘍の発症機序と治療戦略の構築に貢献するところが大きい。よって審査委員会委員全員は、本論文が申請者に博士（医学）の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。