

| | |
|---------------|---|
| 氏 名 | 平 田 有 基 |
| (ふりがな) | (ひらた ゆうき) |
| 学 位 の 種 類 | 博士 (医学) |
| 学 位 授 与 番 号 | 甲 第 号 |
| 学 位 審 査 年 月 日 | 平成 29 年 7 月 5 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 | Fatty acids in a high-fat diet potentially induce gastric parietal-cell damage and metaplasia in mice (高脂肪食中の脂肪酸がマウス胃壁細胞の傷害と化生を誘導する) |
| 論 文 審 査 委 員 | (主) 教授 今 川 彰 久 教授 林 道 廣 教授 前 村 憲 太 朗 |

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

《緒言》

世界的に肥満患者の数は増加しており、様々な癌腫のリスクファクターとなることから問題視されている。消化管領域では、食道バレット腺癌や胃の噴門部癌、大腸癌が肥満との相関が高いがそのメカニズムについては不明な点が多い。また、肥満による腸内細菌の変化や腹圧の上昇に伴う胃酸や胆汁酸の逆流も発癌に関与しているのではないかと考えられているが、食事内容と発癌について検討を行った研究は少ない。そこで我々は、マウスに高脂肪食を摂取させ特に上部消化管にどのような変化を来すのか、また高脂肪食中に含まれる脂肪酸自身が胃の上皮細胞にどのような変化を与えるのかを調べることにした。

《方法》

C57BL/6 マウスに4週齢から高脂肪食を摂取させ、経時的に胃の組織学的変化を検討し、胃体部細胞の遺伝子発現解析を、コラゲナーゼ処理で細胞分離したのちに、フローサイトメトリーで壁細胞以外の上皮細胞を回収し single cell レベルで行った。次に透過型電子顕微鏡 (Transmission Electron Microscope; TEM) で高脂肪食摂取群とコントロール食摂取群の胃の細胞の構造を比較検討した。また、胃体部の細胞を用いて脂肪酸が細胞生存に与える影響を胃体部の primary cell 並びにオルガノイドを作成し、in vitro で検討した。最後に不飽和脂肪酸が豊富に含まれている食餌と飽和脂肪酸が豊富に含まれている食餌を作成し胃の組織の変化の比較検討を行った。

《結果》

C57BL/6 マウスに高脂肪食(60% kcal% fat)を摂取させると、摂取開始より15週間後にはコントロール食(10% kcal% fat)を摂取しているマウスと比較して有意に胃体部の粘膜の肥厚を認め、23%の個体で粘膜の白色隆起病変を認めた。また、免疫染色を行なったところ細胞増殖のマーカーである Ki67 陽性細胞数も明らかに増加しており細胞増殖が上昇していると考えられた。

胃体部を構成する細胞の組成を調べてみると高脂肪食摂取群では、胃酸を分泌する壁細胞が明らかに減少しており(摂取開始15週後 $p=0.0404$)、粘液を産生する細胞の数が明らかに増加していた。

増加している粘液は、MUC2 陽性の腸型ではなく MUC6 陽性の胃型の粘液であった。加えて、本来胃体部では発現していない CD44 が、高脂肪食摂取群では高発現しており、これらの表現型はマウスに *Helicobacter.felis* を感染させた際に発生する前癌病変と考えられている SPEM(Spasmolytic polypeptide-expressing metaplasia)に酷似していた。実際 SPEM のマーカーである TFF2 も陽性であった。

次に遺伝子レベルでの変化を詳しく調べるために single cell analysis という手法で、壁細胞を除いた上皮細胞の一細胞の遺伝子発現パターンを高脂肪食摂取群とコントロール食

摂取群で比較を行った。その結果、高脂肪食摂取群ではコントロール食摂取群と比較すると遺伝子発現パターンが大きく変化しており、幹細胞のマーカ―や SPEM 特有の遺伝子の発現が上昇していることが明らかになった。また、高脂肪食摂取群の細胞の約半数では内分泌細胞のマーカ―の発現が上昇していた。

このような変化を引き起こす原因を明らかにするため、まず腸内細菌叢の関与を検討した。4 週齢より高脂肪食摂取した群と高脂肪食に加えて抗生剤を飲水内投与した群を比較したところ、抗生剤を投与して腸内細菌の影響を無くしても、高脂肪食単独摂取群と同様の比率で胃体部に化生性変化を引き起こした。次に、肥満により上昇した腹圧のために逆流していると考えられる胆汁酸の影響を検討した。高脂肪食単独摂取群と高脂肪食と胆汁酸を飲水内投与した群を比較したが、抗生剤投与実験と同様に胃体部の化生粘膜の発生率に差はなかった。

さらに電子顕微鏡で胃体部の細胞の構造を観察したところ、高脂肪食摂取早期(投与 4 週後)から壁細胞のミトコンドリアの構造異常を認め、増加している粘液細胞内には多数 density の高い、類円形の構造物を多数認めた。しかし、これらの構造物はコントロール食を摂取しているマウスの細胞内ではほとんど認めなかった。これらの構造物は全て Oil red O 染色陽性であり脂肪滴と考えられた。そこで我々は、高脂肪食内の脂肪酸自体が胃体部の細胞に影響を与えているという仮説を立て検証を行った。

遊離脂肪酸には細胞毒性があることが知られており、まず始めに高脂肪食摂取マウスの胃内に遊離脂肪酸が増加しているかを質量分析法を用いて測定した。すると食餌そのものには含まれていない遊離脂肪酸が胃内で明らかに増加していた。

マウスの胃体部の上皮細胞を分離し初代培養を行い、脂肪酸添加培地内で 6 時間培養を行った。脂肪酸は OE33 や MKN45 などの胃癌の細胞株ではほとんど毒性を示さなかったが、初代培養上皮細胞に対しては濃度依存的に細胞毒性を示した。また、飽和脂肪酸であるステアリン酸(18:0)やパルミチン酸(16:0)と比較して、不飽和脂肪酸であるリノール酸(18:2)やオレイン酸(18:1)の方が細胞毒性が強いことが明らかになった。

電子顕微鏡の所見で壁細胞ミトコンドリアの構造異常が早期から指摘されていたことか

ら、これらの細胞毒性はミトコンドリアのダメージによって起こっているのではないかと考えた。TMRM という細胞内の intact なミトコンドリアを可視化できる系で評価を行ったところ細胞毒性の実験と同様に不飽和脂肪酸の方がミトコンドリアに与えるダメージが飽和脂肪酸より大きい所見が得られており、高脂肪食中の特に不飽和脂肪酸が一連の変化に深く関わっていることが予想された。

また、胃の細胞からオルガノイドを作成し、脂肪酸の含まれた培地内で培養すると、壁細胞を含めた上皮細胞の細胞死が誘導されていることが示された。

最後に不飽和脂肪酸(リノール酸)が多く含まれている餌と飽和脂肪酸(ステアリン酸)が多く含まれている餌をマウスに投与したところ、不飽和脂肪酸を多く含む餌を投与した群では、約 9 割の個体で上記の白色隆起病変の発生を認めた。

《結論》

今回の我々の研究では、高脂肪食に含まれる脂肪酸そのものが胃の上皮細胞に影響を与え、胃粘膜の前がん病変発生に寄与している可能性が示された。

今回の研究では高脂肪食摂取によって、特に壁細胞に大きなダメージを受けていることが明らかになったが、これには2つの原因があるのではないかと推察された。一つは、壁細胞は胃酸を分泌する細胞であり、エネルギーを多量に必要とするため他の上皮細胞と比べて豊富なミトコンドリアを持っており ROS などからダメージを受けやすいということである。また、高脂肪食摂取したマウスの残存している壁細胞内には、増加した粘液細胞内に比べて明らかに脂肪滴の数が少なかった。脂肪滴の役割は脂肪酸の運搬と脂肪酸の毒性から細胞を守ることが挙げられ、脂肪滴を作る能力の乏しい壁細胞は脂肪酸の毒性を受けやすいのではないかとということが二つめの理由として考えられた。

また、今回の系では不飽和脂肪酸の毒性が飽和脂肪酸と比較して高いことが示されたが同じ肥満でも食事内容によって発癌率に差が出てくる可能性も本研究は示唆している。今後、食物や消化物が直接接触する消化管の発癌の研究には食事内容も考慮する必要が出てくるのではないかと考えられた。

論文審査結果の要旨

肥満は様々な癌腫のリスクファクターであり、消化管領域では、食道バレット腺癌や胃の噴門部癌、大腸癌が肥満との相関が高いがそのメカニズムについては不明な点が多い。そこで我々は、マウスに高脂肪食を摂取させ、特に上部消化管にどのような変化を来すのかを検討した。高脂肪食摂取群ではコントロール食摂取群と比較して有意に胃体部の粘膜の肥厚を認め、23%の個体で粘膜の白色隆起病変を認めた。細胞組成を調べると高脂肪食摂取群では、壁細胞が減少しており、粘液産生細胞の数が増加していた。増加している粘液の性質は腸型ではなく胃型であった。これらの表現系は **SPEM(Spasmolytic polypeptide-expressing metaplasia)** と呼ばれるマウス胃前癌病変に酷似していた。一細胞の遺伝子発現パターンを高脂肪食摂取群とコントロール食摂取群で比較をしたところ、高脂肪食摂取群では幹細胞のマーカーや **SPEM** 特有の遺伝子の発現が上昇していた。さらに電子顕微鏡で細胞の構造を観察したところ、壁細胞のミトコンドリアの構造異常を認め、粘液細胞内に多数の脂肪滴が認められた。そこで我々は、高脂肪食内の脂肪酸自体が胃体部の細胞に影響を与えているという仮説を立てた。マウスの胃体部の細胞を分離し、脂肪酸添加培地内で培養を行うと濃度依存的に細胞毒性を示し、飽和脂肪酸と比較して不飽和脂肪酸で毒性が強いことが明らかになった。最後に不飽和もしくは飽和脂肪酸が多く含まれている餌を作成しマウスに与えたところ、不飽和脂肪酸を多く含む餌を投与した群では、約 9 割の個体で上記の白色隆起病変の発生を認めた。今回の我々の研究では、高脂肪食に含まれる脂肪酸そのものが、胃粘膜の前がん病変発生の原因の一つである可能性が示された。このことにより、肥満と噴門部がん発症が関連する可能性が示された。

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 gastroenterology

2016 Nov doi: 10.1007/s00535-016-1291-0 〈オンライン掲載〉