

氏 名	植 林 賢
(ふ り が な)	(ならばやし けん)
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学 位 授 与 番 号	乙 第 号
学 位 審 査 年 月 日	平成 27 年 1 月 14 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 題 名	Indomethacin suppresses LAMP-2 expression and induces lipophagy and lipoapoptosis in rat enterocytes via the ER stress pathway (インドメタシンは LAMP-2 の発現を抑制し、小胞体ストレスを介してラット小腸上皮細胞にリポファジーとリポアポトーシスを誘導する)
論 文 審 査 委 員	(主) 教授 内 山 和 久 教授 朝 日 通 雄 教授 廣 瀬 善 信

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

《緒 言》

Autophagy は元来、細胞が飢餓の状態に陥った時に細胞内小器官を autophagic vacuole 内で分解する細胞保護的な機構であり、ストレスを受けた時、lipid droplet (LD) の過剰な蓄積が起こった時などにも誘導されることが明らかになってきた。

細胞内に過剰に脂肪が蓄積すると、LD が autophagy によって分解される (lipophagy)。それゆえに autophagy の経路が阻害されると、LD が蓄積し apoptosis (lipoapoptosis) に陥る。また、autophagosome の蓄積や Lysosomal-associated membrane protein 2 (LAMP2) の発現阻害も、最終的には細胞を apoptosis に陥らせると考えられている。

近年、カプセル内視鏡やバルーン内視鏡の進歩により、NSAID 起因性小腸傷害の存在が明らかとなり、注目されている。しかし、発症機序に関しては、不明な点が多い。

Indomethacin (IND) の脂肪新生への関与や、IND 投与により大腸細胞や大腸癌細胞において脂肪酸が増加し、apoptotic cell death を起こすことが知られている。また、最近 NSAID 起因性の胃粘膜傷害に autophagy が関与するという報告がなされたが、小腸傷害と autophagy の関係についての報告はまだなされていない。

《目 的》

IND 起因性小腸傷害における autophagy の関与について、ラット正常小腸上皮細胞株 (IEC6) とラットの *in vivo* モデルを用いて検討した。

《材料と方法》

In vitro

IEC-6 に、200 μ M indomethacin (IND) を添加し 0,3,6,12,24h 後に試料の採取を行った。Autophagic vacuole (隔離膜・autophagosome・autolysosome) を LC3、autolysosome を LAMP2、小胞体ストレスのマーカーとして CHOP (CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein)、autophagy の活性化・動態を mTOR/p-mTOR (Mammalian target of rapamycin) 抗体を用いた蛍光免疫染色と Western blot (WB) で検討した。また、細胞の形態学的変化を透過型電子顕微鏡 (TEM) にて観察した。LD は LipidTOX™ で脂肪染色を行い、Apoptosis は terminal deoxynucleotidyl transferase UTP nick-end labeling (TUNEL) 法および cleaved caspase3 の WB で評価した。さらに、autophagy の阻害剤である 3-Methyladenine (3-MA) を添加し cell viability・LD の評価を行った。また、小胞体ストレスの阻害剤である 4-Phenylbutyrate (4-PBA) を添加し、同様に評価を行った。脂肪染色・免疫染色は各々画像解析ソフト Image J を用いて測定し定量化を行った。

In vivo

雄性 SD ラット 220-280g を用いて 10mg/kg の IND を経口投与し、0, 3, 6, 12, 24 h 後

に屠殺し、小腸を採取した。潰瘍の検索は Hematoxylin and Eosin (H.E) 染色、トルイジンブルー染色を用い、autophagic vacuole を *in vitro* と同様の抗体を用いた免疫染色、WB と免疫電顕法で評価し、さらに TEM で超微形態学的観察を行った。なお、autolysosome の検出は LC3 と pan cathepsin の二重蛍光免疫染色で行った。Apoptosis の評価には TUNEL 法を用いた。

《結 果》

In vitro

Autophagic vacuole は免疫染色・WB にて経時的に増加していた。一方 LD は 0-3 h までは増加するも、6 h で有意に減少し、その後は再上昇していた。LC3 と LD の蛍光 2 重染色と TEM から lipophagy を確認した。LAMP2 は免疫染色で、6 h でピークとなり、その後は徐々に減少し、24 h で有意に減少した。WB にても 6 h に比して 24 h で有意に LAMP2 発現は減少しており、総じて lysosome の機能低下が示唆された。TUNEL 法と cleaved caspase3 の WB から経時的な apoptosis の増強を認めた。さらに TEM で apoptosis 細胞は多くの LD を核の周囲に保持しており lipoapoptosis も確認された。また autophagosome には他の細胞内小器官も含まれており autophagy を経て apoptosis に陥ったことも示唆された。3MA で autophagy を阻害すると、6 h の早期では autophagic vacuole は減少し、cell viability の低下、さらには LD の増加が認められた。小胞体ストレスのマーカである CHOP の発現は WB にて 6 h で増強し、24 h で減弱していた。4-PBA で小胞体ストレスを抑制すると 6 h・24 h とともに autophagic vacuole は減少し、6 h では有意に LD の増加を認めた。

In vivo

IND 投与 3 時間後から粘膜傷害が確認され、さらに、粘膜傷害の周囲の上皮胞体には空胞が認められた。これらは LD や lipid を取り込んだ autophagosome であり、免疫電顕にて LC3 陽性であったことから autolipophagosome (ALP) と考えられた。同部では免疫染色および WB により ALP、lysosome が有意に増加していた。しかし、autolysosome は

24h で減少していた。すなわち ALP と lysosome の融合不全が示唆された。一方、TUNEL 陽性上皮細胞は 24 h で有意に増加し apoptosis が亢進していることが確認された。

《考 察》

本研究では、IND 起因性の小腸傷害モデルを *in vitro* および *in vivo* において作製し、autophagic vacuole と LD の増加から autophagy の一種である lipophagy が誘導されていることを明らかにした。さらに、lipophagy は LD の蓄積に対して、早期には細胞保護的に働くが、長時間の IND の曝露では LAMP2 の発現低下から autophagosome と lysosome の融合不全を来し、結果的に LD・autophagosome の蓄積を伴って lipoapoptosis に至り、潰瘍形成の一因となっている可能性が示唆された。

NSAID による小腸粘膜傷害のメカニズムとしては、これまで apoptosis 誘導が主に検討されてきたが、今回の研究は autophagy に関連した細胞傷害という新たな機序の存在を明らかにした。本研究の成果は、NSAID による小腸粘膜傷害に関する分子メカニズムを解明し、本現象をターゲットとする新たな治療開発にも貢献しうるもので、臨床的に有用な新知見であると考えられる。

論文審査結果の要旨

Autophagy は飢餓状態時や種々のストレスに曝露した場合、それらから回避するために自己成分を lysosome に取り入れ分解する細胞保護機構と定義され、種々の疾患との関連が報告されている。

近年、カプセル内視鏡やバルーン内視鏡により小腸病変の検索が可能となり Nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID) による小腸傷害の存在が注目されている。その病因については apoptosis を中心とした様々な報告がなされているが、まだ不明な点が多く autophagy の関与についての報告はない。

申請者は、indomethacin 起因性の小腸傷害モデルを *in vitro* および *in vivo* において作製し、autophagic vacuole (隔離膜・autophagosome・autolysosome を含む総称) と lipid droplet (LD) の増加から autophagy の一種である lipophagy が誘導されていることを明らかにした。さらに、lipophagy は LD の蓄積に対して、早期には細胞保護的に働くが、長時間の indomethacin の曝露では lysosome 関連タンパクである Lysosomal-associated membrane protein 2 (LAMP2) の発現低下から autophagosome と lysosome の融合不全を来とし、結果的に LD・autophagosome の蓄積を伴って lipoapoptosis に至り、潰瘍形成の一因となっている可能性が示唆された。

今回の研究は、NSAID による小腸粘膜傷害のメカニズムとして autophagy という新たな機序の存在を明らかにしており、autophagy をターゲットとする新たな治療薬や予防法の開発にも貢献しうるもので、臨床的にも有用な新知見であると考えられる。

以上により、本論文は本学学位規程第 3 条第 2 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 2014 Sep 12 doi: 10.1007/s00535-014-0995-2

<オンライン掲載> in press