

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：13802

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19877

研究課題名(和文)クローン病腸管粘膜におけるLPCAT3の機能解析

研究課題名(英文)Analysis of LPCAT3 in intestinal mucosa of Crohn's disease

研究代表者

原田 岳 (Harada, Takashi)

浜松医科大学・医学部附属病院・診療助教

研究者番号：00537251

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：クローン病の内視鏡的正常回腸粘膜と正常回腸粘膜のホスファチジルコリンの分布を、IMSを用いて比較した。【方法】クローン病患者切除腸管の内視鏡的正常回腸粘膜と、癌患者非癌部回腸粘膜をIMSで比較した。【結果】IMSでは、クローン病粘膜でArachidonic PCが多いことがわかった。さらにArachidonic PC合成に関わる酵素LPCAT3が、クローン病腸管粘膜に多く発現している事がわかった。クローン病回腸内分泌細胞はLPCAT3を多く発現しているため、刺激に対して多量の5-HTを分泌し、腹痛や下痢を起こす一因となっていると思われる。

研究成果の概要(英文)：Distribution of phosphatidylcholine in endoscopic normal ileal mucosa and normal iliac mucosa of Crohn's disease was compared using IMS. METHODS: The endoscopic normal ileal mucosa of the resected intestinal tract of Crohn's disease patients was compared with the ileal mucosa of cancer patient noncancerous area by IMS. RESULTS: IMS found that Arachidonic PC was more in Crohn's disease mucosa. Furthermore, it was found that the enzyme LPCAT3 involved in the synthesis of Arachidonic PC was expressed more frequently in the mucosa of Crohn's disease intestinal tract. Crohn's disease ileal endocrine cells express LPCAT3 in a large amount, so it is thought that it secretes a large amount of 5-HT to the stimulus and is one cause of abdominal pain and diarrhea.

研究分野：消化器外科

キーワード：炎症性腸疾患 クローン病

1. 研究開始当初の背景

クローン病は小腸及び大腸に再発緩解を繰り返す難治性潰瘍を発症する難病で、疾患の発症原因など詳細は未だ不明である。20歳前後の若年より発症し、病状進行により不可逆性の腸管狭窄瘻孔形成が問題となり、生涯で複数回の外科的腸管切除が必要となる場合も多い。クローン病はこれまでの研究で、複数の遺伝的素因を背景として、食餌性因子や腸内細菌叢に対する免疫系の過剰反応が病変局所で起こっていることが示唆されている。しかし、洋の東西を問わず同様の臨床像を呈するにもかかわらず、遺伝的素因として挙げられる疾患関連遺伝子には人種差が大きいことがわかっている (Lancet 2012)。また食餌性因子や腸内細菌叢に関しても、発症原因として治療に直結するような因子の発見は未だない。疫学的には、罹患率がほぼ横ばいの欧米と比べ、日本でのクローン病患者数は年々増加の一途をたどっている。この欧米との対比の中で病因として挙げられるのが、「食の欧米化」という言葉に代表される食餌性因子、特に脂質の量的、質的变化である。これまでに、血中及び組織中の n3 系多価不飽和脂肪酸 / n6 系多価不飽和脂肪酸比や飽和脂肪酸 / 不飽和脂肪酸比の増加が、クローン病の病勢と関連するとの報告がある (The American journal of clinical nutrition 1996, Inflamm Bowel Dis 2005, The American journal of gastroenterology 2011)。また、大規模臨床試験からクローン病悪化要因に脂肪酸が鍵となっていることは既知であり (Current problems in pediatric and adolescent health care 2011)、発症初期段階の組織学的炎症変化における脂肪酸の動態解析が疾患の予防と発症機構の解明に極めて重要と考えられる。しかし、脂質の精密分析には抽出作業を要するため組織中の局在情報が失われてしま

い、従来の方法ではクローン病腸管壁の構造別脂質変化を解析することは困難であった。

質量分析イメージング (Imaging mass spectrometry/IMS) は、数 10 μm オーダーの解像度において組織切片から直接質量分析及びイメージングが可能な分子イメージングの方法として、注目されている (Anal Chem, 2008)。従来の手法とは異なり、抽出・精製を必要とせず、細胞表面に豊富に含まれる脂質を主要な成分として、脂肪酸組成など詳細な構造の違いを明らかにし、組織上における生体分子の局在を明らかにすることが可能な方法である。

2. 研究の目的

PC は細胞膜の主要な成分であり、コリン基に脂肪酸が 2 つ結合した構造をもつ。結合する脂肪酸は常に流動的に決定されており (The Journal of biological chemistry 1958)、同じ PC でも側鎖の脂肪酸の違いにより役割が異なることが近年注目されている (Journal of lipid research 2008)。我々は IMS をクローン病腸管に応用し、クローン病の腸管粘膜層では PC(16:0/20:4) を始めとした多価不飽和脂肪酸をもつ PC(PUFA-PC) が増加していることを見出した。

クローン病において、腸管粘膜に PUFA-PC が増加する原因の探求を主な目的とし、以下の実験を行った。

3. 研究の方法

過去の報告から、PC(16:0/20:4) の生成には LPCAT3 が主に関与していると言われて

いる。LPCAT3 は小胞体タンパクで、特に PC の側鎖にアラキドン酸を結合させる酵素活性をもつ (PNAS 2008)。

我々はクローン病患者切除腸管の内視鏡的正常回腸粘膜(n=5)と、癌患者非癌部回腸粘膜(n=5)を IMS で比較した。また、クローン病患者回腸粘膜(n=10)と正常回腸粘膜(n=10)を用いて、RT-PCR、蛍光免疫染色、免疫電顕法を行った。また RIN-14B 細胞株を用いて、LPCAT3 過剰発現による 5-HT 分泌能の変化を観察した。

4 . 研究成果

IMS では、クローン病粘膜で PUFA- PC (PC(16:0/20:4) 、 PC(18:0/20:4) 、 PC(18:1/20:4))が多いことがわかった (p<0.01)。そこで LPCAT3 蛍光免疫染色を行ったところ、LPCAT3 陽性細胞は Chromogranin A 陽性細胞と共局在しており、LPCAT3 陽性細胞はクローン病で有意に多いことがわかった (p=0.0045)。LPCAT3 が細胞内のどの小器官に分布するかを明らかにするために免疫電顕法を施行したところ、LPCAT3 は分泌顆粒に局在していた。腸管内分泌細胞株としては、5-HT 産生細胞株 RIN-14B(PNAS 2009)、CCK 産生細胞株 STC-1(Am J Pathol 1990)、GLP-1 産生細胞株 GLUtag(Mol Endocrinol 1992)などがこれまで報告されている。我々は、腸管内分泌細胞株 RIN-14B に LPCAT3 を過剰発現させた。すると、Ionomycin 刺激による 5-HT 分泌量は有意に増加した(p=0.0039)。

LPCAT3 は Arachidonic PC を脂質二重膜に導入することで、腸管内分泌細胞におけ

る分泌過程に関わる。クローン病回腸内分泌細胞は LPCAT3 を多く発現しているため、刺激に対して多量の 5-HT を分泌し、腹痛や下痢を起こす一因となっていると思われる。LPCAT3 はクローン病の症状緩和の観点から治療ターゲットと成り得ると考えている。

5 . 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)
なし

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

Possible involvement of 5-HT over-secretion from enteroendocrine cells of ileum mediated by increased lysophosphatidylcholine acyltransferase 3 and PUFA-PC in Crohn's disease.

Harada T., Yamamoto M., Kurachi K., Konno H.

23rd United European Gastroenterology Week. 2015.10. Barcelona

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)
なし

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)
なし

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原田 岳 (Takashi Harada)

浜松医科大学・医学部附属病院・診療助教

研究者番号：00537251

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()