

論文内容の要旨

論文提出者氏名 東 祐圭

論文題目

Deoxycholic acid delays the wound healing of colonic epithelial cells via transmembrane G-protein-coupled receptor 5

論文内容の要旨

潰瘍性大腸炎やクローン病を代表とする炎症性腸疾患(Inflammatory Bowel Disease:IBD)の治療目標の一つは粘膜治癒とされ、粘膜治癒を達成した症例は有意に再燃率や手術率が低下すると報告されている。しかしながら、腸管粘膜の創傷治癒は、腸内細菌叢の代謝産物や宿主の免疫応答など様々な要因によって影響を受けており、その詳細な機序の解明は重要な課題である。

胆汁酸は肝臓でコレステロールから一次胆汁酸が合成され、二次胆汁酸であるデオキシコール酸(deoxycholic acid:DCA)などに変換される。胆汁酸は、腸管粘膜におけるホルモン分泌、電解質・流体輸送、感覚伝達、炎症、運動などを制御しており、近年一部の胆汁酸は、腸管上皮細胞を用いた創傷治癒に影響を与えることが報告されている。一方 DCA は、膜型胆汁酸受容体である G タンパク質共役型胆汁酸受容体(G-protein-coupled receptor:TGR5)を介して腸管上皮細胞で耐糖能やインスリン抵抗性の改善作用、エネルギー代謝や脂質代謝など多くの役割を果たしているが、大腸上皮の治癒における TGR5 の役割は不明であった。また、DCA は様々な細胞において様々なシグナルの活性化を誘導するが、DCA の創傷治癒への影響に関わる細胞内シグナルについては十分に議論されていない。今回我々は、DCA 存在下での大腸上皮細胞の創傷治癒の制御因子としての TGR5 の役割について検討した。

UC 患者から内視鏡検査時に直腸から生検サンプルを採取し、TGR5 発現について、組織学・免疫組織化学・定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応(qRT-PCR)・Western blot 法を用いて解析を行った。In vitro による検討では、マウス大腸上皮細胞株である YAMC (Young Adult Mouse Colonic Epithelial) 細胞を使用し、TGR5 発現を qRT-PCR 法、Western blot 法を用いて確認した後に、Wound Healing Assay を用いて DCA による創傷治癒効果及び細胞内シグナル機構について検討した。Wound Healing Assay は 10 μ l のマイクロチップを用いてコンフルエントになった YAMC 細胞に対して吸引により円形の穴を空け、

DCA30 μ M 添加直後と 24 時間後における穴の面積の変化率を計算し上皮細胞の wound healing における DCA の影響を検討した。また、DCA の TGR5 を介した効果を検討するために、TGR5 shRNA を YAMC 細胞に導入することで TGR5 欠損 YAMC 細胞を作成し、同様に wound healing assay を行った。さらに、AKT の活性化が創傷治癒に果たす役割についても調べるため、YAMC 細胞と TGR5 欠損 YAMC 細胞に DCA 添加後の AKT 活性化を検討した。また、Rhodamine Phalloidin 染色を用いて Rho の活性化により生じる重合化したアクチン (F-アクチン) を染色し、DCA の刺激および AKT 阻害剤投与による変化を検討した。In vivo による検討では、生後 7 週雄性 C57BL/6 マウスを用いて、マウス大腸組織における TGR5 発現を免疫組織染色で評価した。2.5% Dextran Sodium Sulfate (DSS) を 7 日間自由飲水させることで腸炎を誘発し、その後 DSS 投与を中止することによるマウス回復期腸炎モデルを用いた。無作為に DSS 群と水のみを与えたコントロール群に分け、DSS 投与開始から 14 日後に大腸を摘出して、組織学、免疫組織化学、qRT-PCR 法、Western blot 法により TGR5 の発現を解析した。

マウス大腸粘膜と YAMC 細胞の両方で TGR5 が発現していることが確認され寛解期の UC 患者および回復期の DSS 誘発大腸炎マウスでは、TGR5 の発現が低下していた。さらに、Wound Healing Assay で DCA は YAMC 細胞の生存率には影響を与えず、創傷治癒を有意に遅延させたが、TGR5 欠損 YAMC 細胞では遅延させなかった結果となり、DCA は TGR5 を介して創傷治癒を阻害する。YAMC 細胞は DCA 添加により AKT シグナルが活性化したが、TGR5 のサイレンシングにより AKT 活性化は抑制され、AKT 阻害剤を添加すると DCA による創傷治癒の遅延を防ぐ結果となり、DCA による YAMC 細胞の創傷治癒阻害は AKT の活性化に依存することが示された。DCA は、Rhodamine Phalloidin 染色で YAMC 細胞の蛍光強度を有意に低下させ、F-アクチンの重合を阻害したが、AKT 阻害剤で処理した細胞ではアクチン重合は阻害されなかったことより、DCA によって AKT の活性化を介して創傷治癒における細胞内の重要なステップである F-アクチンの重合を阻害することがわかった。

以上より、今回我々は DCA に曝された大腸上皮細胞の創傷治癒において、TGR5 が AKT 経路の活性化を介して抑制的な役割を果たしていることを示し、DSS 誘発大腸炎から回復したマウスの大腸上皮および活動期の UC 患者の大腸粘膜における TGR5 の発現が低下し創傷治癒を促進することを示した。今回の結果はより、UC 患者の損傷した大腸粘膜の治癒を促進するために、TGR5 のダウンレギュレーションが有用なアプローチであることを示唆された。