

論文の内容の要旨

論文題目 腸管組織における autotaxin (ATX) の発現とその意義について

指導教員 名川 弘一 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成15年4月 入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 森 健

Autotaxin (ATX)は Stracke, Liotta らによって、1990年代に同定された 100kDa の糖蛋白質で、autocrine motility factor (AMF)の一つである。彼らは、高い転移能を有するヒト培養メラノーマ細胞(A-2058)の培養上清に、A-2058 細胞自身の運動能を促進する活性を見出し、その分子を精製して、Autotaxin と命名した。実際、肺癌、乳癌、腎細胞癌などでは、ATX の mRNA は過剰発現しており、癌の進展に関与していると考えられていた。しかし、ATX が癌の進展に関与するその機序は不明であった。

一方、リゾホスファチジン酸(LPA)は、リン酸-グリセロール-脂肪酸というきわめて単純な構造を持つリン脂質であるが、細胞増殖、血小板凝集抑制、平滑筋収縮効果、癌の浸潤促進効果など非常に多岐にわたる薬理作用を有している。LPA の作用は、細胞表面の G 蛋白質共役型受容体を介して細胞内に伝達されるが、現在まで EDE ファミリーの属する、LPA1(EDE2)、LPA2(EDE4)、LPA3(EDE7)等の受容体の他、LPA4(p2y9/GPR23)や LPA5(GPR92/GPR93))が同定されている。LPA は、これらの受容体を介して様々な生理作用を誘導するとされ、血小板活性因子(PAF)やスフィンゴシン1リン酸(S1P)とともに、リゾリン脂質メディエーターの一つと認識されるようになり、癌の進展にも深く関与していることが指摘されている。

近年、血中の LPA は主に、血漿中に多量に存在する lysophosphatidylcholine (LPC) から、lysophospholipase D (lysoPLD)により変換されることが示され、さらに、ウシ胎児血

清から精製された lysoPLD が ATX と同一の物質であることが証明された。この事実から、ATX の生理活性の多くの部分は、実は LPA 産生を介している可能性が考えられるようになった。現在、ATX の機能に関しては詳細に解明されつつあるが、ヒトの組織における ATX の発現や、細胞レベルでの ATX の分泌に関しては十分な情報が得られていない。本研究では、消化管組織における ATX の発現パターンを解明し、その生理作用やがんに対する影響を推定することを目的として、下記の検討を遂行した。

まず、ATX に対するモノクローナル抗体を用いて、ヒト腸管組織の連続切片を免疫組織染色したところ、腸管組織の粘膜下層の間質に、抗 ATX 抗体により細胞質が茶色に染色される楕円形の細胞が存在し、連続切片で比較すると、ATX で染色される細胞の多くは、抗トリプターゼ抗体で染色される肥満細胞と形態学的に類似していた。

ATX を発現する細胞は肥満細胞のサブタイプである可能性が考えられたため、FITC 標識抗 ATX 抗体と、rhodamine 標識抗トリプターゼ抗体で二重染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。ATX を発現する細胞は緑色に染色され、トリプターゼを発現する細胞は赤色に染色されたが、merged view では、緑色に染色される ATX 陽性細胞はすべてトリプターゼ陽性を示し、黄色蛍光として検出された。一方、marged view でもいくつかの細胞は赤色に染色された。この事実から、腸管組織において ATX を発現する細胞は、トリプターゼを発現する肥満細胞の一部の分画であることが確認された。さらに、rhodamine 標識抗キマーゼ抗体を用いて同様に免疫蛍光二重染色を行った。キマーゼで赤色に染色される細胞のほとんどが、merged view では、黄色を呈していた。異なる20視野で観察し、トリプターゼあるいは、キマーゼを発現する細胞のうち、ATX を発現する細胞の割合をカウントすると、キマーゼを発現する細胞の 92%が ATX を発現しており、トリプターゼを発現する細胞の 68%が ATX を発現していた。これまでの報告では、トリプターゼを発現する肥満細胞は、粘膜および粘膜下に存在し、キマーゼを発現する肥満細胞は粘膜下にのみ存在することが知られており、この結果は、腸管粘膜下の肥満細胞が ATX を強く発現するということを示唆していると考えられた。実際、トリプターゼ陽性肥満細胞のうち、ATX を発現する細胞の割合を胃、大腸、小腸で、粘膜、粘膜下、筋層において、それぞれカウントすると、粘膜下層ではいずれの組織でも 50%以上の肥満細胞が ATX を発現していた(胃:52%、小腸:63%、大腸:56%)のに対し、粘膜層、筋層では、ATX を発現する肥満細胞の割合は低い傾向を認めた(胃:7.1%,8% 小腸:6.7%,8% 大腸:14%,4.1%)。

この事実を更に詳しく検証するために、正常胃、大腸壁に存在する肥満細胞を分離して、その分析を行った。がん患者の切除標本の正常腸管壁から、4 ステップ酵素組織分離法

により、約 1%の肥満細胞を含む遊離細胞が約 2×10^6 個程度の細胞分画が採取された。さらに auto MACS システムにより CD117 陽性細胞を抽出したところ、磁氣的に抽出されたほとんどの細胞がアルシアンブルーで青色に染色され、肥満細胞リッチな分画を得ることに成功した。さらに、抽出した細胞をスライドガラスに散布、固定し、抗トリプターゼ抗体および、抗キマーゼ抗体による免疫組織染色を行ったところ、約 82%の細胞はトリプターゼ陽性細胞であったのに対し、抗キマーゼ抗体により染色される細胞の数は 17%であることが確認された。

次に、この肥満細胞リッチな分画を固定後、肥満細胞と好塩基球の特異的表面抗原 (CD203c) に対する抗体 および FITC で標識した抗 ATX 抗体により 2 重染色し、フローサイトメトリー法により解析した。70%以上の細胞が、CD203c 陽性であり、CD203c 陽性細胞のうち約 20%が有意に細胞内に ATX を発現していることを確認した。

さらに、この肥満細胞リッチな分画を用いて、トリプターゼ、キマーゼおよび ATX に対する抗体を用いて、Western Blot 法による検討を行うと、CD117 を用いてポジティブに抽出された細胞は、トリプターゼ、キマーゼおよび ATX を発現していた。一方 ネガティブに抽出された細胞には、いずれの蛋白の発現もみられなかった。すなわち、腸管より分離した CD117 陽性肥満細胞が ATX を発現していることが確認された。

最後に細胞上清の ATX を検討した。磁氣的に抽出した CD117 陽性肥満細胞を 8ml の RPMI にて 48 時間培養した。上清液を 100 μ ml に濃縮し、Western Blot 法を用いて ATX の発現を検討した。肥満細胞リッチな分画の上清中には有意な ATX 蛋白質が確認されたが、CD117 陰性の細胞群を用いた群では有意な ATX シグナルは検出できなかった。以上より、この腸管内肥満細胞は、無刺激の状態でも一定量の ATX を細胞外に分泌していることが確認された。

本研究により、ヒト腸管組織においては、粘膜下層の結合組織型肥満細胞が、ATX の主な供給細胞であり、肥満細胞から分泌される ATX により産生された LPA が腸管粘膜における様々な生理学的・病理組織学的現象に深く関わっている可能性が推測された。ヒト腸管の粘膜下の肥満細胞が ATX を分泌するという新しい知見を出発点とし、この肥満細胞における ATX の発現、分泌の調節メカニズムや、癌や炎症性腸疾患における臨床病理学的因子との関連性を明らかにすることによって、癌組織の近傍に浸潤する肥満細胞 (tumor-associated mast cell) をターゲットとする新しい治療法が生まれる可能性があると考えられる。