

博士論文

ヒト胆管上皮癌細胞株における
Lysophosphatidylcholine および酸化遊離脂肪酸による
アポトーシス誘導機構の解析

広島大学大学院 医歯薬学総合研究科薬学専攻
平成17年度入学 藤田 啓子
主指導教員 木平 健治

【略語一覽】

PC : Phosphatidylcholine

LPC : Lysophosphatidylcholine

PLA₂ : Phospholipase A₂

G2A : G protein-coupled receptor 123

PS : phosphatidyl serine

Apaf-1 : apoptosis protease activating factor-1

MTT : 3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium salt

FITC : fluorescein isothiocyanate

PI : Propidium Iodide

DAPI : 4',6-diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride

FADD : Fas associated death domain

pNA : p-nitroanilide

ROS : reaction oxygen species

H₂DCF-DA : 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium

FBS: fetal bovine serum

HBSS: Hank's balanced salts

HEPES: 2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic acid

PBS: phosphate buffered saline

9-HODE : 9-hydroxyoctadecadienoic acid

PS : phosphatidyl serine

【目次】

序論	1
本論	
第1章 Lysophosphatidylcholine (LPC) が胆管上皮癌細胞の 増殖動態に及ぼす影響	5
第1節 MTT assay による LPC の細胞増殖動態の検討	6
第2節 小括	7
第2章 LPC によるアポトーシス誘導作用	8
第1節 フローサイトメトリーによるアポトーシス細胞の検出	8
第2節 LPC 誘導性アポトーシス細胞 における核の形態学的変化	11
第3節 小括	12
第3章 LPC による細胞障害に対する phosphatidylcholine (PC) の影響	13
第1節 LPC による細胞障害に対する PC の影響	14
第2節 小括	16
第4章 LPC によるアポトーシスシグナル伝達経路	17
第1節 アポトーシスシグナル伝達分子 caspase-3、8、9 の活性評価	19
第2節 アポトーシスシグナル伝達分子 Fas の活性評価	22

第3節	アポトーシスシグナル伝達分子 Bax の活性評価	・ ・ ・ ・ ・ 23
第4節	小括	・ ・ ・ ・ ・ 24
第5章	LPC 誘導性アポトーシスと G 蛋白共役型受容体 G2A (G protein-coupled receptor 123) の検討	・ ・ ・ ・ ・ 25
第1節	LPC による G2A 発現誘導	・ ・ ・ ・ ・ 26
第2節	小括	・ ・ ・ ・ ・ 28
第6章	9-hydroxyoctadecadienoic acid (9-HODE) の細胞障害性の検討	・ ・ ・ ・ ・ 29
第1節	9-HODE の細胞障害性の検討	・ ・ ・ ・ ・ 30
第2節	PC による細胞障害性に対する 9-HODE の影響	・ ・ ・ ・ ・ 31
第3節	フローサイトメトリーによるアポトーシス細胞の検出	・ ・ ・ ・ ・ 32
第4節	小括	・ ・ ・ ・ ・ 34
総括		・ ・ ・ ・ ・ 35
実験方法		・ ・ ・ ・ ・ 39
引用文献		・ ・ ・ ・ ・ 44
謝辞		・ ・ ・ ・ ・ 48

【序論】

肝内結石症や原発性硬化性胆管炎（PSC : primary sclerosing cholangitis）などの胆汁うっ滞性肝疾患や膵胆管合流異常において、胆管癌・胆嚢癌併発のリスクが高いといわれている¹⁻⁴⁾。この胆管癌の発生メカニズムとして、胆管への膵液逆流により、膵臓で産生される **phospholipase A₂**（PLA₂）の胆汁中濃度が上昇し、慢性炎症が起こることが引き金となり発癌に寄与していると想定されている。

膵胆管非合流異常症患者の胆汁と膵液そのものでは変異原性を示さないが、胆汁と膵液を混和後の変異原性は、60%以上が変異原性陽性であった¹⁾。このことから、混和による化学反応で生じた物質が発癌に寄与している可能性が示唆される。また、胆管上皮細胞は常に胆汁に暴露されているため、胆汁組成⁵⁾（Fig. 1）の変化が発癌に寄与している可能性は高いと考えられている。

リン脂質は細胞膜の主要構成成分で、タンパク質と共に膜の流動性や膜構造の維持など膜機能制御に関する役割を担っている。リン脂質に **phospholipase** が作用することで、リゾリン脂質と脂肪酸が生成される。**Lysophosphatidylcholine**（LPC）はリゾリン脂質の一種であり、界面活性作用や血管拡張阻害作用を有し、アテローム性疾患への関与、ヒト血管上皮細胞⁶⁾、肝細胞⁷⁾、Tリンパ球⁸⁾およびラット海馬細胞⁹⁾など種々の細胞に対してアポトーシスを誘導することが明らかになっている。

膵胆管合流異常を生じた胆汁中において、LPC 濃度が膵胆管合流異常を発症していない患者に対して約 10 倍以上に増加する¹⁾。さらに、重症の膵炎発症に PLA₂ が深く関与し、PLA₂ により生成される LPC が膵細胞や胆管細胞に対しアポトーシスを誘導し、傷害を引き起こすことが示唆されている。このことから、合流異常による化学反応で生じた LPC が発癌に寄与している可能性が考えられている。

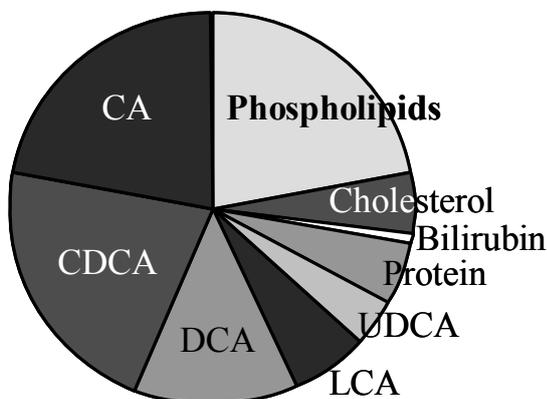


Fig. 1. Typical solute composition of hepatic and gallbladder biles in normal humans.

CA: chole acid,

CDCA: chenodeoxychole acid,

DCA: deoxychole acid,

LCA: lithocholic acid,

UDCA: ursodeoxychole acid

胆汁中の主要構成成分であるリン脂質の

LPCが生成する過程を Fig. 2 に示す。一種 phosphatidylcholine の sn-2 エステル結合が、PLA₂ によって加水分解されることにより LPC と遊離脂肪酸が生成される¹⁰⁾。そして、LPC は脂質メディエーターとして生体内で様々な生理作用を示す。その一部の作用として G 蛋白共役型受容体 G2A (G protein-coupled receptor 123) が関与しているとの報告が多数ある^{9,11)}。

G2A は、1998 年に T/B リンパ球の細胞周期を調整する受容体としてクローニングされ¹²⁾、2001 年に LPC の受容体として報告された¹³⁾が、後に 9-hydroxyoctadecadienoic acid (9-HODE) などの酸化遊離脂肪酸がリガンドとしてより強い活性を示すことが報告された¹⁴⁻¹⁷⁾。また、LPC は G2A 受容体発現を up-regulate させ、アポトーシスと密接に関与していることが報告されている^{9,11)}。LPC、酸化遊離脂肪酸および G2A がどのような調節機能で関与し合い、アポトーシス誘導に効果を示すのかは未だ解明されていない。また、G2A はリンパ球や脾臓に高発現し¹⁸⁻²⁰⁾、炎症や免疫反応に関与しているが、生体内での詳細な役割は明らかになっていない。

細胞死のメカニズムはアポトーシスとネクローシスに区別される。ネクローシスは、細胞が膨張して破裂し、内容物が周囲に漏れ出ることによって炎症を伴う細胞死である。一方、アポトーシスは個体の生命を維持するために、プログラムされた細胞死であり、恒常性の維持や免疫系の成立などに重要な役割を果たしている。

アポトーシスの特徴は、その過程で炎症は誘導されず、アポトーシスを起こしている細胞の周辺の組織が破壊されないことである²³⁾。アポトーシス異常に起因する疾患の発生機序は以下の 2 つが考えられる²⁴⁾。①アポトーシス抑制により癌細胞などの有害細胞が除去されない。②アポトーシス過亢進により正常細胞が死滅する。

通常、細胞膜二重層における膜内外の脂質組成は異なっており、非対称性を保っている。負電荷を持った phosphatidylserin (PS) は細胞膜を構成するリン脂質の一種であり、通常は内膜側に存在している。しかし、アポトーシスが起ると、PS が細胞外に露出する。

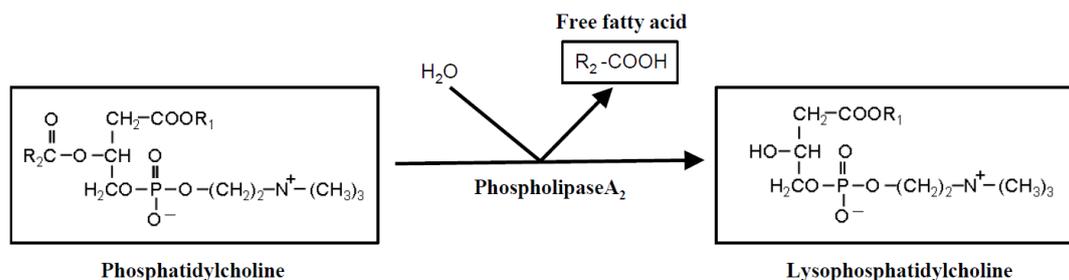


Fig. 2. Biogenetic pathway of lysophosphatidylcholine.

R₁, R₂: acyl group

このような細胞膜の非対称性の崩壊により細胞膜の崩壊が起こる (Fig. 3)。その過程で、染色体の凝集や核の断片化、細胞自体の断片化によりアポトーシス小体の形成が起こる。

このアポトーシス小体や細胞膜糖タンパク質の構造変化を近隣細胞や食細胞が認識して貪食することで排除される²⁵⁾。

アポトーシスシグナル伝達機構では、前述したような形態学変化の前に、多くの場合で細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が起こる。それに続いて、細胞内で様々なアポトーシスシグナルの誘導、決定、実行という一連の過程を経て進行し、各段階で制御されている。この機構により、不要になった細胞や異常な細胞を除外できる。

アポトーシスシグナル伝達機構には MAPK (mitogen-activated protein kinase) 経路や、Fas/FasL 系、細胞外ストレスによる直接的刺激など、多くの経路が存在し、細胞種やレセプターを刺激する物質により異なる経路を辿ることが知られている。例えば、細胞外でデスリガンドがデスレセプターに結合すると、FADD (Fas-associated death domain) を介して、caspase-8 が複合体を形成、多量体化することで、隣接した caspase 同士が互いに切断し合い活性化される²⁶⁾。さらに、ミトコンドリアから cytochrome C が放出され、cytochrome C が Apaf-1 (apoptosis protease activating factor-1) と procaspase-9 複合体に結合することで活性化型 caspase-9 となる。続いてアポトーシス実行因子である caspase-3 が活性化され、細胞アポトーシスが実行される。シトクロム C の放出や caspase-9 が活性化される細胞はミトコンドリア依存性の Type II に分類されミトコンドリア非依存性の細胞は Type I に分類される。

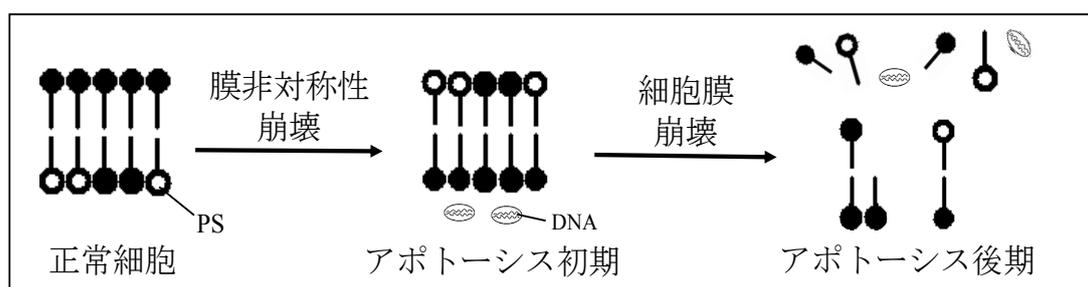


Fig. 3. Disruption mechanism of apoptosis cell membrane. PS: phosphatidylserin

LPC の基質である PC は細胞膜や胆汁中に豊富に存在し、胆汁中リン脂質の約 95%を占めるといわれている。PC は胆汁中においてコレステロール、胆汁酸とミセルを形成することにより、強い界面活性作用を有する疎水性胆汁酸から胆管上皮を保護する役割を演じている。肝内結石症の胆汁中リン脂質濃度が低下していることや、PC の胆汁分泌が欠如している進行性家族性胆汁鬱滞症 3 型では胆管炎を発症することが報告されている²¹⁾。さらに、膵胆管合流異常症では胆汁中 PC 濃度の低下と LPC 濃度の上昇が認められ、LPC が PC の 2 倍以上の濃度となることが報告されており²²⁾、胆汁中 PC 濃度の減少がこれらの病態に関与している可能性が考えられる。

本研究では、胆汁中の主要構成成分である PC を基質として PLA₂ により生成される LPC の胆管上皮癌細胞におけるアポトーシス誘導作用および細胞障害作用に対する 9-HODE、PC の影響について検討した。

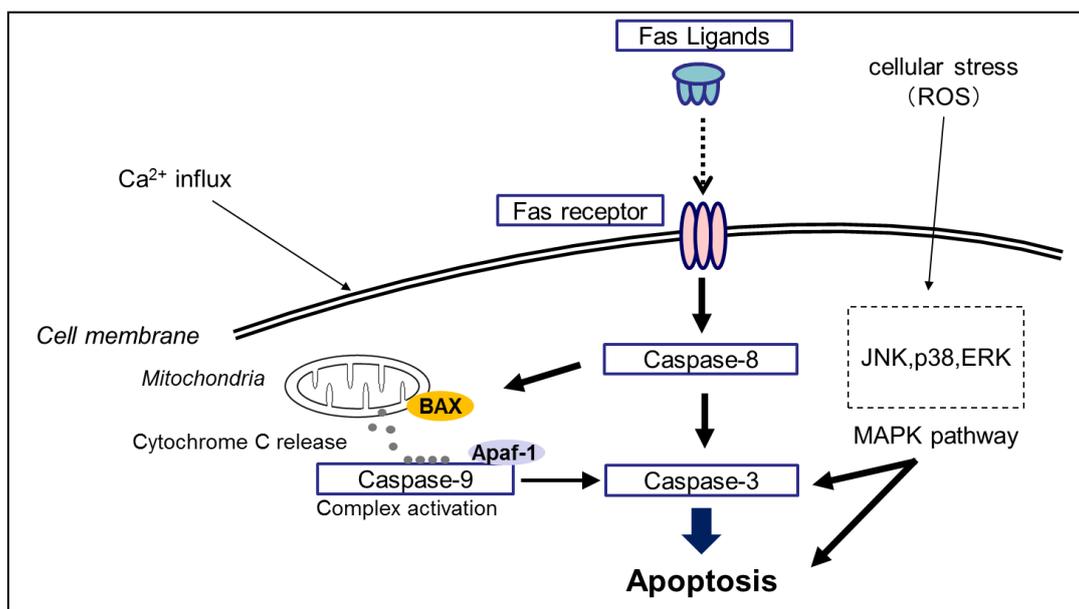


Fig. 4. General apoptosis signaling pathway.

【本論】

第1章

Lysophosphatidylcholine (LPC) が胆管上皮癌細胞の増殖動態に及ぼす影響

LPC は、ヒト血管上皮細胞や肝細胞などで細胞障害作用を示すことが知られている^{6,7)}。しかし、ヒト胆管上皮細胞に対する細胞障害作用は報告されていない。本章では、ヒト胆管上皮癌細胞株 HuCCT-1 細胞における、LPC の細胞障害作用について検討を行った。

本検討では、MTT assay (Fig. 5) により LPC の細胞毒性を検討した。MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) とはテトラゾリウム塩の一種であり、生細胞中のミトコンドリア内脱水素酵素により還元され、不溶性の暗青色 formazan に変化する。この formazan 生成量を測定することにより、ミトコンドリア酵素活性 (=細胞の生存率) を求めることが出来る^{27,28)}。

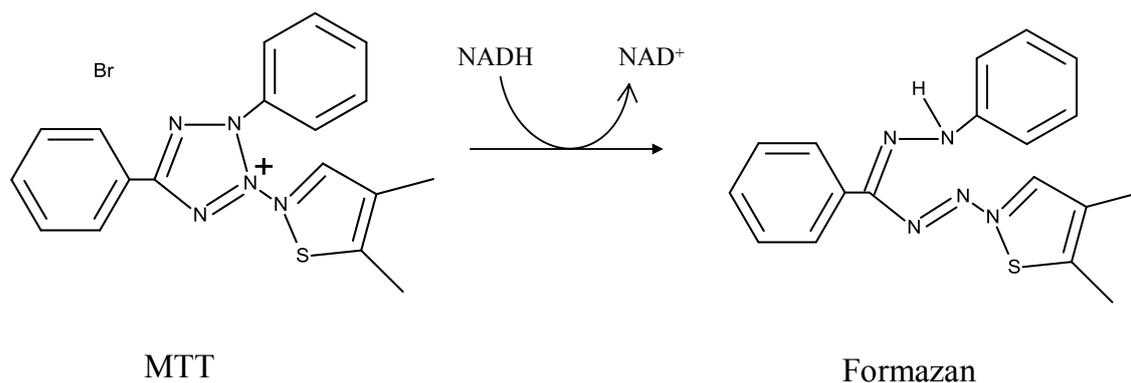


Fig. 5. Cleavage of MTT and formation of formazan by active cells.
MTT: 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide

第1節 MTT assay による LPC の細胞増殖動態の検討

本節では、HuCCT-1 細胞の細胞増殖動態に及ぼす LPC の濃度および時間依存的な影響について検討した。濃度は 1、10 および 100 μM 、時間はそれぞれ 1、5 および 10 時間で測定を行った。その結果として、100 μM LPC の 1 時間曝露群では細胞障害作用はみられなかったが、5、10 時間曝露することにより、細胞障害作用が経時的に有意に誘導された (Fig. 6)。LPC 1、10 μM 曝露群では細胞障害作用への影響はみられなかった。

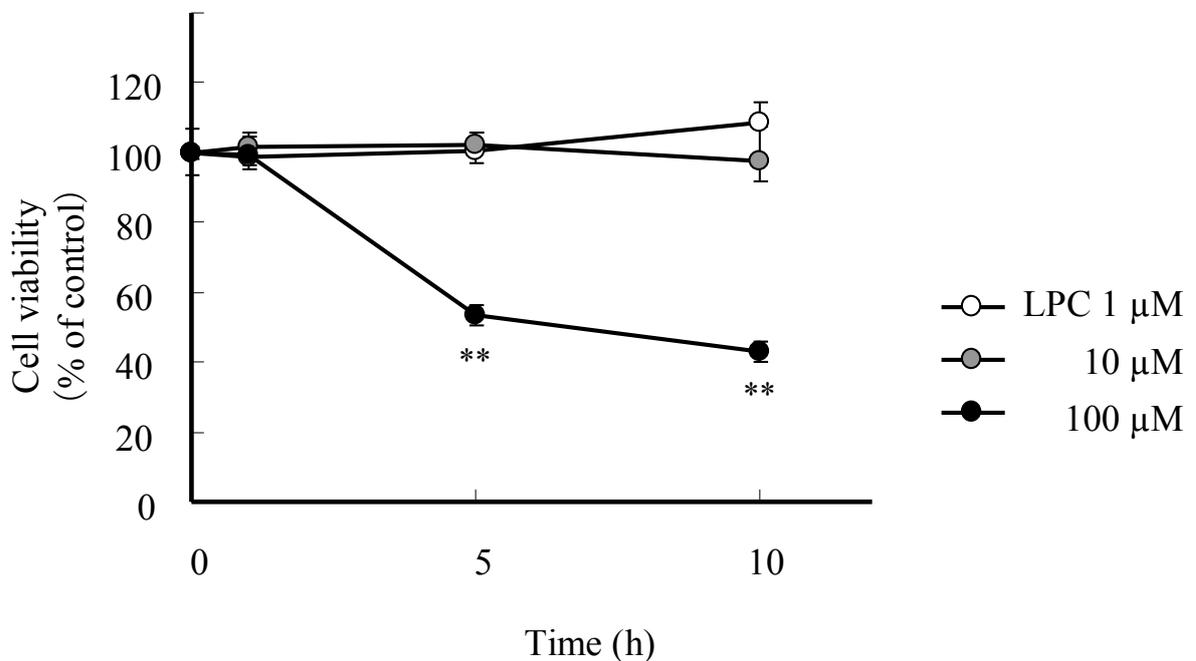


Fig. 6. Effects of lysophosphatidylcholine (LPC) on cell proliferation in HuCCT-1 cell. HuCCT-1 cells were incubated with DMEM medium containing 1, 10 or 100 μM LPC for 1, 5 or 10 hr. Cell viability was determined by MTT assay. Each value represents the mean \pm S.E. (n=6) ** $p < 0.01$ vs. vehicle.

第2節 小括

本章では、HuCCT-1 細胞に対して、LPC による細胞障害作用がみられる 10 時間曝露までで検討を行った。その結果として、LPC 1、10 μM では 10 時間曝露しても細胞増殖を抑制しなかった。しかし、LPC 100 μM 曝露群では 1 時間曝露では増殖抑制を示さなかったが、5 時間以降で有意な細胞増殖の抑制作用を示した。よって、HuCCT-1 細胞に対して、LPC 100 μM では遅くとも 5 時間から細胞障害作用が引き起こされることが示唆された。

ラット膀胱細胞において LPC は、25 μM で 24 時間曝露することによって細胞障害作用を引き起こした²⁾。本実験において HuCCT-1 細胞に対しては、24 時間曝露でも、さらに高濃度で用いなければ細胞障害作用を誘導しなかった。これは、HuCCT-1 細胞が癌細胞であるため、正常細胞と比較して増殖能が高いためであると考えられた。

また、HuCCT-1 細胞における倍加時間は、約 15~20 時間である。図 1 には示していないが、今回は 24 時間まで検討を行った。24 時間後では細胞数が 2 倍になっている可能性が十分に考えられる。しかし、通常の細胞培養液中には細胞増殖因子である FBS を 10%含有しているが、LPC 曝露中の溶液は FBS を含んでいない。そのため、FBS 存在下との倍加時間は異なると想定される。実際に、LPC 100 μM を 24 時間曝露すると生細胞の割合が増加していた。これは、HuCCT-1 細胞の増殖能が LPC による細胞障害作用よりも上回っていたためであると考えられた。

第2章

LPCによるアポトーシス誘導作用

第1章では、LPC 100 μM 曝露は、HuCCT-1 細胞に対して細胞障害作用を示し、細胞死を惹起することが示唆された。LPC はヒト血管上皮細胞⁶⁾、肝細胞⁷⁾、Tリンパ球⁸⁾およびラット海馬細胞⁹⁾など種々の細胞に対してアポトーシスを誘導することが明らかになっている。

そこで本章では、HuCCT-1 細胞において、LPC による細胞死がアポトーシスに起因するものであるか検討を行った。

第1節 フローサイトメトリーによるアポトーシス細胞の検出

本検討では、FITC (fluorescein isothiocyanate) 標識 Annexin V とヨウ化プロピジウム (Propidium Iodide: PI) で二重染色した HuCCT-1 細胞を、フローサイトメーターを用いて検出することにより、LPC によるアポトーシス誘導作用を検出した。

生体内でアポトーシスを起こした細胞は、マクロファージなどの貪食細胞により除去されることが知られている。これらの貪食細胞は、アポトーシス細胞の細胞膜脂質二重層における非対称性の変化など、細胞表層の変化を認識している²⁹⁾。アポトーシス初期では、通常細胞の内膜側に存在している phosphatidylserin (PS) が、膜の構造を維持したままで細胞膜外に出てくるなど、膜の非対称性が変化する。Annexin V は、 Ca^{2+} 存在下で細胞表層に露出した PS に対して強い親和性を示す。一方、アポトーシス後期では、膜が構造的に劣化するため、DNA 親和性である PI が細胞内に入り込み、DNA と結合する³⁰⁻³²⁾。

よって、FITC 標識 Annexin V と PI の二重染色を用いた場合、アポトーシス初期では Annexin V と PS の結合は観察されるが、細胞膜構造は維持されているため PI と DNA は結合しない (Fig. 7b)。アポトーシス後期やネクローシスの場合、細胞膜の構造が崩壊するため、Annexin V と PI の両方の結合が観察される (Fig. 7c)。アポトーシス後期の細胞では細胞膜が崩壊しているため、ネクローシスとの判別が付きにくいといわれている。そのため、本検討では「アポトーシス細胞 = アポトーシス初期細胞」と仮定した。

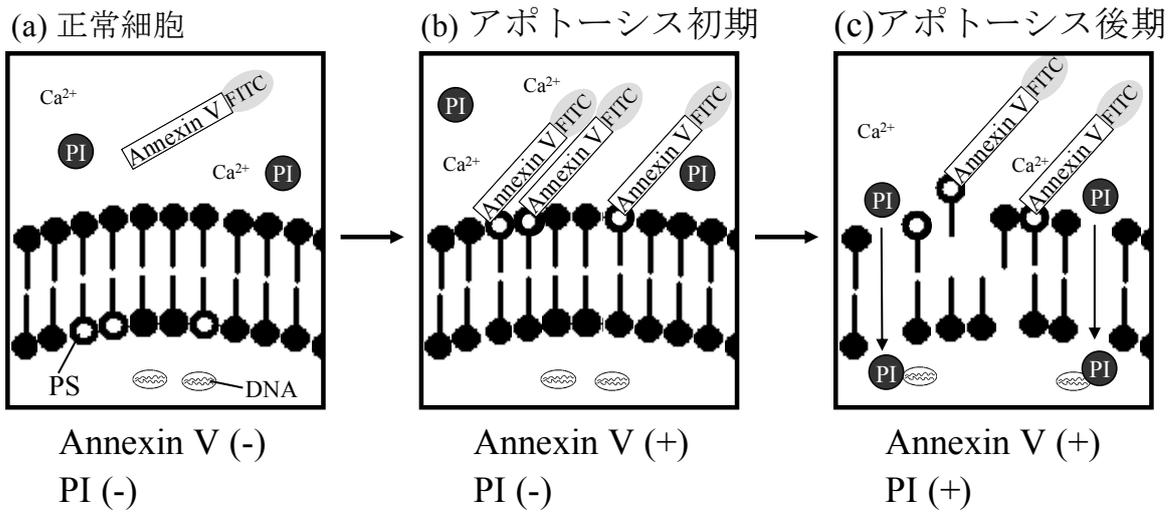


Fig. 7. Detection of apoptosis utilizing Annexin V and PI.
(+) : positive for binding、 (-) : negative for binding

LPC 曝露による時間依存性アポトーシス誘導について検討を行った。その結果、HuCCT-1 細胞において LPC 100 μ M、5 時間曝露群ではコントロールと比較してアポトーシス細胞の割合が上昇した (Fig. 8)。

このサイトグラムを、LPC 曝露群のアポトーシス細胞の割合をコントロールのアポトーシス細胞割合で除してグラフ化したものを Fig. 9 に示す。その結果、アポトーシス細胞の割合は 5 時間でコントロールの 2 倍に増加し、10 時間で 2.3 倍まで上昇した。グラフには示していないが、アポトーシス後期細胞・ネクロシス細胞の割合も時間依存的に増加傾向を示し、生細胞は時間の経過と共に減少傾向を示した。

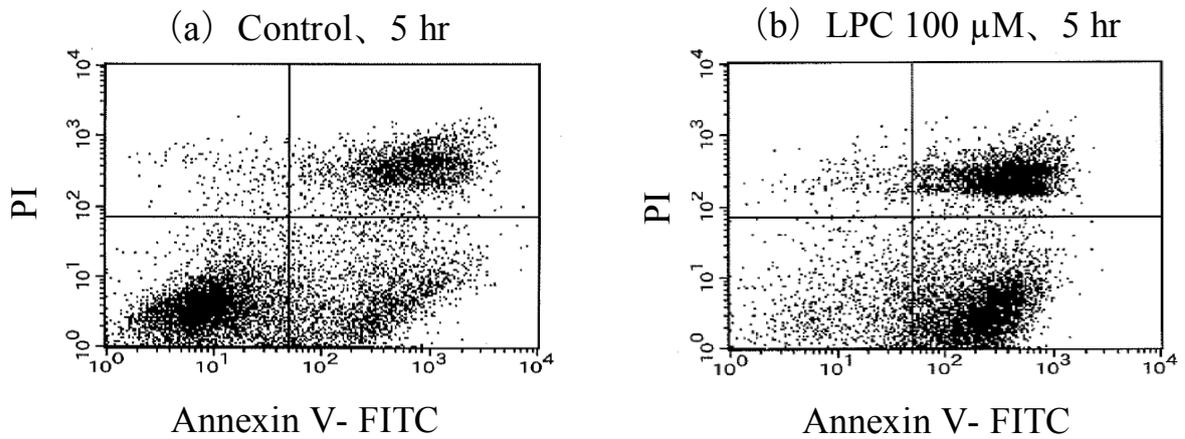


Fig. 8. Apoptotic and necrotic death of HuCCT-1 were distinguished using FITC labeled annexin V and propidium iodide (PI) stain. HuCCT-1 cell were treated as indicated above each panel and then analyzed by flow cytometry. The lower left quadrants of each panel show the viable cells, which exclude PI and are negative for annexin V binding (Annexin V-: PI-). The lower right quadrants represent the early apoptotic cell, positive for annexin V binding and negative for PI uptake (Annexin V+: PI-). The upper right quadrants represent the later apoptotic cell and necrotic cells, positive for annexin V binding and negative for PI uptake (Annexin V+: PI+).

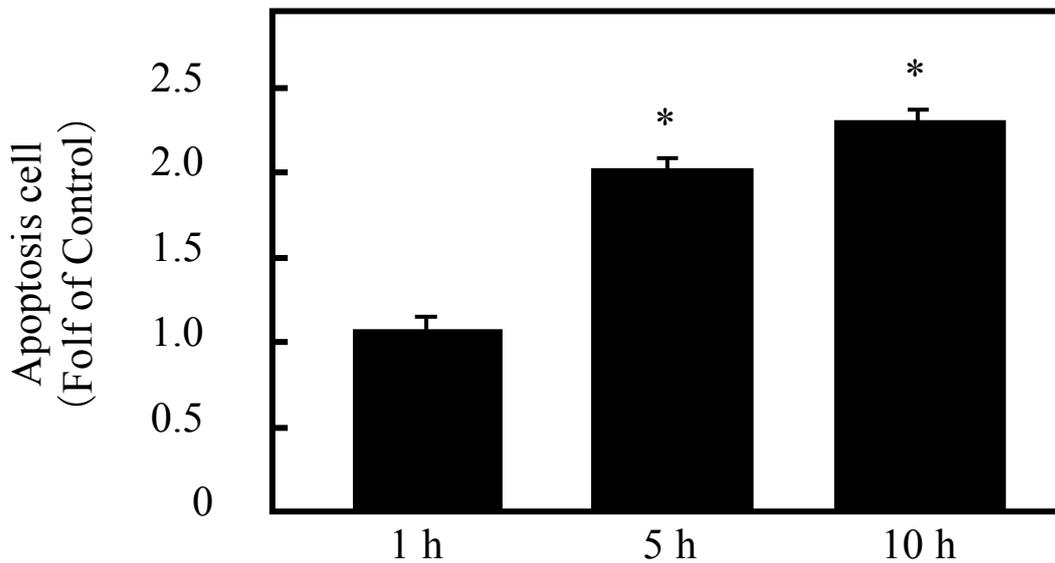


Fig. 9. Time course of apoptosis induction on HuCCT-1 cell by LPC. Flow cytometric analysis of annexin V-FITC/PI double stained cells that were incubated with 100 μ M LPC for 1, 5 or 10 hr. Each value represents the mean \pm S.E. (n=6) *p<0.05 vs. control.

第 2 節 LPC 誘導性アポトーシス細胞における核の形態学的変化

第 1 節では、フローサイトメトリーによって、LPC 曝露によりアポトーシスが誘導されることを確認した。本節では、アポトーシスに伴う最も特徴的な形態変化の 1 つである、核の断片化を観察した。共焦点レーザー顕微鏡を用い、DAPI (4',6-diamidino-2'-phenylindole dihydrochloride) 色素 (Fig. 10) で核染色した細胞を観察した。DAPI は細胞膜透過性の青色蛍光色素であり、細胞の DNA (アデニン・チミン対) と特異的に結合する^{33,34}。

その結果は、コントロール細胞の核と比較して、LPC 100 μM 、5 時間曝露群では核の断片化が観察された。よって、フローサイトメトリーの結果と同様に、HuCCT-1 細胞において LPC 誘導性アポトーシスが引き起こされていることが明らかとなった。

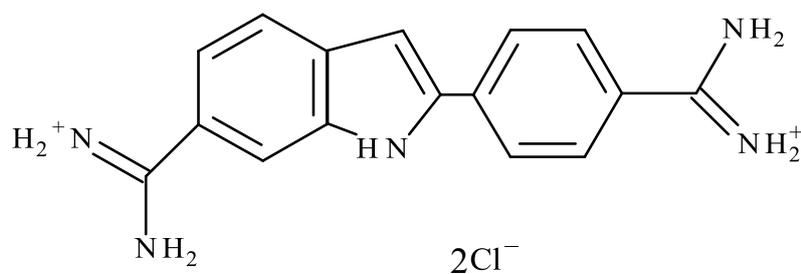


Fig. 10. Chemical structural formula of DAPI.

DAPI: 4',6-diamidino-2'-phenylindole dihydrochloride

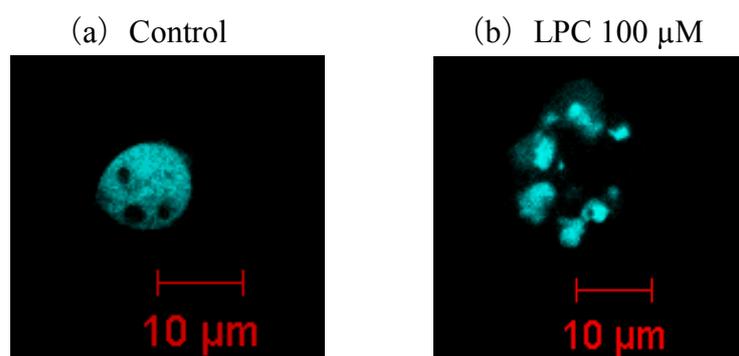


Fig. 11. LPC induced apoptosis in HuCCT-1 cells. Detection of apoptosis by DAPI staining. Nuclear morphology was observed by fluorescence microscope. HuCCT-1 were incubated without (a) or with 100 μM LPC (b).

第3節 小括

本章では、HuCCT-1 細胞に対する LPC の細胞障害作用が、アポトーシスに起因するものであるか検討した。その結果、フローサイトメトリーによるアポトーシス細胞の検出において、LPC 100 μ M 5、10 時間曝露群で有意なアポトーシス細胞数の上昇を認めた。また、DAPI 染色においては、アポトーシスに特徴的な形態学的変化である核の断片化を観察した。したがって、LPC は HuCCT-1 細胞においてアポトーシスを誘導し、細胞障害作用を示すことが示唆された。

フローサイトメトリーの結果から、アポトーシス初期細胞数は 5 時間よりも 10 時間でさらに増加していたが、ネクローシスおよびアポトーシス後期細胞も 10 時間で増加傾向を示した。よって、今後の検討では、LPC によるアポトーシス誘導作用のみを検討するため、ネクローシスの影響が少ない LPC 100 μ M、5 時間曝露群をアポトーシス細胞として扱うことが適切であると考えた。

第3章

LPCによる細胞障害に対する phosphatidylcholine (PC) の影響

PCはLPCの基質であり、胆汁中や細胞膜に豊富に存在している。PCは胆汁中においてコレステロールや胆汁酸とミセルを形成することにより、強い界面活性作用を有する疎水性胆汁酸から胆管上皮を保護している。そのため、PCの胆汁分泌が欠如している進行性家族性胆汁鬱滞症3型や、リン脂質トランスポーターであるAbcb4 (ATP binding cassette protein B4) をノックアウトしたマウスでは、進行性の非化膿性破壊性胆管炎を発症する³⁵⁾。また、原発性胆汁性肝硬変(PBC)ではPCの細胞内減少および胆汁中への排出量の低下が病態を形成していることが想定されており³⁶⁾、PBC治療においてursodeoxycholic acid(UDCA)投与後のセカンドラインとして使用されるフィブラート系薬剤は、胆汁中へのPCの排出増加がその作用機序であると考えられている。

PCは通常、胆汁中リン脂質の約96%を占めるのに対し、LPCは2%程度を占めるにすぎない。しかし、膵胆管合流異常症の胆汁中ではこの組成が変化し、LPCがPCの2倍以上の濃度となることが報告されている²²⁾。

そこで本章では、LPCの細胞障害作用に対するPCの影響についての検討を行った。

第1節 LPCによる細胞障害に対するPCの影響

本節では、LPC 100 μM と PC 100、200、400、800 μM を併用して5時間曝露し、LPCにより誘導される細胞障害性に対するPCの影響をMTT assayおよびフローサイトメトリーで検討した。Fig. 12にMTT assayの結果を示す。HuCCT-1細胞の生存率はLPC単独添加によって低下したが、PC 200、400、800 μM の併用条件においてはPCの濃度依存的細胞生存率が上昇し、PCの併用による細胞保護的な作用が認められた。

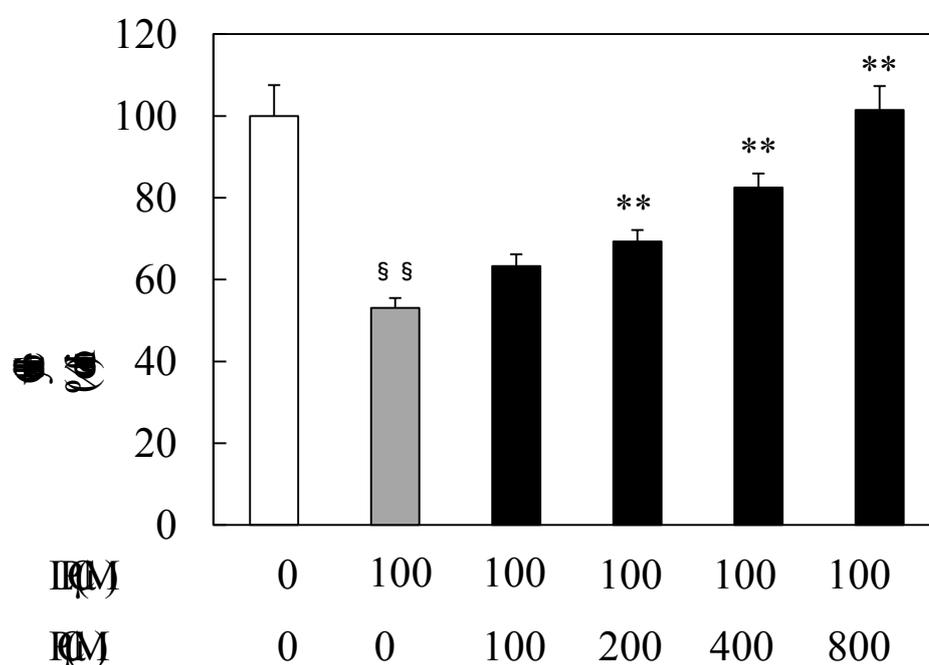


Fig. 12. Effect of PC on LPC-induced cell damage in HuCCT-1 cells. Each value represents the mean \pm S.E. (n=6) §§P<0.01 vs. control. ** P<0.01 vs. LPC only.

次に、PCによるLPC誘導性アポトーシス抑制作用についてフローサイトメトリーによる検討を行い、生細胞、アポトーシス細胞、ネクローシス細胞を区別した。LPC 100 μM と PC 400 μM を併用することにより、LPCによるアポトーシス誘導が抑制された (Fig. 13c)。PC併用群の生細胞、アポトーシス細胞、ネクローシス細胞の割合はコントロールと同程度となった (Fig. 13d)。

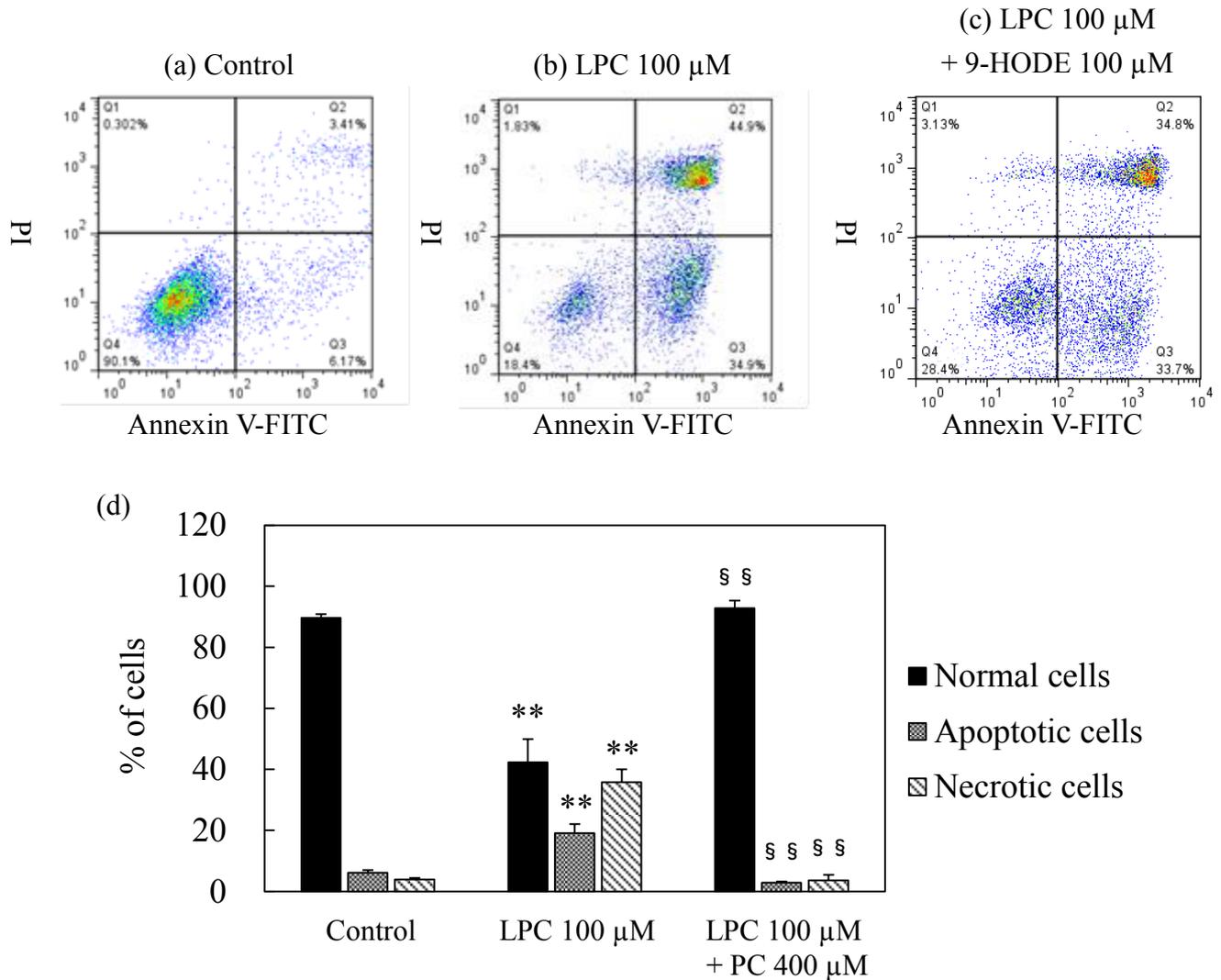


Fig. 13. Apoptotic and necrotic cells were distinguished using FITC labeled Annexin V and PI stain. HuCCT-1 cells were treated as indicated above each panel and then analyzed by flow cytometry. (a)(b)(c) dot plots. The lower left quadrants of each panel show viable cells, negative for PI uptake and Annexin V binding (Annexin V-; PI-). The lower right quadrants represent early apoptotic cells, positive for Annexin V binding and negative for PI uptake (Annexin V+; PI-). The upper right quadrants represent later apoptotic cells and necrotic cells, positive for Annexin V binding and PI uptake (Annexin V+; PI+). (d) percentage of apoptosis/necrosis. Each value represents the mean \pm S.E. (n=6) **P<0.01 vs. each group of control. $\S\S$ P<0.01 vs. each group of LPC 100 μ M.

第2節 小括

本章では LPC のアポトーシス誘導作用に及ぼす PC の影響について検討した。LPC 100 μM と PC 100 μM の併用では LPC による細胞障害は抑制されなかったが、PC 200、400、800 μM の併用により PC の濃度依存的な細胞保護作用が認められた。

次に、MTT assay を用いた検討において細胞保護作用が十分に認められた PC 400 μM を LPC 100 μM と併用し、フローサイトメトリーによる検討を行った。その結果、アポトーシス、ネクローシス、生細胞の割合は PC 400 μM の併用によりそれぞれコントロールと同程度となり、PC による細胞保護作用が示された。

本章の結果より、PC が LPC に対して過剰に存在する生理的条件下では、PC により LPC 誘導性の細胞障害が抑制されていることが考えられた。通常胆汁中リン脂質は約 96% が PC、約 2% が LPC であるため、今回の実験条件は通常胆汁と比較して LPC に対する PC の割合が低い。本検討で用いた HuCCT-1 細胞は癌細胞であり、正常細胞と比較して増殖能が高いため、通常胆汁組成に対する PC の割合が低い条件で LPC に対する保護作用が認められた可能性がある。

一方、HuCCT-1 細胞において LPC 100 μM と PC 100 μM の併用では保護作用がみられなかった。膵胆管合流異常症では胆汁中 LPC 濃度の増加と PC 濃度の減少が起こり、LPC が PC の 2 倍以上の濃度となることが報告されており²²⁾、この胆汁中リン脂質組成の変化が胆管上皮細胞障害を惹起する可能性が推測された。

第4章

LPCによるアポトーシスシグナル伝達経路

第1章および第2章で、HuCCT-1細胞において、LPCによりアポトーシスが誘導され、細胞障害作用が生じることが明らかとなった。本章では、LPC誘導性アポトーシスにおけるシグナル伝達経路について検討を行う。

本章で検討を行ったシグナル経路を Fig. 14 に示す。主にアポトーシスシグナル伝達経路は、細胞外からのストレスやデスレセプターにシグナルが伝わることで進行する。代表的なデスレセプターとして、Fas レセプターが知られている。Fas 系によってアポトーシスを起こす細胞は、下流の情報伝達経路により2種類 (Type I、Type II) に分類される。Type I はミトコンドリア非依存的に細胞死を誘導するのに対し、Type II はミトコンドリア依存的に細胞死を誘導する^{32,37)}。

デスレセプターが刺激されると、Fas 関連分子から刺激を受けた procaspase-8 が活性化され、活性型 caspase-8 となる。活性化された caspase-8 は procaspase-3 から caspase-3 へと活性化させる一方、ミトコンドリアの活性化を促進する分子である Bid をプロセッシングして活性型の tBid とする。tBid によりミトコンドリアからの遊離を促進されたシトクロム C は、caspase-9 および Apaf-1 と複合体を形成する。Caspase-9 は複合体を形成することにより、アポトーシス実行因子である caspase-3 を活性化させる。

よって、caspase-9 などが活性化される細胞はミトコンドリア依存性の Type II に分類され、caspase-9 の活性化を伴わないミトコンドリア非依存性の細胞は Type I に分類される。

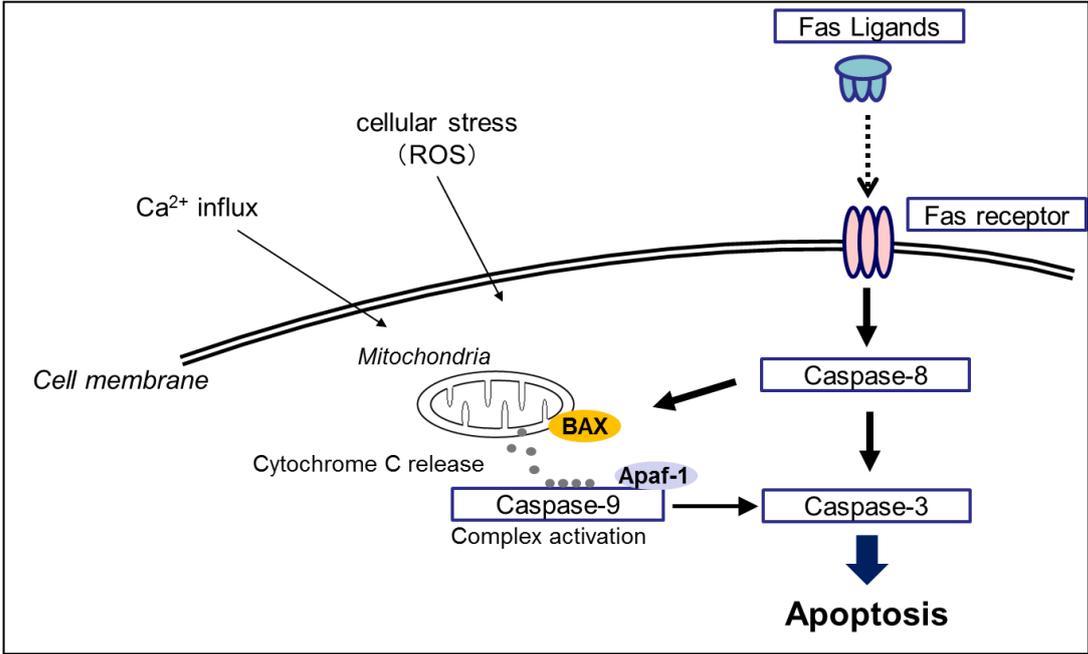


Fig. 14. Apoptosis signaling pathway.

第1節 アポトーシスシグナル伝達分子 caspase-3、8、9の活性評価

Caspase は、デスレセプター連結反応、DNA 破損、ストレスなど様々なアポトーシスシグナルに呼応して活性化されるシステインプロテアーゼである。

多くの分子を基質として認識、切断し、アポトーシスに伴う変化に関与している³⁸⁾。いずれの caspase も、その活性中心にシステイン残基を持ち、正常の細胞では前駆体として存在している。Caspase が基質を認識するには、基質の切断部位の N 末端の 4 つのアミノ酸が必須である。さらに、基質の切断部位には、N 末端にアスパラギン酸を必要とし、アスパラギン酸の C 末端側を切断する^{24, 39)}。

本検討では、上記の性質を利用して caspase-3、8 および 9 の活性を測定した。Caspase によって認識される 4 アミノ酸の配列の C 末端側に pNA

(p-nitroaminilide) を結合させ、この合成基質から遊離される pNA 量を測定する (Fig. 15)。pNA にのみ吸収される波長 (400-405 nm) で吸光度を測定することで、caspase の活性を測定することが出来る²⁴⁾。

発色基質として caspase-3 に特異的配列を持つ DEVD-pNA、caspase-8 に特異的配列を持つ IETD-pNA、caspase-9 に特異的配列を持つ LEHD-pNA を用いた。

(D : アスパラギン酸、E : グルタミン酸、V : バリン、A : アラニン、I : イソロイシン、T : トレオニン、L : ロイシン、H : ヒスチジン)

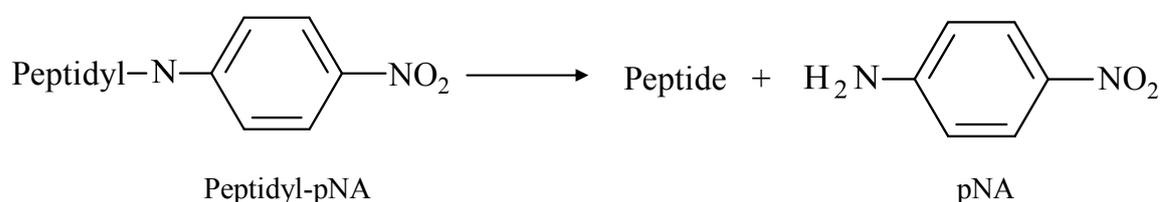


Fig. 15. Cleavage of peptidyl-pNA and formation of pNA (p-nitroaminilide) .

LPCによる caspase 活性化作用

第2章までに、LPC 100 μM は遅くとも5時間でアポトーシスを惹起することが判明した。10時間曝露群では後期アポトーシスおよびネクローシスも同時に進行していた。そのため、アポトーシスのみを検討する目的で曝露時間を5時間に設定し、LPC誘導性のアポトーシスシグナル伝達経路に caspase が関与しているか否か検討した。

その結果、HuCCT-1細胞におけるLPC 100 μM 曝露によりアポトーシス実行因子である caspase-3 は1.6倍 (Fig. 16)、デスレセプター依存性である caspase-8 は1.8倍 (Fig. 17)、ミトコンドリア依存性 caspase-9 は1.7倍 (Fig. 18) まで活性が上昇した。一方、低濃度LPC (10、50 μM) を5時間曝露させた群では caspase-3、8 および9 で共に有意な活性の上昇はみられなかった。よって、HuCCT-1細胞においてLPC 100 μM によるアポトーシス誘導作用には caspase-3、8 および9 が関与していることが示唆された。

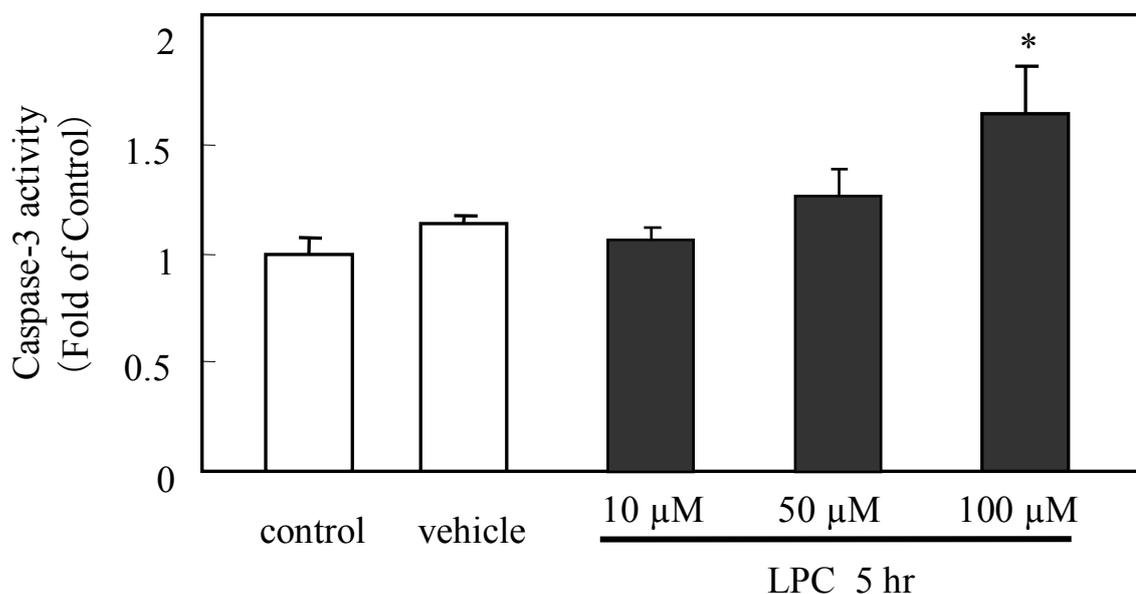


Fig. 16. Caspase-3 activity in LPC induced apoptosis cells. HuCCT-1 cells were incubated with LPC 10, 50 or 100 μM for 5 hr. Each value represents the mean \pm S.E. (n=6) * p<0.05 vs. control.

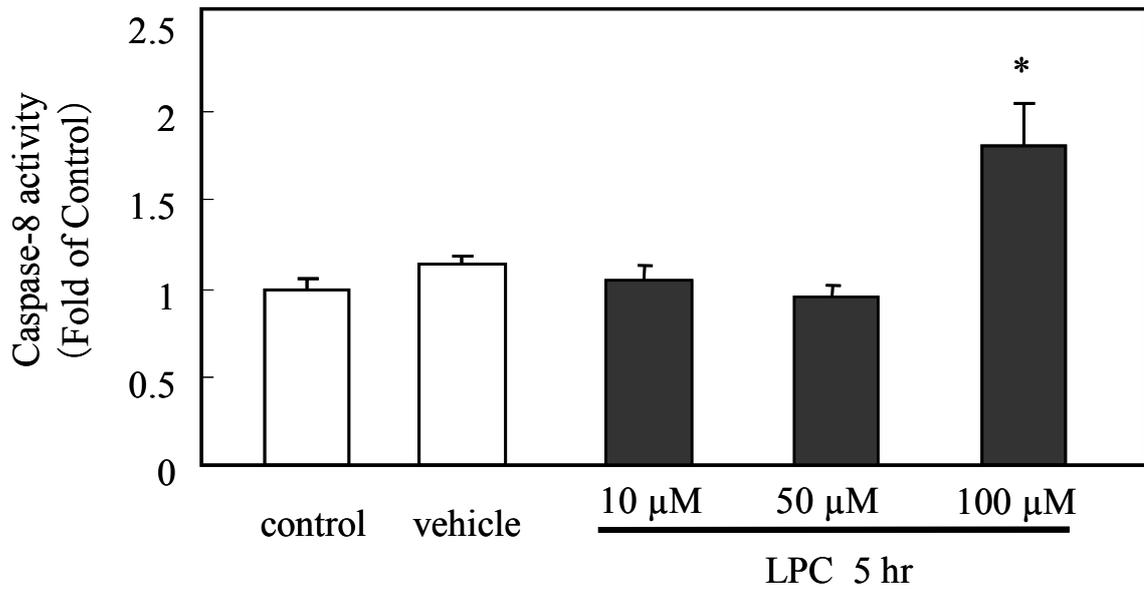


Fig. 17. Caspase-8 activity in LPC induced apoptosis cells. HuCCT-1 cells were incubated with LPC 10, 50 or 100 μ M for 5 hr. Each value represents the mean \pm S.E. (n=6) * p<0.05 vs. control.

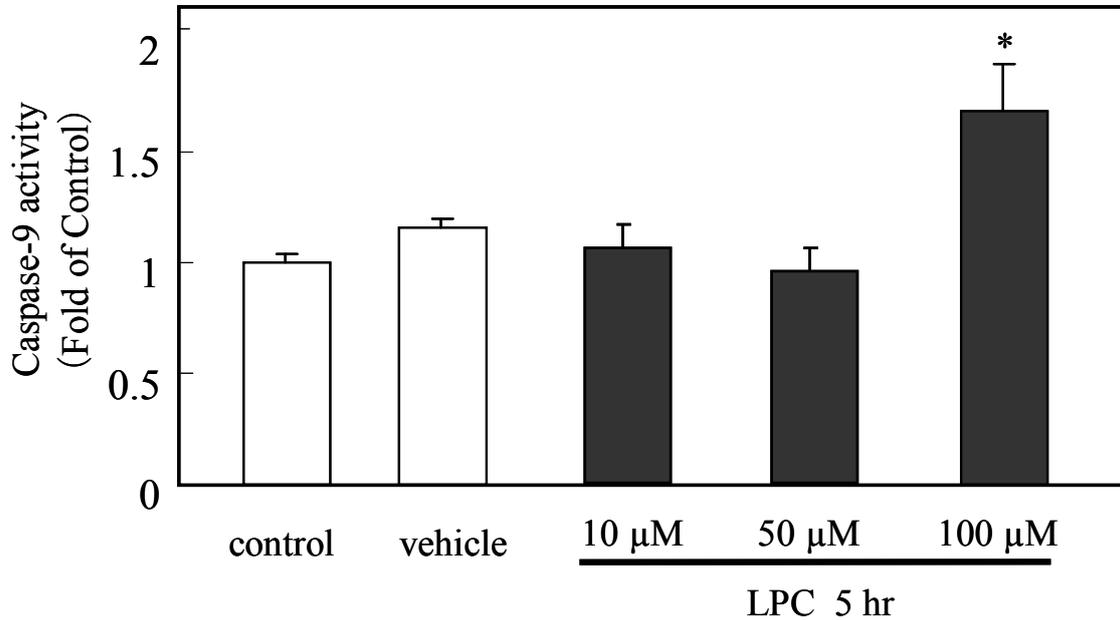


Fig. 18. Caspase-9 activity in LPC induced apoptosis cells. HuCCT-1 cells were incubated with LPC 10, 50 or 100 μ M for 5 hr. Each value represents the mean \pm S.E. (n=6) * p<0.05 vs. control.

第2節 アポトーシスシグナル伝達分子 Fas の活性評価

LPCによるアポトーシスに caspase-3、8、9 が関与していることが第1節で明らかとなったので、本節では real-time PCR 法を用い、アポトーシスシグナル伝達経路に関与するデスレセプターの1種である Fas レセプターの mRNA 発現について検討した。

その結果は、コントロールと比較して LPC 100 μ M、1 および 5 時間曝露群で共に約 7 倍まで mRNA 発現が上昇した (Fig. 19)。データには示していないが、Fas リガンドの mRNA は、LPC 曝露群において発現誘導されなかった。よって、Fas レセプターからのシグナル伝達によって生じるアポトーシスは、LPC からの刺激により惹起されている可能性が示唆された。

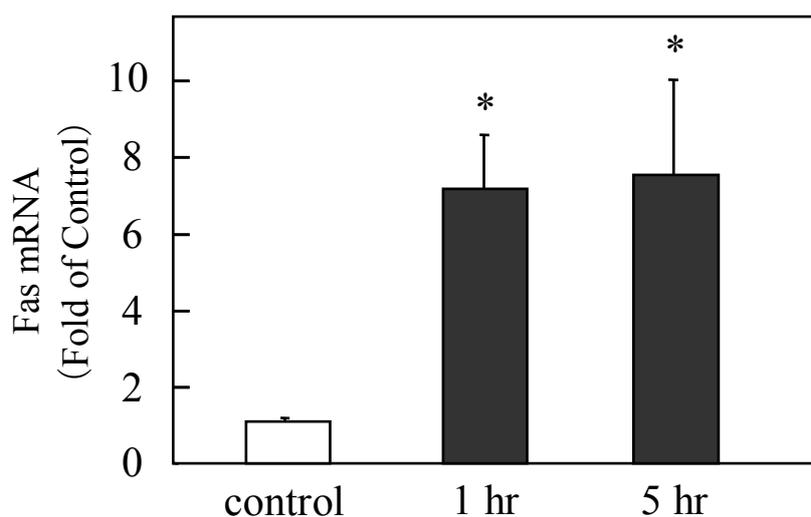


Fig. 19. Fas receptor expression in LPC induced apoptosis cell by real-time PCR. HuCCT-1 cells were incubated with LPC 100 μ M for 5 hr. Each value represents the mean \pm S.E. (n=6) * p<0.05 vs. control.

第3節 アポトーシスシグナル伝達分子 Bax の活性評価

Bax はミトコンドリア膜に発現し、cytochrome C の放出を促進してアポトーシスを促進する分子である。本節では real-time PCR 法を用い、ミトコンドリア依存性アポトーシスシグナル伝達経路に関与する Bax の mRNA 発現について検討した。その結果、LPC 100 μ M、5 時間曝露群でコントロールと比較して約 3 倍まで Bax の mRNA 発現が上昇した (Fig. 20)。よって、LPC により活性化されるアポトーシスシグナル伝達経路においてミトコンドリア依存性経路が活性化されることが示唆された。

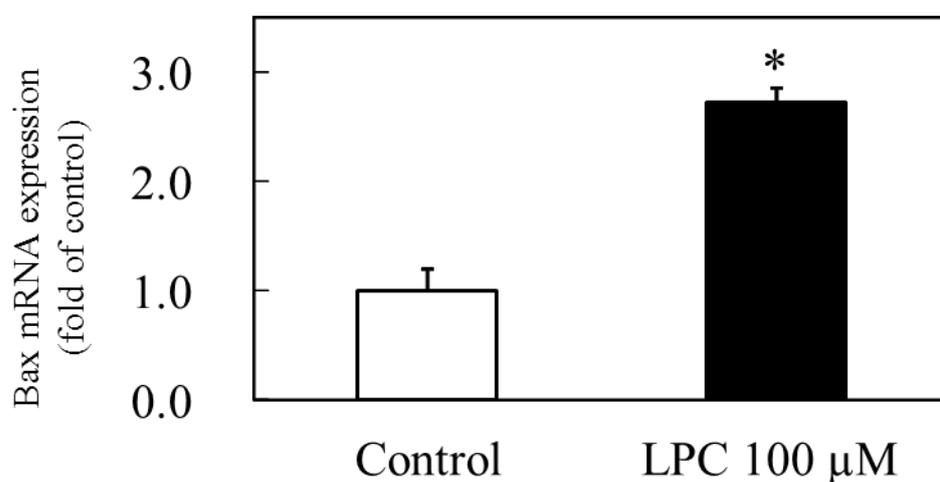


Fig. 20. RT-PCR analysis of Bax mRNA in HuCCT-1 cells. Each value represents the mean \pm S.E. (n=6) *P<0.05 vs. control.

第4節 小括

本章では、HuCCT-1 細胞に対する、LPC 誘導性アポトーシスシグナル伝達経路について検討を行った。LPC は、ラット海馬細胞において caspase-3 および 8⁹⁾、ラット臍細胞やヒト臍帯静脈内細胞においては caspase-3^{2, 40)}を介してアポトーシスを誘導することが報告されている。

その結果、HuCCT-1 細胞において LPC 100 μ M、5 時間曝露により、アポトーシス実行因子である caspase-3、デスレセプター依存性である caspase-8、ミトコンドリア依存性である caspase-9 の活性が上昇した。また、LPC 100 μ M、1 時間および 5 時間曝露群において Fas レセプターの mRNA 発現が約 7 倍まで誘導された。

よって、HuCCT-1 細胞における LPC 誘導性アポトーシス経路は、Fas レセプターの発現が上昇することにより、デスレセプター依存性 caspase-8 が活性化され、同時にミトコンドリア依存性 caspase-9 の活性化、アポトーシス実行因子である caspase-3 の活性化が起こり、アポトーシスが誘導されることが示唆された。

また、LPC 曝露により Bax の発現増加が認められたことから、LPC によるアポトーシスではミトコンドリア依存性の経路が活性化されるということが示された。Bax はミトコンドリア膜に存在し、ミトコンドリアの膜透過性を亢進させることでミトコンドリア外膜と内膜の間にある膜間スペースからの cytochrome C の放出を促進する分子である。Bax により cytochrome C の放出がおこり、下流の caspase-9 および caspase-3 が活性化されるとアポトーシスが実行される。今回の結果から、LPC によりミトコンドリア依存性のアポトーシスシグナル伝達経路が活性化され、HuCCT-1 細胞にアポトーシスが誘導されることが示された。

今回の結果から、HuCCT-1 細胞における LPC 誘導性アポトーシスシグナル伝達経路は Fas 受容体を介したデスレセプター依存性経路だけでなく、ミトコンドリア依存性経路を活性化させることが想定された。

第5章

LPC 誘導性アポトーシスと G 蛋白共役型受容体 G2A (G protein-coupled receptor 123) の検討

G 蛋白共役型受容体 G2A は、当初 LPC の受容体であるとの報告があった¹³⁾が、後に酸化遊離脂肪酸の受容体として機能することも報告された¹⁴⁻¹⁷⁾。しかし、LPC は G2A 受容体発現を up-regulate させ、アポトーシスと密接に関与していることが報告されている^{9,11)}。LPC が G2A に対してどのような機序で関与し、アポトーシスを誘導させ、さらに G2A 受容体のリガンドである酸化遊離脂肪酸に対してどのような作用を有するかは未だ解明されていない。また、G2A はリンパ球や脾臓に高発現し¹⁸⁻²⁰⁾、炎症や免疫反応に関与している¹⁷⁾が、生体内での詳細な役割は明らかになっていない。

G2A は、Gs、Gi、Gq、G₁₃ タンパク質と結合していることが報告されており^{17,41)}、G₁₃ タンパクを介した低分子 G タンパク質 RhoA の活性化、Gq タンパク質を介したイノシトールリン酸 (IPs) 産生促進、細胞内カルシウムイオンの動員など、現在までに様々な機能を有することが報告されている^{13,42,43)}。また、細胞外 pH に感受性を持ち、pH 低下により G2A 活性が低下するという報告もある^{18,42,44,45)}。

一方、G2A はリガンド非依存的な性質を有することも明らかとなっている⁴²⁾。そのため、G2A はいくつかの G タンパク質と共役しているが、これらの G タンパク質の活性化は必ずしも LPC 刺激を必要としない。しかし、LPC を刺激したときは、G タンパク質発現を上昇させる⁸⁾。

そのため、本検討では、LPC が G2A 受容体の発現を上昇させることで、G2A 受容体との親和性を高め、G2A に依存したシグナル伝達が誘導されると仮定し、検討を行った。

第1節 LPCによるG2A発現誘導

本節では、HuCCT-1細胞におけるG2A受容体発現の有無およびG2A発現がLPC曝露によって影響を受けるか否か検討した。結果は、LPC 100 μ M、1および5時間曝露にてコントロールと比較して約5倍までG2A mRNA発現量が上昇した。これは、一般的にG2A受容体高発現臓器として報告されている脾臓、リンパ腫細胞株と同程度であった (Fig. 21)。よって、HuCCT-1細胞においてLPCによりG2A受容体がmRNAレベルで発現が誘導されることが明らかとなった。

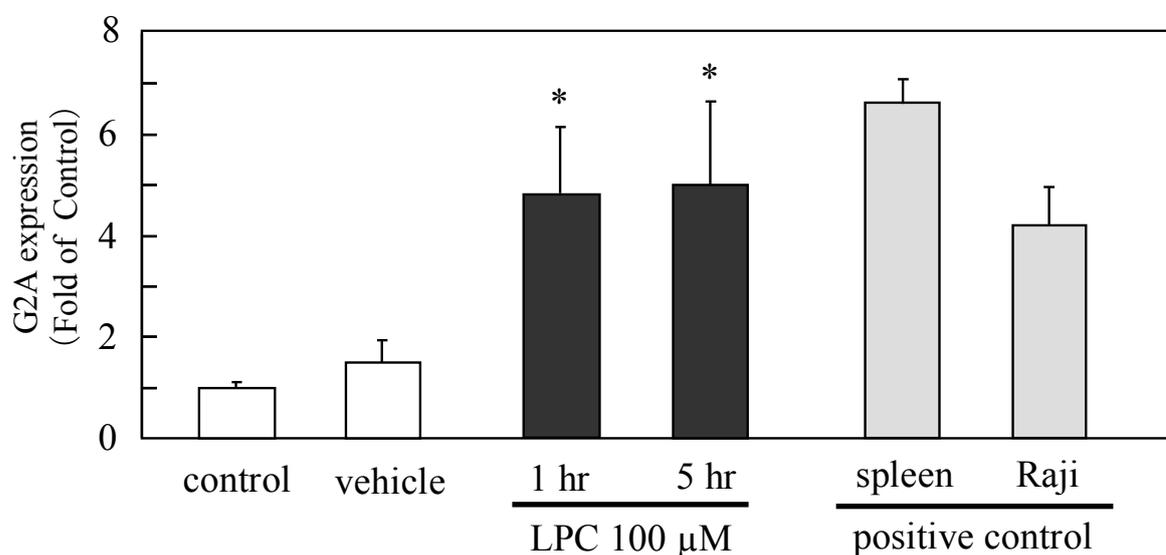


Fig. 21. G2A receptor expression in LPC induced apoptosis cell by real-time PCR. HuCCT-1 cells were incubated with LPC 100 μ M for 5 hr. Each value represents the mean \pm S.E. (n=6) * p<0.05 vs. control. Raji: Human Burkitt's lymphoma cell line

さらに、低濃度 LPC (1、10、50 μM) での G2A 受容体の発現について検討を行った。LPC 1 μM では G2A mRNA の発現上昇は見られなかったが、LPC 10、50 μM では LPC 100 μM 曝露と同程度まで発現上昇が認められた (Fig. 22)。G2A タンパク質においてもコントロールと比較して LPC 10、50 および 100 μM 曝露にてバンドが濃く現れているため、LPC により濃度依存的に G2A 受容体タンパク発現が増加していることを確認した (Fig. 23)。

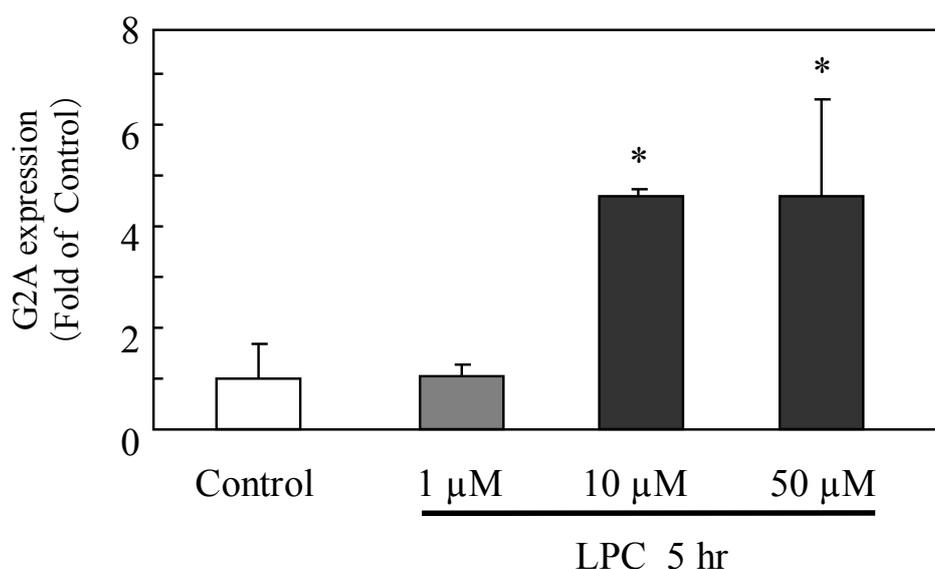


Fig. 22. G2A receptor expression in LPC induced apoptosis cell by Real-time PCR. HuCCT-1 cells were incubated with LPC 100 μM for 5 hr. Each value represents the mean \pm S.E. (n=3) * p<0.05 vs. vehicle.

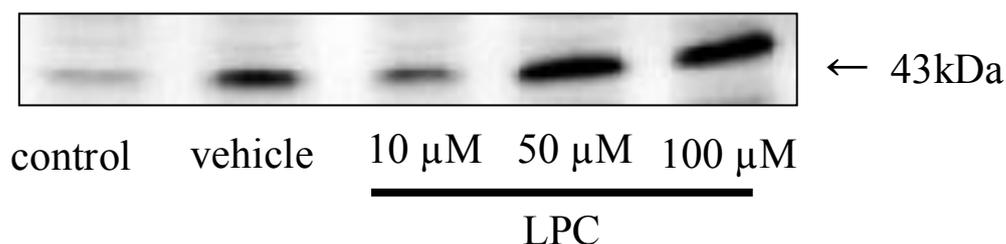


Fig. 23. LPC induced G2A receptor aggregation. HuCCT-1 cells were treated with LPC 10, 50 or 100 μM for 5 hr. HuCCT-1 cell lysates were prepared and used for Western blot analysis.

第2節 小括

本章では HuCCT-1 細胞において、LPC による G2A mRNA の発現誘導について検討した。その結果、LPC 100 μM 、1 および 5 時間曝露にてコントロールと比較して約 5 倍まで G2A mRNA 発現量が上昇した。さらに、低濃度 LPC (1、10、50 μM) での G2A 受容体の発現について検討を行った。LPC 1 μM では G2A 受容体 mRNA 発現上昇は見られなかったが、LPC 10、50 μM では LPC 100 μM 曝露と同程度まで発現上昇が認められた。G2A 受容体タンパク質においても LPC 10、50、100 μM 曝露にて発現量が増加していた。よって、HuCCT-1 細胞において LPC により G2A 受容体の発現が誘導されることが明らかとなった。

G2A は種々の細胞においてアポトーシスに関与することは報告^{9,11)}されており、本検討で HuCCT-1 細胞においても、LPC 曝露により発現が誘導されることが明らかとなった。G2A 受容体が LPC の特異的な受容体として作用するかは明らかではないが、HuCCT-1 細胞における LPC 誘導性アポトーシスシグナル伝達経路に、G2A 受容体に関与している可能性が示唆された。

第6章

9-hydroxyoctadecadienoic acid (9-HODE) の細胞障害性の検討

LPC が PLA₂ の作用により生成する際、同時に PC の sn-2 位由来の遊離脂肪酸が生成する。したがって、PLA₂ 活性の亢進に伴い胆汁中 LPC 濃度が増加する状況下では、通常よりも高濃度の LPC および遊離脂肪酸が共存することが考えられる。リン脂質の sn-2 位には不飽和脂肪酸が結合し易いことが知られており、胆汁中リン脂質に結合する脂肪酸の約 30% がリノール酸であることが報告されている⁴⁶⁾。そのため、PLA₂ の作用により生じる遊離脂肪酸のうちでは、リノール酸の占める割合が高いことが考えられる。

9-HODE はリノール酸由来の酸化脂肪酸であり、G2A のリガンドとして強い活性を示す¹⁶⁾ことや、ヒト単球性細胞にアポトーシスを誘導する¹⁵⁾ことが報告されているが、HuCCT-1 細胞における作用は報告されていない。第5章において、LPC 100 μM、5 時間曝露で G2A の mRNA およびタンパクレベルでの発現増加が認められた。そのため HuCCT-1 細胞において、9-HODE が G2A を介して作用する可能性が考えられる。

9-HODE は酸化ストレスのマーカーとしても注目されており、酸化ストレスが生じる環境において増加すると考えられている。膵胆管合流異常症では胆管への膵液の逆流により慢性炎症が生じ、それにより活性酸素が産生されることが想定されており、実際に膵胆管合流異常症では胆嚢上皮における強い酸化ストレスが認められることが報告されている⁴⁷⁾。したがって、膵胆管合流異常症の胆汁中で通常よりも高濃度の LPC および 9-HODE が共存していることが想定される。

本章では、9-HODE の細胞障害作用および 9-HODE が LPC 誘導性アポトーシスに及ぼす影響について検討を行った。

第1節 9-HODEの細胞障害性の検討

本節では、MTT assayにより9-HODEがHuCCT-1細胞の細胞増殖動態に及ぼす影響について検討を行った。9-HODEの影響について、PLA₂の作用によりLPCと同時に生じる脂肪酸であるリノール酸、オレイン酸、リノレン酸、アラキドン酸の同条件における影響と比較した。9-HODEおよび各種遊離脂肪酸の濃度は10、50、100 μMとし、5時間曝露した。その結果、9-HODE 100 μMで有意な細胞障害性が認められたが、その他の脂肪酸についてはいずれの濃度においても有意な影響は認められなかった (Fig. 24)。

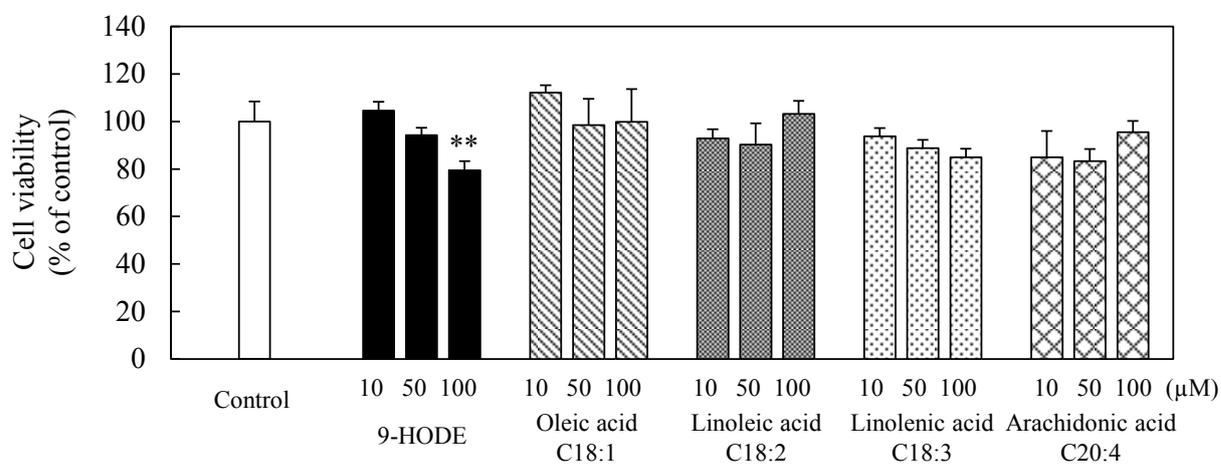


Fig. 24. Effects of various fatty acids on cell proliferation in HuCCT-1 cells. Each value represents the mean \pm S.E. (n=6) **P<0.01 vs. control.

第2節 LPCによる細胞障害性に対する9-HODEの影響

第1節では9-HODEおよび各種遊離脂肪酸の単独の影響について検討を行った。これらの脂肪酸は膵胆管合流異常症や肝内結石症の胆汁中において高濃度でLPCと共存することが考えられる。そこで本節では、LPCと9-HODE又は各種遊離脂肪酸を共存させ、その細胞障害性をLPC単独添加時の細胞障害性と比較した。その結果をFig. 25に示す。LPCとの共存下、いずれの遊離脂肪酸も細胞障害性を示さず、むしろリノール酸とアラキドン酸は低濃度でわずかに細胞保護的な作用を示した。一方、9-HODEはLPCと共存することにより、LPC単独曝露よりも強い細胞障害性を示した。

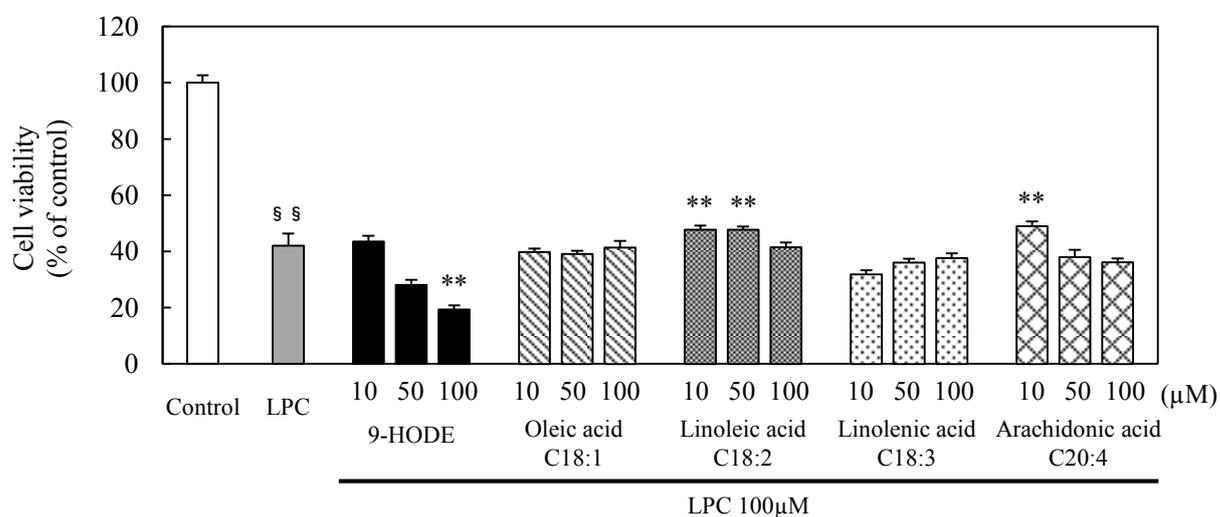


Fig. 25. Effects of various fatty acids on LPC-induced cell damage in HuCCT-1 cells. Each value represents the mean \pm S.E. (n=6) §§P<0.01 vs. control. **P<0.01 vs. LPC only.

第3節 フローサイトメトリーによるアポトーシス細胞の検出

本節では、フローサイトメーターを用いて、LPC と 9-HODE の併用による細胞死の増加がアポトーシスの増加に起因するものであるか否かについて検討した。LPC 100 μM の 5 時間曝露によりアポトーシス細胞は有意に増加した (Fig. 26b)。9-HODE 100 μM を併用することにより、アポトーシス細胞はさらに増加した (Fig. 26c)。

これらのサイトグラムの生細胞、アポトーシス細胞、ネクローシス細胞の割合を、それぞれのコントロールの細胞割合で除してグラフ化したものを Fig. 26d に示す。LPC 単独曝露、9-HODE と LPC の併用の両群において、コントロール群に対するネクローシスを生じた細胞の割合の増加と生細胞の割合の減少が観測された。ネクローシスを生じた細胞の割合はLPCのみの曝露とLPCと9-HODEの併用群の間で同程度であったが、アポトーシス細胞割合はLPCと9-HODEの併用群においてLPC単独曝露群に対し有意に増加した。

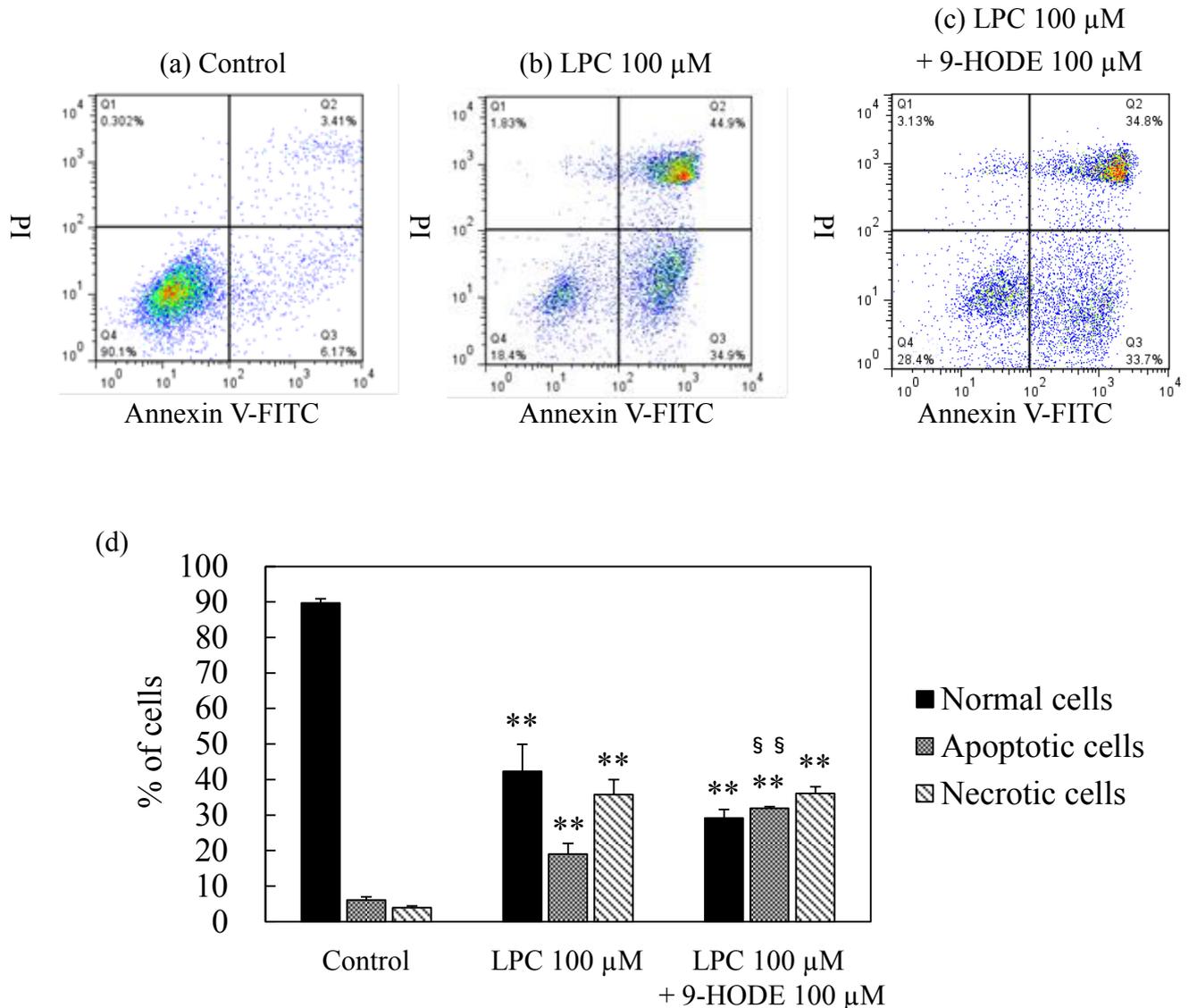


Fig. 26. Apoptotic and necrotic cells were distinguished using FITC labeled Annexin V and PI stain. HuCCT-1 cells were treated as indicated above each panel and then analyzed by flow cytometry. (a)(b)(c) dot plots. The lower left quadrants of each panel show viable cells, negative for PI uptake and Annexin V binding (Annexin V-; PI-). The lower right quadrants represent early apoptotic cells, positive for Annexin V binding and negative for PI uptake (Annexin V+; PI-). The upper right quadrants represent later apoptotic cells and necrotic cells, positive for Annexin V binding and PI uptake (Annexin V+; PI+). (d) percentage of apoptosis/necrosis. Each value represents the mean \pm S.E. (n=6) **P<0.01 vs. each group of control. §§P<0.01 vs. each group of LPC 100 μ M.

第4節 小括

本章では、HuCCT-1細胞におけるLPC誘導性アポトーシスに対する9-HODEの影響について検討を行った。PLA₂の作用によりLPCと同時に生じる遊離脂肪酸であるオレイン酸、リノール酸、リノレン酸、アラキドン酸は細胞障害性を示さず、LPCとの併用においても細胞障害性はみられなかった。一方、9-HODEはHuCCT-1細胞に対して単独で細胞障害性を示し、LPCとの併用において細胞障害性を増強した。フローサイトメトリーの結果から、9-HODEはLPC単独曝露群と比較してアポトーシス細胞を増加させることが示された。

9-HODEがLPCとの共存下でどのような経路を介してアポトーシスを増強するのかは明らかではない。しかし、9-HODEがG2Aのリガンドとして作用することが報告されている¹⁵⁾ことや、当研究室での実験でLPCによりHuCCT-1細胞においてG2Aが誘導された¹⁸⁾ことから、LPCと9-HODEの共存によるアポトーシス誘導の増加にG2Aが関与している可能性が考えられる。これらのことから、HuCCT-1細胞においてLPCによりup-regulateされたG2Aに9-HODEがリガンドとして作用することでアポトーシスの増加がみられたことが推測される。しかし、HuCCT-1細胞においてG2Aと9-HODEがどのようなアポトーシス伝達経路を活性化させるのかという詳細なメカニズムについてはさらなる検討が必要である。

【総括】

胆汁うっ滞性肝疾患や膵胆管合流異常において、胆管癌・胆嚢癌併発のリスクが高いといわれている。それら発癌の原因として、胆管上皮細胞に及ぼす胆汁中成分の組成の変化などによる影響が想定されている¹⁻⁴⁾。さらに、組成変化により変異原性陽性物質が生じ、細胞障害作用やアポトーシスを引き起こす可能性が考えられる。LPCは、胆汁中成分であるPCが膵液で産生されるPLA₂に分解されることにより生成する。生体内（血液中、腹水など）でのLPC濃度は、アルブミンやその他のタンパク質と結合して存在するものも含めて10-150 μMである²⁰⁾が、正常の胆汁中には微量しか存在しないといわれている⁴⁸⁾。しかし、胆管合流異常患者では、合流異常を発症していない患者の約10倍にLPC濃度が増加したという報告がある¹⁾。

我々は今回の検討において、HuCCT-1細胞に対するLPCによるアポトーシス誘導、細胞障害作用およびアポトーシスシグナル伝達機構について検討した。

まず、LPCが細胞増殖に及ぼす影響についてMTT assayを用いて検討したところ、LPC 1、10 μMの濃度では、10時間曝露しても細胞増殖に対して影響を示さなかった。LPC 100 μMでは5時間曝露から細胞障害作用が観察された。

続いて、LPCがHuCCT-1細胞に対する細胞障害作用がアポトーシスによるものであるかフローサイトメトリーにより検討した。その結果として、LPC 100 μM、1時間曝露群ではアポトーシスが見られなかったが、5、10時間曝露群ではアポトーシス細胞の割合が有意に増加した。よって、LPCは胆管上皮細胞に対して、アポトーシスを誘導することが明らかとなった。

更にLPCのアポトーシス誘導作用に及ぼすPCの影響について検討を行った。LPC 100 μMとPC 100 μMの併用ではLPCによる細胞障害は抑制されなかったが、PC 200、400、800 μMの併用によりPCの濃度依存的な細胞保護作用が認められた。フローサイトメトリーによる検討において、アポトーシス、ネクローシス、生細胞の割合はPC 400 μMの併用によりそれぞれコントロールと同程度となった。PCは通常の胆汁においてLPCよりもはるかに多く存在している。しかし、膵胆管合流異常症では胆汁中LPC濃度の増加とPC濃度の減少が起こるために、LPCによる細胞障害作用の増強とPCによる細胞保護作用の減弱が起こることが、胆管上皮細胞障害の一因となっている可能性が推測された。

次に、LPC誘導性アポトーシスのシグナル伝達経路について検討した。アポトーシスは細胞種により異なるシグナル伝達経路を辿り実行され、多くは細胞膜上のデスレセプターを介して伝達される。代表的なデスレセプターであるFas受

容体が薬物などにより刺激されると、受容体の直下にあるアダプター分子などにより細胞内にシグナルが伝達される。I型のアポトーシスはデスレセプター依存性であるcaspase-8が活性化され、ミトコンドリアを介することなくアポトーシスが実行される。一方、II型のアポトーシスはミトコンドリアを介するため、ミトコンドリアからシトクロムCが放出され、caspase-9の活性化を伴う。II型においてcaspase-8は、Bidを介してミトコンドリア膜が関与する細胞内アポトーシスシグナル伝達経路も活性化させる³⁷⁾。Caspase-8および9の活性化により、アポトーシス実行因子であるcaspase-3が活性化され、アポトーシスが実行される。

我々の検討において、Fas受容体のmRNA発現は、LPC 100 μ M、1時間曝露にて上昇した。またcaspase-3、8および9はLPC 100 μ Mで5時間曝露することによって活性が上昇した。このことから、LPCはHuCCT-1細胞において、デスレセプターであるFas受容体の発現誘導によりcaspase-8を活性化し、ミトコンドリア依存性のcaspase-9を介して、アポトーシス実行因子であるcaspase-3を活性化する経路が示唆された。これはII型のアポトーシスに特徴的な挙動であった (Fig. 27)。

LPCによるHuCCT-1細胞に対するアポトーシス誘導について検討した。その結果、LPC 100 μ M、5時間曝露で細胞障害作用が引き起こされ、アポトーシス促進分子であるBaxの発現増加が認められた。今回の結果と、当研究室での過去の検討においてcaspase-9およびcaspase-3の活性化がみられたという結果から、LPCによるアポトーシスはミトコンドリア依存性の経路を介して誘導されるということが示された。また、当研究室の過去の検討において、LPCによりデスレセプターの一つであるFas受容体とデスレセプター依存性であるcaspase-8の活性化もみられたことから、HuCCT-1細胞におけるLPC誘導性アポトーシスシグナル伝達経路ではデスレセプター依存性経路が活性化されることが考えられる。したがって、HuCCT-1細胞におけるLPC誘導性アポトーシスシグナル伝達経路はデスレセプター依存性経路とミトコンドリア依存性経路の両方を介することが想定される。

次に、G2A受容体の発現について検討した。G2A受容体は、当初LPCの受容体であるとの報告があった¹³⁾が、後に酸化遊離脂肪酸の受容体として機能することが報告された。しかし、G2Aは種々の細胞においてLPC誘導性アポトーシスに関与することは報告^{9,11)}されており、何らかの機序でLPC誘導性アポトーシスにG2A受容体に関与していることが考えられる。本研究でも、HuCCT-1細胞に対して、LPC 100 μ M曝露することによりG2A受容体mRNAおよびタンパク発現が上昇した。よって、G2A受容体がLPCの特異的な受容体として作用するかは明らかではないが、HuCCT-1細胞におけるLPC誘導性アポトーシスシグナル伝達経路に、G2A受容体に関与している可能性が示唆された。

また、LPC は正常ヒト乳腺上皮細胞に対して、高濃度 ($\geq 100 \mu\text{M}$) ではアポトーシスを惹起し、低濃度 ($\leq 20 \mu\text{M}$) ではアポトーシスシグナルに関与する分子の mRNA を誘導したという報告がある²⁰⁾。本検討においても、LPC は $100 \mu\text{M}$ で caspase-3、8 および 9 を活性化させ、アポトーシスを惹起させた。一方、低濃度 LPC ($10, 50 \mu\text{M}$) では、caspase-3、8 および 9 は活性化させず、アポトーシスも誘導されなかったが、アポトーシスシグナル関連分子である G2A 受容体の mRNA は低濃度でも発現が誘導された。よって、LPC は高濃度では LPC 自身がアポトーシスを誘導し、低濃度では mRNA レベルでアポトーシスシグナルを促進させる分子として作用するのではないかと考えられた。

PLA₂ の作用により LPC と同時に遊離脂肪酸が生じる。その遊離脂肪酸の 30% 以上を占めるリノール酸は、酸化を受けることで 9-HODE を生成する。9-HODE は G2A のリガンドとして活性を示す¹⁵⁾ことや、LPC が種々の細胞において G2A を介した細胞応答を起こす^{9, 11)}ことが報告されている。当研究室での検討において、LPC は HuCCT-1 細胞の G2A 発現量を増加させた¹⁸⁾。これらの報告から、膵胆管合流異常による炎症反応で生じた LPC および 9-HODE が G2A を介して胆管上皮細胞に影響を及ぼしている可能性が考えられる。

今回の検討により、ヒト胆管上皮癌細胞株 HuCCT-1 細胞に対して、胆汁中成分である PC が膵液酵素 PLA₂ に加水分解されることにより生成される LPC は、アポトーシスを誘導することが明らかとなった。そして、LPC 誘導性アポトーシスシグナル伝達経路は、Fas 受容体が発現誘導、アポトーシス促進分子である Bax の発現増加、caspase-9 および caspase-3 の活性化がみられたという結果から、LPC によるアポトーシスはミトコンドリア依存性の経路を介して誘導されるということが示された。

次に、HuCCT-1 細胞に対する 9-HODE の影響について、PLA₂ の作用により LPC と同時に生じる脂肪酸であるリノール酸、オレイン酸、リノレン酸、アラキドン酸の同条件における影響と比較した。遊離脂肪酸単独の MTT assay の結果、9-HODE $100 \mu\text{M}$ で有意な細胞障害性が認められたが、その他の脂肪酸についてはいずれの濃度においても有意な影響は認められなかった。これらの遊離脂肪酸と LPC $100 \mu\text{M}$ を併用すると、9-HODE $100 \mu\text{M}$ 併用群のみで細胞障害作用の増強がみられた。さらに、フローサイトメトリーによりアポトーシスとネクローシスを区別して検討した結果、9-HODE は LPC によるアポトーシス誘導を増強することが示された。9-HODE の LPC 誘導性アポトーシス増強機序についてはさらなる検討が必要であるが、9-HODE は G2A のリガンドとして作用すると報告されている¹⁵⁾ことや、当研究室での過去の研究において LPC による G2A の発現増加が認められていることから、9-HODE が LPC により発現が増加した G2A を介してアポトーシスを誘導する可能性が考えられる。

さらに、LPC のアポトーシス誘導作用に及ぼす PC の影響について検討を行った。LPC 100 μM と PC 100 μM の併用では LPC による細胞障害は抑制されなかったが、PC 200、400、800 μM の併用により PC の濃度依存的な細胞保護作用が認められた。フローサイトメトリーによる検討において、アポトーシス、ネクローシス、生細胞の割合は PC 400 μM の併用によりそれぞれコントロールと同程度となった。PC は通常の胆汁において LPC よりもはるかに多く存在している。しかし、膵胆管合流異常症では胆汁中 LPC 濃度の増加と PC 濃度の減少が起るために、LPC による細胞障害作用の増強と PC による細胞保護作用の減弱が起こることが、胆管上皮細胞障害の一因となっている可能性が推測された。

今回の検討により、LPC がアポトーシスシグナル伝達においてミトコンドリア依存性経路が活性化されることが示された。また、リノール酸由来の酸化遊離脂肪酸である 9-HODE は LPC と共存することにより、LPC による細胞障害を増強させることが示唆された。以上の結果から、膵胆管合流異常症などの病態下において、胆汁中 PC 由来 LPC や酸化遊離脂肪酸である 9-HODE が胆管上皮細胞障害を来すことが示唆された。

今後、さらに LPC 誘導性アポトーシスに特異的な経路が解明されることにより、胆汁うっ滞や膵胆管合流異常などの LPC 濃度が上昇する病態の発癌機序が解明され、適正な治療法および予防法が確立されることが期待される。

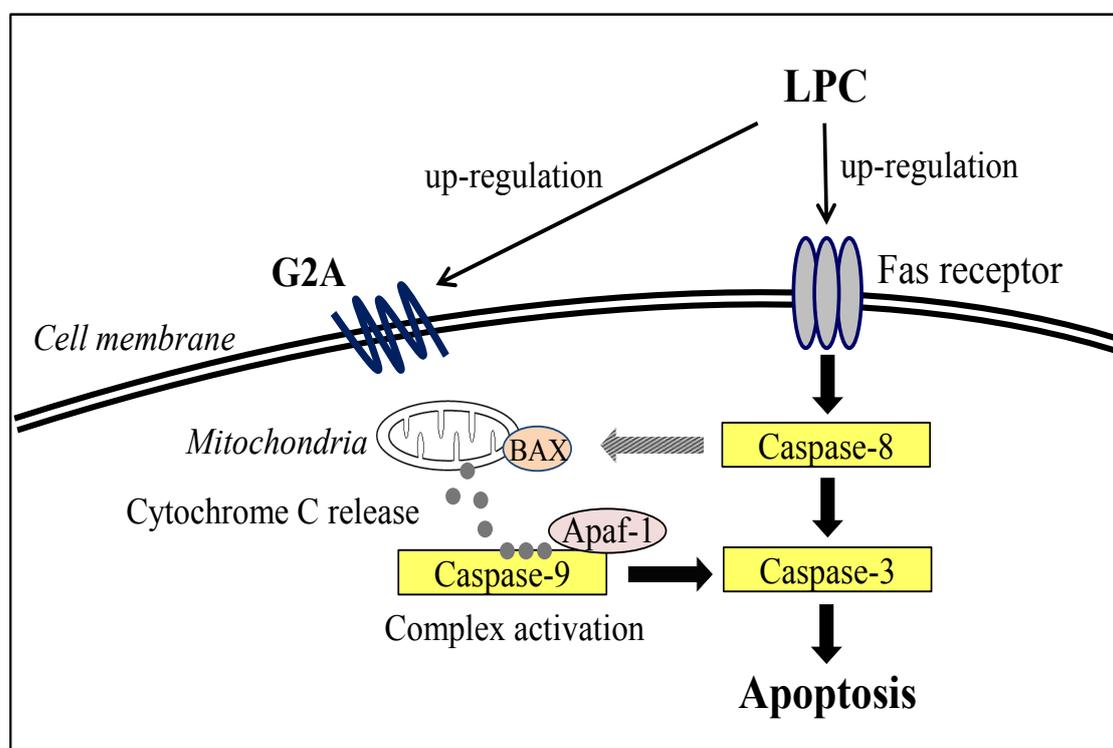


Fig. 27. LPC-induced apoptosis signaling pathway in HuCCT-1 cell.

【実験方法】

1) 実験細胞

不死化ヒト胆管上皮癌細胞株：HuCCT-1

2) 使用試薬

Lysophosphatidylcholine (LPC)

SIGMA-ALDRICH

Phosphatidylcholine (PC) SIGMA-ALDRICH

9-hydroxyoctadecadienoic acid (9-HODE) Cayman

CHEMICAL

3) 試薬調製方法

LPC と PC は溶解補助液としてエタノールを用いて 50 mM の溶液を調製した。-30℃の冷凍庫で保存し、用時溶解して用いた。上記の溶媒を phenol red-free の DMEM を希釈液として段階希釈にて調製した。なお、HuCCT-1 細胞に添加する際のエタノール濃度は、細胞増殖動態に影響を及ぼさない濃度である 3.0%以下になるように設定した。

4) 細胞培養、継代および播種

• 試薬

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)

SIGMA-ALDRICH

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (phenol red-free DMEM) GIBCO®

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (-) (PBS(-)) 日水製薬株式会社

Fetal Bovine Serum (FBS) SIGMA-ALDRICH

Penicillin-Streptomycin solution GIBCO®

(penicillin 10,000 IU/mL、streptomycin 10 mg/mL)

0.25% Trypsin-EDTA solution SIGMA-ALDRICH

他の試薬は市販特級品を使用した。

• 使用機器

10 cm² dish IWAKI

15 mL Centrifuge Tube

nunc TM	
50 mL Centrifuge Tube	IWAKI
CO ₂ incubator	THERMO ELECTRON CORPORATION
卓上多本架遠心機 (LC-220)	TOMY
ヘモサイトメーター	エルマ販売
光学顕微鏡	Nikon

- 培養方法

HuCCT-1 細胞は 10 cm² dish に FBS 10%、streptomycin 1%、penicillin 1% が含まれた DMEM を用いて培養した。継代は 3-4 日おきに細胞密度を 1/5 に希釈して行った。実験には、HuCC-1 細胞を 96 well plate、6 well plate、あるいは 10 cm² dish に添加し、70-80% confluent な状態で用いた。

- 継代方法

HuCCT-1 細胞を 5 mL の PBS(-) で 2 度洗浄後、0.25% Trypsin-EDTA 1.5 mL を添加し、37°C、5% CO₂ で 7 分保温することにより細胞を剥離させた。培地 3.5 mL を添加し細胞浮遊液を作成後、細胞浮遊液 1 mL に培地 9 mL を合わせた^{49,50)}。

5) 実験方法

① HuCCT-1 の増殖能の検討：MTT assay (第 1、3、6 章)

- 使用機器

マイクロプレートリーダー (model 680)	BIO-RAD
Multi Dish 96 wells	nunc TM

- 使用薬剤およびキット

TetraColor ONE[®] (Cell Proliferation Assay System) 生化学工業株式会社
他の試薬は市販特級品を使用した。

- 方法

HuCCT-1 細胞 (1×10⁵ cells/mL) を 96 well plate に播種し、6-24 時間培養した。培養液を除去した後、各濃度の試薬を添加した。各時間曝露後に試薬溶液を除去し、MTT 溶液 100 μL を添加した。2 時間インキュベートした後、吸光度を測定した⁵¹⁾。(測定波長 450 nm)

② アポトーシス細胞の検出：フローサイトメトリー（第2、3、6章）

• 使用機器

フローサイトメーター (FACS Calibur) BD バイオサイエ
ンクス

FlowJo (フローサイトメーター解析) トミーデジタルバイオ
ロジ

5 mL Polystyrene Round-Bottom Tube with Cell-Strainer Cap BD
Falcon™

Multi Dish 6 wells
nunc™

• 使用薬剤及びキット

MEBCYTO-Apoptosis Kit 100 tests MBL

他の試薬は市販特級品を使用した。

• 方法

HuCCT-1 細胞 (1×10^5 cells/mL) を 6 well plate に播種し、2 mL の培地で 48-72 時間培養した。培養液を除去した後、試薬を添加し、アポトーシスを誘導した。5 時間曝露した後に trypsin 処理した細胞を、15 mL Centrifuge Tube に回収し PBS(-) で 1 回洗浄した。binding buffer 85 μ L を懸濁した細胞液に Annexin V と PI を添加し、暗中、室温で 15 分間染色した。染色後、さらに binding buffer 400 μ L を加え、5 mL Polystyrene Round-Bottom Tube with Cell-Strainer Cap に移し、フローサイトメーターにより測定した^{52, 53)}。

③ アポトーシス細胞の蛍光染色：DAPI staining（第2章）

• 使用機器

共焦点レーザーสキャן顕微鏡 (LSM5Pascal) Zeiss.

スライドガラス 共和医理機株式会社

MICRO COVER GLASS MATSUNAMI

遠心分離機 THERMO ELECTRON CORPORATION

• 使用薬剤

DAPI (4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride) Roche

10%-Formaldehyde Neutral Buffer ナカライテスク

他の試薬は市販特級品を使用した。

- 方法

Penicillin-Streptomycin solution を含まないメEDIUMで2回以上継代したHuCCT-1細胞 (1×10^5 cells/mL) を6 well plate に播種し、48-72時間培養した。培養液をアスピレートした後、LPC 100 μ M 2mL を5時間曝露し、セルスクレイパーで細胞を剥がし回収した。PBS(-) で2回洗浄した後、細胞固定液 (10%-Formaldehyde Neutral Buffer) 100 μ L で懸濁し室温で30分間放置した。PBS(-) で洗浄した後、DAPI溶液を混和し、37°Cで15分間インキュベーションした。DAPI溶液をアスピレートし、PBS(-) で懸濁した細胞をスライドガラスに1滴落とし、カバーガラスをかぶせた。共焦点レーザー顕微鏡で観察した。(測定波長 405nm)

④ Caspase 活性の測定 (第4章)

- 使用機器

マイクロプレートリーダー (model 680) BIO-RAD

- 使用薬剤及びキット

Dc Protein assay Reagent A BIO-RAD

Dc Protein assay Reagent B BIO-RAD

APOCYTO Caspase-3 Colorimetric Assay kit 100 tests MBL

APOCYTO Caspase-8 Colorimetric Assay kit 100 tests MBL

APOCYTO Caspase-9 Colorimetric Assay kit 100 tests MBL

他の試薬は市販特級品を使用した。

- 方法

HuCCT1細胞 (5×10^6 cells/10 cm² dish) を10 cm² dish に播種し、3-4日間培養後、培養液をアスピレートし、LPC 100 μ M を5時間曝露した。LPCによりアポトーシスを誘導させた細胞を1.5mL μ -tube に回収し、Cell Lysis Buffer で懸濁した。懸濁した細胞液を遠心し、上清を細胞抽出液とした。細胞抽出液に、10mM ジチオスレイトール(DTT)を含む2 \times reaction buffer を添加した。その後、基質 (caspase-3: DEVD-pNA、caspase-8: IETD-pNA、caspase-9: IETD-pNA、終濃度 200 mM) を添加し、2時間培養した後、吸光度を測定し、遊離した pNA 量を求めた (測定波長 405nm)。pNA 量を、Lowry 法⁵¹⁾にてタンパク定量した各タンパク質濃度で除し、caspase 活性とした。

⑤ アポトーシスシグナル経路関連分子 mRNA の測定 (第4、5章)

- 使用機器

紫外可視吸分光光度計 (DV640 Bio Spectrophostometer)

BECKMAN

COULTER

Takara PCR Thermal Cyclor Dice

Takara

Light Cyclor[®] Capillaries (20 μL)

Roche

Real-time PCR system Light Cyclor1.5 (ST300)

Roche

- 使用薬剤およびキット
RNeasy[®] Plus Mini Kit (50)

QIAGEN

ReverTra Ace[®] qPCR RT Kit

TOYOBO

LightCycler[®] FastStart DNA MASTER PLUS GREEN I

Roche

- 方法
HuCCT-1 細胞 (5×10⁶ cells/10 cm² dish) を 10 cm² dish に播種し、3-4 日間培養した。培養液を除去し、LPC 100 μM を 5 時間曝露した。LPC によりアポトーシスを誘導させた細胞を 1.5 mL マイクロ tube に回収し、PBS(-) で洗浄した。RNeasy[®] Plus Mini Kit を用い、mRNA を抽出した。上記で抽出した mRNA を ReverTra Ace[®] qPCR RT Kit を用いて cDNA に逆転写した。cDNA は LightCycler[®] FastStart DNA MASTER PLUS GREEN I を用いて増幅させ、real-time PCR にて測定した⁵⁴⁻⁵⁶。

⑦ ウェスタンブロット法 (第 5 章)

- 使用機器
Block heater AS ONE
泳動槽 Mini PROTEAN[®] 3 Cell BIO-RAD
ライフサイエンス
- 使用薬剤
RIPA buffer
Protease inhibitor completeMini Roche
GPR132 polyclonal Antibody (G2A 抗体) Proteintech

goat anti rabbit IgG HRP (SC-2004)	Santa cruz
ミニプロテインゲル TGX ゲル	BIO-RAD
Immuno-Blot™ PVDF Membrane for Protein Blotting (0.2 μm)	BIO-RAD
Transfer buffer	
Blocking buffer (0.3% skim milk – 0.1% TBS-T)	

- 方法

HuCCT1 細胞 (5×10^6 cells/10 cm² dish) を 10 cm² dish に播種し、3-4 日間培養した。培養液をアスピレートし、LPC 100 μM を 5 時間曝露した。LPC によりアポトーシスを誘導させた細胞を 1.5 mL μ-tube に回収し、PBS(-) で洗浄した。RIPA buffer と Protein inhibitor で細胞を溶解し、20 分間氷冷後、15000 rpm、4°C で 10 分間遠心分離し、タンパクを抽出した。タンパク濃度は Lowry 法 (DC Protein assay) にて行った。抽出したタンパクを 95°C で 5 分間熱し、12% gel SDS-PAGE 中で、100V、2 時間泳動した。その後、サンドイッチ板を用いて、PVDF Membrane に 100V、1 時間で転写した。Blocking buffer 中で 1 時間振透した後、抗体と反応させ、TBS-T で 3 回洗浄した。その後、イメージング装置を用いて 10 分間蛍光転写を行った。

6) 統計解析

測定値は、平均値±標準偏差で表した。多重比較は Dunnett's test により行った。なお、危険率 1%または 5%未満を有意差有りとした。

【引用文献】

- 1) 伊藤正樹. 総胆管結石, 膵胆管合流異常, 肝内結石, 胆管癌における胆汁中
リゾレシチンの検討. *胆道*, **7**: 491-198 (1993)
- 2) Masamune, A. Sakai, Y. Satoh, A. Fujita, M. Yoshida, M. and Shimosegawa, T.
Lysophosphatidylcholine Induces Apoptosis in AR42J Cells.
Pancreas, **22**: 75-83 (2001)
- 3) 高尾尊身, 新地洋之, 前村公成, 愛甲孝. 膵胆管合流異常と発癌の関係の今.
外科治療, **94**: 823-829 (2006)
- 4) 船曳孝彦. 膵胆管合流異常をめぐって 一主として胆道発癌を中心に一. 日
本消化器外科会誌, **33**: 261-270 (2000)
- 5) David W. Hay, M.D. Martin C Carey, M.D, D.Sc. Pathophysiology and
pathogenesis of cholesterol gallstone formation. *SEMINARS IN LIVER DISEASE.*,
10, 159-170 (1990)
- 6) Takahashi M. Okazaki H. Ogata Y. Takeuchi K. Ikeda U. Shimada K.
Lysophosphatidylcholine induces apoptosis in human endothelial cells through a
p38-mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism. *Atherosclerosis.*, **161**:
387-394 (2002)
- 7) Myoung Sook Han. Park SY, Shinzawa K, Kim S, Chung KW, Lee JH, Kwon CH,
Lee KW, Lee JH, Park CK, Chung WJ, Hwang JS, Yan JJ, Song DK, Tsujimoto Y,
Lee MS. Lysophosphatidylcholine as a death effector in the lipoapoptosis of
hepatocytes. *Journal of Lipid Research.* **49**:84-97 (2008)
- 8) Phoebe Lin, Richard D. Ye. The Lysophospholipid Receptor G2A Activates a
Specific Combination of G Proteins and Promotes Apoptosis. *THE JOURNAL OF
BIOLOGICAL CHEMISTRY.* **278**: 14379-14386 (2003)
- 9) Y. Sun Lee JH, Kim NH, Lee CW, Kim MJ, Kim SH, Huh SO.
Lysophosphatidylcholine-induced apoptosis in H19-7 hippocampal progenitor cells
is enhanced by the upregulation of Fas Ligand. *Biochim. Biophys. Acta.* **1791**:
61-68 (2009)
- 10) G. Schmitz, K Ruebsaamen., Metabolism and atherogenic disease association of
lysophosphatidylcholine. *Atherosclerosis.* **208**: 10-8 (2009)
- 11) Li V. Yang, Caius G. Radu, Li Wang, Mireille Riedinger, and Owen N. Witte.

Gi-independent macrophage chemotaxis to lysophosphatidylcholine via the immunoregulatory GPCR G2A. *Blood*. **105**: 1127-1134 (2005)

- 12) Weng Z, Fluckiger AC, Nisitani S, Wahl MI, Le LQ, Hunter CA, Fernal AA, Le Beau MM, Witte ON. A DNA damage and stress inducible G protein-coupled receptor blocks cells in G2/M. *Proc Natl Acad Sci*. **95**: 12334-12339 (1998)
- 13) Janusz H. S. Kabarowski, Zhu K, Le LQ, Witte ON, Xu Y.e. Lysophosphatidylcholine as a Ligand for the Immunoregulatory Receptor G2A. *Science*. **293**: 702 -705 (2001)
- 14) Hattori, T. Obinata¹, H. Ogawa, A. Kishi¹, M. Tatei¹, M. Ishikawa, O. and Izumi¹, T. G2A Plays Proinflammatory Roles in Human Keratinocytes under Oxidative Stress as a Receptor for 9-Hydroxyoctadecadienoic Acid. *Journal of Investigative Dermatology*. **128**: 1123-1133 (2008)
- 15) Obinata, H. Hattori, T. Nakane, S. Tatei, K and Izumi¹, T. Identification of 9-Hydroxyoctadecadienoic Acid and Other Oxidized Free Fatty Acids as Ligands of the G Protein-coupled Receptor G2A. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*. **280**: 40676–40683 (2005)
- 16) Obinata, H. Izumi, T. G2A as a receptor for oxidized free fatty acids. *Prostaglandins & other Lipid Mediators*. **89**: 66-72 (2009)
- 17) Janusz H. Kabarowski. G2A and LPC : Regulatory function in immunity. *Prostaglandins & other Lipid Mediators*. **89**: 73-81 (2009)
- 18) Caius G. Radu, Amar Nijagal, Jami McLaughlin[‡], Li Wang, and Owen N. Witte. Differential proton sensitivity of related G protein-coupled receptors T cell death-associated gene 8 and G2A expressed in immune cells. *Proc Natl Acad Sci*. **102**: 1632–1637 (2005)
- 19) Kabarowski, Feramisco JD, Le LQ, Gu JL, Luoh SW, Simon MI, Witte ON. Direct genetic demonstration of Gα13 coupling to the orphan G protein-coupled receptor G2A leading to RhoA-dependent actin rearrangement. *Proc Natl Acad Sci*. **24**: 12109–12114 (2000)
- 20) Yan, Xu. Sphingosylphosphorylcholine and lysophosphatidylcholineG protein-coupled receptors and receptor-mediated signal transduction. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1582**: 81-88 (2002)
- 21) 菅野啓司, 溝岡雅文, 田妻進. 疾患と胆汁分泌・胆汁組成の変化. 胆と膵, **29**: 697-701 (2008)
- 22) 杉山讓, 小堀宏康, 袴田健一, 清藤大, 鳴海俊治, 遠藤正明, 佐々木睦男, 須

貝道博, 棟方博文. 膵・胆管合流異常症例の胆汁組成の検討 —発癌との関連を中心に—. *胆道*. **12**: 386-394 (1998)

- 23) 吉廣尚大. 胆汁酸のヒト胆管上皮細胞に及ぼす影響. 広島大学大学院修士論文 (2009)
- 24) アポトーシスがわかる 編集/田沼靖一 羊土社
- 25) Savil. J. Fadok V, Henson P, Haslett C. Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol. Today*, **14**: 131-136 (1993)
- 26) Nagata, S. Apoptosis by death factor. *Cell*, **88**: 355-365 (1997)
- 27) L. V. Rubinstein, R. H. Shoemaker, K. D. Paull, R. M. Simon, S. Tosini, P. Skehan, D. A. Scudiero, A. Monks, M. R. Boyd. Comparison of In Vitro Anticancer-Drug-Screening Data Generated With a Tetrazolium Assay Versus a Protein Assay Against a Diverse Panel of Human Tumor Cell Lines. *J Natl Cancer Inst.* **82**: 1113-1118 (1990)
- 28) Tim Mosmann. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods*. **65**: 55-63 (1983)
- 29) Savill J, Fadok V, Henson P, Haslett C. Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol Today*. **14**: 131-136 (1993)
- 30) T. Kobuke, T. Tazuma, S. Hyogo, H. Chayama, K. A Ligand for Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Inhibits Human Cholangiocarcinoma Cell Growth: Potential Molecular Targeting Strategy for Cholangioma. *Dig Dis Sci*. **51**: 1650-1657 (2006)
- 31) MEBCYT[®] Apoptosis Kitの説明書 MLB.
- 32) MBL Apoptosis-Detection and Analysis-2002,
株式会社 医学生物研究所 編
- 33) DAPI色素説明書 ROCHE
- 34) 新アポトーシス実験法 基本操作と最先端の解析法
編/辻本賀英、刀祢重信、山田武. 羊土社
- 35) 正田純一, 稲田洋一. 肝内結石症と胆汁中リン脂質異常. *肝胆膵*. **51**: 607-616 (2005)

- 36) 田妻進, 小道大輔. 胆汁酸と生体防御. 肝胆膵. **51**: 537-542 (2005)
- 37) C.Scaffidi et al. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO. J.*, **17**: 1675-1687 (1998)
- 38) APOPCYTO caspase-3, 8, 9 Colorimetric Assay Kitの説明書 MBL
- 39) Henning R. Stennicke, Guy S. Salvesen . Caspases - controlling intracellular signals by protease zymogen activation. *Biochimica et Biophysica Acta* **1477**: 299-306 (2000)
- 40) Masahiro Matsubara , Kozo Yao, Kazuhide Hasegawa. Benidipine, a dihydropyridine-calcium channel blocker, inhibits lysophosphatidylcholine induced endothelial injury via stimulation of nitric oxide release. *Pharmacological Research*. **53**: 35-43 (2006)
- 41) N. Inoue et al., Lysophosphatidylcholine increases the secretion of matrix metalloproteinase 2 through the activation of NADH/NADPH oxidase in cultured aortic endothelial cells. *Atherosclerosis*. **155**: 45-52 (2001)
- 42) J.H.S. Kabarowski, Yan Xu, O.N. Witte. Lysophosphatidylcholine as a ligand for immunoregulation. *Biochemical Pharmacology*. **64**: 161-167 (2002)
- 43) Murakami, N. Yokomizo, T. Okuno, T. and Shimizu, T. G2A Is a Proton-sensing GPCR Antagonized by Lysophosphatidylcholine. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* . **279**: 42484-42491 (2004)
- 44) Monica J. Carson and David Lo. The Push-Me Pull-You of T Cell Activation. *Science* **27**: 618-619 (2001)
- 45) Tomura, H. Mogi, C. Sato, K. Okajima, F. Proton-sensing and lysolipid-sensitive G-protein-coupled receptors: A novel type of multi-functional receptors. *Cellular Signalling*. **17**: 1466-1476 (2005)
- 46) Van Berge Henegouwen GP, van der Werf SD, Ruben AT. Fatty acid composition of phospholipide in bile in man: promoting effect of deoxycholate on arachidonate. *Clinica Chimica Acta*. **165**: 27-37 (1987)
- 47) 清水周次, 千々岩和夫, 大谷和広, 田中雅夫. 胆嚢癌と膵・胆管合流異常の carcinogenesis —DNA酸化傷害の意義—. 胆と膵. **22**: 1081-1085 (2001)
- 48) Shimada K, Yanagisawa J, Nakayama F. Increased lysophosphatidylcholine and pancreatic enzyme content in bile of patients with anomalous pancreaticobiliary ductal junction. *Hepatology*. **13**: 438-444 (1991)

- 49) 肝細胞由来細胞の一般的培養手法について
<http://cellbank.nibio.go.jp/sheet/att00029.htm>
- 50) Cell Bank, cell stock number: JCRB0425 [HuCCT1]
<http://cellbank.nibio.go.jp/celldata/jcrb0425.html>
- 51) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT. *The Journal of Biological Chemistry*, **193**: 265-275 (1951)
- 52) MEBCYTO[®] Apoptosis Kitの説明書 MLB.
- 53) MBL Apoptosis-Detection and Analysis-2002, 株式会社 医学生物研究所 編
- 54) RNeasy[®] Plus Mini Handbookの説明書. QIAGEN
- 55) ReverTra Ace[®] qPCR RT Kitの説明書. TOYOBO
- 56) LightCycler[®] FastStart DNA Master SYBR Green I の説明書. Roche