

学位論文要旨

学位申請者

松井 龍宣

題目：ヒスチジン欠乏が小腸上皮細胞に及ぼす影響に関する基礎研究

出血や潰瘍を始めとする小腸粘膜上皮障害は、重症に至るまで痛みを伴わず小腸壁に穴が開く穿孔が生じて初めて発見されることも多く、早期発見や予防を含めた対処法が求められている。また、種々の疾患における血中アミノ酸濃度測定の結果から、炎症性腸疾患などの小腸粘膜上皮障害を呈する疾患で血中ヒスチジン濃度が低下していることが報告されている。本研究は、これらの背景を元に、ヒスチジン欠乏と小腸粘膜上皮障害の関連性に着目し、ラット小腸上皮細胞を用いて、その遊走および細胞生存に及ぼすヒスチジン欠乏の影響とメカニズムについて検討した基礎研究である。

序論

ヒスチジンは不可欠アミノ酸に数えられる重要なアミノ酸であり、タンパク質の構成要素であることはもちろん、血管拡張や胃酸分泌を促進するヒスタミンの前駆物質ならびに酵素の活性中心として生体内で多様な役割を持つ。近年、炎症性腸疾患や慢性腎臓病患者の血漿中ヒスチジン濃度が低下していることが報告されており、これら患者の小腸で、出血や潰瘍が発見されることがある。このような背景から、ヒスチジン欠乏が小腸粘膜上皮の修復を阻害し、小腸の出血や潰瘍を誘発するのではないかという仮説を立てた。そこで、小腸粘膜上皮の出血や潰瘍の発生予防やその修復に重要である細胞の遊走および組織修復の基盤となる細胞生存におけるヒスチジンの役割解明を目的とした。

第1章 ヒスチジン欠乏が小腸上皮細胞の遊走に与える影響

本章では、ヒスチジン欠乏が小腸上皮細胞の遊走に与える影響およびその機序を検討した。また、小腸上皮細胞の遊走を促進することが報告されているアルギニンと比較し、考察した。生体内アミノ酸 20 種類を含む Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) 培地をコントロールとし、各 1 種類のアミノ酸を欠乏させた培地を用いて、それぞれのアミノ酸欠乏による細胞の遊走を評価した。ラット小腸上皮細胞 (IEC-6 細胞) を播種したプレートに直径 1 mm の円形スクラッチを作製し、12 時間後の円面積の縮小率を計測した結果、ヒスチジン欠乏は遊走を 72%抑制し、20 種類のアミノ酸の中で最も遊走を抑制した。また、細胞の遊走はヒスチジン濃度に依存して低下し、遊走の維持に必要とされるヒスチジンの最小濃度は 10  $\mu$ M であった。

さらに、ヒスチジン欠乏条件下では IEC-6 細胞の *transforming growth factor- $\beta_1$*  (TGF- $\beta_1$ ) mRNA 発現量が 37%低下し、培養上清中に分泌された TGF- $\beta_1$  量は 72%低下した。一方で、低下した

細胞外の TGF- $\beta_1$  量を組換え TGF- $\beta_1$  により補填したところ、細胞の遊走がコントロールレベルまで回復した。そこで、TGF- $\beta_1$  を介した Smad および non-Smad の 2 つのシグナル経路と細胞遊走との関連を解析した。ヒスチジン欠乏は Smad シグナル経路のリン酸化 Smad2 量を 34%抑制し、non-Smad シグナル経路の mammalian target of rapamycin (mTOR)、70-kDa ribosomal protein S6 kinase (p70S6K) および extracellular signal-regulated kinase (ERK) の各リン酸化量を 15%、20%および 34%低下させた。以上の知見より、ヒスチジン欠乏は、TGF- $\beta_1$  転写抑制による細胞外 TGF- $\beta_1$  量を低下させ、Smad および non-Smad シグナル経路が抑制されたため、細胞遊走が低下したと考えられた。

## 第 2 章 ヒスチジン欠乏が小腸上皮細胞の細胞生存率に与える影響

本章では、ヒスチジン欠乏が小腸上皮細胞の生存に与える影響およびその機序を検討した。生体内アミノ酸 20 種類を含む DMEM 培地をコントロールとし、生細胞の NADH 産生を指標にした Cell Counting Kit-8 アッセイキットを用いてヒスチジン欠乏培地での細胞生存率を評価した。ヒスチジン欠乏培地で 18 時間培養した IEC-6 細胞の細胞生存率は 63%低下した。また、コントロール培地と同レベルの細胞生存率を維持するために必要とされるヒスチジンの最小濃度は 10  $\mu$ M であった。これは細胞遊走に必要なヒスチジンの最小濃度と同じであったが、細胞遊走を回復するために重要な因子である TGF- $\beta_1$  の添加はヒスチジン欠乏による細胞生存率の低下を全く回復させなかった。これより、ヒスチジンによる細胞遊走と細胞生存に対する作用は異なる経路を介したメカニズムによることが示唆された。

また、ヒスチジン欠乏では、アポトーシスの指標である活性化 caspase-3 発現量および Annexin V 陽性細胞が増加した。さらにミトコンドリア膜電位の低下および caspase-9 の活性化が見られたことから、ヒスチジン欠乏はミトコンドリア機能障害によるアポトーシスを亢進させたと考えられた。

さらに、ヒスチジン欠乏の小腸上皮細胞以外の細胞への影響を検討するため、ラット胃上皮細胞 (RGM1) とラット腎線維芽様細胞 (NRK) を用いて細胞生存率および caspase-3 の活性化を検討した。ヒスチジン欠乏は、RGM1 細胞でも同様に細胞生存率の低下およびアポトーシスの亢進を引き起こしたが、IEC-6 細胞に比べてその変化量は 2 分の 1 程度であった。一方、NRK 細胞では、ヒスチジン欠乏は細胞生存率およびアポトーシスに全く影響しなかった。よって、ヒスチジン欠乏は消化管上皮細胞に感受性が高いと考えられた。

## 総括

本研究は、20 種類のアミノ酸の中でヒスチジン欠乏が小腸上皮細胞の遊走および細胞生存率を低下させることを初めて明らかにした。本結果は、小腸上皮細胞の遊走や細胞生存率の維持にヒスチジンが非常に重要な役割を果たすことを示唆している。

その機序として、ヒスチジンは細胞の遊走促進因子である TGF- $\beta_1$  産生量を転写レベルで制御することと、ミトコンドリア由来のアポトーシスを抑制することが判明した。これまでに、

ヒスチジンによる細胞遊走や生存維持への分子レベルの影響は報告されておらず、TGF- $\beta$  シグナル経路やミトコンドリア機能との関係を特定した本研究の意義は大きい。

小腸における出血や潰瘍の予防において、不可欠アミノ酸であるヒスチジンを生体内に一定量維持することの有用性を示した本研究結果は、今後の臨床応用の基礎となる研究であると考えられる。