

| | |
|--------|--|
| 氏名 | おおにしとしお 大西敏雄 |
| 学位論文題目 | Sphingomyelin synthase 2 deficiency inhibits the induction of murine colitis-associated colon cancer. (スフィンゴミエリン合成酵素(SMS)2ノックアウト(KO)マウスでは炎症性大腸発癌が抑制される) |

学位論文内容の要旨

研究目的

潰瘍性大腸炎およびクローン病を含む炎症性腸疾患（IBD）を有する患者の 20%以上が結腸炎関連結腸癌（CAC）を発症する。従って、IBD は大腸癌（CRC）発症の重要な危険因子であると認識されているが、IBD と CAC を結ぶ病原性メカニズムは完全には理解されていない。一方、脂質代謝の調節不全は癌の開始に重要な因子であり、CRC の発症に寄与することが報告されている。スフィンゴミエリン合成酵素（SMS）2 は細胞形質膜、及び、ゴルジ装置に局在し、セラミド（Cer）とホスファチジルコリンから細胞形質膜の主要成分であるスフィンゴミエリン（SM）を合成する酵素である。最近、SMS2 ノックアウト（KO）マウスにおいて、リポ多糖刺激による肺の障害と炎症が抑制されることが報告されたことから、SMS2KO マウスでは炎症応答が抑制されることが示唆された。また、alk-SMase, nCDase, Sphk1/2 等のスフィンゴ脂質代謝酵素 KO マウスを用いた解析から、スフィンゴ脂質代謝と大腸炎症に関係があることが明らかにされてきている。そこで本研究では SM 代謝と急性大腸炎症、及び、炎症性大腸発癌の関係を明らかにするため、SMS2KO マウスを用いてそれら病態と炎症応答メカニズムの関係を解析した。

実験方法

① 急性炎症モデル(表現型解析)

急性大腸炎症は、野生型（WT）、及び、SMS2KO マウスを用いて、3.5%デキストラン硫酸ナトリウム(DSS：分子量：36,000~50,000)を 5 日間給水後、通常の水を 10 日間給水するプロトコールを行い、毎日、体重、下痢、及び、下血を記録した。体重減少、下痢、血便はスコア化し評価した。0, 5, 10, 15 日にマウスを解剖して大腸を回収し、ヘマトキシリン・エオジン染色し組織病理学的分析を行った。Crypt の崩壊の程度で炎症をスコア化し評価した。

② 急性炎症モデル(メカニズム解析)

- 1：大腸の Cer、及び、SM 量はマウスから大腸上皮細胞を採取し-80℃で凍結した後液体クロマトグラフ質量分析計（LC-MS / MS）によって測定した。
- 2：大腸での細胞内シグナル伝達活性化（ERK1/2, p38, STAT3）は大腸上皮から蛋白質を抽出しウエスタンブロットで解析した。
- 3：炎症性メディエーター（TNF- α , IL-1 β , CXCL2, CCL8）の mRNA 量はリアルタイム PCR で測定した。
- 4：炎症応答細胞（好中球、マクロファージ、T 細胞）の浸潤は大腸上皮細胞のみ

に分離しフローサイトメトリーを用いて解析した。

5：骨髄移植は、WT、及び、SMS2K0マウスに 10GyのX線を照射して免疫細胞を死滅させた後、別のWT、及び、SMS2K0マウスから回収した骨髄 (BM) をそれぞれ WT/WT^{BM}、WT/SMS2K0^{BM}、SMS2K0/WT^{BM}、及び、SMS2K0/SMS2K0^{BM}という組み合わせで移植した。炎症改善後にDSS(1.5%)を 3 日間投与した後、12 日間、無菌飲料水に変更後に解剖した。

6：マイクロアレイ解析は、DSS 処理 2 日目の WT、及び、SMS2K0 マウスの大腸上皮細胞から回収した mRNA を用いて行った。

③ 炎症性大腸発癌モデル(表現型解析)

炎症性大腸発癌は、アゾシキメタン(AOM)を 1 回投与後、DSS 給水サイクルを 3 回繰り返すプロトコールを用いて 14 週後に解剖し解析した。

実験成績

最初に、WT、及び、SMS2K0マウスに急性大腸炎症を起こさせ、体重減少、下痢や血便の増加、及び、炎症指標の増加といった病態を比較した所、SMS2K0マウスでは急性大腸炎症が有意に抑制されることを見出した。次にDSS処理後の大腸でのスフィンゴ脂質変化量を LC-MSによって測定した所、SMS2K0ではCerが増加し、SMが減少したのに対し、WTでは変化がみられなかったことから、SMS2 は大腸炎症時においてCer、及び、SM量を維持する役割があることが示唆された。さらに、SMS2K0における大腸炎症の抑制機構を明らかにするため、DSS処理後の大腸での細胞内シグナル伝達活性化 (ERK1/2, p38, STAT3)、炎症性メディエーター (TNF- α , IL-1 β , CXCL2, CCL8) のmRNA発現量、及び、炎症応答細胞 (好中球、マクロファージ等)の浸潤量を解析した所、これら炎症応答反応の全般がSMS2K0マウスでは抑制されることを見出した。加えてマイクロアレイ解析により、発現が亢進した遺伝子はWTでは、97 個、SMS2-K0では 22 個あり、共通遺伝子は 16 個であった。炎症に関するサイトカインを誘導する遺伝子はWTで 20 個、SMS2-K0で 4 個、発現が亢進した。SMS2K0では「免疫系プロセス」、「炎症応答」、「細胞増殖の調節」、及び、「創傷への反応」に關与する遺伝子群の発現が減少していることを明らかにした。続いて、WTとSMS2K0マウスの間で骨髄移植したマウスを用いて急性大腸炎症を起こさせ病態を比較した所、宿主がSMS2K0マウスであるSMS2K0/WT^{BM}、及び、SMS2K0/SMS2K0^{BM}では体重減少等の大腸炎症病態が抑制されたことから、SMS2K0における大腸炎症抑制は免疫細胞によるのではなく、大腸上皮細胞によることが明らかになった。最後に、WT、及び、SMS2K0マウスに炎症性大腸発癌を起こさせ病態を比較した所、SMS2K0では腫瘍形成数、及び、腫瘍出現率が減少するが、腫瘍の大きさや悪性度に差がないことを見出した。

総括および結論

以上の結果から、急性大腸炎症において、SMS2K0 マウスでは大腸内で Cer 量が増加し、SM 量が減少すること、さらに大腸上皮細胞において炎症応答が抑制されることにより、大腸の炎症が抑制されることがわかった。加えて炎症性大腸発癌において、SMS2K0 マウスでは腫瘍形成数、及び、主瘍出現率が減少したのは、発癌の初期段階である炎症が抑制されることにより、結果的に発癌が抑制されたと考えられた。