The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Increased intestinal phospholipase A2 activity catalyzed by phospholipase B/lipase in WBN/Kob rats with pancreatic insufficiency
Author(s)	Tchoua, Urbain
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42638
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【10】

氏　　名	Tchoua, Urbain（ちょうあ，あーばいん）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学 位 記 番 号	第　15726　号
学位授与年月日	平成12年9月29日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科生理系専攻
学 位 論 文 名	Increased intestinal phospholipase A2 activity catalyzed by phospholipase B/lipase in WBN/Kob rats with pancreatic insufficiency （小腸刷子縁膜結合型ホスホリパーゼB/リパーゼの脂質消化における役割 ――――膵外分泌不全モデルラットWBN/Kobを用いた研究）
論 文 審 査 委 員	（主査） 教　授　岡本　光弘 （副査） 教　授　門田　守人　　教　授　谷口　直之

論 文 内 容 の 要 旨

[目的] 炭水化物・蛋白質の小腸における消化は、腸液中に分泌される加水分解酵素による消化（管腔内消化）と、小腸刷子縁膜に局在し終末消化を司る加水分解酵素による消化（膜消化）の相補的な作用により効率良く行われる。一方、脂質の消化は、膵臓から分泌されるリパーゼ・ホスホリパーゼA2（PLA2）等による管腔内消化によってのみ成されると一般に考えられてきたが、最近、小腸刷子縁膜に脂質の膜消化に関与すると考えられるCa2+非依存性ホスホリパーゼB/リパーゼ（PLB/LIP）が見出され、当研究室で精製・クローニングされた。本酵素は、単一酵素でリパーゼ、PLA2、リゾホスホリパーゼの3つの脂質分解活性を持つ。リン脂質に対しては、まずPLA2活性が作用し続いてリゾホスホリパーゼ活性によりリン脂質の2本のアシル鎖を両者とも切断するいわゆるホスホリパーゼB活性を発揮する。本研究では、膵外分泌不全モデルラットWBN/Kobを用いて、膵臓リパーゼ・PLA2分泌不全時におけるPLB/LIPの脂質消化における役割について検討した。

[方法ならびに成績]

(1) WBN/Kob雄ラットは、3月齢ごろより慢性膵炎を発症し進展する。その後はやくとも9月齢ごろより糖尿病を発症する。慢性膵炎の重症度を糖尿病が発症する以前の2，4，6月齢WBN/Kob雄ラットに低脂肪食（NF）と高脂肪食（HF、全カロリーの57%のコーン油含量）を1週間投与し組織学的に検討した。NFとHF.群に有意差はなかった。2月齢ラットでは異常所見は認められなかったが、4、6月齢ラットで腺房細胞の脱落と線維化が見られ、明らかな慢性膵炎を呈していた。膵外分泌機能不全の程度はNFとHF群の膵臓ホモジネートのリパーゼ、Ca2+依存性PLA2活性により評価した。膵型PLA2（group IB PLA2）は、プロ酵素として合成、分泌され、十二指腸で活性型に変換されるため、プロ酵素と活性型酵素を同程度に認識する酵素抗体法（EIA）を用いて測定した免疫活性PLA2（IR-PLA2）濃度もあわせて検討した。リパーゼ活性・PLA2活性は、遊離された脂肪酸を9-アントリルジアゾメタン（ADAM）で誘導体化後HPLCを用い分離定量することにより測定した。IR-PLA2濃度は、両群とも4月齢で有意に低下し、膵リパーゼ、Ca2+依存性PLA2活性も両群とも4月齢で低下傾向を示した。4月齢WBN/Kobラット膵臓のアミラーゼ、リパーゼ、Ca2+依存性PLA2活性、IR-PLA2濃度は4月齢ウイスターラット（コントロール）と比較していずれも有意に低下していた。これらの結果から、4月齢WBN/Kob雄ラットは、膵外分泌機能不全のモデル動物として使用できることが明らかとなった。

(2) 抗 group IB PLA 2 抗体を用いた 4 月齢 WBN/Kob 膵臓の免疫組織化学的検討では、残存している腺房細胞に免疫活性が見られたが、間質には認められなかった。

(3) 膵外分泌不全により低下した消化管管腔内の酵素活性を補う消化管粘膜の脂質分解酵素活性の有無を検討した。group IB PLA 2 は、膵臓のほか胃粘膜にも存在するが,その IR-PLA2濃度は、4 月齢 WBN/Kob とコントロールラットで有意差は認められなかった。次に、回腸粘膜の PLB/LIP により触媒される Ca 2 +非依存性 PLA 2 活性および免疫活性 PLB/LIP（IR-PLB/LIP）濃度について検討した。NF と HF 両群に有意差は認められなかった。PLA 2 活性は、4 月齢 WBN/Kob ラットが最も高値（$p<0.05$）であったが 6 月齢ラットも 2 月齢ラットよりも高値（$p<0.05$）をしめした。PLA 2 活性が PLB/LIP に由来することは電気泳動後ゲルから蛋白バンドを切り出し酵素活性を測定することで確認した（収率85%）。しかし、IR-PLB/LIP 濃度、イムノブロットにおける PLB/LIP バンドの染色濃度、PLB/LIPmRNA レベルは、WBN/Kob ラットの月齢で有意差は認めなかった。これらの結果は、PLB/LIP が酵素蛋白レベルで活性化されていることを示唆する。4 月齢 WBN/Kob ラット回腸のリパーゼ、Ca2+非依存性 PLA2活性、は 4 月齢コントロールラットと比較していずれも有意に（$p<0.05$）増加していた。PLA2活性は、NF と HF 両群で有意差は認められなかったが、リパーゼ活性は、NF 群と比較して HF 群で有意に高く、このリパーゼ活性には PLB/LIP のほかに HF により誘導される別のリパーゼの寄与が含まれていることが示唆された。

(4) 回腸でのリン脂質消化への PLB/LIP の寄与を見積もるため HF 投与 4 月齢 WBN/Kob ラット小腸腸液と小腸粘膜の PLA2活性を比較した。近位回腸粘膜の PLB/LIP が触媒する Ca 2 +非依存性 PLA 2 活性は、腸液中の全 PLA 2 活性（Ca 2 +依存性と Ca 2 +非依存性 PLA 2 法性の和）より約 4 倍高く、PLB/LIP が膵外分泌不全による管腔内 PLA 2 活性の低下を補っていることが示唆された。

(5) 便中のトリアシルグリセロール濃度は、HF 投与 4 月齢 WBN/Kob ラットでコントロールラットより有意に増加していたが高々 2 倍の増加に止まっていた。

[総括]

(1) 4 月齢 WBN/Kob 雄ラットは、膵外分泌綾能不全のモデル動物として有用である。

(2) 刷子縁膜結合型 PLB/LIP の触媒する近位回腸の Ca2+非依存性 PLA2活性は、4 月齢 WBN/Kob 雄ラットで有意に増加していたが、PLB/LIP 蛋白質と mRNA レベルには WBN/Kob ラットの月齢あるいはコントロールと比較したときに変化がなく、酵素レベルでの活性化が示唆された。

(3) 4 月齢 WBN/Kob ラットの小腸粘膜と管腔内腸液の全 PLA 2 活性の約80%を PLB/LIP の Ca 2 +非依存性 PLA 2 活性が占め、PLB/LIP が膵外分泌不全による管腔内 PLA 2 活性の低下を補っていることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

脂質消化吸収の機序を解明することは、生理学的に重要であるだけでなく臨床的にも各種病態下の栄養管理、脂質が病因に関与する膵炎、大腸癌、アレルギー、動脈硬化の病態生理学的研究、等に重要である。従来、食餌性脂質の消化管での消化は、主に膵臓から分泌されるリパーゼ、ホスホリパーゼ A 2 の作用により空腸管腔内で起こると考えられてきた。最近、近位回腸刷子縁膜に結合するホスホリパーゼ B/リパーゼが発見され精製・クローニングされた。この酵素は、その局在部位から多糖類やペプチドのいわゆる終末消化（膜消化）酵素に対応する機能を持つことが予想される。本研究では、慢性膵炎モデルラット WBN/Kob を有効に用いて、膵臓・脂質分解酵素合成分泌不全時に刷子縁膜ホスホリパーゼ B/リパーゼが脂質消化において果たす役割を詳細に検討している。そして、ホスホリ

パーゼB/リパーゼが、膵臓外分泌機能不全を代償するという脂質消化における新しい概念を提出し、今後の脂質消化吸収研究の新しい展開に結びつく研究であり、学位論文に充分値するものと認める。