

令和元年6月5日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09401

研究課題名(和文)急性膵炎におけるカルシウム結合蛋白の役割—新たな創薬を目指して

研究課題名(英文)The role of calcaim-binding protein in acute pancreatitis: aiming for a new drug discovery

研究代表者

眞嶋 浩聡 (MASHIMA, Hirosato)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：10261869

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：S100gは主に十二指腸に発現しているカルシウム結合蛋白である。急性膵炎を惹起すると膵臓でのS100gの発現が増加し、S100g KOマウスでは組織障害が軽減した。膵外分泌モデルであるAR42J細胞にS100gを過剰発現させたAR42J-S100g細胞を樹立した。この細胞ではCCK8刺激によるアミラーゼ分泌が抑制され、細胞内カルシウム濃度 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇も抑制された。以上から、S100gは膵炎の増悪因子であり、KOマウスではCCK8刺激による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が抑制されず、外分泌が亢進した状態となり、細胞内トリプシノーゲン量が低下し、異所性活性化が抑制され膵炎が軽減したものと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

急性膵炎は膵内でのトリプシンの異所性活性化が原因と考えられてきたが、多くの研究結果から、それ以外にも、NF- κ Bの活性化、オートファジー不全、小胞体ストレス、酸化ストレス、カルシウムシグナル異常などの多くの異常が並行して起こっていることが明らかになってきた。しかし、詳細なメカニズムは未だに不明である。急性膵炎が発症すると外分泌不全が生ずるが、本研究はそれにS100gが関与している可能性があること、S100gを抑制し外分泌を維持することで、膵傷害を軽減できる可能性があることを示したものである。もちろん細胞内カルシウムシグナルは他の因子でも調節されており、さらなる検討が必要である。

研究成果の概要(英文)：S100g is a calcium-binding protein, which is mainly expressed in the duodenum. The expression of S100g in the pancreas was induced in experimental pancreatitis and pancreatic injury was decreased in S100g knock-out (KO) mice. We produced AR42J-S100g cells, which over-expressed S100g in a pancreatic exocrine model; AR42J cells. In these cells, amylase secretion in response to cholecystokinin (CCK-8) was inhibited and the increase of intracellular calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) was restricted. Therefore, S100g was suspected to be a risk factor of pancreatitis. In the experimental pancreatitis of S100g KO mice, it seems that the increase of $[Ca^{2+}]_i$ in response to CCK-8 was not restricted, the secretion from pancreatic acinar cells stayed in the high level, and the amount of intracellular trypsinogen decreased compared to the control mice, resulting in the reduction of pancreatic injury with the decrease of ectopic activation of trypsinogen.

研究分野：消化器内科

キーワード：急性膵炎 S100g カルシウム トリプシン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膵臓は消化酵素を産生し、食物の消化に重要な役割を果たしている。消化酵素は通常食事刺激にあわせて調節性外分泌経路によって分泌される。分泌刺激が基底膜上の受容体から入ると細胞内カルシウム濃度($[Ca^{2+}]_i$)の上昇が頂端側の細胞内に起こり、酵素顆粒が分泌される。膵腺房細胞の外分泌における細胞内情報伝達経路として、(1) アセチルコリン(Ach)やコレシストキニン(CCK)などによる $[Ca^{2+}]_i$ をセカンドメッセンジャーとする経路、(2) セクレチンやVIP などによる細胞内 cyclic AMP をセカンドメッセンジャーとする経路の二つの主要な経路がある。急性膵炎発症の超急性期には膵管から十二指腸への劇的な分泌低下が起こる。この時、膵腺房細胞の頂端側細胞膜からの分泌障害、膵管上皮の細胞間隙の減弱化による膵液の漏出、頂端側から側方基底膜への分泌の移行が起こる(Ji B, Logsdon CD. Gastroenterology 141:1972-5,2011)。急性膵炎の成因として、アルコール性、胆石性、特発性はその多くを占めるが、他に慢性膵炎急性増悪、膵胆管合流異常、膵管癒合不全、膵腫瘍、高脂血症、薬剤性などがある。また、内視鏡的逆行性膵胆管造影(ERCP)検査や治療の偶発症として生ずることもある。これらすべてに共通する事象を考えあわせ、急性膵炎の initial trigger は膵腺房細胞からの外分泌不全であると我々はこれまで主張してきた。酵素顆粒は正しく頂端側細胞膜から分泌されれば、消化酵素として食物の消化・吸収に寄与するが、そうでなければ、細胞内に爆弾をかかえているのと同じである。この爆弾を懸命に処理しようとしてオートファジーなどが動員されるが、処理しきれなければ、トリプシンの活性化、NF- κ B の活性化、酸化ストレス、小胞体ストレスが連鎖的に起きてしまい、急性膵炎が発症する。放出されたサイトカインによって炎症細胞が遊走し、障害された腺房細胞と相互作用することによってさらに炎症が増悪して悪循環に陥り、全身へと障害が波及してゆくものと思われる。

2. 研究の目的

$[Ca^{2+}]_i$ は外分泌の重要な因子であり、通常の酵素顆粒の外分泌時には頂端側付近でのみ $[Ca^{2+}]_i$ が上昇する。膵炎発症時には細胞全体に異常な $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が生じ、そしてその上昇が遷延することが報告されている(Gerasimenko JV et al. J Physiol 592:269-80,2014)。

インターフェロン制御因子(IRF)2 KO マウスの膵臓は急性膵炎の初期像を呈していることを我々は以前報告した(Mashima H, et al. Gastroenterology 2011)。このマウスの膵腺房細胞ではまさに調節性外分泌障害からオートファジー不全、トリプシンの異所性活性化が生じている。このマウスの膵臓の遺伝子発現が解析されて著明な発現変化を来す遺伝子群が報告された(Hayashi H et al. PNAS 108:18766-71,2011)。その中に二種類のカルシウム結合蛋白(S100g, Anxa10)が含まれており、IRF2KO マウスで発現が著明に亢進していた。S100g は EF ハンドを2個有しているのに対し、Anxa10 は EF ハンドを有していないがカルシウムを結合する。これらの蛋白はもともと膵腺房細胞には多くは発現していないが、膵炎発症に伴って発現が上昇する。

そこで、本研究の目的は、(1) これらのカルシウム結合蛋白の膵腺房細胞での役割を調べ、(2) $[Ca^{2+}]_i$ 異常、カルシウム結合蛋白、急性膵炎の関係を明らかにして急性膵炎発症のメカニズムの解明を進め、さらに、(3) 治療介入が可能なポイントを探り、急性膵炎の新たな治療法の可能性を見出すことである。この研究は、慢性膵炎の治療・予防、膵臓癌の発症抑制にもつながる可能性を秘めている。

3. 研究の方法

- (1) 野生型マウスにおける S100g, Anxa10 の発現と急性膵炎反応における変化
 - ・ RT-PCR
 - ・ 免疫組織学的検討
- (2) 膵腺房細胞株 AR42J 細胞を用いた検討
 - ・ レトロウイルスを用いて S100g 過剰発現細胞(AR42J-S100g)、Anxa10 過剰発現細胞(AR42J-Anxa10)を樹立
 - ・ コレシストキニン刺激によるアミラーゼ分泌、fura-2 を用いた $[Ca^{2+}]_i$ の変化の検討
- (3) S100g KO マウス、ANXA10KO マウス
 - ・ 単離腺房を用いたコレシストキニン刺激によるアミラーゼ分泌の検討
 - ・ セルレイン膵炎を惹起した際の膵炎反応の変化の検討
(組織学的重症度、トリプシンの異所性活性化、 $[Ca^{2+}]_i$ の変化)

4. 研究成果

- (1) 野生型マウスにおける S100g, Anxa10 の発現と実験的急性膵炎における発現変化。
免疫組織化学で検討すると、S100g は主に十二指腸に発現しており、生理条件下では膵臓にその発現はほとんど見られなかった。mRNA の発現は認められた。Anxa10 は免疫組織化学では染色されず、primer を多種類設計して PCR をかけても膵臓では band が全く検出されず、mRNA も発現していないものと考えられた。過剰量のセルレインを 7-12 回腹腔内に投与し、浮腫性膵炎を惹起させると S100g は mRNA レベル、蛋白レベル両者において発現の亢進がみられた。Anxa10 も mRNA、蛋白の発現を認められた(図 1, 2)。免疫染色では、S100g は側方基底膜寄りの

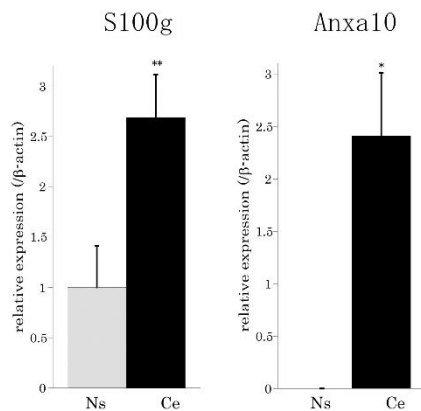


図1 セルレイン膵炎におけるS100g, Anxa10のmRNAレベルの変化。膵炎発症に伴って発現が著明に亢進している。

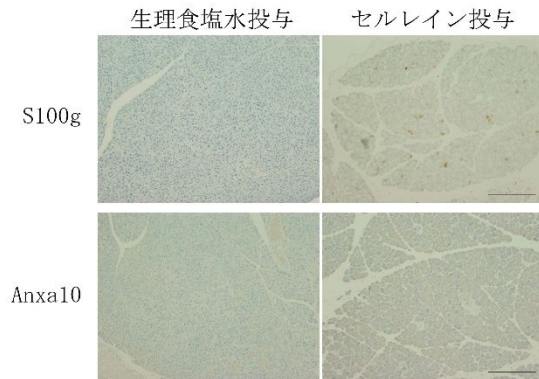


図2 S100g, Anxa10の免疫組織化学

野生型マウスに生理食塩水、セルレインを7回腹腔内投与した膵臓をそれぞれの抗体を用いて免疫染色した。セルレイン膵炎においてS100gは基底膜側に斑状に染色され、Anxa10は細胞質全体に淡く染色された。生理食塩水投与では両者とも染色されなかった。

細胞質が染まった細胞がただらに出現し、時間と共に膵臓全体に広がっていったのに対し、Anxa10は細胞質全体の染色性が亢進していった(図2)。

野生型マウスにセルレイン膵炎を惹起するとS100g, Anxa10はIRF2KOマウス(急性膵炎発症初期のモデル)と同様の発現の変化を起こした。これらの分子は膵炎発症に関与している可能性が考えられる。

(2) 膵腺房細胞株 AR42J 細胞を用いた検討

ラット膵腺房細胞癌由来のAR42J細胞にS100gを過剰発現させた細胞(AR42J-S100g)、Anxa10を過剰発現させた細胞(AR42J-Anxa10)をレトロウイルスの系を用いて樹立した。コレシストキニン(CCK-8)刺激によるアミラーゼ分泌、fura-2を用いた $[Ca^{2+}]_i$ の変化をコントロール細胞(AR42J-GFP)と比較検討した。

100pM CCK-8による分泌刺激では、AR42J-S100gではアミラーゼ分泌が著明に抑制されたのに対し、AR42J-Anxa10ではごくわずかに抑制された。AR42J-S100g細胞では、CCK-8刺激による $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が著明に抑制されたが、AR42J-Anxa10ではその抑制はわずかであった(図3)。siRNAを用いてS100gの発現を抑制し、逆の結果が得られるかを検討したが、AR42J細胞ではうまくノックダウンができなかった。

S100g過剰発現AR42J細胞では $[Ca^{2+}]_i$ の上昇、アミラーゼ分泌が顕著に抑制された。Anxa10も同様の傾向であるが、その作用は弱かった。急性膵炎発症初期の外分泌不全へのS100gのより強い関与が示唆された。

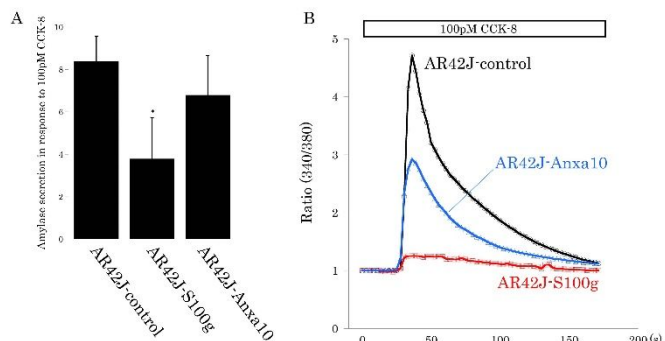


図3 CCK-8に対するアミラーゼ分泌(A)、 $[Ca^{2+}]_i$ (B)の比較

コントロール細胞(AR42J-control), S100g過剰発現細胞(AR42J-S100g), Anxa10過剰発現細胞(AR42J-Anxa10)を樹立し、100pM CCK-8で刺激した時の反応を比較検討した。AR42J-S100gはアミラーゼ分泌が抑制され、 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が抑制された。AR42J-Anxa10でもその傾向はみられたが、作用は弱かった。

(3) S100g KO マウス

韓国 Chungbuk National University の Eui-Bae Jeung 教授から S100g KO マウスを供与してもらい実験を行った。生理条件下では既報通り異常を示さず、繁殖にも問題は見られなかった。Anxa10 KO マウスは利用できるマウスが最近までなく、検討から外した。

単離腺房での検討: コントロールマウス、S100g KO マウスからコラゲナーゼ法により腺房を単離した。CCK-8刺激(10pM, 100pM)による上清中へのアミラーゼ分泌を検討した(図4)。恒常性分泌(constitutive secretion)、刺激性分泌(stimulatory secretion)ともにS100g KO マウスでは分泌が増加していた。単離腺房にfura-2をloadして $[Ca^{2+}]_i$ の変化を比較検討しようとしたが、系が安定せず、十分な結果が得られなかった。

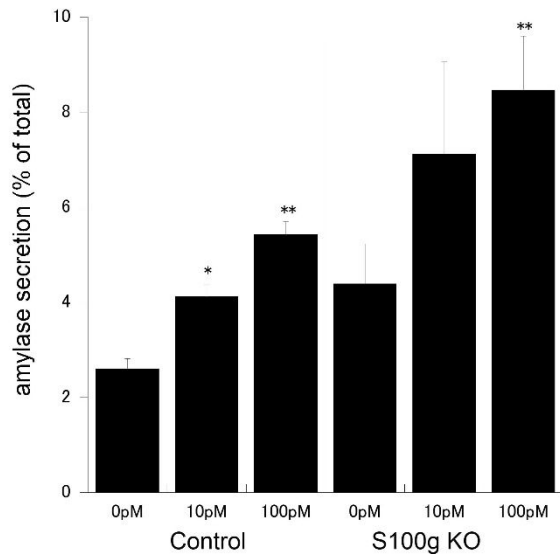


図4 単離腺房におけるCCK-8刺激に対するアミラーゼ分泌

コントロールマウス、S100g KOマウスの膵臓から腺房を単離し、CCK-8 (10pM, 100pM)で刺激した時のアミラーゼ分泌を比較検討した。KOマウスでは、constitutive secretion、stimulatory secretion共に増加していた。

セルレイン膵炎（浮腫性膵炎）を惹起した際の膵炎の重症度の比較検討

コントロールマウス、S100g KO マウスにコレシストキニンのアナログであるセルレインを複数回投与して実験的膵炎を惹起して比較検討した。膵炎の重症度を組織学的(浮腫、壊死、出血、炎症細胞浸潤)からなるスコアの総計)で比較すると S100g KO マウスで軽減する傾向にあったが、有意差はみられなかった。膵臓の相対重量で比較すると KO マウスで低値であり、これは浮腫を強く反映しているものと思われた(図 5A)。血清アミラーゼの上昇に差はみられなかったが、膵組織中のトリプシン活性は S100g KO マウスでは低下していた(図 5B)。つまり、トリプシンの膵内での異所性活性化が抑制されたために膵炎反応が軽減した可能性が示唆された。S100g はカルシウム結合蛋白であることから、セルレイン刺激に対する細胞内カルシウム濃度 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇に変化が生じ、そのために膵炎が軽減したと思われる。

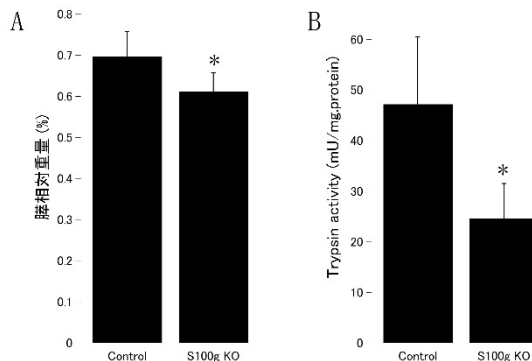


図5 コントロールとS100g KOマウスにおけるセルレイン膵炎の比較 (n=3)

A. 膵相対重量 (膵重量/体重)
B. 膵内でのトリプシンの活性化
組織学的スコアでは有意差を認めなかったが、浮腫を反映する膵重量はKOマウスで低下していた。また、トリプシンの膵内での活性化はKOマウスで低下していた。

当初は、S100g は膵炎反応に従って発現が誘導され、 $[Ca^{2+}]_i$ の異常な上昇を抑制して膵炎を軽減する方向に作用するかと想定していたが、ノックアウトマウスを用いた実験では逆の結果であった。(1)から(3)の結果を総合すると、一つの可能性としてであるが、「過剰な CCK-8 刺激に対して S100g は $[Ca^{2+}]_i$ の上昇にブレーキをかける働きをしているが、S100g KO マウスではその上昇にブレーキがかからず、外分泌が亢進したままの状態となる。そのため、細胞内のトリプシノーゲン量が少なくなり、細胞内での異所性活性化が抑制され、S100g KO マウスでは膵炎反応が軽減した」という仮説が考えられる。これを証明するためには、詳細な外分泌実験、マウスの生体内での $[Ca^{2+}]_i$ のモニタリングが重要である。S100g はカルシウム結合蛋白ではあるが、カルモジュリン(Gerasimenko JV et al. PNAS 108:5873-78,2011 ; カルモジュリンは細胞内でカルシウムを結合し、膵保護的に作用する)の作用とは異なるようである。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5件)

眞嶋浩聡、高橋健一、大西洋英：急性膵炎におけるオートファジーとエンドサイトーシス。胆と膵 39(2), 139-145, 2018, 査読無

高橋健一、眞嶋浩聡、大西洋英：急性膵炎発症・進展における細胞内小胞輸送の役割。膵臓 33(4): 723-729, 2018, 査読有

Takahashi K, Mashima H, Miura K, Maeda D, Goto A, Goto T, Wada G, Wada Y, Ohinishi H. Disruption of small GTPase Rab7 exacerbates the severity of acute pancreatitis in experimental mouse models. Sci Rep 2017;7:2817, doi:10.1038/s41598-017-02988-3, 査読有

眞嶋浩聡、大西洋英：急性膵炎におけるカルシウムシグナル異常。膵臓 第 31 巻, 17-24, 2016, 査読有

眞嶋浩聡、大西洋英：急性膵炎とオートファジー。肝胆膵 第 73 巻 2 号, 243-249, 2016, 査読無

〔学会発表〕(計 7 件)

高橋健一、眞嶋浩聡、大西洋英。低分子量 G タンパク質 Rab7 の膵外分泌腺における機能解析。第 49 回日本膵臓学会大会、和歌山、2018.6.29-30.

高橋健一、眞嶋浩聡、大西洋英。膵外分泌恒常性維持における Rab7 機能の検討。第 104 回日本消化器病学会総会、東京、2018.4.19-21. (ワークショップ)

高橋健一、眞嶋浩聡、大西洋英。Rab7 のオートファジー・エンドサイトーシスを介した急性膵炎での保護的作用の検討。第 48 回日本膵臓学会大会(ワークショップ)、京都、2017.7.14-15.

高橋健一、眞嶋浩聡、大西洋英。膵臓特異的 Rab7 ノックアウトマウスによるオートファジー成熟過程の障害はセルレイン誘発急性膵炎を悪化させる。第 103 回日本消化器病学会総会、東京、2017.4.20-22. (ワークショップ)

Takahashi K, Mashima H, Miura K, Goto T, Ohnishi H. RAB7 LOCALIZES TO ZYMOGEN GRANULE MEMBRANE IN PANCREATIC ACINAR CELLS AND CONTRIBUTES TO MATURATION OF ZYMOGEN GRANULES BUT NOT TO EXOCYTOSIS. Annual meeting of American Gastroenterological Association, Digestive Disease Week 2017, Chicago (USA), 2017.5.6-9.

Takahashi K, Mashima H, Ohnishi H. Exacerbation of the caerulein-induced acute pancreatitis in the pancreas-specific Rab7 knockout mice. The Joint Conference of the 47th annual meeting of the Japan Pancreas Society (JPS), the 20th meeting of the International Association of Pancreatology (IAP) and the 6th meeting of the Asian Oceanic Pancreatic Association (AOPA). Sendai, 2016.8.4-7. (oral presentation)

Takahashi K, Mashima H, Maeda D, Goto A, Miura K, Goto T, Ohnishi H. Disruption of Small GTPase Rab7 Exacerbates the Severity of Caerulein-Induced Mouse Acute Pancreatitis. DDW2016, San Diego 2016.5.21-24

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：

国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

眞嶋浩聡：実臨床における膵疾患(膵炎、膵癌、膵嚢胞性疾患)2019.2.7 学術講演要旨。浦和医師会報 705:30-31, 2019.

消化器内科紹介：先端医療シリーズ 49 消化器疾患の最新医療：312-312、2018. 先端医療技術研究所。

眞嶋浩聡：今日の治療指針(福井次矢、高木誠、小室一成編) 医学書院、東京、2017. 担当部分：慢性膵炎(59:552-555)

眞嶋浩聡：人体の正常構造と機能改訂第3版（坂井建雄、河原克雅編）日本医事新報社、東京、2017．担当部分：肝・胆・膵 - 膵液、血糖の調節（310-323）

6．研究組織

研究代表者 眞嶋浩聡が単独で行った研究である。

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。