

機関番号：32647

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2007～2010

課題番号：19390203

研究課題名 (和文) 膵外分泌機能の修復と再生をめざした研究

研究課題名 (英文) A study for restoration and regeneration of pancreatic exocrine function

研究代表者

宮坂 京子 (KYOKO MIYASAKA)

東京家政大学・家政学部・教授

研究者番号：90166140

研究成果の概要 (和文) : 膵臓の幹細胞から膵外分泌細胞を再生させるのではなく、残存しているわずかな膵外分泌細胞の機能をよみがえらせて、膵外分泌機能の回復と改善を望むための基礎的手段を探索した。手がかりとして、マウスおよびヒトに共通して存在するラス蛋白関連蛋白 (KRAP) を選択し、マウスでは、KRAP の発現低下は膵外分泌細胞を肥大させることを明らかにした。一方、ヒト膵胆道系悪性腫瘍における KRAP の発現は変動がなく、悪性腫瘍発現と KRAP 発現量は関係がないことがわかった。

研究成果の概要 (英文) : This study was designed to expect the recovery of pancreatic exocrine function from the damaged pancreas, not the regeneration from the pancreatic stem cells. Ki-ras-induced actin-interacting protein (KRAP) was originally identified in a human colon cancer cell, is conserved from fish to mammalian species. We found that the decrease and/or defect in KRAP expression resulted in pancreatic hypertrophy in mice. The level of KRAP mRNA in human cancer cell lines, in the tissues of pancreatic cancer and gallbladder cancer, and in normal pancreatic tissue did not differ to one another.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
2008年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2009年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科

キーワード：遺伝子 栄養学 タンパク質 内科 ゲノム

1. 研究開始当初の背景

膵臓は生体内で機能的に最も大きい消化酵素分泌器官であり同時に血糖調節に不可欠な内分泌

器官である。内外分泌機能は相互に影響し、膵臓のランゲルハンス島周囲の外分泌細胞はインスリンの影響を受けて肥大し(ハロー効果)、アルコール

ル多飲による障害では外分泌機能不全が最初に生じ、内分泌機能不全(膵性糖尿病)にいたる。1型糖尿病の治療として、膵島移植や臓器移植が試みられるようになってきた。しかしながら、膵性糖尿病は、インスリンのみでなくグルカゴンも欠乏していること、消化酵素の不足により消化吸収不全(炭水化物分解能の低下—糖吸収障害など)により血糖調節が困難で、日常生活の中で低血糖をおこしやすいという問題がある。また慢性膵炎の原因としてアルコール多飲がもっとも多い(男性では70%近い)が、断酒の難しさも影響して慢性膵炎の死亡率は、癌などの悪性疾患ではないにもかかわらず30%前後と高い。そこで膵外分泌腺の増殖や数の増加(再生)はなくても、膵外分泌機能が日常生活を維持できるレベルまで回復させることが可能となれば、慢性的な医療費の消費を減少させることができると考えた。

k-ras 遺伝子のコドン 13 変異のある Cell line で、分子量 180000 のタンパク(KRAP)が同時に増加していることが報告され(Shirasawa et al. Science 1993, Inokuchi et al. J Hum Genet 2004)、このタンパクをノックアウトした(KRAP-KO)マウスが作成された。GTP が結合した活性型 Ras は、Raf と結合し MAP kinase にいたる serine-threonine kinase cascade を制御する。Ras のアミノ酸変異のためその内在する GTPase 活性が低下することにより細胞増殖のシグナルが出続けるため癌を生じると解釈されることから、KRAP の人為的削除は細胞増殖を低下させると予測された。しかし思いがけず、KO マウスでは、膵臓の外分泌腺細胞にチモーゲン顆粒が充満していた。この現象が分泌障害による消化酵素貯留であるかどうかを確認するため、CCK による分泌刺激を行ったところ、分泌障害は全くなく、野生型では、くり返し刺激に対して分泌減少(分泌できる酵素のストアが枯渇するため)がみられるのに比し、KO マウスでは分泌反応が持続して認められた。この結果から、KO マウスでは消化酵素の合成亢進、貯留亢進が生じていると解釈した。この分子を標的として発現を減少させる

ことで、ヒト膵外分泌機能の再生を期待できると考えた。

2. 研究の目的

膵外分泌腺の増殖や数の増加(再生)は期待できなくても、膵外分泌機能が日常生活を維持できるレベルまで回復させることが可能となれば、慢性的な医療費の消費を減少させることができると考えた。その手がかりになる分子として Ki ラス関連蛋白(KRAP)の発現調節をとりあげた。すなわち、ラットにはきわめて効果的な CCK による膵栄養効果は、ヒトでは(その受容体がないため)栄養効果を期待できないが、KRAP は、80%以上の相同性をもってヒトにも認められる。この分子を標的として発現を減少させることで、ヒト膵外分泌機能の再生を可能とするための基礎検討を行った。

3. 研究の方法

(1)KRAP-KO マウスと野生型を用いて、表現型を比較することにより、このタンパクの生理機能をしらべた。

①膵内外分泌機能:一晚絶食ののち、2g/kg のブドウ糖を経口投与し、血糖変化を記録した。麻酔下に膵液胆汁を採取し、CCK に対する反応を調べた。年齢別に組織像を調べた。

②24 時間に消費した飼料と糞便をあつめ、カロリーポンベメーターで含有カロリーを測定し、消化吸収率を測定した。

③マウスを個別代謝ケージにいれ、呼気中酸素と炭酸ガスを測定することで、呼吸商、エネルギー消費の日内変動と1日当たりの消費量を測定する。摂食量を測定することで、エネルギーバランスを算出した。

(2) CCK-A-receptor(AR)KO、CCK-ARBR-KO、CCK-BRKO マウスの膵臓、白色脂肪、肝臓における KRAP 遺伝子発現の測定

以下のプライマーを用いてリアルタイム PCR 法で測定した。

No.1 Primer (514bp) 384, 5'

-TCAAGTTGAAAACCTGCAACAATATC-3' and 897,

5' -TGATAGTGTTCATCAGACGGTTT-3'

No.2 Primer (418bp) 1066, 5' -GCTACGGTTACAGAAGAAGTCTCAG -3' and 1483, 5' -CTCTTTTTGACTTGGCAAGACTTAG-3'

No.3 Primer (557bp) 2823, 5' -TCAGAACTCGTCTGTTCTACCTCTT-3' and 3379, 5' -GTAGCCCTCTAGATCTTCTGTTGGT-3'

(3)インスリン抵抗性を示すモデル (SHIP2 遺伝子導入マウス)での KRAP 発現

KRAP-KO マウスはインスリン投与による低血糖が、野生型マウスよりも強度に生じた。そこで、逆の病態=インスリン抵抗性を示すモデルマウスにおいて KRAP 発現がどうなっているのかをしらべた。

(4)KRAP タンパクのヒトにおける役割と調節

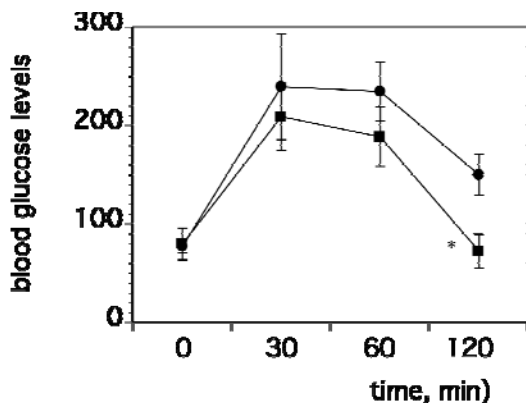
①ヒトにおいて、KRAP 過発現が癌化と関わりがないことを確認するため、ヒト由来 cell line での KRAP 発現の有無をしらべるため、コドン 13 の変異の有無と KRAP 遺伝子発現をしらべた。Cell line は 14 種類 (KP-1N, KP-2, KP-3, AsPC-1, MIA Paca-2, Suit-2 等) で行った。

②手術によって得られた組織 (膵臓癌、胆嚢癌、正常組織) のコドン 13 変異の有無の検索および KRAP 遺伝子発現を real-time PCR で測定した。

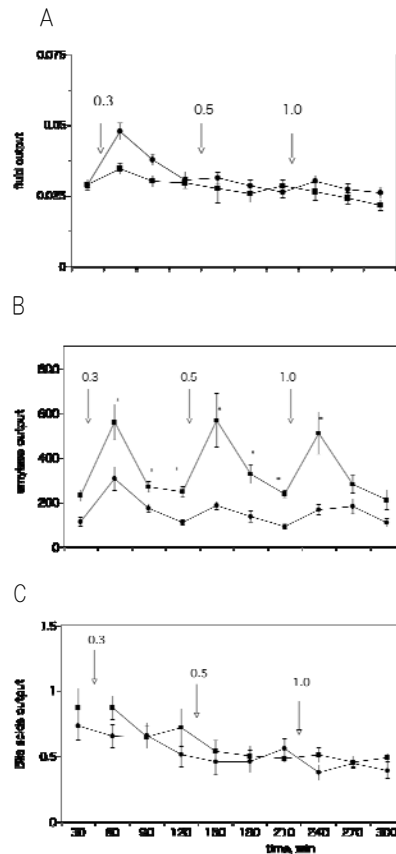
4. 研究成果

(1) KRAP-KO マウスと野生型マウスの表現型の比較。

①膵内外分泌機能: 2g/kg のブドウ糖を経口投与後の血糖変化は野生型より低下した。



膵臓の基礎分泌は wild-type と同じであったが、CCK の連続刺激に対して、有意に高いアミラーゼ分泌反応を示し、膵臓内蛋白、アミラーゼ含有量も有意に高かった(A:液量、B:アミラーゼ分泌、C:胆汁酸分泌)。



膵臓の組織像は胎生期~離乳期までは wild-type とほとんど変わらなかったが、離乳期前後より、分泌顆粒が有意に増加した。

②消化吸収率は野生型と変わらなかった。

③酸素消費量は増加しており高脂肪食を投与した場合には有意に上昇していた。

(2) CCK-ARKO、CCK-ARBRKO、CCK-BRKO マウスの肝臓、白色脂肪、膵臓における KRAP 遺伝子発現の測定

・肝臓、有意差なし(p=0.055)

・白色脂肪(p = 0.005, いずれも野生型より有意に高値。しかし CCK-ARKO, CCK-BRKO, CCK-ARBRKO の間には差がない。

・膵臓(p < 0.0001。ARKO は最も低下。

BRKO, ARBRKO は、野生型より有意に高値。しかし

ARKO, BRKO, ARBRKOの間には差がない。

CCK-ARKO(wild-type) < CCK-BRKO, ARBRKO

(3)インスリン抵抗性を示すモデル (SHIP2 遺伝子導入マウス)での KRAP 発現

肝臓、白色脂肪、膵臓のいずれにおいても、KRAP の遺伝子発現は野性型と有意差がみられなかった。

(4) KRAP タンパクのヒトにおける役割と調節・膵癌 Cell lines : 6 例 ; KP-1N, KP-2, KP-3, AsPC-1, MIA Paca-2, Suit-2 および、ヒト膵がん組織では、KRAP 遺伝子発現は正常組織と有意の差は認められなかった。また、コドン 13 の変異も認められなかった。

確認のため、さらに14種類の cell line (KP-1NL, KP-3L, KP-4, KP-5N, KP-10N, BxPc-3, H-48-N, Tcc-PAN 2, Panc-1)、膵がん組織 18 例、胆嚢がん組織 2 例を追加したが、やはり、有意差は得られなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 25 件)

- ① Miyasaka K, Fujimoto T, Kawanami T, Takiguchi S, Jimi A, Funakoshi A, Shirasawa S. Pancreatic hypertrophy in Ki-ras induced actin-interacting protein (KRAP) gene knockout mice. *Pancreas* 査読有 40: 79-83, 2011
- ② Tsutsumi E, Kanai S, Ohta M, Suwa Y, Miyasaka K. Stimulatory effect of N-methyltyramine, a congener of beer, on pancreatic secretion in conscious rats. *Alco Clin Exp Res (Supplemental Issue)* 査読有 34: S14-S17, 2010
- ③ Akimoto S, Miyasaka K. Age-associated changes of appetite-regulating peptides. *Geriatr Gerontol Int* 査読有 10(Suppl. 1): S107-S119, 2010
- ④ Miyasaka K, Hosoya H, Tanaka Y, Uegaki

S, Kino K, Shimokata H, Kawanami T, Funakoshi A. Association of aldehyde dehydrogenase 2 gene polymorphism with pancreatic cancer but not colon cancer. *Geriatr Gerontol Int* 査読有 10(Suppl. 1): S120-S126, 2010

- ⑤ Kanai S, Hosoya H, Akimoto S, Ohta M, Matsui T, Takiguchi S, Funakoshi A, Miyasaka K. Gastric acid secretion in cholecystokinin-1 receptor, -2 receptor and -1, -2 receptor gene knockout mice. *J Physiol Sci* 査読有 59: 23-30, 2009
- ⑥ Fujimoto T, Miyasaka K, Koyanagi M, Tsunoda T, Baba I, Doi K, Ohta M, Kato N, Sasazaki T, Shirasawa S. Altered energy homeostasis and resistance to diet-induced obesity in KRAP-deficient mice. *PLoS one* www.plosone.org 査読有 4* 1, e4240-e4241, 2009
- ⑦ 秋本紗恵子、宮坂京子。内臓脂肪症候群の形成に關与する社会的性差(飲酒習慣)と生物学的性差の重要度の比較検討。健康医科学 査読有 24: 31-36, 2009
- ⑧ 宮坂京子。消化・吸収・代謝調節と老化 消化と吸収 査読なし 32: 24-30, 2009
- ⑨ Shimazoe T, Morita M, Ogiwara S, Kojiya T, Goto J, Kamakura M, Moriya T, Takiguchi S, Kono A, Miyasaka K, Funakoshi A, Ikeda M. Cholecystokinin-A receptors on retinal amacrine cells play a role in circadian photo-entrainment. *The FASEB Journal* 査読有 22: 1479-1490, 2008
- ⑩ Miyasaka K, Kawanami T, Yamanaka T, Funakoshi A. Aldehyde dehydrogenase (ALDH)2 polymorphism is an independent risk of pancreatic cancer in a Japanese

- population. Res. Adv. In Alcohol & Alcoholism 1, 査読なし 1-7, 2008
- ⑪ 嶋田有紀子、太田稔、金井節子、川波賢子、瀧口総一、船越顕博、関目綾子、三田佳子、宮坂京子。インスリン情報伝達に関わる蛋白SHIP2の遺伝子トランスジェニックマウスの作成と表現型の検索。消化と吸収 査読有 31: 91-97, 2008.
- ⑫ 秋本紗恵子、太田稔、宮坂京子。食欲調節の加齢変化-摂食調節ペプチドの側面から-。消化器科 査読なし 46:137-142, 2008
- ⑬ 宮坂京子、太田稔、金井節子、細矢博子、堤絵梨、諏訪芳秀、山中竹春、船越顕博。アルコールと消化管機能。GI Research 査読なし 16:45-50, 2008
- ⑭ 宮坂京子。代表的な胆嚢・胆管系の疾患と解剖・病態生理。消化器肝胆膵ケア。査読なし 4, 5月号、65-69, 2008
- ⑮ 宮坂京子、船越顕博。消化管生理活性ペプチドの最新知見。CCK GI Research 査読なし 16:18-22, 2008
- ⑯ 宮坂京子、太田稔、金井節子、細矢博子、堤絵梨、諏訪芳秀、山中竹春、船越顕博。アルコールと消化管機能。GI Research 査読なし 16:45-50, 2008
- ⑰ 宮坂京子。膵酵素とイオン分泌調節。胆と膵 査読なし 29:729-733, 2008
- ⑱ Miyasaka K, Kanai S, Ohta M, Hosoya H, Sekime A, Akimoto S, Takiguchi S, Funakoshi A. Age-associated gallstone formation in male and female CCK-1(A) receptor deficient mice. J Gastroenterol 査読有 42: 493-496, 2007
- ⑲ Kanai S, Hosoya H, Ohta M, Miyasaka K. Decreased H⁺, K⁺-ATPase expression and gastric acid secretory capacity in aged mice. Arch Geriat Gerontol 査読有 45: 243-252, 2007
- ⑳ Miyasaka K, Kanai S, Ohta M, Sekime A, Akimoto S, Takiguchi S, Funakoshi A. Susceptibility to obesity and gallbladder stasis produced by a protein- and fat-enriched diet in male mice compared with female mice Nutr & Metab 査読有 4, 2007 (doi:10.1186/1743-7075-4-14)
- ㉑ Miyasaka K, Takiguchi S, Funakoshi A. Cholecystokinin 1(A) receptor polymorphisms Curr Top Medicinal Chem 査読なし 7: 1205-1210, 2007
- ㉒ Miyasaka K, Funakoshi A. Is the OLETF rat a good model of central sensitization? Correspondence, J Pharm Sci 査読なし 105: 373, 2007 doi:10.1254/jphs.LT0070020
- ㉓ 宮坂京子、金井節子、太田稔、船越顕博。肥大膵にみられる Lumial cholecystokinin-releasing factor (LCRF), cholecystokinin (CCK)と、膵外分泌反応の解離。査読なし」膵臓 22: 117-122, 2007
- ㉔ 宮坂京子、太田稔、金井節子、細矢博子、関目綾子、瀧口総一、船越顕博。高砂糖食と胆石形成:CCK-1受容体欠損マウスでの検討。消化と吸収 査読有 30: 30-34, 2007.
- ㉕ 金井節子、細矢博子、秋本紗恵子、瀧口総一、船越顕博、宮坂京子。コレシストキニン (CCK) -1 および-2 受容体遺伝子、CCK -1,-2 受容体遺伝子欠損マウスにおける胃酸分泌。消化と吸収 査読有 30: 39-43, 2007.
- [学会発表] (計 24 件)
- ① Miyasaka K, Fujimoto T, Kawanami T, Takiguchi S, Funakoshi A, Shirasawa S. Pancreatic hypertrophy in ki-ras-induced actin-interacting protein (KRAP) gene

- knockout mice. 第 88 回日本生理学会大会、第 116 回日本解剖学会総会・全国学術集合同大会 3/28-30, パシフィコ横浜(地震のため、誌上発表のみ)
- ② 宮坂京子。加齢と消化器、高齢者における、肥満と大腸癌の関係について。日本消化吸収学会創立 40 周年記念、特定非営利活動法人日本消化吸収学会創立記念シンポジウム 主催 日本消化吸収学会・特定非営利活動法人日本消化吸収学会 2.13.2011 大手町サンケイプラザ, 東京
- ③ 宮坂京子、関目綾子、金井節子、川波賢子、瀧口総一、船越顕博。CCK-1(A)受容体(R)ノックアウト(-/-)マウスの胆石形成におよぼすウルソデオキシコール酸の影響 第 6 回東日本胆汁酸研究会。7.31.2010 大手町サンケイプラザ 東京
- ④ 伊丹奈穂、磯崎裕美、小俣友美、武田静佳、田中里奈、戸口亜由美、平木実可子、堀越美祐紀、関目綾子、宮坂京子、堤絵梨、諏訪芳秀。C13 呼気テストによるアルコール飲料の胃排出速度の性差の検討。第 41 回日本消化吸収学会総会 10.13-16, 2010 横浜
- ⑤ 秋本陽介、宮坂京子、金井節子、秋本紗恵子、植松宏。加齢によるグレリンの摂食亢進効果の減弱。第 41 回日本消化吸収学会総会 10.13-16, 2010 横浜
- 川波賢子、瀧口総一、船越顕博、金井節子、宮坂京子。ラス関連タンパク (Ki-ras-induced actin-interacting protein=KRAP) のpancreatic growthへの関与。第 41 回日本消化吸収学会総会 10.13-16, 2010 横浜
- ⑥ 金井節子、川波賢子、関目綾子、瀧口総一、船越顕博、宮坂京子。CCK-1(A) 受容体 (R) ノックアウト(-/-)マウスの胆石形成におよぼすウルソの影響。第 41 回日本消化吸収学会総会 10.13-16, 2010 横浜
- ⑦ 林洋、宮坂京子。高血糖ラットの小腸リンパでは脂肪酸組成が変わる。第 44 回日本成人病 (生活習慣病) 学会 都市センターホテル 2010.1.9-10、東京
- ⑧ 三田佳子、関目綾子、宮坂京子、堤絵梨、諏訪芳秀。C13 3 個期テストによる胃排出速度のおよぼすアルコールの影響。第 40 回日本消化吸収学会総会 10.14-17, 2009 京都
- ⑨ 宮坂京子。エネルギーバランスと老化の制御 静岡県立大学食品栄養科学部特別講演 平成 21 年 1.29
- ⑩ 宮坂京子 消化・吸収・代謝調節と老化 第 40 回日本消化吸収学会総会 特別講演 10.14-17, 2009 京都
- ⑪ 金井節子、細矢博子、秋本紗恵子、瀧口総一、船越顕博、宮坂京子。コレシストキニン (CCK) -1 および-2 受容体遺伝子、CCK -1,-2 受容体遺伝子欠損マウスにおける胃酸分泌。日本消化器関連週間 第 38 回日本消化吸収学会総会神戸 10.17-22, 200
- ⑫ 太田稔、金井節子、細矢博子、秋本紗恵子、瀧口総一、船越顕博、宮坂京子。SHIP2 トランスジェニックマウスの表現型検討。第 85 回日本生理学会大会 3.25-27、2008、東京
- ⑬ 太田稔、金井節子、瀧口総一、船越顕博、関目綾子、三田佳子、宮坂京子。インスリン情報伝達に関わる蛋白SHIP2 の遺伝子トランスジェニックマウスの作成と表現型の検索。第 39 回日本消化吸収学会総会 10.1-4、2008、東京 (品川)
- ⑭ Kanai S, Ohta M, Sakurai C, Akimoto S, Hosoya H, Miyasaka K. Age-associated gallstone formation between male and female CCK-ARKO mice. The 84th Annual Meeting of Japanese Physiological Society. 3.20-22, 2007 Osaka
- ⑮ 秦弘恵、田中康夫、紀健二、宮坂京子、船

越頭博。大腸癌と大腸ポリープにおけるアルデハイド脱水素酵素遺伝子変異の影響。第49回日本消化器病学会総会 青森 4.18-4.20, 2007.

- ⑩ 金井節子、細矢博子、太田稔、秋本紗恵子、瀧口総一、船越頭博、宮坂京子。高タンパク高脂肪食による肥満、高脂血症に対する生物学的性差の重要性。日本基礎老化学会第30回大会 札幌 6.20-22, 2007.
- ⑪ 宮坂京子。膵外分泌機能調節と膵障害モデルへのアプローチ。第38回日本膵臓学会大会 教育講演|基礎 第38回日本膵臓学会大会 福岡 6.28-29, 2007
- ⑫ 川波賢子、伊藤鉄英、明石哲郎、藤森尚、澄井俊彦、宮坂京子、中村光男、船越頭博。慢性膵炎および膵癌症例におけるPST1遺伝子変異の解析。第38回日本膵臓学会大会 福岡 6.28-29, 2007
- ⑬ 金井節子、太田稔、宮坂京子、船越頭博。肥大膵にみられるCCKおよびLCRFと、膵外分泌反応の解離。第38回日本膵臓学会大会 福岡 6.28-29, 2007
- 太田稔、堤絵梨、諏訪芳秀、宮坂京子。ビール中の非アルコール成分(NMT)の覚醒ラット膵内外分泌に対する作用の比較。第38回日本膵臓学会大会 福岡 6.28-29, 2007
- 太田稔、金井節子、細矢博子、瀧口総一、船越頭博、宮坂京子。インスリン抵抗性モデルマウス作成の試み。第38回日本膵臓学会大会 福岡 6.28-29, 2007
- 宮坂京子、太田稔、金井節子、細矢博子、関目綾子、瀧口総一、船越頭博。高砂糖食と胆石形成:CCK-1受容体欠損マウスでの検討。日本消化器関連週間 第38回日本消化器学会総会神戸 10.17-22, 2007
- 太田稔、金井節子、細矢博子、瀧口総一、船越頭博、宮坂京子。グレリン分泌に対するCCK受容体の関与。日本消化器関連週間

第38回日本消化器学会総会神戸 10.17-22, 2007

[図書] (計5件)

- ① 宮坂京子 消化器系 栄養科学イラストレイテッド 解剖生理学、志村二三夫、岡純、山田和彦編 羊土者p41-60, (全 p222)東京 2010
- ② 宮坂京子 消化器系 栄養科学イラストレイテッド 解剖生理学ノート、志村二三夫、岡純、山田和彦編 羊土者 32-49, (全 p214)東京 2010
- ③ 宮坂京子、船越頭博、明石恵子。膵炎 病態生理ビジュアルマップ 2。佐藤千史、井上智子編 医学書院、東京 p109-118(全 129) 2010 9月
- ④ 宮坂京子、金井節子、太田稔、細矢博子。覚醒状態でのラット膵内外分泌測定方法。老化・老年病研究のための動物実験ガイドブック 日本基礎老化学会編 株式会社アドスリー 東京 2008. p181-187(全p293).
- ⑤ 宮坂京子、船越頭博。膵炎 病気、病態、重症度からみた疾患別看護過程。井上智子、佐藤千史 編 医学書院、東京 p545-554 (全p1981), 2008

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮坂 京子 (MIYASAKA KYOUKO)
東京家政大学・家政学部・教授
研究者番号：90166140

(2) 研究分担者 (-H19)

瀧口 総一 (TAKIGUCHI SOICHI)
国立病院機構 九州がんセンター・臨床研究部・研究員
研究者番号：00280793

(3) 連携研究者 (H20-H22)

瀧口 総一 (TAKIGUCHI SOICHI)
国立病院機構 九州がんセンター・臨床研究部・研究員
研究者番号：00280793

