

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08476

研究課題名(和文)トリプシン異所性活性化におけるRab7の役割と急性膵炎発症のメカニズムの解明

研究課題名(英文)The role of rab7 on ectopic activation of trypsin and the mechanism of the onset of acute pancreatitis.

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：Rab7 KOマウスの解析を通じて、Rab7は酵素顆粒やリソソームの成熟、恒常性の維持に重要な役割を果たしている。Rab7KOマウスの腺房細胞では酵素顆粒やリソソームが未熟であり、カテプシンBの活性が既に亢進した状態にある。未成熟な酵素顆粒に過剰な分泌刺激が加わることで、fragileなリソソームと相まって異常なトリプシン活性化が腺房細胞内で生ずる。Rab7 KOマウスでは膵炎刺激のごく早期に膵内のRab7陽性細胞が増加(活性化?)する、ことを示すことができた。Rab7陽性細胞の正体、その細胞が膵炎抑制作用を持つのかどうかの検討が今後の課題である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Rab7が膵腺房細胞の恒常性の維持に重要な役割を果たしていること、膵炎に対して抑制的に作用することが明らかとなった。Rab7 KOマウスの実験的膵炎のごく初期に見られたRab7陽性細胞の正体、その果たしている役割を詳細に解析することで、膵炎の新たな治療法の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Through the analysis of Rab7 KO mice, we have shown 1. Rab7 plays an important role in the maturation and integrity of zymogen granule and lysosome, 2. Zymogen granule and lysosome are altered in integrity in Rab7 KO acinar cells and the activity of cathepsin B is already elevated in a physiological condition, 3. Excessive stimulation of secretion to the immature zymogen granules together with fragile lysosomes results in the abnormal ectopic activation of trypsin in Rab7 KO acinar cells, 4. The number of Rab7-positive cells (other than acinar cells) increased in the very early phase of experimental pancreatitis in Rab7-KO pancreas. Further investigation is needed on the types of Rab7-positive cells and whether they have a suppressive effect on pancreatitis.

研究分野：膵臓

キーワード：急性膵炎 Rab7 トリプシン 酵素顆粒 リソソーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

これまで、我々のグループが行ってきた遺伝子改変マウスの実験的膵炎におけるトリプシンの活性化の比較を図1に示す。左端の Rab7KO マウスのセルレイン膵炎を除いてはトリプシンの異所性活性化はコントロールの約 1/2 ~ 2 倍であった。多くの論文で発表されている遺伝子改変マウスの膵炎実験でもほぼ同様の結果である。Rab7KO マウスに L-アルギニン投与による膵炎を生じさせても約 2 倍のトリプシンの上昇しか示さない(左から 2 番目)ことから、Rab7KO マウスにセルレイン(コレシストキニンのアナログ)による過剰な分泌刺激を加えた時にのみ異常なトリプシンの活性化が生じることがわかる。

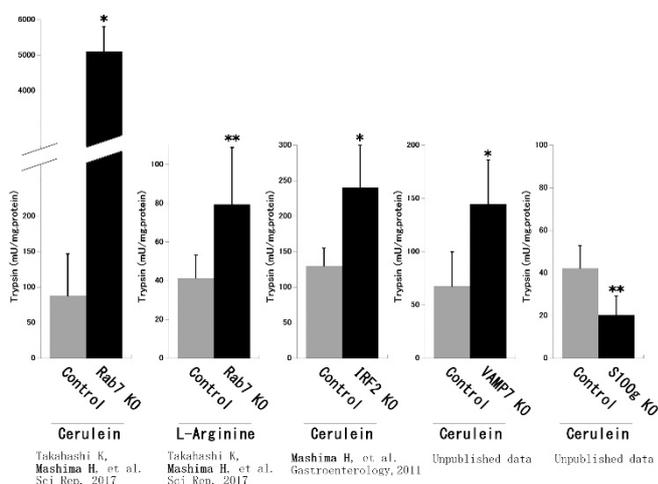


図 1. 各種遺伝子改変マウスに実験的膵炎を惹起した際の膵内でのトリプシン活性化の比較。

膵腺房細胞は食物の消化に寄与するために多くの消化酵素を分泌する。消化酵素の多くは前駆体の形で酵素顆粒内に貯えられている。急性膵炎発症の超急性期には腺房細胞の頂端側からの分泌障害が生じる(Gaisano HY, Gorelick FS. Gastroenterology, 2009)。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・吸収に働くが、そうでなければ細胞内に爆弾を抱えているようなものである。これを処理するためにオートファジーが動員されるが、リソソーム中の水解酵素には量的な限界があり、やがて処理しきれなくなるとオートファジー不全が生じ、膵内でトリプシンが活性化すると考えられている。しかし、これでは Rab7KO マウスにおいて、セルレイン膵炎のみで異常なトリプシンの活性化が生じることが説明できない。

2. 研究の目的

細胞内小胞輸送に関与する低分子量 G 蛋白の一つである Rab7 はオートファジー機構の中でオートファゴソームとリソソームの両者に局在し、その機能に重要な役割を果たしている可能性がある (Biochim Biophys Acta, 2013)。また、リソソーム上に存在することは外分泌やエンドサイトーシス/エキソサイトーシスにも影響している可能性を示唆する。オートファジーにおけるオートファゴソーム・オートリソソームの形成とエンドソームの成熟過程には類似性がある。どちらも小胞内の物質をリソソームの水解酵素によって分解し、細胞の恒常性の維持に必要な物質を作りだし、不要物をエキソサイトーシスによって細胞外に排出するという機構である。Rab7 はオートファゴソーム、オートリソソーム、後期エンドソーム、リソソームのすべての膜上に存在しており、その機能に重要な役割を果たしていると考えられる。しかしオートファジー不全だけでは Rab7KO マウスのセルレイン膵炎時のトリプシンの異常な活性化を説明できない。オートファジー、外分泌、エンドサイトーシス/エキソサイトーシスを関連付けることで初めてその異常な活性化を解明できると考えられ、Rab7KO マウスを用いてその解析を行う。

3. 研究の方法

A. Rab7 KO マウスモデル (Rab7^{Δpan})

マウスの Rab7 を全身でノックアウトすると胎生致死であるため、Ptfla-Cre マウスを用いて膵特異的 Rab7KO マウスを作成した。我々は、Rab7KO マウスを用いて、飢餓状態やセルレイン膵炎を惹起するとコントロールマウスと比較して Rab7KO マウスはオートファジー不全が増悪し、膵炎が重症化すること、前期エンドソームとオートファゴソームの異常な癒合が生じることなどを明らかにして既に報告した (Takahashi K, Mashima H, et al. Sci Rep, 2017)。しかし、実験的膵炎の中でもセルレイン膵炎を発症させた時にのみ、膵内でトリプシンが爆発的に活性化する現象はまだ説明できていない。そこで、以下の検討を行う。トリプシン、カテプシン B/D/L の質的・量的変化、オートファゴソーム、オートリソソーム、前期エンドソーム、後期エンドソーム、リソソームの質的・量的変化の検討：コントロールマウス、Rab7 KO マウスに分泌過剰刺激(セルレイン膵炎)薬物投与(L-アルギニン膵炎)食餌性(コリン欠乏エチオン食)の実験的膵炎を惹起し、その反応の差異を詳細に検討する。特にトリプシンの量的変化、局在の変化に着目する。

B. ラット膵腺房細胞株 AR42J を用いた検討

膵外分泌のモデル細胞である AR42J 細胞にレトロウイルスを用いて、コントロール細胞、野生型 Rab7 過剰発現細胞、活性型 Rab7Q67L(GTP 型)過剰発現細胞、不活性型 Rab7T22N(GDP 型)過剰発

現細胞を作成する。岩手医科大学薬学部機能性科学分野の中西真弓先生から発現ベクターを供与して頂いた。各細胞株を樹立し、Rab7 の機能を解明する。培養液中から FCS を除去したスターベーション下で細胞変化、CCK 刺激による外分泌に及ぼす影響、高濃度 CCK 刺激による細胞動態の変化(オートファジー、細胞内トリプシン活性上昇、細胞壊死など)につき解析する。

4. 研究成果

A. Rab7 KO マウスを用いての解析

Rab7 は酵素顆粒膜上に存在する：免疫染色により Rab7 は腺房細胞内でアミラーゼと同在が一致した。また、超遠心により酵素顆粒を分画したウエスタンブロットでも、Rab7 は酵素顆粒に存在した。

Rab7 は調節性外分泌には影響を及ぼさない：単離腺房細胞を用いて、CCK 刺激によるアミラーゼ分泌を検討した。コントロールマウスと Rab7KO マウスでは差はみられなかった。

Rab7 は酵素顆粒の成熟や恒常性の維持に影響を及ぼす：電子顕微鏡でコントロールマウスと Rab7KO マウスの腺房細胞を観察すると、Rab7KO マウスの腺房細胞の酵素顆粒は径が明らかに小さかった。次にリソソームのマーカである LAMP1 で WB を行うと、バンドは下方にシフトしており、degradation している可能性が考えられた(図 2a)。膝ホモジェネート中のカテプシン B の活性を測定すると図 2b に示すように Rab7KO マウスで有意に亢進していた。カテプシン D, L に関しては現在検討中である。

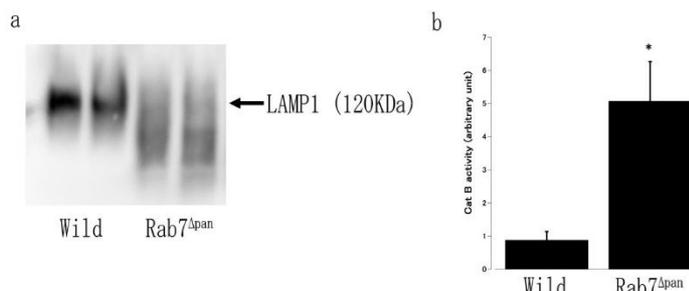


図2. Rab7 KOマウスではリソソームの機能に障害が生じている。
a. LAMP1のウエスタンブロット b. カテプシンBアッセイ

以上から、Rab7 は早期エンドソームや後期エンドソーム、リソソームだけでなく、酵素顆粒上にも存在しているが、調節性外分泌には影響を及ぼさず、酵素顆粒やリソソームの成熟や恒常性の維持に機能していることが明らかとなった。

次にセルレイン膵炎を惹起すると、コントロールマウスと Rab7KO マウスでどのような差が生じるかを検討した。

既報にあるようにセルレイン膵炎において、野生型マウスのトリプシンの異所性活性化は二峰性に生じた(1時間で一回目のピーク、10時間で二回目のピーク)が、Rab7 KO マウスでは第一のピークがなく、第二のピークが爆発的に生じた(図 3)。

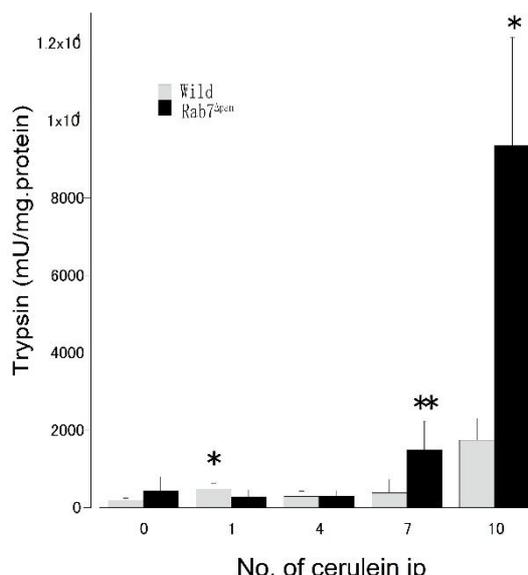


図3. セルレイン膵炎におけるトリプシン活性の時間経過。コントロールマウスは二峰性にトリプシンが上昇するが、Rab7KOマウスは7時間後から著明な上昇が見られる。

カテプシン B と LAMP-1 の発現の変化を WB で検討した。発現量自体には時間的な変化はほとんど見られなかった。コントロールマウスと比較すると、Rab7KO マウスにおいて、カテプシン B の発現量が多く、LAMP-1 の degradation は一貫して認められた(図 4)。セルレインを 10 回 ip した時点の膵組織を用いて免疫組織化学を行った。図 5 に示すようにトリプシン及びカテプシン B の著明な発現亢進が Rab7KO マウスで認められた。コントロールではトリプシンと

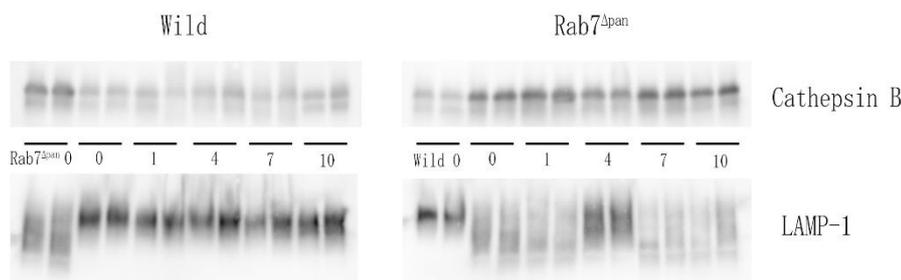


図4. セルレイン膵炎におけるカテプシンB、LAMP-1 ウエスタンブロットの時間経過

カテプシン B の共存は細胞内全体に分散していたが、Rab7KO マウスでは apical 側でその共存が強く、その周囲にカテプシン B 陽性の粗大小胞が取り巻いていた。

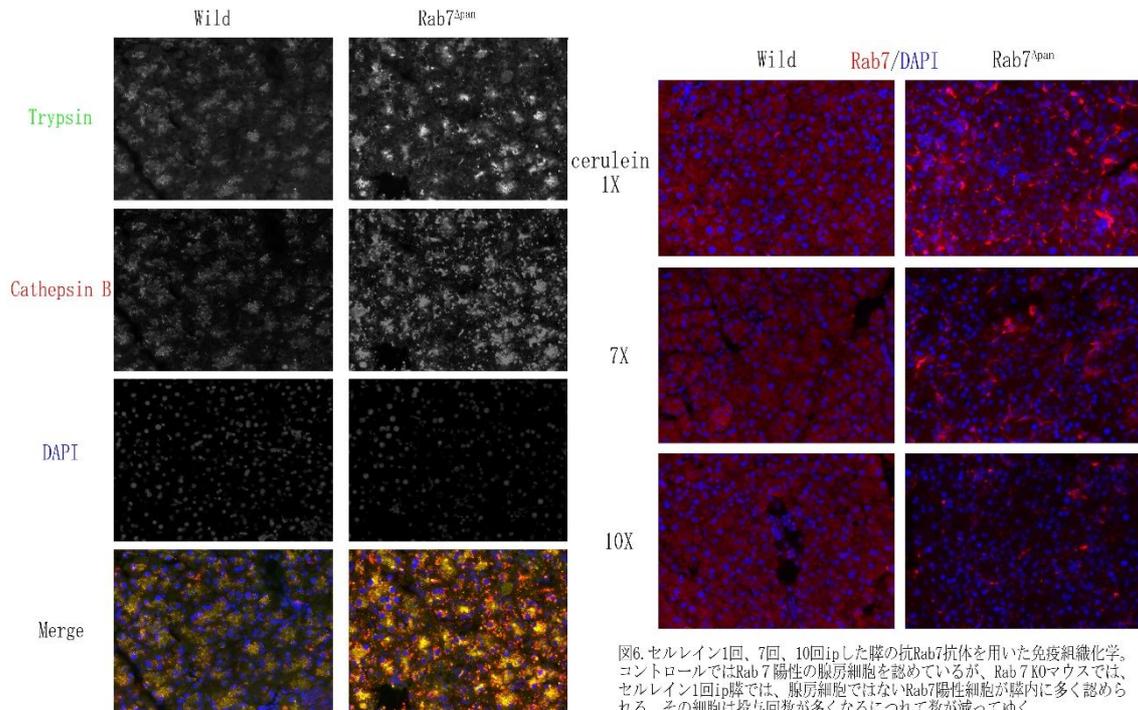


図5. セルレイン膵炎 (10回ip)を惹起した膵の免疫組織化学

図6. セルレイン1回、7回、10回ipした膵の抗Rab7抗体を用いた免疫組織化学。コントロールではRab7陽性の腺房細胞を認めているが、Rab7 KOマウスでは、セルレイン1回ip膵では、腺房細胞ではないRab7陽性細胞が膵内に多く認められる。その細胞は投与回数が増えるにつれて数が減ってゆく。

Rab7 KO マウスでは腺房細胞に Rab7 はないが、膵臓には腺房細胞以外にも膵管、ランゲルハンス島、星細胞(PSC)、血球などが存在する。そこで膵炎発症時の Rab7 陽性細胞の挙動を免疫組織化学で検討した(図9)。コントロールでは腺房細胞に Rab7 の免疫原性を認めるが、KO マウスでは驚くことに1回 ip した時点で多くの Rab7 陽性細胞が腺房細胞以外の膵内にそして、セルレインの投与回数が増えるに従ってその数は減少した。

Rab7 KO マウスの膵内に見られた Rab7 陽性細胞は膵管、ランゲルハンス島とは異なっており、セルレイン ip1 回では膵内に炎症細胞浸潤も認めないことから、PSC ではないかと考えている。これが炎症抑制作用をもっているために、トリプシンの異所性活性化の第一のピーク(図6)が見られないのではないかと考えている。

B. ラット膵腺房細胞株 AR42J を用いた検討

Puromycin を用いた細胞のセレクションがうまく行かず、断念した。

本研究では、Rab7 は酵素顆粒やリソソームの成熟、恒常性の維持に重要な役割を果たしている、Rab7KO マウスの腺房細胞では酵素顆粒やリソソームが未熟であり、カテプシン B の活性が既に亢進した状態にある、未成熟な酵素顆粒に過剰な分泌刺激が加わることで、fragile なリソソームと相まって異常なトリプシン活性化が腺房細胞内で生ずる、Rab7 KO マウスでは膵炎刺激のごく早期に膵内の Rab7 陽性細胞が増加(活性化?)する、ことを示すことができた。

の Rab7 陽性細胞の正体、膵炎抑制作用を持つのかなどをさらに検討してゆく必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Mashima Hirosato, Takahashi Kenichi, Sekine Masanari, Matsumoto Satohiro, Asano Takeharu, Uehara Takeshi, Fujiwara Junichi, Otake Haruka, Ishii Takehiro, Yoshikawa Shuhei, Miura Takaya, Koito Yudai, Kashima Hitomi, Matsumoto Keita, Ohnishi Hirohide	4. 巻 526
2. 論文標題 The role of calcium-binding protein S100g (CalbindinD-9K) and annexin A10 in acute pancreatitis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 692 - 698
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.03.155	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 眞嶋浩聡、関根匡成、大西洋英	4. 巻 40
2. 論文標題 急性膵炎発症のメカニズム	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 胆と膵	6. 最初と最後の頁 1065 - 1072
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 眞嶋浩聡、関根匡成、小島柊、佐藤杏美、佐々木吾也、田中健丈、松本圭太、小糸雄大、賀嶋ひとみ、三浦孝也、石井剛弘、坪井瑠美子、吉川修平、上原健志、浅野岳晴、松本吏弘	4. 巻 9
2. 論文標題 世界における膵炎の疫学とその動向	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 消化器・肝臓内科	6. 最初と最後の頁 63 - 71
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 眞嶋浩聡、関根匡成、上原健志、浅野岳晴、松本吏弘	4. 巻 16
2. 論文標題 膵性糖尿病(DEP)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本臨床 別冊膵臓症候群	6. 最初と最後の頁 374 - 379
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 関根匡成, 眞嶋浩聡
2. 発表標題 早期慢性膵炎診断基準2019の超音波内視鏡(EUS)像と切除膵病理組織像の後方視的な比較検討
3. 学会等名 第107回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 関根匡成、眞嶋浩聡
2. 発表標題 超音波内視鏡における早期慢性膵炎画像所見と関連する因子の検討
3. 学会等名 第51回日本膵臓学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 関野 雄典, 鎌田 健太郎, 関根 匡成, 平尾 元宏, 砂村 真琴, 眞嶋 浩聡, 大西 洋英
2. 発表標題 メタボローム解析を用いた早期慢性膵炎疾患概念確立とバイオマーカー探索(第一報)
3. 学会等名 第51回日本膵臓学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 関根匡成、藤原純一、眞嶋浩聡
2. 発表標題 高齢者における総胆管結石治療前のEUS 評価の有用性の検討
3. 学会等名 第99回日本消化器内視鏡学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 関根匡成、大西洋英、眞嶋浩聡
2. 発表標題 早期慢性膵炎の診断の確立を目指した超音波内視鏡（EUS）像と切除膵病理組織像の比較検討
3. 学会等名 第106回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計6件

1. 著者名 坂井建雄、河原克雅	4. 発行年 2021年
2. 出版社 日本医事新報社	5. 総ページ数 904
3. 書名 カラー図解 人体の正常構造と機能 全10巻縮刷版	

1. 著者名 下瀬川 徹、渡辺 守	4. 発行年 2021年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 736
3. 書名 専門医のための消化器病学 第3版	

1. 著者名 福井 次矢、高木 誠、小室 一成	4. 発行年 2021年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 2192
3. 書名 今日の治療指針 2021年版 [デスク判]	

1. 著者名 矢崎 義雄	4. 発行年 2020年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 2002
3. 書名 新臨床内科学 [デスク判] 第10版	

1. 著者名 永井 良三	4. 発行年 2020年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 2114
3. 書名 今日の診断指針 デスク判 第8版	

1. 著者名 南学 正臣	4. 発行年 2019年
2. 出版社 中山書店	5. 総ページ数 3000
3. 書名 内科学書	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>研究代表者 眞嶋浩聡が単独で行った研究である。 講演会 眞嶋浩聡：「膵炎・膵癌のFront Line」膵疾患セミナー in 熊谷、熊谷総合病院、2022.2.17</p>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------