

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17396

研究課題名(和文) 膵線維化および膵発癌過程における膵貯蔵レチノイドの役割

研究課題名(英文) Role of pancreatic retinoid storage in pancreatic fibrosis and carcinogenesis

研究代表者

小澤 範高 (Ozawa, Noritaka)

岐阜大学・大学院医学系研究科・招へい教員

研究者番号：60761450

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)：膵星細胞の貯蔵レチノイドが膵癌や膵線維化に及ぼす影響について実験を行った。HPLCで測定した膵貯蔵レチノイドは、レチニルエステル合成酵素(LRAT)欠損マウスで有意に減少していた。セルレイン反復注射による膵線維化モデルにおいて、血清アミラーゼおよびリパーゼはLRAT欠損群で有意に高値であった。また、LRAT欠損マウスでは線維化マーカーTimp1 mRNAの膵での発現が高値であったほか、膵組織像で膵炎の増悪と線維組織の有意な増生がみられた。上記結果より、LRATの欠損により慢性膵炎、膵線維化が増悪することが示唆され、膵組織におけるレチノイド量の差異が、膵の病態に影響を与える可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

レチニルエステル合成酵素(LRAT)欠損マウスの膵貯蔵レチノイドは有意に低値であったことから、この遺伝子改変マウスが膵レチノイド貯蔵欠如モデルとして適切であることが見出された。また、膵線維化モデルを用いた実験結果から、LRAT欠損すなわち膵レチノイド貯蔵の減少により慢性膵炎、膵線維化が増悪することが示された。本研究結果は、膵貯蔵レチノイドが慢性膵炎および膵線維化を抑制する可能性を示しており、膵星細胞へのレチノイド補充もしくは脂肪滴喪失の阻害による、慢性膵炎・膵線維化および膵癌に対する治療法の開発につながると思われる。

研究成果の概要(英文)：The roles of retinoid storage in pancreatic stellate cells on pancreatic cancer and fibrosis were investigated. In lecithin:retinol acyltransferase (LRAT)-deficient mice, pancreatic retinoid storage measured by HPLC were significantly decreased compared to the control. In a model of pancreatitis and pancreatic fibrosis induced by caerulein injections, serum amylase and lipase were significantly higher and the mRNA expression level of fibrosis marker Timp1 was markedly elevated in the pancreas of LRAT-deficient mice. In addition, the pancreatic histology in mutant mice showed exacerbation of pancreatitis and significant increase of fibrous tissue. These results indicated LRAT deficiency exacerbates chronic pancreatitis and fibrosis, suggesting that differences in retinoid levels in pancreatic tissue might affect the pathology of the pancreas.

研究分野：消化器病学

キーワード：膵癌 膵線維化 レチノイド 膵星細胞

1. 研究開始当初の背景

膵癌は現在、本邦における癌死亡原因の第4位であり、死亡数は年間3万人を超える。膵癌は早期発見が困難であり、浸潤性および転移性が高いことから、5年生存率は約10%と他のがん種と比較して極めて予後不良である。近年、進行膵癌に対する新たな治療法の開発が進められているが、未だ満足できる成績は得られていない。従って、膵癌に対する新規予防法・治療法の開発は喫緊の課題である。

ビタミンAとその類縁体であるレチノイドは、生体の恒常性維持や生殖・発生・免疫など多岐にわたり重要な役割を担う生理活性物質である。肝の非実質細胞である肝星細胞と同様に、膵臓の間質に存在する膵星細胞は、その脂肪滴中にレチノイドを多量に含有している。膵星細胞は、膵臓での慢性炎症に伴い活性化し、レチノイドを含んだ脂肪滴を徐々に失うとともに、その形態を線維芽細胞様に変化させ、サイトカインやコラーゲン等を産生し膵線維化に深く関わっている。

膵癌やその発生源地と考えられる慢性膵炎は膵線維化を病理学的特徴としており、膵星細胞はそれらの病態進展において中心的役割を果たすと考えられている。膵星細胞活性化とそれに伴う脂肪滴喪失、すなわち膵臓内のレチノイド量減少は、膵疾患発症における一つの指標となりうるが、膵星細胞活性化と脂肪滴喪失の因果関係については結論が得られていない。

申請者らの研究グループではこれまで、肝貯蔵レチノイドが欠如した動物モデルとしてレチニルエステル合成酵素 (lecithin:retinol acyltransferase, LRAT) ノックアウト (KO) マウスを用いた研究を行ってきた。LRAT は貯蔵型レチノイドであるレチニルエステルの合成を触媒する酵素であり、その欠損マウスは肝星細胞内に脂肪滴を有さず、肝レチノイド貯蔵がほとんど認められない。LRAT KO マウスは、その肝星細胞だけでなく膵星細胞においても、レチノイドを含む脂肪滴が喪失している可能性があり、膵組織としての貯蔵レチノイドが欠如した興味深い動物モデルであると考えた。この遺伝子改変マウスを用いた様々な疾患モデルを解析することで、膵レチノイド貯蔵が膵臓の病態に与える影響や、膵線維化・発癌において膵星細胞が果たす役割について新たな知見を得ることが期待できる。

2. 研究の目的

本研究は下記を目的としている。

- レチニルエステル合成酵素欠損マウスの、膵星細胞、膵レチノイド貯蔵につき解析し、モデルとしての有用性を検証する。
- 膵線維化および膵発癌過程における膵星細胞活性化と、レチノイドを含有した脂肪滴喪失の関連性について解明し、膵貯蔵レチノイドの役割を明らかにする。

3. 研究の方法

- レチニルエステル合成酵素 (LRAT) 欠損マウスの膵臓および膵星細胞の解析

LRAT KO マウスを解剖し、得られた膵組織を電子顕微鏡で観察するとともに、高速液体クロマトグラフィー (high performance liquid chromatography, HPLC) を用いて含有するレチノイド (レチニルエステルおよびレチノイン酸) 量を測定する。対照群は遺伝子背景が一致している野生型マウスとする。同時に肝組織も採取し、肝星細胞内の脂肪滴の欠如と肝組織のレチノイド含有量が対照群との比較において有意に低いことを確認する。

また、膵組織において、星細胞 (活性化) のマーカーである glial fibrillary acidic protein (GFAP)、desmin、vimentin、 α -smooth muscle actin (α -SMA) 等による免疫染色を行い、膵星細胞の数、分布および活性化について対照群と比較する。さらに、コラゲナーゼ・プロナーゼ灌流手技を利用して膵星細胞の単離を行い、膵星細胞の形態学的変化および活性化に関連する遺伝子発現変化について対照群と比較する。脂肪滴の分解に関わる hormone sensitive lipase、perilipin についても注目するほか、十分なサンプルが得られればマイクロアレイ等の網羅的解析も行う。

- LRAT 欠損マウスを用いた慢性膵炎、膵線維化および膵発癌実験

LRAT KO および対照の野生型マウスを用いて、下記動物モデルにおける膵疾患の発症につき解析し比較検討する。

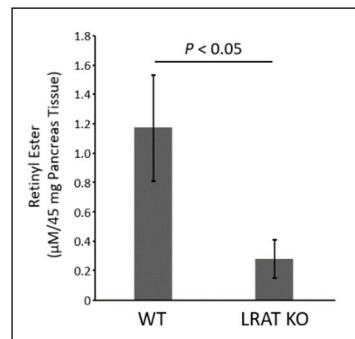
- a) セルレイン投与による膵線維化モデル
コレシストキニンアゴニストであるセルレインの反復投与を行い、膵炎および膵線維化を誘導する。
- b) アルコール給餌によるアルコール性膵炎モデル
アルコール飼料 (Lieber-DeCarli diet) の給餌により膵炎を誘導する。

- c) 膵管上皮 Kras 遺伝子変異による膵発癌モデル
膵管上皮に Kras 遺伝子変異を有するマウス (Pdx1-Cre:LSL-KrasG12D および Pdx1-Cre:LSL-KrasG12D:p16^{-/-}) を用いて、LRAT の有無による違いを比較する。Kras 遺伝子変異マウスはそれぞれ、6 ヶ月および3 ヶ月程度で膵腫瘍が発生するため、前者は早期膵癌 (pancreatic intraepithelial neoplasia, PanIN)、後者は進行膵癌のモデルとして使用する。

4. 研究成果

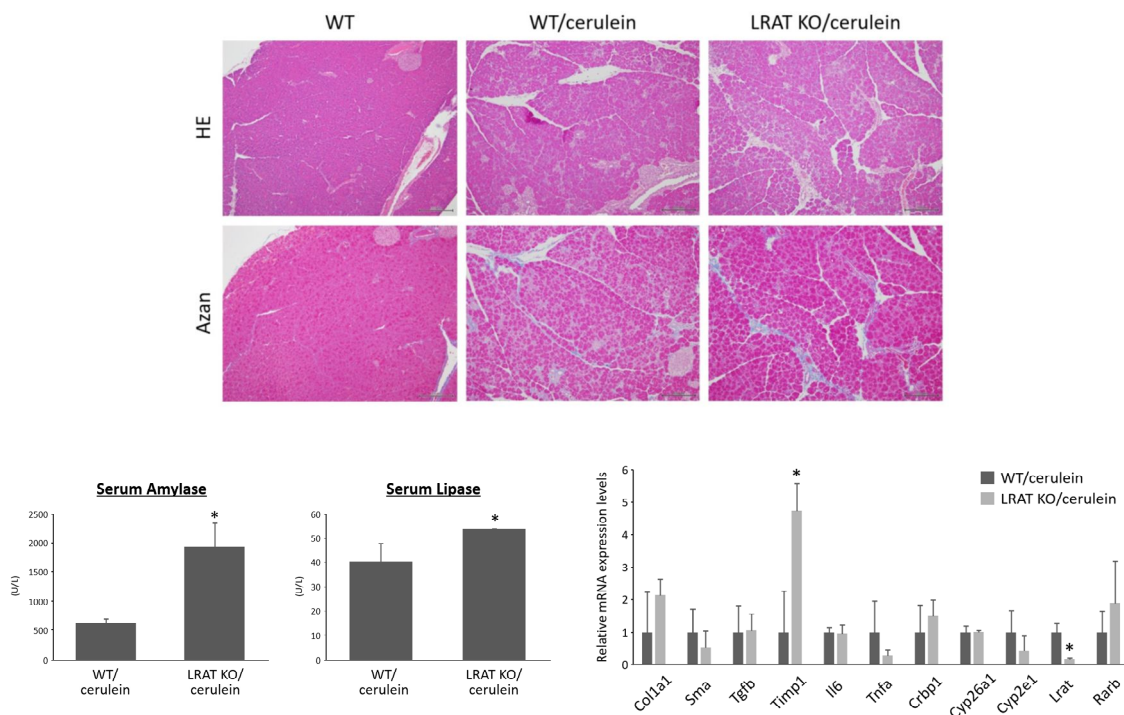
> レチニルエステル合成酵素 (LRAT) 欠損マウスの膵臓の解析

6 週齢の LRAT 欠損マウスおよび対照マウスを解剖して膵組織を得た。HPLC による解析で、LRAT 欠損マウスは野生型マウスに比べ膵貯蔵レチノイド量が有意に少なかった (右図)。この結果は、LRAT 欠損マウスの膵星細胞に貯蔵されているレチノイドが肝星細胞の貯蔵レチノイドと同様に減少していることを示しており、この遺伝子改変マウスが、膵貯蔵レチノイド量が減少した動物モデルとして有用であることを示唆している。



> LRAT 欠損マウスを用いた慢性膵炎・膵線維化および膵発癌実験

LRAT 欠損マウスおよび野生型マウスに対してセルレインの反復投与を行い、膵炎および膵線維化を誘導した。セルレイン非投与群と比較して、投与群では膵腺房細胞が萎縮、脱落し、化成組織や線維組織に置換されており、慢性膵炎および膵線維化の病理組織像を呈していた (下図)。セルレイン投与群での比較において、血清の解析ではアミラーゼおよびリパーゼは LRAT 欠損マウスで有意に高値であった。膵組織像の比較では、LRAT 欠損マウスにおいて膵炎および膵線維化が増悪していたほか、膵組織の mRNA 発現を比較したところ、線維化マーカーである *Timp1* 発現が高値であった。このことから、膵貯蔵レチノイドの減少によって、慢性膵炎および膵線維化が増悪することが示唆された。



(まとめ)

本研究結果は、膵貯蔵レチノイドが慢性膵炎および膵線維化を抑制する可能性を示しており、膵星細胞へのレチノイド補充もしくは脂肪滴喪失の抑制による、慢性膵炎・膵線維化および膵癌に対する治療法の開発につながると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Takada J, Araki H, Ozawa N, Sugiyama T, Kubota M, Ibuka T, Shimizu M.	4. 巻 50
2. 論文標題 Effective Treatment of Cytotoxic Agent Refractory Alpha-Fetoprotein-Producing Gastric Cancer with Ramucirumab: a Case Report and Review of the Literature.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Gastrointest Cancer.	6. 最初と最後の頁 556-559
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12029-017-0043-6.	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 Takada J, Araki H, Mizutani T, Ozawa N, Sugiyama T, Kubota M, Ibuka T, Shimizu M.	4. 巻 37
2. 論文標題 Safety of Carbon Dioxide Insufflation during Endoscopic Submucosal Dissection for Esophageal Squamous Cell Carcinoma.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Dig Dis.	6. 最初と最後の頁 93-99
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000492870.	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 Shirakami Yohei, Nakanishi Takayuki, Ozawa Noritaka, Ideta Takayasu, Kochi Takahiro, Kubota Masaya, Sakai Hiroyasu, Ibuka Takashi, Tanaka Takuji, Shimizu Masahito	4. 巻 16
2. 論文標題 Inhibitory effects of a selective prostaglandin E2 receptor antagonist RQ-15986 on inflammation-related colon tumorigenesis in APC-mutant rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0251942
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0251942	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 Arao Masamichi, Mizutani Taku, Ozawa Noritaka, Hanai Tatsunori, Takada Jun, Kubota Masaya, Imai Kenji, Ibuka Takashi, Shiraki Makoto, Araki Hiroshi, Ishihara Takuma, Shimizu Masahito	4. 巻 39
2. 論文標題 Skeletal Muscle Depletion: A Risk Factor for Pneumonia following Gastric Endoscopic Submucosal Dissection in Elderly Patients	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Digestive Diseases	6. 最初と最後の頁 435 ~ 443
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000514275	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 Ozawa Noritaka, Yamazaki Kenji, Kushima Ryoji	4. 巻 33
2. 論文標題 Graft versus host disease like reactions in the gastrointestinal tract in a patient with SARS CoV 2 infection	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Digestive Endoscopy	6. 最初と最後の頁 876 ~ 877
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/den.13994	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 -

〔学会発表〕 計6件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------