

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590802

研究課題名（和文）アルコール性膵炎の病態解明とその革新的予防法の開発

研究課題名（英文）Elucidation of the pathogenesis of alcoholic pancreatitis and development of its prevention

研究代表者

佐藤 晃彦（SATO AKIHIKO）

東北大学・大学院医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：70312569

研究成果の概要（和文）：

ラット遊離膵腺房細胞において、Thapsigargin または tunicamycin による小胞体ストレス負荷に対して、小胞体シャペロン Binding Protein の発現や、PERK とその下流で働く eukaryotic initiation factor 2、さらに小胞体ストレスにおけるアポトーシスに役割を担う転写因子 CHOP が活性化された。膵炎時における小胞体ストレス負荷に対して unfold protein response シグナルが活性化することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Recent studies have suggested a role of endoplasmic reticulum (ER) stress in a variety of diseases. We here examined the activation of unfold protein response (UPR) in response to ER stresses. We showed that, in response to thapsigargin and tunicamycin, the expression of the binding protein (BiP) and the activation of protein kinase RNA-like ER kinase, eukaryotic initiation factor 2, and apoptosis-related transcription factor CHOP in isolated rat pancreatic acini.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：膵炎、アルコール、線維化、シグナル伝達、小胞体ストレス、遺伝子多型、CD14、Toll-like receptor

1. 研究開始当初の背景

急性膵炎は膵酵素の病的活性化による自己消化と炎症応答を本態とする。特に重症膵炎は致命率の高い難病であり、厚生労働省の特定疾患に指定されている。一方、慢性膵炎は反復する腹痛とともに進行性の組織破壊による膵内外分泌障害を引き起こす、やはり難治性の疾患である。両疾患に共通して、アルコールが最も重要な成因であるが、アルコールがいかなる機序により膵炎を惹起するのかが未解明のために、アルコール性膵炎に対する本質的予防手段は未だ確立されていない。

膵炎発症の場と想定される膵腺房細胞は、生体中で最も蛋白合成の盛んな細胞のひとつであり、小胞体が著しく発達している。小胞体は細胞内カルシウムの貯蔵、脂質や蛋白質合成の他、蛋白質プロセッシングに関与する細胞小器官である。翻訳合成された蛋白質は、小胞体に存在する多種多様な分子シャペロンやフォールディング酵素によって折り畳まれて高次構造を形成し、蛋白としての機能を獲得する。環境的・遺伝的な要因により折り畳み・分解機構が低下したり、処理能力を超える蛋白質が発現した場合、あるいは異常蛋白が発現した場合など、いわゆる小胞体ストレスが生じる状況では、unfoldedな蛋白質が蓄積することとなり、対抗して生体は直ちに防御システム (unfolded protein response: UPR) を作動させる。最近の研究の展開により、UPRの結果誘導されるアポトーシス細胞死やUPRで処理できない異常蛋白の蓄積が、アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患や糖尿病、躁鬱病、炎症など様々な疾患の原因として病態に深く関与していることが明らかになってきた。膵腺房細胞における小胞体の高度な発達、小胞体ストレスが膵炎発症に関与することを示唆する。

一方、膵炎発症の第一段階は、膵腺房細胞内でのトリプシノーゲンの異所性活性化であると考えられている。生体内には異所性のトリプシノーゲン活性化、さらに活性化したトリプシンを介して他の消化酵素が活性化することによる自己消化から膵臓を守るための防御機構が存在している。第1の防御機構は膵分泌性トリプシンインヒビター (PSTI, SPINK1) がトリプシンと結合してその活性を抑制することである。第2の防御機構は、トリプシン自身やキモトリプシンCといったプロテアーゼが、トリプシンやトリプシノーゲンを分解 (自己分解) して不活化することである。これらトリプシンに関連する遺伝子解析研究が、膵炎の病態解明にも重要な手がかりを与えている。すなわち遺伝子異常により、トリプシンの活性化が亢進・持続する、あるいはトリプシンに対する防御機構が

減弱し、トリプシンと自己防御機構とのバランスが崩れた結果、自己消化すなわち膵炎が起こるという考え方である。大酒家のうちで膵炎を発症するのは数%にすぎないことは、膵炎を起こしやすい体質、すなわち遺伝子多型の存在を強く示唆する。しかし、膵炎の重症化や再発に関与する遺伝子多型はほとんど明らかではない。

2. 研究の目的

小胞体ストレス刺激により膵腺房細胞内で小胞体シグナルセンサー系の活性化が起こることを明らかにすること。あわせて、アルコール性膵炎を含めた膵炎患者における遺伝子多型と膵炎発症、重症化との関連を明らかにすること。

3. 研究の方法

Wistar 系雄性ラットから膵遊離腺房を分離した。薬剤性小胞体ストレスとして作用する、小胞体カルシウム ATPase 阻害剤 thapsigargin または蛋白質糖鎖負荷阻害剤 tunicamycin により膵腺房細胞を刺激した。小胞体シャペロン Binding Protein (BiP) の発現の変化を Western blotting により検討した。小胞体ストレスセンサーのひとつである PERK とその下流で働く eukaryotic initiation factor 2 (eIF2) の活性化を、抗リン酸化抗体を用いた Western blotting により検討した。また、小胞体ストレスにおけるアポトーシスに役割を担う転写因子 CHOP の発現の変化を Western blotting にて検討した。

一方、東北大学病院ならびに関連病院を受療した急性および慢性膵炎患者について、書面によるインフォームドコンセントのうえに採血を行い、ゲノム DNA を抽出した。病原体認識に関与する Toll-like receptor/CD14 遺伝子、膵分泌性トリプシンインヒビター (SPINK1) 遺伝子 p.N34S 多型ならびに IVS3+2T>C 多型、カチオニックトリプシノーゲン (PRSS1) 遺伝子 p.R122H 変異、p.N29I 変異ならびに p.A16V 変異、アニオニックトリプシノーゲン (PRSS2) 遺伝子 p.G191R 多型、メゾトリプシノーゲン (PRSS3) 遺伝子 p.E32del 多型の頻度について、健常対照群と比較した。症例は単発の発作のみの症例と、複数回発作を繰り返す再発性の症例とわけても比較検討をした。

4. 研究成果

(1) 遊離膵腺房における小胞体ストレス応答性

Thapsigargin または tunicamycin により膵腺房細胞を刺激した。小胞体シャペロン Binding Protein (BiP) の発現や、小胞体ストレスセンサーのひとつである PERK

とその下流で働く eukaryotic initiation factor 2 (eIF2)、さらに小胞体ストレスにおけるアポトーシスに役割を担う転写因子 CHOP が活性化された。これらの検討より膵腺房細胞において、小胞体ストレス負荷に対して UPR シグナルが活性化することが示唆された。

(2) 急性膵炎発症・重症化に関連する遺伝子多型の検討

解析した 346 例の急性膵炎患者における検討では、CD14 遺伝子-260C/T 多型は、アレル頻度、ゲノタイプ頻度とも健常群、急性膵炎群で差を認めなかった。健常者と軽症、重症患者間でも差を認めなかった。一方、-651C/T 多型も、アレル頻度、ゲノタイプ頻度とも健常群、急性膵炎群で差を認めなかった。急性膵炎の成因別の検討でも関連を認めなかった。しかし、重症度別の解析では、C アレル頻度、また CC ゲノタイプ頻度が、重症膵炎群において有意に高頻度であり、CT ゲノタイプは低頻度であった。-651/CC ゲノタイプの患者と CT、TT ゲノタイプの患者間で、臨床経過を比較すると、重症者、最大 CRP 値、仮性嚢胞形成、感染、特にグラム陰性菌感染、膵炎手術が、CC ゲノタイプで有意に高頻度であった。特に、仮性嚢胞形成、膵炎手術例は交絡因子の存在を考慮した Bonferroni 補正後でも、有意に高頻度であった。さらに、重症急性膵炎患者のみの比較でも、仮性嚢胞形成、グラム陰性菌感染の頻度に有意差を認めた。一方、慢性膵炎患者ならびに膵腫瘍患者における-260C/T、ならびに-651C/T 多型頻度は健常群と差を認めなかった。なお、TLR4 遺伝子 D299G、および T399I 多型は健常者群、患者群のいずれにおいても認めず、本邦では稀な多型と考えられた。

(3) 再発性急性膵炎発症に関わる遺伝子異常の検討

急性膵炎患者 261 例を対象とした検討では、SPINK1 遺伝子の p.N34S 多型が急性膵炎患者において、有意に高頻度であったほかは、PRSS1 遺伝子の p.R122H 変異、SPINK1 遺伝子の IVS3+2T>C 多型、PRSS2 遺伝子の p.G191R 多型そして PRSS3 遺伝子の p.E32del 多型の頻度に差を認めなかった。ところが、急性膵炎患者を初発の症例と再発性の症例に分けて検討したところ、SPINK1 遺伝子の p.N34S 多型の頻度は、初発の急性膵炎では健常対照群と比べて決して高くないが、再発性膵炎では高頻度であることが判明した。再発性膵炎の患者は、単発の膵炎患者に比べて、より若年で胆石性が少なく、アルコール性が多いという特徴がみられた。SPINK1 遺伝子 p.N34S 多型と同様に PRSS1 遺伝子の p.R122H 変異および PRSS3 遺伝子の E32de 多型の頻度も、再

発性膵炎においてのみ高いことが明らかとなった。再発性急性膵炎と慢性膵炎患者における遺伝子多型プロファイルの類似は、トリプシン関連遺伝子異常を有する場合、膵炎発作は単発で終わらずに再発し、最終的には慢性膵炎に移行するという考え方を支持する。

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 12 件)

1. Masamune A, Ariga H, Kume K, Kakuta Y, Satoh K, Satoh A, Shimosegawa T. Genetic background is different between sentinel and recurrent acute pancreatitis. J Gastroenterol Hepatol. 2011, in press (査読有)
2. Kikuta K, Masamune A, Watanabe T, Ariga H, Itoh H, Hamada S, Satoh K, Egawa S, Unno M, Shimosegawa T. Pancreatic stellate cells promote epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells. Biochem Biophys Res Commun. 2010;403:380-384. (査読有)
3. Masamune A, Watanabe T, Kikuta K, Satoh K, Kanno A, Shimosegawa T. Nuclear expression of interleukin-33 in pancreatic stellate cells. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2010;299:G821-832. (査読有)
4. Masamune A, Kume K, Kikuta K, Watanabe T, Hirota M, Satoh K, Kanno A, Suzuki N, Kakuta Y, Shimosegawa T. -651C/T promoter polymorphism in the CD14 gene is associated with severity of acute pancreatitis in Japan. J Gastroenterol. 2010;45:225-233. (査読有)
5. Masamune A, Satoh A, Watanabe T, Kikuta K, Satoh M, Suzuki N, Satoh K, Shimosegawa T. Effects of ethanol and its metabolites on human pancreatic stellate cells. Dig Dis Sci. 2010;55:204-211. (査読有)
6. Masamune A, Watanabe T, Kikuta K, Shimosegawa T. Roles of pancreatic stellate cells in pancreatic inflammation and fibrosis. Clin Gastroenterol Hepatol. 2009;7:S48-54. (査読有)
7. Watanabe T, Masamune A, Kikuta K, Hirota M, Kume K, Satoh K, Shimosegawa T. Bone marrow contributes to the population of pancreatic stellate cells in mice. Am J Physiol

- Gastrointest Liver Physiol. 2009;297:G1138-1146. (査読有)
8. Masamune A, Shimosegawa T. Signal transduction in pancreatic stellate cells. J Gastroenterol. 2009;44:249-260. (査読有)
 9. Masamune A, Kikuta K, Watanabe T, Satoh K, Hirota M, Hamada S, Shimosegawa T. Fibrinogen induces cytokine and collagen production in pancreatic stellate cells. Gut 2009;58:550-559. (査読有)
 10. Kume K, Masamune A, Takagi Y, Kikuta K, Watanabe T, Satoh K, Satoh A, Hirota M, Hamada S, Shimosegawa T. A loss-of-function p.G191R variant in the anionic trypsinogen (PRSS2) gene in Japanese patients with pancreatic disorders. Gut 2009;58:820-824. (査読有)
 11. Suzuki N, Masamune A, Kikuta K, Watanabe T, Satoh K, Shimosegawa T. Ellagic acid inhibits pancreatic fibrosis in male Wistar Bonn/Kobori rats. Dig Dis Sci. 2009;54:802-810. (査読有)
 12. 正宗 淳、下瀬川徹. アルコールと膵炎-酒を飲みすぎると膵炎になるか? 別刷 医学のあゆみ-アルコール医学・医療の最前線: 85-90, 2008. (査読無)

[学会発表] (計 10 件)

1. Masamune A, Kikuta K, Watanabe T, Shimosegawa T. Hedgehog signaling pathway mediates activation of pancreatic stellate cells. United European Gastroenterology Week. 26 October 2010, Barcelona, Spain.
2. 正宗 淳、下瀬川徹. Toll-like receptor/CD14 遺伝子多型は急性膵炎の重症化に関連する. DDW-Japan 2009. 2009年10月14日. 京都.
3. 佐藤晃彦、廣田衛久、下瀬川徹. 急性膵炎患者における全身性免疫応答反応の解析. DDW-Japan 2009. 2009年10月14日. 京都.
4. 菊田和宏、正宗 淳、渡辺 崇、下瀬川徹. Advanced glycation end-products は膵星細胞の増殖を促進する. 第 40 回日本消化器病学会総会. 2009年7月31日. 東京.
5. Masamune A, Shimosegawa T. Roles of pancreatic stellate cells in pancreatic fibrosis and inflammation. AGA-JSGE Joint Meeting. 7 May 2009, Sapporo.
6. 菊田和宏、正宗 淳、下瀬川徹. Advanced

- glycation end-products は膵星細胞の増殖と MCP-1 産生を誘導する. 第 95 回日本消化器病学会総会. 2009年5月7日. 札幌.
7. 正宗 淳. 膵線維化の分子機序-最新の知見-. 第 4 回新都心消化器カンファレンス. 2009年4月7日. 東京.
 8. 正宗 淳. 膵星細胞からみた膵線維化の分子機序. DDW-Japan 2008. 2008年10月1日. 東京.
 9. 正宗 淳、菊田和宏、渡辺 崇、佐藤賢一、下瀬川徹. フィブリノゲンはヒト膵星細胞におけるサイトカインとコラーゲン産生を誘導する. DDW-Japan 2008. 2008年10月1日. 東京.
 10. 糸 潔、正宗 淳、下瀬川徹. 膵炎関連遺伝子変異である SPINK1 遺伝子変異は膵癌の危険因子か? DDW-Japan 2008. 2008年10月1日. 東京.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:
 発明者:
 権利者:
 種類:
 番号:
 出願年月日:
 国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:
 発明者:
 権利者:
 種類:
 番号:
 取得年月日:
 国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 晃彦 (SATO AKIHIKO)
 東北大学・大学院医学系研究科・非常勤講師
 研究者番号: 70312569

(2) 研究分担者

正宗 淳 (MASAMUNE ATSUSHI)
 東北大学・病院・助教
 研究者番号: 90312579

条 潔 (KUME KIYOSHI)
東北大学・大学院医学系研究科・非常勤講
師
研究者番号：30431563

(3) 連携研究者
()

研究者番号：