

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08330

研究課題名(和文) TNF- $\alpha$  上昇が慢性膵炎病態形成に与える影響の解明研究課題名(英文) The effect of elevated TNF- $\alpha$  on the pathogenesis of chronic pancreatitis

研究代表者

重川 稔 (Shigekawa, Minoru)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：00625436

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)：膵特異的Atg7欠損マウスは10週齢で膵腺房細胞脱落や線維化を伴う慢性膵炎像を呈していることが確認された。同胞との比較ではAtg7欠損マウスの血清TNF- $\alpha$  や膵組織mRNA発現に差はなかった。5、16、22、48週齢で同様の検討を行い、両群間で膵組織像や膵重量体重比に差を認めるものの、TNF発現に差は認められなかった。全身性TNF欠損マウスとAtg7欠損マウスを交配し、10週齢、16週齢においてAtg7欠損マウスとAtg7欠損TNF欠損マウスを比較したが、両群に組織像、膵重量体重比に差は認められなかった。今回検討したモデルマウスでは、慢性膵炎の病態形成におけるTNF- $\alpha$  の関与は否定的と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TNF- $\alpha$  はアポトーシスやネクロシスを誘導し細胞死機構のバランス制御、炎症や組織修復再生において重要な役割を果たしている分子である。実臨床においてTNF- $\alpha$  阻害薬や抗TNF- $\alpha$  抗体が抗炎症作用を示す一方で、組織修復再生には促進的に働くことが報告されている。慢性膵炎において細胞死機構の全貌は明らかではなく、細胞死機構の制御にTNF- $\alpha$  がいかに関与するかは明らかではない。本研究ではヒトの慢性膵炎と似た病態を呈する膵特異的オートファジー関連蛋白欠損マウスを用いてTNF- $\alpha$  の関与の検討を行ったが、本モデルマウスの病態形成におけるTNF- $\alpha$  の関与は否定され、他の慢性膵炎モデルマウスの検討が必要である。

研究成果の概要(英文)：Pancreas-specific Atg7-deficient mice (P-Atg7 KO mice) at 10 weeks of age were found to have chronic pancreatitis histology with spontaneous loss of pancreatic acinar cells and fibrosis. Compared to their littermates, P-Atg7 KO mice showed no significant changes in serum TNF- $\alpha$  levels or pancreatic tissue mRNA expression. Five-, 16-, 22-, and 48-week-old mice were examined in the same way, and there were no differences in TNF expression between P-Atg7 KO mice and littermates, although differences were observed in pancreas histology and pancreas weight/body weight ratio. We mated systemic TNF-deficient mice with P-Atg7 KO mice (P-Atg7-TNF DKO mice) and compared P-Atg7 KO mice with P-Atg7-TNF DKO mice at 10 and 16 weeks of age and found no differences in histology or pancreatic weight/body weight ratio between the two groups. In the chronic pancreatitis mouse model examined in this study, the involvement of TNF- $\alpha$  in the pathogenesis of chronic pancreatitis was considered negative.

研究分野：膵炎

キーワード：TNF- $\alpha$  慢性膵炎 オートファジー ノックアウトマウス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

慢性膵炎は膵組織の持続的な膵腺房細胞の細胞死と炎症、線維化を主体とした疾患であり、長期的に不可逆的な膵内外分泌不全に至る。慢性膵炎患者の血清では炎症性サイトカインである TNF- の上昇が報告されている<sup>1</sup>。TNF- はアポトーシスやネクロシスを誘導し細胞死機構の制御、炎症や組織修復再生において重要な役割を果たしているサイトカインである。細胞死機構への TNF- の関与として caspase-8 を介した外因性アポトーシスを誘導する働きが報告されている一方で<sup>2</sup>、ネクローシスも誘導することが報告されており、細胞死機構のバランス調節に関与している。また TNF- は NFkB や STAT3 を介して肝再生を促すことや<sup>3</sup>、TNF- 受容体欠損マウスを用いた検討では p38 MAPK 活性化を介して骨格筋再生を促すこと<sup>4</sup>が報告されており、再生経路にも関与するサイトカインである。膵炎動物モデルを用いた実験において、TNF- の細胞死機構への関与が示唆されている。TNF- 欠損マウスを用いたセルレイン急性膵炎モデルの検討や膵炎モデルマウスへの TNF- 中和抗体を投与した検討では、膵炎のトリガーとなるトリプシンの活性化の抑制および膵ネクローシスの抑制が認められ、急性膵炎像が改善したと報告されている<sup>5</sup>。その一方で、ネクローシスに関与する RIP3 を欠損したマウスに慢性膵炎を誘導するとアポトーシスが亢進し、慢性膵炎がより増悪したと報告されている<sup>6</sup>。また膵特異的オートファジー関連蛋白欠損マウスは 6 週齢頃から急性膵炎を呈し慢性化を経て糖尿病や消化障害を来すヒトの慢性膵炎と酷似した病態を呈することが報告されており<sup>7,8</sup>、申請者もオートファジーに関与する蛋白である Atg7 を膵特異的に欠損したマウスで急性膵炎の経過から 10 週齢で慢性膵炎を呈することを報告しているが<sup>9</sup>、膵特異的 Atg7 欠損マウスにおいて腺房細胞におけるアポトーシスの亢進を認めており、一定の見解は得られていないものの膵炎における TNF- の細胞死機構への関与が示唆される。関節リウマチ、炎症性腸疾患などの慢性炎症を主体とする様々な疾患において TNF- 阻害薬の有用性が示されているが<sup>10,11</sup>、慢性膵炎を伴った乾癬患者で TNF- 阻害薬が乾癬とともに慢性膵炎の病状も改善したと報告されており<sup>12</sup>、TNF- が慢性膵炎の治療ターゲットとなる可能性も示唆される。

これまでの報告から TNF- はアポトーシスとネクローシスのバランスを制御することで細胞死の誘導に深くかわり、修復再生経路に対しては保護的に働く可能性が考えられる。一方で、TNF- 阻害薬の慢性疾患に対する有用性からは TNF- が炎症制御の点において炎症波及を増悪させると考えられるが、慢性膵炎における TNF- 上昇の意義については十分に検討されていない。

### 2. 研究の目的

膵特異的オートファジー関連蛋白欠損マウスでは組織的には急性膵炎から慢性膵炎像を呈し、糖尿病や消化障害を認めることからヒトの慢性膵炎と似た病態を呈することが報告されている。本研究課題では慢性膵炎治療を念頭に置きながら、臨床に即した慢性膵炎モデルと全身性 TNF 欠損(TNF-/-)マウスを用いた検討を行い、TNF- が慢性膵炎の腺房細胞死機構、炎症細胞浸潤や再生修復にいかに関与するかを解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

膵特異的 Atg7 欠損マウス(Pdx1-Cre Atg7fl/fl:慢性膵炎マウス)を作成し、10 週齢を中心に複数の週齢で以下の項目について評価を行った。膵特異的 Atg7 欠損マウスと同腹仔の Atg7 野生型マウスから得られる血清を用いて ELISA で TNF- を測定し、膵組織を用いて RT-PCR で TNF- 発現を評価した。また膵組織検体の組織像やネクローシス(HE 染色)、TUNEL 染色、膵重量変化などを評価した。全身性 TNF 欠損(TNF-/-)マウスと膵特異的 Atg7 欠損マウス(Pdx1-Cre Atg7fl/fl)を交配させ、ダブルノックアウトマウス(Pdx1-Cre Atg7fl/fl TNF-/-:慢性膵炎 TNF 欠損マウス)を作製した。10 週齢および

16 週齢の慢性膵炎 TNF 欠損マウスと同腹コントロールマウスにおいて、膵組織検体の組織像やネクロシス(HE 染色)、膵重量変化などを評価した。膵肉眼所見、全体重/膵重量、膵組織所見を評価した。

8 週齢の野生型マウスに対して、セルレイン 50ug/kg/回を 1 日 2 回 14 日間腹腔内投与し、組織像、血清 TNF 値の評価を行った。

#### 4. 研究成果

Pdx1-Cre 発現下に Atg7 を欠損する膵特異的 Atg7 欠損マウス(Pdx1-Cre Atg7fl/fl)は 10 週齢で組織学的に膵腺房細胞の脱落、線維化を伴う慢性膵炎像を呈し、腺房細胞におけるアポトーシスの亢進を認めた。本マウスと同週齢のコントロールマウス(Pdx1-Cre マウス)を用いて、10 週齢、16 週齢、22 週齢、48 週齢時点における血清 TNF- $\alpha$  値と膵組織の TNF- $\alpha$  mRNA 発現を経時的に比較検討を行ったところ、10、16、22、48 週齢のいずれの時点においても両群間に差は認められなかった。早期の段階で膵炎の進行に TNF が関与している可能性を考慮し、5 週齢で膵組織像と血清 TNF- $\alpha$  値を両群間で評価した。Atg7 欠損マウスでは組織学的に急性膵炎に類似した膵浮腫像を呈し、膵酵素上昇も伴っていた。同週齢で膵に異常所見を呈さないコントロールマウスとの比較検討で、血清 TNF- $\alpha$  値に差はなかった。膵特異的 Atg7 欠損マウスの慢性膵炎形成過程における TNF- $\alpha$  の意義を検討するために、全身性 TNF 欠損(TNF- $\alpha$  /-)マウスと Pdx1-Cre Atg7fl/fl を交配し、TNF- $\alpha$  欠損の有無による膵組織像、体重、膵重量体重比の比較検討を行った。10 週齢、16 週齢いずれの週齢においても膵組織像、体重や膵重量体重比

について両群間で差はなかった(表 1)。今回検討した週齢では、本

表 1 16 週齢	体重,g (median)	膵重量,g (median)	膵重量 体重比
膵特異的 Atg7 欠損, n=10	22.44	0.131	0.0058
TNF 欠損 + 膵特異的 Atg7 欠損, N=9	23.56	0.133	0.0057

慢性膵炎モデルマウスの慢性膵炎の病態形成における TNF- $\alpha$  の関与は否定的であると考えられた。8 週齢の野生型マウスにセルレイン反復投与により慢性膵炎モデルマウスを作成し、10 週齢で慢性膵炎像が確認され、Vehicle 群と比較して TNF- $\alpha$  発現上昇が認められた。今後同マウスの慢性膵炎病態形成における TNF- $\alpha$  の関与を明らかにするために、全身性 TNF 欠損マウスを用いた検討の準備を進めている。

#### <参考文献>

1. Komar HM, et al. Pancreas. 2017; 46: 986-993.
2. Peter ME, Krammer PH. Cell Death Differ. 2003; 10: 26-35.
3. Fausto N. J Hepatol. 2000; 32: 19-31.
4. Chen SE, et al. Am J Physiol Cell Physiol. 2005; 289: C1179-87.
5. Sandler M, et al. Gut. 2013; 62: 430-9.
6. Zhou X, et al. Cell Death Dis. 2017; 8: e2918.
7. Diakopoulos KN, et al. Gastroenterology. 2015; 148: 626-638.e17.
8. Antonucci L, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015; 112: E6166-74.
9. Iwahashi K, et al. Biochem Biophys Res Commun. 2018; 503: 2576-2582.
10. Moelants EA, et al. Immunol Cell Biol. 2013; 91: 393-401.
11. Bantel H, et al. Inflamm Bowel Dis. 2013; 19: E51-2.
12. Clayton H, et al. Dermatology. 2013; 227: 193-6.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計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
研究分担者	小玉 尚宏  (Kodama Takahiro)  (10623275)	大阪大学・大学院医学系研究科・助教    (14401)	
研究分担者	巽 智秀  (Tatsumi Tomohide)  (20397699)	大阪大学・大学院医学系研究科・准教授    (14401)	
研究分担者	疋田 隼人  (Hikita Hayato)  (20623044)	大阪大学・大学院医学系研究科・講師    (14401)	

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