

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年3月26日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590872

研究課題名（和文）IRF2^{-/-}マウスの膵外分泌異常の解明-新しい膵炎治療のターゲットを求めて-研究課題名（英文）Clarification of the molecular mechanism in the defect of pancreatic exocytosis in IRF2^{-/-}mice- Searching for a new target of the treatment of acute pancreatitis -.

研究代表者

真嶋 浩聡（MASHIMA HIROSATO）

秋田大学・医学部・講師

研究者番号：10261869

研究成果の概要（和文）：*Irf2*^{-/-}マウスに見られる膵臓の異常は、調節性外分泌の障害が原因であった。その結果、酵素顆粒が細胞内に充満し、軽度の膵炎が進行していた。しかし、IRF2は酵素顆粒と細胞膜の結合・癒合に関わる SNARE 蛋白質を直接的には制御しておらず、急性膵炎発症のメカニズムの解明のために、IRF2 の標的分子の同定、分子メカニズムの解明が重要である。

研究成果の概要（英文）：The alteration in the pancreas of IRF2 knock-out mice resulted from the defect of regulated exocytosis. Zymogen granules accumulated throughout the cytoplasm and mild acute pancreatitis was proceeding in the acinar cells of *Irf2*^{-/-} pancreas. However, IRF2 did not regulate the SNARE proteins directly, which plays a pivotal role in the dock and fusion between zymogen granules and apical plasma membrane. So, it is urgently needed to clarify the target gene of IRF2 and molecular mechanisms regulating the pancreatic exocytosis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
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：胆道学、膵臓学

1. 研究開始当初の背景

インターフェロン（IFN）は抗ウイルス作用の他に、細胞増殖抑制作用や免疫調節作用など極めて多様な生物活性をもち、I型（IFN- α/β ）とII型（IFN- γ ）の二つに大別される。I型IFNはウイルス感染時にほとんど全

ての細胞種から産生されて抗ウイルス状態を誘導するほか、自然免疫及び獲得免疫に関与するサイトカインである。II型IFNは主に免疫細胞、特にT細胞やNK細胞より産生され、免疫調節性サイトカインとして働く。これらのIFN系の遺伝子の転写を制御する遺伝

子として IFN 制御因子 (Interferon Regulatory Factor (IRF))が発見され、現在 9 種の遺伝子からなるファミリーを形成している (IRF-1~9)。遺伝子欠損マウスの解析から IRF は IFN 系に限らず種々の免疫関連遺伝子の転写調節、細胞増殖・アポトーシスの制御、癌化等に密接に関与することが明らかになってきた。

IRF-1 及び 2 は同じ DNA 配列を認識して結合し、主に IRF-1 は転写活性化因子、IRF-2 は転写抑制因子として作用するが、対象遺伝子によっては逆の作用を示し、単純ではない。I 型 IFN の機能を解析するために、1993 年 *Irf1*^{-/-}、*Irf2*^{-/-} マウスが作成された (Matsuyama T et al. Cell, 75, 83-97, 1993)。

Irf2^{-/-} マウスでは白血球、血小板が減少し、骨髄でのさまざまな血球前駆体細胞の減少がみられ、造血系細胞の分化・増殖に IRF-2 が関与していることが示された。その他に、生後数週齢からの脱毛、表皮の肥厚をとともなう皮膚炎症が認められ、IFN 応答性の異常と CD8+T 細胞に依存した病態であることが明らかにされた。また、クリーム色でやや光沢がある *Irf2*^{+/+}、*Irf2*^{-/-} マウスの膵臓と比較して、*Irf2*^{-/-} マウスの膵臓は白色で光沢がなく、一見して異常な色調を呈していたが、その異常が何に由来するのかはまだ解明されていなかった。

2. 研究の目的

そこで、我々はまず手始めとして、*Irf2*^{-/-} マウスの膵組織を HE 染色と電子顕微鏡を用いて観察した。膵臓は内胚葉性上皮由来の臓器であり、消化酵素を分泌する外分泌細胞、膵ホルモンを分泌する内分泌細胞、導管系上皮細胞からなる膵管組織から構成されているが、外分泌細胞がその大部分を占め、腺房という特徴的な形態をとっている。その腺房細胞に HE 染色において異常が認められた。通常、腺房細胞の頂端側には多数の酵素顆粒が赤色に、基底側には小胞体が紫色に染色されるが、*Irf2*^{-/-} マウスでは、核を除いた細胞質全体が赤色に染色された (図 1)。電子顕微鏡で観察すると通常よりも小型の酵素顆粒が細胞質全体に密に広がっている像が観察された (図 2)。また、通常では、頂端側

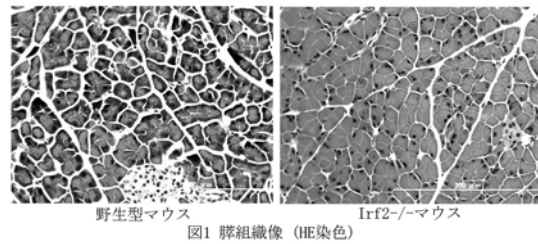


図1 膵組織像 (HE染色)

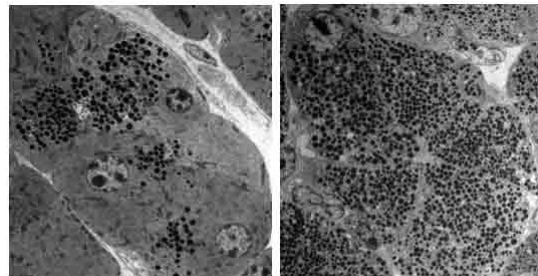


図2 膵腺房細胞の電子顕微鏡像

の管腔から酵素顆粒が分泌される像が見られるが、その像が全く見られず、*Irf2*^{-/-} マウスでは酵素顆粒の分泌が障害されており、そのため細胞質全体に酵素顆粒が蓄積しているものと考えられた。そこで、この分泌障害の原因が何かを解明することを本研究のテーマとした。細胞内小胞が分泌される時、小胞が①分泌されるべき細胞膜に正しく輸送される、②細胞膜に接着・癒合する、③内容物の分泌、④分泌後小胞としてリサイクルされる、ことが重要である。②は SNARE 蛋白質およびその関連分子によって調節されており、小胞上に存在する v-SNARE (vesicle-associated membrane protein (VAMP)) と目標となる膜上に存在する t-SNARE (syntaxin (STX), SNAP) が結合することによって、反応が進行する。今回の *Irf2*^{-/-} マウスの外分泌異常は HE 染色、電子顕微鏡観察の結果から考えると②のステップの障害の可能性が高い。実際、SNARE 蛋白質の一つである VAMP8 ノックアウトマウスでも、*Irf2*^{-/-} マウスマウスの膵臓と類似した膵外分泌の異常が報告されている (Wang CC et al. Developmental Cell, 7, 359-371, 2004)。

膵炎は膵外分泌の異常により蛋白分解酵素が過剰にそして異所性に活性化され、急性または慢性的に自己消化が起こることにより惹起される。原因として、アルコールや胆石の陥頓、高脂血症等が挙げられ、遺伝性も認められるが、原因不明な場合も多く、また内視鏡的な検査 (内視鏡的逆行性膵胆管造影

(ERCP) や治療の偶発症としても生ずる。治療として蛋白分解酵素阻害薬が使用されるが、その他に有効な薬剤が少ないのが現状である。*Irf2*^{-/-}マウスに見られる膵外分泌異常の原因を解明し、膵外分泌の抑制を可逆的に行うことができれば、急性・慢性膵炎の治療及び予防の新たな手段となりうる。我々のもつ膵臓・外分泌・SNARE 蛋白質に関する解析手段を駆使し、*Irf2*^{-/-}マウスの膵の異常を解明し、新たな膵炎治療のターゲットを同定することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

- (1) *Irf2*^{+/+}、*Irf2*^{+/-}、*Irf2*^{-/-}マウスの膵組織の詳細な比較検討(HE 染色、電子顕微鏡)。
- (2) SNARE 関連分子の発現量、局在の検討(ウエスタンブロット、免疫組織化学)。
- (3) 血清中の膵酵素量の比較(エラスターゼ1、アミラーゼ)。
- (4) 単離膵腺房細胞を用いた CCK-8 によるアミラーゼ分泌刺激実験。
- (5) *Irf2*^{+/+}マウスと *Irf2*^{-/-}マウスの膵におけるオートファジー、トリプシン活性の比較。
- (6) 膵外分泌 in vitro モデル細胞を用いた IRF2 の外分泌に及ぼす影響の検討。
- (7) *Irf2*^{-/-}*Ifnar1*^{-/-}マウスを用いた I 型 IFN シグナルの関与の検討。
- (8) 野生型マウス膵における急性膵炎発症時の IRF2 の発現の変化(ウエスタンブロット)。
- (9) cDNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現の変化の検討。
- (10) real-time PCR を用いた遺伝子発現の比較による候補遺伝子の絞り込み。

これらの動物実験はすべて、秋田大学バイオサイエンス安全委員会の承認を受け、秋田大学動物実験規程に基づき施行した。

4. 研究成果

- (1) (研究目的の項に記載) 消化酵素であるアミラーゼは唾液腺からも分泌されるが、*Irf2*^{-/-}マウスの唾液腺には形態学的異常はみられなかった。
- (2) 膵腺房細胞における酵素顆粒の分泌は、神経細胞などと同じく SNARE 関連分子によって制御されている。腺房細胞の頂端側には

STX2、Munc18b、側方基底側には STX4、Munc18c、酵素顆粒上には VAMP2、VAMP8、STX3、Munc18b が存在する。静止状態においては Munc18 が STX に結合して SNARE 複合体の形成を阻害している。分泌刺激により Munc18 が解離することによって STX が自由となり、二分子の SNAP23 及び VAMP と結合することによって、SNARE 複合体が形成され、酵素顆粒と細胞膜の結合・癒合が進行すると考えられている。*Irf2*^{-/-}マウスでは、頂端側の SNARE 蛋白が減少し、酵素顆粒上の SNARE 蛋白が増加していた。頂端側の SNARE 蛋白の染色性は、量的な減少と一致して低下していたが、局在に変化はなく、また腺房細胞の極性にも異常はみられなかった。

(3) *Irf2*^{-/-}マウスの血清中のアミラーゼ、エラスターゼ1は *Irf2*^{+/+}、*Irf2*^{+/-}マウスと比較して低下していた。

(4) *Irf2*^{+/+}、*Irf2*^{+/-}、*Irf2*^{-/-}マウス膵より腺房細胞を単離した後、コレシストキニン(10pM, 100pM CCK8)で刺激し、分泌されるアミラーゼ量を検討した。*Irf2*^{-/-}マウスの膵腺房細胞からはアミラーゼ分泌が全くみられなかった(図3)

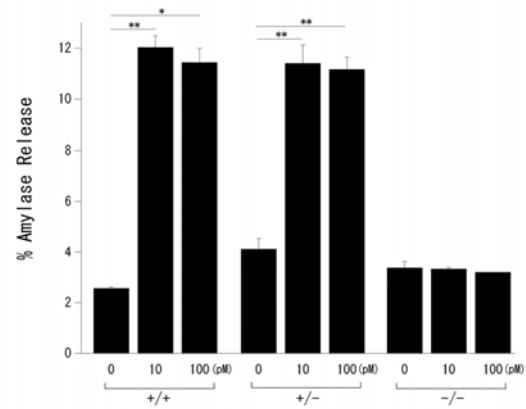


図3 単離膵腺房細胞のアミラーゼ分泌刺激実験
Irf2^{+/+}、*Irf2*^{+/-}、*Irf2*^{-/-}マウスから膵腺房細胞を単離し、CCK8で30分間刺激した時のアミラーゼ分泌量の比較検討。
*:P<.05, **:P<.01

(5) *Irf2*^{-/-}膵腺房細胞を電子顕微鏡で観察すると細胞内に多数の空胞が見られ、その中には電子密度の高い物質や渦巻き状の膜成分も認められた(図4A)。ウエスタンブロットでは微小管結合蛋白質 LC3 の膜結合型(LC3-II)が *Irf2*^{-/-}膵で増加しており、オートファジーが腺房内で進行していることが明らかとなった(図4B)。また、膵ホモジェネートを用いたトリプシン活性の比較でも、*Irf2*^{-/-}膵では

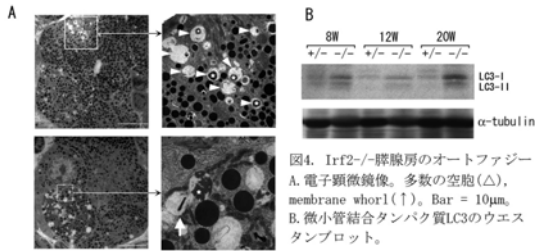


図4. *Irf2*^{-/-}膵腺房のオートファジー
A. 電子顕微鏡像。多数の空胞(Δ),
membrane whorl(↑)。Bar = 10μm。
B. 微小管結合タンパク質LC3のウエス
タンブロット。

トリプシン活性が亢進していた。HE染色標本からでは膵炎所見(浮腫、出血、好中球浸潤、壊死)は明らかではないが、*Irf2*^{-/-}膵腺房内で軽度の膵炎が進行していることをこれらは示している。

(6) 膵外分泌モデルとしてラット膵外分泌細胞株 AR42J 細胞を使用し、*Irf2*^{-/-}マウスで認められる分泌異常が *in vitro* モデルでも再現されるかどうかを検討した。AR42J 細胞にレトロウイルスを用いて、IRF2 を過剰発現させた細胞(GFPirf2)、DNA 結合部位のみを過剰発現させたドミナントネガティブ細胞(GFPirf2dn)、コントロール細胞(GFPcont)を作成した。コレシストキニン(CCK8)、カルシウムイオノフォア(A23187)、cAMP アゴニスト(8Br-cAMP)で刺激して、そのアミラーゼ分泌を比較検討した(図5)。GFPirf2dn 細胞ではアミラーゼ分泌は抑制され、GFPirf2 細胞では亢進した。AR42J 細胞でも IRF2 の発現レベルに応じて *Irf2*^{-/-}マウスにみられる分泌異常が再現され、IRF2 が調節性外分泌に重要な役割を果たしていることが示された。

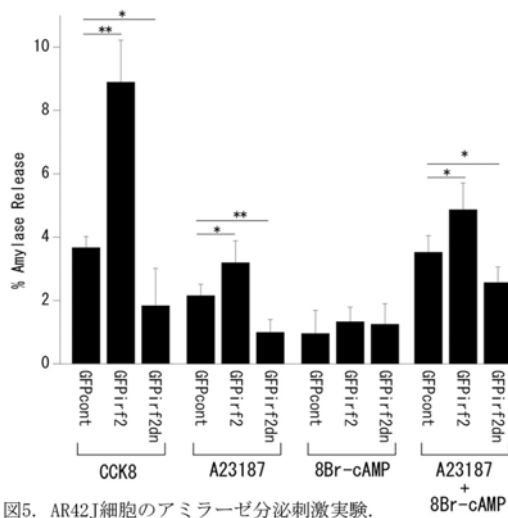


図5. AR42J細胞のアミラーゼ分泌刺激実験。
コントロール細胞(GFPcont)、IRF2過剰発現細胞(GFPirf2)、IRF2ドミナントネガティブ細胞(GFPirf2dn)を樹立し、100pM CCK8、5μM A23187、500μM 8Br-cAMPで15分間刺激した時の上清中に分泌されるアミラーゼ量を比較検討した。
*:P<.05, **:P<.01

(7) IRF2 は IFN 系の遺伝子の転写を負に制御する遺伝子であり、*Irf2*^{-/-}マウスでは I 型インターフェロンシグナルが常に亢進状態となっている。この過剰なインターフェロンシグナルの関与を調べるために、受容体を欠損したダブルノックアウトマウス *Irf2*^{-/-}*Ifnar1*^{-/-}マウスを作成し、その膵臓を検討した。このマウスの膵臓には *Irf2*^{-/-}マウスと同じ異常が見られたことから、過剰な I 型インターフェロンシグナルはその原因ではないことが明らかとなった。

(8) 野生型マウスにセルレイン膵炎を惹起し、IRF2 の発現の変化を検討した。膵炎発症時 IRF2 の発現低下が認められ(図6)、この発現低下はセルレイン初回注射後 1 時間でも認めたことから膵炎発症のごく初期の段階で IRF2 が関与している可能性が示唆された。

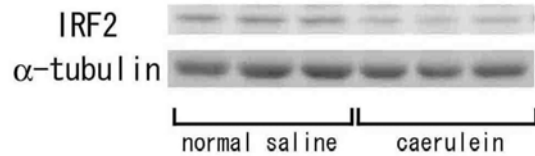


図6. セルレイン膵炎時のIRF2の発現の変化。

野生型マウスにセルレイン(50μg/kg)を1時間ごとに腹腔内に5回投与し、最終投与後1時間で膵臓を摘出し、ウエスタンブロットを行った。α-チューブリンを内部コントロールとした。*:P<.05

(9) *Irf2*^{-/-}、*Irf2*^{-/-}膵の遺伝子発現レベルの変化をマイクロアレイを用いて検討した。全膵および単離腺房における比較より、*Irf2*^{-/-}膵で発現が高度に変化する遺伝子群(亢進39個、低下7個)を同定した。

(10) (9)で抽出された遺伝子群の中に、急性膵炎の発症に関与する因子があるならば、急性膵炎時にも同様な発現変化を起こすと考えられる。野生型マウスにセルレイン急性膵炎を発症させ、その mRNA の変化を検討した。また、遺伝子操作を行った膵外分泌細胞株 AR42J 細胞(IRF2 過剰発現、IRF2 dominant-negative 発現)での発現変化も検討した。以上から絞り込みを行い、*Irf2*^{-/-}マウスに生じている調節性外分泌障害の原因遺伝子として、2 個の候補遺伝子を同定した。両者ともカルシウム結合蛋白であり、カルシウムシグナルに錯乱を起こさせ、分泌障害を生じているものと推察された。

本研究を通じて、我々は以下のことを明らかにした。*Irf2*^{-/-}マウスの膵臓では酵素顆粒の調節性外分泌が障害され、酵素顆粒が細胞内に蓄積する結果、*Irf2*^{-/-}膵腺房内ではオートファジー、トリプシンの活性化が惹起され、軽度の膵炎が進行していた。この異常は亢進した I 型 IFN シグナルが原因ではなく、IRF2 の特異的な機能障害が原因と考えられる。また唾液腺には異常を認めないことから膵外分泌特異的な異常である。急性膵炎実験モデルにおいて、膵炎発症早期に IRF2 の発現低下がみられることから、IRF2 は膵炎発症に重要な役割を果たしている可能性が示唆される。IRF2 は転写因子であり、SNARE 蛋白質を直接制御していると考えられるが、real-time PCR により、SNARE 関連遺伝子の発現レベルを検討したところ、ウエスタンブロットとは逆の発現変化がみられた(図 7)。

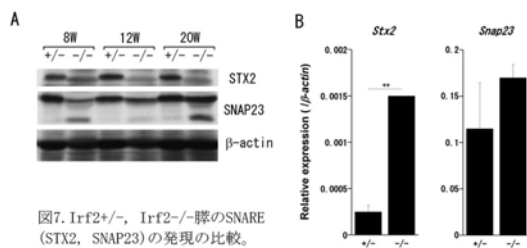


図7. *Irf2*^{+/+}, *Irf2*^{-/-}膵のSNARE (STX2, SNAP23)の発現の比較。

A. ウエスタンブロット

B. Real-time PCR (単離膵腺房細胞、平均±標準偏差、n=3、**：p<.01)

これは、SNARE 蛋白質が IRF2 の転写制御を直接受けていないことを示す。今後は、標的遺伝子の同定を含め、IRF2 が関与する膵外分泌機構の詳細な分子メカニズムの解明が必要である。また、その分子機構が急性膵炎発症にどのように関与しているのかを明らかにしてゆく。その先に急性膵炎の新たな治療法の開発のヒントや予防の可能性が見えてくる。

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 7 件)

- ① Mashima H, Sato T, Horie Y, Ohteki T, Ohnishi H. Interferon Regulatory Factor-2 Regulates Exocytosis in Mechanisms Mediated by SNAREs in Pancreatic Acinar Cells. *Gastroenterology*, 査読有, 2011; 141:1102-1113.

- ② 真嶋浩聡, 大西洋英 遺伝子改変マウスを用いた急性膵炎研究の現状と今後の展望 膵臓、査読有、in press
- ③ 真嶋浩聡, 大西洋英 膵外分泌における腺房細胞内情報伝達と分子メカニズム 胆と膵、査読無、2010; 31: 535-539
- ④ Shinozaki S, Mashima H, Ohnishi H, Sugano K. IL-13 promotes the proliferation of rat pancreatic stellate cells through the suppression of NF- κ B /TGF-1 pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 査読有, 2010; 393: 61-65.
- ⑤ Watanabe D, Miura K, Goto T, Nanjo H, Yamamoto Y, Ohnishi H. Solid Pseudopapillary Tumor of the Pancreas with Concomitant Pancreas Divisum. *Journal of Pancreas*, 査読有, 2010; 11: 45-48.
- ⑥ 真嶋浩聡, 大西洋英, 膵線維化とその治療戦略、成人病と生活習慣病、査読無、2010; 40: 35-39
- ⑦ Kamada K, Mashima H, Goto T, Ohnishi H. MCP-1 inhibits DNA synthesis in rat pancreatic stellate cells. *Akitaigaku*, 査読有, 2009; 36: 185-194.

[学会発表] (計 8 件)

- ① Mashima H, Sato T, Horie Y, Ohteki T, Ohnishi H. The pancreas of *Irf2*^{-/-} mice presented a very early feature of acute pancreatitis and a milder response in cerulein-induced pancreatitis. *American Gastroenterological Association (Digestive Disease Week) 2011.5.7, Chicago*
- ② 真嶋浩聡, 大西洋英. *Irf2*^{-/-}膵は急性膵炎早期のモデルであり、実験的膵炎に対しては耐性を示す。第42回日本膵臓学会大会 2011.7.30 青森
- ③ 真嶋浩聡, 大西洋英. 急性膵炎初期像を模倣するモデル動物IRF2 KOマウスにおける膵再生及び線維化の解析 第82回日本消化器内視鏡学会総会 (JDDW2011)

2011. 10. 21 福岡

- ④ 真嶋浩聡、大西洋英。IRF2は膵調節性外分泌に重要な役割を果たし、急性膵炎モデルIRF2K0マウスを用いて急性膵炎発症の分子メカニズムの解明を目指す。第19回浜名湖シンポジウム 2011. 12. 23 浜松
- ⑤ Mashima H, Sato T, Horie Y, Ohteki T, Ohnishi H. Interferon regulatory factor-2 plays a pivotal role in exocytosis in pancreatic acinar cells. American Gastroenterological Association (Digestive Disease Week) 2010. 5. 7 New Orleans
- ⑥ Mashima H, Sato T, Horie Y, Ohteki T, Ohnishi H. Interferon regulatory factor-2 plays a pivotal role in exocytosis in pancreatic acinar cells. Joint Meeting of the International Association of Pancreatology and the Japan Pancreas Society 2010. 7. 12, 福岡
- ⑦ 真嶋浩聡、堀江泰夫、大西洋英。IRF-2は膵腺房細胞の調節性外分泌機構に重要な役割を果たす-Irf2-/-膵：急性膵炎における膵外分泌異常のモデルとしての可能性-第52回日本消化器病学会大会(第18回JDDW) 2010. 10. 15 横浜
- ⑧ Mashima H, Yoshikumi Y, Ohnishi H. Up-regulation of JAM-1 in AR42J cells treated with activin A and betacellulin and the diabetic regenerating islets. The International Pancreatic Research Forum 2009, 2009. 7. 30-31, 東京

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

真嶋 浩聡 (MASHIMA HIROSATO)
秋田大学・医学部・講師
研究者番号：10261869

(2) 研究分担者

大西 洋英 (OHNISHI HIROHIDE)
秋田大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：00313023