

## 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 25 年 6 月 6 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590758

研究課題名（和文） インターロイキン10による膵線維化抑制に関する検討

研究課題名（英文） The effect of inhibition of pancreatic fibrosis by IL-10.

研究代表者

大原 弘隆（OHARA HIROTAKA）

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：80285212

研究成果の概要（和文）：炎症性サイトカインにより膵血管内皮細胞に MAdCAM-1 が発現し、その透過性が亢進した。IL-10 は MAdCAM-1 の発現を抑制し、リンパ球浸潤を抑制すると考えられた。マウスセルレイン膵炎では、IL-10 誘導薬剤により、膵重量増加および血清アミラーゼ値上昇が抑制され、膵炎抑制効果を有すると考えられた。今後、より効率に IL-10 を誘導する薬剤の開発が膵炎進展抑制に貢献する可能性があると考えられた。

研究成果の概要（英文）：Several inflammatory cytokines induced expression of MAdCAM-1 on the vascular endothelial cells of pancreas and increased permeability of endothelium. It was suggested that infiltration of lymphocytes were inhibited by IL-10 because IL-10 inhibited expression of MAdCAM-1. In cerulean-induced pancreatitis model of mice, IL-10-inducing drugs were considered effective against pancreatitis because the increasing of body weight and serum amylase levels of mice were inhibited by glatiramer acetate which induced expression of IL-10. Consequently, progression of IL-10-inducing drugs are contributable for the therapy of pancreatitis.

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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、慢性膵炎、インターロイキン10

## 1. 研究開始当初の背景

現在でも難治性疾患である膵炎治療に関する研究は、膵星細胞の線維化進展機構研究が中心に行われている。急性膵炎の初期には、臨床的に膵浮腫が生じることは明白であるが、その発症機序は不明である。一方、一般的にサイトカインにより血管内皮細胞で接

着因子が発現し、その結果、好中球やリンパ球の浸潤が起こり、臓器傷害が発症する。また各臓器の血管内皮細胞に、臓器特異的な接着因子の発現があり、その結果、異なる疾患が発症すると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究は、膵血管内皮細胞に焦点を当てた新たな膵炎治療の確立を目的とした。申請者の確立した膵血管内皮細胞を用いて、炎症性サイトカインによる血管透過性につき検討を行った。また抗炎症性サイトカインであるIL-10を加えることによる血管透過性の変化を検討した。

次に血管内皮細胞における炎症性サイトカインによる接着因子MAdCAM-1の発現を検討し、IL-10のその抑制効果につき検討を行った。さらにマウスセルレイン膵炎に対するIL-10誘導薬剤による膵炎抑制効果について検討した。現在、IL-10誘導薬剤として、酢酸グラチマラーが知られている。酢酸グラチマラーは分子量14000 - 23000のL-アラニン、L-リジン、L-チロシンから合成されたミエリン構成たんぱく類似物質で、多発性硬化症の治療薬であり、酢酸グラチマラーによるin vivoでの膵炎抑制効果を検討した。

### 3. 研究の方法

(1) 膵臓血管内皮細胞株(PMEC)を24 ウェル4CバイオコートインサートコラーゲンIに撒き、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IFN- $\gamma$ を各濃度で投与、3時間後の細胞間電気抵抗値(TER)を測定した。次に、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 投与時にIL-10(20ng/ml)を同時に投与し、3時間後のTERを測定した。

(2) 次に、PMECを使用し、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 刺激後、24時間、48時間、72時間におけるTERを測定した。

(3) 炎症性腸疾患における炎症を誘導する中心的役割をする接着因子であるMAdCAM-1の発現を検討した。炎症性サイトカイン(TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IFN- $\gamma$ )刺激後のMAdCAM-1発現の用量依存性や時間依存性をウエスタンブロット法で検討を行った。次に抗炎症性サイトカイン(IL-10)を同時投与および前投与(24時間)し、MAdCAM-1の発現を検討した。

(4) 20-22gマウスを用いてセルレイン(50 $\mu$ g/kg、1時間ごとに8回腹腔内投与)による膵炎を作成した。酢酸グラチマラーはセルレイン膵炎作成4日前より2.5mgを連日腹腔内投与、計5回投与した。今回①コントロール群、②生理食塩水前投与セルレイン膵炎群、③酢酸グラチマラー前投与セルレイン群の3群において、マウス重量、膵重量の測定、血清アミラーゼ値測定、膵炎の病理組織学的検討(浮腫、好中球浸潤、実質壊死のスコア化)を行った。

### 4. 研究成果

(1) 研究の主な成果

① TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 刺激後、TERの低下は3

時間後では有意差は認めなかったが、TER低下の傾向を認めた。TERの変化にTNF- $\alpha$ とIL-1 $\beta$ の濃度依存性は認めなかった。一方、IFN- $\gamma$ 刺激ではTER低下は認めなかった。次にIL-10同時投与ではTNF- $\alpha$ によるTER低下には影響を与えなかった。IL-1 $\beta$ およびIFN- $\gamma$ とIL-10の同時投与でも同様の結果であった。

② TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 刺激後、24時間後では有意なTERの低下を認めたが、48時間、72時間後では、逆に回復傾向を示した。一方、IL-1 $\beta$ 刺激では、72時間までTER低下が持続した。

③ TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 刺激後、12時間後でMAdCAM-1の発現を確認し、24時間後でプラトーになった。またMAdCAM-1は、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ の濃度に依存してその発現の増強を認めた。一方、IFN- $\gamma$ による刺激ではMAdCAM-1の発現は認めなかった。次にIL-10の同時投与ではMAdCAM-1の発現には影響を与えなかったが、IL-10の前投与ではMAdCAM-1発現の減弱を認めた。

④ コントロール群での体重あたりの%膵重量(膵重量/体重 $\times$ 100)は1.41%、生理食塩水前投与セルレイン膵炎群では1.93%であった。一方、酢酸グラチマラー前投与セルレイン膵炎群では1.77%であり、生理食塩水前投与群に比較して%膵重量の増加に対する抑制効果が認められた(図1)。

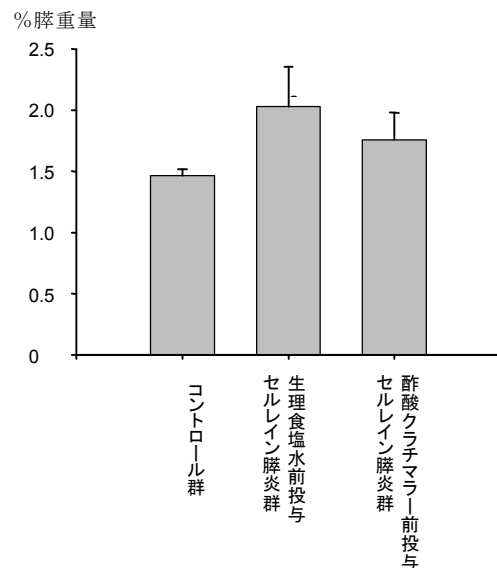


図1 体重あたりの%膵重量の比較

また血清アミラーゼ値はコントロール群で882U/L、生理食塩水前投与セルレイン膵炎群では18660U/Lであった。酢酸グラチマラー前投与セルレイン膵炎群では100550U/L

を示し、セルレイン膵炎による血清アミラーゼ値の上昇に対する酢酸グラチマラーの抑制効果が認められた（図2）。

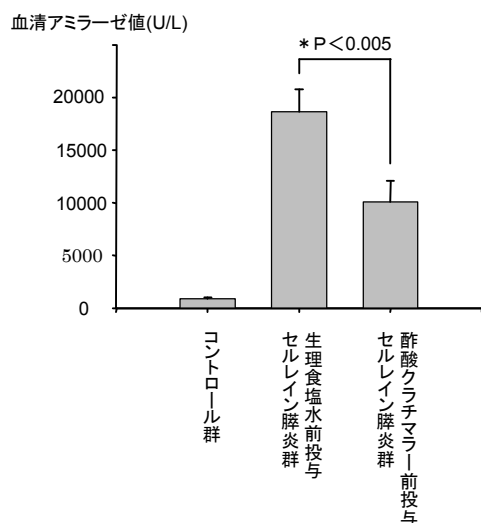


図2 血清アミラーゼ値の比較

一方、病理組織学的検討では、浮腫、好中球浸潤、実質壊死の評価を行ったが、生理食塩水前投与セルレイン膵炎群と酢酸グラチマラー前投与セルレイン膵炎群に明らかな差は認められなかった。

## (2) 考察

本研究では、各種炎症性サイトカインにより、膵血管内皮細胞の透過性亢進が生じることが証明され、作用発現時間が異なることが示された。また本研究においての IL-10 の血管透過性抑制効果に関する検討を行ったが、投与3時間後では予想に反して血管透過性抑制効果は認められなかった。治療的意義の点から今後はさらに IL-10 投与後の TER の経時的検討が必要であると考えている。

また各種炎症性サイトカインにより、膵血管内皮細胞における接着因子 MAdcAM-1 が発現することが示された。MAdcAM-1 発現はリンパ球の接着を示唆することより、IL-10 による MAdcAM-1 の発現抑制は、リンパ球浸潤を抑制するものと考えられる。今後は、他の接着因子に関する検討が必要と考える。

マウスセルレイン膵炎では、IL-10誘導薬剤である酢酸グラチマラーの前投与により、体重あたりの膵重量増加の抑制、血清アミラーゼ値上昇の抑制効果が認められた。病理学的検討では酢酸グラチマラーにより浮腫、出血、壊死範囲には明らかな差がなかったが、膵炎抑制効果を示唆するものと考えている。今後はさらに、酢酸グラチマラーの至適量の検討が必要となると考えている。

## (3) 結語

IL-10 による膵炎抑制効果を in vivo で示

し、その機序を血管内皮細胞株を用いて示した。既に IL-10 誘導薬剤も開発されており、より効率に IL-10 を誘導する薬剤の開発が膵炎進展抑制に貢献する可能性があると考えている。

## 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 10 件)

① Shimizu S, Naitoh I, Nakazawa T, Hayashi K, Miyabe K, Kondo H, Yoshida M, Yamashita H, Umemura S, Hori Y, Ohara H, Joh T. Predictive factors for pancreatitis and cholecystitis in endoscopic covered metal stenting for distal malignant biliary obstruction. J Gastroenterol Hepatol. 2013; 28(1): 68-72. 査読有

② Shimizu S, Naitoh I, Nakazawa T, Hayashi K, Okumura F, Miyabe K, Kondo H, Yoshida M, Yamashita H, Ohara H, Joh T. A case of autoimmune pancreatitis showing narrowing of the main pancreatic duct after cessation of steroid therapy in the clinical course. Intern Med. 2012; 51(16): 2135-2140. 査読有

③ Okumura F, Sakuma H, Nakazawa T, Hayashi K, Naitoh I, Miyabe K, Yoshida M, Yamashita H, Ohara H, Inagaki H, Joh T. Analysis of VH gene rearrangement and somatic hypermutation in type 1 autoimmune pancreatitis. Pathol Int. 2012; 62(5): 318-323. 査読有

④ Naitoh I, Nakazawa T, Hayashi K, Okumura F, Miyabe K, Shimizu S, Kondoh H, Yoshida M, Yamashita H, Ohara H, Joh T. Clinical differences between mass-forming autoimmune pancreatitis and pancreatic cancer. Scand J Gastroenterol 2012; 47(5): 607-613. 査読有

⑤ 林 香月、大原弘隆、中沢貴宏、吉田道弘、宮部勝之、奥村文浩、内藤 格、宮木知克、安藤朝章、三井 章、城 卓志. 経皮経空腸的内視鏡下ドレナージ術が奏功した膵頭十二指腸切除後膵仮性嚢胞の 1 例. Gastroenterol Endosc. 2011; 53: 66-72. 査読有

⑥ Naitoh I, Nakazawa T, Ohara H, Ando T, Hayashi K, Okumura F, Miyabe K, Yoshida M, Sano H, Takada H, Kanematsu T, Joh T. Comparative evaluation of the Japanese diagnostic criteria for autoimmune pancreatitis. Pancreas. 2010 ; 39(8): 1173-9. 査読有

⑦ Shimosegawa T, Kataoka K, Kamisawa T, Miyakawa H, Ohara H, Ito T, Naruse S, Sata

N, Suda K, Hirota M, Takeyama Y, Shiratori K, Hatori T, Otsuki M, Atomi Y, Sugano K, Tanaka M. The revised Japanese clinical diagnostic criteria for chronic pancreatitis. J Gastroenterol. 2010; 45(6): 584-91. 査読有

⑧ Naitoh I, Nakazawa T, Ohara H, Ando T, Hayashi K, Tanaka H, Okumura F, Miyabe K, Yoshida M, Sano H, Takada H, Joh T. Clinical significance of extrapancreatic lesions in autoimmune pancreatitis. Pancreas. 2010; 39(1): e1-5. 査読有

⑨ Nakazawa T, Naitoh I, Ando T, Hayashi K, Okumura F, Miyabe K, Yoshida M, Ohara H, Joh T. A case of advanced-stage sclerosing cholangitis with autoimmune pancreatitis not responsive to steroid therapy. JOP. 2010; 11(1): 58-60. 査読有

⑩ 中沢貴宏、大原弘隆、安藤朝章、今井英人、林香月、田中創始、内藤格、奥村文浩、宮部勝之、吉田道弘、高田博樹、佐野仁、城卓志。自己免疫性膵炎再治療のポイント肝胆膵, 60: 37-42, 2010. 査読有

〔学会発表〕(計9件)

① 奥村文浩、中沢貴宏、大原弘隆。急性閉塞性化膿性膵管炎の臨床像と治療法に関する検討。第83回日本消化器内視鏡学会総会。東京。2012.05.12.

② 内藤格、中沢貴宏、大原弘隆。腫瘍形成型自己免疫性膵炎と膵癌の鑑別診断。第97回消化器病学会総会。東京。2012.04.20.

③ Naitoh I, Nakazawa T, Hayashi K, Okumura F, Miyabe K, Shimizu S, Yoshida M, Yamashita H, Ohara H, Joh T. Clinical differences between mass-forming autoimmune pancreatitis and pancreatic cancer. The International Pancreatic Research Forum 2011. Osaka, Japan. 2011.11.26.

④ Miyabe K, Notohara K, Nakazawa T, Hayashi K, Naitoh I, Okumura F, Shimizu S, Yoshida M, Yamashita H, Ohara H, Joh T. Significance of obliterative phlebitis for the diagnosis of lymphoplasmacytic sclerosing pancreatitis. The International Pancreatic Research Forum 2011. Osaka, Japan. 2011.11.26.

⑤ 宮部勝之、能登原憲司、中沢貴宏、安藤朝章、林香月、内藤格、奥村文浩、吉田道弘、大原弘隆、城卓志。急性膵炎にて発症した、乳頭部ポリープ状過形成の1例。第47回日本胆道学会学術集会。宮崎。2011.09.16.

⑥ 奥村文浩、中沢貴宏、大原弘隆。当院における早期慢性膵炎診断の現状。第97回消化器病学会総会。東京。2011.05.14.

⑦ 内藤格、中沢貴宏、大原弘隆。IgG4関連硬化性胆管炎と原発性硬化性胆管炎の相違点。第97回消化器病学会総会。東京。2011.05.14.

⑧ 奥村文浩、中沢貴宏、大原弘隆。自己免疫性膵炎に対する治療と長期予後の検討。JDDW 2010 (パネルディスカッション)。横浜。2010.10.13.

⑨ 内藤格、中沢貴宏、大原弘隆。自己免疫性膵炎における膵外病変の有用性。日本消化器病学会 (ワークショップ)。新潟。2010.04.23.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大原 弘隆 (OHARA HIROTAKA)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号: 80285212

### (2) 研究分担者

中沢 貴宏 (NAKAZAWA TAKAHIRO)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授  
研究者番号: 70305522

安藤 朝章 (ANDOH TOMOAKI)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員  
研究者番号: 40423850

林 香月 (HAYASHI KAZUKI)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号: 00405200

内藤 格 (NAITOH ITARU)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号: 30527750

兼松 孝好 (KANEMATSU TAKAYOSHI)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師  
研究者番号: 20381824