

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 31 日現在

機関番号：13901
研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2012～2014
課題番号：24591010
研究課題名(和文) Polycystic kidney ratを用いた慢性膵炎発症の分子機構の研究

研究課題名(英文) A study of molecular pathogenesis of chronic pancreatitis by using polycystic kidney rat

研究代表者
石黒 洋 (Ishiguro, Hiroshi)

名古屋大学・総合保健体育科学センター・教授

研究者番号：90303651
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：膵管の管腔内にはprimary ciliaが存在する。本研究では、primary ciliaが障害されている多発性嚢胞腎症のモデルであるPolycystic kidney (PCK) ラットの膵臓の機能と形態を解析した。PCKラットでは、in vivoの膵液分泌量が減っていたが、アミラーゼ分泌は保たれていた。PCKラットから単離した小葉間膵管では、溶液分泌が亢進していた。単離膵管の管腔内にATPを加えた時の細胞内Ca²⁺反応は、管腔の灌流方向に依存しており、PCKラットでは逆であった。N-acetylcysteineを用いて粘液を取り除くと、電子顕微鏡でprimary ciliaを観察できた。

研究成果の概要(英文)：To clarify the role of primary cilia in the pancreatic duct, we examined the structure and function of the exocrine pancreas of polycystic kidney (PCK) rats. Pancreatic fluid secretion in vivo stimulated with a physiological dose of secretin in PCK rats was significantly smaller than that in wild-type (WT) rats. The amylase response to carbamylcholine was not different between PCK and WT rats. In isolated interlobular pancreatic duct of PCK rats, fluid secretion stimulated with the maximal concentration of secretin was significantly larger compared to WT duct. In WT ducts, a luminal application of ATP from the acinar side induced a significantly larger intracellular Ca²⁺ response than that applied from the duodenal side. The direction of ATP flow induced the opposite intracellular Ca²⁺ response to in PCK ducts. Luminal mucus was removed by luminal perfusion of N-acetylcysteine and primary cilia protruded from epithelial cells were successfully observed by electron microscope.

研究分野：膵臓病学

キーワード：膵管 primary cilia 多発性嚢胞腎症

1. 研究開始当初の背景

(1) 膵管を含めた管腔組織には、上皮細胞の apical membrane より管腔に突出する primary cilia が存在する。primary cilia が管腔内の機械的刺激を感知し、シグナルを周囲に伝えることにより、正常な管腔構造が保持される。cilia タンパクをコードする遺伝子の変異によって、primary cilia の機能が障害されると、多発性嚢胞腎症 polycystic kidney disease が発症する。

(2) 慢性膵炎の発症メカニズムは不明である。慢性膵炎は膵管の拡張を特徴とするが、明らかな膵管の閉塞を伴うことなく膵管の拡張と実質の線維化が進行する症例がしばしば見られる。

2. 研究の目的

(1) これまでの研究は、膵管内腔からの持続的な機械的刺激が、慢性膵炎の発症に關与することを示唆している。我々は、慢性膵炎の発症に primary cilia の機能障害が關連していると考えた。本研究は、primary cilia の機能が障害されている多発性嚢胞腎症のモデル動物である Polycystic kidney (PCK) ラットを用いてこの仮説を検証することを目的とする。

(2) PCK ラットの膵外分泌腺の形態と膵液分泌機能、膵管内圧の変化に対する細胞内 Ca^{2+} 応答を解析することにより、primary cilia の機能障害が膵管の拡張と線維化を引き起こす分子機構を明らかにする。

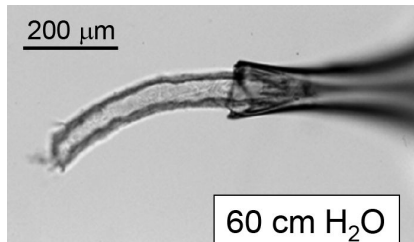
3. 研究の方法

(1) 摘出した膵臓をコラゲナーゼ処理、実体顕微鏡下で腺房を取り除いて膵管樹を単離した。

(2) 麻酔下に胆膵管にカニューレションし、胆管を結紮することにより、純粋膵液を採取した。

(3) 実体顕微鏡下で、直径 $\sim 100 \mu\text{m}$ の小葉間膵管を単離した。一昼夜培養して両端が閉じた膵管は、溶液分泌によって内腔が膨らむ。内腔容積の変化率から分泌速度を測定した。

(4) 単離した膵管の管腔を microperfusion し (下図では、60 cm 水柱圧で管腔を灌流している)、Fura-2 を用いて細胞内 Ca^{2+} 濃度を測定した。



(5) 単離膵管の管腔を N-acetylcysteine を含む溶液で灌流して粘液を取り除き、glutaraldehyde 液に浸して固定した後、オスミウム染色し、凍結乾燥した膵管の管腔内面を走査電子顕微鏡で観察した。

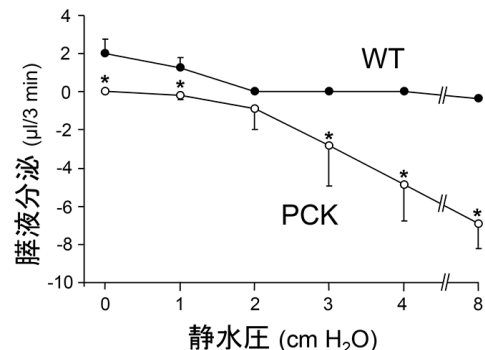
4. 研究成果

(1) PCK ラットの膵では、膵管の拡張と膵管周囲の線維化が見られ、ヒト慢性膵炎に類似した組織所見を示したが、嚢胞は見られなかった。腺房細胞は正常であった。また、膵導管の上皮細胞における水チャネル AQP1 の免疫活性が亢進していた。

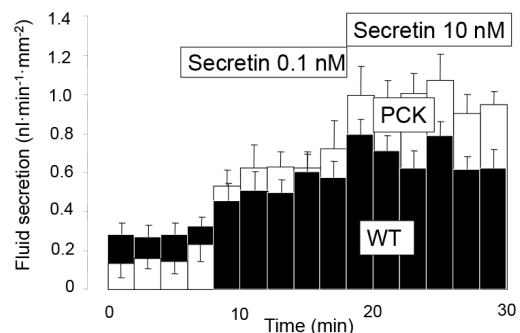
(2) PCK ラット膵の main pancreatic duct の内径は平均 $180 \mu\text{m}$ であり、正常ラット (平均 $100 \mu\text{m}$) に比べて有意に拡張していた。PCK ラットの膵管内腔の体積は、正常ラットの約 8 倍であった。primary cilia の機能障害が膵管の拡張をきたすことを確認した。

(3) PCK ラットでは、基礎分泌および生理的濃度のセクレチン刺激による膵液分泌量が有意に減っていた。一方、カルバミルコリン刺激によるアミラーゼ分泌量は正常ラットと変わらなかった。PCK ラットの膵臓では、腺房細胞機能は保たれるが、膵導管細胞機能が障害されていることが分かった。

(4) 基礎分泌時 (純粋膵液採取) に 8 cm 水柱までの静水圧を加えると、正常ラットでは分泌が停止し、PCK ラットでは膵液が逆流した (下図)。PCK ラットの膵管は、管腔内圧の上昇に対応して拡張しやすいことが分かった。

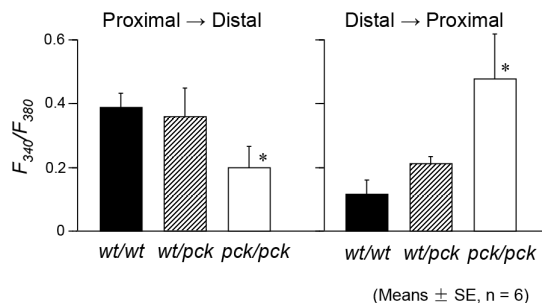


(5) PCK ラットの単離膵管では、高濃度のセクレチン刺激による溶液分泌が亢進していた。PCK ラットの膵導管細胞では、管腔内圧のメカセンサー機能が障害されていることを示唆している。

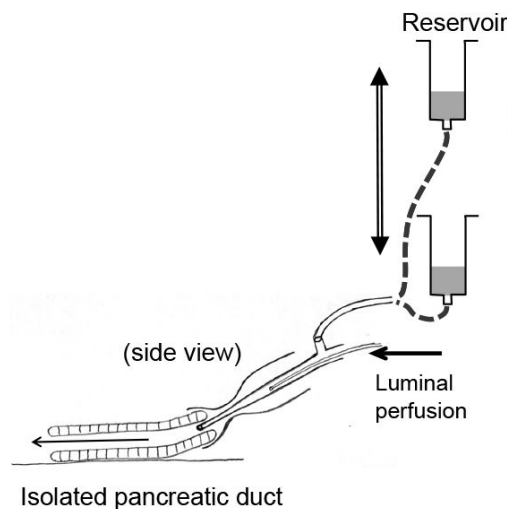


(6) 管腔灌流液に ATP を加えた時の細胞内 Ca^{2+} 反応は、管腔の灌流方向 (十二指腸側あるいは腺房側から) に依存していた (下図)。正常

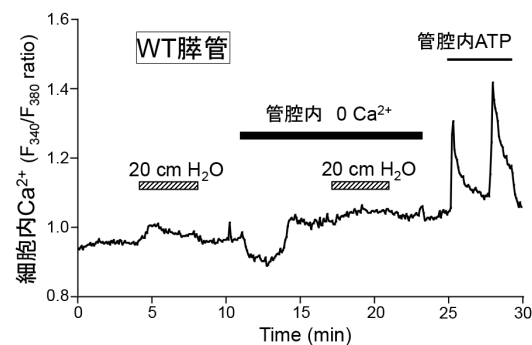
ラットの膵管 (*wt/wt*) では、腺房側から灌流した場合の反応が大きかったが、PCK ラットの膵管 (*pck/pck*) では逆であった。PCK ラットの膵導管細胞では、管腔の機械的 / 化学的刺激に対する反応が変わっていることが分かった。



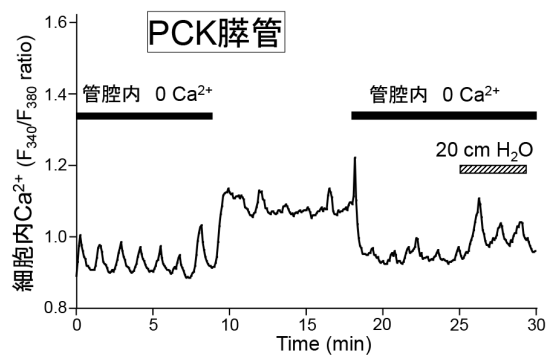
(7) リザーバーの高さを下図のように変えることによって管腔内圧を変化させ、細胞内 Ca²⁺ 濃度に及ぼす影響を見た。



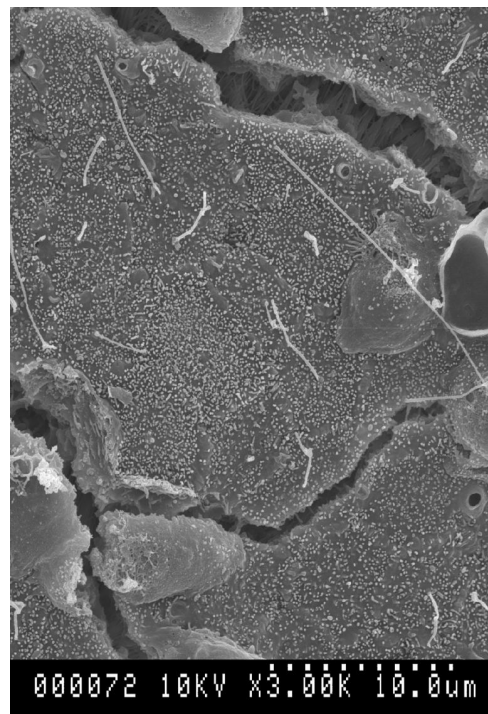
正常ラットの膵管では、下図のように、灌流圧を変化させた時の細胞内 Ca²⁺ 反応は、比較的小かった。



一方、PCK ラットの単離膵管では、管腔内圧を生理学的な範囲で変化させた場合に、細胞内 Ca²⁺ の過剰応答が見られた。また、管腔内の Ca²⁺ 濃度を変化させると、細胞内 Ca²⁺ 濃度の周期的変動 (Ca²⁺ oscillation) が見られた。このように、PCK ラットでは、膵管内圧の変化、膵管内の Ca²⁺ 濃度の変化に対する知覚が亢進していた。



(8) 敷石状の膵管上皮細胞の 1 つ 1 つに、細胞のほぼ中心から管腔内に突出する長さ 5 μm 程度の primary cilia を観察することができた。



(9) 膵管腔内の primary cilia は物理的 / 化学的刺激のセンサーとして働き、膵液分泌と膵管系の形態を調節していることが明らかとなった。

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)

HCO₃⁻ secretion by SLC26A3 and mucosal defence in the colon. Ishiguro H. *Acta Physiol (Oxf)* 211: 17-9, 2014. 査読有
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24868584>

Inflammation increases cells expressing ZSCAN4 and progenitor-cell markers in the adult pancreas. Ko SB, Azuma S, Yokoyama Y, Yamamoto A, Kyokane K, Niida S, Ishiguro H, Ko MS. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 304: G1103-16,

2013. 査読有
doi: 10.1152/ajpgi.00299.2012.

Structure and function of the pancreas in the polycystic kidney rat. Yi L, Naruse S, Furuya S, Yamamoto A, Nakakuki M, Nagao S, Yoshihara D, Ko SB, Wei M, Kondo T, Ishiguro H. *Pancreas* 41: 1292-8, 2012. 査読有
doi: 10.1097/MPA.0b013e31824c12f9.

Detection of a large heterozygous deletion and a splicing defect in the CFTR transcripts from nasal swab of a Japanese case of cystic fibrosis. Nakakuki M, Fujiki K, Yamamoto A, Ko SB, Yi L, Ishiguro M, Yamaguchi M, Kondo S, Maruyama S, Yanagimoto K, Naruse S, Ishiguro H. *J Hum Genet* 57: 427-33, 2012. 査読有
doi: 10.1038/jhg.2012.46.

Deletion of Slc26a6 alters the stoichiometry of apical Cl/HCO₃⁻ exchange in mouse pancreatic duct. Song Y, Yamamoto A, Stewart MC, Ko SB, Stewart AK, Soleimani M, Liu BC, Kondo T, Jin CX, Ishiguro H. *Am J Physiol Cell Physiol* 303: C815-24, 2012. 査読有
doi: 10.1152/ajpcell.00151.2012.

CFTR polymorphisms of healthy individuals in two Chinese cities--Changchun and Nanjing. Jin CX, Fujiki K, Song Y, Ping Z, Nakakuki M, Wei MX, Zhang SM, Ishiguro H, Naruse S. *Nagoya J Med Sci* 74: 293-301, 2012. 査読有
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23092102>

Molecular mechanisms of pancreatic stone formation in chronic pancreatitis. Ko SB, Azuma S, Yoshikawa T, Yamamoto A, Kyokane K, Ko MS, Ishiguro H. *Front Physiol* 2012; 3: 415. 査読有
doi: 10.3389/fphys.2012.00415.

〔学会発表〕(計 4 件)

Functional coupling of apical H⁺/HCO₃⁻ transporters and CFTR in pancreatic duct cells. Ishiguro H. Symposium "Molecular pathophysiology of pancreatic duct cells & pancreatitis" 45th Anniversary Meeting of American Pancreatic Association/Japan Pancreas Society (Hawaii) 2014・11

膵導管細胞管腔膜のカルシウム輸送とメカノセンサー機能 石黒真理子、山本明子、長尾枝澄香、成瀬 達、石黒 洋 トピック

スセッション1「膵疾患の克服を目指した基礎研究」第44回日本膵臓学会大会(仙台)2013・7

Role of channel and transporters in pancreatic secretion. Ishiguro H, Yamamoto A. Basic Science Symposia "Frontier in Pancreatic Research" 2013 Joint meeting of IAP (International Association of Pancreatology) and KPBA (Korean Pancreatobiliary Association) (Seoul) 2013・9

多発性嚢胞腎症ラットの膵導管の形態と機能 衣 蘭娟、山本明子、古家園子、長尾枝澄香、吉原大輔、中莖みゆき、山口 誠、近藤志保、持丸由香、成瀬 達、石黒 洋 生理研研究会「粘膜防御における上皮膜輸送の役割とその破綻による疾病発症メカニズム」(岡崎) 2012・12

〔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〕 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石黒 洋 (ISHIGURO Hiroshi)
名古屋大学・総合保健体育科学センター・教授
研究者番号: 90303651

(2) 研究分担者

古家 園子 (FURUYA Sonoko)
生理学研究所・個別研究 村上正隆・特別協力研究員
研究者番号: 20096952

長尾 静子 (NAGAO Shizuko)
藤田保健衛生大学・疾患モデル教育研究センター・准教授
研究者番号: 20183527

中莖 みゆき (NAKAKUKI Miyuki)
名古屋大学・総合保健体育科学センター・非常勤研究員
研究者番号: 30578729

山本 明子 (YAMAMOTO Akiko)
名古屋大学・総合保健体育科学センター・准教授
研究者番号: 60402385

(3) 連携研究者 なし