

平成 21 年 5 月 19 日現在

研究種目:基盤研究(C)

研究期間:2007~2008

課題番号:19591514

研究課題名(和文) 遺伝子改変マウスを用いた急性膵炎発症機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism in acute pancreatitis development using gene-manipulated mice

研究代表者

廣田 昌彦(HIROTA MASAHIKO)

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師

研究者番号:80284769

研究成果の概要: 急性膵炎におけるオートファジーの意義と急性膵炎の発症機序を明らかにするために、*PstilAtg5* ダブル欠損マウスと膵特異的 *Atg5* 欠損マウスを作成し、解析した。1) 膵外分泌刺激時には、オートファジーの結果トリプシンが生成するが、通常は PSTI 活性によりトリプシン活性は阻害されて膵障害は生じない、2) 過剰な膵外分泌刺激によりトリプシン活性が PSTI の制御活性を超えると、連鎖的に膵消化酵素が活性化されて膵が障害される、という結論を得た。

交付額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野:医歯薬学

科研費の分科・細目:外科系臨床医学・外科学一般

キーワード:急性膵炎、トリプシン、PSTI、オートファジー、トリプシンインヒビター、膵腺房細胞、ノックアウトマウス、自己消化

## 1. 研究開始当初の背景

急性膵炎とはトリプシノーゲンの活性化(トリプシン生成)をひきがねとして、組織が膵消化酵素により自己消化を受ける疾病である。我々はこれまでに、膵細胞内における内因性トリプシンインヒビターである pancreatic secretory trypsin inhibitor (PSTI) の発現欠損マウスを作成し、急性膵炎の発症機構として、細胞内タンパクの処理機構の一つであるオートファジーの過程が関与すること、および膵内におけるトリプシン生成と PSTI によるトリプシン活性の制御能のバランスが関与すること、を報告してき

た。

## 2. 研究の目的

急性膵炎発症におけるオートファジーの意義(オートファジーが誘導された結果トリプシンが生成するのか、あるいは、生成したトリプシンを処理するためにオートファジーが誘導されるのか)を検討し、急性膵炎発症のメカニズムを明らかにする。

## 3. 研究の方法

- (1) カテプシン B 遺伝子の欠損マウス
- (2) 膵臓の遺伝子のみを改変したコンディ

シヨナル欠損マウス、(3)Psti 欠損マウス、Atg5 欠損マウス(オートファジーの誘導に必須のタンパク質を産生する遺伝子Atg5のノックアウトマウス)、カテプシン B K0 マウスの掛け合わせによる複数遺伝子の改変マウス、を作成し、「トリプシノーゲンの活性化」と「オートファジー」の関係を解析し、急性膵炎の発症機構を明らかにする。(2)においては、オートファジー誘導遺伝子 (Atg5) を全身的に欠損させると生後数日で死亡するので、膵腺房細胞特異的にオートファジー誘導遺伝子をノックアウトしたマウス(膵特異的Atg欠損マウス)を作成し、膵臓だけの現象を解析する。

遺伝子改変マウスの作成は、研究分担者のひとりである大村谷昌樹が担当する。

#### 4. 研究成果

各種遺伝子改変マウスの作成をすすめるとともに、ほぼ作成を終了した系 (Psti/Atg5 ダブル欠損マウス、膵特異的Atg5 欠損マウス) の解析 (光顕、電顕による形態学的解析、トリプシン活性・アミラーゼ活性の測定など) を行った。

(1) Psti/Atg5 ダブル欠損マウスの作成・解析: 膵炎発症におけるオートファジーの意義 (オートファジーが誘導された結果トリプシンが生成するのか、あるいは、生成したトリプシンを処理するためにオートファジーが誘導されるのか) を明らかにするために、Psti 遺伝子とオートファジーの誘導に必要な Atg5 遺伝子の両者をノックアウトした Psti/Atg5 ダブル欠損マウスを作成し、解析した。Psti 欠損マウスでは非刺激下状態において膵腺房細胞内でトリプシンが活性化されて広範な腺房細胞の破壊を認めたのに対して、Psti/Atg5 ダブル欠損マウスでは、膵腺房細胞内のトリプシンは活性化されてはならず、また、腺房細胞の破壊も認められなかった。

(2) 膵特異的 Atg5 欠損マウスの作成・解析:

Atg5 遺伝子を全身的に欠損させると生後数日で死亡するので、膵腺房細胞特異的にオートファジー誘導遺伝子をノックアウトした膵特異的 Atg 欠損マウスを作成し、膵臓だけの現象を解析した。野生型マウスに過剰な膵外分泌刺激をかけた場合には、膵腺房細胞内にトリプシン活性が出現し膵障害が惹起されたのに対し、膵特異的 Atg 欠損マウスでは、過剰な膵外分泌刺激をかけても膵腺房細胞内にトリプシン活性は出現せず膵障害も惹起されなかった。

以上の結果は、(1) 膵外分泌刺激時には、分泌蛋白の品質管理・処理機構としてのオー

トファジーの結果トリプシンが生成するが、通常は PSTI の活性によりトリプシン活性は阻害されて膵障害は生じない、(2) 過剰な膵外分泌刺激の結果、生じたトリプシンの活性が PSTI の制御活性を超えると、連鎖的な膵消化酵素の活性化を生じて膵障害 (膵臓の自己消化) を生じる、ということの意味する

#### 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14件)

廣田昌彦、瀧下智恵、田中洋平、大村谷昌樹、馬場秀夫: 急性膵炎の発症に關与する遺伝子変異. 侵襲と免疫 18: 32-38, 2009. 査読無

橋本大輔、大村谷昌樹、廣田昌彦、高森啓史、山村研一、馬場秀夫: 膵腺房細胞内のトリプシン活性とプロテアーゼインヒビター. Surgery Frontier 16: 114-119, 2009. 査読無

廣田昌彦: 重症急性膵炎に対する膵局所動注療法. 外科治療 100: 375-379, 2009. 査読無

Suyama K, Ohmuraya M, Hirota M, Ozaki N, Ida S, Endo M, Araki K, Gotoh T, Baba H, Yamamura K: C/EBP homologous protein is crucial for the acceleration of Experimental pancreatitis. Biochem Biophys Res Commun. 367: 176 - 182, 2008. 査読有

Hashimoto D, Ohmuraya M, Hirota M, Yamamoto A, Suyama K, Ida S, Okumura Y, Takahashi E, Kido H, Araki K, Baba H, Mizushima N, Yamamura K: Involvement of autophagy in trypsinogen activation within the pancreatic acinar cells. J Cell Biol 181: 1065-1072, 2008. 査読有

Fujimura Y, Hirota M, Ichihara A, Takamori H, Baba H: Platelet count as a sensitive and convenient parameter for assessing the prognosis in acute pancreatitis. Pancreas 37: 225-227, 2008. 査読有

広田昌彦、大村谷昌樹、陶山浩一、尾崎宣之、井田 智、田中 洋、高森啓史、馬場秀夫：急性膵炎重症化の分子機構。胆と膵。29：313-316，2008。査読無

広田昌彦、高森啓史、田中 洋、生田義明、佐藤伸隆、田中洋平、馬場秀夫：急性膵炎（重症膵炎を含む）。救急・集中治療 20：381-386，2008。査読無

大村谷昌樹、広田昌彦、橋本大輔、馬場秀夫：遺伝子改変マウスを用いた膵炎の発症機構の解析。膵臓 23：20-24，2008。査読有

広田昌彦、市原敦史、藤村美恵、保坂征司、岡部弘尚、蔵元一崇、木下浩一、近本 亮、高森啓史、金光敬一郎、馬場秀夫：SIRS と急性膵炎の重症化。侵襲と免疫 16：30-34，2007。査読無

広田昌彦、井田 智、金光敬一郎、馬場秀夫：急性膵炎とnon-occlusive mesenteric ischemia (NOMI)。医薬の門 47：30-33，2007。査読無

広田昌彦、坂本快郎、田中 洋、近本 亮、高森啓史、馬場秀夫：急性膵炎におけるSIRSとCARS。最新医学 62：1866-1873，2007。査読無

広田昌彦、金光敬一郎、高森啓史、馬場秀夫：急性膵炎におけるMRI検査。医薬の門 46：506-509，2007。査読無

吉田雅博、高田忠敬、真弓俊彦、平田公一、木村康利、小泉 勝、伊佐地秀司、武田和憲、広田昌彦、関本美穂、三浦文彦、和田慶太：エビデンスに基づいた急性膵炎の診療ガイドライン出版後の普及活動と今後 インターネット化、ダイジェスト版、英文化：日本腹部救急医学会雑誌 27：487-490，2007。査読有

〔学会発表〕(計 11 件)

廣田昌彦：急性膵炎の発症にはオートファジーの機構が関与する。第 15 回外科侵襲とサイトカイン研究会、2008 年 12 月 13 日、盛岡市。

廣田昌彦：急性膵炎の発症・重症化の機序と治療戦略。第10回筑後地区肝胆膵研究会特別講演、2008年11月4日、久留米市。

Hirota M: Autophagy activates trypsinogen within the pancreatic acinar cells and induces acute pancreatitis. Joint meeting of the European pancreatic club and the international association of pancreatology. 2008年7月28日、ポーランドウッチ市。

Hirota M: Involvement of Autophagy in trypsinogen activation within the pancreatic acinar cells. Lecture at Tampere University, 2008 年 7 月 23 日、フィンランドタンペレ市。

廣田昌彦：急性膵炎の重症化機序。第9回侵襲と生体反応研究会。2008年2月16日、東京都。

広田昌彦：急性膵炎の発症・重症化の機序と治療戦略。第12回外科難治性症例検討会。2008年2月1日、姫路市。

広田昌彦：急性膵炎の病態解析とその膵癌診療への応用。高知急性膵炎学術講演会特別講演。2007 年 8 月 3 日、高知市。

広田昌彦、大村谷昌樹、橋本大輔、陶山浩一、尾崎宣之、市原敦史、井田 智、近本 亮、高森啓史、金光敬一郎、馬場秀夫：遺伝子改変マウスを用いた膵炎の発症機構の解析。第38回日本膵臓学会大会ワークショップ。2007年6月29日、福岡市。

井田 智、広田昌彦、近本 亮、高森啓史、金光敬一郎、馬場秀夫：急性膵炎における血中soluble E-selectin濃度、thrombomodulin濃度の変化とその意義。第38回日本膵臓学会大会一般口演、2007年6月28日、福岡市。

今村 裕、廣田昌彦、阿部真也、八木雄史、岩槻政晃、水流添周、近本 亮、高森啓史、金光敬一郎、馬場秀夫：急性膵炎時のCT重症度評価における腎周囲脂肪織炎の意義。第38回日本膵臓学会大会パネルディスカッション。2007年6月28日、福岡市。

広田昌彦：膵疾患診療のトピックス。大隈臨床外科医会特別講演。2007年6月14日、鹿屋市。

〔図書〕(計5件)

廣田昌彦、大村谷昌樹、馬場秀夫：急性膵炎：成因・発症機序・重症化機序．In：膵疾患へのアプローチ、下瀬川徹編、中外医学社（東京）、pp.11-17, 2008.

急性膵炎の診療ガイドライン第2版作成出版委員会（含広田昌彦）：エビデンスに基づいた急性膵炎の診療ガイドライン第2版．金原出版(東京)、pp.1-131, 2007．

広田昌彦、金光敬一郎、高森啓史、馬場秀夫：急性膵炎の重症度判定法は？ In：臨床に直結する肝・胆・膵疾患治療のエビデンス．跡見 裕、他編、文光堂(東京)、pp.216-218, 2007.

広田昌彦、馬場秀夫：急性膵炎．In：知っておきたい臨床検査値．日本薬学会編、東京化学同人（東京）、pp.106-109, 2007．

広田昌彦、大村谷昌樹、橋本大輔、陶山浩一、藤村美憲、尾崎宣之、井田 智、市原敦史、田中 洋、高森啓史、馬場秀夫：急性膵炎の病態生理．In：最新医学別冊新しい診断と治療のABC 54．下瀬川徹編、最新医学社（東京）、pp.16-24, 2007.

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

廣田 昌彦 (HIROTA MASAHIKO)  
熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師  
研究者番号：80284769

### (2)研究分担者

馬場 秀夫 (BABA HIDEO)  
熊本大学・医学薬学研究部・教授  
研究者番号：20240905

高森 啓史 (TAKAMORI HIROSHI)  
熊本大学・医学薬学研究部・講師  
研究者番号：90363514

### (3)連携研究者

大村谷 昌樹 (OOMURAYA MASAKI) (2007年度は研究分担者)  
熊本大学・発生医学研究センター・助教  
研究者番号：60398229

山本 章嗣 (YAMAMOTO AKITSUGU) (2007年度は研究分担者)  
長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・教授  
研究者番号：30174775