

令和元年6月5日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09389

研究課題名(和文)オートファジーに立脚した急性膵炎発症・進展の分子機構の解析

研究課題名(英文) The molecular mechanism of autophagy participates in the onset and progression of acute pancreatitis

研究代表者

大西 洋英 (OHNISHI, Hirohide)

自治医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：00313023

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：急性膵炎の発症・進展におけるオートファジーの関与の分子機構解明のため、オートファゴソームがリソソームと融合してオートリソソームに成熟する生理的オートファジーに機能する低分子GTP結合蛋白であるrab7の膵腺房細胞特異的KOマウスを作成し(以下：KOマウス)解析した。その結果、オートファゴソームからオートリソソームへの成熟過程が障害されるためKOマウス膵でオートファジー不全が認められ、また実験的急性膵炎を惹起すると、KOマウスにおいてはwildマウスに比べ急性膵炎が悪化していた。これらからrab7は急性膵炎に関してautophagy機構を介して抑制的に機能していることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

急性膵炎は重症化すると予後不良となる可能性ある疾患であるが、その発症等に関する細胞生物学的ならびに分子生物学的発症機序について依然不明な点が多い事から、未だその根本的予防法や治療法が開発されていない疾患である。本研究においては、低分子量GTP結合蛋白であるrab7が急性膵炎の発症・進展に対して、オートファジー機構等を介して防御的に機能している事が明らかになった。この知見は、今後rab7をターゲットとした急性膵炎治療法開発の一助となる可能性を秘めており、学術的意義は高い。また、本研究成果は日本経済新聞全国版など多くの新聞にて取り上げられ社会的注目を浴びており、社会的意義も大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In the current study, we tried to elucidate the molecular mechanism of the autophagy participation in the onset and progression of acute pancreatitis. To this end, we have examined the function(s) of rab7, a member of ras-related small GTPase rab family, in the onset and progression of acute pancreatitis, using pancreas-specific rab7 conditional knockout mice (KO mice). In the pancreas of KO mice, the autophagy process was disturbed at the step of the autophagosome maturation to the autolysosome. When experimental acute pancreatitis was induced by the intrapancreatic injection of caerulein or L-arginine, the severity of acute pancreatitis determined with the pathological features and intra-pancreatic trypsin activity was markedly exacerbated in KO mice. These data indicate that rab7 plays a protective role against the progression of acute pancreatitis.

研究分野：膵臓病学

キーワード：急性膵炎 オートファジー rab7

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

急性膵炎は重症化すると致死にも至る可能性のある、急性疾患である。しかしその発症、進展の細胞生物学的、ならびに分子生物学的メカニズムが依然明らかでない点が多いことから、その根本的予防法や治療法の開発が未だなされていない。一方で、急性膵炎の発症・進展においては膵腺房細胞におけるオートファジー機構が重要な役割を担っていると考えられているものの、その詳細は未だ明らかではなかった。

2. 研究の目的

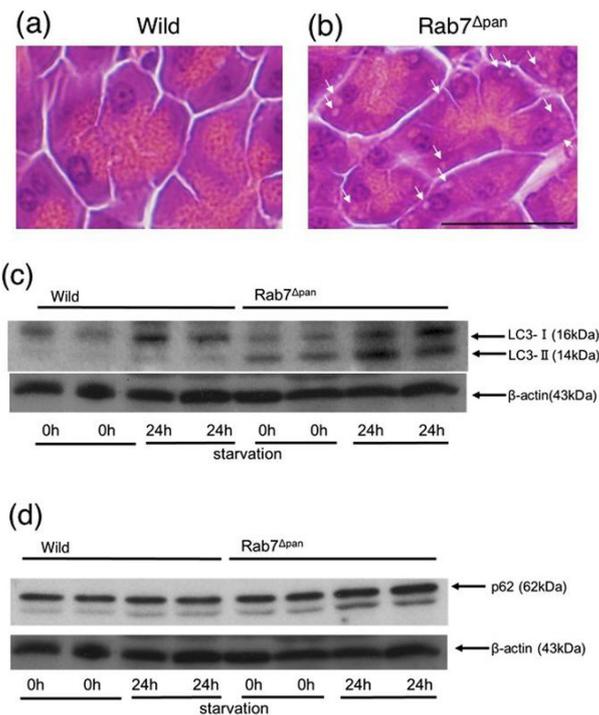
本研究においては、オートファジー機構にてオートファゴソームがリソソームと融合してオートリソソームに成熟するオートファジー過程に機能する低分子GTP結合蛋白であるrab7遺伝子に焦点をあて、急性膵炎発症・進展におけるオートファジーの役割とその分子機構を明らかにし、急性膵炎治療のターゲットとなる新たな分子メカニズムを探索し、新薬の開発基盤を創出することを目的とした。

3. 研究の方法

Cre-loxP システムを用いて、膵臓特異的Cre発現マウスであるptf1-Creマウスとrab7^{lox/f}マウスを交配させることにより、膵臓特異的にrab7遺伝子をノックアウトしたconditional knockout mouse (以下: K0マウスまたは Rab7^{pan})を用いてrab7の膵臓における機能を検討した。またコントロールとして同腹のrab7^{lox/flox}マウスを用いた(以下: wild または 野生型)。

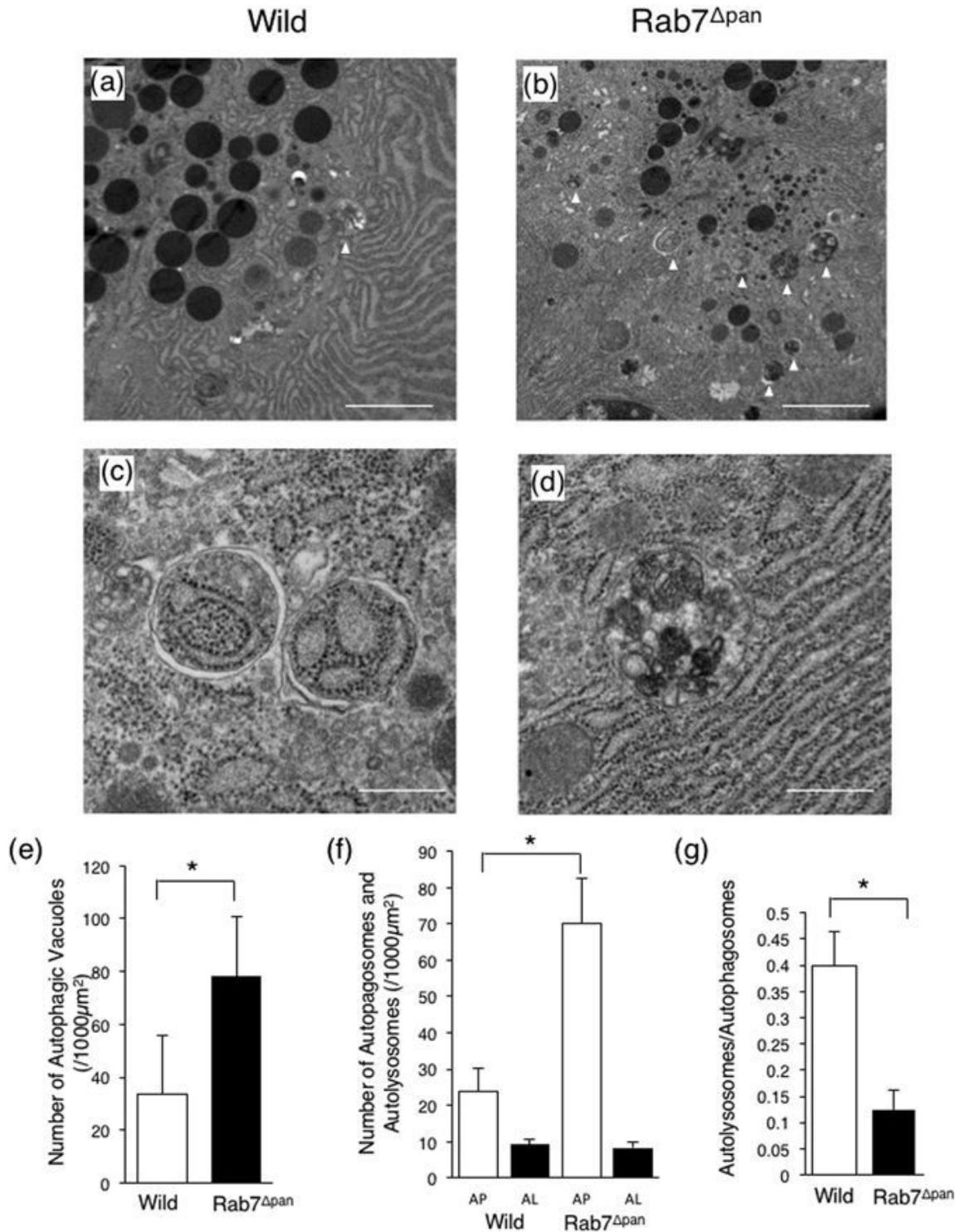
4. 研究成果

(1) K0マウス膵腺房細胞においては、絶食によるオートファジー惹起により細胞質内異常空胞が出現し(下図: a, b, Sci Rep. 2017; 7: 2817.より転載)、同時にWestern blotsにてLC3-IIとp62の発現量が野生型マウスに比し増強していた(下図: c, d, Sci Rep. 2017; 7: 2817.より転載)。



(2) また電子顕微鏡による観察では、絶食時にはK0マウス膵腺房細胞では野生型マウスに比べ、オートファゴソームが著明に増加する一方で、オートリソソーム量は減少していた (下

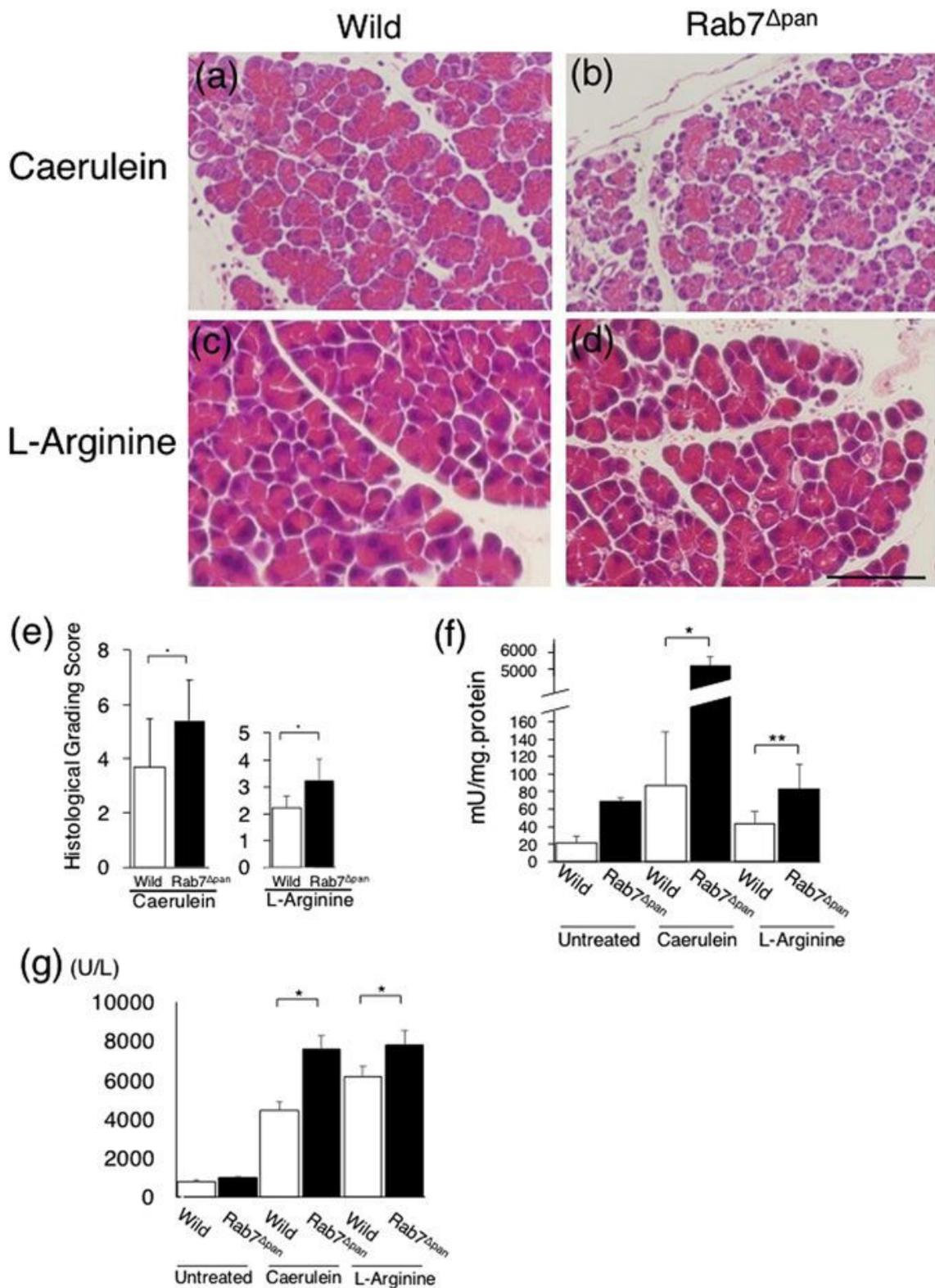
図a-g, Sci Rep. 2017; 7: 2817.より転載)。



(3) また続いて行った、蛍光免疫染色法を用いた観察では、K0マウス膵腺房細胞では早期エンドゾームの肥大と後期エンドゾームの減少を認め、更にはWestern blotにてリソソームの機能不全も生じている事が明らかとなった。

これらから、K0マウス膵腺房細胞ではオートファジー不全ならびにエンドサイトーシス不全の存在が認められ、オートファジー不全はオートファゴソームからオートリソソームへの成熟過程が障害され、エンドサイトーシス不全は早期エンドゾームから後期エンドゾームへの成熟過程の障害のためであると考えられた。

(4) 次に、セルレインやL-アルギニンの腹腔内投与による実験的急性膵炎を惹起し解析したところ、KOマウスにおいてはwildマウスに比べ急性膵炎が悪化していることが、病理学的ならびに細胞生物学的解析にて確認された(下図: a-d:HE染色病理像、e:病理学的傷害スコア、 f:膵内トリプシン活性、g: 血清アミラーゼ値、Sci Rep. 2017; 7:2817 より転載)。



以上より、rab7はオートファジー機能等を介して急性膵炎に対して抑制的に機能していることが明らかとなった。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

高橋 健一, 眞嶋 浩聡, 大西 洋英, 急性膵炎発症・進展における細胞内膜小胞輸送の役割、
査読有、膵臓、33巻、2018、pp. 723-729

眞嶋浩聡、高橋健一、大西洋英、急性膵炎におけるオートファジーとエンドサイトーシス、査
読無、胆と膵、39巻、2018、pp.139-145

Kenichi Takahashi, Hirosato Mashima, Kouichi Miura, Daichi Maeda, Akiteru Goto, Takashi
Goto, Ge-Hong Sun-Wada, Yoh Wada, Hirohide Ohnishi, Disruption of Small GTPase Rab7
Exacerbates the Severity of Acute Pancreatitis in Experimental Mouse Models, Scientific
Reports, 査読有, 2017;7:2817. doi: 10.1038/s41598-017-02988-3.

〔学会発表〕(計4件)

高橋 健一, 眞嶋 浩聡, 大西 洋英, 低分子量Gタンパク質Rab7の膵外分泌腺における機能解析、
日本膵臓学会総会、2018年

高橋 健一, 眞嶋 浩聡, 大西 洋英, 基礎研究から紐解く膵・胆道の恒常性とその破綻 膵外分
泌腺恒常性維持におけるRab7機能の検討、日本消化器病学会総会、2018年4月

高橋健一、眞嶋浩聡、大西洋英、Rab7 のオートファジー・エンドサイトーシスを介した急性
膵炎での保護的作用の検討、第48回日本膵臓学会大会 2017年07月

高橋健一、眞嶋浩聡、大西洋英、膵臓特異的 Rab7 ノックアウトによるオートファジー成熟過
程の障害はセルレイン誘発急性膵炎を悪化させる、第103回日本消化器病学会総会、2017年
4月

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：眞嶋 浩聡

ローマ字氏名:(MASHIMA, hirosato)

所属研究機関名:自治医科大学

部局名:医学部

職名:教授

研究者番号(8桁):10261869

研究分担者氏名:三浦 光一

ローマ字氏名:(MIURA, kouichi)

所属研究機関名:自治医科大学

部局名:医学部

職名:准教授

研究者番号(8桁):90375238

(2)研究協力者

なし。

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。