

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15429

研究課題名(和文)オートファジーによる膵ザイモゲン顆粒とインフラマソームの制御を介した急性膵炎治療

研究課題名(英文) Treatment for acute pancreatitis by regulating autophagy which modulates zymogen granules and inflammasomes

研究代表者

竹原 徹郎 (Takehara, Tetsuo)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：70335355

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：急性膵炎における膵腺房細胞のオートファジー変化を明らかにし、病態進展に与える影響を検討した。マウスセルレイン急性膵炎モデルではRubicon発現抑制を伴うオートファジーの亢進が示唆された。そこで急性膵炎におけるオートファジー亢進の意義を検討するため、膵特異的Atg7欠損マウスを作成した。しかし、このマウスは生理的な状態でもザイモゲン顆粒の増加を伴う一過性の膵炎と、それに続く強い膵萎縮を伴った慢性膵炎様の変化を認め、セルレイン誘導性急性膵炎の実験には適さなかった。そこで、薬剤誘導性膵腺房細胞特異的Atg7欠損マウスを作成した。タモキシフェン投与によりAtg7発現の低下が確認できた。

研究成果の概要(英文)：We examined the change of acinar cell autophagy in acute pancreatitis and its impact on progression of the disease. By analyzing autophagy-related proteins in mice with caerulein-induced acute pancreatitis, autophagy was suggested to be promoted with decrease in Rubicon expression. To examine the impact of autophagy inhibition on caerulein-induced acute pancreatitis, we generated pancreas-specific Atg7 knock out mice. However, they developed temporary acute pancreatitis followed by chronic pancreatitis with severe atrophic change without any stimulation. Therefore, we next successfully generated tamoxifen-inducible acinar cell-specific Atg7 Knock out mice. We confirmed that tamoxifen injection into them suppressed Atg7 expression in their pancreas.

研究分野：消化器内科学

キーワード：急性膵炎 オートファジー

1. 研究開始当初の背景

オートファジーは劣化したタンパクやオルガネラを分解する機構として働き、生体の恒常性の維持に重要な役割を果たしている。オートファジー遂行に必須の遺伝子である Atg7 を欠損させたマウスの腺房細胞では、ザイモゲン顆粒の蓄積を認めるといふ予備的な結果を得ている。またこのマウスでは4週の時点では軽度の膵浮腫を伴う血清アミラーゼ値、リパーゼ値の上昇を認め、軽度の膵円が惹起されている可能性を見出している。

膵炎はザイモゲン顆粒内の消化酵素の自己活性化が発生機序に関与していることから、申請者は、不良ザイモゲン顆粒がオートファジー（ザイモファジー）により分解され品質維持されることが、膵炎の発症抑制に寄与しているのではないかという発想に至った。そのためオートファジーを介したザイモゲン顆粒の品質維持機構（ザイモファジー）が急性膵炎の発症に関与している可能性を考え、本研究課題を立案した。

2. 研究の目的

オートファジー進行を負に制御する蛋白質として、Beclin-1 と結合する Rubicon が報告されている (Matsunaga K, et al. Nat Cell Biol 2009)。我々は細胞株を用いて、Rubicon の欠損がオートファジーを亢進させることをすでに確認している。そこで、オートファジー制御タンパクの1つである Rubicon にも着目し、急性膵炎発症における Rubicon 発現とオートファジーの変化を明らかにし、オートファジーの制御による急性膵炎に対する発症予防の開発につなげることを目的とした。

3. 研究の方法

マウス急性膵炎モデルとして、セルレイン急性膵炎モデルを採用した。1時間おきに12回投与する方法と、1時間おきに8回投与す

ることを2日間連続、計16回投与する方法を検討した。

オートファジーが抑制された膵腺房細胞の検討のため、膵特異的 Atg7 欠損マウス (Pdx-Cre Atg7 fl/fl) を作成し、電子顕微鏡にて腺房細胞内にザイモゲン顆粒の数の経時的推移を検討した。

膵特異的 Atg7 欠損マウスから初代培養膵腺房細胞を単離し、コレシストキンもしくはカルバコール刺激によるアミラーゼ分泌率に違いがないかを検討した。

薬剤誘導性の膵特異的 Atg7 欠損マウスを作成するため、Atg7 fl/fl マウスと Ela-Cre ER マウスを交配し、タモキシフェン投与により膵腺房細胞特異的に Atg7 が欠損する Ela-Cre ER Atg7 fl/fl マウスを作成した。

4. 研究成果

セルレインを1時間おきに12回投与する方法と、1時間おきに8回投与することを2日間連続、計16回投与する方法を検討したところ、いずれの方法でも強い膵浮腫と血清アミラーゼ値、リパーゼ値の上昇を認め、強い急性膵炎が誘導できることを確認した。

急性膵炎誘導時にオートファジー関連蛋白の発現をウェスタンブロット法で確認したところ、コントロール群と比較し、LC3-の増加とオートファジーを負に制御する Rubicon の減少とを認め、オートファジーが亢進している可能性が考えられた。

急性膵炎におけるオートファジー亢進の意義を検討するため、膵特異的 Atg7 欠損マウス (Pdx-Cre Atg7 fl/fl) を作成した。生理的な状態で膵特異的 Atg7 欠損マウス (Pdx-Cre Atg7 fl/fl) の腺房細胞では、野生型に比し、3週齢ではザイモゲン顆粒の数に違いを認めなかったが、4週齢、5週齢ではザイモゲン顆粒数の有意な増加を認めた。膵特異的 Atg7 欠損マウスから採取した初代培養膵腺房細胞と野生型マウスから採取し

た初代培養膵腺房細胞では、コレシストキンおよびカルバコール刺激によるアミラーゼ分泌率に差を認めなかった。このことから、ザイモゲン顆粒の明らかな放出障害はないと考えられ、ザイモゲン顆粒はオートファジーによって分解されていることが示唆された。

また、無刺激でも膵特異的 Atg7 欠損マウスは4週齢で軽度の浮腫上変化とともに膵重量の増加を認め、その後5週以降は膵萎縮を認め、膵重量は有意に低下した。4週齢ではTUNEL陽性細胞腺房細胞も多数出現し、血清リパーゼ価の有意な上昇を認めた。5週目には血清リパーゼは野生型マウスと同程度であったが、組織学的評価では、膵内の abnormal architecture, glandular atrophy, pseudotubular complex, fibrosis という慢性膵炎様変化を認め、半年後には重度の膵萎縮に至った。そのためこのマウスでは急性膵炎の検討には適さないと考えられた。

そこで ElaCre-ER マウスと Atg7 fl/fl マウスを交配し、タモキシフェン誘導性の膵腺房細胞特異的 Atg7 欠損マウスを作成した。このマウスにタモキシフェンを連日7日間投与したところ、タモキシフェン投与開始3日目および7日目の膵臓ではウエスタンブロットにより Atg7 の発現低下は確認できなかった。一方、タモキシフェン最終投与後3日目の膵臓でウエスタンブロットにて Atg7 の発現低下を認めた。今後このタイミングで急性膵炎を惹起させ、急性膵炎時のオートファジー亢進の病態形成に与える影響を検討し、急性膵炎の新規治療標的の研究へと展開していきたい。

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 0件)

[学会発表](計 1件)

2016年5月21日-24日: Digestive Disease Week 2016 San Diego

Poster Session 「Autophagy Impairment in Pancreatic Acinar Cells Induces Accuulation of Zymogen Granules」

5月24日 Kiyoshi Iwahashi, Hayato Hikita, Minoru Shigekawa, Kenji Ikezawa, Ryotaro Sakamori, Tomohide Tatsumi, Tetsuo Takehara

[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]

特記すべきことなし

6. 研究組織

(1)研究代表者

竹原 徹郎(TAKEHARA, Tetsuo)

大阪大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 70335355

(2)研究分担者

巽 智秀(TATSUMI, Tomohide)

大阪大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号: 20397699

(3)研究分担者

疋田 隼人(HIKITA, Hayato)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 20623044

(4)研究協力者

岩橋 潔 (IWAHASHI, Kiyoshi)

大阪大学・大学院医学系研究科・博士課程

大学院生

研究者番号：

(5)研究協力者

末吉 弘尚 (SUEYOSHI, Hironari)

大阪大学・大学院医学系研究科・博士課程

大学院生

研究者番号：