

令和元年6月11日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06804

研究課題名(和文) 膵炎および膵発癌におけるナルディライジンの役割の検討

研究課題名(英文) The functional role of Nardilysin in pancreatitis and pancreatic ductal adenocarcinoma formation

研究代表者

生田 耕三 (Ikuta, Kozo)

京都大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：60802741

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：メタロプロテアーゼの一つであるナルディライジン(Nardilysin, NRDC)は、局在特異的に異なる働きをすることが分かっている。本研究では、膵におけるNrdcの役割について明らかにすることを目的とした。膵特異的Nrdc欠損マウスの膵では、アポトーシス亢進、膵萎縮、腺房導管異形成を伴う慢性膵炎が生じていた。また、Kras変異下においては、膵特異的Nrdc欠損マウスの膵は、膵腫瘍の形成が著明に促進された。このことから、膵のNrdcは膵炎発症を抑制し、膵発癌に抑制的に働くことが分かった。さらに、ヒト膵癌の一部で、NRDCが欠失していることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵炎の一種である遺伝性膵炎は難治性であり、遺伝性膵炎患者は膵癌を発症する確率が非常に高い。また、遺伝性膵炎患者のおよそ30%で、原因遺伝子が解明されていない。そのため、遺伝性膵炎の新規治療法の発見や発生メカニズムの解明が急務である。本研究で、マウスにおいて、膵のナルディライジンが、膵炎発症、膵腫瘍発生に抑制的に働くことが明らかになり、ヒト膵癌の一部でナルディライジンが欠失していた。このことから、ナルディライジンは、遺伝性膵炎およびそれに付随する膵癌治療の新たなターゲットとなる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Nardilysin (NRDC), a zinc peptidase, exhibits multiple localisation-dependent functions. We found that pancreatic deletion of Nrdc leads to spontaneous chronic pancreatitis concomitant with acinar-to-ductal conversion, increased apoptosis and atrophic pancreas in mice. Acinar-to-ductal conversion was observed mainly through a non-cell autonomous mechanism, and the expression of several chemokines was significantly increased in Nrdc-null pancreatic acinar cells. Furthermore, pancreatic deletion of Nrdc dramatically accelerated KrasG12D-driven PanIN and subsequent PDA formation in mice. These data demonstrate a previously unappreciated antiinflammatory and tumour suppressive functions of Nrdc in the pancreas in mice. Finally, absence of NRDC expression was observed in a subset of human PanIN and PDA.

研究分野：消化器内科

キーワード：膵炎 膵癌

1. 研究開始当初の背景

慢性炎症が発癌の母地となることはここ数十年で明らかとなってきている。膵癌でも、発症のリスクファクターの一つに慢性膵炎の罹患が挙げられ、慢性膵炎の一部に、特定の遺伝子の変異による遺伝性膵炎が知られている。一方、膵炎の中には原因不明なものも多く含まれており、膵炎に関連する新たな遺伝子やメカニズムを探索することで、膵炎や膵癌の新規治療につながる可能性がある。

上記の目的に即した新たな分子標的として、申請者らは、本研究において M16 メタロプロテアーゼの一つである Nardilysin(Nrde)に着目した。申請者らのグループは、Nrde が HB-EGF の結合タンパクであることを発見し、その後の研究で、Nrde が ADAM プロテアーゼの活性化を介して、HB-EGF や TNF α などの膜タンパク質前駆体のシェディングを増強することを報告した (EMBO 2001, JBC 2006, BBRC2008)。また Nrde は核内にも移行し、核内で種々の遺伝子の転写制御を行っていることが明らかになった (JBC 2012, Nat commun 2014)。

膵における Nrde の役割はこれまで不明であったが、申請者らのグループは、膵内分泌細胞の Nrde が、核内で Islet1 と協調することにより正常なインスリン分泌に必須であることを近年明らかにした (DIABETES 2016)。しかし、膵外分泌細胞における Nrde の役割は依然不明である。

以上の背景から、申請者らは本研究において、膵外分泌細胞における Nrde の役割を検討し、膵外分泌組織の恒常性維持及び膵発癌における機能的役割について明らかにすることを目的とした。

申請者らは、初めに、マウス膵で膵外分泌細胞の核に Nrde が発現していることを確認した。次いで、膵特異的に Nrde を欠失させたマウス (*Ptfla-Cre; Nrde(flox/flox)*マウス・以下 *Nrde-cKO*マウス) を独自に作製したところ、生後 3 週では WT マウスと *Nrde-cKO*マウスの膵は明らかな違いを認めなかったが、生後 8 週の *Nrde-cKO*膵は著明な萎縮が認められた (図 1)。



(図 1) 生後 8 週の野生型と *Nrde-cKO*マウスの膵。

(左/左中)野生型の膵。

(右中/右)*Nrde-cKO*膵。膵臓の著明な萎縮と腺房導管異形成が認められる。

さらに、生後 5 週頃から、*Nrde-cKO*膵に、アポトーシスの著明な増加、マクロファージを含む白血球の浸潤、線維化の進行を認め、慢性膵炎が自然発生しているという知見が得られた。

以上の結果から、マウスにおいて、膵外分泌細胞の Nrde は膵腺房細胞の維持に必須であり、膵炎の自然発生を抑制することが示された。さらに、膵炎は膵癌の形成・進展を促進することから、申請者らは、『Nrde は膵炎の抑制を介して膵癌の形成を抑制しているのではないかと仮説を立てた。本研究では、その仮説を検証し、膵炎、膵癌における Nrde の役割を明らかにしようと考えた。

2. 研究の目的

慢性膵炎や膵癌に対する新規治療開発へ向けた基礎的知見を得るため、*Nrde-cKO*マウスに自然発生する膵炎を解析し、さらにマウスにおける膵腺房細胞における Nrde 欠失の影響および膵発癌における Nrde の役割を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、膵組織における Nrde の役割を明らかにするため、以下の検討を行った。

(1) *Nrde-cKO*マウスに自然発生する膵炎についての解析

*Nrde-cKO*マウスの膵炎を詳しく解析する。予備的解析で検討したアポトーシス、細胞増殖、炎症細胞の浸潤、線維化等についてさらに詳しく解析した。

(2) 膵腺房細胞における Nrde 欠失の影響の検討

① *Nrdc-cKO* マウス膵に生じる Acinar-to-ductal metaplasia (ADM) が、細胞自律的か非細胞自律的かを検討するため、生後 3 週 of *Nrdc-cKO* マウスの膵から膵外分泌細胞を単離する。単離した膵外分泌細胞の 3 次元培養を行い、*Nrdc* 欠失膵外分泌細胞が細胞自律的に ADM を形成するかどうかを検討した。

② *Nrdc (flox/flox)* マウスから膵外分泌細胞を単離し、Cre タンパクを発現するアデノウイルスベクターを用いて *Nrdc* を欠失させ、間質の影響を受けない *Nrdc* 欠失の膵外分泌細胞組織を作成し解析した。

(3) *Nrdc* が膵癌形成において果たす役割の検討

Kras 変異存在下において、膵特異的に *Nrdc* をノックアウトした *Ptf1a-Cre; Nrdc (flox/flox); Kras^{LSL-G12D}* マウスを作製し解析した。

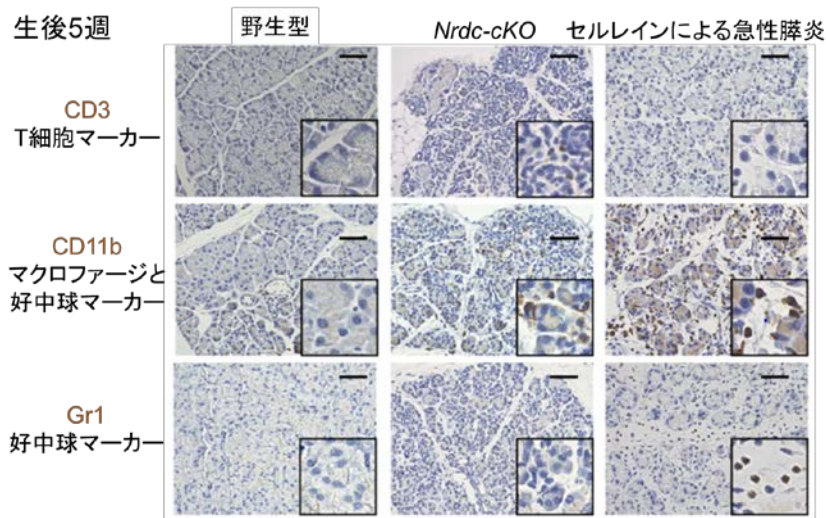
(4) ヒト膵炎、膵癌における *Nrdc* の発現の検討。

当研究室では、ヒトの免疫染色に適した *Nrdc* 抗体の独自開発に成功している。ヒト手術検体の標本を用いて NRDC の免疫染色を行い、正常膵外分泌細胞、PanIN、膵癌における *Nrdc* の発現パターンを調べた。

4. 研究成果

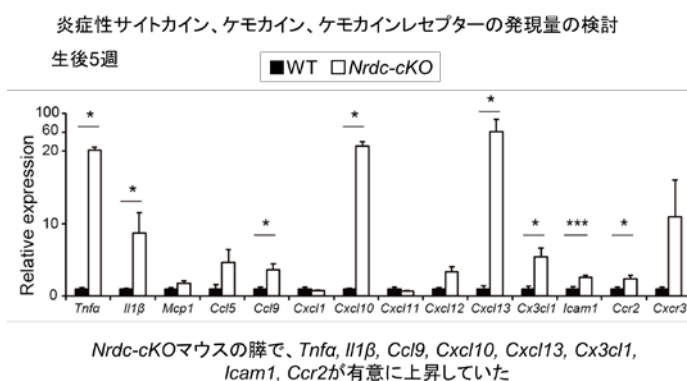
(1) *Nrdc-cKO* マウスに自然発生する膵炎についての解析

HE 染色の結果、F4/80 の免疫染色の結果から、*Nrdc-cKO* マウス膵では慢性膵炎が自然発生していると考えられた。その結果を裏付けるため、T 細胞マーカーである CD3、マクロファージと好中球の共通マーカーである CD11b、好中球マーカーである Gr1 での免疫染色を施行した。*Nrdc-cKO* マウス膵では、T 細胞とマクロファージが浸潤しているが、好中球の浸潤がほぼないことが分かった。この特徴は、既知の、慢性膵炎における間質細胞の浸潤と共通しており、*Nrdc* ノックアウトマウスの膵で慢性膵炎が自然発生していることを裏付ける結果となった(図 2)。



(図 2) 野生型、*Nrdc-cKO* マウス、セルレイン膵炎における、CD3、CD11b、Gr1 の免疫染色。

また、膵から抽出した RNA を用いて、qRT-PCR による定量解析を施行した。その結果、*Nrdc-cKO* マウス膵で、*Tnfa* や *Cxcl10* などの一部の炎症性サイトカインやケモカインが上昇していた(図 3)。慢性膵炎を起こしている *Nrdc-cKO* マウスの膵における遺伝子発現について、さらに網羅的な解析を行うため、生後 5 週 of WT と *Nrdc-cKO* マウスの膵でマイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現解析を行った。GO ontology でパスウェイ解析した結果、*Nrdc-cKO* 膵で免疫や炎症などのシグナルが有意に上昇しており、膵炎発症に関与している、細胞走化性、NF- κ B シグナル、ERK シグナルに関連するパスウェイの遺伝子群が有意に上昇していることが分かった。



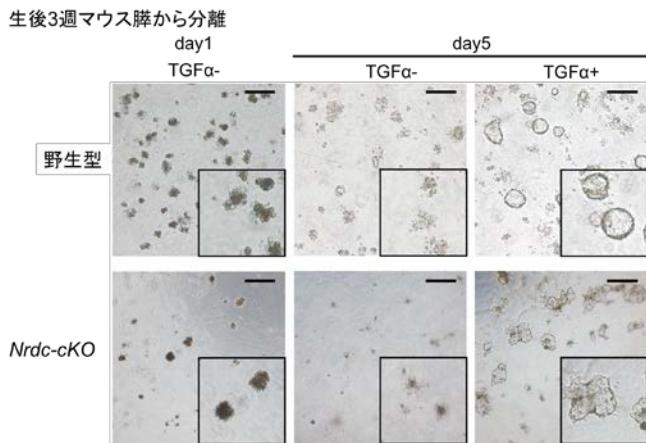
(図 3) 生後 5 週 of 野生型と *Nrdc-cKO* 膵から抽出した RNA の発現量の評価。

以上より、*Nrdc-cKO* マウスの膵では、慢性膵炎が自然発生していることが明らかとなった。

(2) 膵腺房細胞における *Nrdc* 欠失の影響の検討

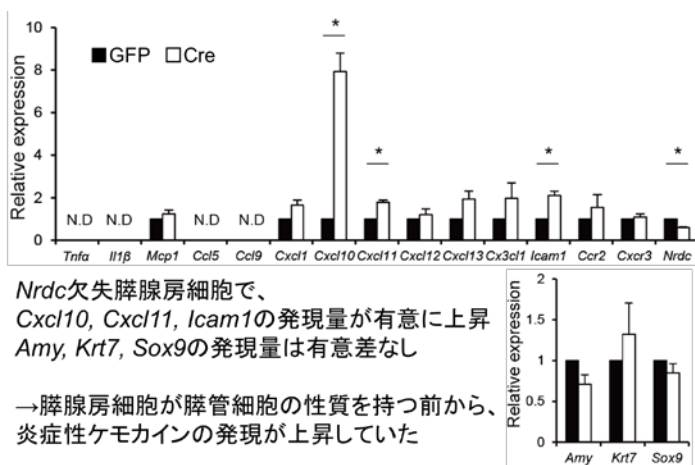
① マウスの膵腺房細胞を分離する acinar cell culture の系は、既に確立されている。マウスの膵を切除し、コラーゲナーゼで分解することにより、クラスター状の膵腺房組織を単離し、単離した膵腺房組織から mRNA やタンパクを抽出し評価することができる。また、分離した膵腺房組織を、コラーゲン内で三次元培養することができる。

生後3週マウスの膵から分離した膵腺房細胞を、コラーゲン内で培養した結果、野生型では、既報通り、5日間の培養後、 $TGF\alpha$ なしでは ADM はほとんど形成されず、培地に $TGF\alpha$ を加えることで多くの ADM が形成された。そして、*Nrdc-cKO* マウスの膵腺房組織でも同様の結果で、 $TGF\alpha$ がなければほとんど ADM はほとんど形成されず、培地に $TGF\alpha$ を加えると多くの ADM が形成された(図4)。このことから *Nrdc-cKO* 膵腺房組織では細胞自律的には ADM が形成されず、*Nrdc* ノックアウトマウスで ADM が起こるのは非細胞自律的なメカニズムによると考えられた。



(図4) 生後3週の野生型(上)と *Nrdc-cKO* マウス(下)の膵から抽出した膵腺房細胞を用いた、コラーゲン内での5日間の培養後の評価。

② さらに、膵腺房組織の *Nrdc* 欠失の影響を調べるために、前述の方法で生後5週 *Nrdc (flox/flox)* マウスの膵腺房組織を単離し、*Cre* リコンビナーゼを含むアデノウイルスベクターを用いて *Cre* タンパクを導入することにより、*Nrdc* を欠失させた膵腺房組織を作成し mRNA を抽出し、*qRT-PCR* でコントロールと比較した。*Nrdc* 欠失膵腺房組織では、*Cxcl10* が大きく上昇しているほか、*Cxcl11*, *Icam1* も優位に上昇していた。また、アミラーゼ、ケラチン7、*Sox9* の発現量を調べたが、これらに有意差は認められなかった。このことから、膵腺房細胞が膵管細胞の性質を持つ前から、*Cxcl10* などのケモカインの発現が上昇していることが分かった(図5)。



(図5) *Nrdc (flox/flox)* マウスから抽出した膵腺房組織に *Cre* を含むアデノウイルスベクターを感染させ、*Cre* タンパクを導入した群(白)と、*GFP* タンパクを導入したコントロール群(黒)の、mRNA 発現量の比較。

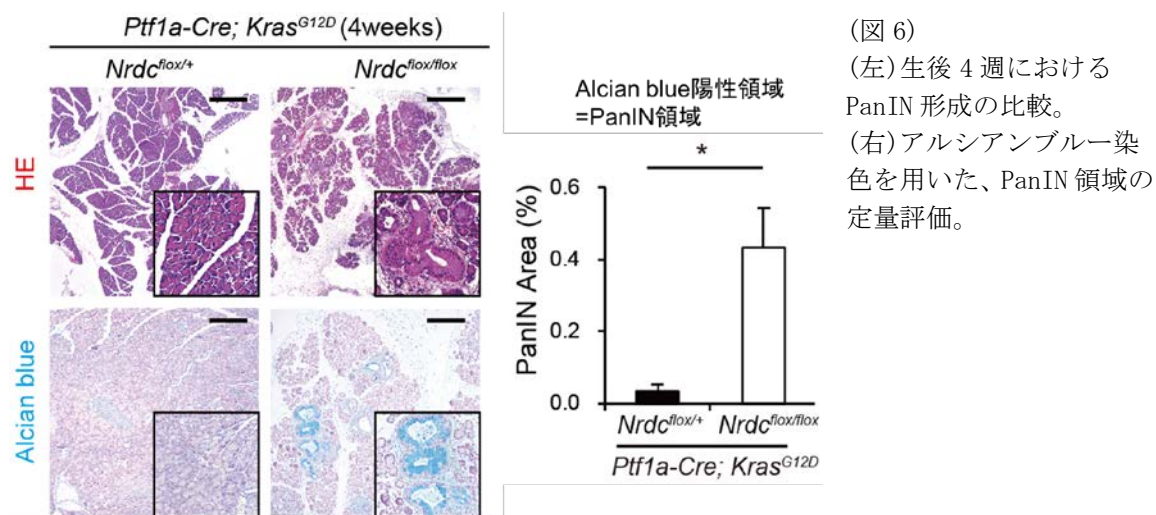
Nrdc 欠失膵腺房細胞で、*Cxcl10*, *Cxcl11*, *Icam1* の発現量が有意に上昇
Amy, *Krt7*, *Sox9* の発現量は有意差なし

→膵腺房細胞が膵管細胞の性質を持つ前から、炎症性ケモカインの発現が上昇していた

(3) *Nrdc* が膵癌形成において果たす役割の検討

膵癌形成における *Nrdc* の役割を明らかにするため、膵上皮細胞特異的に活性化 *Kras* 変異が入り、さらに *Nrdc* を膵特異的にノックアウトした *Ptf1a-Cre; KrasG12D; Nrdc (flox/flox)* マウスを作製した。*Nrdc flox* がヘテロで *Kras* 変異が入ったマウス (*Ptf1a-Cre; KrasG12D;*

Nrdc (*flox/+*)マウスをコントロールとし、比較した。膵癌の前癌病変である PanIN の形成について、生後 4 週で評価した。コントロールである、*Ptf1a-Cre; KrasG12D; Nrdc* (*flox/+*)マウスでは、*Ptf1a-Cre; KrasG12D* マウス同様、この時点では PanIN はほとんど認められなかった。一方、*Ptf1a-Cre; KrasG12D; Nrdc* (*flox/flox*)マウスでは、4 週の時点ですでに PanIN の形成が認められた。PanIN の粘液部位を評価するアルシアンブルー染色を用いた定量解析でも、やはり、*Ptf1a-Cre; KrasG12D; Nrdc* (*flox/flox*)マウスの膵で PanIN 形成が有意に促進されていることが分かった(図 6)。



(図 6)
 (左)生後 4 週における PanIN 形成の比較。
 (右)アルシアンブルー染色を用いた、PanIN 領域の定量評価。

さらに、*Ptf1a-Cre; KrasG12D; Nrdc* (*flox/flox*)マウスの膵では、線維化領域が著しく増え、一視野当たりのマクロファージの数は非常に増加していた。以上より、*Ptf1a-Cre; KrasG12D; Nrdc* (*flox/flox*)マウスでは、線維化を伴った PanIN の形成が亢進していることが分かった。

(4) ヒト膵炎、膵癌における *Nrdc* の発現の検討。

最後に、ヒトの ADM、PanIN、膵癌における NRDC の発現について免疫染色で検討した。その結果、膵腺房細胞の核には、すべて NRDC が発現していた。一方、ADM、PanIN、膵癌では、NRDC が発現している検体と発現していない検体があった。ADM、PanIN、膵癌に NRDC が発現していない頻度はそれぞれ 43%、51%、53%であり、以上の結果から、ヒトにおいても、ADM、PanIN、膵癌の形成に、NRDC の発現消失が寄与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Kozo Ikuta, Akihisa Fukuda, Satoshi Ogawa, Kenji Masuo, Norihiro Goto, Yukiko Hiramatsu, Motoyuki Tsuda, Yoshito Kimura, Yoshihide Matsumoto, Yuto Kimura, Takahisa Maruno, Keitaro Kanda, Kiyoto Nishi, Kyoichi Takaori, Shinji Uemoto, Shigeo Takaishi, Tsutomu Chiba, Eiichiro Nishi, Hiroshi Seno

Nardilysin inhibits pancreatitis and suppresses pancreatic ductal adenocarcinoma initiation in mice

Gut. 2019 May;68(5):882-892. doi: 10.1136/gutjnl-2017-315425. Epub 2018 May 24.

〔学会発表〕(計 5 件)

- ① Kozo Ikuta, Akihisa Fukuda, Hiroshi Seno
 Nardilysin functions as a tumor suppressor in pancreatic ductal adenocarcinoma through maintaining acinar cell differentiation and suppressing pancreatitis.
 第 25 回日本消化器関連学会週間 2017 年 10 月 12 日 福岡
- ② 生田 耕三、福田 晃久、津田 喬之、丸野 貴久、神田 啓太郎、西 英一郎、妹尾 浩
 ナルディライジンは膵炎の自然発生抑制を介して、膵発癌を抑制する
 第 76 回日本癌学会学術総会 2017 年 9 月 29 日 横浜
- ③ 生田 耕三、福田 晃久、小川 智、増尾 謙志、後藤 規弘、平松 由紀子、津田 喬之、木村 佳人

松本善秀, 吉岡拓人, 丸野貴久, 西英一郎, 妹尾浩

ナルディライジンは膵外分泌細胞の維持, 膵炎の抑制を介して, 膵発癌を抑制する

第 48 回日本膵臓学会大会 2017 年 7 月 15 日 京都

- ④ Kozo Ikuta, Akihisa Fukuda, Satoshi Ogawa, Kenji Masuo, Norihiro Goto, Yukiko Hiramatsu, Motoyuki Tsuda, Yoshito Kimura, Yoshihide Matsumoto, Yutaka Takada, Takuto Yoshioka, Takahisa Maruno, Kyoichi Takaori, Shinji Uemoto, Eiichiro Nishi, Hiroshi Seno

Nardilysin functions as a tumor suppressor in pancreatic ductal adenocarcinoma through maintaining acinar cell differentiation and suppressing pancreatitis

DDW 2017 2017 年 5 月 6 日 アメリカ シカゴ

- ⑤ 生田耕三, 福田晃久, 妹尾浩

代謝、炎症、発癌を制御する因子 Nardilysin の可能性

第 103 回日本消化器病学会総会内第 1 回消化器臓器間ネットワーク附置研究会

2017 年 4 月 21 日 東京

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※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。