

平成 22 年 4 月 14 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006 ～ 2009

課題番号：18590752

研究課題名（和文）膵線維化の新しい機序の解明と膵癌上皮細胞・間葉系細胞転換誘導に関する研究

研究課題名（英文） Novel mechanisms of pancreatic fibrosis and epithelial to mesenchymal transition in pancreatic diseases.

研究代表者

清水 京子（SHIMIZU KYOKO）

東京女子医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90187451

研究成果の概要（和文）：

膵星細胞は膵炎の線維化や膵癌における desmoplastia の中心的役割を果たす細胞である。本研究では膵星細胞には貪食能、toll-like receptor(TLR)を介する機序がある一方、MHC class II の発現がなく獲得免疫による T 細胞活性化には関与しないことが明らかになった。貪食した膵星細胞は液性因子を介して膵癌細胞の増殖、浸潤、遊走能を抑制し、膵癌上皮細胞・間葉系細胞転換誘導を抑制する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Pancreatic stellate cells (PSCs) play a pivotal role in pancreatic fibrogenesis in chronic pancreatitis and in the desmoplastic reaction in pancreatic cancer. We demonstrated that PSCs are associated with phagocytosis and innate immunity via toll-like receptors, but not with acquired immunity via MHC class II. PSCs that engulfed dead cells inhibited proliferation, invasion, and chemotaxis by pancreatic cancer cells in a manner that was mediated by luminal factors released by PSCs, suggesting that the phagocytic function of PSCs modulates the epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,500,000	0	1,500,000
2007 年度	700,000	210,000	910,000
2008 年度	700,000	210,000	910,000
2009 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
総計	3,600,000	630,000	4,230,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、消化器内科学

キーワード：膵臓病学

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 膵星細胞は膵腺房、導管、血管の周囲に存在する紡錘形の細胞で、酸化ストレスや種々のサイトカイン刺激によって静止期膵星細胞が活性化膵星細胞に形質転換し、細胞外基質、ケモカイン、接着分子などを産生し、膵臓の線維化の中心的役割を果たす。我々は過去の研究で、PPAR $\gamma$ リガンドが膵星細胞の活性化を抑制することで慢性膵炎の線維化が抑制されることを報告した。

(2) 膵癌は高度に線維化した desmoplastic reaction を有するという特徴がある。膵癌の desmoplastic reaction にも活性化膵星細胞が関与し、膵星細胞から産生される細胞外基質、その分解酵素である matrix metalloproteinase、増殖因子などが膵癌細胞の増殖、浸潤、転移を促進するように作用し、膵癌と膵星細胞は膵癌の進行に対して相補的に作用する。膵癌は浸潤、転移には上皮細胞・間葉系細胞転換誘導 (EMT) が関与する。

(3) 貪食は生体に悪影響を及ぼす死細胞、異物を排除し、生体の恒常性を保つために重要な作用である。肝臓には組織マクロファージであるクッパー細胞が存在するが、膵臓にはランゲルハンス島以外の部位に組織マクロファージは存在しない。膵星細胞に非常に類似した性質をもつ肝星細胞にはマクロファージのような貪食作用があることが報告されている。

## 2. 研究の目的

(1) 膵炎では膵腺房細胞はアポトーシスやネクローシスとなるが、細胞死に陥った膵腺房細胞がどのように処理されるかについては明らかではない。本研究では、膵星細胞の貪食作用について検討し、膵星細胞の貪食作用が膵炎の病態にどのように関わるかについて検討した。

(2) 膵疾患の病態には様々な免疫機構が関与しているが、膵星細胞が自然免疫、獲得免疫にどのように関わるかについては不明である。本研究では、膵星細胞の免疫機能における役割について検討した。

(3) 膵星細胞が膵癌の進行を促進することが知られているが、本研究では膵癌の EMT における膵星細胞の関与について検討した。

## 3. 研究の方法

(1) 急性膵炎、慢性膵炎ラットモデルを用いた膵星細胞の貪食作用の証明  
ラットの膵管を結紮して急性膵炎を作成し、また、自然発症慢性膵炎モデルとして WBN/Kob ラットを用いた。膵組織を glial

fibril acidic protein (GFAP)、 $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA)の特異抗体を用いて免疫組織染色を行い、細胞質に異物を貪食した細胞が膵星細胞であることを確認した。

(2) 膵星細胞によるアポトーシス好中球の貪食に関する検討

ラットの膵臓より膵星細胞を分離し、第2・4継代の活性化膵星細胞を使用した。また、ラットの血液より好中球を分離し、24時間培養にてアポトーシスを誘導した。膵星細胞とアポトーシス好中球を共培養し、以下の実験を行った。

膵星細胞に取り込まれたミエロペルオキシダーゼ (MPO) 染色陽性の好中球数にて貪食能を評価した。貪食能に対する PPAR ligand、TNF-、IL-1、TGF- による貪食好中球数を測定した。また、蛍光標識したラテックスビーズを膵星細胞に投与し、フローサイトメトリーにて貪食された蛍光ビーズ数を測定した。

核内転写因子 PPAR $\gamma$ の標的遺伝子産物の一つである CD36 発現についてフローサイトメトリーを行い、また、PPAR $\gamma$  siRNA を用いて内因性 PPAR 活性を抑制することで、膵星細胞の貪食における内因性 PPAR $\gamma$ の関与について検討した。

貪食した膵星細胞の増殖能と $\alpha$ -SMA 発現の変化について検討した。

(3) 膵星細胞によるネクローシス膵腺房細胞の貪食に関する検討

膵腺房細胞を48時間培養し、ネクローシスを誘導し、膵星細胞と共培養し以下の実験を行った。

ネクローシスとなった膵腺房細胞を蛍光標識した annexin V と PI にて二重染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察し、貪食を確認した。貪食後の膵星細胞の増殖能、 $\alpha$ -SMA 発現を測定した。

膵腺房細胞を貪食した膵星細胞の上清を採取し、貪食していない膵星細胞に投与し、培養液に遊離した物質による膵星細胞活性化への影響について検討した。

貪食した膵星細胞の培養液中の TGF- $\beta$ 濃度を ELISA にて測定した。

(3) 膵星細胞の膵癌細胞に及ぼす影響についての検討

通常型膵管癌では膵管閉塞による尾側膵炎を合併することが多い。そこで、ネクローシス膵腺房細胞を貪食した膵星細胞の培養液を用いて膵癌細胞株 (Panc-1, Mia-Paca2, AsPc, BxPc) を培養し、48時間後の細胞増殖能、遊走能、浸潤能の変化を検討した。また、培養液中の TGF- $\beta$ 濃度を ELISA 法にて測定し、培

養液中に TGF- $\beta$  中和抗体を添加し、膵癌細胞株の増殖能の変化を検討した。

(4) 膵星細胞の活性化における自然免疫の関与についての検討

ラット膵星細胞における toll-like receptor (TLR) 2,4 の発現についてウェスタンブロットを行ったのち、*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) *Streptococcus pyogenes* (*S. pyogenes*)、*Streptococcus faecalis* (*S. faecalis*) 由来のリポタイコ酸 (LTA)、*Escherichia coli* (*E. coli*) 由来の lipopolysaccharide (LPS) を添加し、 $\alpha$ -SMA 発現と、分泌されたコラーゲン濃度を測定した。また、TLR2、TLR4 の中和抗体を投与し、膵星細胞に対するこれらの物質の影響が TLR2,4 を介するものであるかを検討した。

(5) 膵星細胞の活性化における獲得免疫の関与についての検討

ヒトあるいはラットの PSC を分離、培養後、FITC で標識した ovalbumin (OVA) を投与し、PSC 内への endocytosis について検討した。また、GM-CSF、INF- $\gamma$ 、IL-4、ionomycin、PMN、あるいは FITC-OVA で PSC を刺激し、ラットでは MHC class I と MHC class II を、ヒトでは HLA-DR を flow cytometry にて、また、MHC class II  $\alpha$  chain と  $\beta$  chain 遺伝子発現を RT-PCR にて測定した

#### 4. 研究成果

(1) 膵管結紮による急性膵炎モデルで、間質の浮腫、炎症細胞浸潤などの急性膵炎所見が認められ、TUNEL 陽性のアポトーシス細胞を取り込んだ活性化膵星細胞が確認された。また、WBN/Kob ラットでは褐色色素を細胞質に貪食した細胞が腺房周囲および間質に認められ、

$\alpha$ -SMA、GFAP 陽性であることから活性化膵星細胞と考えられた。免疫電顕でも貪食物質を取り込んだ細胞の細胞質に  $\alpha$ -SMA、GFAP 陽性線維が確認された。正常ラットでは膵星細胞による貪食は認められなかった。In vitro の検討で、活性化膵星細胞に MPO 陽性の好中球が貪食され、無血清下に比べて血清存在下で貪食能は亢進した。培養液中に TGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-1 を添加すると貪食能は有意に減少した。蛍光標識ビーズを用いた貪食能の検討でも、TGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-1 により貪食能の抑制が確認された。また、PPAR $\gamma$  ligand にて貪食能は亢進し、PPAR $\gamma$  siRNA で内因性 PPAR $\gamma$  を抑制すると貪食能の低下と CD36 の発現が低下したことから、PPAR $\gamma$  ligand は活性化膵星細胞の CD36 を介して貪食を促進することが明らかになった。

【結論】正常膵における膵星細胞では貪食能は認められなかったが、急性膵炎および慢性膵炎確認された。また、TGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-1 は膵星細胞の線維化を促進するが、貪食能

は抑制した。膵星細胞は線維化とともに貪食作用を示すことによって、炎症時の恒常性維持を担う可能性が示唆された。

(2) 膵星細胞の細胞質内にネクローシスを起こした膵腺房細胞の取込みが認められ、貪食後 12 時間後の膵星細胞数は有意に減少し、 $\alpha$ -SMA 発現も低下し、これは貪食後に膵星細胞自信の細胞死が誘導されることが明らかになった。一方、貪食 48 時間後の膵星細胞数は増加傾向にあり、12 時間後に比べ 48 時間後で  $\alpha$ -SMA 量は増加していた。さらに、貪食させた膵星細胞の上清を添加すると、12 時間後では細胞数は有意に減少するが 48 時間後では有意差は認めなかった。上清内の TGF- $\beta$  を測定したところ両者に差は認めなかった。

【結論】膵星細胞はアポトーシスを起こした膵腺房細胞を貪食することにより細胞数が減少し、膵星細胞自体が細胞死をおこして傷害された腺房細胞を除去するように作用する。その後液性因子以外の膵星細胞内からの何らかのシグナルによって、膵星細胞は筋線維芽様細胞へ活性化され、膵線維化を促進すると考えられた。

(3) ネクローシスを誘導した膵腺房細胞を貪食した膵星細胞の培養液を正常の膵星細胞に投与すると、非貪食膵星細胞の培養液投与と比較して、Panc-1、Mia-Paca2、BxPc の増殖能は有意に抑制され、Panc-1、BxPc、AsPc の遊走能と浸潤能も有意に抑制された。培養液中の TGF- $\beta$  濃度は膵腺房細胞の貪食の有無で変化はなく、TGF- $\beta$  中和抗体を添加しても増殖能、遊走能、浸潤能の抑制に変化は認められなかった。

【結論】膵星細胞は傷害された膵星細胞を貪食し、膵星細胞から遊離した TGF- $\beta$  以外の何らかの物質を介して膵癌細胞株の増殖能、遊走能、浸潤能を抑制し、膵癌の EMT を抑制する方向に作用すると考えられる。

(4) 膵星細胞には TLR2, 4 の発現があり、LTA や LPS を投与することで膵星細胞の活性化が亢進した。また、LTA、LPS による膵星細胞の活性化はそれぞれ TLR2、TLR4 抗体によって膵星細胞の活性化は有意に抑制された。グラム陽性球菌感染のヒトの膵臓では膵臓の間質に LTA の分布がみられることから、グラム陰性桿菌感染以外にグラム陽性球菌感染でも膵星細胞を活性化し、膵線維化を亢進すると可能性が示唆された。

【結論】膵線維化の増悪因子のひとつとしてグラム陽性球菌感染症を考慮する必要があると思われる。

(5) ラット膵星細胞では MHC class I 発現を認めたが、GM-CSF、INF- $\gamma$ 、IL-4、ionomycin、

PMN のいずれの刺激によっても MHC class II の発現は誘導されなかった。また、Dual-color flow cytometry で OVA は膵星細胞の 95% 以上に取り込みを認めたが、MHC class II 発現の誘導はなかった。MHC class II  $\alpha$  chain と  $\beta$  chain は遺伝子発現レベルでも確認されなかった。同様に、ヒトの膵星細胞においても、GM-CSF、INF- $\gamma$ 、IL-4、ionomycin、PMN 刺激は、HLA-DR 発現を誘導しなかった。

【結論】膵星細胞における MHC class II 分子の発現は各種刺激によっても誘導されなかった。膵星細胞とほぼ同様の性質を有する肝星細胞は MHC class II を介して抗原提示細胞として T リンパ球を活性化することが報告されているが、膵星細胞は肝星細胞と異なり抗原提示細胞として細胞性免疫への関与はないと思われる。

#### 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 24 件)

1. Morishita K, Shimizu K, MD, Haruta I, Kawamura S, MD, Kobayashi M, Shiratori K. Engulfment of gram-positive bacteria by pancreatic stellate cells in pancreatic fibrosis. *Pancreas* 2010(in press). 査読有り
2. 清水京子、白鳥敬子。II 慢性膵炎、1 疫学と症候。日本内科学会雑誌 99: 36-40, 2010 査読なし
3. Shimizu K, Watanabe S, Watanabe S, Matsuda K, Suga T, Nakazawa S, Shiratori K. Efficacy of oral administrated superfine dispersed lentinan for advanced pancreatic cancer. *Hepatology* 56: 240-244, 2009 査読有り
4. 清水京子、白鳥敬子。家族歴を中心とした膵癌発生の危険因子の検討。消化器科 49: 520-525, 2009 査読なし
5. Shimizu K. Mechanism of pancreatic fibrosis and applications to the treatment of chronic pancreatitis. *J Gastroenterol* 43: 823-832, 2008 査読有り
6. Tahara J, Shimizu K, Shiratori K. Engulfment of necrotic acinar cells by pancreatic stellate cells inhibits pancreatic fibrogenesis. *Pancreas* 37: 69-74, 2008. 査読有り
7. Shimizu K. Pancreatic stellate cells: Molecular mechanism of pancreatic fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol* 23: Supple 1: S119-S121, 2008 査読有り
8. 清水京子、白鳥敬子。膵外分泌機能と膵機能調節ペプチド分泌における糖代謝の役割胆膵の生理機能 24: 29-32, 2008 査読有り
9. 中島文香、清水京子、白鳥敬子。膵癌の疫学と危険因子。内科 102, 640-647, 2008 査読無し
10. 白鳥敬子、大橋美穂、清水京子。膵臓癌とサーベイランス 臨床診断の立場から。消化器癌 28, 1047-1051, 2008 査読なし
11. Takayama Y, Shimizu K, Shiratori K. Effect of endogenous insulin on bicarbonate and amylase secretion. *J Tokyo Wom Med Univ* 77: 501-506, 2007 査読有り
12. 清水京子、渡辺真也、渡辺晴司、松田健司、須賀哲也、中澤三郎。免疫賦活成分 Lentinan (  $\beta$ -1,3-Glucan) 含有食品の切除不能および再発膵癌患者における安全性および有用性の検討。Biotherapy 21 (3), 187-195, 2007 査読有り
13. 清水京子。慢性膵炎における膵線維化機序と治療。最新医学 62: 1895-1990, 2007 査読なし
14. 清水京子。PPAR $\alpha$ 。特集 膵星細胞。肝胆膵 55: 1247-1254, 2007 査読なし
15. 清水京子、白鳥敬子。PAR (protease-activated receptor) とは。消化器科 44: 90-94, 2007 査読なし
16. 田原純子、清水京子、小西洋之、羽鳥 隆、白鳥敬子。輸入脚症候群による重症急性膵炎の一例。膵臓 22: 698-702, 2007 査読あり
17. 田原純子、清水京子、白鳥敬子。「アミラーゼが高い」と言われた。診断と治療 95: 404-407, 2007. 査読なし
18. 白鳥敬子、清水京子。急性膵炎と成分栄養療法。医学と薬学 27: 134-140, 2007 査読なし
19. 清水京子。膵の線維化機構-膵星細胞をめぐって。日消誌 103: 924-930, 2006. 査読なし
20. 清水京子。膵線維化治療への応用-特に PPAR $\alpha$  agonist について-。胆と膵 27: 737-742. 2006 査読なし
21. 清水京子。膵線維化と PPAR $\alpha$  の関わり。医学と薬学 56: 515-521, 2006 査読なし
22. Nishino T, Toki F, Oyama H, Shimizu K, Shiratori K. Long-term outcome of autoimmune pancreatitis after oral prednisolone therapy. *Internal Medicine*. 45(8):497-501, 2006. 査読あり
23. 田原純子、清水京子、平山浩美、前出幸子、小山祐康、中村真一、羽鳥 隆、白鳥敬子。重症急性膵炎に伴う膵仮性嚢胞が脾と胃に穿破した一例。膵臓 21: 358-364, 2006.

査読あり

24. 前出幸子、清水京子、高山敬子、白鳥敬子。膵癌・胆道癌の診断と治療-最新の研究動向-膵癌と慢性膵炎との鑑別診断。日本臨床 64、170-174、2006 査読あり

〔学会発表〕(計7件)

1. 清水京子、高山敬子、白鳥敬子。家族歴を中心とした膵癌発症の危険因子の検討。第95回日本消化器病学会総会 ワークショップ 5、膵癌及び胆管癌の予防、日本消化器病学会総会1、2009年5月7日~9日 札幌、

2. Shimizu K, Tahara J, Morishita K, Shiratori K, Kobayashi M. Gram-Positive Bacterial Infection Promotes Pancreatic Fibrogenesis. Joint meeting of the European Pancreatic Club and the International Association of Pancreatology. June 25-28, 2008, Lodz, Poland. Pancreatology 8: 303, 2008.

3. Shimizu K, Morishita K, Haruta I, Shiratori K, Kobayashi M. Gram-Positive Infection Provokes Pancreatic Fibrogenesis. Gastroenterology 134, A-586, 2008. Digestive Disease Week and 109<sup>th</sup> Annual Meeting of the AGA Institute, May 17-22, 2008, San Diego, CA.

4. Shimizu K, Tahara J, Morishita K, Shiratori K. Engulfment of damaged cells by pancreatic stellate cells modulates the invasive activity of pancreatic cancer cell lines. Digestive Disease Week and Annual Meeting of the AGA Institute, May 2007, Washington DC

5. Shimizu K. Pancreatic stellate cell: molecular mechanism of pancreatic fibrosis. 2<sup>nd</sup> International Symposium on alcoholic liver and pancreatic diseases and cirrhosis. Kobe October 18-19, 2007

6. 清水京子。膵線維化機序の解明と新しい治療法の可能性。第24回日本胆膵生理機能研究会 特別講演、金沢、2007年6月23日

7. Shimizu K, Tahara J, Shiratori K. Engulfment of apoptotic bodies by pancreatic stellate cells attenuates pancreatic fibrogenesis. 14<sup>th</sup> UEGW, Berlin, Gut supplement NOV 55, A75, 2006

〔図書〕(計5件)

1. Shiratori K, Shimizu K. Insulo-acinar relationship. The Pancreas second edition 'an integrated textbook of basic science, medicine, and surgery' Blackwell Publishing p136-142, 2008

2. 大橋美穂、清水京子、白鳥敬子。第2章

慢性膵炎、概念・定義と疫学。最新医学別冊。新しい診断と治療のABC 54、膵炎・膵癌。最新医学社 p61-71, 2008

3. 白鳥敬子、清水京子、高山敬子、鈴木大輔。急性膵炎患者の治療と看護。生活習慣病ナーシング 6 消化器生活習慣病 メヂカルフレンド社、p76-110, 2008

4. 田原純子、清水京子、白鳥敬子。急性膵炎。消化器疾患ガイドライン-最新の治療指針-「今月の治療」第13巻臨時増刊号、編集：高橋信一。総合医学社。p215-219, 2006.

5. 田原純子、清水京子、白鳥敬子。慢性膵炎、膵石症。図解 消化器内科学テキスト。編集 井廻道夫、日比紀文。中外医学社 p415-418, 2006

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

清水 京子 (SHIMIZU KYOKO)

東京女子医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90187451