

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18790968
 研究課題名（和文） PSTI 欠損に伴い発生する生物学的諸現象（オートファジー細胞死、膵炎）の機構解析
 研究課題名（英文） Analysis of PSTI; beyond the trypsin inhibitor

研究代表者

大村谷 昌樹（OHMURAYA MASAKI）
 熊本大学・大学院先導機構・特任助教
 研究者番号：60398229

研究成果の概要：

トリプシノーゲンの異所性（膵内）活性化（トリプシン生成）にひきつづいて生じる連鎖的な諸プロテアーゼの活性化によって、膵の構成細胞が自己消化されるに至るという機構が、膵炎の主要な発症機構と考えられている。我々が樹立した膵分泌性トリプシンインヒビター欠損マウスの膵腺房細胞で誘導されるオートファジー（自食作用）の役割を解析する目的で、膵臓腺房細胞で特異的にオートファジーが欠失するマウスを作製した。このマウスは生理的条件下では異常は示さないが、セルレインで膵炎刺激を誘導すると、抵抗性を示した。さらに単離した膵腺房細胞に細胞内トリプシン活性化刺激を加えると、トリプシンの活性化がほとんど検出されることが判明した。このことは腺房細胞内トリプシン活性化、つまり、膵炎発症機構にオートファジーが重要な役割を担っていることを示している。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,400,000	0	1,400,000
2007 年度	800,000	0	800,000
2008 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	210,000	3,110,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：PSTI, Psti knockout mice, Autophagy, Pancreatitis

1. 研究開始当初の背景

1996 年に Whitcomb らは、遺伝性膵炎患者のゲノム DNA よりカチオニックトリプシノーゲンの点突然変異を発見し、この変異によりトリプシンが自己分解に抵抗性を獲得し、持

続的なトリプシン活性化を生じるとの膵炎の発生機序に分子レベルでの仮説を提唱した。

一方で、ヒト膵内にはトリプシンインヒビターである膵分泌性トリプシンインヒビター

ー (Pancreatic Secretory Trypsin Inhibitor : PSTI) が存在している。PSTI は膵臓内で活性化したトリプシンを阻害することにより、トリプシンによって引き起こされるさまざまな酵素前駆体の連鎖的活性化を抑え、膵臓を自己消化から守る役割を負っていると考えられている。つまりトリプシンの異常のみではなく、PSTI に異常があって活性型トリプシンに PSTI が結合できず、膵炎を発症するという仮説が考えられる。

そこで当大学消化器外科において家族性膵炎の *PSTI* 遺伝子の変異検索を行った。その結果、2つのアミノ酸置換を伴う変異を認め、報告した。

さらに個体レベルで、PSTI と遺伝性膵炎との関連を調べる目的で、われわれは *Psti* 欠損マウスを樹立した。このマウスでは膵腺房細胞 (外分泌細胞) の空胞変性が胎生 16.5 日より始まり、出生後その空胞変性がさらに著しくなった。空胞の正体はオートファゴゾームおよび、オートファゴゾームとリソソームが融合したオートリソソームであり、オートファジー (自食作用) が亢進していることが明らかとなった。出生後 3 日には成熟した腺房細胞が消失したが、その細胞死の形態はアポトーシスでもネクローシスでもない、オートファジー細胞死であることが判明した。このマウスには著しい成長障害がみられ、出生後 3~10 日で致死となった。死因は膵外分泌不全による消化吸収障害によるものと考えられた。膵腺房細胞内におけるトリプシン活性を調べた結果、当初の予想通り、著しいトリプシンの活性化が確認された。以上の結果より 本来膵臓内では安定型と考えられていたトリプシノーゲンが、腺房細胞内で比較的容易に活性化されている (しかも胎生期から) 腺房細胞内でトリプシンの活性を制御する唯一のインヒビターが PSTI である、

ことが証明され、*PSTI* 遺伝子の点突然変異と遺伝性膵炎の関連が示唆された。

2. 研究の目的

(1) *Psti* 欠損腺房細胞及び急性膵炎におけるオートファジーの役割

(2) *Psti* 欠損膵腺房細胞におけるオートファジーの誘導機構

(3) *PSTI* の遺伝子変異が遺伝性膵炎の原因遺伝子となりえるのか、

を、様々な遺伝子改変マウスを作製し、*in vivo* における解析を目的とした。

3. 研究の方法

(1) *Psti* 欠損腺房細胞及び急性膵炎におけるオートファジーの役割・・・*Psti* 欠損マウスや急性膵炎マウスの膵腺房細胞においてオートファジーが誘導されるが、その役割は全く不明である。オートファジー欠損マウスは生後1日以内に死亡してしまうため、膵炎の実験が不可能である。

そのため、まず膵腺房細胞で特異的に働く *Rat elastase1 promoter* 遺伝子の下流に *Cre* 遺伝子結合したプラスミドを作製し、マイクロインジェクション法で受精卵に導入した。

次に腺房細胞特異的に *Cre* 蛋白を発現するマウスの作製を行った (*Rat elastase1 promoter-Cre gene transgenic mouse*)。このマウスと *conditional Atg5* 欠損マウス (東京医科歯科大学・水島昇博士より提供) と交配し、膵腺房細胞特異的オートファジー欠損マウスを樹立した。膵腺房細胞におけるオートファジーの生理的意義、またこのマウスに膵炎誘発刺激をかけた際の膵の変化により、オートファジーの役割を調べた。

(2) *Psti* 欠損膵腺房細胞におけるオートファジーの誘導機構・・・実験性膵炎マウスと *Psti* 欠損マウスにおけるオートファジー誘導の程度は明らかに異なっており、*Psti* がオート

ファジーを負に制御している可能性を示唆している。オートファジーの制御機構についてはまだよく知られていないのが現状であるが、mTORの関与が大きいことは知られていることから、*Psti*欠損豚を用いて、主にmTORの活性の有無を中心に解析を行った。

(3) *PSTI* の遺伝子変異が遺伝性膵炎の原因遺伝子となりえるのか・・・*Psti*欠損マウスが出生後早期に死亡してしまったため、*PSTI*の変異が遺伝性膵炎の原因遺伝子か否かの決着が着いていない。この問題を解決するために、ヒト*PSTI*遺伝子の野生型cDNA、2つの変異*PSTI* cDNAを

- (1)膵臓腺胞細胞で特異的に働くRat elastase 1 promoterの下流に連結して、transgenic miceを作製した(計3系統)。
- (2)Cre-loxシステムを用いて、内在性の*Psti* プロモーターの下流に置換した(計3系統)。

4. 研究成果

(1) *Psti* 欠損腺房細胞及び急性膵炎におけるオートファジーの役割・・・まずオートファジーが急性膵炎でも見られる現象であるのか否かの検討を行った。マウス膵炎モデルを作製し、電顕で観察を行うと腺房細胞の細胞質内に多数のオートファゴソームが確認され、さらに膵炎の重症度に比例して、オートファジーが亢進することがオートファジー特異的プローブを用いて初めて証明された。

上述のように全身でオートファジー必須遺伝子である*Atg5*を欠失したマウスは出生直後に死亡してしまうため、膵腺房細胞特異的*Atg5*欠損マウスを樹立した(文献1, 2)。このマウスは生理的条件下では現在2年まで観察を行っているが、肝臓や神経細胞で見られた異常蛋白の凝集は見られず、ほぼ正常であった。

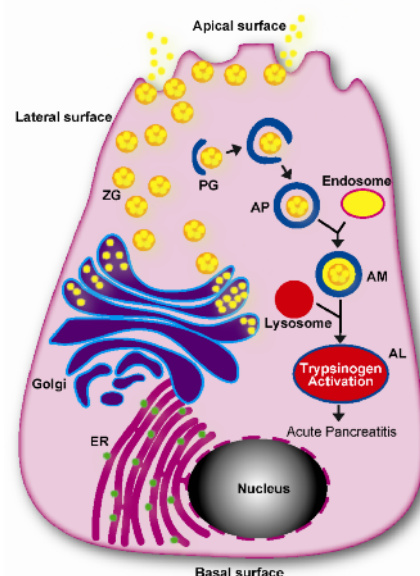
それではこのマウスにセルレイン(コレシストキニンのアナログ)膵炎刺激を加えたら

重症度はどのように変わるだろうか? オートファジーは異常(危険)な蛋白を除去する働きがある。異常に活性化されたトリプシンを除去しているとすると、オートファジーが欠損することで、その安全装置がなくなってしまうため、より重症化することが予想される。しかしオートファジーは細胞内容物をリソソーム酵素を介して分解している。腺房細胞内では、オートファジーがカテプシンBなどのリソソーム酵素とトリプシノーゲンの出会いの場を仲介している可能性もある。この仮説の場合、オートファジーが欠損するとトリプシノーゲンとリソソーム酵素の出会いが、阻止されるため、膵炎が発症しない可能性がある。

実際には急性膵炎はかなり抑制され、このマウスでは膵炎で通常見られる空胞変性が観察されなかった。

さらに単離した*Atg5*欠損腺房細胞をセルレインを加えた培地中で培養し、トリプシン活性を測定したところ、細胞内トリプシン活性が著しく抑制されていることも判明し、後者の仮説、つまりオートファジーはトリプシノーゲンとリソソーム酵素の出会いを仲介することで、膵炎発症に関わっていることが証明された。

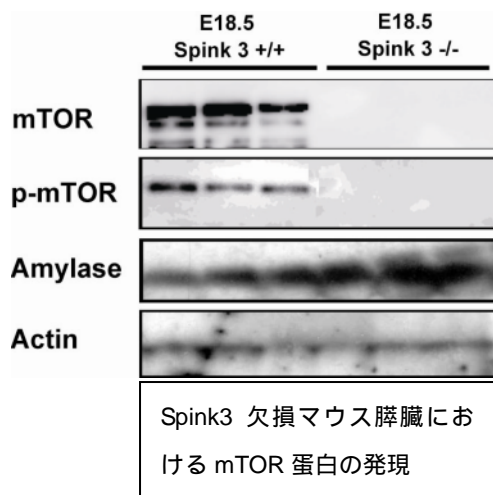
膵炎発症とオートファジーの模式図



(2) Psti欠損膵腺胞細胞におけるオートファジーの誘導機構

Psti欠損マウスの胎生18.5日より膵臓を用いてウエスタンブロッティングでmTORおよびリン酸化mTORの実験を行ったところ、図に示すようにmTORおよびリン酸化mTORともに欠失していた。

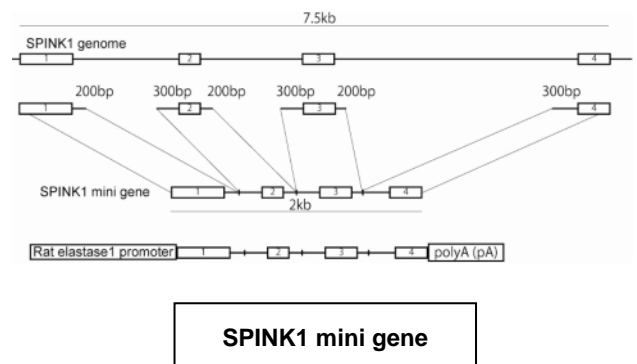
mTORの上流のシグナルはPI3K-AKT経路を介する、Spink3欠損膵ではAKT蛋白も欠損しており、これまで膵臓ではトリプシンインヒビターとして認識されてきたSpink3には、mTORを介したオートファジー制御の役割も担っている可能性が示された。



(3) PSTI の遺伝子変異が遺伝性膵炎の原因遺伝子となりえるのか

Rat elastase 1 promoter を用いた transgenic mice および、内在性 Psti プロモーターの下流に cDNA を置換したマウスをすべて作製した。しかし mRNA の発現は確認されるものの、蛋白レベルでの発現は見られなかった。この原因として、PSTI の遺伝子が非常に小さいため、転写は行われるものの、翻訳がなされないのではないかと考えた。そこで、Duke 大学の Riddle らがラットの SPINK1 ゲノムですでに成功している mini gene (図 SPINK1 の全ゲノムは 7.5kb であるが、エクソンと 200-300bp のイントロンの両端を含むよ

うにそれぞれをクローニングする。それを連結して約 2kb の mini-gene を作製する) を作製した。



今後この遺伝子に変異を加え、同様の方法で PSTI の変異が遺伝性膵炎に関連するか、否かの検討を行う予定である。

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 10 件)

Ohmuraya M and Yamamura K: Autophagy and acute pancreatitis: A novel autophagy theory for trypsinogen activation. **Autophagy**. 2008 in press. (査読有)

Hashimoto D, Ohmuraya M, Hirota M, Mizushima N, Yamamura K (13 名中 2 番目): Involvement of autophagy in trypsinogen activation within the pancreatic acinar cells. **J Cell Biol.** 181:p1065-72, 2008. (査読有)

Wang J, Ohmuraya M, Hirota M, Yamamura K (8 名中 2 番目): Expression pattern of serine protease inhibitor kazal type 3 (Spink3) during mouse embryonic development. **Histochem Cell Biol.** 130:p387-397, 2008. (査読有)

Suyama K, Ohmuraya M, Hirota M, Yamamura K (10 名中 2 番目): C/EBP homologous protein is crucial for the acceleration of experimental pancreatitis. **Biochem Biophys Res Commun.** 367:p176-182, 2008. (査読有)

Hashimoto D, Ohmuraya M, Yamamura K (6名中2番目): Effect of low-molecular-weight trypsin inhibitor, nafamostat mesilate, on trypsin activity using the pancreatic acinar cells. **Pancreas**. 2008 in press. (査読有)

Ida S, Ohmuraya M, Baba H (11名中8番目): Significance of endothelial molecular markers in the severity evaluation of acute pancreatitis. **Surgery today**. 2008 in press. (査読有)

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 **臓器** 23: p20-24, 2008. (査読有)

Hirota M, Ohmuraya M, Baba H. Genetic background of pancreatitis. **Postgrad Med J**. 82:p775-8, 2006. (査読有)

Hirota M, Ohmuraya M, Baba H. The role of trypsin, trypsin inhibitor, and trypsin receptor in the onset and aggravation of pancreatitis. **J Gastroenterol**. 41:p832-6, 2006. (査読有)

Ohmuraya M, Hirota M, Araki K, Baba H, Yamamura K. Enhanced trypsin activity in pancreatic acinar cells deficient for serine protease inhibitor kazal type 3. **Pancreas**. 33:p104-6, 2006. (査読有)

[学会発表](計11件)

The International Pancreatic Research Forum in Tokyo March 28, 2009. Serine protease inhibitor, Kazal type 1 promotes proliferation of pancreatic cancer cells through the epidermal growth factor receptor.

M. Ohmuraya, N. Ozaki, M. Hirota, H. Baba and K-I Yamamura

The International Pancreatic Research Forum in Tokyo March 28, 2009. Involvement of autophagy in trypsinogen activation within the

pancreatic acinar cells.

M. Ohmuraya, D. Hashimoto, M. Hirota, H. Baba and K-I Yamamura

The 67th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association in Nagoya October 28-30, 2008. Involvement of autophagy in trypsinogen activation within the pancreatic acinar cells

Masaki Ohmuraya, Satoshi Ida, Nobuyuki Ozaki, Kimi Araki, Keishi Takamori, Hideo Baba, Ken-ichi Yamamura

第13回腫瘍学世界大会及び第11回分子医学国際シンポジウム in Greece October 9-11, 2008. SERINE PROTEASE INHIBITOR, KAZAL TYPE 1, INDUCES EGFR ACTIVATION AND CELL PROLIFERATION THROUGH EGFR/MAPK CASCADE

Masaki Ohmuraya and Ken-ichi Yamamura 21st International Mammalian Genome Conference in Kyoto October 28-November 1, 2007. AUTOPHAGY DELIVERS TRYPSINOGEN TO THE LYSOSOME IN ACUTE PANCREATITIS

Masaki Ohmuraya, Kimi Araki and Ken-ichi Yamamura

21st International Mammalian Genome Conference in Kyoto October 28-November 1, 2007. CELL DEATH WITH EXCESSIVE AUTOPHAGY OCCURS IN SERINE PROTEASE INHIBITOR KAZAL TYPE 3 DEFICIENT ACINAR CELLS

Masaki Ohmuraya, Kimi Araki and Ken-ichi Yamamura

The 66th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association in Yokohama October 3-5, 2007. Serine protease inhibitor, Kazal type 1, induces EGFR activation and cell proliferation through EGFR/MAPK cascade

Masaki Ohmuraya and Ken-ichi Yamamura The 24th The Japanese Society of Animal

Models for Human Diseases in Tsukuba
August 31-September 1, 2007.

Excessive autophagy is induced in
serine protease inhibitor Kazal type
3 deficient pancreatic acinar cells.

Masaki Ohmuraya, Kimi Araki and
Ken-ichi Yamamura

20th IUBMB International Congress of
Biochemistry and Molecular Biology
and 11th FAOBMB Congress in Kyoto,
June 18-23, 2007. Autophagic cell
death of pancreatic acinar cells in
serine protease inhibitor Kazal type
3-deficient mice

Masaki Ohmuraya, Kimi Araki and
Ken-ichi Yamamura

The 40st Annual Meeting for the
Japanese Society of Developmental
Biologist in Fukuoka May 28-30, 2007.

Autophagy activates trypsinogen
within the pancreatic acinar cell

Masaki Ohmuraya, Kimi Araki and
Ken-ichi Yamamura

Digestive Disease Week 2006 in Los
Angeles May20-25, 2006. Autophagic
cell death of pancreatic acinar cells
in serine protease inhibitor Kazal
type 3-deficient mice

Masaki Ohmuraya, Masahi Hirota, Kimi
Araki and Ken-ichi Yamamura

研究者番号：

6 . 研究組織

(1)研究代表者

大村谷 昌樹 (OHMURAYA MASAKI)
熊本大学・大学院先導機構・特任助教
研究者番号：60398229

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()