

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007-2008

課題番号：19590786

研究課題名（和文） 膵星細胞をターゲットとした慢性膵炎の新しい治療法の開発

研究課題名（英文） Novel therapeutic strategy for chronic pancreatitis targeting pancreatic stellate cells

研究代表者 大西 洋英（OHNISHI HIROHIDE）

秋田大学・医学部・教授

研究者番号：00313023

研究成果の概要：

慢性膵炎の主な病理学的現象は膵組織の線維化であり、その線維化の発症伸展の中心的役割を果たすのは活性化膵星細胞である。本研究ではその活性化膵星細胞の増殖や遊走能の分子メカニズムを解明し、それらを抑制する方法を見いだして活性化膵星細胞の機能を制御する事により、膵線維化の予防ならびに治療法の開発の一助とすべく、本研究を遂行した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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、慢性膵炎、膵線維化、膵星細胞、TGF-beta, interleukin-13

1. 研究開始当初の背景

(1) 慢性膵炎と膵線維化

慢性膵炎とはアルコール多飲などに起因した持続する膵の炎症の結果、膵外分泌腺・内分泌腺の傷害を惹起し終には両分泌不全へと至る難治性膵疾患である。その病理学的主徴候は内外分泌腺の萎縮・変性と膵組織の線維化であり、進行慢性膵炎症例では膵の広い範囲で内外分泌腺が線維化組織に置換されてしまっている現象が認められる。これら病理学的検討より慢性膵炎における臓器傷害は、膵組織の線維化現象がその主因と考えられている。

(2) 膵線維化における膵星細胞の役割

膵星細胞が同定・単離されて後(Apte et al. Gut 1998, Bachem et al, Gastroenterology, 1998),慢性膵炎の膵線維化現象におけるその中心的役割が明らかにされてきた。膵星細胞は正常膵においては外分泌腺房周囲に位置し、ビタミンA含有油滴を有する静止細胞として存在するが、慢性膵炎膵組織においては活性化され、 α -smooth muscle actin を発現する筋線維芽細胞様に形態変化し、盛んに増殖し始めて遊走能を獲得し、膵傷害部位においてコラーゲンやファイブロネクチン等の細胞外基質を産生・放出する結果、膵組織の線維化を発症・進展せしめる。これらの知見

より、腭星細胞の活性化の抑制法および、活性化腭星細胞の Apoptosis の誘導法などを開発する事が出来れば、それらは腭線維化治療法ならびに予防法の有効な手段となり得ると考えられる。

2. 研究の目的

本研究ではこれら新しい腭線維化治療法の開発を目指しその開発手法の理論的礎の中心として、申請者らがこれまでに明らかにしてきたオートクリン TGF- β_1 /Smad 刺激伝達系による腭星細胞機能制御機構の研究を応用して研究を推進する。

近年、TGF- β ファミリーに加え、各種臓器の線維化疾患に関連が示唆されるサイトカインが明らかにされて来た。その中でも本研究では、interleukin-13 に着目し、interleukin-13 の慢性腭炎における役割、TGF- β との相互作用、および腭星細胞の機能にたいする影響とその分子機構の解明を研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 腭星細胞はラット腭より Nycodenz 勾配遠心法を用いて単離し、培養した。

(2) 腭星細胞の増殖能は $[^3\text{H}]$ -thymidine uptake 法にて測定した。

(3) TGF- β の分泌, Mrna 発現、およびプロモーター活性は各々 ELISA 法、Real-time PCR 法、Luciferase assay にて測定した。

(4) NF- κ B 活性は Trans AM kit を用いて測定した。

4. 研究成果

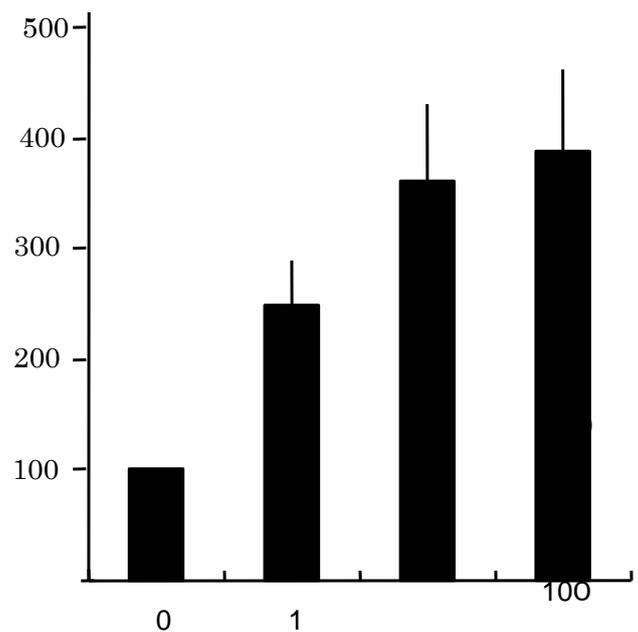
慢性腭炎における腭線維化において中心的役割を演じる腭星細胞(PSC)は、自らが分泌する TGF- β (オートクリン TGF- β)により活性化されて、コラーゲン等の細胞外基質を産生、放出することにより腭線維化を発症、伸展させる。一方、その活性化腭星細胞(活性化PSC)はオートクリン TGF- β によりその増殖は抑制されている。本研究においては、最近 TGF- β との相互作用が注目されるサイトカインである interleukin-13(IL-13)に着目し、PSC の機能制御における TGF- β と IL-13 の作用を検討した。

その結果、IL-13 は活性化 PSC の増殖を用量依存的に促進した。そこでその IL-13 による増殖促進作用が IL-13 とオートクリン TGF- β との interaction による可能性を検討した。その結果、IL-13 は活性化 PSC におけるオートクリン TGF- β の発現および分泌を強力に抑制する事が明らかとなった。これより IL-13 はオートクリン TGF- β の活性化 PSC 増殖抑制作用を解除する事によりその増殖を促進すると考えられた。次に、IL-13 のオートクリン TGF- β 発現抑制の分子機構を解明する目的で、IL-13 による

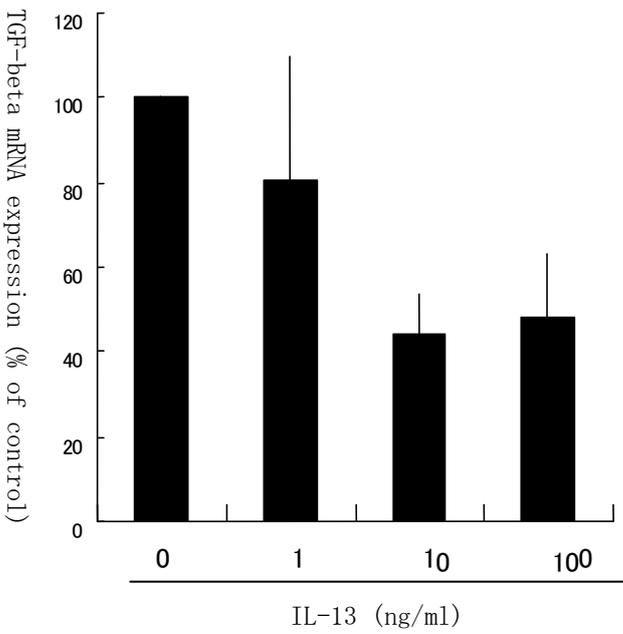
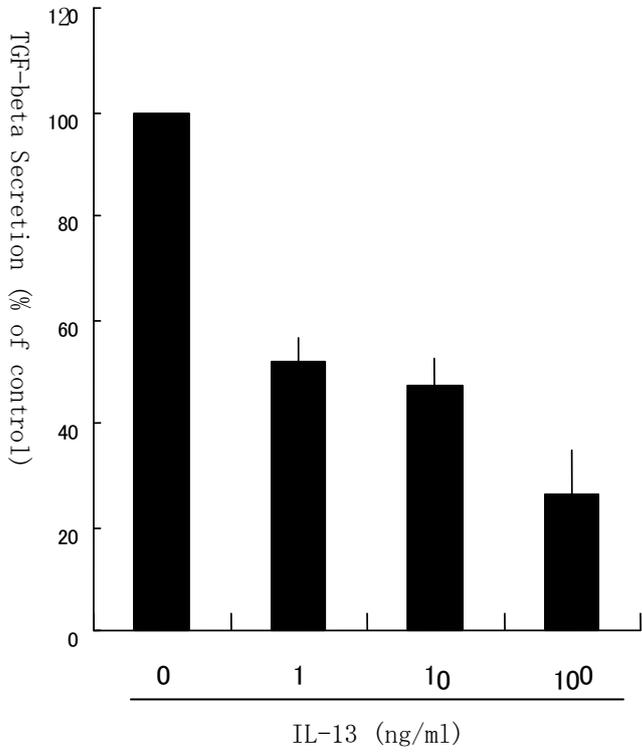
TGF- β 発現抑制作用における NF- κ B の関与を検討した。その結果、静止期 PSC に比べ活性化 PSC においては NF- κ B は恒常的にその活性が上昇しており、IL-13 はこの活性化 PSC において上昇した NF- κ B の活性を抑制した。更には NF- κ B 活性の super-repressor である I- κ B を活性化 PSC に過剰発現させると、その NF- κ B 活性が抑制されると同時に、TGF- β の発現および分泌ともに強く抑制された。以上より、IL-13 は NF- κ B を介して TGF- β システムと interaction する事により活性化 PSC の増殖を促進する事で、慢性腭炎における腭線維化を促進すると考えられた。

IL-13 の腭星細胞増殖促進作用

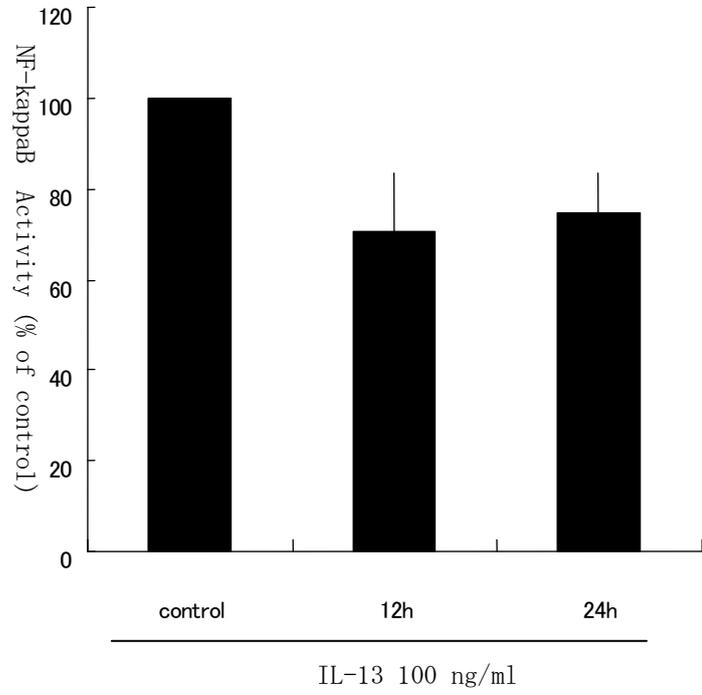
$[^3\text{H}]$ -thymidine uptake (%)



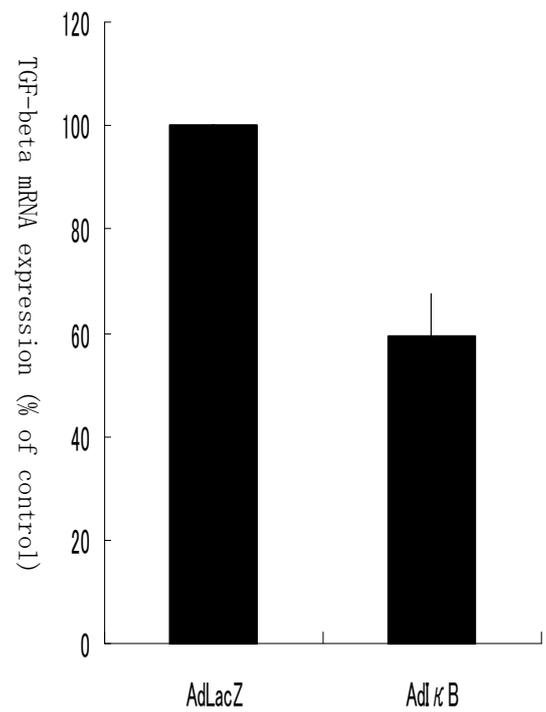
IL-13 の腭星細胞における TGF-beta 発現、分泌に対する作用



IL-13 の腭星細胞における NF-kappaB 活性に対する作用



NF-kappaBsuper-repressor IkappaB-mutanat の TGF-beta 発現に対する作用



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5件)

1. Shinozaki S, Ohnishi H et al.(10人中2番目) Indian hedgehog promotes the migration of rat activated pancreatic stellate cells by increasing membrane type-1 matrix metalloproteinase on the plasma membrane. *Journal of Cellular Physiology*. 査読有り、vol. 216, p38-46, 2008.
2. Yoshikumi Y, Ohnishi H et al (10人中6番目) Up-regulation of JAM-1 in AR42J cells treated with activin A and betacellulin and the diabetic regenerating islets. *Endocrine Journal*. 査読あり. Vol55, p757-765, 2008.
3. 大西洋英. 膵線維化における膵星細胞機能研究の新しい展開. *膵臓*. 査読なし. vol.23, p124-131, 2008.
4. Aoki H, Ohnishi H, et al. (10人中2番目) Cyclooxygenase-2 is required for activated pancreatic stellate cells to respond to proinflammatory cytokines. *American Journal of Physiology, Cell Physiology*. 査読有り. vol. 292. C259-268, 2007.
5. 大西洋英. 特集:膵星細胞「サイトカイン」. *肝胆膵*. 査読なし. vol. 55, p1199-1206, 2007.

[学会発表] (計3件)

1. 篠崎聡、大西洋英. IL-13の膵星細胞増殖促進作用の検討。第38回に本膵臓学会大会、2007年6月29日、福岡
2. Shinozaki S, Ohnishi H. IL-13 promotes the proliferation of activated rat pancreatic stellate cells through multiple signaling pathways including autocrine TGF-beta/NF-kappaB, Akt-, and S6-dependent pathways. 108th Annual Meeting of American Gastroenterological Association, DDW. May 20, 2007, Washington DC, USA
3. 篠崎聡、大西洋英. IL-13の膵星細胞増殖促進作用における分子機構の解析。第93回に本消化器病学会総会、2007年4月19日、青森

6. 研究組織

(1)研究代表者

大西 洋英 (OHNISHI HIROHIDE)

秋田大学・医学部・教授

研究者番号: 00313023

(2)研究分担者

(3)連携研究者