

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08405

研究課題名(和文) 膵、消化管の再生医療を念頭においた組織再生関連遺伝子Regに関する研究

研究課題名(英文) The role of Reg family in pancreatitis

研究代表者

大村谷 昌樹 (Ohmuraya, Masaki)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：60398229

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：慢性膵炎モデルマウスにおいてRegenerating gene (Reg) familyが顕著に上昇しており、膵線維化に関わっている可能性が示唆された。Reg1,2,3a,3b,3d,3g,4の7つの遺伝子からなる。本研究課題でReg1,2,3の6遺伝子を欠損したマウス(Reg<sup>-/-</sup>)を樹立した。Reg<sup>-/-</sup>マウスは野生型と差が見られなかった。急性膵炎惹起刺激を行うと、病理学的重症度には差が見られなかったが、その後の再生に遅れが見られ、膵線維化の原因細胞である膵星細胞の活性遷延が確認された。つまりReg familyが膵星細胞の活性化に影響していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性膵炎は膵内の持続的な炎症により、膵外分泌細胞の脱落と線維化を特徴とする原因不明の慢性炎症性疾患である。膵外分泌、内分泌機能の低下による消化・吸収障害、糖尿病に加え、膵癌を高頻度に併発することから、原因の解明と治療法の開発が急がれている。その線維化の中心的な役割を果たすのが膵星細胞であり、同細胞をいかに制御するか、に注目が集まっている。本研究課題ではその制御機構の一つとして、Reg遺伝子に注目し、解析を行ったものであり、Regを介した膵星細胞の活性化機構の解明が新たな治療標的となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Regenerating islet-derived (Reg) family proteins express in various mammalian tissues with multiple functions. They can also be induced after pancreas damage. To investigate the role of Reg in the pancreas following injury, we generated Reg1-3 deficient (Reg<sup>-/-</sup>) mice and examined them during cerulein-induced acute pancreatitis (AP) or cerulein and lipopolysaccharide-induced severe acute pancreatitis (SAP). Reg<sup>-/-</sup> mice showed no abnormalities in pancreas development and growth, did not affect the severity of pancreatitis or against pancreatic apoptosis in both AP and SAP model, and failed to stimulate pancreatic stellate cells (PSCs). We therefore conclude that Reg proteins might act to stimulate the PSCs contributing to pancreas repair.

研究分野：膵臓病学

キーワード：Reg 急性膵炎 膵星細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

慢性膵炎の特徴は持続する炎症と病理学的には膵腺房細胞(外分泌細胞)の脱落と線維化である。申請者は膵分泌性トリプシンインヒビター; *SPINK1*(マウス オルソログは *Spink3*)のノックアウトマウスを作製・解析した結果、ホモ欠損(*Spink3*<sup>-/-</sup>)では出生直後に膵腺房細胞に特異的にオートファジー不全とトリプシノーゲンの活性化が起こり、ネクローシス様の細胞死が誘導されることを見いだした(*Gastroenterology* 2005)。*Spink3*<sup>-/-</sup>マウスは出生後すぐに膵外分泌機能不全で死亡してしまうため、ヒト *SPINK1* 遺伝子を用いて致死性を回避することで、機能解析を試みた。CAG プロモーターと *SPINK1* 遺伝子をつないだトランスジーンを、X 染色体に置換したマウス(X-*SPINK*)と *Spink3*<sup>+/-</sup>マウスを交配し、*Spink3*<sup>+/-</sup>;X-*SPINK* のオスは正常に発育することを確認した。しかし、メスは、致死性は回避されたものの、発育不良で、膵臓は萎縮し、膵腺房細胞の脱落と線維化、持続的な炎症(慢性膵炎)を認めた。これは X 染色体不活性化による効果で、2 本ある X 染色体のうちの 1 本がランダムに不活化(トランスジーンが発現しない)され、つまり、*SPINK1* の発現によって *Spink3*<sup>-/-</sup>がレスキューされた腺房細胞と、*SPINK1* の発現が抑制されて、ネクローシス様の細胞死が起きる腺房細胞がモザイク状に混在したためであった(*Sci Rep* 2016)。

近年、細胞死が誘導された後の死細胞自身が周囲の細胞や組織にシグナルを発信し、様々な生体応答を引き起こすことが分かってきている。つまり、単に残骸であり速やかに処理されるべきであると考えられてきた死細胞が実はシグナルの発信源となり、免疫応答、炎症、修復、再生、線維化といった生体応答の起点(ダイニングコード)になっているという新しいコンセプトが形成され始めている。

そこで、申請者らは膵臓に慢性炎症、線維化を引き起こすダイニングコードを同定するため、上記の慢性膵炎モデル(正常腺房細胞と死細胞が混在)と野生型の膵臓(出生 0.5 日)をマイクロアレイ解析で比較した。その結果、Regenerating gene (*Reg*) family が顕著に上昇していることを見いだした。*Reg* 遺伝子は、東北大学のグループによって、損傷された膵臓が再生する過程で誘導される遺伝子としてクローニングされた(*J Biol Chem* 1988)。その後、同グループは、*Reg* が膵ラ氏島に対して細胞増殖作用を有することを報告し、*Reg* の膵再生関連因子としての役割が注目されている。

## 2. 研究の目的

これまでに *Reg1*(*Diabetes* 2002)、*Reg2* (*Hepatology* 2006)、申請者らが樹立した *Reg3b,g* (*BMC Biotechnol* 2015)の単独欠損マウスでは、顕著な異常は見られていない。その理由は、マウスには *Reg1* ~ 4 までの相同性が高いパラログ遺伝子が存在するためと考えられる。この中で、*Reg1* ~ 3(3には *a*, *b*, *d*, *r*がある)の6遺伝子は6番染色体の約 100kb の領域に位置しており、また *Reg4* は3番染色体に位置している。

従来の相同組換えを用いた遺伝子ターゲティング法では、単独の遺伝子しか欠損させることができず、また交配による多重欠損マウスも、*Reg1* ~ 3 のように同一染色体上で、近傍に位置し

ている場合は不可能である。本研究では、ゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 システムを用いて、*Reg1* ~ 3 遺伝子を含む約 100kb を欠損させたマウスを作製し、Reg family の *in vivo* における機能解析を目的とした。

### 3. 研究の方法

#### 1. *Reg family* 遺伝子欠損マウスの樹立と生理的意義の解明

CRISPR/Cas システムを用いて、*Reg1*, 2, 3 a, b, d, r の 6 遺伝子を欠失したマウス (*Reg*<sup>-/-</sup>マウス) を樹立する。*Reg*<sup>-/-</sup>マウスを樹立し、発生過程、生理的条件下における Reg family の機能解析を行う。

#### 2. *Reg family* 遺伝子の病的意義の解明

急性、慢性膵炎および炎症性腸疾患モデルを用いて、炎症後の再生過程を観察する。*Reg* が欠損した状態で、再生の異常や、線維化の有無、炎症遷延の程度、などを比較する。

膵炎モデル・・・コレシストキニン・アナログのセルレインを腹腔内投与して、急性膵炎、慢性膵炎モデルを作製する。さらに前述した *Spink3*<sup>-/-</sup>;*X-SPINK* との交配で、慢性膵炎の重症度 (体重、膵臓の重量、病理的解析、炎症マーカー、線維化の範囲、など) を比較する。

### 4. 研究成果

*Reg*<sup>-/-</sup>マウスはメンデルの法則に従って出生し、その後の成長も野生型と差が見られなかった。膵臓と共に *Reg* の発現が高い消化管においても、病理学的な異常も見られなかった。尚、*Reg1* から 3 に関して、タンパクレベルで欠損していることを確認した。また、*Reg4* の発現レベルも確認したが、変化は見られなかった。

8 週齢で急性膵炎惹起刺激を行い、血清アミラーゼ活性、病理学的解析、定量 PCR 法による炎症性サイトカインの解析、を行ったが、重症度には差が見られなかった。

前述したように *Reg* は組織破壊後にその発現上昇が見られ、組織再生に役割を果たしていると推測されている。急性膵炎後の再生過程における役割を解析するために、急性膵炎後の 24 時間後と 48 時間後の病理学的解析を行った。その結果、*Reg*<sup>-/-</sup>マウスでは再生にやや遅れが見られたが、その違いは小さかった。この結果は、急性膵炎後の再生に *Reg* 遺伝子は役割を果たしているものの、その寄与度は小さいか、他の代償機構が働いていると考えられた。尚、*Reg4* の発現レベルも変化が見られなかった。また膵線維化の原因細胞である膵星細胞の活性遷延が確認された。

以上の結果から、Reg family が膵炎の再生と膵星細胞の活性化に影響していることが示唆され、慢性膵炎の原因となっている膵線維化の治療標的となる可能性が示唆された。

尚、*Spink3*<sup>-/-</sup>;*X-SPINK* との交配で、慢性膵炎の重症度を比較する予定であったが、交配に時間がかかってしまい、現在進行中である。*Reg*<sup>-/-</sup>; *Spink3*<sup>-/-</sup>;*X-SPINK* の解析までをまとめて、投稿を予定している。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Iwama H, Mehanna S, Imasaka M, Hashidume S, Nishiura H, Yamamura KI, Suzuki C, Uchiyama Y, Hatano E, Ohmuraya M.	4. 巻 11
2. 論文標題 Cathepsin B and D deficiency in the mouse pancreas induces impaired autophagy and chronic pancreatitis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 6596
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-85898-9.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Shindo Ryodai, Katagiri Takaharu, Komazawa-Sakon Sachiko, Ohmuraya Masaki, Takeda Wakami, Nakagawa Yoshiko, Nakagata Naomi, Sakuma Tetsushi, Yamamoto Takashi, Nishiyama Chiharu, Nishina Takashi, Yamazaki Soh, Kameda Hideto, Nakano Hiroyasu	4. 巻 21
2. 論文標題 Regenerating islet-derived protein (Reg)3 plays a crucial role in attenuation of ileitis and colitis in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 100738 ~ 100738
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrep.2020.100738	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kanda Shoichiro, Ohmuraya Masaki, Akagawa Hiroyuki, Horita Shigeru, Yoshida Yasuhiro, Kaneko Naoto, Sugawara Noriko, Ishizuka Kiyonobu, Miura Kenichiro, Harita Yutaka, Yamamoto Toshiyuki, Oka Akira, Araki Kimi, Furukawa Toru, Hattori Motoshi	4. 巻 31
2. 論文標題 Deletion in the Cobalamin Synthetase W Domain-Containing Protein 1 Gene Is associated with Congenital Anomalies of the Kidney and Urinary Tract	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of the American Society of Nephrology	6. 最初と最後の頁 139 ~ 147
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1681/ASN.2019040398	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shindo Ryodai, Ohmuraya Masaki, Komazawa-Sakon Sachiko, Miyake Sanae, Deguchi Yutaka, Yamazaki Soh, Nishina Takashi, Yoshimoto Takayuki, Kakuta Soichiro, Koike Masato, Uchiyama Yasuo, Konishi Hiroyuki, Kiyama Hiroshi, Mikami Tetuo, Moriwaki Kenta, Araki Kimi, Nakano Hiroyasu	4. 巻 15
2. 論文標題 Necroptosis of Intestinal Epithelial Cells Induces Type 3 Innate Lymphoid Cell-Dependent Lethal Ileitis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 536 ~ 551
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2019.05.011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki Chigure, Tanida Isei, Ohmuraya Masaki, Oliva Trejo Juan, Kakuta Soichiro, Sunabori Takehiko, Uchiyama Yasuo	4. 巻 20
2. 論文標題 Lack of Cathepsin D in the Renal Proximal Tubular Cells Resulted in Increased Sensitivity against Renal Ischemia/Reperfusion Injury	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1711 ~ 1711
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20071711	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kurematsu Chihiro, Sawada Masato, Ohmuraya Masaki, 他	4. 巻 219
2. 論文標題 Synaptic pruning of murine adult-born neurons by microglia depends on phosphatidylserine	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1084/jem.20202304	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishiura Hiroshi, Imasaka Mai, Yamanegi Koji, Fujimoto Jiro, Ohmuraya Masaki	4. 巻 12
2. 論文標題 Immune Aging and How It Works for Inflammation and Fibrosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Physiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphys.2021.795508	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Saiki Yuriko, Jiang Can, Ohmuraya Masaki, Furukawa Toru	4. 巻 14
2. 論文標題 Genetic Mutations of Pancreatic Cancer and Genetically Engineered Mouse Models	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 71 ~ 71
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers14010071	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mareninova Olga A., Dillon Dustin L., Wightman Carli J.M., Yakubov Iskandar, Takahashi Toshimasa, Gaisano Herbert Y., Munson Keith, Ohmuraya Masaki, Dawson David, Gukovsky Ilya, Gukovskaya Anna S.	4. 巻 13
2. 論文標題 Rab9 Mediates Pancreatic Autophagy Switch From Canonical to Noncanonical, Aggravating Experimental Pancreatitis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology	6. 最初と最後の頁 599 ~ 622
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jcmgh.2021.09.017	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 李未悠、今坂舞、陳文亭、大村谷昌樹
2. 発表標題 膵炎後の膵炎再生におけるReg familyの機能解析
3. 学会等名 第68回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	福井 広一 (Fukui Hirokazu) (60378742)	兵庫医科大学・医学部・准教授  (34519)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------