

機関番号：13901

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590807

研究課題名 (和文)

慢性膵炎発症・進展における膜蛋白の細胞内局在異常の解明

研究課題名 (英文) The roles of mislocalization of membrane proteins in the development of chronic pancreatitis

研究代表者

洪 繁 (Shigeru Ko)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90402578

研究成果の概要 (和文)：

慢性膵炎は、慢性進行性炎症性疾患である。膵導管細胞管腔膜に発現する CFTR 遺伝子の変異は膵炎発症に関わる因子として同定されたが、CFTR と膵炎発症の関わりについては不明である。CFTR と慢性膵炎発症の関わりについて検討した。慢性膵炎患者の導管細胞では CFTR は細胞質に誤局在していた。モルモットの膵導管細胞の CFTR 発現を抑制すると、CFTR 及び AQP1 の発現が著明に抑制された。つまり膵導管細胞に発現する CFTR チャンネルが膵の水分泌を制御しており、慢性膵炎では炎症により CFTR が細胞質内に誤局在することで膵の水分泌が抑制されることが明らかとなった。

研究成果の概要 (英文)：

Chronic pancreatitis is a progressive disease of the pancreas. Accumulating evidence suggests that CFTR channel, which is expressed in the apical plasma membrane of pancreatic duct cells, is one of the factors that cause pancreatitis. However, it remains unknown how CFTR dysfunction cause pancreatitis. In chronic pancreatitis, CFTR is largely mislocalized in the cytoplasm of pancreatic duct cells. When CFTR expression was reduced by RNA interference in isolated guinea-pig pancreatic duct cells, pancreatic fluid secretion was remarkably reduce to ~50% of control. These findings indicate that CFTR expression directly regulates the fluid secretion from pancreatic duct cells and therefore CFTR dysfunction is one of the mechanisms to develop chronic pancreatitis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：慢性膵炎、膜蛋白、細胞内局在、CFTR、AQP

## 1. 研究開始当初の背景

慢性膵炎は、アルコールの多飲や膵炎関連遺伝子の変異により起こる慢性進行性炎症性疾患である。慢性膵炎では、内外分泌不全を特徴とするが、中でも膵導管細胞機能である水と重炭酸イオン分泌機能不全を特徴とする。最近の研究により、膵導管細胞に発現するクロライドチャンネルである *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)* の遺伝子異常が慢性膵炎発症に関係する遺伝子として同定された。CFTR は導管細胞の管腔膜に発現するクロライドチャンネルであるが、CFTR 遺伝子の保因者で何故慢性膵炎の発症率が上昇するのかについては、不明であった。

## 2. 研究の目的

本研究では、導管細胞に発現するクロライドチャンネル蛋白である CFTR が膵炎発症と関わる分子機構の解明を目的とした。

## 3. 研究の方法

ヒト慢性膵炎における CFTR 蛋白の細胞内局在

特殊な膵炎である自己免疫性膵炎組織及びアルコール性、特発性膵炎の膵組織を抗 CFTR 抗体を用いた免疫組織化学染色法で CFTR の細胞内局在を検討した。またヒトの膵導管細胞機能は外分泌機能試験で評価した。

膵水分泌におけるモルモット CFTR 遺伝子の役割

モルモットの膵より実体顕微鏡下に膵導管細胞を単離した。単離した導管細胞は CFTR 遺伝子特異的な二本鎖 RNA 又はコントロール RNA と 36 時間培養した。培養した膵導管細胞は、ビデオ顕微鏡を用いて観察することにより管腔内への水分泌量を測定した。また CFTR 及び AQP1 水チャンネルの発現量は、免疫ブロッキング法を用いて検討した。

## 4. 研究成果

ヒト膵導管細胞機能における CFTR の役割  
正常では導管細胞管腔膜に発現する CFTR クロライドチャンネルは、自己免疫性膵炎及びアルコール性、特発性慢性膵炎患者では、大部分細胞質に誤局在していた。膵炎患者では膵導管細胞からの水分泌機能が障害されているが、その原因は導管細胞におけるイオン、水輸送の中心蛋白である CFTR チャンネルが細胞膜に発現していないことが原因であることが明らかとなった。

モルモットの単離小葉間膵管の CFTR を RNA 干渉法を用いて発現を抑制すると膵導管細胞における CFTR 遺伝子発現だけでなく、水チャンネル蛋白 AQP1 も発現が約 50% に抑制され

ていた。単離小葉間膵管からの水分泌量を測定すると、コントロールに比べて約 50% に減少していた。即ち、導管細胞における CFTR の発現量が、膵の水分泌量を直接制御していることが明らかとなった。

本研究の成果からは、CFTR 機能の異常や細胞内局在異常により導管細胞管腔膜におけるイオン透過性が減少すると膵導管細胞からの水分泌が減少することが明らかとなった。導管細胞からの水分泌が減少すると膵管内での蛋白栓形成、更には膵石形成をおこすと考えられた。即ち、導管細胞における CFTR 機能低下が、慢性膵炎発症・進展の分子機構の一つであることが解明された。

## 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 13 件)

1. Ko SB, Azuma S, Anzai N, Yamamoto A, Mizuno N, Kamimura K, Ishiguro H, and Goto H. Intravenous fluid therapy successfully prevents renal injury by gemcitabine in patients with pancreatic cancer. *Pancreas* 2011, in press. 査読有
2. Ko SB, Goto H. How fast can pancreatic cancer grow? A case of pancreatic carcinoma developed within 5 months after a negative examination to the advanced stage with multiple liver and bone metastases. *Pancreas* 2011;40(2):318-9. 査読有
3. Ko SB, Mizuno N, Yatabe Y, Yoshikawa T, Ishiguro H, Yamamoto A, Azuma S, Naruse S, Yamao K, Muallem S, Goto H. Corticosteroids correct aberrant CFTR localization in the duct and regenerate acinar cells in autoimmune pancreatitis. *Gastroenterology*. 2010 138(5):1988-96. 査読有
4. Futakuchi S, Ishiguro H, Naruse S, Ko SB, Fujiki K, Yamamoto A, Nakakuki M, Song Y, Steward MC, Kondo T, Goto H. Glucose transport in interlobular ducts isolated from rat pancreas. *J Med Invest*, 2009; 56:308-311. 査読無
5. Ko SB, Mizuno N, Yatabe Y, Yoshikawa T, Ishiguro H, Yamamoto A, Azuma S, Naruse S, Yamao K, Muallem S, Goto H. Aquaporin 1 water channel is overexpressed

- in the plasma membranes of pancreatic ducts in patients with autoimmune pancreatitis. *J Med Invest.* 2009; 56:318-321 査読無
6. Futakuchi S, Ishiguro H, Naruse S, Ko SB, Fujiki K, Yamamoto A, Nakakuki M, Song Y, Steward MC, Kondo T, Goto H. High glucose inhibits HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> and fluid secretion in rat pancreatic ducts. *Pflugers Arch.* 2009;459:215-26. 査読有
  7. Hayakawa T, Jin CX, Ko SB, Kitagawa M, Ishiguro H. Lactoferrin in gastrointestinal disease. *Intern Med.* 2009;48(15):1251-4. 査読有
  8. Ohta E, Itoh T, Nemoto T, Kumagai J, Ko SB, Ishibashi K, Ohno M, Uchida K, Ohta A, Sohara E, Uchida S, Sasaki S, Rai T. Pancreas-specific aquaporin 12 null mice showed increased susceptibility to caerulein-induced acute pancreatitis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2009;297: C1368-78. 査読有
  9. Mizuno N, Bhatia V, Hosoda W, Sawaki A, Hoki N, Hara K, Takagi T, Ko SB, Yatabe Y, Goto H, Yamao K. Histological diagnosis of autoimmune pancreatitis using EUS-guided trucut biopsy: a comparison study with EUS-FNA. *J Gastroenterol.* 2009;44(7):742-50. 査読有
  10. Kamisawa T, Shimosegawa T, Okazaki K, Nishino T, Watanabe H, Kanno A, Okumura F, Nishikawa T, Kobayashi K, Ichiya T, Takatori H, Yamakita K, Kubota K, Hamano H, Okamura K, Hirano K, Ito T, Ko S, Omata M. Standard steroid therapy for autoimmune pancreatitis. *Gut.* 2009;58(11):1504-7. 査読有
  11. Ishiguro H, Steward MC, Naruse S, Ko SB, Goto H, Case RM, Kondo T, Yamamoto A. CFTR functions as a bicarbonate channel in pancreatic duct cells. *J Gen Physiol.* 2009;133:315-26. 査読有
  12. Ko SB et al. Observation of deworming process in intestinal *Diphyllobothrium latum* parasitism by gastrografin injection into jejunum through double-balloon enteroscopy. *Am J Gastroenterol.* 2008;103(8):2149-50. 査読有
  13. Otsuki M, Chung JB, Okazaki K, Kim MH, Kamisawa T, Kawa S, Park SW, Shimosegawa T, Lee K, Ito T, Nishimori I, Notohara K, Naruse S, Ko SB, Kihara Y; Research Committee of Intractable Pancreatic Diseases provided by the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan and the Korean Society of Pancreatobiliary Diseases. Asian diagnostic criteria for autoimmune pancreatitis: consensus of the Japan-Korea Symposium on Autoimmune Pancreatitis. *J Gastroenterol.* 2008;43(6):403-8. 査読有
- [学会発表] (計 22 件)
1. 水野伸匡、山雄健次、洪 繁  
「機能及び組織からみた1型および2型自己免疫性膵炎の病態」  
厚生労働省科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業・IgG4 関連全身硬化性疾患の診断確立と治療法開発に関する研究、平成22年第二回総会  
メルパルク京都、2011.2.1
  2. 水野伸匡、洪 繁 他  
「自己免疫性膵炎の組織回復における幹・前駆細胞の関与」  
厚生労働省科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業・難治性膵疾患に関する調査研究班、平成22年度第二回研究報告会  
トウキョウステーションコンファレンス、2011.1.21
  3. 石黒 洋、洪 繁 他  
「日本人のう胞線維症1症例のCFTR遺伝子解析」  
厚生労働省科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業・難治性膵疾患に関する調査研究班、平成22年度第二回研究報告会  
トウキョウステーションコンファレンス、2011.1.21
  4. 水野伸匡、洪 繁、山雄健次  
「自己免疫性膵炎患者におけるステロイド治療による膵外分泌機能の長期予後」  
日本消化器関連学会週間2010  
パネルディスカッション-5 自己免疫性膵炎の治療と予後  
パシフィコ横浜、横浜市、2010.10.13-16(10/13)
  5. 洪 繁、水野伸匡、後藤秀実  
「成人膵における膵幹細胞の局在と自己免疫性膵炎の膵組織回復における幹/前駆細胞の関与」

- 日本消化器関連学会週間 2010  
ワークショップ 16 肝胆膵疾患と組織  
幹細胞/progenitor cell : 病態解析と治療戦  
略  
パシフィコ横浜、横浜市、  
2010.10.13-16(10/14)
6. 洪 繁、水野伸匡、後藤秀実  
「ステロイド治療による自己免疫性膵  
炎の機能回復における膵幹/前駆細胞の  
関与」  
日本消化器関連学会週間 2010  
パネルディスカッション 15 膵炎の基  
礎と臨床  
パシフィコ横浜、横浜市、  
2010.10.13-16(10/15)
  7. Ko SB, Mizuno N, Yatabe Y, Yoshikawa T,  
Ishiguro H, Yamamoto A, Azuma S, Nause  
S, Yamao K, Muallem S, Goto H.  
“Corticosteroid correct aberrant cystic  
fibrosis transmembrane conductance  
regulator localization in the duct and  
regenerate acinar cells in autoimmune  
pancreatitis.” International Association of  
Pancreatology at Fukuoka, 2010.7.11-13  
(07/11)
  8. Ko SB, Mizuno N, Yatabe Y, Yoshikawa T,  
Ishiguro H, Yamamoto A, Azuma S, Nause  
S, Yamao K, Muallem S, Goto H.  
“Corticosteroid correct aberrant cystic  
fibrosis transmembrane conductance  
regulator localization in the duct and  
regenerate acinar cells in autoimmune  
pancreatitis.” European Pancreatic Club  
meeting at Stockholm, Sweden.  
2010.6.17-19 (06/18)
  9. 洪 繁、石黒 洋、山本明子、東 祥子、  
後藤秀実  
「塩酸ゲムシタピン腎症予防における  
輸液療法の有用性」  
日本消化器病学会東海支部第 111 回例会  
シンポジウム「肝胆膵悪性腫瘍に対する  
診断と治療の進歩」  
名古屋国際会議場、名古屋市、2009/12/05
  10. Mizuno N, Hosoda W, Bhatia V, Hara K,  
Sawaki A, Hijioka S, Imamura H, Ko SB,  
Yatabe Y, Goto H, Yamao K. “Histological  
Diagnosis of Autoimmune Pancreatitis  
Using EUS-Guided Trucut Biopsy: A  
Comparison Study With EUS-FNA.” Joint  
40th Anniversary meeting of American  
Pancreatic Association and Japan Pancreas  
Society, Honolulu, Hawaii, 2009/11/4-7
  11. 洪 繁、水野伸匡、後藤秀実  
「自己免疫性膵炎の消化吸収障害とそ  
の対策」  
第 51 回日本消化器病学会大会、  
2009/10/14-17 消化吸収学会、消化器病学  
会共催  
ワークショップ 16: 膵・胆道疾患におけ  
る消化吸収障害とその対策  
国立京都国際会館、京都府、2009/10/16
  12. 水野伸匡、洪 繁、山雄健次  
「自己免疫性膵炎(AIP)のステロイド治  
療による膵外分泌機能回復と膵幹/前駆  
細胞の同定」  
JDDW2009、消化器病学会 2009/10/14-17  
ワークショップ 20: 自己免疫性膵炎関連  
疾患の病因病態  
グランドプリンスホテル京都、京都府、  
2009/10/16
  13. Ko SB “Pancreatic ductal HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> secretion  
in a disease-implication for the role of ion  
channels and transporters” PAT-CVR  
interanational Symposium, Speaker,  
Symposim V  
Physiological institute, Okazaki, Japan,  
2009/08/04-08/06
  14. 洪 繁、水野伸匡、山雄健次、後藤秀実  
「膵炎のステロイド治療における膵組  
織再生と血球系幹細胞マーカーCD133  
の発現」  
第 40 回日本膵臓学会大会  
シンポジウム 1、「慢性膵炎の基礎研究  
における最近の進歩—新しい診断と治  
療法の開発に向けての展望—」  
京王プラザホテル、東京、2009/07/30-31
  15. Ko SB, Mizuno N, Yatabe Y, Ishiguro H,  
Azuma S, Yoshikawa T, Yamamoto A,  
Naruse S, Yamao K, Muallem S, Goto H.  
“Aquaporin Water channel protein is  
overexpressed in the plasma membranes of  
pancreatic ducts in patients with  
autoimmune chronic  
pancreatitis.” Symposium 3, Speaker  
“Aquaporin and Ion channel/Transporter:  
Physiology and Disease: Part II”  
International Symposium in Exocrine  
Secretion at Tokushima, 2009  
Tokushima University, Japan,  
2009.07.23-25
  16. 洪 繁、東 祥子、山本明子、石黒 洋、  
後藤秀実  
「膵癌治療薬ゲムシタピンによる高尿  
酸血症副作用における尿酸トランスポ

- ーターURAT1の役割」  
第4回トランスポーター研究会、シンポジウムII、  
東京大学、2009/5/23-5/24
17. 洪 繁、水野 伸匡、後藤 秀実  
「膵外分泌機能からみた自己免疫性膵炎に対するステロイド投与の意義」  
第50回 日本消化器病学会大会  
シンポジウム11 「自己免疫性膵炎の診断、治療：ステロイド投与の意義」  
東京都、グランドプリンスホテル、  
2008.10.1
18. 洪 繁、石黒 洋、山本明子、有村奈利子、相馬義郎、後藤秀実  
CFTR-SLC26 輸送体複合体のイオン輸送機能における低分子量G蛋白質の役割  
文部省科学研究費補助金特定領域生体膜トランスポートソームの分子機構と生理機能、平成20年度 第一回班会議、淡路夢舞台国際会議場、兵庫県淡路市、2008.9.26
19. 水野 伸匡、洪 繁、後藤 秀実、山雄健次「自己免疫性膵炎および特発性慢性膵炎における膵内・外分泌機能相関」  
第39回 日本膵臓学会大会  
ワークショップ4「膵内・外分泌の基礎と臨床：相互相関をめぐって」  
パシフィコ横浜 2008.7.31
20. Ko SB, Mizuno N, Yatabe Y, Ishiguro H, Yoshikawa T, Yamamoto A, Naruse S, Muallem S, Yamao K, Goto H.  
“Aquaporin Water channel protein is overexpressed in the plasma membranes of pancreatic ducts in patients with autoimmune chronic pancreatitis.”Autoimmune pancreatitis Summit AIP 2008  
Seoul, South Korea, 2008.07.04
21. 洪 繁、山本明子、宋 海珍、石黒 洋、後藤秀実、「RNA 干渉法を用いたモルモットCFTR 機能の解析」第3回トランスポーター研究会、京都大学、薬学部、  
2008.6.7-8
22. Ko SB, Mizuno N, Yatabe Y, Ishiguro H, Yoshikawa T, Yamamoto A, Naruse S, Muallem S, Yamao K, Goto H.“Aquaporin Water channel protein is overexpressed in the plasma membranes of pancreatic ducts in patients with autoimmune chronic pancreatitis.”  
The international Pancretic Research Forum  
Tokyo, Japan, 2008.3.22
6. 研究組織  
(1)研究代表者  
洪 繁 (Shigeru Ko )  
名古屋大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：90402578
- (2)研究分担者  
石黒 洋 (Hiroshi Ishiguro)  
名古屋大学・総合保健体育科学センター・教授  
研究者番号：90303651  
山本明子 (Akiko Yamamoto)  
名古屋大学・総合保健体育科学センター・准教授  
研究者番号：60402385  
後藤 秀実 (Hidemi Goto)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：10215501  
水野 伸匡 (Nobumasa Mizuno)  
愛知県がんセンター・腫瘍免疫部・研究員  
研究者番号：80399592
- (3)連携研究者 なし