

機関番号：17102

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590808

研究課題名 (和文) 慢性膵炎進展における FRACTALKINE の関与

研究課題名 (英文) The effect of Fractalkine in the progression of chronic pancreatitis

研究代表者

伊藤 鉄英 (ITO TETSUhide)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：50253448

研究成果の概要 (和文)：

慢性膵炎は一般に反復する腹痛から始まり、徐々に膵内外分泌能が低下していく病態を呈し、非可逆性の進行性疾患と考えられており、早期診断及び早期治療が望まれる。最近、新規ケモカインの Fractalkine/CX3CL1 が、慢性炎症において関与していることが判明した。そこで、最初に、ヒト慢性膵炎における Fractalkine 血中濃度の上昇が早期に認められることを明らかにし、早期慢性膵炎のマーカーとして提唱した。次にラット慢性膵炎モデルを用いて、膵星細胞が Fractalkine の膵内産生源であることを明らかにした。In vitro で感染類似刺激による膵星細胞からの Fractalkine 分泌誘導を明らかにした。さらに、PMA およびエタノールが相乗的に Fractalkine 分泌を促進することを明らかにし、これらに PKR, PKC などの Protein kinase および MMP, ADAM などの Metalloprotease が関与することを明らかにした。以上より、慢性膵炎の病態、特に進展早期に Fractalkine が関与していることが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

Chronic pancreatitis, an irreversible inflammatory disease of the pancreas, is characterized by chronic inflammatory cell infiltration, acinar cell degeneration, and development of fibrosis, which lead to impairment of pancreatic exocrine and endocrine function. Recently, a role for fractalkine/CX3CR1-mediated inflammation has been demonstrated in several initial inflammatory disorders. Therefore, at first, we elucidated the elevation of serum Fractalkine level in patients with chronic pancreatitis, especially in early-stage. Next, using DBTC chronic pancreatitis model rats, we identified pancreatic stellate cells as a main source of Fractalkine expression. In vitro study, we confirmed the increased secretion of Fractalkine induced by pathogen-associated molecular patterns, such as LPS, in pancreatic stellate cells. Interestingly, both PMA and ethanol, which were substrates for protein kinase C, could synergistically induce Fractalkine release. Furthermore, we elucidated multiple stress kinase and metalloprotease involving in Fractalkine release by inhibitory assays. In conclusion, it is suggested that Fractalkine plays an important factor in progression of 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	2,500,000	750,000	3,250,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野： 膵臓病学

科研費の分科・細目： 内科系臨床医学・消化器病学 胆道学、膵臓学

キーワード： 慢性膵炎、フラクタルカイン、膵線維化、膵星細胞、ケモカイン、
プロテインカイネース C

1. 研究開始当初の背景

フラクタルカインは 1997 年に同定された膜貫通型タンパクであり、フラクタルカイン受容体を有する炎症細胞との接着因子として機能する一方、膜からの切断によって分泌型ケモカインとなり、遊走因子としても機能する。このフラクタルカインは炎症細胞の浸潤を伴った様々な炎症性疾患でその発現が亢進しており、新たな治療ターゲットとして脚光を浴びている。これまで我々は慢性膵炎において、単球遊走に関わる MCP-1 がその病態進展に関与することを dominant negative MCP-1 vector を用いて実証し、ケモカインが慢性膵炎の病態に強く関与することを明らかにしている。一方で、このフラクタルカインが膵炎に関与するかどうかについてはこれまで明らかとなっておらず、他疾患と同様、治療標的となりうる可能性を明らかにする必要がある。

2. 研究の目的

慢性膵炎においても他疾患と同様にフラクタルカインを介した炎症細胞の誘導、膵炎進展が存在するかを明らかにし、新たな治療ターゲットとなりうるか検討する。

3. 研究の方法

まず、健常者および慢性膵炎患者の保存血清を用いて、フラクタルカインの血中濃度の変化があるかを確認する。

次に、ヒトの病態がげっ歯類においても反映されるかどうかを確認するため、DBTC 慢性膵炎モデルラットを使用し、それぞれの病期におけるフラクタルカインの血中濃度推移、および膵組織内発現分布を明らかにする。

最後に、膵内の Source となりうる細胞を単離し、in vitro でフラクタルカインの発現および分泌のメカニズムを明らかにする。

4. 研究成果

最初に健常者および慢性膵炎患者の血清を用いて、フラクタルカインおよび MCP-1 の血中濃度を測定した。フラクタルカインは MCP-1 では認められない有意な血中濃度上昇を認めた。興味深いことにフラクタルカインの血中濃度は慢性膵炎の早期および晩期の 2 峰性上昇を示した。アルコール飲用者において血中濃度が上昇するため、次にアルコール非飲用者のみを対象にして解析したところ、このフラクタルカインの血中濃度は早期のみに上昇し、晩期の上昇は飲酒が関与していることが判明した。以上よりフラクタルカイン

ンは慢性膵炎早期において特異的に分泌され、この結果は早期慢性膵炎のマーカーにフラクタルカインが有用であることを示唆する所見と考えられた。また、晩期においてアルコール飲用者の血中濃度が上昇していることからフラクタルカインの分泌においてアルコールが何らかの影響を与えている可能性が示唆された。

次に DBTC 慢性膵炎モデルラットを作成し、血中フラクタルカイン濃度を測定した。フラクタルカインは DBTC 作成後、約 2 週から 4 週にかけて上昇を認め、以後漸減し、ラットの慢性膵炎モデルにおいてもフラクタルカインの血中濃度が上昇し、その病態進展に関与する可能性が示唆された。そこで次に膵組織内においてどのような細胞に発現しているかを検討するために、抗フラクタルカイン抗体を用いてラット慢性膵炎膵組織を免疫染色した。正常膵組織においては膵島に発現しており、慢性膵炎モデルラットでは GFAP 陽性膵星細胞に強く発現していることが判明した。

そこで実際の細胞をもちいて分泌のメカニズムを明らかにすることとした。コラゲナーゼ灌流法および密度遠心勾配法を用いてラット膵から膵腺房細胞および膵星細胞を単離し、*in vivo*と同様、*in vitro*でも発現があるかを確認するため免疫蛍光細胞染色を行った。*in vitro*においては膵腺房細胞、膵星細胞ともにフラクタルカインを発現しているのを確認した。実際にフラクタルカインを分泌するかを確認するため ELISA 法を用いて、膵星細胞培養上清中のフラクタルカイン濃度を確認した。刺激なしの状態でも 20-50pg/100μl の分泌を認め、定常状態におけるフラクタルカイン分泌を確認し、膵内の恒常性を保つために炎症細胞を誘導していることが推察された。最後に Toll 様受容体 4

(Toll-like receptor 4) のリガンドである LPS で刺激すると濃度依存性、時間依存性の上昇を認め、Toll-like receptor を介した刺激がフラクタルカインの分泌に関与することを確認した。

以上より、慢性膵炎の病態、特に進展早期に Fractalkine が関与していることが示唆された。

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 2 件)

1) Yasuda M, Ito T, et al :
Fractalkine and TGF-beta1 levels reflect the severity of chronic pancreatitis in humans. World J Gastroenterol. (14) 6488-6495,2008

2) Nakamura T, Ito T, Oono T, et al :
Bacterial DNA Promotes Proliferation of Rat Pancreatic Stellate Cells Through Toll-Like Receptor 9: Potential Mechanisms for Bacterially Induced Fibrosis. Pancreas in press,2011

[学会発表] (計 4 件)

1) 安田幹彦、伊藤鉄英、他:
膵疾患患者における血清中ケモカイン、サイトカインの検討
第 94 回 日本消化器病学会総会
2008 年 5 月 , 福岡市

2) Nakamura T, Fujimori N, Oono T, Ito T, et al.: CpG DNA Activates Pancreatic Stellate Cell via Toll Like Receptor 9. Digestive Diseases Week (American Gastroenterological Association) May 4, 2010, New Orleans, USA

3) Nakamura T, Uchida M, Niina Y, Ito T, et al: Bacterial DNA Promotes Proliferation of Rat Pancreatic Stellate Cells.

The 14th Joint Meeting of the International Association of Pancreatology and the Japan Pancreas Society
July 12, 2010, Fukuoka, Japan

4) Uchida M, Nakamura T, Ito T, et al: Neural fractalkine (CX3CL1) requires various sheddases of pancreatic stellate cells ~ novel therapeutic strategy for curing patients suffering from intractable pancreatic pain and fibrosis.

Digestive Diseases Week
(American Gastroenterological Association)
May 8, 2011, Chicago, USA

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.kyushu-u.ac.jp/intmed3/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 鉄英 (ITO TETSUHIDE)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：5 0 2 5 3 4 4 8

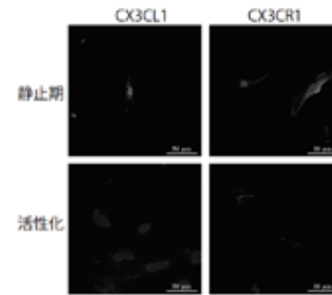
(2) 研究分担者

五十嵐 久人 (IGARASHI HISATO)

九州大学・大学病院・助教

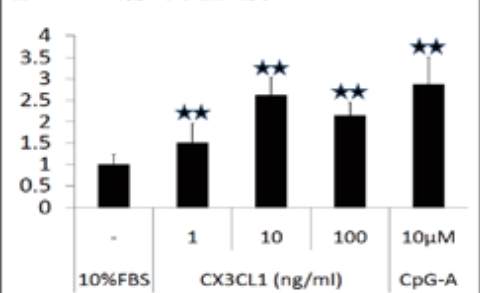
研究者番号：6 0 4 6 7 9 4 1

図 1. 静置細胞における CX3CL1 および CX3CR1 の発現



フラクタルカインおよびフラクタルカイン受容体特異的抗体を用いて免疫蛍光細胞染色を行った。静置期および活性化の双方においてリガンド、受容体ともに発現を認めた。受容体は膜表面に存在し、一方でリガンドは膜および細胞質内核膜にも存在した。

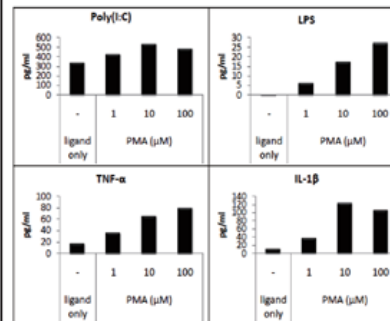
図 3. CX3CL1 刺激による増殖の誘導



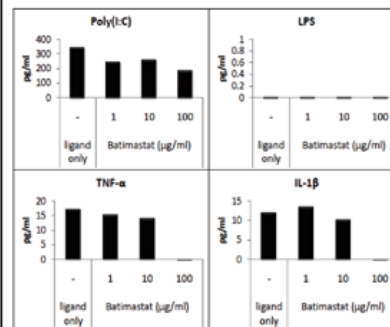
フラクタルカインの静置細胞に対する作用を検討するために BrdU incorporation assay による増殖 Assay を行った。CX3CL1 は増殖作用を認めた。CpG-A は P.C.

図 2. 静置細胞における CX3CL1 分泌およびプロテアーゼの関与

ア) PMA による CX3CL1 分泌促進



イ) Batimastat による CX3CL1 分泌阻害



感染および炎症刺激により活性化静置細胞は CX3CL1 を分泌する。また、ア) ADAM17 activator である PMA を前投与することにより、その分泌が亢進する。一方で、イ) MMP inhibitor である Batimastat を前投与すると、CX3CL1 分泌は抑制される。