

令和 4 年 5 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21595

研究課題名(和文) 高中性脂肪血症による急性膵炎のマウスモデルの確立と治療法探索

研究課題名(英文) Molecular dissection and therapeutic development of hypertriglyceridemia-induced acute pancreatitis

研究代表者

岡崎 啓明 (Okazaki, Hiroaki)

東京大学・医学部附属病院・病院診療医(出向)

研究者番号：80610211

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、申請者らが独自に確立してきた重度高トリグリセライド血症(HTG)のモデルマウスとそのレスキューモデル(apoA-VとSREBP-1cの欠損マウス)を活用して、急性膵炎(AP)の主要な原因の一つであるHTGによるAP(HTG-AP)のマウスモデルの確立と、AP発症の分子機構解明、新規治療法開発に挑んだ。特に、HTG-APの動物モデルの確立において、一定の成果を得た。このHTG-APモデルは、APの発症メカニズム探求、効果の期待されるAP治療薬の評価や新規創薬スクリーニングに役立つ可能性がある。本研究成果をさらに発展させ、予防困難で特効薬の乏しいAPの病態解明と創薬につなげたい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

急性膵炎(AP)は致死的な疾患であるが治療法に乏しい。病態解明と新たな治療開発のためには、ヒトの病態をよく再現したマウスモデルが必要である。ある種の遺伝子異常に起因する遺伝性APのマウスモデルは報告されているが、よりcommonなAPのマウスモデル確立が求められる。本研究では、APの主要な原因の一つである高トリグリセライド血症(HTG)に着目、申請者らが独自に確立してきた、環境因子での誘発が可能な重度HTGの病態生理的モデル(apoA-V欠損マウス)を用いて、HTG-APのモデル確立に一定の成果を得た。本成果をもとに、予防困難で特効薬の乏しいAPの病態解明と治療開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：This study aims to develop a mouse model of hypertriglyceridemia (HTG)-induced acute pancreatitis (HTG-AP) using a mouse model of HTG. We took advantage of apoA-V deficient mice, by which we have revealed a critical role of SREBP-1c in environmental-induced HTG via the SREBP-1c-large VLDL pathway. This animal model may facilitate further studies to uncover the molecular mechanisms underlying HTG-AP and develop novel therapeutic modalities for this intractable life-threatening disease.

研究分野：内分泌代謝疾患・生活習慣病とその合併症

キーワード：急性膵炎 高中性脂肪血症 アポリポ蛋白 動物モデル 治療法探索 難病

1. 研究開始当初の背景

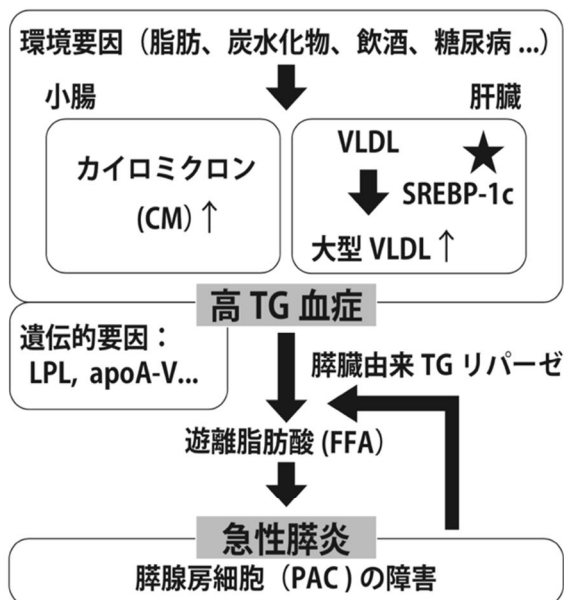
急性膵炎 (AP) は致死率が高いが特效薬の乏しい急性疾患である。その危険因子として、胆道系疾患、アルコール、高トリグリセリド (TG) 血症、機械的侵襲、薬剤、感染症などが知られている。これらにより、膵臓の腺房細胞が障害を受けると、トリプシンやリパーゼなどの酵素が放出され、膵臓やその他の臓器が障害され、多臓器不全を来す。しかし、その分子機構は十分解明されておらず、特異的な治療法にも乏しい。AP の病態解明と治療法開発の遅れの主要な原因として、適切な動物モデルが乏しいことが挙げられる。

ヒトの AP をよく再現したマウスモデルとして、最近、遺伝性 AP (*PRSS1^{R122H}*) のマウスモデルの樹立が報告され、このモデルの解析から、抗凝固薬 + トリプシン阻害薬の組み合わせが、遺伝性 AP マウス (*PRSS1^{R122H}*) の膵炎治療に有効である可能性が示唆された (Gui F et al, *J Clin Invest* 2019)。このように、AP のモデルマウス開発は、病態解明や新規治療開発に大きく寄与するが、このモデルは特殊な遺伝子異常に起因するものであり、その知見が膵炎全般に適用できるとは限らない。common な AP のマウスモデル確立が求められている。

重度高 TG 血症 (HTG) (TG > 1,000 mg/dL) は、膵炎の原因としてよく知られている。重度 HTG 性膵炎 (HTG-AP) は、膵炎全体の 5~40% を占めると言われており、胆道系疾患、アルコールに次いで、AP の原因の第 3 位といわれている。しかし、HTG-AP の分子機構は十分に解明されていない。その原因の一つとして、重度 HTG 自体の適切な動物モデルに乏しかったことが挙げられる。

我々は、重度 HTG のヒトの病態をよく反映する病態生理的マウスモデルを確立してきた。重度 HTG の原因遺伝子 (*LPL*, アポリポ蛋白 C-II, *GPIIIBP1*, *LMFI*, アポリポ蛋白 A-V (apoA-V; 遺伝子名 *APOA5*)) が欠損したモデルマウスのうち、唯一 apoA-V 欠損マウスでは、食事等の環境負荷による重度高 TG 血症 (カイロミクロン (CM)・VLDL 蓄積) を来すことを我々は見出した (Takanashi et al. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2019)。すなわち、アポリポ蛋白 A-V (apoA-V) の欠損マウスは、通常食では軽度な HTG (約 500 mg/dL 前後) を示すが、加齢、高炭水化物食、薬剤 (LXR アゴニスト) 等の環境因子の負荷により、ヒトと同様の環境因子による重度 HTG (1,000 mg/dL 以上) を来す。さらに、このモデルを用いて、apoA-V 欠損における環境要因による VLDL 蓄積には、肝臓で脂質合成を制御する転写因子 SREBP-1c が重要な役割を果たすことを apoA-V と SREBP-1c の両欠損マウス (apoA-V; SREBP-1c 両欠損マウス) を用いて示した。この apoA-V; SREBP-1c 両欠損マウスは、ヒト重度 HTG のレスキューモデルとして活用できる。SREBP-1c 欠損では VLDL 蓄積を選択的にレスキュー可能であることから、これらのモデルに様々な環境負荷を加えることにより、CM や VLDL が選択的な増減するモデルを作成可能である。

そこで、本研究では、申請者独自の HTG モデルマウスを用いて、common な急性膵炎の主要な原因の一つである HTG-AP のモデル確立に挑む。急性膵炎の惹起は、確立された膵臓腺房細胞の障害プロトコール (cerulein モデル、L-アルギニンモデル) によって可能である。これまで、高 TG 血症を惹起する化合物 (P-407) や (Pan et al. *Sci Rep* 2017)、アデノウィルスを用いた人工的な系 (Tang M et al. *Acta Cir Bras* 2016) での高 TG 血症において cerulein を用いて膵炎を誘発したとの報告はあるが、これらの従来の報告は薬物やアデノウィルスを用いた人工的な系によるものであり、ヒトの HTG-AP の特徴である環境要因による HTG 増悪と膵炎発症のモデルとはなり難い。環境要因で誘発可能な重度 HTG の病態生理的モデルを利用する研究が、急性膵炎の病態解明と治療法開発のために必要と考えた。



高 TG 血症 (HTG) 性急性膵炎 (HTG-AP) : LPL 経路 (LPL, apoA-V など) の遺伝子異常は、重度高 TG 血症 (CM, VLDL 増加) を介して急性膵炎を来す。しかし、どのような環境因子が、どのリポ蛋白、どのような遊離脂肪酸を介して、どのように膵炎を惹起するのか明らかでなく、特效薬はない。疾患モデル確立からの解明が求められる。本研究では、申請者が確立してきた HTG モデルマウス (apoA-V 欠損) を利用し、疾患モデル確立、分子機構解明、治療法探索を目指す。SREBP-1c (★) は膵炎の新たな治療標的となる可能性がある。

そこで、予防的手段に乏しく、特効薬もない急性膵炎の治療開発を、マウスモデルの確立によって推進すべく、申請者独自の HTG モデルを活用して、HTG-AP の *in vivo* でのマウスモデル構築と、病態解明、創薬標的探索を行うこととした。

2. 研究の目的

我々が確立してきた重度高 TG 血症モデルを用いて、HTG-AP のマウスモデルを確立、分子機構解明と、新規治療法開発に挑む。

3. 研究の方法

A) HTG-AP の動物モデルの確立

重度 HTG の動物モデルとして、申請者らが確立してきたモデル (apoA-V 欠損マウス) に、膵臓の腺房細胞を障害する負荷を加えることにより、HTG-AP モデルを確立する。腺房細胞障害には、確立されている方法 (cerulein 投与など) を用いる (Gui F et al, *J Clin Invest* 2019)。apoA-V 欠損マウスは、通常食では軽度な HTG (約 500 mg/dL 前後) を示すが、高炭水化物食、高脂肪食、糖尿病、妊娠、薬剤 (LXR アゴニスト) などの環境因子の負荷により、重度 HTG (1,000 mg/dL) となる。これらの刺激を加え、膵炎を評価し (膵重量、組織学的評価、血中膵酵素 (アミラーゼなど) の測定など) 環境因子により誘発可能な HTG-AP マウスモデルを確立する。

B) HTG-AP のメカニズムの解明

A で確立した HTG-AP モデルを用いて、従来の仮説「CM、VLDL 中の TG の水解により生ずる遊離脂肪酸 (FA) (特に不飽和脂肪酸) が、膵臓腺房細胞 (PAC) を障害する」を検証する。apoA-V 欠損、apoA-V;SREBP-1c 両欠損マウスに、様々な環境因子刺激を加え、B-1) 各種環境因子 (炭水化物、脂質など) 各種リポ蛋白 (CM、VLDL) の膵炎発症における役割を *in vivo* で検討する。環境因子刺激として、高フルクトース食、オリーブオイル投与は、それぞれ VLDL、CM を選択的に増加させる点で有用で、SREBP-1c 欠損は選択的に VLDL 蓄積のみをレスキュー出来る点で有用である (Takanashi et al. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2019)。膵炎評価に加え、膵組織の炎症細胞浸潤、サイトカイン変化、NF- κ B 経路、DNA 損傷、アポトーシス、ER ストレス、ROS 等の評価を行い、膵障害の分子機序を解明する。

全ての遺伝子組換え実験は、遺伝子組換え生物等規制法および東京大学遺伝子組換え生物等の使用等実施規則を遵守して行われ、適切な拡散防止措置が取られる。全ての動物実験は倫理委員会の承諾を経て東京大学動物実験実施規則に基づき実施される。廃棄物処理や実験場所に関して、関係法令・指針および研究施設の設けた基準を遵守する。ウィルスベクター (レベル 2) を用いた実験は東京大学研究用微生物安全管理規則を遵守して実施される。以上、本研究の遂行にあたって法令等の遵守に必要な対処は全てなされている。

4. 研究成果

最終年度までの研究の結果、野生型マウスや、申請者らが確立してきた HTG モデル (apoA-V 欠損マウス) に、膵臓の腺房細胞を障害する負荷 (セルレイン投与) を加えることにより、血中アミラーゼの上昇、膵腫大、膵臓の炎症系遺伝子 (monocyte chemoattractant protein-1 (*Mcp1*), tumor necrosis factor alpha (*Tnfa*), interleukin 1 (*Il1b*), and *Il6* など) の mRNA 発現亢進を来すなど、急性膵炎が誘発されることを見出した。apoA-V 欠損モデルでは野生型マウスに比べて、これらの膵炎のマーカーが悪化する傾向が認められ、その傾向は HTG を悪化させる薬物投与 (Triton WR-1339) によりさらに増悪する傾向を認めたことから、apoA-V 欠損モデルは、HTG-AP の新たな動物モデルとして有用である可能性が示唆された。これらのモデルを活用することにより、重度 HTG による急性膵炎 (HTG-AP) のメカニズムが探求可能と考えられ、どのような栄養負荷 (炭水化物の量や質、脂質の量や質など) が膵炎を惹起するのか、SREBP-1c 欠損による apoA-V 欠損マウスの高 VLDL 血症のレスキューは膵炎を軽減できるのか、さらに検討を進めている。また、本モデルにより、遺伝性膵炎モデルマウス (*PRSS1^{R122H}*) における有効性が最近報告された抗凝固薬 + トリプシン阻害薬の組み合わせ (Gui F et al, *J Clin Invest* 2019) など、効果の期待される新たな膵炎治療薬の評価やスクリーニングも可能と考えられ、AP 治療の候補薬剤の *in vivo* 評価も開始している。予防困難で特効薬の乏しい膵炎の病態解明と創薬につながる知見を得るべく、さらに検討を進めたい。

結語: 本研究課題では、独自に確立してきた重度 HTG とそのレスキューモデル (apoA-V と SREBP-1c の両欠損マウス) を活用して、膵炎の主要な原因の一つである重度 HTG による急性膵炎 (HTG-AP) のマウスモデルを確立、膵炎発症の分子機構解明と、新規治療法開発を目的に研究を遂行、特に、HTG-AP の動物モデルの確立において、一定の成果を得た。この HTG-AP モデルを用いて、HTG-AP の発症のメカニズムの解明、候補となる治療薬の *in vivo* スクリーニングをさらにすすめ、新規治療法開発につなげたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 岡崎啓明	4. 巻 62
2. 論文標題 血中脂質研究の今 環境と遺伝子 高TG血症はなぜ増悪するのか?	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 脂質生化学研究	6. 最初と最後の頁 8-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

1. 著者名 岡崎啓明	4. 巻 70
2. 論文標題 原発性高カイルロミクロン血症	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 新薬と臨床	6. 最初と最後の頁 70-80
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

1. 著者名 Okazaki Hiroaki, Gotoda Takanari, Ogura Masatsune, Ishibashi Shun, Inagaki Kyoko, Daida Hiroyuki, Hayashi Toshio, Hori Mika, Masuda Daisaku, Matsuki Kota, Yokoyama Shinji, Harada-Shiba Mariko	4. 巻 28
2. 論文標題 Current Diagnosis and Management of Primary Chylomicronemia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Atherosclerosis and Thrombosis	6. 最初と最後の頁 883 ~ 904
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5551/jat.RV17054	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 岡崎 啓明	4. 巻 128
2. 論文標題 特集 2020年代の内科診療-26テーマの近未来予想 内分泌・代謝内科 [その他の代謝疾患] 脂質異常症診療: 期待される高LDL-C血症, 高TG血症の新薬とパラダイムシフト	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 内科	6. 最初と最後の頁 1191 ~ 1196
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15106/j_naika128_1191	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10件（うち招待講演 7件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hiroaki Okazaki
2. 発表標題 Critical Role of SREBP-1c Large-VLDL Pathway in Environment-induced Hypertriglyceridemia of apoA-V Deficiency
3. 学会等名 Vascular Discovery: From Genes to Medicine Scientific Sessions 2020 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 岡崎 啓明
2. 発表標題 環境と遺伝子~高TG血症はなぜ増悪するのか？
3. 学会等名 第62回日本脂質生化学会 (招待講演)
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 田中督記、高梨幹生、李驍驍、木村武史、石セイセン、高瀬暁、岡崎佐智子、飯塚陽子、門脇孝、山内敏正、岡崎啓明
2. 発表標題 apoA-V欠損マウスを用いたインスリン欠乏時の重度高中性脂肪血症のメカニズム解明
3. 学会等名 第52回日本動脈硬化学会総会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 岡崎 啓明
2. 発表標題 中性脂肪の動脈硬化リスクに迫る 中性脂肪と動脈硬化 分子遺伝学から考える
3. 学会等名 第52回日本動脈硬化学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 岡崎 啓明、後藤田貴也
2. 発表標題 原発性脂質異常症の分子メカニズムと治療との関連 原発性高カイロミクロン血症の治療標的
3. 学会等名 第52回日本動脈硬化学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 田中 督記，高梨 幹生，木村 武史，李 驍驍，石セイセン，野田 明里，高瀬 暁，岡崎佐智子，飯塚 陽子，門脇 孝，山内 敏正，岡崎 啓明
2. 発表標題 妊娠時高中性脂肪血症のマウスモデルの構築と分子機構の解明
3. 学会等名 第63回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 岡崎 啓明
2. 発表標題 著明な高トリグリセライド血症をみたら
3. 学会等名 第60回日本臨床化学会年次学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 岡崎 啓明
2. 発表標題 高中性脂肪血症の機序と対策
3. 学会等名 第30回臨床内分泌代謝 Update（招待講演）
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 田中 督記, 石 セイセン, 高梨 幹生, 高瀬 暁, 岡崎 佐智子, 飯塚 陽子, 門脇 孝, 山内 敏正, 岡崎 啓明
2. 発表標題 ベキサロテンによる薬剤性高中性脂肪血症のマウスモデル確立と分子機序解明
3. 学会等名 第53回日本動脈硬化学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 岡崎 啓明
2. 発表標題 中性脂質代謝と動脈硬化 新たな制御標的の探索
3. 学会等名 第53回日本動脈硬化学会総会・学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年～2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>東京大学医学部 糖尿病・代謝内科 第2・11研究室ホームページ http://plaza.umin.ac.jp/~lipid/</p>

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

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
---------	---------