

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 8 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591004

研究課題名(和文)急性膵炎発症の分子メカニズムの解明と新たな膵炎治療法の開発

研究課題名(英文)Clarify the molecular mechanism of acute pancreatitis and develop a new approach for treatment of pancreatitis

研究代表者

真嶋 浩聡 (Mashima, Hirosato)

秋田大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：10261869

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：急性膵炎発症のメカニズムは不明であり、治療方法に近年進歩はみられない。我々が2011年に明らかにした急性膵炎の初期像のモデルであるIRF2 KOマウスで著明な発現レベルの変化を来す遺伝子群から様々な手法を用いて絞り込みを行い、最終的にカルシウム結合タンパクの2種類の遺伝子にたどり着いた。S100g、Anxa10の機能解析を培養細胞、マウスを用いて行い、S100gが膵炎発症に関与していることを見出した。

研究成果の概要(英文)：The mechanism of the onset of acute pancreatitis is still unknown. There has been no progress in the treatment of acute pancreatitis. The pancreas of interferon regulatory factor-2 (IRF-2) knock-out mice shows the early phase of acute pancreatitis (Mashima H et al. Gastroenterology 2011). We have selected candidate genes of acute pancreatitis among the highly up-regulated or down-regulated genes in IRF2 KO pancreas compared to the control. Finally, we have chosen the two genes, which are both calcium-binding proteins. Then, we analyzed the function of S100g and Anxa10 by using a cell line, which is manipulated genetically, and wild-type and knock-out mice. We have shown S100g may have an important role in the onset of acute pancreatitis.

研究分野：消化器内科学、膵臓病学

キーワード：膵炎 膵外分泌 S100g Anxa10

1. 研究開始当初の背景

急性膵炎の原因は多岐にわたるが、アルコール性、胆石性、特異性が多くを占める。治療としては禁食、輸液、蛋白分解酵素阻害薬、抗生剤、経管栄養などが行われるが、その治療方法に進展はあまり見られない。重症急性膵炎の死亡率も 8-9% のままで、下げ止まりとなってきた。これはひとえに発症のメカニズムが未だに解明されておらず、治療方法に進展がないためである。

2. 研究の目的

本研究は、我々がこれまで研究してきた遺伝子改変マウス (IRF2 遺伝子欠損マウス、Mashima H et al. Gastroenterology 2011) に見られる膵外分泌異常の原因を更に究明して、急性膵炎発症のメカニズムの全貌を分子レベルで明らかにし、新たな膵炎治療薬のターゲットを絞り込み、新薬の開発基盤を創生することを目的とした。

3. 研究の方法

cDNA microarray による mRNA レベルの比較。膵腺房細胞株 AR42J 細胞を利用して IRF2 過剰発現細胞 (AR42J-IRF2)、dominant-negative IRF2 過剰発現細胞 (AR42J-dnIRF2)、コントロール細胞 (AR42J-GFP) を樹立し、細胞間の発現比較による候補遺伝子の絞り込み。

野生型マウスに急性膵炎を発症させた際の発現変化による候補遺伝子の絞り込み。

AR42J 細胞を利用して S100g 過剰発現細胞 (AR42J-S100g)、Anxa10 過剰発現細胞 (AR42J-Anxa10)、コントロール細胞 (AR42J-GFP) を樹立。その性質の変化の検討 (アミラーゼ分泌、細胞内 Ca²⁺濃度)。

野生型マウスにセルレイン膵炎を惹起し、S100g、Anxa10 の変化の検討 (qPCR、免疫組織化学)。

S100g KO マウスを用いての検討。

4. 研究成果

の検討で、著明な発現レベルの変化がみられた遺伝子群の数を表にすると

Total records		Dispersed acini		
: 45037		2 ⁴ ≤	2 ¹ ≤	
Total	2 ⁴ ≤	14	21	2011
pancreas	2 ¹ ≤	25	438	
		1063		

Total records		Dispersed acini		
: 45037		≤ 2 ⁻⁴	≤ 2 ⁻¹	
Total	≤ 2 ⁻⁴	4	7	1416
pancreas	≤ 2 ⁻¹	3	274	
		974		

であった。

野生型マウスにセルレイン膵炎を惹起すると IRF2 の発現は低下することから、膵炎発症に関与し IRF2 で直接制御されている遺伝子であれば、次のように変化することが予想される。

Irfl2^{-/-}膵炎 セルレイン膵炎 AR42J 細胞
GFPirf2dn 細胞で
GFPirf2 細胞で

そこで の検討から候補遺伝子の絞り込みを行った。この条件を全て満たしたものは、RIKEN cDNA 1810009J06 gene (trypsinogen 4) と S100 ファミリーに属するカルシウム結合タンパク (S100g)、アネキシンファミリーに属するカルシウム結合蛋白 (Anxa10) の計 3 個であった。この中で trypsinogen 4 は膵炎発症への関与が当然予想される遺伝子である。逆にこの遺伝子が同定されたということは解析方法が間違っていないことを意味する。カルシウムシグナルは膵臓に限らず、全ての外分泌機構において重要な役割を果たしている。このシグナル伝達に異常を起こせば、外分泌異常、膵炎発症に大きく関与することが容易に想像される。2011 年に他のグループから IRF2 KO マウスの膵臓の遺伝子変異を検討したデータが報告された (Hayashi H. et al. PNAS 2011)。この二つの遺伝子は発現が大きく上昇する遺伝子として報告されており、我々の結果と同様であった。

次に AR42J 細胞に S100g、Anxa10 を過剰発現させた細胞を樹立して比較検討した ()。S100g 過剰発現細胞 (AR42J-S100g) では 100pM CCK-8 刺激によるアミラーゼ分泌の有意な低下がみられ、細胞内 Ca²⁺濃度の上昇も抑制された。Anxa10 過剰発現細胞 (AR42J-Anxa10) でも同様な傾向を弱いながらも認められたが、有意なものではなかった。

野生型マウスにセルレイン膵炎を惹起し、S100g、Anxa10 の発現の変化を検討した ()。セルレイン膵炎を起こすと S100g は約 2.5 倍の発現レベルの上昇がみられ、免疫組織化学では基底膜よりの細胞質に patchy に染色された。Anxa10 は生理条件下のマウス膵では発現がみられなかったが、セルレイン膵炎によって発現がみられ、細胞質全体が染色された。以上から、Anxa10 は発現がないところから膵炎発症に伴って発現してくる興味深い因子ではあるが、過剰発現 AR42J での効果が弱く、また KO マウスがまだ作成されていないために以降の検討から外した。

韓国 Chungbuk National University の Eui-Bae Jeung 教授より S100g KO マウスの供与を受けた。このマウスは生理条件下では膵臓及び全身に特に異常を認めなかった。膵腺房を単離して、恒常性外分泌及び CCK-8 刺激による調節性外分泌をアミラーゼ分泌を指標に評価した。S100g KO マウスの膵臓において両者ともに増加していた。次に、セルレイン

ン膵炎を惹起してコントロールマウスと比較した。血清アミラーゼには変化はみられなかったが、膵炎スコア（浮腫、出血、壊死、炎症細胞浸潤）では K0 マウスが低い傾向があり、膵ホモジェネート中のトリプシン活性は有意に低下していた。まだプレリミナリーな検討ではあるが、S100g K0 マウスでは膵炎が軽減する可能性があり、その機序として膵炎発症に伴う外分泌の低下が抑制され、膵内でのトリプシンの異所性活性化が抑制される可能性が考えられる。今後検討を重ねる必要がある。

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 11 件)

- 1) 真嶋浩聡、大西洋英：
膵線維化と膵星細胞． SURGERY FRONTIER 2013; 20: 320-323.
- 2) 真嶋浩聡、大西洋英：
急性膵炎の発症のメカニズム ～細胞内では何が起きているか～． 胆と膵 2013; 34: 1035-1041.
- 3) 大西洋英：
糖尿病と膵疾患 G. I. Research 2013; 21: 255-259.
- 4) 真嶋浩聡、大西洋英：
I κ B α の欠失はRelAを活性化し、Spi2Aの亢進を介して急性膵炎を減弱させる． Review of Gastroenterology & Clinical Gastroenterology and Hepatology 2013; 8: 26-30.
- 5) Yamada Y, Mashima H, Sakai T, Matsushashi T, Jin M, Ohnishi H. Functional roles of TGF-1 in intestinal epithelial cells through Smad-dependent and Non-Smad pathways. Dig Dis Sci. 2013; 58: 1207-1217.
- 6) 真嶋浩聡、大西洋英：
IRF2K0 マウスを用いて、膵炎発症のメカニズムの解明を目指す。アルコールと医学生物学 アルコール性臓器障害研究の新展開 32, 12-18, 2014.
- 7) Sakai T, Mashima H, Yamada Y, Goto T, Sato W, Dohmen T, Kamada K, Yoshioka M, Uchinami H, Yamamoto Y, Ohnishi H. The roles of interferon regulatory factor (IRF) 1 and IRF2 in the progression of human pancreatic cancer. Pancreas 2014; 43(6): 909-916.
- 8) 真嶋浩聡、酒井利隆、大西洋英：膵疾患における Interferon Regulatory Factor の役割。膵臓 2014; 29: 23-31.
- 9) 真嶋浩聡、大西洋英：急性膵炎発症のメカニズム。日本消化器病学会雑誌 2014; 111: 1550-1560.
- 10) 真嶋浩聡、大西洋英：急性膵炎発症のメカニズム。胆と膵 臨時増刊特大号 特集

膵炎大全～もう膵炎なんて怖くない～， 2014; 35: 1001-1009.

11) 真嶋浩聡、大西洋英：膵炎とオートファジー G. I. Research in press

〔学会発表〕(計 10 件)

- 1) Sakai T, Mashima H, Yamada Y, Goto T, Ohnishi H:
The role of interferon regulatory factor (IRF)-1 and IRF-2 in the progression of human pancreatic cancer. Annual Meeting of American Gastroenterological Association, Digestive Disease Week 2013, Orlando (USA), 2013.5.
- 2) 真嶋浩聡、大西洋英：
IRF2K0 マウスを用いて、膵炎発症のメカニズムの解明を目指す。第 32 回アルコール医学生物学研究会、シンポジウム [アルコールと消化器疾患]，東京，2013.1.
- 3) 真嶋浩聡、大西洋英：
IRF2K0 マウスを用いて、膵炎発症のメカニズムの解明を目指す。第 50 回日本臨床分子医学学会学術集会、東京、2013.4.
- 4) 真嶋浩聡、大西洋英：
急性膵炎における VAMP7 の役割。第 44 回日本膵臓学会大会、トピックスセッション，仙台，2013.7.
- 5) 酒井利隆、真嶋浩聡、大西洋英：
膵臓がんにおける IRF1 および IRF2 の役割。第 44 回日本膵臓学会大会，仙台，2013.7.
- 6) 酒井利隆、真嶋浩聡、山田由美、後藤隆、吉岡政人、打波宇、山本雄造、大西洋英：
膵臓がんにおける IRF1 および IRF2 の役割。膵臓がんにおける IRF1 および IRF2 の発現とその働き。第 55 回日本消化器病学会大会 (JDDW2013)，品川，2013.10.
- 7) 真嶋浩聡、酒井利隆、山田由美、後藤隆、佐藤巨、鎌田健太郎、道免孝洋、大西洋英：
膵臓癌における IRF1, IRF2 の役割。第 48 回膵臓病研究会、仙台、2014.2.
- 8) 真嶋浩聡：急性膵炎発症のメカニズムー新たな膵炎治療法の開発を目指してー。滋賀消化器病研究会・特別講演、大津、2015.2.
- 9) Mashima H, Watanabe N, Arata S, Ohnishi H. Involvement of the calcium-binding protein in the onset of acute pancreatitis. Digestive Disease Week 2015, Washington (USA), 2015.5.
- 10) 真嶋浩聡、渡部昇、荒田英、大西洋英：
二種類のカルシウム結合蛋白と急性膵炎の関連の検討。第 46 回日本膵臓学会大会，シンポジウム，名古屋，2015.6.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：

発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.akita-u.ac.jp/department/gs/kenkyu-org/kouza.php?koza=naika1>

<http://www.med.akita-u.ac.jp/~naika1/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

真嶋 浩聡 (MASHIMA, Hirosato)

秋田大学・医学部・講師

研究者番号：10261869

(2) 研究分担者

大西 洋英 (OHNISHI, Hirohide)

秋田大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：00313023

(3) 連携研究者

()

研究者番号：