

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591016

研究課題名(和文) In vivoの膵星細胞を標的とした慢性膵炎の治療戦略の開発

研究課題名(英文) Generation and analysis of chronic pancreatitis model mice

研究代表者

大村谷 昌樹 (Ohmuraya, Masaki)

熊本大学・生命資源研究・支援センター・准教授

研究者番号：60398229

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：慢性膵炎は膵内の持続性炎症により、膵外・内分泌機能が低下していく原因不明の疾患である。我々は遺伝性膵炎の原因遺伝子としてSPINK1を特定し、そのマウスホモログSpink3遺伝子のノックアウトマウスを樹立した。今回、2系統のSPINK1ノックインマウスを樹立し、慢性膵炎モデルマウスを樹立した。膵腺房細胞の脱落、広範な線維化、炎症細胞の浸潤を認め、ヒト慢性膵炎と一致していた。膵臓では、オートファジーに由来する巨大な異常空胞とLC3-IIの亢進を確認し、残存した腺房細胞にp62蛋白の異常蓄積が確認された。また、このマウスにビタミンAを表出したりボソームを投与し、活性型膵星細胞への効果も検討した。

研究成果の概要(英文)：Mutations in SPINK1 are associated with chronic pancreatitis (CP). Genetic deletion of Spink3, mouse homolog of SPINK1, causes postnatal lethality precluding mechanistic investigations into the effects of SPINK1 deficiency. Here we have developed SPINK1 knockin in mice by cre-loxP technology (termed "SPINK1-X-in" and "SPINK1-in"). This partial restoration of SPINK1 function rescues mice from lethality, but, in contrast to control mice, SPINK1-X-in and SPINK1-in mice within 4 weeks developed pancreas damage the earliest manifestations of which were impaired autophagy and increased trypsin activity, and these mice progressively develop spontaneous chronic pancreatitis. SPINK1-in mice represent a novel, clinically relevant, genetic model of human CP, revealing the mechanisms whereby SPINK1 insufficiency causes CP. The results identify new targets of SPINK1 regulating autophagic and lysosomal pathways in pancreas.

研究分野：膵臓病学、発生工学

キーワード：慢性膵炎 膵星細胞 SPINK1/Spink3 オートファジー ネクロプトーシス

1. 研究開始当初の背景

(1) 膵星細胞を標的とした慢性膵炎の治療法の開発

Pancreatic stellate cell: PSC は慢性膵炎や膵癌における線維化の中心的役割を果たす細胞である。PSC は障害組織を修復する反応の一つとして、コラーゲンをはじめとする細胞外マトリックス(extra cellular matrix: ECM) を産生、分泌する。しかし過剰な ECM の沈着はかえって膵の血流や膵液の流れを妨げ、膵機能を悪化させる。したがって、慢性膵炎(膵線維症)の治療は、膵機能の維持および発癌阻止の観点から、PSC が一つの治療標的となることは明かである。

(2) 慢性膵炎モデル動物の開発

これまでの研究から PSC の増殖、機能を抑制する、または PSC の消滅を目的とした研究が、in vitro の系を用いて行われてきた。新規の治療開発には、その効果判定として、in vivo つまり動物モデルが不可欠である。

2. 研究の目的

(1) 治療効果判定のための遺伝子改変慢性膵炎モデルマウスの確立

(2) PSC に特異的なドラッグデリバリーシステムの開発、を行う。

3. 研究の方法

申請者らは過去に遺伝性膵炎の原因遺伝子 SPINK1 (serine protease inhibitor Kazal type 1)のマウスホモログ Spink3 のノックアウトマウス (Spink3^{-/-}) を樹立している (Gastroenterology 2005)。

Spink3^{-/-}マウスは出生直後に膵腺房細胞に特異的に異常なオートファジーを伴う細胞死が一斉に誘導され、膵外分泌機能不全の結果、生後 2 週間以内に死亡する。そこで、ヒト SPINK1 遺伝子を 2 つの異なる方法でマウス染色体内に置換して、2 種類の遺伝子改変慢性膵炎モデルマウスの作出を行った。

(1) 慢性膵炎マウス ; CAG promoter-SPINK 遺伝子 pA (トランスジーン)

を X 染色体に置換する方法 (SPINK1-X-in mice)。X 染色体の不活性化とは哺乳類の性染色体である X 染色体が、1 本を除いて、残りの X 染色体で遺伝子発現が抑制される構造に変化することをいう。この原理を応用して、トランスジーンを Cre-loxP システムを用いて、あらかじめ X 染色体に lox-P 配列が挿入されている ES 細胞に置換する。結果、雄では SPINK1 遺伝子がすべての細胞で発現するのに対し、メスではランダムに SPINK1 が発現する細胞と発現しない細胞に存在することになる。

(2) 慢性膵炎マウス ; (プロモーターの無い) SPINK1 遺伝子を Cre-loxP システムを用いて、Spink3 遺伝子のプロモーター直下に置換した。マウス Spink3 プロモーターによって、ヒト SPINK1 遺伝子の発現が制御されるマウスが得られた (SPINK1-in mice)。

(3) 活性型膵星細胞に特異的に薬剤を取り込ませる方法 ; ビタミン A を表出したリポソームが活性化した肝星細胞に特異的に取り込まれることが知られている。膵星細胞にも肝星細胞と同様に、活性化されるとビタミン A を取り込む性質があるため、同様の手法を用いて、リポソームを作製し、その中に、ローダミン、PSC に細胞死を誘導することが期待される薬剤、を含ませて、慢性膵炎マウスに投与する。(現在 PSC に焦点をあてた治療として効果が期待される薬剤は Rho kinase 阻害剤、MAPK 阻害剤、アンジオテンシン変換酵素阻害剤、抗酸化剤などがある)

4. 研究成果

(1) SPINK1-X-in mice の解析

Cre-loxP システムを用いて、X 染色体に高率にトランスジーンを ES 細胞に置換することが出来た。

マウス膵臓におけるヒト SPINK1 遺伝子の発現を確認するため、SPINK1 mRNA に特異的なプローブを用いて ISH 法で確認したが、オスではすべての細胞で発現が確認された

が、メスではモザイク状の発現が見られ、X染色体不活性化が起きていることが確認された。尚、この新たな遺伝子改変マウスの作出法に関して、特許申請（モデル等物の作出方法及びモデル動物）を行った。

このマウスと、Spink3 ヘテロ欠損マウスとを交配し、Spink3 欠損 SPINK1-X-in マウスを樹立した。このマウスの p0.5 の膵臓では、オスは正常であった。つまり、ヒト SPINK1 遺伝子がマウス Spink3 を代償することが明らかとなった。メスでは正常細胞と、オートファジーを伴う細胞がモザイク状に混在していることが明らかとなった。

このマウスは約 80%が成獣まで成長するが、腺房細胞の脱落と広範な線維化を来し、ヒト慢性膵炎と酷似していたことから、慢性膵炎のモデルマウスと考えられた。

(2) SPINK1-in mice の解析

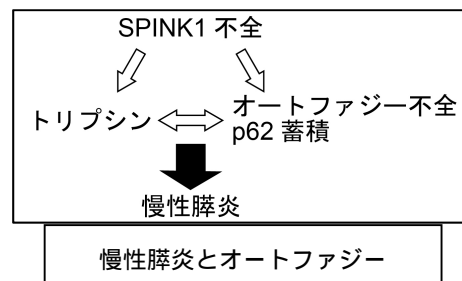
Cre-loxP システムを用いて、Spink3 プロモーター下に SPINK1 遺伝子を置換した。発現量を内在性の Spink3 遺伝子と比較したが、ほぼ同程度に SPINK1 が発現していることを確認した。このマウスを交配して、SPINK1 を両アリルにもつマウスはほぼ正常であることを確認した。ヒト患者において、SPINK1 遺伝子のプロモーター領域、またはスプライスドナー領域の変異によって、遺伝性膵炎を発症する家系が知られている。SPINK1 遺伝子の発現を抑制することで、慢性膵炎を発症するのかを明らかにするため、片方のアリルに SPINK1、もう片方を発現しないようにして、SPINK1 遺伝子の発現を約 30%に落としたマウスを作製した (SPINK1-in mice)。



Spink3-in マウス (3週齢)

K1-in

mice)。このマウスは、致死性は回避されるものの、生後 4 週齢において、(1)と同様に慢性膵炎を発症した。このマウスにおいては、Spink3 欠損マウスと同様、オートファジー



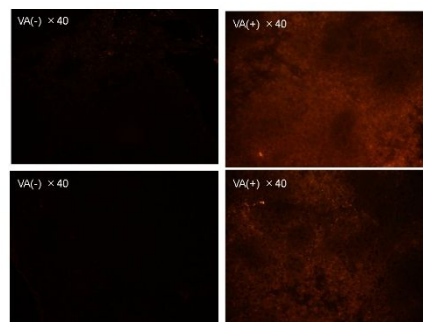
ー
に
由
来
す
る
巨
大

な空胞の形成が見られ、オートファジーの選択的な基質である p62 タンパクの蓄積が見られたことから、オートファジー不全が引き起こされていると考えられた。

本研究結果から、SPINK1 不全による遺伝性膵炎患は、オートファジー不全、p62 の蓄積、トリプシンの活性化によって引き起こされている可能性が示唆された。

(3) ビタミン A 表出リポソームの作製

研究協力者の佐藤株式会社バイオメッドコア・代表取締役)がビタミン A 表出リポソームを作製し、上記の(2)の SPINK1-in マウスの 3 週齢に、まずローダミンを含ませたリポソームを腹腔内投与し、活性型膵星細胞



に取り込まれるか、検討を行った。

ローダミンの蛍光を検出した結果、膵臓にローダミンの蛍光が検出されたものの、活性型 PSC に特異的に取り込まれているのか判定がつかなかったため、今後のさらなる検討が必要であると考えられた。

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 14 件)

すべて査読あり

1. Nakagawa Y, Sakuma T, Sakamoto T, **Ohmuraya M**, Nakagata N, Yamamoto T. Production of knockout mice by DNA microinjection of various CRISPR/Cas9 vectors into freeze-thawed fertilized oocytes. BMC Biotechnol. 2015 in press. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25997509>)
2. Ida S, Ozaki N, **Araki K**, Hirashima K, Zaito Y, Taki K, Sakamoto Y, Miyamoto Y, Oki E, Morita M, Watanabe M, Maehara Y, Yamamura KI, Baba H, **Ohmuraya M**. SPINK1 Status in Colorectal Cancer, Impact on Proliferation, and Role in Colitis-associated Cancer. Mol Cancer Res. 2015. pii: molcanres.0581.2014. (<http://mcr.aacrjournals.org/content/early/2015/03/24/1541-7786.MCR-14-0581.long>)
3. Hashimoto D, Chikamoto A, Sakata K, Nakagawa S, Hayashi H, **Ohmuraya M**, Hirota M, Yoshida N, Beppu T, Baba H. Staging laparoscopy leads to rapid induction of chemotherapy for unresectable pancreaticobiliary cancers. Asian J Endosc Surg. 2015;8:59-62. DOI: 10.1111/ases.12138.
4. Tsukamoto M, Hashimoto D, Chikamoto A, Abe S, **Ohmuraya M**, Baba H. Clinical features and management of pancreatic solid pseudopapillary tumor. Am Surg. 2014;80:1212-5. (<http://www.ingentaconnect.com/content/esc/tas/2014/00000080/00000012/art00022?token=00511ec15cbd8e0402f376405847447b49762f42735176383a66667a33757e6f4f2858592f3f3b57b>)
5. Nakagawa Y, Sakuma T, Nakagata N, Yamasaki S, Takeda N, **Ohmuraya M**, Yamamoto T. Application of oocyte cryopreservation technology in TALEN-mediated mouse genome editing. Exp Anim. 2014;63:349-55. (https://www.jstage.jst.go.jp/article/expanim/63/3/63_14-0013/_article)
6. Ozaki N, Fukuchi Y, Tomiyoshi SR, Uehara H, Ida S, Wang J, **Araki K**, Sibilia M, Baba H, Yamamura K, **Ohmuraya M**. Autophagy regulation in pancreatic acinar cells is independent of epidermal growth factor receptor signaling. Biochem Biophys Res Commun. 2014;446:224-30. DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.02.111.
7. Nakagawa Y, Yamamoto T, Suzuki K, Araki K, Takeda N, **Ohmuraya M**, Sakuma T. Screening methods to identify TALEN-mediated knockout mice. Exp Anim. 2014;63:79-84. (https://www.jstage.jst.go.jp/article/expanim/63/1/63_13-0039/_article)
8. Sakata K, **Ohmuraya M**, **Araki K**, Suzuki C, Ida S, Hashimoto D, Wang J, Uchiyama Y, Baba H, Yamamura K. Generation and analysis of serine protease inhibitor kazal type 3-cre driver mice. Exp Anim. 2014;63:45-53. (https://www.jstage.jst.go.jp/article/expanim/63/1/63_13-0034/_article)
9. Hashimoto D, Chikamoto A, **Ohmuraya M**, Abe S, Nakagawa S, Beppu T, Takamori H, Hirota M, Baba H. Impact of Postoperative Weight Loss on Survival After Resection for Pancreatic Cancer. JPEN J Parenter Enteral Nutr. 2014. (<http://pen.sagepub.com/content/early/2014/03/01/08850666141250000>)

14/01/29/0148607114520992.long)

10. Hashimoto D, Chikamoto A, **Ohmuraya M**, Sakata K, Miyake K, Kuroki H, Watanabe M, Beppu T, Hirota M, Baba H. Pancreatic cancer in the remnant pancreas following primary pancreatic resection. *Surg Today*. 2014;44:1313-20. DOI: 10.1007/s00595-013-0708-0.
11. Hashimoto D, Chikamoto A, **Ohmuraya M**, Hirota M, Baba H. Pancreaticodigestive anastomosis and the postoperative management strategies to prevent postoperative pancreatic fistula formation after pancreaticoduodenectomy. *Surg Today*. 2014;44:1207-13. DOI: 10.1007/s00595-013-0662-x.
12. Ozaki N, **Ohmuraya M**, Ida S, Hashimoto D, Ikuta Y, Chikamoto A, Hirota M, Baba H. Serine protease inhibitor Kazal type 1 and epidermal growth factor receptor are expressed in pancreatic tubular adenocarcinoma, intraductal papillary mucinous neoplasm, and pancreatic intraepithelial neoplasia. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*. 2013;20:620-7. DOI: 10.1007/s00534-012-0587-6.
13. Piao X, Komazawa-Sakon S, Nishina T, Koike M, Piao JH, Ehlken H, Kurihara H, Hara M, Van Rooijen N, Schütz G, **Ohmuraya M**, Uchiyama Y, Yagita H, Okumura K, He YW, Nakano H. c-FLIP maintains tissue homeostasis by preventing apoptosis and programmed necrosis. *Sci Signal*. 2012;5(255):ra93. DOI: 10.1126/scisignal.2003558.
14. **Ohmuraya M**, Sugano A, Hirota M, Takaoka Y, Yamamura K. Role of Intrapancreatic SPINK1/Spink3 Expression in the Development of Pancreatitis. *Front Physiol*. 2012 7;3:126.

DOI: 10.3389/fphys.2012.00126.

〔学会発表〕(計 20 件)(主要発表のみ記載)

1. **大村谷昌樹**. 急性膵炎の発症におけるカテプシン D の役割-膵炎とオートファジー-. 大阪大学タンパク質研究所セミナー “オートファジーと疾患”平成 26 年 2 月 20 日-21 日. 大阪大学タンパク質研究所一階講堂(大阪府吹田市).
2. **大村谷昌樹**. オートファジー不全と慢性膵炎発症メカニズムの解明. 第 23 回日本 Cell Death 学会学術集会. 平成 26 年 7 月 18 日- 19 日. 東京医科歯科大学 M&D タワー2F 鈴木章夫記念講堂(東京都文京区).
3. **大村谷昌樹**. SPINK 不全に伴うオートファジーの異常と慢性膵炎の発症. 第 22 回若手膵臓研究会. 平成 26 年 10 月 22 日. 生田神社会館 3 階「梅の間」(兵庫県神戸市)
4. **Masaki Ohmuraya**, Kazuya Sakata, Katsunobu Taki, Miyuki Matsumoto, Kimi Araki, and Ken-ichi Yamamura. Impaired Autophagy induced by Serine Protease Inhibitor Kazal (SPINK) Insufficiency Causes Chronic Pancreatitis in Mice. 第 37 回日本分子生物学会年会. 平成 26 年 11 月 25 日~27 日.パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
5. **大村谷昌樹**, 能登原憲司, 廣田昌彦. 急性膵炎におけるオートファジー調節的基質 p62 の役割. 慢性膵炎におけるオートファジーの解析. 第 45 回日本膵臓学会. 平成 26 年 7 月 11 日-12 日, 北九州国際会議場(福岡県北九州市)
6. **Masaki Ohmuraya**, Kazuya Sakata, Olga Mareninova, Kenji Notohara, Ilya Gukovsky, Anna Gukovskaya. SPINK insufficiency causes impaired autophagy resulting in chronic pancreatitis. 2014 APA/JPS, 45th Anniversary Meeting.

- Nov. 5-8, 2014, Hapuna Beach Prince Hotel (Hawaii, USA)
7. **Masaki Ohmuraya**, Kazuya Sakata, Ken-ichi Yamamura. Autophagy and Pancreatitis. The 16th Northeastern Asian Symposium on Autophagy: from Basic to Medicine. Dec. 18-21, 2014, The Westin Chosun Busan Hotel (Busan, Korea).
 8. **大村昌樹** 橋本大輔 坂田和也 能登原憲司 馬場秀夫 カテプシン D による膵臓細胞内トリプシン活性化機構の解析第 44 回日本膵臓学会大会 平成 25 年 7 月 25-26 日 仙台国際センター (宮城県仙台市)
 9. **大村昌樹** オートファジー不全がもたらす慢性膵炎発症メカニズムの解析第 7 回オートファジー研究会 2013 年 12 月 19 日~21 日 ヤマハリゾート つま恋 (静岡県掛川市)
 10. **Masaki Ohmuraya**, Kazuya Sakata, Kenji Notohara, **Kimi Araki**, Hideo Baba, Ken-ichi Yamamura. Chronic inflammation in the pancreas induces pre-cancerous development in mice. 慢性膵炎により引き起こされる癌関連遺伝子の異常第 72 回日本癌学会学術総会 2013 年 10 月 3-5 日 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
 11. **大村昌樹** **荒木喜美** 山村研一. オートファジー不全がもたらす慢性膵炎発症メカニズムの解析. 第 36 回日本分子生物学会 神戸ポートアイランド 2013 年 12 月 3-6 日 (兵庫県神戸市)
 12. **Masaki Ohmuraya**, Kenji Notohara, **Kimi Araki**, Masahiko Hirota, Ken-ichi Yamamura. Insufficient levels of serine protease inhibitor, Kazal (SPINK) produced by partial expression of SPINK1 in Spink3 deficient pancreas result in permanent pancreatic tissue damage. Digestive Disease Week 2012 (USA), 2012. May 18-24, 2012 (San Diego, CA, USA) (ポスター賞, 第七回日本膵臓学会国際優秀演題賞)

〔図書〕(計 2 件)

1. **大村谷 昌樹**. 膵炎発症機序とオートファジー. 竹原徹郎、金井隆典、*et al.* 編集 Annual Review 消化器 2015 中外医学社, p133-137, 2015.
2. **大村谷 昌樹**, 廣田 昌彦. 膵臓の構造と機能. 下瀬川徹、渡辺守、*et al.* 編集 専門医のための消化器病学 第 2 版 医学書院, p568-570, 2013.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 1 件)

名称: モデル等物の作出方法及びモデル動物
発明者: 大村谷昌樹、荒木喜美

権利者: 熊本大学

種類: 特許

番号: PCT/JP2012/065668

出願年月日: 2012 年 6 月 9 日

国内外の別: 国内

(米 国 公 開 番 号 / 公 開 日 :
US2014-0289878 / 9/25/2014)

〔その他〕

<http://irda-transgenic.kuma-u.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

大村谷 昌樹 (Ohmuraya, Masaki)

熊本大学・生命資源研究・支援センター・
准 教授

研究者番号: 60398229

(2)研究分担者; なし

(3)連携研究者

荒木 喜美 (Araki, Kimi)

熊本大学・生命資源研究・支援センター・
教授

研究者番号: 90211705