

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591021

研究課題名(和文) 膵炎発症における小胞体ストレスの関与と新規治療法の検討

研究課題名(英文) Study on the role of endoplasmic reticulum stress in the development of pancreatitis and new treatment through its amelioration

研究代表者

西尾 彰功 (Akiyoshi, NISHIO)

関西医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50362463

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)：急性膵炎発症時の小胞体(ER)ストレスの関与とその軽減による治療効果について検討した。セルレインとリポポリサッカライドを投与してマウス急性膵炎モデルを作製し、セルレイン初回投与から24時間後の血清アミラーゼと炎症性サイトカイン、膵炎組織像、膵臓のERストレス関連蛋白について検討した。対照膵炎群ではGRP78、CHOPが増加した。膵炎誘導後にeIF2 脱リン酸化阻害薬を投与した群では膵炎の軽減、リン酸化eIF2、ATF4の増加とGRP78、CHOPの減少を認めた。蛋白合成の抑制やATF4を介したERストレス誘導蛋白の増加が膵炎を軽減したと考えられ、膵炎の有効な治療法となりうることを示された。

研究成果の概要(英文)：To clarify the role of endoplasmic reticulum stress in the development of acute pancreatitis, we created a murine model induced by administration of cerulein and lipopolysaccharide. GRP78 and CHOP proteins increased in the pancreas of mice with pancreatitis. In contrast, administration of an inhibitor of dephosphorylation of eIF2 suppressed pancreatitis, coupled with the increase in phosphorylated eIF2 and ATF4 and the decrease in GRP78 and CHOP protein. Suppression of protein synthesis and increase in ER stress-induced proteins by administration of the inhibitor are supposed to be involved in amelioration of pancreatitis, suggesting the usefulness of augmentation of PERK signaling pathway for the treatment of acute pancreatitis.

研究分野：消化器内科学、特に自己免疫消化器疾患

キーワード：膵炎 小胞体ストレス アポトーシス セルレイン エンドトキシン

## 1. 研究開始当初の背景

急性膵炎は、膵局所の炎症で終息する軽症例から重症感染症や全身性の炎症症候群により多臓器不全を合併し致死的となりうる重症例まで、多彩な臨床像を呈する膵臓の急性炎症である。急性膵炎の病態解明や初期治療の重要性の認識により重症例の致命率は改善されてきたが、依然として致命率は高く救命率の向上は臨床的に重要な課題となっている。慢性膵炎は、炎症細胞浸潤を伴う膵の線維化と腺房細胞の変性・脱落が非可逆的に進行し、末期には膵内外分泌機能不全に至る病態で、膵癌の危険因子と考えられている。

細胞内で合成される蛋白質は、細胞内小器官の一つである小胞体で分子シャペロンにより正しく折りたたまれた後目的部位に輸送される。小胞体にはこの過程で生じる構造異常蛋白の処理機構も備わっているが、過剰な異常蛋白の蓄積は小胞体負荷(ストレス)をもたらす。これに対する生体反応として、mRNA から蛋白への翻訳抑制、分子シャペロンの転写誘導、構造異常蛋白の分解促進などの unfold protein response(UPR) が誘導され、異常蛋白の蓄積を抑制して小胞体ストレスを回避するが、ストレスが持続する場合には細胞死に至る。これまでに小胞体ストレスが原因となり、神経変性疾患、癌、糖尿病など多岐にわたる疾患が発症することが報告されている。

膵臓は体内で最も蛋白合成の盛んな臓器のひとつで、膵腺房細胞では消化酵素を含めた多量の蛋白合成が行われる。それ故、腺房細胞に対する過剰な刺激は容易に小胞体の機能障害につながり小胞体ストレスを引き起こすと推定される。これまで、膵臓における小胞体ストレスについては糖尿病と関連した膵細胞の研究が中心であり、膵腺房細胞に関する研究は数少ない。動物モデルを用いた膵過剰分泌刺激やアルコール過剰摂取時の検討などが散見されるのみで、膵炎重症化において重要でありアルコール性膵炎の引き金ともなり得るエンドトキシン血症が膵腺房細胞の小胞体ストレスに及ぼす影響については検討されていない。重症膵炎では cytokine storm と呼ばれる高炎症性サイトカイン血症がみられるが、エンドトキシンは IL-1、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  など炎症性サイトカイン産生を誘導することが広く知られている。しかし、炎症性サイトカインが膵腺房細胞の小胞体機能に及ぼす影響については検討されていない。炎症性サイトカインは膵を含めた全身の重要臓器に好中球を集積させ、活性化した好中球はプロテアーゼ放出や活性酸素種の産生による酸化ストレスを誘導して臓器障害を引き起こす。我々は、セルレイン/LPS 投与により重症急性膵炎および慢性膵炎マウスモデルを作製し、膵炎発症における酸化ストレスの関与を示し、抗酸化物質投与による

膵炎改善を報告した。現在膵炎発症における酸化ストレスの重要性は明らかであるが、酸化ストレスと小胞体ストレスとの関連は不明である。しかし、様々な機序を介した膵小胞体ストレス誘導が膵炎発症に関与しているとすれば、小胞体ストレスの軽減は膵炎の新規治療につながる可能性がある。

## 2. 研究の目的

マウスモデルを用いて重症急性膵炎におけるエンドトキシン血症と膵小胞体ストレスの関係を検討した。さらに、薬剤を用いた小胞体ストレスの軽減による膵炎改善効果について、膵炎動物モデルを用いて解析を行い、臨床応用の可能性について検討した。

## 3. 研究の方法

(1) 8 週齢 C57BL/6 マウスにセルレイン(50  $\mu$ g/kg)を 1 時間毎に 6 回腹腔内投与し、最終投与時に lipopolysaccharide(LPS) 10mg/kg を投与して急性膵炎モデルを作製した。初回投与から 24 時間後にマウスを屠殺し血清アミラーゼ測定と血清サイトカイン(IL-1、IL-6、IL-10、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ )を ELISA で検討した。膵炎の組織学的重症度は膵炎スコアを用いて評価した。

(2) 生体には小胞体ストレスに対する応答(UPR)の一つに eukaryotic initiation factor 2 (eIF2) のリン酸化を介して蛋白合成における mRNA から蛋白の翻訳を制御する防御機構が存在する(PERK 経路)。このシグナル伝達経路に關与する eIF2 を含めた膵臓の小胞体ストレス関連蛋白(GRP78、eIF2、リン酸化 eIF2、ATF4)の発現をウエスタンブロットで検討した。

(3) 上記膵炎マウスに eIF2 の脱リン酸化を抑制する薬剤(salubrinal)を投与して小胞体ストレスの軽減による膵炎の重症度の変化について検討した。薬剤投与群の膵小胞体ストレス関連蛋白の発現についてウエスタンブロットで対照群と比較検討した。膵腺房細胞のアポトーシスについて TUNEL 染色で検討を行い、ER ストレス関連アポトーシス因子 CHOP とアポトーシス経路に關与する caspase3 についてウエスタンブロットで検討した。

## 4. 研究成果

(1) セルレイン/LPS 投与群では、セルレイン単独投与群と比べて血清アミラーゼ上昇を伴い組織学的に膵炎の重症化が認められ、血中炎症性サイトカインもセルレイン単独投与群と比べて高値であった。

(2) 膵炎組織のウエスタンブロットの検討では、コントロール群と比較してセルレイン膵炎発症群で小胞体ストレス関連蛋白の発現が増加しており、LPS 併用群ではより高い傾向を認めた。

(3) セルレインと LPS で膵炎を誘導したマウスに salubrinal 投与群では無治療群と比較して 1.0mg/kg 以上の濃度で投与した群で

組織学的な膵炎の軽減が認められ、血中炎症性サイトカイン(IL-1、IL-6、TNF)の上昇が抑制された。

(4)ウエスタンブロットによる検討ではsalubrinal投与群でリン酸化eIF2とリン酸化eIF2 / eIF2比の上昇が認められ、薬剤投与によるeIF2の脱リン酸化抑制が示された。さらに、薬剤投与群でERストレスの指標であるGRP78蛋白の低下を認めた。(5) salubrinal投与群では無治療群と比較して、ERストレス関連アポトーシス因子CHOPとアポトーシス経路の活性化に關与するcaspase3の発現低下を認めた。

膵炎改善の機序として、Salubrinal投与でeIF2リン酸化状態が維持されmRNAから蛋白への翻訳が抑制され異常蛋白の集積が減少して小胞体負荷が軽減したことや、ATF4の増加が小胞体ストレス誘導蛋白を増加させたことによる小胞体機能の改善によるものと推測される。また、CHOPの減少による小胞体関連アポトーシスの抑制も關与していると考えられた。

以上より、膵炎を発症した膵組織では小胞体ストレスが亢進しており、薬剤投与でUPRを増強させることにより膵炎が軽減することが示された。本研究で示されたように、PERK経路における構成要素のeIF2のリン酸化状態を維持してこの経路のシグナル伝達を増強させることは、小胞体ストレスの軽減を介した膵炎に対する有効な治療法となりうることを示された。

## 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 15件)

Toshiyuki Mitsuyama, Kazushige Uchida, Akiyoshi Nishio (13名、7番目). Comparison of neutrophil infiltration between type 1 and type 2 autoimmune pancreatitis. *Pancreatology*. 2015; 15: 271-280. 査読有

Masanobu Kishimoto, Toshiro Fukui T, Akiyoshi Nishio (10名、11番目). Phosphorylation of Smad2/3 at specific linker threonine indicates slow-cycling intestinal stem-like cells before reentry to cell cycle. *Dig Dis Sci*. 2015; 60: 362-374. 査読有

Kimi Sumimoto, Kazushige Uchida, Akiyoshi Nishio (7名、9番目). The role of CD19+CD24highCD38high and CD19+CD24highCD27+ regulatory B cells in patients with type I autoimmune pancreatitis. *Pancreatology*. 2014; 14: 193-200. 査読有

Yuri Fukui, Kazushige Uchida, Akiyoshi Nishio (7名、5番目). Possible involvement of Toll-like receptor 7 in

the development of type I autoimmune pancreatitis. *J Gastroenterol*. 2014; 50: 435-444. 査読有

Yu Takahashi, Toshiro Fukui, Akiyoshi Nishio (11名、12番目). Phosphorylation of Smad2/3 at the specific linker threonine residue indicates slow-cycling esophageal stem-like cells before re-entry to the cell cycle. *Disease of the esophagus*. 2014. 10.1111/dote.12277 査読有

Takashi Okazaki, Akiyoshi Nishio, Masahiro Takeo (4名、2番目). Inhibition of the dephosphorylation of eukaryotic factor 2 $\alpha$  ameliorates murine experimental colitis. *Digestion*. 2014; 90: 167-178. 査読有

Akiko Kurishima, Muneo Inaba, Akiyoshi Nishio (5名、6番目). Immunoregulatory function of PIR-A/B+ DCs in the inflammatory responses of dextran sodium sulfate-induced colitis. *J Gastroenterol*. 2014; 49: 1367-1377. 査読有

Shinji Nakayama, Akiyoshi Nishio, Masao Yamashina (6名、2番目) Acquired immunity plays an important role in the development of murine experimental pancreatitis induced by alcohol and lipopolysaccharide. *Pancreas*. 2014; 43: 28-36. 査読有

Koyabu, Kazushige Uchida, Akiyoshi Nishio (9名、11番目). Possible involvement of Foxp3+ regulatory T cells in the development of immune-mediated pancreatitis in MRL/Mp mice treated with polyinosinic: polycytidylic acid. *Int J Rheumatol*. 2013. 10.1155.2013/367325. 査読有

Kimi Sumimoto, Kazushige Uchida, Akiyoshi Nishio (14名、16番目). A proposal of a diagnostic algorithm with validation of international consensus diagnostic criteria for autoimmune pancreatitis in a Japanese cohort. *Pancreatology*. 2013; 13: 230-237. 査読有

Yuri Fukui, Kazushige Uchida, Akiyoshi Nishio (16名、13番目). The similarity of type I autoimmune pancreatitis to pancreatic ductal adenocarcinoma with significant IgG4-positive cell infiltration. *J Gastroenterol*. 2013; 48: 751-761. 査読有

Atsushi Nakajima, Toshiro Fukui, Akiyoshi Nishio (9名、10番目). Attenuation of indomethacin-induced gastric mucosal of sake yeast-derive thioredoxin. *J Gastroenterol*. 2012; 47: 978-987. 査読有

Masao Yamashina, Akiyoshi Nishio, Shinji Nakayama (4名、2番目). Comparative study on experimental autoimmune pancreatitis and its extrapancreatic involvement in mice. *Pancreas*. 2012; 41: 1255-1262. 査読有  
Toshiro Fukui, Ryo Suzuki, Akiyoshi Nishio (6名、7番目). Dilation of the bile and pancreatic ducts due to compression by an unruptured abdominal aortic aneurysm (AAA): a case ameliorated by an endovascular stent grafting. *Intern Med*. 2012; 51: 2749-2752. 査読有  
Kazushige Uchida, Takeo Kusuda, Akiyoshi Nishio (12名、14番目). Regulatory T cells in type 1 autoimmune pancreatitis. *Int J Rheumatol*. 2012; 2012: 795026. 10.1155/2012/795026. 査読有

[学会発表](計 14件)

Takashi Okazaki. Improvement of endoplasmic reticulum stress by enhanced PERK signaling pathway reduces severe acute pancreatitis in mice. *Asian Pacific Digestive Week 2014*. 2014年11月24日 バリ(インドネシア)  
Kimi Sumimoto. Regulatory B cells in type I autoimmune pancreatitis. 115th Annual Meeting of the American Gastroenterological Association. 2014年5月5日 シカゴ(米国)  
岡崎敬. PERKシグナル増強を介したERストレス軽減による実験的大腸炎の改善効果の検討. 第6回日本炎症性腸疾患研究会学術集会. 2014年12月14日 TKPガーデンシティ品川(東京)  
Takashi Okazaki. Improvement of endoplasmic reticulum stress by enhanced PERK signaling pathway reduces severe acute pancreatitis in mice. 22th United European Gastroenterology Week. 2013年10月15日 ベルリン(ドイツ)  
Takashi Okazaki. Endoplasmic reticulum stress inhibitor Salubrinal protects against murine experimental colitis via the PERK-eIF2a signaling pathway. The 1st annual meeting of Asian organization for Crohn's & colitis. 2013年6月13日 ホテルラフォーレ東京(東京)  
Takashi Okazaki. Endoplasmic reticulum stress inhibitor Salubrinal protects against murine experimental colitis via the PERK-eIF2a signaling pathway. 114th annual meeting of the American Gastroenterological Association. 2013年5月21日 オランダ(米国)  
Kimi Sumimoto. Increased peripheral

CD19+CD24hiCD38hi regulatory B cells may be involved in the pathology of type I autoimmune pancreatitis. 114th annual meeting of the American Gastroenterological Association. 2013年5月19日 オランダ(米国)  
Takashi Okazaki. Amelioration of endoplasmic reticulum stress through enhanced PERK signaling attenuates murine experimental colitis. 20th United European Gastroenterological Week. 2012年10月24日 アムステルダム(オランダ)  
Kimi Sumimoto. Comparison of international consensus diagnostic criteria and major diagnostic criteria for autoimmune pancreatitis. 113th annual meeting of the American Gastroenterological Association. 2012年5月20日 サンディエゴ(米国)  
Yu Takahashi. The specific linker phosphorylation of Smad2/3 indicates epithelial stem cells in esophagus. 113th annual meeting of the American Gastroenterological Association. 2012年5月19日 サンディエゴ(米国)  
Toshiro Fukui. Attenuation of indomethacin-induced gastric mucosal injury with prophylactic administration of sake yeast-derived thioredoxin. 113th annual meeting of the American Gastroenterological Association. 2012年5月19日 サンディエゴ(米国)  
内田一茂. IgG4関連肝胆膵疾患における制御性T細胞に関する検討. 第49回日本消化器免疫学会. 2012年7月5日 城山観光ホテル(鹿児島市)  
山科雅央. 自己免疫性膵炎マウスにおける膵外病変の比較検討. 第43回日本膵臓学会大会. 2012年6月29日 メトロポリタン山形(山形市)  
中山新士. アルコール性慢性膵炎の発症における自然免疫/獲得免疫の関与の検討. 第43回日本膵臓学会大会. 2012年6月28日 メトロポリタン山形(山形市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西尾 彰功(NISHIO Akiyoshi)  
関西医科大学・医学部・准教授  
研究者番号: 50362463