

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659364

研究課題名(和文)急性膵炎における腺房細胞障害の分子機構の解明

研究課題名(英文)Molecular mechanisms of acinar cell injury in acute pancreatitis

研究代表者

竹原 徹郎 (Takehara, Tetsuo)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70335355

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：STAT3は細胞増殖・炎症等に関わる遺伝子発現調節や転写因子制御等を行う重要な蛋白であるが、膵STAT3欠損マウスを用いた検討により、セルレイン急性膵炎において膵STAT3は炎症細胞浸潤を伴う膵壊死およびアポトーシス細胞死に対して保護的に働くことが示された。一方Bcl-xL・Mcl-1はアポトーシス抑制性蛋白であり、セルレイン・L-アルギニン急性膵炎での膵での蛋白発現上昇が認められる。Bcl-xL欠損マウスでの膵炎の重症化は認められず、重症化にBcl-xL・Mcl-1が相補的に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：STAT3 is a transcription factor which controls several gene expression levels associated with cell proliferation, inflammation, and cell survival. In the study, we clarified STAT3 played a protective role in pancreatic necrosis, inflammatory cell infiltration and apoptotic cell death using caerulein-administrated conditional STAT3 knockout mice. In the models of caerulein or L-arginine-induced acute pancreatitis, while the expression levels of Bcl-xL and Mcl-1 (anti-apoptotic proteins) increased, the severity of pancreatitis did not worsen in conditional Bcl-xL knockout mice compared with control mice. Collectively, these results suggested that Bcl-xL and Mcl-1 may function redundantly in regulation of acute pancreatitis.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：急性膵炎 アポトーシス マウスモデル

1. 研究開始当初の背景

急性膵炎とは、膵腺房細胞で産生される消化酵素前駆体が膵組織内で活性化されることで、炎症細胞の浸潤を伴って広範な膵組織の脱落が惹起される致死率の高い疾患である。この膵組織の脱落とは、主に腺房細胞の細胞死である。細胞死の機構としては、アポトーシスとネクローシスという大きく分けて2つの機構が知られているが、急性膵炎における腺房細胞の細胞死には両者の機構が併存している。またアポトーシス、ネクローシスともにさらに複数の経路が存在するがその中でいずれの経路が急性膵炎において重要かは不明であり、そのため急性膵炎における細胞死の全体のフレームワークも未だ明らかでない。

一方、急性膵炎において膵炎の重症度はネクローシスと順相関、アポトーシスと逆相関すると考えられている。(Odinokova IV et al. J Gastroenterol Hepatol. 2008.) この理由としては、ネクローシスでは細胞は膨化し、細胞膜が融解し、細胞質の酵素や代謝の中間産物が放出されるため炎症反応が惹起されること、アポトーシスでは死細胞がマクロファージなどに貪食されるため細胞質の酵素や代謝の中間産物が放出されないため炎症反応は少ないことが機序として想定されている。またカスパーゼ阻害薬などにより腺房細胞のアポトーシスを抑制すれば、ネクローシスが増加し膵炎が悪化するとの報告もあり (Mareninova OA, et al. J Biol Chem. 2006.) 急性膵炎の新たな治療戦略の1つとして、ネクローシスからアポトーシスへ細胞死を誘導し膵臓における炎症を減弱化させる戦略が考えられる。そのため、腺房細胞の細胞死調節による急性膵炎の治療を目指して、さらに詳細な細胞死機構の解析と細胞死によって誘導される炎症反応の解明が必要である。

2. 研究の目的

急性膵炎における膵組織の脱落は重症例で多数認め、予後を大きく左右する因子の1つである。この膵組織の脱落とは主に膵腺房細胞の細胞死である。細胞死の機構としてはアポトーシス細胞死とネクローシス細胞死が知られているが、急性膵炎では両細胞死の形態とも存在している。しかし、急性膵炎における両細胞死の詳細な機構は未だ不明である上に、細胞死の形態の違いによる炎症反応の違いに関して十分な検討がなされていないのが現状である。そこで本研究課題では、急性膵炎における両細胞死の機構及び相互作用を解明し、各々が炎症反応に及ぼす影響を検討することで、急性膵炎を改善させる効果的な腺房細胞死の制御方法の開発につなげることを目的としている。

3. 研究の方法

STAT3 は細胞の生存・増殖・炎症・血管新生などに関わる遺伝子の発現調節や他の転写因子制御等に関わっていることがすでに知られているが、急性膵炎時の腺房細胞障害における膵 STAT3 の役割を明らかにするために、野生型マウスに対してセルレインを腹腔内に反復投与し膵 STAT3 の活性化を評価した。また膵特異的に STAT3 を欠損したマウスを作成し表現型を検討するとともに、セルレインを反復腹腔内投与し急性膵炎を引き起こし、その病態を解析した。

また、Bcl-xL・Mcl-1 はアポトーシス抑制性蛋白であり、これらの発現を抑制することによるアポトーシスの誘導、ひいては急性膵炎の改善が期待される。そこで急性膵炎時の腺房細胞障害における膵 Bcl-xL・Mcl-1 の役割を明らかにするために、野生型マウスに対してセルレインや L-アルギニンを腹腔内に反復投与し、膵 Bcl-xL や膵 Mcl-1 の発現の変化を評価した。また膵特異的に Bcl-xL を欠損したマウスを作成し、その表現型を検討

するとともに、セルレインを反復腹腔内投与し急性膵炎を引き起こし、その病態を解析した。

4. 研究成果

まず膵 STAT3 の急性膵炎における役割を検討するため、野生型マウスを用いた検討を行った。野生型マウスに対するセルレイン腹腔内反復投与により、組織学的に浮腫・炎症細胞浸潤などの急性膵炎の所見を認め、また膵炎発症早期より膵 STAT3 の活性化が認められた。

次に膵特異的な STAT3 欠損マウスを、Pdx プロモーター下に Cre リコンビナーゼを発現するマウスと STAT3 遺伝子が flox 配列で挟まれたマウスを交配することにより作成し、その表現型・膵炎の重症度等を評価した。膵特異的な STAT3 欠損マウスは野生型マウスと同様に発育し、血清アミラーゼ・リパーゼ、体重、膵重量/全体重比、組織学的所見において著変を認めなかった。セルレイン反復投与により、膵 STAT3 欠損マウスではコントロールマウスと比し、血清アミラーゼ、リパーゼの有意な上昇を認めた。組織学的には HE 染色にてより広範な膵壊死が認められた。TUNEL 染色にて TUNEL 陽性細胞数の増加を認めた。コントロールマウスではセルレイン腹腔内反復投与に伴い膵において Bcl-xL の蛋白発現の上昇を認めたが、膵 STAT3 欠損マウスではその発現上昇が抑制されており、TUNEL 陽性細胞増加の要因の一つと考えられた。また、膵 STAT3 欠損マウスでは脱落した膵実質細胞周囲には著明な炎症細胞浸潤・炎症性サイトカインの発現上昇を認め、投与後 24 時間では著明な膵浮腫を認め、膵炎の有意な重症化が確認された。さらに、セルレイン膵炎後の回復過程を継時的に膵組織 HE 染色や Ki-67 免疫染色、膵重量/全体重比により評価すると、膵 STAT3 欠損マウスではコントロールに比し膵組織像や膵重量/全体重比の回復や細

胞増殖の遅延)が認められた。以上より、セルレイン急性膵炎において膵 STAT3 は炎症細胞浸潤を伴う膵壊死およびアポトーシス細胞死に対して保護的に働くことが示された。

次に膵 Bcl-xL・Mcl-1 の急性膵炎における役割を検討するため、野生型マウスに対するセルレイン腹腔内反復投与、L-アルギニン腹腔内反復投与を行った。組織学的に浮腫・炎症細胞浸潤などの急性膵炎の所見を認め、膵での Bcl-xL・Mcl-1 の蛋白発現上昇を認めた。

次に膵特異的な Bcl-xL 欠損マウスを、Pdx プロモーター下に Cre リコンビナーゼを発現するマウスと Bcl-xL 遺伝子が flox 配列で挟まれたマウスを交配することにより作成し、その表現型・膵炎の重症度等を評価した。膵特異的な Bcl-xL 欠損マウスは野生型マウスと同様に発育し、血清アミラーゼ・リパーゼ、体重、膵重量/全体重比、組織学的所見において著変を認めなかった。膵特異的な Bcl-xL 欠損マウスに対するセルレイン反復投与を行ったところ、コントロールマウスと比して組織学的に膵炎の重症度に著変を認めず、TUNEL 陽性細胞数にも有意差を認めなかった。Bcl-xL 欠損マウスでは Bcl-xL 蛋白発現が低下している一方、Mcl-1 についてはコントロールマウスとの著変を認めなかった。膵炎の重症化において Bcl-xL・Mcl-1 が相補的に関与している可能性が考えられた。

以上より、STAT3 は細胞の生存・炎症などに関与する遺伝子の発現や転写因子の制御などを行う蛋白であるが、今回の膵 STAT3 欠損マウスを用いた検討により、セルレイン急性膵炎において膵 STAT3 欠損はセルレイン急性膵炎を増悪させることが明らかとなり、膵 STAT3 はセルレイン急性膵炎による膵壊死およびアポトーシス細胞死に対して保護的に働くことが示された。一方 Bcl-xL・Mcl-1 はアポトーシス抑制性蛋白であるが、野生型マウスを用いた急性膵炎モデルでの検討により膵での Bcl-xL・Mcl-1 蛋白の発現上昇が認

められ、急性膵炎の病態形成への関与が示唆された。一方、Bcl-xL 欠損マウスを用いた検討ではセルレイン急性膵炎の重症化は認められず、急性膵炎の重症化において Bcl-xL・Mcl-1 が相補的に関与している可能性が示唆された。

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)

Shigekawa M, Hikita H, Kodama T, Shimizu S, Li W, Uemura A, Miyagi T, Hosui A, Kanto T, Hiramatsu N, Tatsumi T, Takeda K, Akira S, Takehara T. Pancreatic STAT3 protects mice against caerulein-induced pancreatitis via PAP1 induction. Am J Pathol. , 2012; 101, 2105-2113. 査読有.

重川稔、竹原徹郎. 急性膵炎における転写因子の関わり. 膵臓. 2014; 29, 38-44. 査読有.

[学会発表](計2件)

Minoru Shigekawa, Hayato Hikita, Takahiro Kodama, Satoshi Shimizu, Takuya Miyagi, Atsushi Hosui, Tatsuya Kanto, Naoki Hiramatsu, Tomohide Tatsumi and Tetsuo Takehara. Pancreatic STAT3 protects caerulein-induced acute pancreatitis in mice via the PAP1 induction. DDW2012. 2012年5月19-22日. San Diego, USA.

重川 稔、岩橋 潔、池澤賢治、竹原徹郎. セルレイン急性膵炎において膵STAT3はPAP1の分泌を介して膵保護的に働く. 第44回日本膵臓学会大会. 2013

年7月25-26日. 仙台.

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

該当なし

取得状況(計0件)

該当なし

[その他]

ホームページ等:

http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/gh/research_a.html

データ更新中

6. 研究組織

(1)研究代表者

竹原 徹郎 (Takehara Tetsuo)

大阪大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 70335355

(2)研究分担者

巽 智秀 (Tatsumi Tomohide)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 20397699

疋田 隼人 (Hikita Hayato)

大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講座

助教

研究者番号: 20623044

重川 稔 (Shigekawa Minoru)

大阪大学・大学院医学系研究科・医員

研究者番号: 00625436

(3)連携協力者

池澤 賢治 (Ikezawa Kenji)

大阪大学・大学院医学系研究科・大学院生