

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 3 日現在

機関番号：11401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670364

研究課題名(和文) 各種遺伝子改変マウスを用いた急性膵炎発症関連SNARE蛋白の同定と機能解析

研究課題名(英文) Identification and functional analysis of SNARE proteins participating in the onset of acute pancreatitis

研究代表者

大西 洋英(Ohnishi, Hirohide)

秋田大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00313023

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：急性膵炎発症の分子メカニズムを解明すべく、VAMP7蛋白の遺伝子を膵特異的に欠失させたノックアウトマウスを作製し解析した。VAMP7-floxマウスとSpink3-Creマウスを交配させ作製したマウスではセルレイン惹起性急性膵炎の炎症程度が著明に悪化していることが明らかとなった。一方、ptf1a-CreマウスとVAMP7-floxマウスを交配させ作製したマウスではセルレイン惹起性急性膵炎は発症するものの、その膵炎症の程度は野生型と有意差を認めなかった。この違いは、Cre-recombinaseを発現させるpromoterの特性の違いによるものか否か今後検討すべき課題であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：In order to elucidate the molecular mechanism of the onset of acute pancreatitis, we generated two strains of pancreas-specific VAMP7, a member of SNARE family, knock out mouse, then analyzed their responses to cerulein-induced acute pancreatitis. In a VAMP7 knock out mouse strain generated by crossing VAMP7-flox and Spink3-Cre mice, the inflammation of the acute pancreatitis was much more severe with higher elevated intra-pancreatic trypsin activity compared to wild litter mates. On the other hand, in another VAMP7 knock out mouse strain generated by crossing VAMP7-flox and Ptf1a-Cre mice, no difference of the severity of the inflammation of acute pancreatitis was observed compared to the wild litter mates. We speculate that the difference of the promotes of the Cre-recombinase might be attributed to the discrepancy between the responses of the two VAMP7 knockout mouse strains to the cerulein-induced acute pancreatitis.

研究分野：膵臓病学

キーワード：急性膵炎 VAMP7 ノックアウトマウス

1. 研究開始当初の背景

(i)急性膵炎とその発症・進展における分子病理学的特徴

急性膵炎はアルコールの過剰摂取や胆石の総胆管下部嵌頓による膵管内圧の上昇などによる、膵腺房細胞の急性炎症が惹起されることにより発症する。発症期の膵の病理学特徴としては膵浮腫、炎症細胞浸潤、ならびに腺房細胞内の異常空胞形成が挙げられる。特に、腺房細胞内の異常空胞形成は、腺房細胞の自己融解の原因となる蛋白分解酵素トリプシンの腺房細胞内での異所性活性化に密接に関連すると考えられている。この空胞の形成は酵素顆粒とリソソームの異常融合によって形成され、この空胞内にてリソソーム酵素であるカテプシンBにより酵素顆粒内のトリプシノーゲンが加水分解されて活性化トリプシンが産生されているとの説が有力である。しかし、この異常空胞形成の細胞生物学的メカニズムならびに分子メカニズムは未だ明らかではない。

(ii)細胞内膜小胞器官の生理的融合とSNARE蛋白

一方、細胞内膜小胞器官どうしの生理的融合には、その融合する小胞膜器官上に局在する、SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) 蛋白が中心的役割を果たしている。細胞内で膜小胞が融合相手である標的膜小胞と融合する際、自らの膜上に存在するv(vesicle)-SNARE 蛋白と、標的膜上に存在するt(target)-SNARE 蛋白が、ATPase であるNSF 蛋白等の存在により結合することで、膜小胞と標的小胞が結合できる。融合時に形成されるこれらの蛋白の結合体をSNARE complexと呼ぶ。v-SNARE 蛋白としてはSyntaxin ファミリーが、またt-SNARE 蛋白としてはVAMPファミリーが知られており、これまで各々の10種類ほどのアイソフォームが同定されている。異なる細胞内膜小胞器官上には各々の膜小胞器官に特異的なSyntaxin アイソフォーム、VAMP蛋白アイソフォームが存在し、様々な細胞内膜小胞器官の融合には、その融合する膜小胞器官に特異的なSNARE Complex が形成され融合現象が制御されていることが明らかになってきている。

(iii)細胞内異常空胞形成におけるSNARE蛋白の役割

細胞内異常空胞形成は上述の急性膵炎のみならず各種臓器障害機転においてその細胞内で広く認められる細胞障害の初期病理学的現象である。例えば、胃潰瘍や胃癌の原因であるHelicobacter pylori 菌は、その産生・放出するvacuolating cytotoxin A(VacA)毒素により胃粘膜上皮細胞内にライソゾームとエンドゾームの異常融合にて異常空胞を形成せしめ、その結果、胃粘膜上皮細胞を障害・致死させる(Molinari Met al. J

Biol Chem1997)。申請者はこれまでこのVacA毒素による細胞内異常空胞形成現象をモデルシステムとして用い、細胞内異常空胞形成の分子メカニズムの解析を行ってきた。その結果、このVacAによる異常空胞形成機転である、ライソゾームとエンドゾームの非生理的な融合にはSNARE 蛋白であるsyntaxin7 (Suzuki J, Ohnishi H et al. J Biol Chem vol.278:25585-25590,2003) および VAMP7 (Mashiha H, Ohnishi H et al. Infect Immun vol. 76: 2296-2303,2008)がこの空胞形成の中心的役割を果たしている事を明らかにしてきた。つまり、従来上皮細胞には広く発現し、生理的狀態にてライソゾームやエンドゾームの各種細胞内膜小胞器官との生理的融合を司っているSNARE 蛋白であるsyntaxin7やVAMP7が、病的な細胞内異常空胞形成にも関与している事が明らかとなった。ひとたび、急性膵炎発症時に膵腺房細胞内で形成される異常空胞に目を向けると、この異常空胞もライソゾームおよび酵素顆粒の異常融合にて形成されているのであり、その異常空胞形成機転の分子メカニズムにおいても、ある種のSNARE 蛋白が関与しているであろうことが容易に推測される。

(iv)SNARE 蛋白と膵腺房細胞機能ならびに急性膵炎

これまで、膵腺房細胞内の各種膜小胞器官の膜上には各種SNARE 蛋白が局在し、各種膜小胞器官の生理的輸送や融合現象への関与の知見は得られてはいた。例えば酵素顆粒膜上にはsyntaxin7,12 およびVAMP2,8 が局在し、生理的な膵酵素の外分泌や酵素顆粒の形成に機能していると推察され、実際VAMP8は調節性膵外分泌に促進的に機能している事がこれまでに示されている(Wang C et al. Developmental Cell.2004)。しかし一方、急性膵炎発症における各種SNARE 蛋白の関わりはこれまで殆ど解明が進んでいなかったのが現状であった。しかし、最近我々は、Interferon Regulatory Factor-2(IRF-2)遺伝子欠損マウスが急性膵炎の初期像を呈する事を発見し、更にはそのマウスの膵臓を解析することにより急性膵炎初期の各種SNARE 蛋白の動態変化を明らかにした(Mashima H, Ohnishi H et al. Gastroenterology vol. 141:1102-1113,2011)。すなわち、IRF-2 KO マウスにおいては、1)正常な膵外分泌が停止している。2)腺房細胞内でトリプシンなどの消化酵素が活性化している。3)細胞内にて膜小胞器官の異常融合像や異常空胞が認められる。の以上3点の急性膵炎発症時の機能的、病理学的特徴が再現されており、IRF-2KO マウスは急性膵炎初期像を呈するモデル動物である事が明らかとなった。更にこのマウスの膵腺房細胞にては、各種のSNARE 蛋白の増加や減少が認められており、これらの研究成果より申請者は急性膵炎発症にはSNARE 蛋白が多彩な形で関与してい

るという仮説を立てるに至った。

2. 研究の目的

急性膵炎発症には、膵腺房細胞内に形成される異常空胞が重要な役割を担っている。その異常空胞は酵素顆粒、エンドゾーム及びライソゾームとの病的融合により生じる (Gaisano HY et al. Gastroenterology 2009)。その異常空胞内では、本来非活性型で酵素顆粒内に存在するトリプシノーゲン等の蛋白分解酵素がライソゾームに存在する水解酵素により細胞内で活性化され、その活性化された蛋白分解酵素により膵腺房細胞の自己融解が生じ、膵炎が発症、進展すると考えられている。しかし、この異常空胞が形成される分子メカニズムは依然不明である。そこで申請者は SNARE 蛋白分子をターゲットとしてその SNARE 遺伝子 KnockOut マウスを用いた研究にてこの細胞内異常空胞形成の分子機序を明らかにする事により、急性膵炎発症機序の解明を目的とした。

よって、本研究においては急性膵炎発症への関与が推察される SNARE 蛋白遺伝子のノックアウトマウスを作製しその SNARE 蛋白の急性膵炎発症への関わりを解析を行った。

3. 研究の方法

(i)膵臓特異的 SNARE 遺伝子改変マウスの作製の意図と方法。

これまで、各種 SNARE 遺伝子欠失マウスにおいてはその Total KO マウスが胎生致死などにて成熟体の膵臓の解析が困難な例も報告されている (Schoch S et al. Science 2001.)。よって、本研究ではその遺伝子の flox マウスを使用し Cre-LoxP system を用いた膵臓特異的 conditional KO マウスを作製する方法を用い、Cre-LoxP システムを用いて膵臓特異的 conditional KO マウスを作製するため、申請者は膵臓腺房細胞特異的に Cre を発現する Spink3-Cre マウス (熊本大学 山村研一教授より御供与いただいた。) および膵臓の各種細胞に Cre を発現する ptf1a-Cre マウス (京都大学 川口義弥教授より御供与いただいた。) を用いて、これら Cre 発現マウスと flox マウスの交配により膵特異的 conditional KO マウスの作製を行った。

(ii)ライソゾームに局在する SNARE 蛋白 VAMP7 の選択

本研究においては、急性膵炎の重要な発症初期病理学的現象である膵臓腺房細胞内異常空胞形成がライソゾームと酵素顆粒との異常融合であるとの説と下記研究成果に記する急性膵炎におけるオートファジー機構関与の概念に基づき、まず膵臓特異的 VAMP7 遺伝子欠失マウスを作製し解析することとした。その折、VAMP7 flox マウスは大

阪大学 原田彰宏教授から御供与いただき、本研究に使用させていただいた。

(iii)SNARE KO マウス表現型の解析

本研究の仮説と目的は「膵炎発症時ににおける腺房細胞内異常空胞形成にある種の SNARE 蛋白が関与していると考え、その SNARE 蛋白を同定し機能解析」することにある。よって、前述した研究背景をもとにして研究方法により作製された膵臓特異的 VAMP7 KO マウスにおいて、VAMP7 蛋白が本仮説に合致する「腺房細胞内異常空胞形成に機能している」ものであれば、作製された KO マウスの膵臓においては生理的状態においてもある種の形態学的、機能的表現型が認められる可能性を考えた。更にはセルレイン腹腔内投与などの急性膵炎発症刺激下においては、膵臓腺房細胞内異常空胞の形成における変化や膵炎の各種病理学的現象ならびに膵炎重症度の各種パラメーターの変化が wild-type マウスと比較解析することにより認められる事が期待された。これらの解析により急性膵炎発症に拘る VAMP7 蛋白の機能を明らかにするため、下記の解析方法を用いて研究を遂行した。

(a)形態学的膵組織の解析。

HE 染色、各種免疫染色法、ならびに電子顕微鏡法を用いて、作製された KO マウスの膵組織の形態学的解析を行った。特に、腺房細胞内の酵素顆粒、ライソゾーム、エンドゾーム等の膜小胞器官の形態的および動態の変化、および異常空胞形成の有無、更には膵組織全体の構造的異常の有無および炎症所見などの解析を行った。

(b)膵腺房細胞機能の生理学的検討。

KO マウスの膵臓より遊離膵腺房を作製しそれを用いて、各種膵外分泌刺激による調節性膵外分泌機構の解析を行った。

(c)VAMP7 KO マウスの急性膵炎誘発性セルレイン刺激に対する反応解析。

マウス急性膵炎誘発刺激であるセルレインの腹腔内投与に対する、VAMP7 KO マウスの膵臓の変化の解析を行った。

膵腺房細胞の形態学的解析

HE 染色、各種免疫染色法、ならびに電子顕微鏡法を用いて、セルレイン刺激された KO マウスの膵の腺房細胞の形態学的解析を行った。

膵組織の炎症反応の解析

セルレイン刺激に対する各 KO マウスの膵臓の炎症反応を (a)炎症浸潤細胞の膵内浸潤、(b)膵内壊死組織の膵内比率、(c)膵炎症の指標の一つである膵浮腫、等を各種染色法、撮影法にて解析を行った。更には、(d)膵内活性化トリプシン量、(e)膵重量/体重比を測定する事により膵の炎症反応を定量的に解析した。

(d)VAMP7 KO マウス膵におけるオートファジー機構の解析。

上述のごとく、急性膵炎発症における異常空胞形成などの膵腺房細胞内病理学的現象とオートファジー機構との連関が推察されていることより、VAMP7 KO マウスの膵におけるオートファジー機構の変化をそのマーカーである LC3-II ならびにその基質である p62 の動態を Western blot ならびに免疫組織化学法にて検討した。

4. 研究成果

(1)VAMP7-flox x Spink3-Cre マウス交配による膵腺房細胞特異的 VAMP7 欠損マウスの作製と解析成果

本研究の準備期間ならびに開始期において急性膵炎の発症機構において、オートファジー機構が重要な役割を果たしているとの概念が提唱され、さらにはそのオートファジー機構と急性膵炎における膵腺房細胞内異常空胞形成とは密接な連関があると推察されてきた(Gukovskaya AS, Gukovsky I. Autophagy and pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2012;303: G993 -G1003.)。しかし、その分子メカニズムの詳細は不明である。よって、本研究実施においては、そのオートファジー機構の中で機能すると考えられ、かつライソゾームなどに局在して急性膵炎発症期の膵腺房細胞内異常空胞形成にも関与が推測される SNARE 蛋白に焦点をあて、その蛋白の急性膵炎発症における役割の解析をこころみだ。そこで本研究においてはオートファジー機構の初期段階であるオートファゴゾームの形成に機能していると考えられている SNARE 蛋白のひとつであり、かつライソゾーム機能を司る SNARE 蛋白である VAMP7 に着目し、VAMP7-FLOX マウスと SPINK3-Cre マウスを交配することにより、膵腺房細胞特異的 VAMP7 遺伝子欠損マウスを作製した。

膵腺房細胞特異的 VAMP7 遺伝子欠損マウスにおける膵臓はマクロならびにミクロの組織学的検索では、明らかな異常は認めなかった。一方で、消化管ホルモンのコレシストキニンのアナログであるセルレインを腹腔内に投与する事で、急性膵炎を野生型マウスと膵腺房細胞特異的 VAMP7 遺伝子欠損マウスに惹起させると、膵腺房細胞特異的 VAMP7 遺伝子欠損マウスにおいては野生型マウスと比べ、膵臓の炎症程度が著明に悪化していることが、病理学的検討、生化学的検討にて明らかとなった。特に、膵腺房細胞内のトリプシン活性が膵腺房細胞特異的 VAMP7 遺伝子欠損マウスにおいて野生型マウスに比べ著明に上昇していることが認められた。このことから、VAMP7 の膵腺房細胞特異的欠損がセルレイン惹起性急性膵炎の増悪と関係することが示唆され、さらにその原因の一つとして膵腺房細胞特異的 VAMP7 遺伝子欠損マウスの膵臓においてはセルレイン刺激により膵内におけるトリプシンの異常活性化が野生型

マウスに比べ著明に亢進していることが考えられた。

次に、VAMP7KO マウスの膵臓におけるオートファジー機構の変化を検討した。Spink3-Cre と VAMP7-FOLX マウスを交配させて作製した、膵腺房細胞特異的 VAMP7 遺伝子欠損マウスにおいては、セルレイン膵炎を惹起すると、その膵炎症の程度は野生型に比べ著明に悪化していることは上述した通りである。その事象が、本遺伝子欠損マウスにおける如何なる細胞内機能の変化によって生じているかを検討した。VAMP7 はオートファジーの初期段階にてオートファゴゾームの形成に機能していることが知られていることなどから、本マウスの膵腺房細胞のオートファジー機構について検討したが、オートファゴゾームのマーカーである LC3 やオートライソゾームのマーカーである LAMP-2, ならびにオートファジーの基質である p62 の通常時の発現レベル、ならびに絶食による低栄養にてオートファジーを活性化させた状況においてもこれらの蛋白の VAMP7 KO マウス膵臓での発現レベルは野生型マウスと比して有意差はみとめなかった。これらより、本遺伝子改変マウスにおけるセルレイン惹起性急性膵炎の増悪は、膵腺房細胞におけるオートファジー機構非依存性であること、更にオートファジー機構非依存性に本遺伝子改変マウスにおいてセルレイン膵炎惹起時には、著明なトリプシンの細胞内活性化が生じている可能性が考えられた。

(2)VAMP7-flox x Ptf1a-Cre マウス交配による膵臓特異的 VAMP7 欠損マウスの作製と解析成果

次に我々は、VAMP7 遺伝子欠損マウスにおけるセルレイン膵炎増悪現象の細胞分子生物学的機構を更に解析するため、膵腺房細胞だけに限定する事無く、膵臓細胞全体に発現している VAMP7 の急性膵炎発症における役割を検討すべく、ptf1a 遺伝子のプロモーターにより Cre-recombinase の発現が制御されている Ptf1a-Cre マウスと VAMP7-flox マウスを交配させて、膵特異的に VAMP7 遺伝子欠損するマウス(以下、VAMP7 KO-ptf1a マウス)の作製を試みその作製に成功した。そこで、VAMP7 KO-ptf1a マウスの腹腔内にセルレインを注入しセルレインイン惹起性急性膵炎を発症させて、野生型マウスと比較したところ、その表現型は Spink3-Cre マウスと交配して作製した膵腺房細胞特異的 VAMP7 遺伝子欠損マウスに認められたものと大きく異なっていた。つまり、VAMP7 KO-ptf1a マウスにてはセルレイン腹腔内投与により急性膵炎は惹起されるものの、その膵炎症の程度、膵内のトリプシン活性値などは野生型のそれらと有意差を認めなかった。

この違いは、Cre-recombinase を発現させる promoter-enhancer が機能する細胞の差異や、発現開始時期の特性の違いによるもの

か今後検討すべき課題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4件)

眞嶋浩聡、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，査読有 vol.111、2014、1550-1560、<http://doi.org/10.11405/nisshoshi.111.1550>

眞嶋浩聡、大西洋英、特集，膵炎大全～もう膵炎なんて怖くない～，膵炎の概念と分類 急性膵炎発症のメカニズム，胆と膵，臨時増刊特大号，査読無 Vol.35、2014 1001-1009。

眞嶋浩聡、大西洋英、遺伝子改変マウスを用いて急性膵炎発症の分子メカニズムの解明を目指す、厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業 難治性膵疾患に関する調査研究、平成 23～25 年度 総合研究報告書，査読無 2014、212-216。

眞嶋浩聡、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，査読無 Vol.34、2013、1035-1041。

[学会発表](計3件)

眞嶋浩聡，急性膵炎発症のメカニズム-新たな膵炎治療法の開発を目指して-第74回滋賀消化器病研究会、2015年2月

眞嶋浩聡、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会学術集会(東京)、2013年4月、東京。

眞嶋浩聡 大西洋英、急性膵炎における VAMP7 の役割。(トピックスセッション)第44回日本膵臓学会大会 2013年7月、仙台。

[図書](計1件)

道免孝洋，大西洋英 (2014) メディカルレビュー社，肝・胆・膵疾患 急性膵炎，診療ガイドライン UP-TO-DATE 2014-2015，2014，pp327-333。

[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：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

大西 洋英 (ONISHI, Hirohide)
秋田大学 医学系研究科 教授
研究者番号：00313023

(2)研究分担者

眞嶋 浩聡 (MASHIMA, Hiroshiro)
自治医科大学 医学部 教授
研究者番号：10261869

三浦 光一 (MIURA, Kouichi)
秋田大学医学部 講師
研究者番号：90375238

(3)連携研究者

()

研究者番号：