

際,高カロリー輸液時や高度侵襲時には bacterial translocation と同期した腸管絨毛の菲薄化が報告されており<sup>7)</sup>,その対策としての我々も経腸栄養の優位性を報告している<sup>8)</sup>。また,腸管粘膜の表層を被覆しているムチン層は,細菌の腸管壁内侵入の第一段階である細菌の腸管壁への付着を阻害する因子として重要であると考えられている。

今回の検討に使用した急性膵炎モデルでは,発症24時間後に高率に腸間膜リンパ節と膵局所への感染が成立しており,本モデルでは感染源を腸内細菌とした,bacterial translocation が成立していると判断される。このような条件下で,小腸粘膜絨毛は菲薄化し,ムチン量も減少をきたしていた。このことは,腸管粘膜自体の器質的変化が bacterial translocation の成立に関与していること示唆する結果であった。

しかし,今回の解析はあくまでも腸管粘膜の初期変化をとらえるにとどまっており,その bacterial translocation における関与を証明するには至らなかった。今後,これらの腸管粘膜の器質的変化を抑止することが,膵炎における感染予防につながるかどうかを検討する必要がある。また,今回の解析では,上部空腸を解析に用いたが,実際に bacterial translocation に関与する腸管部位の同定がなされておらず,bacterial translocation に関与する部位での解析が必要と考えられる。

以上,急性膵炎においては発症早期から腸管粘膜に変化をきたしていることが明らかになった。感染成立機構の解明には腸管粘膜の変化にも注目すべきであり,更なる検討を続ける必要があると考えられる。

#### 参 考 文 献

- 1) Runkel NS, Moody FG, Smith GS, et al. The role of the gut in the development of sepsis in acute pancreatitis. *J Surg Res* 1991; 51: 18-23.
- 2) Liu Q, Djuricin G, Nathan C, Gattuso P, Weinstein RA, Prinz RA. The effect of epidermal growth factor on the septic complications of acute pancreatitis. *J Surg Res* 1997; 69: 171-7.
- 3) Deitch EA. The role of intestinal failure and bacterial translocation in the development of systemic infection and multiple organ failure. *Arch Surg* 1990; 125: 403-4.
- 4) Maddaus MA, Wells CL, Platt JL, Condie RM, Simmons RL. Effect of T cell modulation on the translocation of bacteria from the gut and mesenteric lymph node. *Ann Surg* 1988; 207: 387-98.
- 5) Williams RC, Gibbons RJ. Inhibition of bacterial adherence by secretory immunoglobulin: a mechanism of antigen disposal. *Science* 1972; 177: 697-9.
- 6) Berg RD. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *J Med* 1992; 23: 214-44.
- 7) Alverdy JC, Aoye E, Moss GS. Total parenteral nutrition promotes bacterial translocation from the gut. *Surgery* 1988; 104: 185-90.
- 8) Kotani J, Usami M, Nomura M, et al. Enteral nutrition prevents bacterial translocation but does not improve survival during acute pancreatitis. *Arch Surg* 1999; 134: 287-92.

## Lysophosphatidylcholine による AR42J 細胞における アポトーシス誘導能の検討

研究報告者 下瀬川 徹

東北大学大学院消化器病態学分野

共同研究者 正宗 淳 境 吉 孝 佐藤 晃 彦

**要旨：**急性膵炎時に生成される lysophosphatidylcholine (lyso-PC) などのリン脂質は従来 cell lysis により膵腺房細胞障害を起こすとされていた。最近、急性膵炎におけるアポトーシスの関与が報告されている。今回 lyso-PC による AR42J 細胞におけるアポトーシス誘導能について検討した。lyso-PC は濃度依存性に AR42J 細胞に対して cytotoxicity を示した。50 $\mu$ M を超える濃度では短時間の処理で LDH release がみられ、cell lysis と考えられた。それ以下の濃度では濃度依存性にアポトーシスを誘導した。アポトーシス誘導は DNA の断片化および flow cytometry により確認された。Lyso-PC は wild-type p53 発現ならびに clusterin mRNA 発現を誘導した。(結論) Lyso-PC が膵腺房細胞にアポトーシスを誘導することにより急性膵炎の病態に関与することが示唆された。

### 背 景

急性膵炎において、ホスホリパーゼ A2 (PLA2) や platelet activating factor (PAF), lysophosphatidylcholine (lyso-PC) などの脂質 mediator が、病態や重症度と関連することが報告されている<sup>1,2)</sup>。その作用機序として主にネクローシスを介した膵腺房細胞障害が想定されていた。最近になり、膵炎誘導刺激であるセルレインや CCK が膵腺房細胞においてアポトーシスを引き起こすことや急性膵炎におけるアポトーシスの関与が報告されている<sup>3)</sup>。今回、lyso-PC による膵腺房細胞におけるアポトーシス誘導について検討した。

### 方 法

膵腺房細胞モデルとしてラット AR42J 細胞を用いた。Lyso-PC (type I, egg yolk) により処理し、1) MTT 法より cell viability を、2) enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) または DNA を抽出後アガロースゲル電気泳動により DNA の断片化を、3) propidium iodide 染色後 flow cytometry により細胞周期を、4) 蛋白を抽出後 Western blotting により p53 遺伝子発現を、5) 逆転写 PCR により clusterin mRNA の発現を各々検討した。

### 結 果

Lyso-PC は濃度依存性に AR42J 細胞に対して cytotoxicity を示した (図 1 A)。cell lysis の有無を

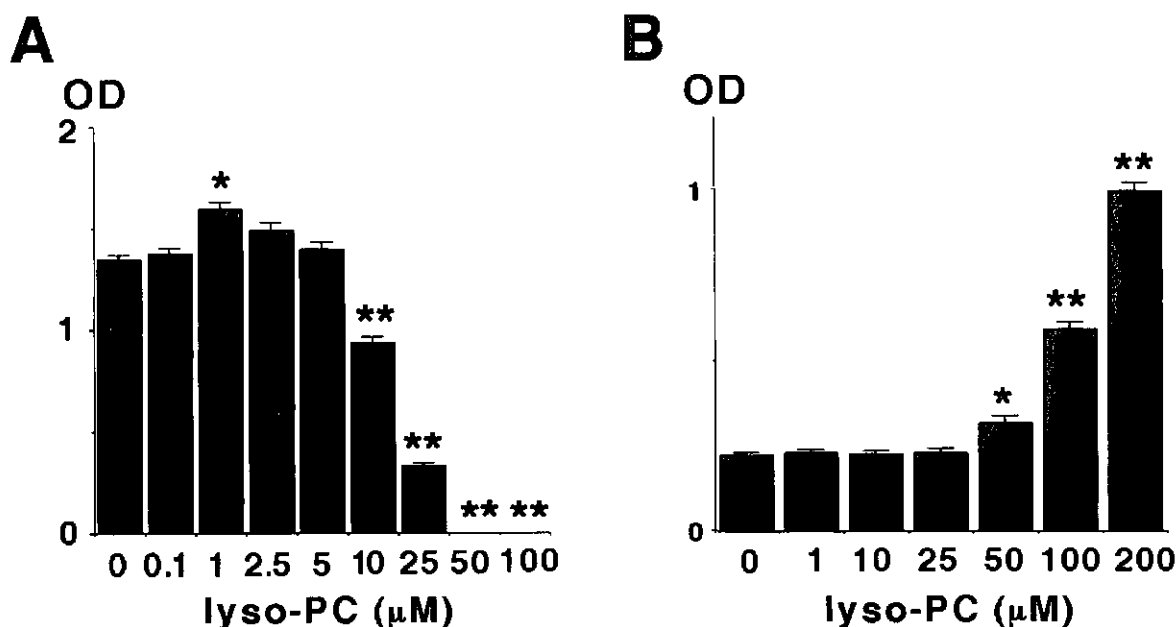


図1. (A) MTT 法による lyso-PC による cell viability の検討。(B)培養上清中への LDH 放出による細胞溶解の検討。(★ :  $p < 0.05$ , ★★ :  $p < 0.01$ )

処理 4 時間後の培養液中への LDH 放出で検討したところ、25 $\mu$ M までの濃度では cell lysis は認められなかった (図 1 B)。ラベリングした bromodeoxyuridine (BrdU) を用いて ELISA を行ったところ、lyso-PC の濃度依存性に DNA 断片化の誘導が認められた (図 2 A)。DNA の断片化はアガロースゲル電気泳動でも確認された (図 2 B)。Flow cytometry にて細胞周期を解析したところ、アポトーシスに相当する hypodiploid が認められた (図 3)。アポトーシスに至るシグナル伝達には caspases の関与が知られている<sup>3)</sup>。そこで caspase-3 の阻害剤である acety-DEVD-aldehyde (DEVD-CHO) と pan-caspases 阻害剤である benzoyloxycarbonyl-VAD-fluoromethylketone (zVAD-fmk) により処理したが lyso-PC によるアポトーシスは抑制されず、caspases 非依存性経路の関与が想定された (データ提示せず)。アポトーシス誘導機序として Western blotting により wild-type p53 の発現を検討したところ、lyso-PC 投与により p53 の発現が誘導されていた (図 4)。また clusterin の遺伝子発現が誘導されていた (図 5)。

## 考 察

Lyso-PC が動脈硬化や炎症など種々の病態に深く関与することが明らかになっている<sup>4)</sup>。Phosphatidylcholine を加水分解して lyso-PC を生成する PLA2 の急性膵炎における意義は広く検討されていたが、lyso-PC の膵腺房細胞に対する作用はネクローシスを誘導すること以外は明らかではない。我々は AR42J 細胞を用いて lyso-PC によるアポトーシス誘導について検討した。我々は lyso-PC が AR42J 細胞にアポトーシスを誘導することを初めて明らかにした。一方、低濃度の lyso-PC は細胞増殖を有意に増加させる傾向がみられた。これは低濃度の lyso-PC は DNA 合成を刺激するが、10 $\mu$ M 以上の濃度では細胞毒性を示すというヒト血管平滑筋細胞における報告と一致するものである<sup>5)</sup>。遊離腺房

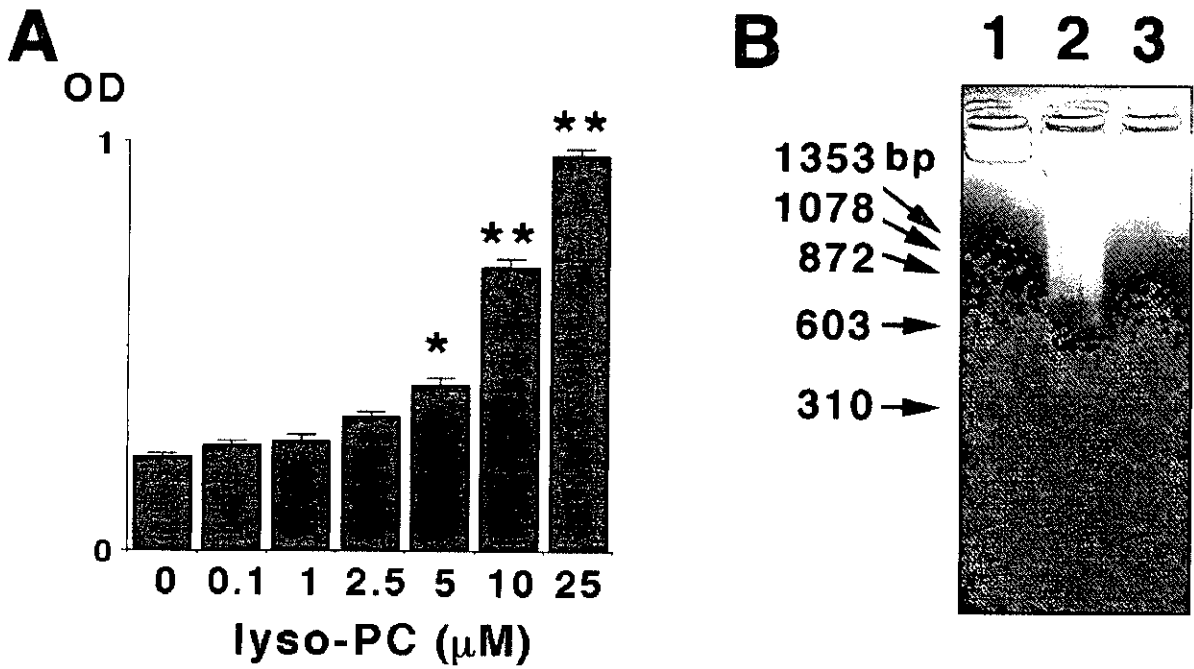


図 2. (A) ELISA による DNA 断片化の検討。(B)電気泳動による apoptotic DNA laddering の検討。Lane 1 : コントロール, lane 2 : lyso-PC (25 $\mu\text{M}$ ), lane 3 : phosphatidylcholine (25 $\mu\text{M}$ )。

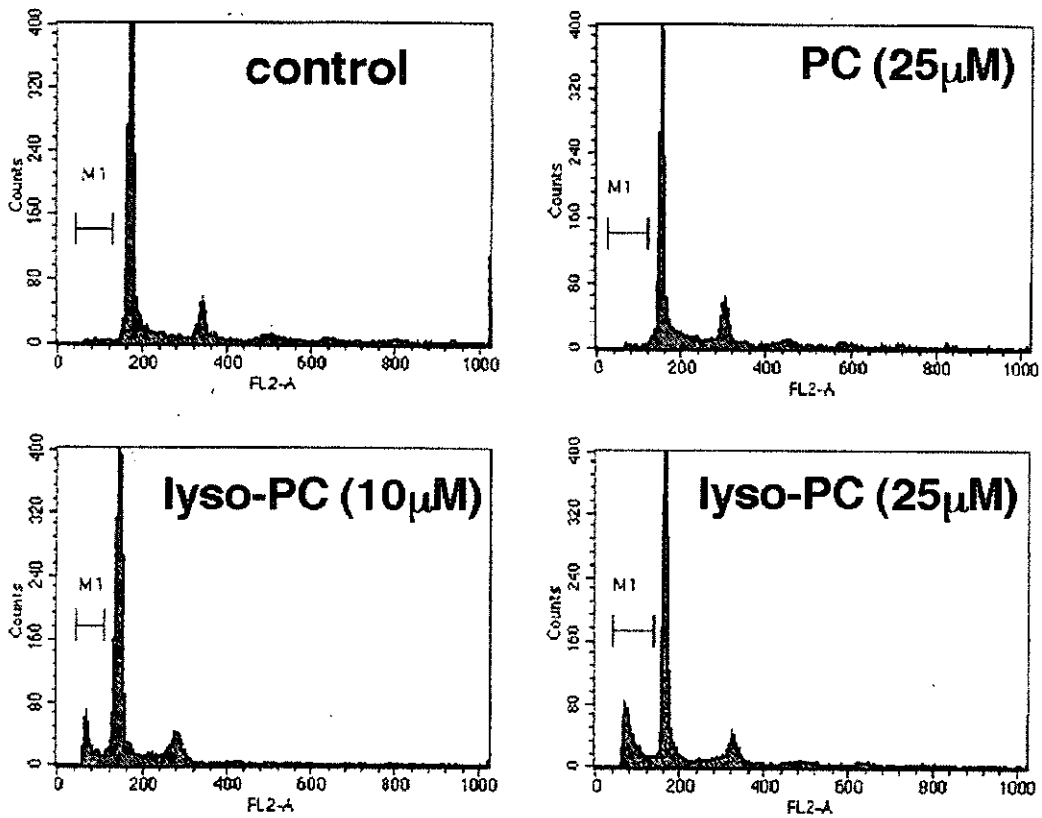


図 3. Flow cytometry による細胞周期の検討。bar M1 : hypodiploid。

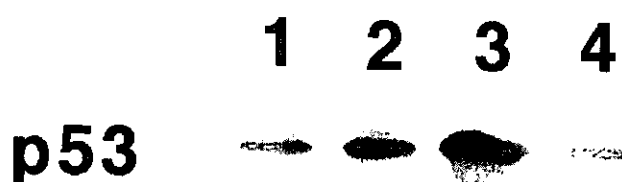


図 4 . Western blotting による wild-type p53 発現の検討。Lane 1 : コントロール, lane 2 : lyso-PC (10 $\mu$ M), lane 3 : lyso-PC (25 $\mu$ M), lane 4 : phosphatidylcholine (25 $\mu$ M)。

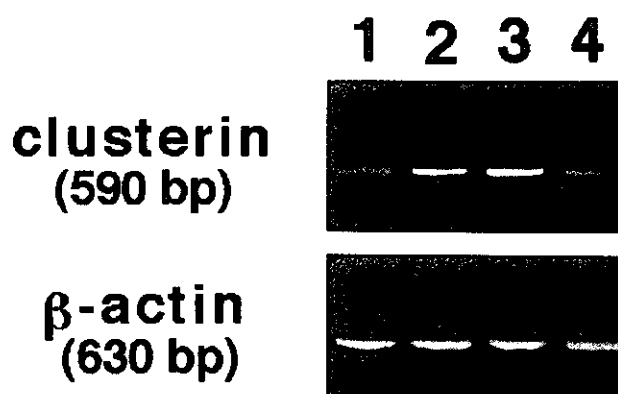


図 5 . 逆転写 PCR による clusterin mRNA レベルの検討。lane 1 : コントロール, lane 2 : lyso-PC (10 $\mu$ M), lane 3 : lyso-PC (25 $\mu$ M), lane 4 : phosphatidylcholine (25 $\mu$ M)。

細胞 (dispersed acini) は確立された *in vitro* の膵腺房細胞モデルであるが、その生存期間からアポトーシスの検討には適さない。AR42J 細胞は消化酵素の合成、分泌、受容体の発見やシグナル伝達機序など膵腺房細胞の多くの特徴を有するものである<sup>9)</sup>。AR42J 細胞は膵外分泌細胞の分泌、分化成長、アポトーシスを検討するモデルとして広く使用されている。

膵腺房細胞におけるアポトーシス誘導機構については不明な点が多い。近年アポトーシス誘導における caspase の関与が注目されている。今回の検討では lyso-PC によるアポトーシス誘導は caspases 阻害剤では影響されず caspases 非依存性機序の関与が想定された。これはセルレインによる AR42J 細胞におけるアポトーシス誘導が cystein proteases 阻害剤で抑制されないことと一致する<sup>3)</sup>。wild-type p53 の発現は lyso-PC により誘導された。wild-type p53 は癌抑制遺伝子として知られており、種々の刺激による AR42J 細胞におけるアポトーシス誘導に必須とされる<sup>3)</sup>。lyso-PC による wild-type p53 発現誘導は lyso-PC による DNA 損傷に対する細胞保護的機構と考えられる。これまで急性膵炎における膵腺房細胞死は主としてネクローシスによると考えられていた。しかし近年、急性膵炎の病態におけるアポトーシスの関与が報告されている<sup>7)</sup>。中等度の実験膵炎モデルではネクローシスはほとんど認められないがアポトーシスは強くみられる。一方重症急性膵炎モデルではネクローシスが主体でありアポトーシスはほとんど見られない。膵における炎症と膵炎の重症度は膵腺房細胞におけるアポトーシスがネク

ローシスに比し優勢な場合、軽減していることから、アポトーシスが膵炎の程度を軽減し治療へ応用しうる可能性を示唆する。しかしながら膵腺房細胞のアポトーシスの意義については、アポトーシスとネクロトーシスの割合は膵炎の重症度のみならず膵炎誘導刺激や動物モデル、時間経過などにも大きく依存しており依然意見の分かれるところである。膵腺房細胞のアポトーシス誘導の分子機序を解明することは膵疾患の臨床に重要な知見を与えると共に治療への応用の可能性を開きうると期待される。

急性膵炎の経過中に clusterin や pancreatitis-associated protein などの種々の遺伝子発現が上昇することが報告されている<sup>8)</sup>。これらの遺伝子は膵腺房細胞のアポトーシスの調節に関与すると考えられている。急性膵炎の経過における clusterin の機能はアポトーシス誘導刺激に対して細胞保護的に働くとされる。膵以外の組織においても clusterin を強く発現している細胞は生存しているのに対し clusterin 発現が低い細胞は死に至るといふ<sup>9)</sup>。Clusterin の発現は ceramide, staurosporine や酸化ストレスなどの種々のアポトーシス誘導刺激により上昇する<sup>8)</sup>。これらの刺激と無関係な lyso-PC によっても clusterin mRNA の発現が増加していることから、clusterin は個々の刺激により直接的に誘導されるのではなく、アポトーシス誘導によって合成されるようである。

培養細胞を lyso-PC により処理すると接着分子や成長因子など種々の遺伝子発現を遺伝子転写レベルで誘導する。加えて lyso-PC は T リンパ球の活性化や血管平滑筋細胞の増殖を刺激する。これらの検討で用いられた lyso-PC の濃度は本研究と同程度であった。急性膵炎の経過で生成される lyso-PC の濃度は不明であるが、lyso-PC は膵腺房細胞に加えて血管内皮や白血球、血管平滑筋細胞にも種々の作用を示すと考えられ、lyso-PC の急性膵炎の病態における新たな役割を示唆すると考えられる。

## 結 論

Lyso-PC などの脂質 mediator が膵腺房細胞におけるアポトーシス誘導を介した遺伝子発現により、急性膵炎の病態に関与する可能性が示唆された。

## 参 考 文 献

- 1) Buchler M, Malfertheiner P, Schadlich H, Nevalainen TJ, Friess H, Beger HG. Role of phospholipase A2 in human acute pancreatitis. *Gastroenterology* 1989; 97: 1521-6.
- 2) Sandoval D, Gukovskaya A, Reavey P, Gukovsky S, Sisk A, Braquet P, Pandolfi SJ, Poucell-Hatton S. The role of neutrophils and platelet-activating factor in mediating experimental pancreatitis. *Gastroenterology* 1996; 111: 1081-91.
- 3) Sata N, Klonowski-Stumpe H, Han B, Luthen R, Haussinger D, Niederau C. Supraphysiologic concentrations of cerulein induce apoptosis in the rat pancreatic acinar cell line AR4-2J. *Pancreas* 1999; 19: 76-82.
- 4) Kume N, Cybulsky MI, Gimborne MJ. Lysophosphatidylcholine, a component of atherogenic lipoproteins, induces mononuclear leukocyte adhesion molecules in cultured human and rabbit arterial endothelial cells. *J Clin Invest* 1992; 90: 1138-44.
- 5) Chen Y, Morimoto S, Kitano S, Koh E, Fukuo K, Jiang B, Chen S, Yasuda O, Hirohara T. Lysophosphatidylcholine causes  $Ca^{2+}$  influx, enhanced DNA synthesis and cytotoxicity in cultured vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 1995; 112: 69-76.
- 6) Christophe J. Pancreatic tumoral cell line AR42J: an amphicrine model. *Am J Physiol* 1994; 266: G963-971.
- 7) Kaiser AM, Saluja AK, Sengupta A, Saluja M, Steer ML. Relationship between severity, necrosis, and apoptosis in five models of experimental acute pancreatitis. *Am J Physiol* 1995; 269: C1295-304.

- 8) Calvo EL, Mallo GV, Fiedler F, Malka D, Vaccaro MI, Keim V, Morisset J, Dagorn J-C, Iovanna JL. Clusterin overexpression in rat pancreas during the acute phase of pancreatitis and pancreatic development. *Eur J Biochem* 1998 ; 254 : 282-9.
- 9) French LE, Wohlwend A, Sappino AP, Tschopp J, Schifferli JA. Human clusterin gene expression is confined to surviving cells during in vitro programmed cell death. *J Clin Invest* 1994 ; 93 : 877-84.

# 各個研究 II

## — 慢性膀胱炎 —



## 膵炎症例における Pancreatic Secretory Trypsin Inhibitor (PSTI) 遺伝子の変異

研究報告者 小川道雄

熊本大学第二外科

共同研究者 広田昌彦 桑田絹子

**要旨：**当科で診療した急性膵炎12例，慢性膵炎5例における PSTI 遺伝子を解析した。PSTI 遺伝子に変異を認めた患者においてはその家族を検索し，また，健康ボランティア20人においても PSTI 遺伝子を解析した。エクソン3の34番目のアミノ酸に Asn (AAT) から Ser (AGT) への置換を伴うもの (N34S) と，エクソン4の67番目のアミノ酸に Arg (CGC) から，Cys (TGC) の置換を伴うもの (R67C) の二種類の変異を慢性膵炎患者において認めた。これは PSTI 遺伝子の変異に関する最初の報告である。理論的には，R67C も N34S も PSTI の高次構造を変化させ，活性を低下させる可能性がある。今後，X線結晶解析や変異リコンビナント蛋白を用いた活性解析による確認が必要である。

### はじめに

プロテアーゼとそのインヒビターは生体内のあらゆるところに存在し，相互に作用しあって多くの複雑な生体反応を調節している。膵臓にはトリプシンやキモトリプシンなど様々なプロテアーゼが存在するが，それらはトリプシノーゲンやキモトリプシノーゲンなどの不活性な前駆体の形で貯えられている。トリプシンは，腸内でエンテロキナーゼの作用でトリプシノーゲンから活性化され，さらに他の消化酵素の前駆体を活性化する。

膵臓には，塩基性膵トリプシンインヒビター (basic pancreatic trypsin inhibitor : BPTI) と膵分泌性トリプシンインヒビター (pancreatic secretory trypsin inhibitor : PSTI) の二種類のトリプシンインヒビターが存在する<sup>1-3)</sup>。BPTI は反芻動物にのみ存在するが，PSTI はヒトを含む多くの哺乳類に存在する。ヒト PSTI 遺伝子は4つのエクソンからなり，N末端側のシグナルシーケンスを含む79のアミノ酸に翻訳される (図1)。PSTI はトリプシンのプロテアーゼ活性を強力に阻害することにより，膵臓の自己消化につながるプロテアーゼ活性化の連鎖反応を抑制する。

1996年，遺伝性膵炎家系のマイクロサテライトマーカーを用いた連鎖解析により，遺伝性膵炎の疾患遺伝子が第7染色体長腕 (7q35) に存在することが明らかとなった<sup>4,5)</sup>。さらに，白人の遺伝性膵炎家系において同遺伝子座に位置するカチオニックトリプシノーゲン遺伝子の点突然変異 (R117H) が報告された。その後，遺伝性膵炎家系におけるトリプシノーゲン遺伝子の変異検索が行われ，これまでに4つの遺伝子変異が報告されている<sup>6-8)</sup>。いまだこれらの遺伝子変異が膵炎を惹起する正確な機構は明らかにはされていないが，いくつかの仮説の中で，変異によって PSTI の活性化トリプシンへの結合能が低下することが一つの機構として提唱されている<sup>9)</sup>。

カチオニックトリプシノーゲンに遺伝子変異を認める膵炎の患者数や，遺伝子変異の種類も最近増加

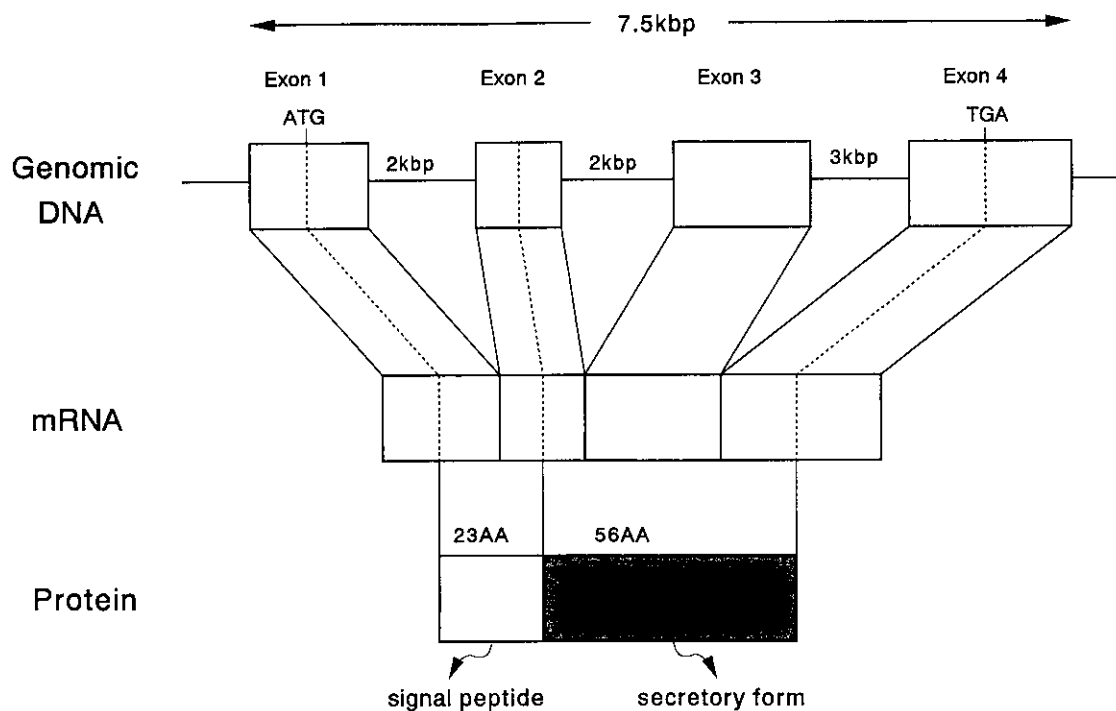


図1. ヒト PSTI 遺伝子構造と PSTI 蛋白

しているが、未だ約半数の遺伝性膵炎の患者の原因遺伝子は明らかにはされていない。上記のようなトリプシノーゲン遺伝子変異による膵炎発症機構の仮説からすると、PSTI 遺伝子の変異によってトリプシン活性の制御ができなくなって膵炎を発症する機構が想定される。そこで、急性、および慢性膵炎の患者で PSTI 遺伝子の変異検索を行った。

## 方 法

当科で診療した急性膵炎12例、慢性膵炎5例における PSTI 遺伝子を解析した。PSTI 遺伝子に変異を認めた患者においてはその家族を検索し、また、健康ボランティア20人においても PSTI 遺伝子を解析した。変異の解析は、4つの各エクソンを PCR で増幅した後、DNA シークエンス、及び制限酵素 Dde I および Nla III を用いた restriction enzyme fragment length polymorphism (RFLP) により行った。

## 結 果

### 1. DNA シークエンシングによる PSTI 遺伝子の変異解析

2つの点突然変異を一人の慢性膵炎患者(32才、女性)において認めた。他の患者および健康ボランティアにおいてはアミノ酸置換を伴う遺伝子変異は認めなかった。一つの変異はエクソン3の34番目のアミノ酸に Asn (AAT) から Ser (AGT) への置換を伴うもの (N34S) で、もうひとつはエクソン4の67番目のアミノ酸に Arg (CGC) から Cys (TGC) への置換を伴うもの (R67C) で、いずれも heterozygous な変異であった(図2, 3)。

Exon 3 Codon 34

Tyr Asn/Ser Glu

TAC AAT GAA

AGT



Forward

TTC ATT GTA

ACT



Reverse

図 2. Exon 3, Codon 34 における heterozygous A → G 変異

Exon 4 Codon 67

Lys Arg/Cys Gln

AA ACG CAG

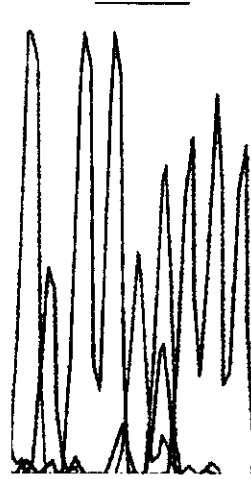
TGC



Forward

CTG GCG TTT

GCA



Reverse

図 3. Exon 4, Codon 67 における heterozygous C → T 変異

### Exon 3 Codon 34

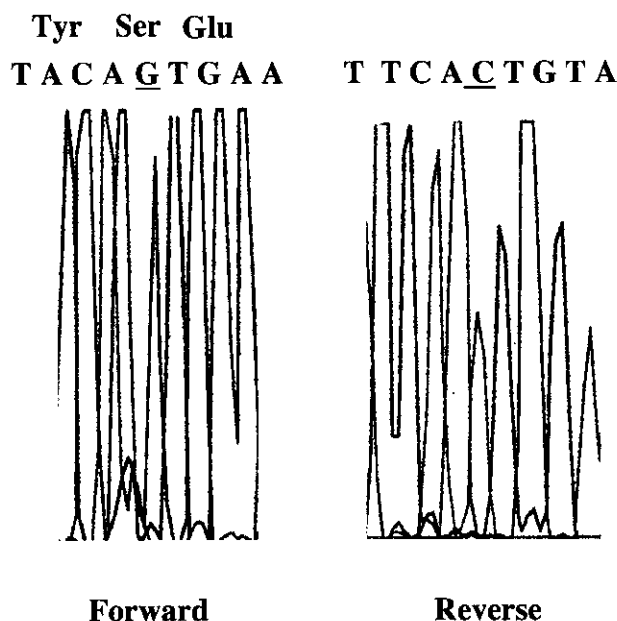


図4. Exon 3, Codon 34 における homozygous A → G 変異

上記, PSTI 遺伝子に変異を伴う慢性膵炎患者の家族を検索した(図5)。父と弟に当該患者と同様の二つの遺伝子変異を認めた。興味あることに, 母と母方の伯父には homozygous な N34C の変異を認めた(図4)。これらの変異は reverse sequence の解析と以下に述べる RFLP 解析によって確認した。また, 3人の膵炎患者, 5人の健康ボランティアにおいて, エクソン4の3'側非アミノ酸翻訳領域に変異を認めたが, これは正常多型と考えられる。

#### 2. RFLP による PSTI 遺伝子の変異解析

シーケンシングにおけると同様に, 各エクソンをPCRで増幅した後, RFLPを検索した。制限酵素 Dde I による N34S の解析結果を図6に示す。正常では, 非切断の204bp のバンドのみを認める。DNA シーケンスの結果と同様に, 当該患者, 父, 弟に変異に伴い切断された176bp と非切断の204bp の2本のバンドを, 母と伯父では176bp の切断バンドのみを認めた。また, 制限酵素 Nla III による R67C の解析結果を図7に示す。当該患者, 父, 弟では変異に伴い切断された183bp と非切断の205bp の2本のバンドを認めた。母, 伯父では, 正常人(健康ボランティア)と同様に非切断の205bp のバンドのみを認めた。

#### 3. PSTI 遺伝子に変異を認める慢性膵炎患者, およびその家族における臨床徴候

R67C と N34S の変異を持つ当該患者は32才の女性である。25才時より, 年1回ほどの膵炎徴候と思われる上腹部痛が出現しており, 31才時に膵石を伴う慢性膵炎と診断された。飲酒歴や膵炎の原因と考えられる因子は認めなかった。血中 PSTI 濃度は4.4 ng/ml と低値(正常値: 4.6~12.2 ng/ml)であった。また, カチオニックトリプシノーゲンの5つのエクソンには変異は認めなかった。

母方の伯父が N34S の変異を認め, 慢性膵炎を発症していた。父方の祖父が慢性膵炎を疑われていたが, 詳細な情報は得られなかった。家系の他のメンバーには膵炎の徴候は認めなかった。また, 家系内

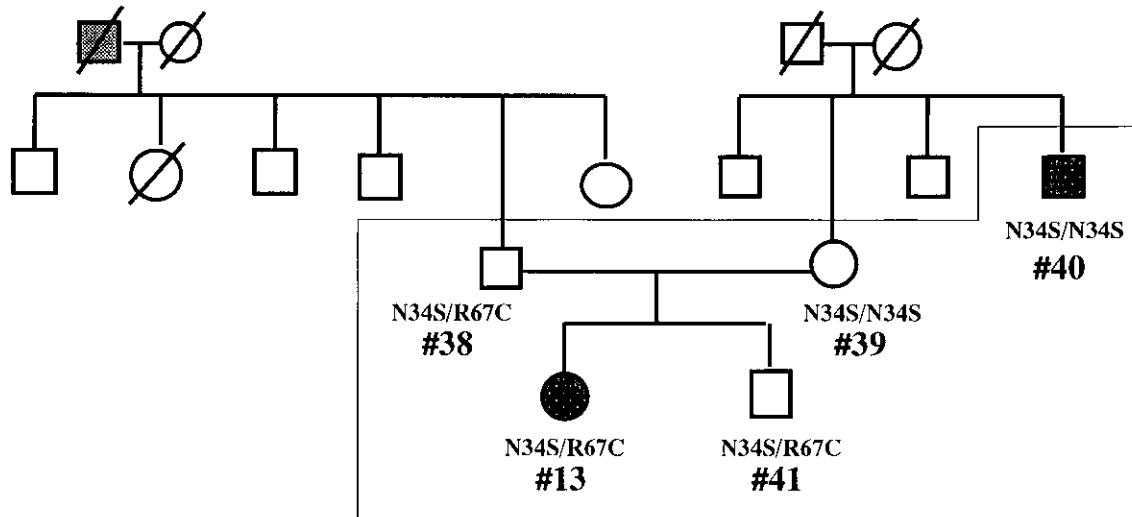


図 5 . PSTI 遺伝子に変異を伴う慢性膵炎患者の家系図

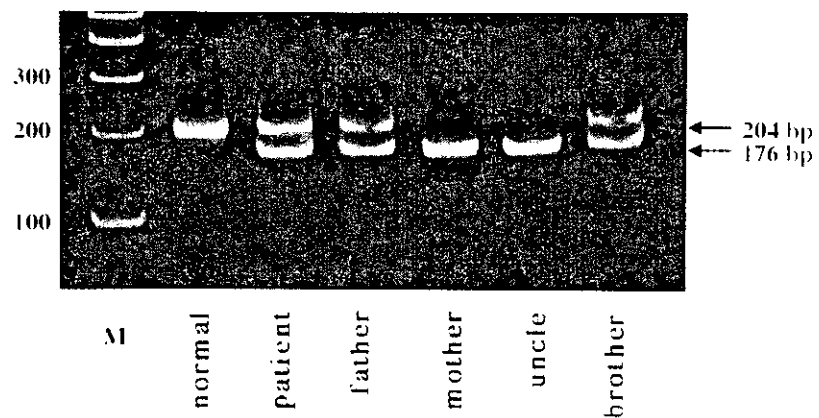


図 6 . RFLP による N34S の解析

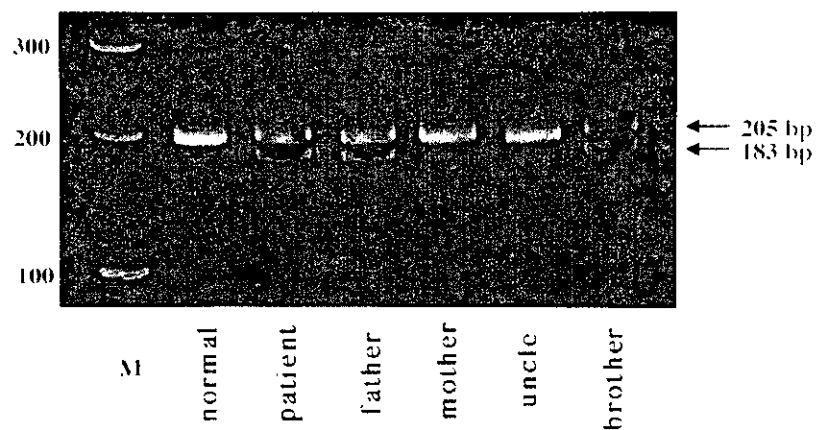


図 7 . RFLP による R67C の解析

に血族結婚は認めなかった。

#### IV. 考 察

PSTI の遺伝子変異が膵炎発症に関与するか否かについてはまだはっきりしないが、N34S の変異に関しては、いくつかの膵炎発症への関与を支持する事項がある。それらは、1) この変異は検索した他の36人には認められないこと、2) N34S の変異を両アレルに持つ伯父が慢性膵炎を発症していること、3) 当該患者は、原因と考えられる因子が存在せず、また、比較的若年で慢性膵炎を発症していること、および4) プタ PSTI は34番目のアミノ酸が Ser であるが、ヒトトリプシンに対する阻害活性が極めて弱いこと、などである。3人の家族が N34S に変異を持つが膵炎を発症していないことは、この遺伝子変異は膵炎発症に関して浸透率が低い (low penetrance) ことを示す。R67C 変異も N34S と同様に他の36人には認められないことから、R67C 変異も易膵炎発症形質を発現する可能性がある。

ヒト PSTI は23のアミノ酸残基のシグナルペプチドを含む79のアミノ酸残基から成り、シグナルペプチドが切断されることにより56アミノ酸残基から成る分子量6.5kD の成熟型が生成する。成熟型 PSTI は3つの分子内ジスルフィド結合 (C32-C61, C39-C58, C47-C79) を有する<sup>10)</sup>。これらの6つのシステイン残基をはじめとして、PSTI のアミノ酸配列は種を越えて高度に保存されている。R67C 変異は、新たに生じたシステイン残基が他のシステイン残基とジスルフィド結合を形成する可能性があることから、高次構造が大きく変わることが考えられる。そのような新たなジスルフィド結合が形成されなくても、Arg から Cys への置換は電荷の変化から局所的な高次構造が変わる可能性が十分ある。いずれの機構によっても、R67C 変異によって PSTI のトリプシンとの結合力が低下することが十分に予想される。

N34S 変異もまた PSTI のトリプシン活性の阻害効果を低下させる可能性がある。Chou-Foasman & Robson-Garnier のコンピューター分析プログラムを用いた二次構造の解析では、N34S 変異を伴う分子では、PSTI のトリプシンとの結合部位である <sup>41</sup>Lys に近い <sup>34</sup>Asn-<sup>35</sup>Glu の native turn structure が消失することが示されている。これはあくまでも理論上のコンピューター解析の結果ではあるが、N34S 変異は活性部位近傍の高次構造を変化させ、PSTI の活性を低下させる可能性が考えられる。以上のように、R67C も N34S も PSTI の高次構造を変化させ、活性を低下させる可能性があるが、今後、X線結晶解析や変異リコンビナント蛋白を用いた活性解析による確認が必要である。

#### 参 考 文 献

- 1) Gebhard W, Tschsche H, Fritz H. Biochemistry of aprotinin and aprotinin-like inhibitors. In: Barrett AJ, Salvesen G, editors. Protease inhibitors. Amsterdam: Elsevier, 1986: 375-88.
- 2) Greene LJ, Pubols MH, Bartelt DC. Human pancreatic secretory trypsin inhibitor. Methods in Enzymol 1976; 45: 813-25.
- 3) Horii A, Kobayashi T, Tomita N, Yamamoto T, Fukushige S, Murotsu T, Ogawa M, Mori T, Matsubara K. Primary structure of human secretory trypsin inhibitor (PSTI) gene. Biochem Biophys Res Commun 1987; 149: 635-41.
- 4) Pandya A, Blanton SH, Landa S. Linkage studies in a large kindred with hereditary pancreatitis confirms mapping of the gene to a 16-cM region on 7q. Genomics 1996; 38: 227-30.
- 5) Whitcomb DC, Gorry MC, Preston RA, Furey W, Sossenheimer MJ, Ulrich CD, Martin SP, Gates LK Jr, Amann ST, Toskes PP, Liddle R, McGrath K, Uomo G, Post JC, Ehrlich GD. Hereditary pancreatitis is

- caused by a mutation in the cationic trypsinogen gene. *Nature Genet* 1996 ; 14 : 141-5.
- 6) Chen JM, Mercier B, Ferec C. Strong evidence that the N21I substitution in the cationic trypsinogen gene causes disease in hereditary pancreatitis. *Gut* 1999 ; 45 : 916.
  - 7) Ford ME, Whitcomb DC. Analysis of the hereditary pancreatitis-associated cationic trypsinogen gene mutations in exons 2 and 3 by enzymatic mutation detection from a single 2.2-kb polymerase chain reaction product. *Mol Diagn* 1999 ; 4 : 211-8.
  - 8) Ferec C, Raguenes O, Solomon R, Roche C, Bernard JP, Guillot M, Quere I, Faure C, Mercier B, Audrezet MP, Guillausseau PJ, Dupont C, Munnich A, Bignon JD, Le Bodic L. Mutations in the cationic trypsinogen gene and evidence for genetic heterogeneity in hereditary pancreatitis. *J Med Genet* 1999 ; 36 : 228-32.
  - 9) Gorry MC, Gabbai Z, Furey W, Gates LKJr, Preston RA, Aston CE, Zhang Y, Ulrich C, Ehrlich GD, Whitcomb DC. Mutations in the cationic trypsinogen gene are associated with recurrent acute and chronic pancreatitis. *Gastroenterology* 1997 ; 113 : 1063-8.
  - 10) Kikuchi N, Nagata K, Yoshida N, Ogawa M. The multiplicity of human pancreatic secretory trypsin inhibitor. *J Biochem* 1985 ; 98 : 687-94.

# ラット慢性膵炎モデルにおける細胞外基質分解酵素 (matrix metalloproteinases) 発現の検討

研究報告者 大 槻 眞

産業医科大学第三内科

共同研究者 山 口 泰 三 中 村 早 人 木 原 康 之

**要旨：**慢性膵炎における細胞外基質分解因子の役割を明らかにするため、オレイン酸膵管内注入慢性膵炎ラットを用いて、膵における membrane type 1 matrix metalloproteinases (MT1-MMP) と matrix metalloproteinases (MMPs)、特に gelatinase (MMP-2, MMP-9) の mRNA および蛋白の発現を検討した。組織学的には膵炎作製 3 日後より膵腺房細胞の脱落と膠原線維の沈着が認められたが、2 週以後膵実質の脂肪置換が進行し、膠原線維は次第に消失した。MT1-MMP, MMP-2 および MMP-9 mRNA の発現はオレイン酸注入 3 日後より著明に増加し、MT1-MMP と MMP-2 mRNA は 6 週後まで、MMP-9 mRNA は 2 週後まで高値が持続した。MT1-MMP 蛋白, MMP-2 および MMP-9 の活性型蛋白は膵炎作製 6 時間後より増加し、MT1-MMP 蛋白と MMP-2 の活性型蛋白は膵炎作製 6 週後、MMP-9 の活性型蛋白は膵炎作製 2 週後まで高値が持続した。オレイン酸膵炎では膠原線維の増加は膵炎作製 6 時間後よりはじまり、MT1-MMP 蛋白の発現と MMPs 活性型蛋白の増加に一致して膠原線維が消失したことから、細胞外基質の分解に MMPs が関与している可能性が示唆された。

## 目 的

慢性膵炎の組織学的特徴は膵腺房細胞のびまん性あるいは限局性の持続的な炎症性破壊と線維化であり、慢性膵炎の線維化機序の検討は慢性膵炎の病態解明に重要である。線維化は細胞外基質 (ECM) の合成と分解の不均衡により惹起される。Matrix metalloproteinases (MMPs) は ECM の分解に中心的な役割を果たしている。Membrane type MMPs (MT-MMPs) は前駆体 MMPs の活性化因子であり<sup>1,2)</sup>、MMPs および MT-MMPs が ECM の分解を調節することにより組織の再生に関与している<sup>3,4)</sup>。本研究ではオレイン酸慢性膵炎モデルラットを用いて膵線維化機序の検討を MMPs、特に MMP-2 および MMP-9 mRNA の発現および蛋白活性と MT1-MMP mRNA および蛋白の発現の面から検討した。

## 方 法

体重 200–250 g の Wistar 系雄性ラットを 18 時間絶食後、ペントバルビタール麻酔下に開腹し十二指腸の胆膵管開口部より膵管内へ逆行性に 99% オレイン酸 50  $\mu$ l / 体重を注入し、慢性膵炎モデルを作製した。膵炎作製前、オレイン酸注入後 6 時間、3 日、5 日、1 週、2 週、4 週、6 週、8 週および 12 週後にラットを屠殺し膵臓を摘出し、HE 染色、アザン染色を用いて組織学的検討を行い、Northern blot 法



を用いて膵での MT1-MMP, MMP-2 および MMP-9 mRNA の発現と, Western blot 法で MT1-MMP 蛋白の変化を経時的に検討した。さらに zymography 法にて MMP-2 および MMP-9 活性の変化を検討した。

## 結 果

組織学的には膵炎作製 3 日後より膵腺房細胞の脱落を認め、1 週後には膵腺房細胞の壊死脱落が著明になり、腺房の導管様変化、間質内への炎症細胞浸潤が認められた。2 週以後、炎症性変化の改善と膵実質の脂肪置換が進行し、8 週後には実質細胞はほとんど脂肪置換された(図 1)。膠原線維は膵炎作製後 3 日より間質に認められ、2 週以後は漸減し、8 週以後はほぼ消失した(図 2)。全経過を通じてランゲルハンス島に変化は認められなかった。

MT1-MMP, MMP-2 および MMP-9 mRNA の発現はオレイン酸注入 3 日後より著明に増加し、それぞれ 1 週後に膵炎作製前に比べ 24 倍, 12 倍, 11 倍と増加し、MT1-MMP と MMP-2 mRNA は 6 週後まで、MMP-9 mRNA は 2 週後まで高値が持続した(図 3)。

MT1-MMP 蛋白の発現は膵炎作製前より認められたが、膵炎作製 6 時間後より増加し、5 日後に頂値

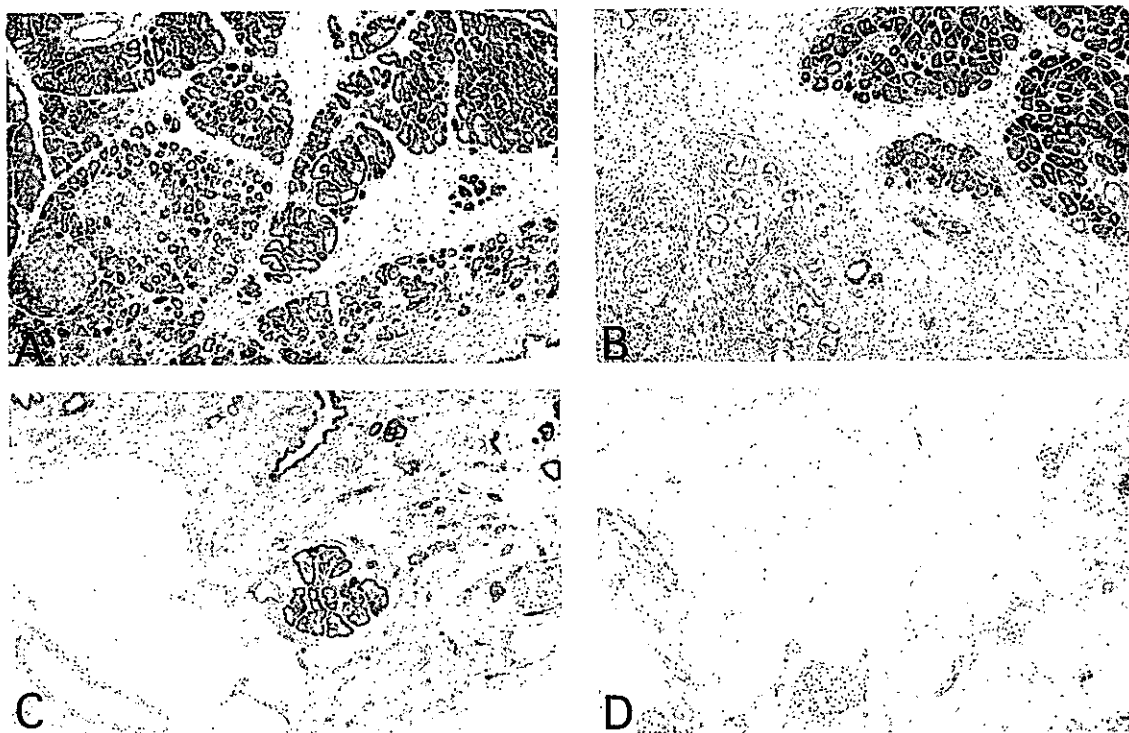


図 1. オレイン酸注入後の組織学的検討 (H&E 染色)

- A: オレイン酸注入後 3 日後
- B: オレイン酸注入後 1 週後
- C: オレイン酸注入後 4 週後
- D: オレイン酸注入後 12 週後

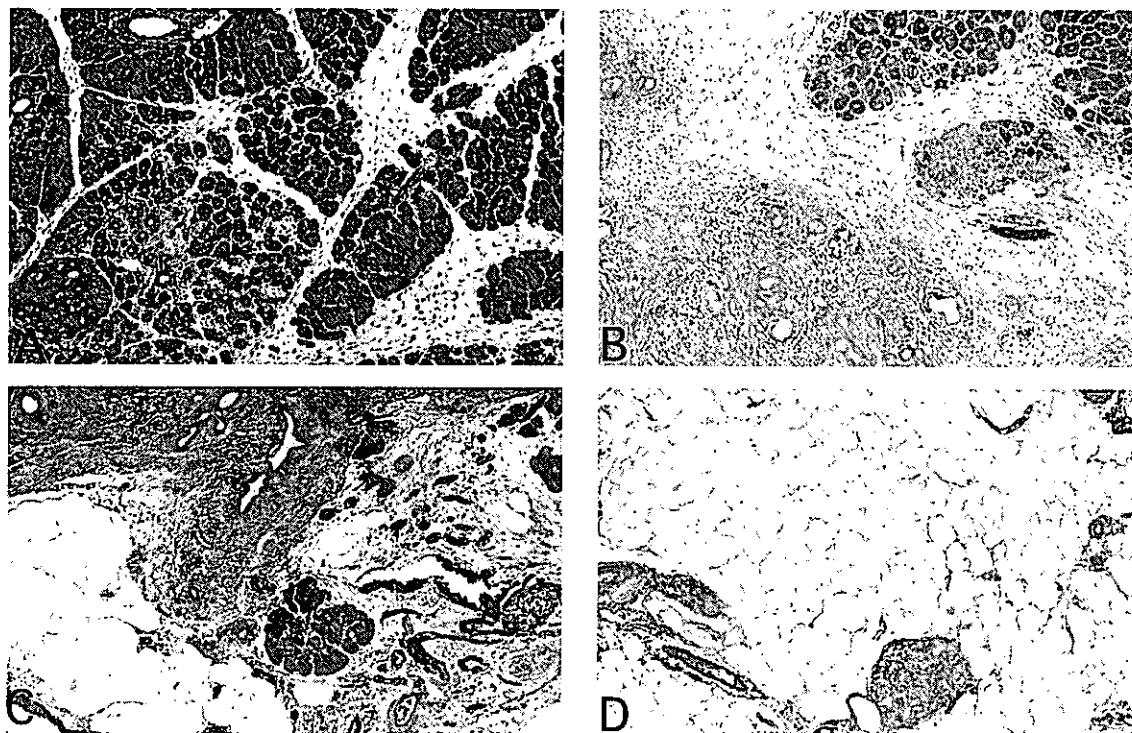


図 2. オレイン酸注入後の組織学的検討 (Azan 染色)

A : オレイン酸注入後 3 日後

B : オレイン酸注入後 1 週後

C : オレイン酸注入後 4 週後

D : オレイン酸注入後 12 週後

となり膀胱作製前に比べ 6 週後まで高値が持続した (図 4)。

MMP-2 および MMP-9 の前駆体蛋白は、それぞれ膀胱作製 5 日後、3 日後に頂値に達し、それぞれ膀胱作製前の 3.6 倍、5.4 倍にまで増加した。MMP-2 および MMP-9 の活性型蛋白は膀胱作製 6 時間後より増加し、それぞれ膀胱作製 5 日後、3 日後に頂値に達し、膀胱作製前に比べ 28 倍、20 倍と増加し、それぞれ膀胱作製 6 週後、2 週後まで高値が持続した (図 5)。

## 考 察

ECM は細胞骨格を支持するだけでなく、細胞増殖、分化などを制御する多彩な生理活性を示す<sup>5,6)</sup>。MMRs はこのような ECM を分解する一群のプロテアーゼであり、組織破壊と再構築が起こる様々な生理的および病的過程に関与することが知られている<sup>7,8)</sup>。MMPs は前駆体蛋白として種々の細胞から分泌され、セリンプロテアーゼにより活性化されるが、前駆体 MMP-2 はセリンプロテアーゼや分泌型の MMP では活性化されず、細胞膜表面に存在する MT1-MMP で活性化される<sup>9)</sup>。

膀胱作製 3 日後より MT1-MMP、MMP-2 および MMP-9 mRNA の発現の増加だけでなく、MT1-MMP 蛋白、活性型 MMP-2 および活性型 MMP-9 蛋白も膀胱作製 6 時間後より増加し、MT1-MMP 蛋白と活性型 MMP-2 は膀胱作製前に比べ 6 週後、活性型 MMP-9 蛋白も膀胱作製前に比べ 2 週後まで高

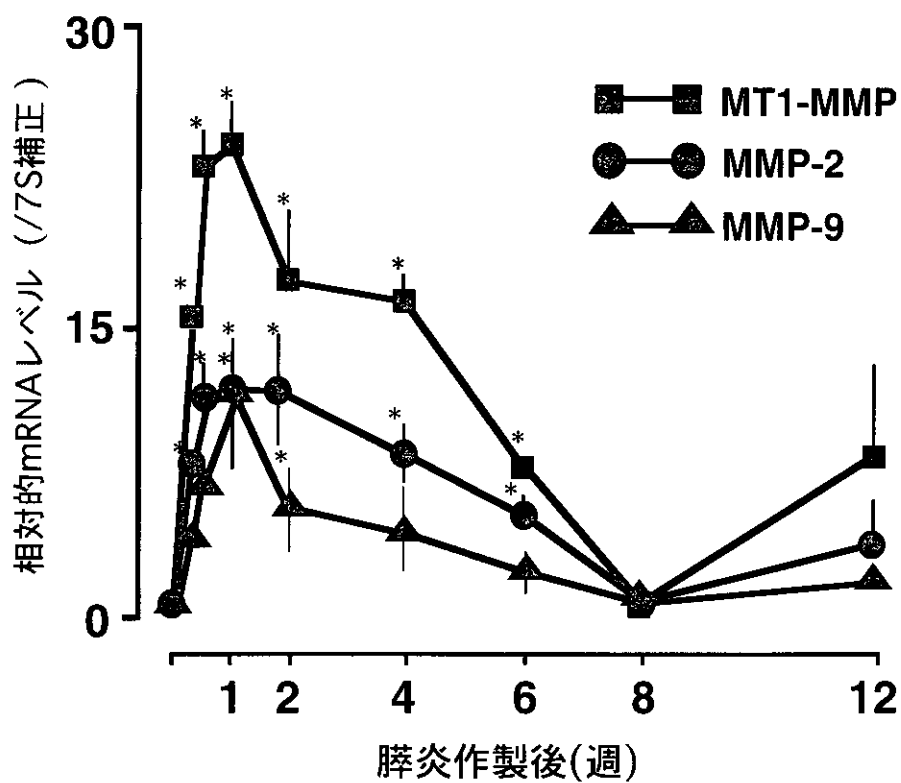


図 3. オレイン酸腓管内注入腓炎における mRNA の変化  
\* :  $P < 0.05$

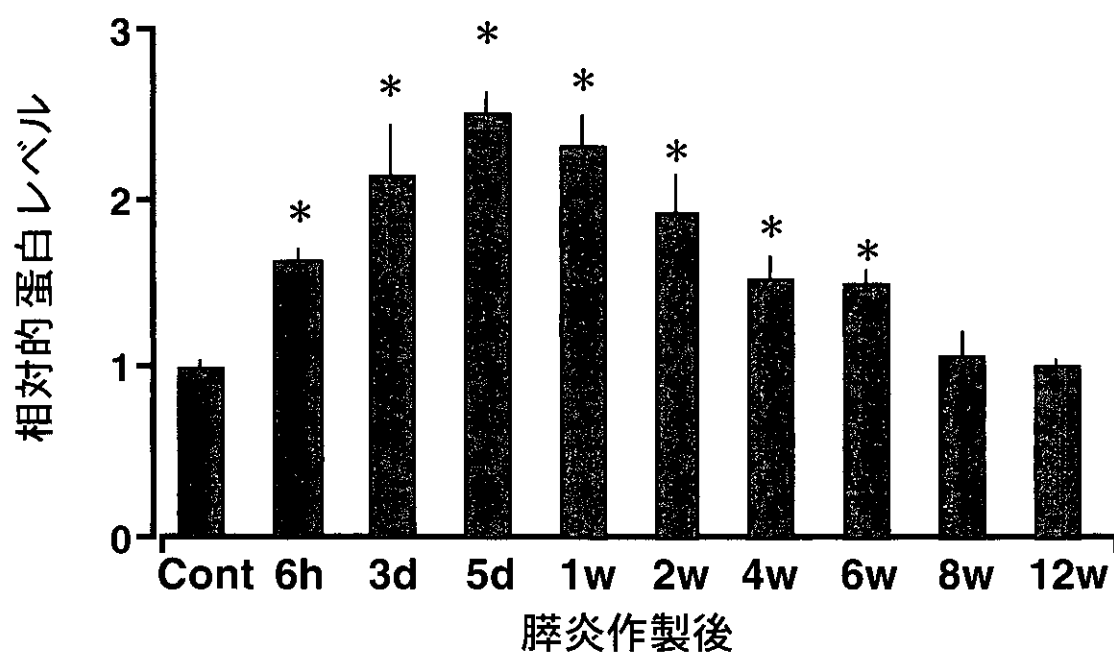


図 4. オレイン酸腓管内注入腓炎における MT1-MMP 蛋白の変化  
\* :  $P < 0.05$

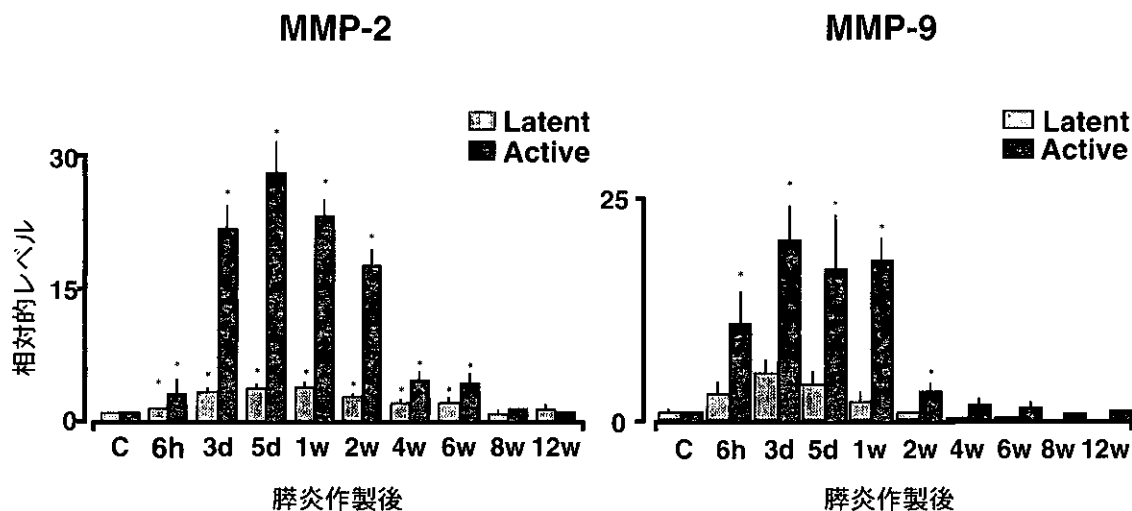


図5. オレイン酸腓管内注入腓炎における zymography  
\* :  $P < 0.05$

値が持続した。組織学的には膠原線維は腓炎作製3日後より間質に認められたが、一過性の沈着に留まった。このことは膠原線維の沈着と分解は腓炎作製早期より同時に起こり、沈着と分解の相対的バランスの不均衡によるECMの分解は、膠原線維の減少に一致して、MMPs mRNAの発現と活性型蛋白、さらに活性を調整するMT1-MMPが増加し、脂肪置換が進行する腓炎作製6週後まで高値を維持したことにより、オレイン酸腓炎ラットではECMがMMPsによって分解され一過性の膠原線維の沈着に留り、膠原線維が分解されつづけた為に細胞骨格が破壊し、腓腺房細胞の再生が抑制された可能性が示唆された。

## 結 語

オレイン酸腓管内注入慢性腓炎モデルラットでは膠原線維の沈着は一過性で、腓実質は脂肪置換された。MT1-MMP、MMP-2およびMMP-9 mRNAの発現はMT1-MMPとMMP-2 mRNAは6週後まで、MMP-9 mRNAは2週後まで高値が持続し、さらにMT1-MMP蛋白とMMP-2の活性型蛋白は腓炎作製6週後、MMP-9の活性型蛋白は腓炎作製2週後まで高値が持続し、これに一致して膠原線維が消失したことから、腓炎後の膠原線維の消失にMT-MMPおよびMMPsが関与している可能性が示唆された。

## 参 考 文 献

- 1) Okada A, Tomasetto C, Lutz Y, Bellocq JP, Rio MC, Basset P. Expression of matrix metalloproteinases during rat skin wound healing: evidence that membrane type-1 matrix metalloproteinase is a stromal activator of pro-gelatinase A. *J Cell Biol* 1997; 137: 67-77.
- 2) Sato H, Takino T, Okada Y, Cao J, Shinagawa A, Yamamoto E, Seiki M. A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature* 1994; 370: 61-5.