

2) 生存時間

体外循環時間を1時間と3時間の2通りでラットの生存時間を比較した。そのほとんどが12-18時間で死亡し治療群とコントロール群で明らかな差を認めなかった。以前報告した抗好中球抗体による生存時間の延長効果には及ばないが、長時間生存例も含まれた。

3) ラット急性出血性膵炎モデルの経時的病理組織変化

ラット急性出血性膵炎モデルにおける膵臓におこる病理組織学的変化を検討した。膵炎作成直後より、血管壁の壊死とその周囲の出血が生じ、3時間後には腺房細胞の破壊と出血巣の拡大が巣状に認められ、10時間後には、著しい腺房細胞の脱落、消失と出血が認められる。これらの変化は、治療群およびコントロール群で共通した変化であった(図2)。

4) 肺組織の3時間後の病理組織所見

3時間の体外循環後に、肺に生じる病理組織所見を両群で比較した。肺胞壁への好中球等の炎症性細胞浸潤の程度は、コントロール群で強い傾向が見られた(図3)。強拡大の像ではコントロール群で、図4のような肺胞壁へのヒアリン様物質の沈着が散見されるのに対し、治療群の方では明らかに少ないことが観察された。

5) 各種血液パラメーター

各種血液データを両群で比較した(図5)。白血球数は治療群で減少傾向にあった。エンドスピーシー法による血中エンドトキシン濃度は、全例検出感度以下であった。血清アミラーゼおよびリパーゼは、PMX使用群で明らかに低値を示した。

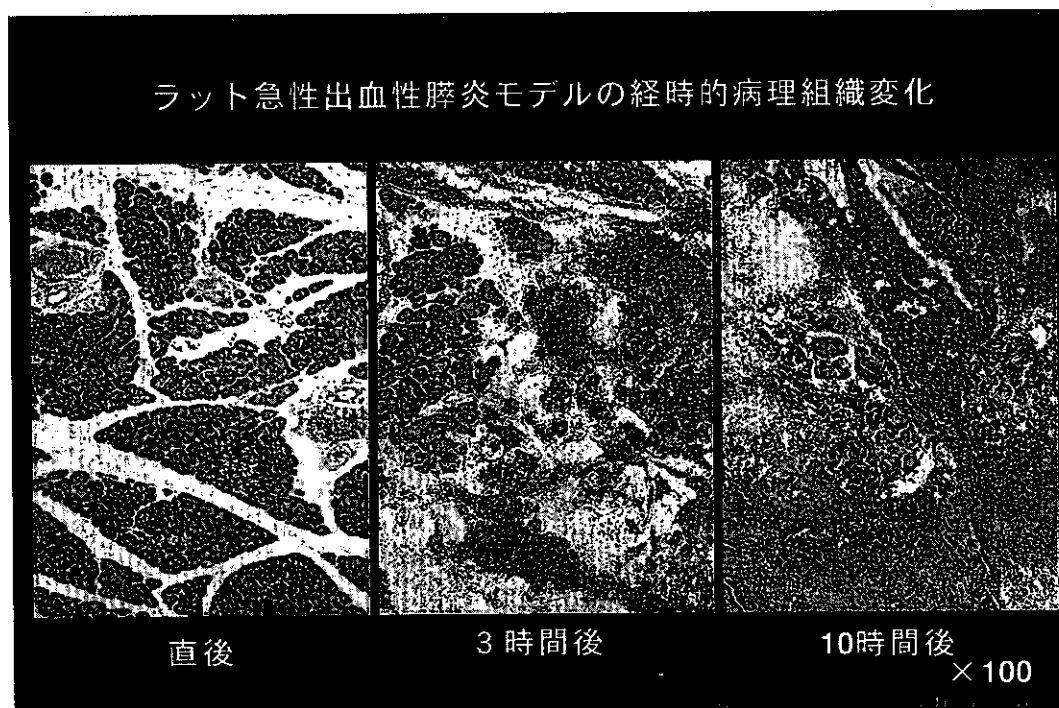


図2. ラット急性出血性膵炎モデルにおけるポリミキシンB吸着カラムの治療効果に関する検討

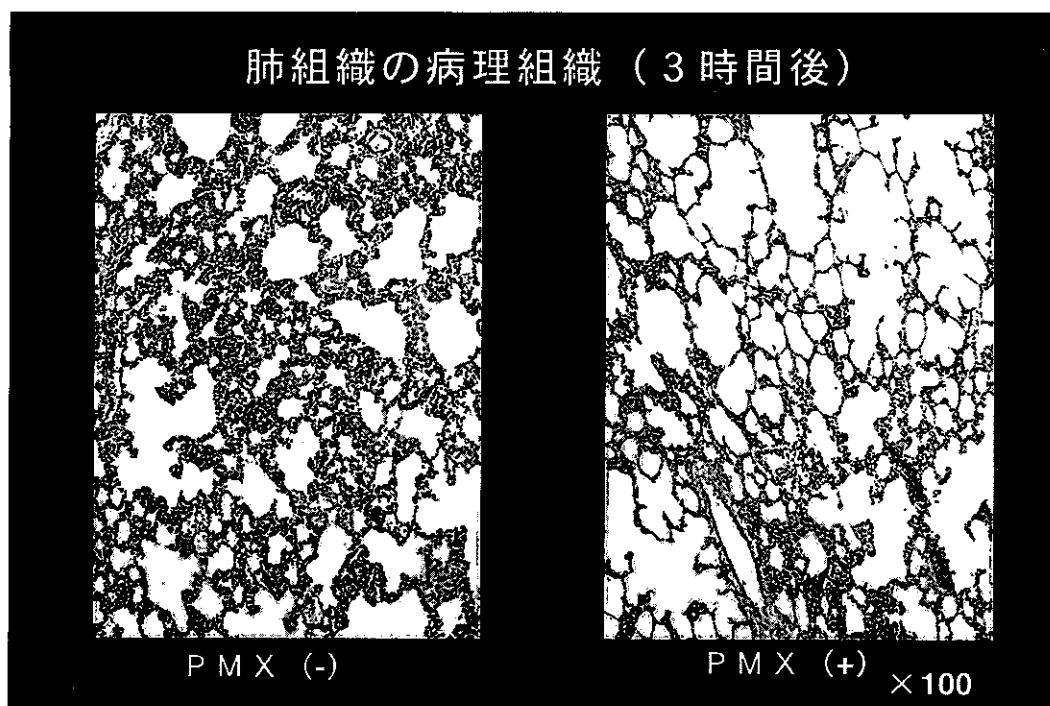


図3. ラット急性出血性膵炎モデルにおけるポリミキシンB吸着カラムの治療効果に関する検討

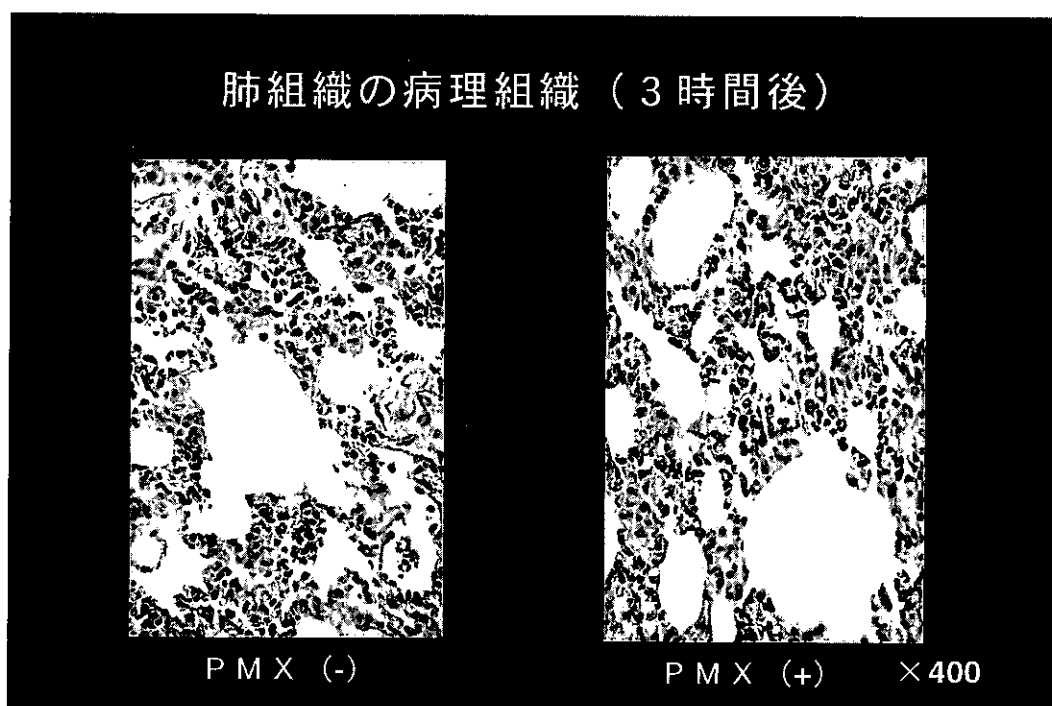


図4. ラット急性出血性膵炎モデルにおけるポリミキシンB吸着カラムの治療効果に関する検討

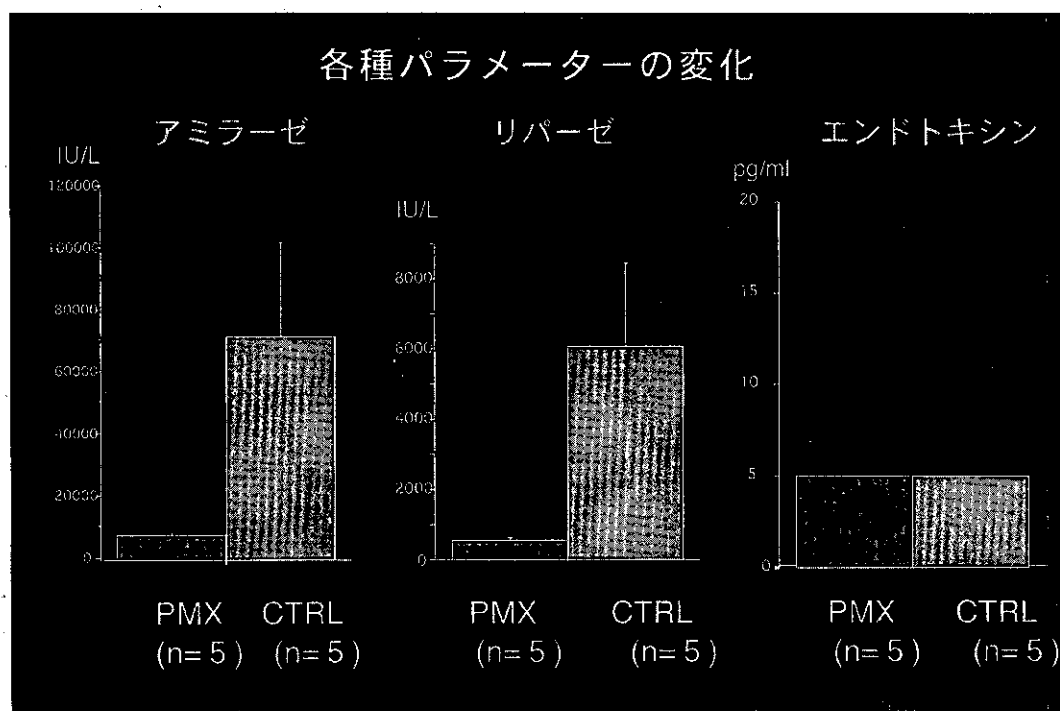


図5. ラット急性出血性膵炎モデルにおけるポリミキシンB吸着カラムの治療効果に関する検討

考 察

ポリミキシン固定化カラムは、1982年に小玉らが開発し、雑種成犬のエンドトキシン血症モデルでエンドトキシンの有意な減少と救命率の向上を確認し³⁾、1995年多施設共同での検討でも高エンドトキシン血症に対してPMXの有用性が確認されている^{4,5)}。このPMXカラムは、エンドトキシン以外にサイトカイン、他の循環抑制物質(anandamide, 2-arachidonoglycerol等)などの吸着が、その発現機序として考えられているが、充分解明されていない。

以前我々は、ラット急性出血性膵炎モデルにおいて抗好中球抗体の投与により肺障害の軽減とそれによる生存率の延長をもたらすこと、また抗好中球抗体が好中球由来のフリーラジカルの産生を抑制することを報告した^{1,2)}。今回PMXカラムが好中球および単球を良好に吸着する(図6)ことに着目し、同様なモデルを用いて、より実践的な手法として膵炎導入後の体外循環による治療効果を検討してきた。前回報告したように、ラット急性出血性膵炎モデルにおいてPMXカラムを用いた体外循環により、その生存率の改善をきたす効果は確認できていない。しかしながらPMXカラム使用により

- 1) 病理組織的变化から、肺障害の軽減
- 2) 血液生化学データより、膵炎そのものの軽減

の可能性が示唆された。

現在、主にエンドトキシンショックに認められる早期メディエーターであるアナンダマイド(図7)の除去効果について、高速液クロマトグラフィーにて測定中である。

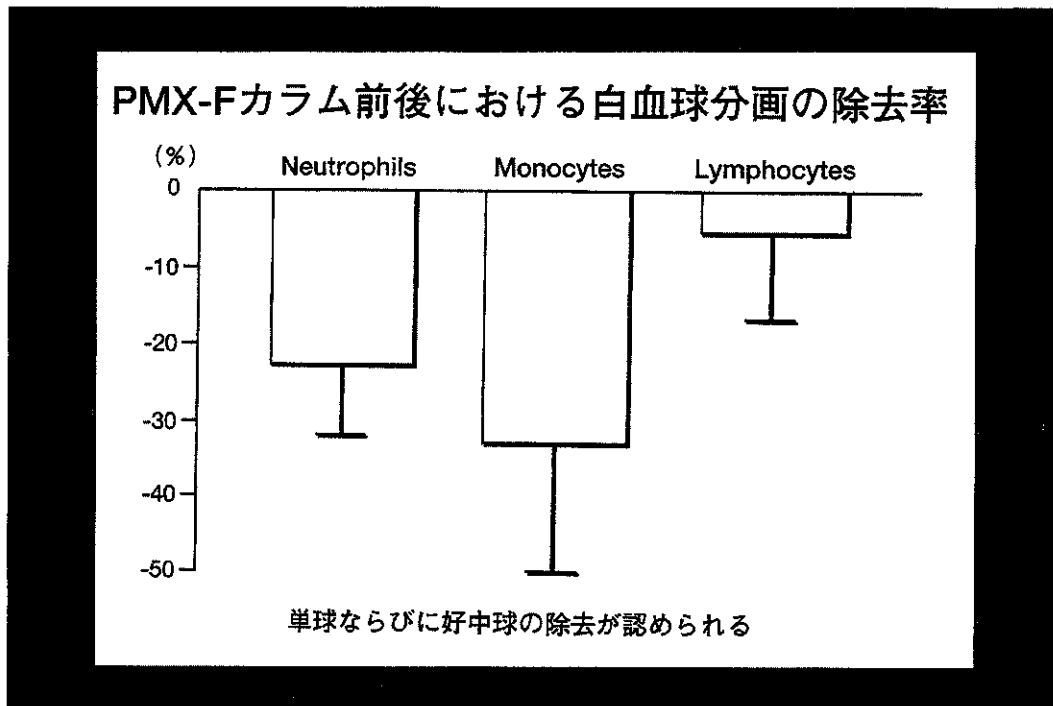


図 6. ラット急性出血性膵炎モデルにおけるポリミキシンB吸着カラムの治療効果に関する検討

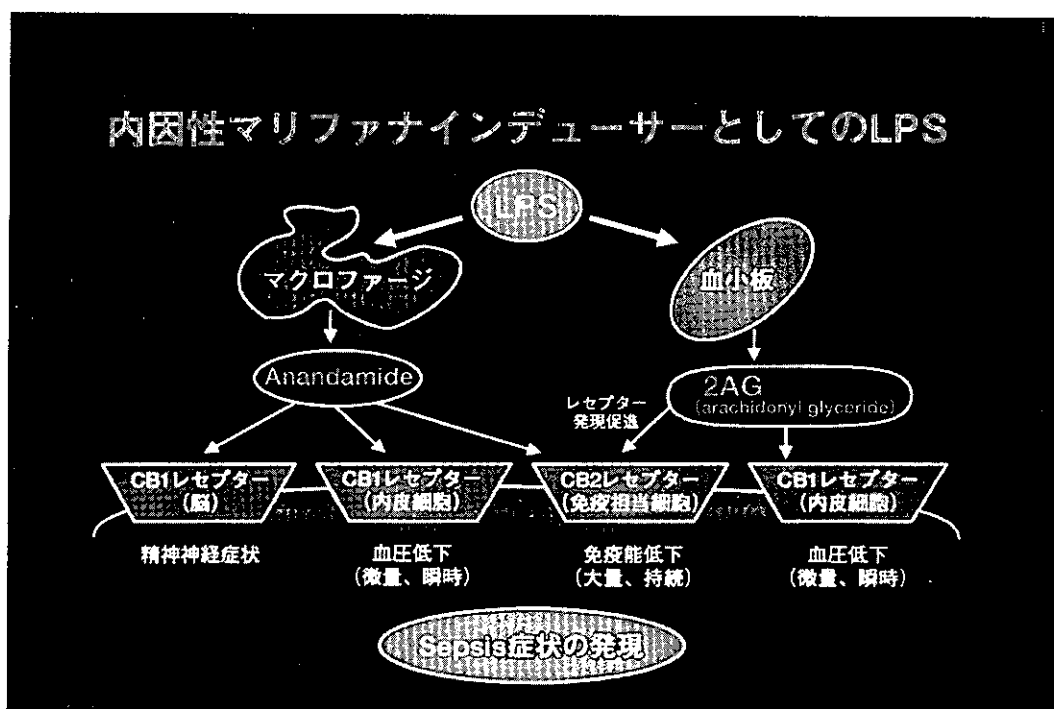


図 7. ラット急性出血性膵炎モデルにおけるポリミキシンB吸着カラムの治療効果に関する検討

参 考 文 献

- 1) Inoue S, Nakao A, Kishimoto W, et al. Anti-neutrophil antibody attenuates the severity of acute lung injury in rats with experimental acute pancreatitis. *Arch Surg* 1995; 130: 93-8.
- 2) Inoue S, Nakao A, Kishimoto W, et al. LFA-1 (CD11a/CD18) and ICAM-1 (CD54) antibodies attenuate superoxide anion release from polymorphonuclear leukocytes in rats with experimental acute pancreatitis. *Pancreas* 1996; 12: 183-8.
- 3) Hanasaka K, Tani T, Kodama M. New approach to endotoxin and septic shock by means of polymyxin-B immobilized fiber. *Surg Gynecol Obstet* 1989; 168: 323-31.
- 4) 小玉正智, 谷 徹, 前川和彦, 他. 重症敗血症に対する流血中エンドトキシン除去療法ーポリミキシンB固定化カラムによる血液灌流法ー. *日外会誌* 1995; 96: 277-86.
- 5) 谷 徹, 花澤一芳, 林 國瑞, 他. エンドトキシン吸着除去療法. *外科治療* 1995; 72: 302-8.

各個研究 II

— 慢性膀胱炎 —

膵分泌性トリプシンインヒビターの遺伝子変異に基づくアミノ酸置換の膵炎発症における意義： リコンビナント蛋白を用いた解析

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：膵炎患者における *PSTI* 遺伝子の変異解析の結果に基づき、3種類のリコンビナント *PSTI* を作成した (wild type, N34S, R67C)。しかし、N34S, R67C のいずれの精製リコンビナント蛋白とも、wild type に比して、トリプシンに対する阻害活性の低下やトリプシンへの結合能の低下は認めず、易膵炎発症形質に *PSTI* 遺伝子の変異が関与しているという証明はできなかった。

N34S に関しては、例外なく常にエクソン近傍のイントロンの変異である IVS 1-37T > C と IVS 3-69insTTTT と共存していることから、N34S 変異に伴うアミノ酸置換による影響よりも、これらのイントロンの変異が mRNA のスプライシングの異常を引き起こして活性蛋白が産生されない可能性が考えられる。一方、R67C に関しては、システイン残基の数が6から7へと増加することによって多くの分子型が産生される可能性がある。実際、精製過程で行った HPLC では、多くの移動度の異なったピークが出現していることからこの可能性が示唆される。今回精製した R67C 蛋白はこれらいくつかのアイソタイプの内のひとつを精製したにすぎないといえる。今後、トリプシン阻害活性が消失した R67C 変異リコンビナント蛋白の精製、N34S 変異 *PSTI* mRNA の発現解析、*PSTI* 遺伝子のノックアウトマウスを用いた解析、などによる確認が必要である。

I. 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¹⁻³⁾。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。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^{4,5)}。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（R122H）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6つの遺伝子変異（R122H, N29I, K23R, A16V, D22G, -28delTCC）が報告されている⁶⁻⁸⁾。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⁹⁾。

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抑制能が低下することによって膵炎を発症する機構が想定される（図1）。

これまでの解析によって、アミノ酸置換を伴う *PSTI* 遺伝子の変異としては、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 (101A > G N34S : 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 (199C > T R67C : R67C) の二種類を認めた。N34Sは、世界中の施設から報告が相次いでいる変異であり、一方、R67Cは本邦でのみ同定された変異である。

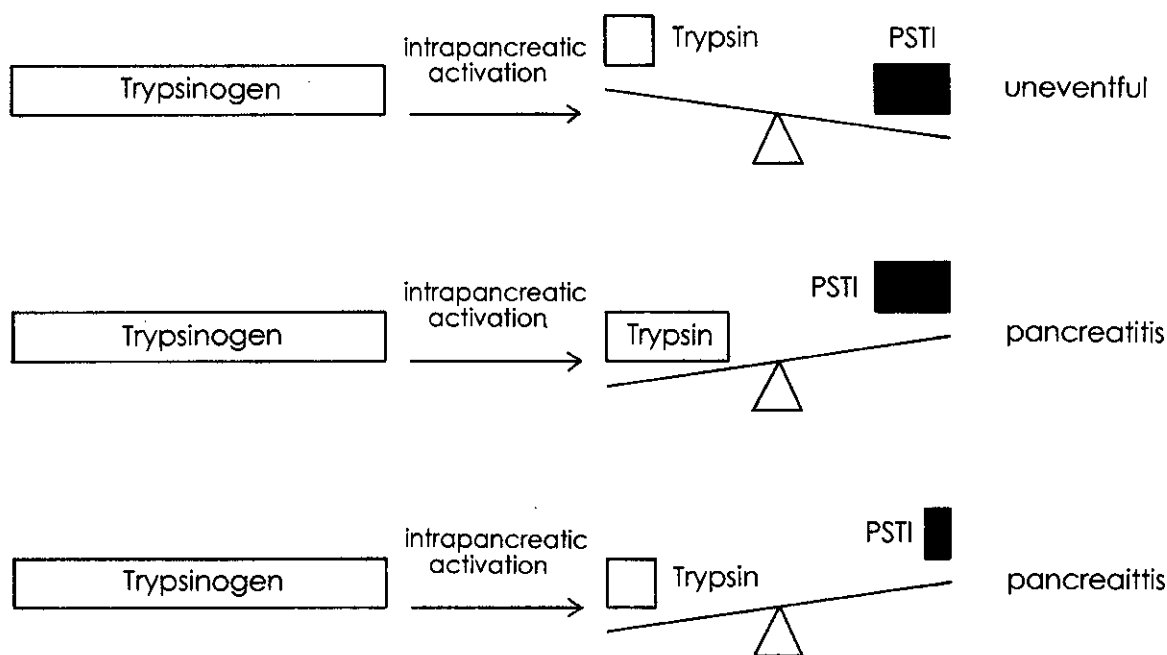


図1. トリプシン活性化と PSTI 機能のバランスと膵炎の発症

Ⅱ. 方 法

1) リコンビナント PSTI 蛋白の作成

PSTI 蛋白は67番目のアミノ酸に Arg を持っているが、この部位でトリプシンによって分解されるために、それを Ser に置換して、持続型の R67S リコンビナント蛋白を産生する系がすでに確立されていた^{10,11)}。そこで、この酵母の R67S リコンビナント蛋白産生系を利用して、site-directed mutagenesis の手法によって新たなアミノ酸置換を伴うリコンビナント蛋白の産生系を確立した (図2)¹²⁾。

2) N34S リコンビナント蛋白のトリプシン阻害活性の酵素反応学的解析

上記酵母リコンビナント蛋白産生系の培養上清から、SP セファロースカラムを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー、及び逆相 HPLC (2回) によって N34S リコンビナント蛋白を精製した (表1)。この N34S リコンビナント蛋白、および wild type のリコンビナント PSTI の、ヒト及びウシトリプシンに対する抑制活性を、酵素反応学的に解析した。

3) N34S リコンビナント蛋白のトリプシン結合能の解析

二つの物質間のアフィニティーを、最も精密に解析することが可能な surface-plasmon-resonance (SPR) biosensor を用いて、リコンビナント蛋白 (N34S, wild type) とトリプシン (ヒト, ウシ) との結合アフィニティーを解析した。SPR biosensor は、センサーチップに固定した分子とその表面に添加されたもう一つの分子の結合と解離に伴って生じる表面プラズモン共鳴の解析によって、二つの物質間の結合と解離の度合い、すなわちアフィニティーを解析する。

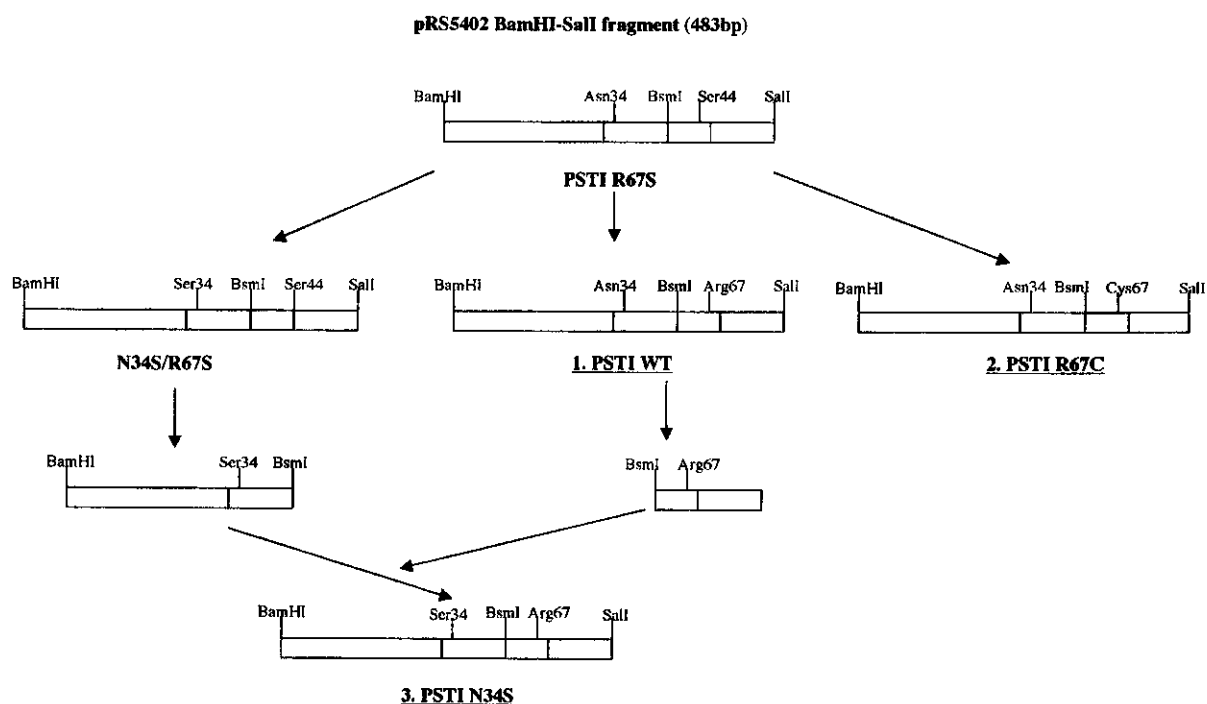


図2. site-directed mutagenesis の手法を用いたリコンビナント PSTI 蛋白の作成

表 1. PSTI リコンビナント蛋白の精製過程

A. wild type

	PSTI 濃度 (mg/ml)	volume (ml)	PSTI 量 (mg)	recovery (%)
培養上清	0.12	680.0	78.4	100.0
SP-Sepharosw fast flow	1.71	34.0	58.2	74.2
硫安塩析 (75%飽和)	11.90	4.6	54.8	69.8
RP-HPLC	0.97	13.6	13.2	16.8

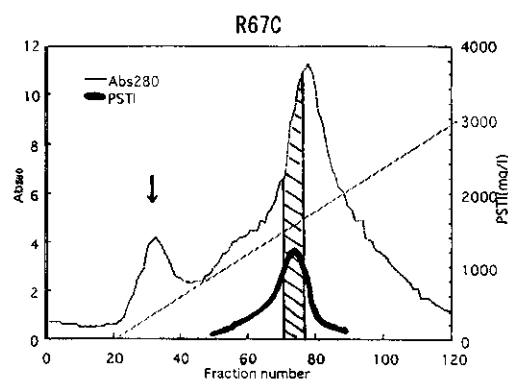
B. N34S

	PSTI 濃度 (mg/ml)	volume (ml)	PSTI 量 (mg)	recovery (%)
培養上清	0.12	1370.0	163.3	100.0
SP-Sepharosw fast flow	0.78	144.0	112.4	68.8
硫安塩析 (75%飽和)	9.13	10.7	97.7	59.8
RP-HPLC	0.80	17.0	13.6	8.3

C. R67C

	PSTI 濃度 (mg/ml)	volume (ml)	PSTI 量 (mg)	recovery (%)
培養上清	0.09	1325.0	114.6	100.0
SP-Sepharosw fast flow	0.34	178.5	51.3	53.5
硫安塩析 (75%飽和)	2.87	20.2	57.9	50.6
RP-HPLC	0.41	8.5	3.5	3.0

Cation Exchange Chromatography



Reversed Phase-HPLC

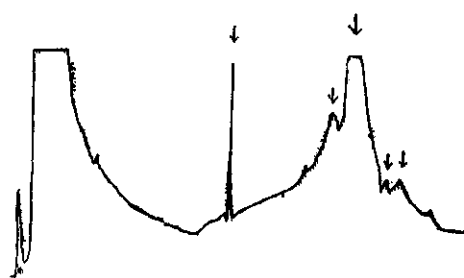


図3. R67C リコンビナント蛋白の精製過程

トリプシン（ヒト，ウシ）を，アミンカップリング法を用いてセンサーチップに固定化した後，100 nM の N34S，及び wild type のリコンビナント蛋白を添加して，分子間のアフィニティーを解析した。

4) R67C リコンビナント蛋白の活性解析

図2で示したリコンビナント蛋白の産生系を用いてR67Cリコンビナント蛋白を産生した。HPLC上多くのピークを認め，多種類の分子型を生じたことが示唆された（図3）。いずれのピークも抗 PSTI（wild type）抗体と反応を認めなかったため，トリプシン阻害活性を指標にして，活性を示した一分画を精製した。同分画を用いて，酵素反応学的解析，トリプシン結合能の解析を行った。

Ⅲ. 結 果

1. N34S リコンビナント蛋白のトリプシン阻害活性の酵素反応学的解析

PSTI とトリプシンのモル比を変化させて，溶液中の残存トリプシン活性を測定した。PSTI の量が増えるにつれて，残存トリプシン活性は低下したが，その低下度には N34S と wild type 間で差異を認めなかった（図4）。

この他，反応系の pH，トリプシンの種（ヒトトリプシン，及びウシトリプシン），Ca 濃度，トリプシンと PSTI の preincubation time（PSTI のトリプシン感受性の変化の検索）を変化させて解析したが，いずれの実験系においても N34S と wild type 間に差異は認めなかった¹²⁾。

2. N34S リコンビナント蛋白のトリプシン結合能の解析

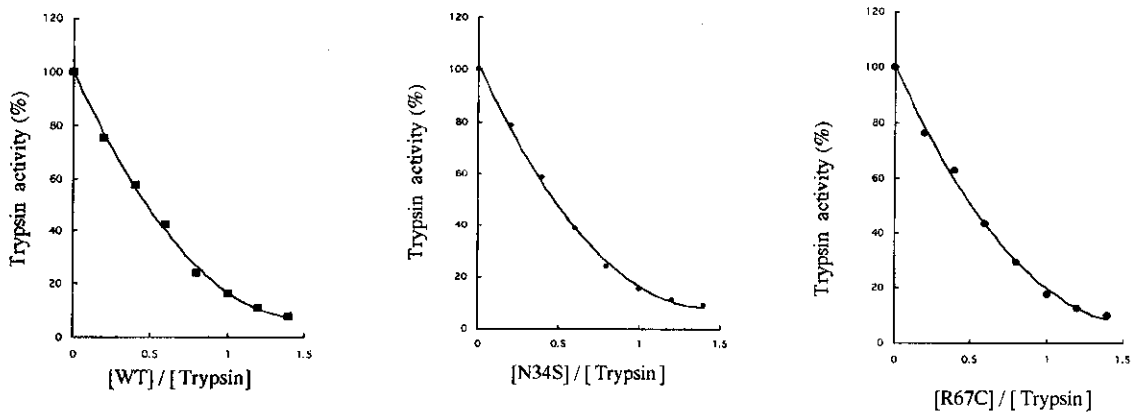


図 4. リコンビナント蛋白のトリプシン阻害活性の比較

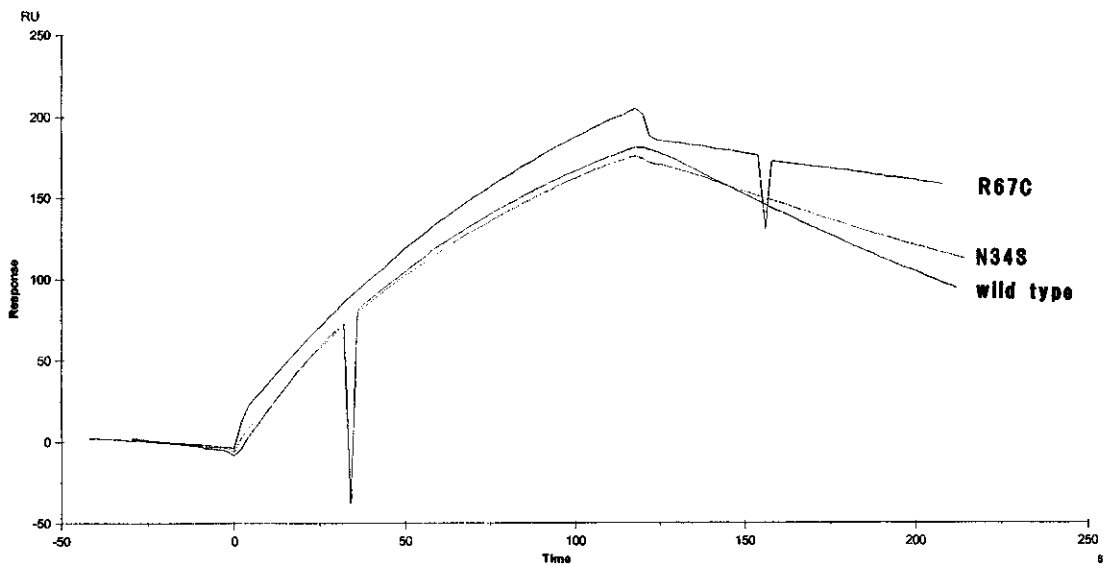


図 5. リコンビナント蛋白のトリプシン結合能の比較

図 5 に示すように、センサーに固定したトリプシンに対する PSTI 蛋白の結合の速度（グラフ上、response の速度がアフィニティーを表す）に N34S と wild type 間で差異を認めなかった。一方、解離の速度は wild type に比して N34S がいくぶん遅かった。結合、解離のいずれの結果とも N34S が wild type に比してトリプシンとのアフィニティーが低下しているとの結果ではなかった。

3. R67C リコンビナント蛋白の活性解析

トリプシン阻害活性を指標に精製した R67C の一分画は、ヒトトリプシン、ウシトリプシンのいずれに対しても、wild type と同等の阻害活性を保持していた（図 4, 5）。N34S と同様に、pH や Ca 濃度を変化させても wild type との間に差異は認めなかった。トリプシンに対する感受性にも変化は認めなかった。

SPR biosensor を用いたトリプシンとのアフィニティーにおいても wild type との間に差異は認めなかった。

Ⅳ. 考 察

われわれの解析¹³⁾ とほぼ同時期に、欧米でも慢性膵炎症例における *PSTI* 遺伝子の変異解析が行われた¹⁴⁻¹⁶⁾。結果を集計すると、N34S 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) この変異は非膵炎発症者に比して、明らかに膵炎症例に高頻度に認めること (表 2)、2) N34S の変異を両アレルに持つ場合 (N34S homozygote) の発症率が非常に高いこと (表 3)、などで

表 2. *PSTI* 遺伝子変異の頻度に関するこれまでの報告の集計

	膵炎発症者								膵炎非発症者	
	Kuwata Japan 13/19)	Witt Germany 14)	Pfulzer USA 15)	Chen France 16)	Kaneko Japan 20)	Rossi Bangladesh 21)	Plendl Germany 22)	Ockenga Germany 23)	計	計
Exon の変異										
-53C>T	0/116	1/192	0/224	0/374	0/64	0/24	-	0/40	1/1034 (0.1%)	0/764 (0%)
MIT	0/116	1/192	0/224	0/374	0/64	0/24	-	0/40	1/1034 (0.1%)	0/838 (0%)
L14P	0/116	1/192	0/224	0/374	0/64	0/24	-	0/40	1/1034 (0.1%)	0/838 (0%)
N34S	9/116	24/192	36/224	17/374	3/64	5/24	7/42	2/40	103/1076 (9.6%)	11/1522 (0.7%)
E50E	0/116	0/192	1/224	0/374	0/64	0/24	-	0/40	1/1034 (0.1%)	0/1028 (0%)
P55S	0/116	0/192	2/224	1/374	0/64	0/24	-	0/40	3/1034 (0.3%)	5/1028 (0.5%)
R65Q	0/116	0/192	0/224	0/374	0/64	0/24	-	1/40	1/1034 (0.1%)	0/1028 (0%)
R67C	1/116	0/192	0/224	0/374	0/64	0/24	-	0/40	1/1034 (0.1%)	2/838 (0.2%)
272C>T	6/116	6/192	9/224	0/374	5/64	4/24	-	0/40	30/1034 (3.0%)	28/838 (3.3%)
Intron の変異										
-253T>C	n.d.	-	-	-	6/64	-	-	-	6/64 (9.4%)	10/64 (15.6%)
-215G>A	n.d.	-	-	-	4/64	-	-	-	4/64 (6.3%)	0/234 (0%)
IVS1-37D>C	9/116	24/192	n.d.	17/374	-	5/24	-	-	55/706 (7.8%)	8/1038 (0.8%)
IVS3+2T>C	0/116	1/192	3/224	0/374	-	1/24	-	-	5/930 (0.5%)	0/590 (0%)
IVS3+125C>A	n.d.	n.d.	1/224	n.d.	-	-	-	-	1/224 (0.5%)	0/380 (0%)
IVS3+184T>A	n.d.	n.d.	5/224	n.d.	-	-	-	-	5/224 (2.2%)	0/380 (0%)
IVS3-69	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
InsTTTT	9/116	24/192	n.d.	17/374	-	5/24	-	-	55/706 (7.8%)	8/1038 (0.8%)

表中分数は変異を有する allele 数/検査した allele 数を示す。

表 3. N34S とトリプシノーゲンの遺伝子変異における膵炎発症率の比較

	<i>PSTI</i> N34S	cationic trypsinogen
Heterozygote	1% 以下*	80% ¹⁸⁾
Homozygote	95% ^{**,***}	—
Compound Heterozygote	67% ^{****}	—

*: 健常人における変異頻度 0.8% と特発性慢性膵炎の発症頻度 0.007% の比較から¹⁴⁾、** : 報告例の集計より (21 症例中 20 例で発症)、*** : 健常人における変異頻度 0.002% と特発性慢性膵炎の頻度 0.007% との比較においても矛盾しない、**** : 報告例の集計より (6 症例中 4 例で発症)。

ある。しかし、N34S リコンビナント蛋白は、トリプシン活性の阻害能もトリプシンへのアフィニティーのいずれも wild type に比して低下を認めなかった。

N34S 変異は、必ずエクソン近傍のイントロン領域に IVS 3-69insTTTT 変異 (T 5 が T 9 となる) と IVS 1-37T > C 変異を伴っており、単純なアミノ酸置換の影響ではなく、スプライシングの異常によって PSTI 蛋白の機能低下をきたす可能性がある。特にイントロンの polypyrimidine tract は、nuclear pre-mRNA のスプライシングに重要であることが報告されており¹⁷⁾、IVS 3-69insTTTT 変異などイントロンの変異により、エクソンの一部がアミノ酸へ翻訳されなければ (splice out)、PSTI 蛋白の高次構造が変化し、易膵炎発症形質へとつながる可能性がある。

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 6.5 kD 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⁵⁾。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 変異では、システイン残基数が 6 から 7 へと増加することによって、変異 PSTI 同士のダイマーの形成、他の蛋白との混合ジスルフィド形成などによって、多くの分子型が形成されうると考えられる。また、新たに生じたシステイン残基が他の分子内システイン残基と新たなジスルフィド結合を形成する可能性もある (表 4)。いずれの機構によっても、R67C 変異によって PSTI の高次機構が大きく変わり、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。R67C リコンビナント変異 PSTI 蛋白は抗 PSTI 抗体との反応性が大きく低下しており、R67C リコンビナント蛋白は、高次構造が著しく変化しているものと考えられる。また、今回の精製系では、トリプシン阻害活性を指標として R67C リコンビナント蛋白を精製したため、精製蛋白がトリプシン阻害活性を保持していたことは当然とも考えられる。実際、精製過程で用いた HPLC 上には多くのピークが出現していることからこの可能性が示唆される。今回の

表 4. R67C の予想される分子型

① PSTI- ⁶⁷ Cys-SH	
② PSTI- ⁶⁷ Cys-S-S- ⁶⁷ Cys-PSTI	: ホモダイマー
③ PSTI- ⁶⁷ Cys-S-S-蛋白	: 他の蛋白 (albumin など) との混合ジスルフィド形成
④ PSTI- ⁶⁷ Cys-S-S-X	: 低分子チオール (glutathione など) との混合ジスルフィド形成
⑤ PSTI- ⁶⁷ Cys-SO _x ⁻	
⑥ PSTI- ⁶⁷ Cys-S-X	
S	
/ \	
⑦ PSTI- ⁶⁷ Cys-S	: 分子内 S-S 結合の再構成
SH	

解析は、多くの R67C 分子型のうちのトリプシン阻害活性を保持した一種だけを解析したにすぎないと言える。

以上のように、N34S (IVS 1-37T > C + N34S + IVS 3-69insTTTT 変異), R67C の両者とも、PSTI 蛋白の高次構造を変化させ、活性を低下させる可能性がある。Witt¹⁴⁾ が報告している 5'UTR の-53C > T 変異 (新たな start codon と stop codon を生じる) や M 1 T 変異 (start codon が消失する) の場合も、そのアレルからは PSTI 蛋白は産生されない。したがって、PSTI の遺伝子変異は PSTI 蛋白の loss of function によって、トリプシン活性の制御に異常をきたし、膵炎を発症する可能性があるといえる。今後、トリプシン阻害活性が消失した R67C 変異リコンビナント蛋白の精製、N34S 変異 PSTI mRNA の発現解析、PSTI 遺伝子のノックアウトマウスを用いた解析、などによる確認が必要である。

カチオニックトリプシノーゲンの遺伝子変異が dominant trait で発症するという事は、カチオニックトリプシノーゲンの autoactivation と PSTI function とのバランスは、正常状態では、おそらく PSTI function の方がある程度は大きいものの、大きな差 (余裕) が無いために、カチオニックトリプシノーゲンの autoactivation の亢進や PSTI 活性の低下の影響によって、膵炎の易発症形質が発現されるものと考えられる。PSTI N34S (IVS1-37T > C + N34S + IVS 3-69insTTTT) homozygote における高い発症率は、膵炎発症の閾値が homozygous な N34S (IVS1-37T > C + N34S + IVS 3-69insTTTT) 変異によって大きく低下していることを意味する。すなわち、PSTI 蛋白の機能低下の程度に応じて膵炎の発症のしやすさが決まると考えられる。

参 考 文 献

- 1) Gebhard W, Tschesche 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, Ragueneas 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, Gabbazadeh D, Furey W, Gates LK Jr, 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, Horii T, Miyazaki S, Shin N, Takimoto N, Tsurata Y, Tamaki M, Teraoka H, Yoshida N. Production of recombinant human pancreatic secretory trypsin inhibitor by *Escherichia coli*. J Biochem 1987; 102

: 607-12.

- 11) Kikuchi N, Nagata K, Shin N, Mitsushima K, Teraoka H, Yoshida N. Site-directed mutagenesis of human pancreatic secretory trypsin inhibitor. *J Biochem* 1989 ; 106 : 1059-63.
- 12) Kuwata K, Hirota M, Shimizu H, Nakae M, Nishihara S, Takimoto A, Mitsushima K, Kikuchi N, Endo K, Inoue M, Ogawa M. Functional analysis of recombinant pancreatic secretory trypsin inhibitor protein with amino acid substitution. *J Gastroenterol* 2002 (in press).
- 13) Kuwata K, Hirota M, Sugita H, Kai M, Hayashi N, Nakamura M, Matsuura T, Adachi N, Nishimori I, Ogawa M. Genetic mutations in exons 3 and 4 of the pancreatic secretory trypsin inhibitor in patients with pancreatitis. *J Gastroenterol* 2001 ; 36 : 612-8.
- 14) Witt H, Luck W, Hennies HC, Classen M, Kage A, Lass U, Landt O, Becker M. Mutations in the gene encoding the serine protease inhibitor, Kazal type 1 are associated with chronic pancreatitis. *Nature Genet* 2000 ; 25 : 213-6.
- 15) Pfützer RH, Barmade MM, Brunskill APJ, Finch R, Hart PS, Neoptolemos J, Furey WF, Whitcomb DC. *SPINK1/PSTI* polymorphisms act as disease modifiers in familial and idiopathic chronic pancreatitis. *Gastroenterology* 2000 ; 119 : 615-23.
- 16) Chen JM, Mercier B, Audrenet MP, Ragueneas O, Quere I, Ferec C. Mutations of the pancreatic secretory trypsin inhibitor (*PSTI*) gene in idiopathic chronic pancreatitis. *Gastroenterology* 2000 ; 120 : 1061-2.
- 17) Chu CS, Trapnell BC, Curristin S, Cutting GR, Crystal RG. Genetic basis of variable exon 9 skipping in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mRNA. *Nature Genetics* 1993 ; 3 : 151-6.
- 18) Whitcomb DC. Genetic predispositions to acute and chronic pancreatitis. *Med Clin North Am* 2000 ; 84 : 531-47.
- 19) Kuwata K, Hirota M, Nishimori I, Otsuki M, Ogawa M. Mutational analysis of the pancreatic secretory trypsin inhibitor (*PSTI*) gene in familial and juvenile pancreatitis in Japan. (submitted).
- 20) Kaneko K, Nagasaki T, Furukawa T, Mizutamari H, Masamune A, Shimosegawa T, Horii A. Analysis of the human pancreatic secretory trypsin inhibitor (*PSTI*) gene mutations in Japanese patients with chronic pancreatitis. *J Hum Genet* 2001 ; 46 : 293-7.
- 21) Rossi L, Pfützer RH, Parvin S, Ali L, Sattar S, Kahn AKA, Gyr N, Whitcomb DC. *SPINK1/PSTI* mutations are associated with tropical pancreatitis in Bangladesh. *Pancreatology* 2001 ; 1 : 242-5.
- 22) Plendl H, Siebert R, Steinemann D, Grote W. High frequency of the N34S mutation in the *SPINK1* gene in chronic pancreatitis detected by a new PCR-RFLP assay. *Am J Med Genet* 2001 ; 100 : 252-3.
- 23) Ockenga J, Dork T, Stuhmann M. Low prevalence of *SPINK1* gene mutations in adults patients with chronic idiopathic pancreatitis. *J Med Genet* 2001 ; 38 : 243-4.

慢性膵炎モデルラットの膵線維化における 細胞外基質分解因子の検討

研究報告者 大 槻 眞

産業医科大学第三内科

共同研究者 木 原 康 之 山 口 泰 三 吉 川 裕 之

中 村 早 人

要旨：膵線維化は細胞外基質の産生と分解の不均衡により惹起される。細胞外基質の分解には細胞外基質分解酵素（MMP）および細胞外基質分解酵素阻害因子（TIMP）が関与している。本研究では膵線維化が持続する OLETF ラットを用いて膵線維化における MMP, TIMP および MMP 活性化因子の発現について検討した。OLETF ラットでは20週齢から膵ラ島内およびラ島周囲に、30週齢以後ラ島および tubular complex の基底膜に type IV collagen 蛋白が認められた。OLETF ラットの TIMP-2 mRNA の発現は20週齢より LETO ラットに比し有意に増加し、30週齢で最大となった。膜型 MMP (MT 1-MMP) mRNA の発現は50週齢まで LETO ラットと同レベルで発現の増加がみられなかった。MMP-2 mRNA の発現は20週齢より LETO ラットに比し増加し、30週齢で最大となった。40週齢以後漸減したが、LETO ラットに比し有意に高値であった。OLETF ラットの MMP-2 活性化蛋白は50週齢まで発現が認められなかった。MMP-2 および TIMP-2 mRNA の発現は認められたが、MT 1-MMP mRNA の発現がみられず、活性型 MMP-2 蛋白の発現も認められなかったことから、潜在型 MMP-2 が MT 1-MMP により活性化されず、産生された細胞外基質の分解が抑制され、膵の線維化が持続する可能性が示唆された。

目 的

膵線維化は細胞外基質の産生と分解の不均衡により惹起される。細胞外基質の産生には TGF- β_1 が重要な役割を果たしているが¹⁾、細胞外基質の分解には細胞外基質分解酵素 matrix metalloproteinase (MMP) および細胞外基質分解酵素阻害因子 (TIMP) が関与している。ヒトの慢性膵炎では MMP-2 および TIMP-2 の mRNA の発現の増加がみられ²⁾、ラットセルレイン膵炎では MMP-2, MMP-3 および MMP-9 の mRNA の発現および活性の増加が認められる³⁾。オレイン酸膵管内注入膵炎モデルラットでは膵の線維化が認められるが、線維化は一過性で、膵実質は脂肪置換される⁴⁾。一方、Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) ラットでは膵ランゲルハンス島（膵ラ島）および膵外分泌腺の線維化が持続する⁵⁾。オレイン酸膵管内注入膵炎モデルラットでは膵炎作製早期より TGF- β_1 mRNA 発現に一致して MMP-2 および TIMP-2 mRNA の発現が認められることから、MMP あるいは TIMP が膵における細胞外基質の分解に主要な役割を果たしている可能性が示唆される⁴⁾。本研究では膵線維化が持続する OLETF ラットを用いて膵線維化における細胞外基質分解酵素および細胞外基質分解酵素阻害因子の発現について検討した。

方 法

OLETF 雄性ラットを10週, 20週, 30週, 40週, 50週齢にベントバルビタール麻酔下に開腹し, 膵を摘出し, AGPC法を用いてRNAを抽出した。対照として同週齢の Long-Evans Tokushima Otsuka (LETO) ラットを用いた。MMP-2, membrane type-1 MMP (MT 1-MMP) および TIMP-2 mRNA の発現を Northern blot 法を用いて検討した。各測定点における mRNA の発現量をインターナルマーカーである 7S RNA の発現量で補正した。Type IV collagen 蛋白をラットモノクローナル抗体を用いて免疫組織学的に, MMP-2 蛋白をラットモノクローナル抗体を用いて Western blot 法を用いて検討した。

結 果

OLETF ラットでは20週齢から膵ラ島内およびラ島周囲に, 30週齢以後ラ島および tubular complex の基底膜に type IV collagen 蛋白が認められた (図1)。

OLETF ラットの TIMP-2 mRNA の発現は10週齢では LETO ラットと有意差はなかったが, 20週齢より LETO ラットに比し有為に増加し, 30週齢で最大となった (図2 A)。MT 1-MMP mRNA の発現は50週齢まで LETO ラットと同レベルで発現の増加がみられなかった (図2 B)。MMP-2 mRNA の発現は10週齢では LETO ラットと同レベルであったが, 20週齢より LETO ラットに比し増加し, 30週齢で最大となった。40週齢以後漸減したが, LETO ラットに比し有意に高値であった (図2 C)。一方, OLETF ラットの MMP-2 活性化蛋白は50週齢まで発現が認められなかった。

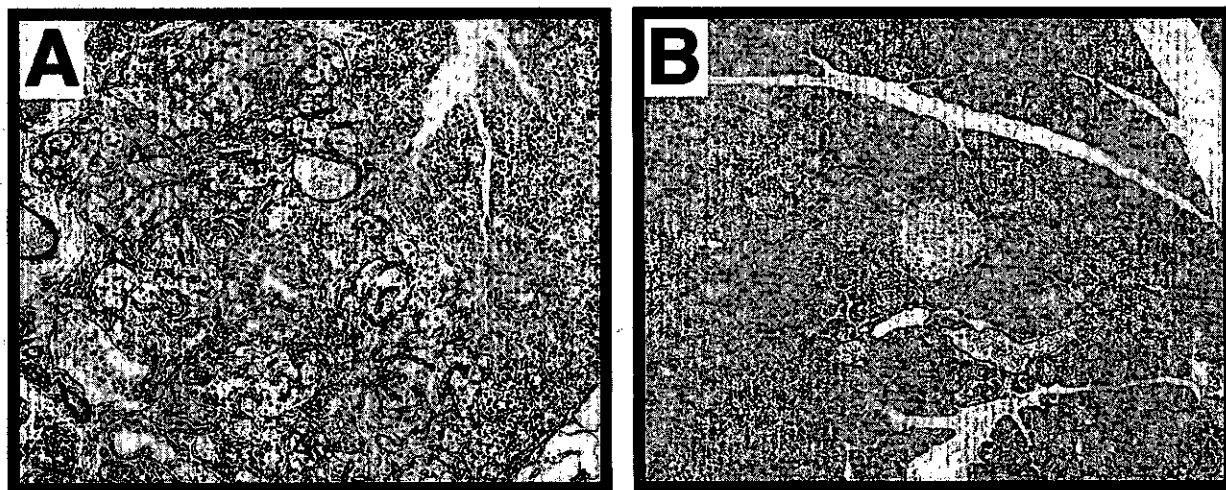


図1. OLETF ラットの膵臓の免疫組織染色

A : 50週齢の OLETF ラット : 4型コラーゲン

B : 50週齢の LETO ラット : 4型コラーゲン

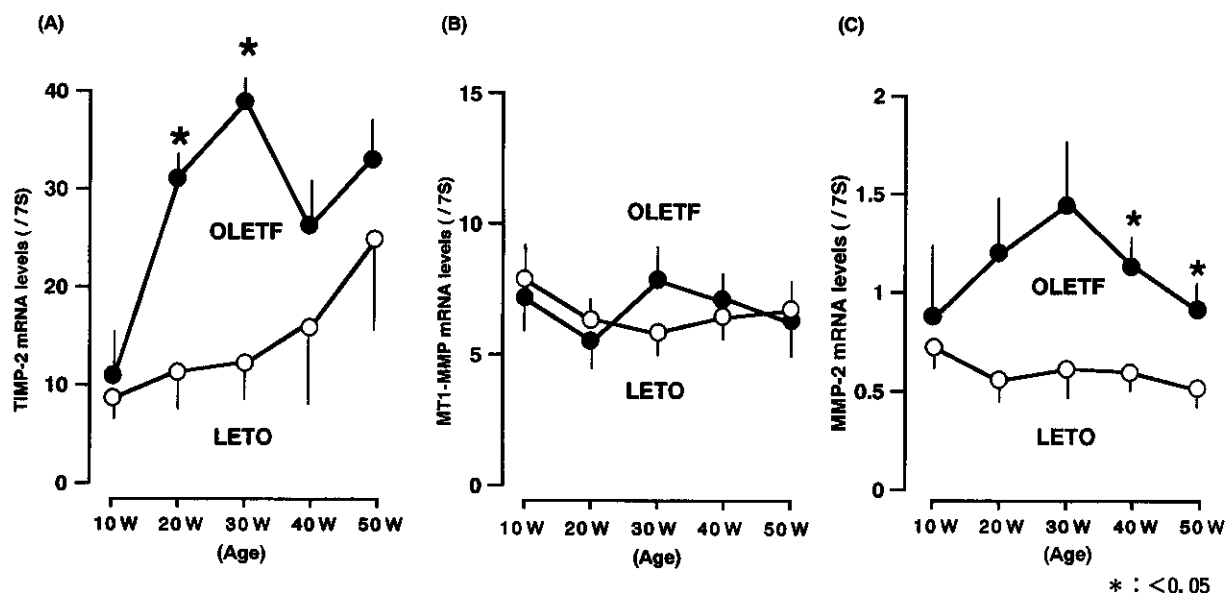


図2. OLETF ラットにおける TIMP-2(A), MT1-MMP (B) および MMP-2(C) mRNA の発現の経時的变化。発現量を BAS2000 (富士フィルム社製) で解析し, 7S の発現量で補正した。
* : P < 0.05 VS 同齡期の LETO

考 察

MMPs は細胞外基質を分解するプロテアーゼのひとつで, 種々の細胞から潜在型酵素として分泌され, 細胞外で p-aminophenylmercuric acetate あるいはセリンプロテアーゼにより活性化されるが, 潜在型 MMP-2 はセリンプロテアーゼでは活性化されず, MT1-MMP により活性化される^{6,7)}。さらに, MT1-MMP は TIMP-2 の受容体として作用することから, TIMP-2 が潜在型 MMP-2 の活性に重要な役割を果たしていることが報告されている⁸⁾。

膵線維化が一過性であるオレイン酸膵管内注入膵炎モデルラットでは MT1-MMP, TIMP-2 および MMP-2 mRNA の発現および MT1-MMP 蛋白, 活性型 MMP-2 蛋白の発現の増加が膵炎発症早期より認められ, 膵の膠原線維が消失する時期まで持続する⁴⁾。一方, 50週齢まで膵線維化が持続する OLETF ラットでは, MMP-2 および TIMP-2 mRNA の発現は LETO ラットに比し増加したが, MT1-MMP mRNA の発現は認められず, 活性型 MMP-2 蛋白の発現が認められなかったことから, 潜在型 MMP-2 が MT1-MMP により活性化されず, 産生された細胞外基質の分解が抑制され, 膵の線維化が持続したと考えられた。潜在型 MMPs が活性化されず, 細胞外基質の分解が低下することで細胞外基質の産生と分解の不均衡が生じ, 膵線維化が惹起される可能性が示唆された。

参 考 文 献

- 1) Kihara Y, Tashiro M, Nakamura H, Yamaguchi T, Yoshikawa H, Otsuki M. Role of TGF- β_1 , extracellular matrix, and matrix metalloproteinase in the healing process of the pancreas after induction of acute necrotizing pancreatitis using arginine in rats. *Pancreas* 2001 ; 23 : 288-95.
- 2) Gress TM, Müller-Pillasch F, Lerch MM, Friess H, Bühler M, Berger HG, Adler G. Balance of expression of genes coding for extracellular matrix proteins and extracellular matrix degrading proteases in chronic pancreatitis. *Z Gastroenterol* 1994 ; 32 : 221-5.
- 3) Müller-Pillasch F, Gress TM, Yamaguchi H, Geng M, Adler G, Menke A. The influence of transforming growth factor β_1 on the expression of genes coding for matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases during regeneration from cerulein-induced pancreatitis. *Pancreas* 1997 ; 15 : 168-75.
- 4) Yamaguchi T, Nakamura H, Kihara Y, Taguchi M, Yoshikawa H, Otsuki M. Long-term overexpression of membrane-type 1 matrix metalloproteinase and matrix metalloproteinase-2 in oleic acid-induced pancreatitis in rats. *Pancreas* 2002 ; 24 : 348-56.
- 5) Yoshikawa H, Kihara Y, Taguchi M, Yamaguchi T, Nakamura H, Otsuki M. Role of TGF- β_1 in the development of pancreatic fibrosis in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats. *Am J Physiol* 2002 ; 282 : G549-58.
- 6) 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.
- 7) Cao J, Sato H, Takino T, Seiki M. The C-terminal region of membrane type matrix metalloproteinase is a functional transmembrane domain required for pro-gelatinase A activation. *J Biol Chem* 1995 ; 270 : 801-5.
- 8) Strongin AY, Collier I, Bannikov G, Marmer BL, Grant GA, Goldberg GL. Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. *J Biol Chem*. 1995 ; 270 : 5331-8.