

H. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 竹田昌弘, 白鳥敬子, 林 直諒, 小田桐恵美, 高崎 健. 便中エラスターゼ1測定を中心とした膵外分泌機能検査の評価. 臨床病理 2002; 50: 893-8.

2. 学会発表

- 1) Shiratori K, Shimizu K, Takayama Y, Imaizumi T, Takeda M, Hayashi N, Takasaki K. Clinical evaluation of fecal elastase-1 determination in the diagnosis of pancreatic dysfunction. The Joint Meeting of European Pancreatic Club and International Association of Pancreatology. Heidelberg June 19-22, 2002

1. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし

慢性膵炎における CCN family の役割に関する研究

研究協力者 石井 裕正 慶應義塾大学医学部消化器内科 教授

【研究要旨】

CCN family は線維化、細胞増殖、器官形成などに関与することが知られている。そこで慢性膵炎における CCN family の関与を明らかにする目的で、慢性膵刺激モデルである慢性エタノール投与ラットおよび四塩化炭素(CCl₄)長期投与ラットの膵における、connective tissue growth factor (CTGF)、cysteine-rich protein 61 (Cyr61)、nephroblastoma overexpressed (Nov) の発現と分布の変化を組織化学的に検討した。健常膵では、CTGF および Nov は血管平滑筋およびラ氏島に認められ、Nov はさらに膵管上皮細胞、腺房中心細胞にも認められたが、Cyr61 は認められなかった。CCl₄投与ラット膵では CTGF および Nov とともに染色性の低下を認め、膵内陽性部位も減少していた。一方、エタノール投与ラット膵では CTGF および Nov の染色性および陽性部位が対照液体飼料群に比し増加していた。以上より、CTGF および Nov が膵に発現し、慢性刺激の違いにより増減することから、膵傷害の程度によって発現が変化することが示唆された。

共同研究者

秋葉保忠

(慶應義塾大学医学部消化器内科)

A. 研究目的

慢性膵炎の成因、線維化の機序については、未だ不明な点が多い。近年、線維芽細胞活性化の研究から同定された、connective tissue growth factor (CTGF)、cysteine-rich protein 61 (Cyr61)、nephroblastoma overexpressed (Nov) は CCN family と呼ばれ、増殖因子としてだけでなく線維化、血管新生や器官発生にも関与することが明らかになりつつある。さらに硬変肝や傷害膵で発現が増加することが報告され、とくに CTGF の線維化への関与が指摘されている^{1,2}が、その分布や他の CCN については明らかでない。そこで、慢性膵炎における CCN family の関与を調べるため、慢性膵刺激モデルである慢性エタノール投与ラットおよび四塩化炭素長期投与ラットにおける CCN の膵内分布の変化を検討した。

B. 研究方法

動物の取り扱いには慶應義塾大学実験動物センターのガイドラインに準じ、同倫理委員会の承認を得て行った。等重量の Wistar 系雄性ラット(体重100-150g、Charles River 実験動物、東京)を対として、既報に従い慢性エタノール投与ラットを作成した³⁾。すなわち、蛋白質18%、脂質36%、炭水化物(dextrin)47%の総合栄養液体飼料(Liquid rat diet, Bio-

Serv®, Frenchtown, NJ, USA)を8週間投与した対照群および炭水化物のうち総カロリー⁴の36%までをエタノールで置換した等カロリー(1 kcal/ml)の液体飼料を8週間投与した慢性エタノール投与群を作成した。また、四塩化炭素長期投与群は四塩化炭素(CCl₄)1.5 ml/kg 週2回8週投与により作成した⁴⁾。健常群(control; n=3)、エタノール投与群(EtOH-fed; n=3)、対照液体飼料群(pair-fed; n=3)および CCl₄投与群(CCl₄-treated; n=3)の各々の膵組織を用いて組織化学的に検討を行った。

各膵組織を10%中性ホルマリン溶液に8時間浸漬固定し、paraffin 切片を作成し、間接抗体法を施行した。一次抗体は rabbit polyclonal 抗 CTGF (Torrey Pines Biolabs 社)、goat polyclonal 抗 Cyr61 (Santa Cruz 社)、rabbit polyclonal 抗 Nov (東京医科歯科大学口腔病理教室勝部先生より供与)および monoclonal 抗 α -smooth muscle actin (SMA) 抗体 (DAKO 社) を用いた。二次抗体は horseradish peroxidase 結合抗 rabbit-IgG、mouse-IgG もしくは goat-IgG 抗体を用い、diaminobenzidine tetrahydrochloride により発色した。観察は Nikon 光学顕微鏡を用い、CCD camera (浜松フォトニクス社、静岡)により撮像した。

C. 研究結果

1. 健常群膵における CCN の分布

健常膵においては、CTGF は血管平滑筋細胞およびラ氏島に認められ、膵管上皮には認められなかった(図 a)。一方、Nov は血管平滑筋細胞、ラ氏島だけでなく膵管上皮細胞や導管細胞、腺房中心細胞に認められた(図 c)。しかし Cyr61 は全く認められな

かった(図b)。また、SMAは細動静脈の血管平滑筋細胞に認められた(図d)。

2. CCl₄長期投与群の検討

CCl₄の8週投与により、肝は線維化、結節状になり肝硬変の所見であった⁴⁾。膵実質には明らかな変化

は認めないが、小動静脈平滑筋細胞の空胞化および肥厚が認められた。これら変性した平滑筋細胞においてはCTGF、NovおよびSMAの発現が多く認められた。しかしCTGF(図e)およびNov(図g)の膵実質内の発現は減弱し、細動静脈平滑筋を含め、陽性部位も減少していた。また、SMA陽性細動静脈も

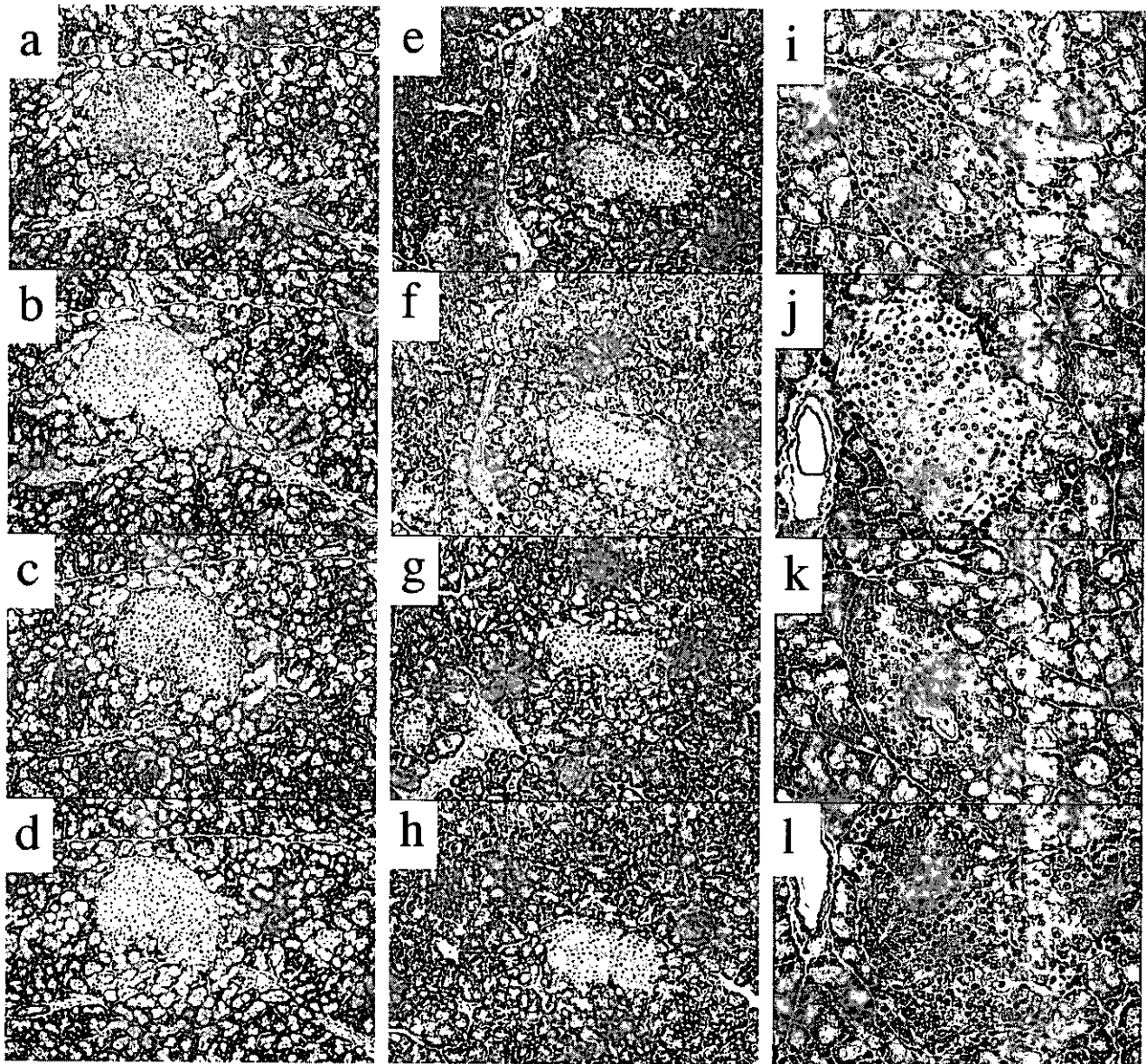


図1. ラット膵における connective tissue growth factor(CTGF)、cysteine-rich protein 61(Cyr61)、nephroblastoma overexpressed(Nov)および α -smooth muscle actin(SMA)の分布

- a-d: 健康膵においては、CTGFは血管平滑筋細胞およびラ氏島に認められ、膵管上皮には認められない(a)。Cyr61は全く認められない(b)。Novは血管平滑筋細胞、ラ氏島、膵管上皮細胞、導管細胞、腺房中心細胞に認められる(c)。SMAは細動静脈の血管平滑筋細胞に認められる(d)。倍率×200。
- e-f: CCl₄長期投与群の膵における発現。CTGF(e)およびNov(g)の発現は低下し、細動静脈平滑筋を含め陽性部位も減少している。また、SMA陽性細動静脈も減少している(h)。Cyr61は発現を認めない(f)。倍率×200。
- i-j: 慢性エタノール投与群の膵における発現。対照群(i)に比しエタノール群(j)ではCTGFの発現の増強と陽性部位の増加が認められる。Novについても対照群(k)に比し、エタノール群(l)で発現および陽性部位の増加を認め、とくにラ氏島および膵管上皮の発現が増強している。倍率×400。

減少していた(図h)。ここでもCyr61は認められなかった(図f)。

3. 慢性エタノール投与群の検討

EtOHの8週投与により、肝は脂肪化を呈し脂肪肝の所見であった⁴⁾。腓実質には明らかな変化は認めないが、腓管の拡張、腓小葉間隙の拡大が認められた。対照群(図i)に比しEtOH群(図j)ではCTGFの発現の増強と陽性部位の増加が認められた。さらにNovについても対照群(図k)に比し、EtOH群(図l)で発現および陽性部位の増加が認められた。とくにラ氏島および腓管上皮の発現が増強していた。対照群、EtOH群ともCyr61は認められず、SMAの発現についても変化を認めなかった。

D. 考察

CCN familyのうち、これまでCTGFについてはtransforming growth factor- β 1の刺激により早期に発現するimmediate-early geneの一つとして、特に線維化との関連で研究されてきている¹²⁾。また、Cyr61は血管内皮へのbasic fibroblast growth factor(bFGF)の作用を増強し、血管新生に関与すると考えられている⁵⁾。しかしNovについてはCTGFとは逆に抑制性増殖因子であると考えられているが、いまだその役割は明らかでない。これらCCN familyは発生段階の器官形成においても重要であることが知られており、増殖因子としてだけでなく、線維化、血管新生、傷害後のremodeling、さらにtumor genesisへの関与が想定されている。CTGFについては、ヒト硬変肝や慢性膵炎組織において発現の増加を認め、慢性炎症に伴う線維化の新しいmolecular targetと考えられている¹²⁾。以上のことから、慢性膵炎における線維化や細胞回転にCCN familyが関与することが想定される。

今回の検討から、CTGFおよびNovがともに腓実質に発現し、慢性膵刺激モデルにおいて異なる動態を示すことが明らかになった。CCL₄およびEtOH長期投与はいずれも腓実質に明らかな傷害は生じないが、前者では肝硬変となり腓小動静脈平滑筋や細動静脈平滑筋に空胞変性および肥厚をきたす。しかし後者では脂肪肝となり、やや腓が浮腫状に変化するものの他に明らかな変化を認めない。すなわち前者では線維化刺激が想定され、その際にはCTGFおよびNovの発現が減弱していた。また後者では慢性刺激によりCTGFおよびNovの発現が増強していた。以上のことから、刺激の強さにより、もしくは傷害の程度によりCTGFおよびNovの発現が変化した

と考えられた。また、この変化はSMAの増減とは関連しなかったことから、線維化そのものと関連したのではなく、細胞増殖など他の作用である可能性が考えられた。今後、発現蛋白量やmRNAの変化や腓線維化モデルを用いた検討が必要であると考えられた。また、両者がラ氏島の β 細胞領域にも発現しており、糖尿病モデルなどを用いた β 細胞の動態との関連を検討する必要があると考えられた。

E. 結論

CCN familyのうちCTGFおよびNovが腓に発現し、慢性刺激の違いにより増減することから、腓傷害の程度によって発現が変化することが示唆された。

F. 参考文献

- 1) Abou-Shady M, Friess H, Zimmermann A, di Mola FF, Guo X-Z, Baer HU, Bühler MW. Connective tissue growth factor in human liver cirrhosis. *Liver* 2000; 20: 296-304.
- 2) di Mola FF, Friess H, Martignoni ME, di Sebastiano P, Zimmermann A, Innocenti P, Graber H, Gold LI, Korc M, Bühler MW. Connective tissue growth factor is a regulator for fibrosis in human chronic pancreatitis. *Ann Surg* 1999; 230: 63-71.
- 3) Lieber CS, DeCarli LM. Quantitative relationship between amount of dietary fat and severity of alcoholic fatty liver. *Am J Clin Nutr* 1970; 23: 474-8.
- 4) 秋葉 保忠, 中村 正彦, 石井 裕正. 胃-肝-膵相関における一酸化窒素合成酵素および塩基性線維芽細胞増殖因子の関連. *肝臓* 1998; 63: 205-11.
- 5) Kolesnikova TV, Lau LF. Human CYR61-mediated enhancement of bFGF-induced DNA synthesis in human umbilical vein endothelial cells. *Oncogene* 1998; 16: 747-54.

G. 健康危険情報

該当なし

H. 研究発表

1. 論文発表 該当なし
2. 学会発表 該当なし

1. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし

膵腺房細胞増殖における connexin43 発現の動態解析に関する研究

研究協力者 片岡 慶正 京都府立医科大学第三内科 講師

【研究要旨】

我々は従来からラット膵腺房の増殖は腺房単位でおこっていることを報告してきたが、腺房新生におけるgap junction蛋白の局所発現についての考察はほとんどみられない。したがって、本年度は内因性CCK刺激という生理的条件における膵腺房細胞増殖刺激をかけ、新生した膵腺房におけるCx43の発現の多寡を解析することを主目的とした。今回の検討では、内因性CCK releaserとしてcamostatを投与すると一過性の腺房細胞増殖が起こり、その際に新生した膵腺房におけるCx43の発現の実測値は期待値に比し有意な低値となることをbinominal distributionを用いた微小確率にて明らかにした。すなわち、内因性CCKによって刺激をうけて増殖した新生膵腺房は、その誕生の初期にはGap junctionが未熟である可能性が示唆された。

共同研究者

阪上順一、金光大石、臼井憲子、高田龍介、
十亀義生、岡上 武
(京都府立医科大学第三内科)

A. 研究目的

コレシトキニン(CCK)はラット膵に対して栄養効果を有することが示されている¹⁾。しかし、膵腺房におけるGap junction蛋白の発現についてはほとんど検討されていない。そこで本年度は、内因性CCK releaserとしてcamostatの経口投与で膵trophismを惹起させ、それによって新生した膵腺房におけるconnexin 43蛋白(Cx43)の多寡を解析することを目的とした。

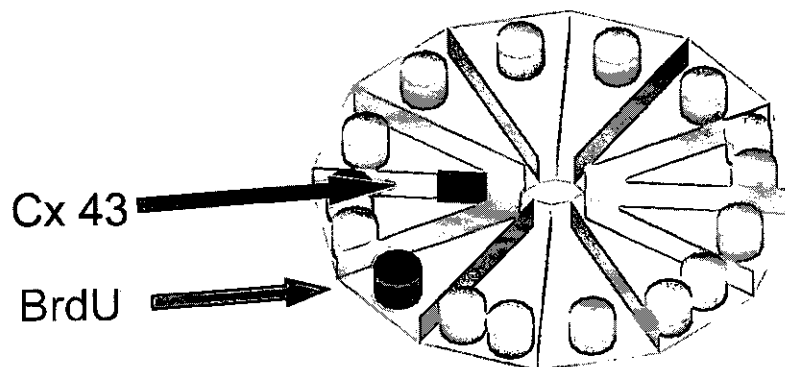
B. 研究方法

実験1；Wistar系雄性ラットにcamostat 50 mg/kg体重を単回経口投与し、ラット遊離膵腺房を用いたLiddle変法によるBioassayにてCCK bioactivityを測定した。測定時間は、0, 0.5, 1, 2, 3, 5, 9時間後とした。

実験2；Wistar系雄性ラットにcamostat 50 mg/kg体重を単回経口投与し、屠殺1時間前にBrdU 20 mg/kg体重を静脈内投与し、0, 0.5, 1, 2, 3, 5日後に犠死せしめた。膵湿重量・膵蛋白含量をLowry法にて、膵アミラーゼ含量をblue-dyed starch法にて、膵RNA含量をOrcinol法にて、膵DNA含量をDiphenylamine法にて測定した。組織学的検索として、BrdUをimmunogold silver stainにて、Cx43をimmunofluorescent stainにて実施

Null Hypothesis;

Acinar Cell Birth and Gap Junction Protein Expression Occurs at Random in the Same Acinus



■Binominal probability (P) was calculated as test for proportion of acini possessing both BrdU-labeled nuclei and Cx43 dots

図1 Cx43が発現したBrdU陽性核をもつ新生膵腺房のscheme。このような腺房がアトランダムに発生することを帰無仮説とした。

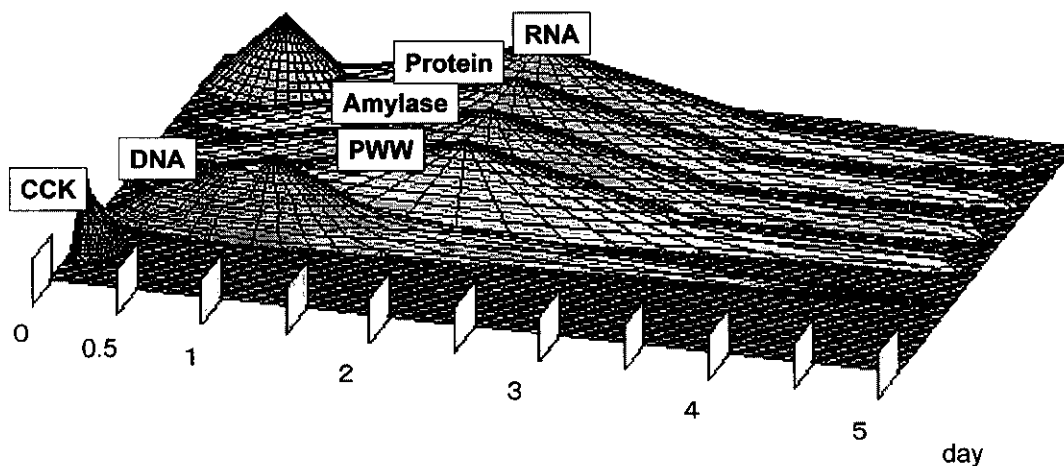


図2 Camostat投与後の膵trophismのscheme. RNA；膵RNA含量。Protein；膵蛋白含量、Amylase；膵アミラーゼ含量、PWW；膵湿重量、DNA；膵DNA含量、CCK；血漿CCK生物活性。

した。

実験3；実験1、2で判明したcamostat投与後の内因性CCKの上昇により腺房細胞増殖が盛んに起こる12時間後から36時間後の1日間にわたり、覚醒ラットにBrdUを4 mg/kg体重を持続静注し、36時間後に屠殺し実験に供した。膵を摘出し、4 μ m切片を作成し、BrdUとCx43の二重染色を実施し、腺房細胞を正確に把握するため、ヘマトキシリンで対染した。内因性CCK刺激で増殖した新生膵腺房におけるCx43の発現の多寡をみるために、BrdU陽性核をもつ腺房を新生膵腺房とみなし、新生膵腺房にCx43が発現することが、アトランダムにおこることを帰無仮説とした(図1)。この帰無仮説に対する検定はBinominal distributionを用いた。尚、実験動物の取り扱いに関し

表1 Cx43のdotとBrdU陽性核を併せ持つ腺房の期待値(α)と実測値(β)の比較

Number of acini	
Expected(α)	Observed(β)
6.803	2

n=6

Binominal probability α being less than $\beta = 0.03288$

てはthe Japan Council on Animal Careのガイドラインに従って行った。

C. 研究結果

生化学的データの推移を図2にまとめると、camostatの経口投与にて内因性CCKの一過性上昇が引き起こされ、膵RNA含量は12時間後と2日後の2峰性上昇をきたし、膵湿重量と膵アミラーゼ含量と膵蛋白含量は2日後に有意な上昇をきたした。さらに、膵DNA含量はそれらより先行して12時間後から2日後に上昇した。BrdUとCx43の二重染色における検討では(図3)、BrdU陽性核をもつ新生膵腺房にCx43のドットをもつ腺房数をカウントすると、Cx43のdotとBrdU陽性核を併せ持つ腺房の実測値は、その期待値に比し有意な低値をとることが判明した(表1)。

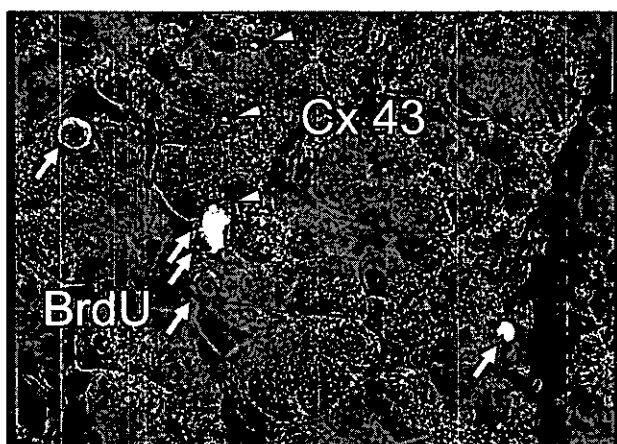


図3 BrdUとCx43の二重染色。矢印；BrdU陽性細胞核。矢頭；connexin 43のドット。

D. 考察

内因性CCK releaserとしてcamostatをラットに

経口投与させると一過性の腺房細胞増殖が起こる。また、その際に新生した膵腺房におけるCx43の発現の実測値は期待値に比し有意な低値をとることが、微少確率的に判明した。すなわち、内因性CCKによって刺激をうけて増殖した新生膵腺房は、その誕生の初期にはGap junctionが未熟である可能性があると考察する。以後は、増殖膵腺房のCx26やCx32などの発現動態²⁾を併せて解明していく予定である。

E. 結論

内因性CCKによって刺激をうけて増殖した新生膵腺房は、膵酵素含量の動態などから完成された細胞群が予想されたが、その誕生の初期にはcell-to-cell communicationに必要なgap junctionはいまだ未成熟である可能性が示唆された。

F. 参考文献

- 1) Oates PS, Morgan RG. Pancreatic growth after partial resection of normal and enlarged pancreas in rats fed soya flour. *Am J Physiol* 1988; 255: G670-5.
- 2) Meda P. Gap junction involvement in secretion: the pancreas experience. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1996; 23: 1053-7.

G. 健康危険情報

該当なし

H. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sakagami J, Kataoka K, Sogame Y, Usui N, Mitsuyoshi M. Ultrasonographic splancnic arterial flow measurement in severe acute pancreatitis. *Pancreas* 2002; 24: 357-64.
- 2) Osawa S, Kataoka K, Sakagami J, Sogame Y, Kawasaki C, Takaoka K, Yasuda H, Takatera A. Relationship between morphological changes in the main pancreatic duct and exocrine pancreatic function after a secretin test. *Pancreas* 2002; 25: 12-9.
- 3) Takaoka K, Kataoka K, Sakagami J. The effect of steroid pulse therapy in the development of acute pancreatitis induced by closed duodenal loop in rats. *J Gastroenterol* 2002; 37: 537-42.

- 4) Sogame Y, Kataoka K, Kato M, Sakagami J, Osawa S, Takatera A, Mitsuyoshi M, Usui N, Mitsui S, Yamaguchi N. Molecular cloning and characterization of chymopasin, a novel serine protease from rat pancreas. *Pancreas* 2002; 25: 378-86.

2. 学会発表

- 1) 阪上順一, 片岡慶正, 高田龍介, 金光大石, 白井憲子. 内因性CCK刺激による新生膵腺房のgap junction蛋白の多寡の解析. DDW-Japan2002 (合同プレナリーセッション) 横浜 2002年10月25日
- 2) 保田宏明, 加藤正人, 阪上順一, 片岡慶正, 加嶋 敬, M.M.Quellette. ヒト膵不死化細胞を用いた膵外分泌細胞への分化誘導の検討. 第44回日本消化器病学会大会 横浜 2002年10月25日

1. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし

ヒト膵腺房周囲筋線維芽細胞 hPFC における MMP 発現調節機構

分担研究者 丸山 勝也 国立療養所久里浜病院 副院長

【研究要旨】

ヒト膵腺房周囲筋線維芽細胞 (hPFC) における、マトリックスメタロプロテアーゼ (とくに MMP-1) の発現変化とその分子機構を検討した。MMP-1 発現はゼラチンザイモグラフィ、RT-PCR 分析、遺伝子レポーター活性で検討した。細胞運動能の検討は、1 型コラーゲンをコートしたトランスウエルアッセイで行った。IL-1 β は hPFC における MMP-1 発現を、遺伝子転写レベルで亢進させることが示唆された。また、低濃度の IL-1 β は hPFC の細胞運動能を亢進させることが示唆された。IL-1 β による MMP-1 の発現亢進と細胞運動能の亢進は、RhoA 蛋白の特異的阻害剤である C3-transferase によって抑制されなかったが、Rac1 によって抑制されることが示唆された。(次年度はさらに詳細なシグナル伝達経路の解析を行う予定である。これらの結果をふまえ今後慢性膵炎の新たな治療薬の開発に取り組みたい。)

共同研究者

朴沢重成

(東海大学医学部内科学系消化器内科学)

A. 研究目的

慢性膵炎の膵線維化過程においては、活性化した膵星細胞 (筋線維芽細胞) の関与が近年報告されている。慢性アルコール性膵炎患者の肝臓の組織学的検討により、活性化された星細胞のコラーゲン発現と脂質過酸化の関与が示された¹⁾。ラット膵星細胞を用いた研究では、Wilson らはエタノール添加が脂質過酸化を介し膵星細胞を活性化することを報告し²⁾、Masamune らは酸化ストレスを介し AP-1 や MAP kinases を活性化することによりコラーゲン産生を亢進させることを報告した³⁾。以上により、エタノールが直接膵線維化を刺激することが強く示唆された。慢性的なエタノールあるいはその代謝産物への暴露により、活性化された膵星細胞は酸化ストレスを介し、コラーゲン代謝のバランスを常に線維化進行の方向に傾けていると考えられる。

コラーゲン代謝はコラーゲン産生系と分解系によって調節を受けている。ラット膵星細胞におけるコラーゲン発現を検討した報告は散見されるが、膵星細胞におけるコラーゲン分解系の解析はほとんど行われていない。膵線維化組織の主な間質成分は 1 型あるいは 3 型コラーゲンであり、その分解にはヒトでは MMP-1 が主に関わる。

そこで本研究では、活性化されたヒト膵筋線維芽細胞のコラーゲン代謝にエタノールが直接関与するかどうかを検討するために、プレート上で長期間活

性化されたヒト膵腺房周囲筋線維芽細胞 (hPFC) にエタノールを添加し、マトリックスメタロプロテアーゼ (とくに、MMP-1) の発現変化とその分子機構を検討することを目的とした。本年度は、この *in vitro* 実験系が有効に機能するかどうかを検証するために、IL-1 β を用いてこれまで他細胞で報告されてきたような MMPs の発現変化をもたらすかどうかを検討した。

B. 研究方法

ヒト膵腺房周囲筋線維芽細胞株 hPFC は滋賀医科大学内科の馬場教授、新谷博士らより供与を受けた。

MMP-1 発現は、MMP-1 のタンパク発現をゼラチンザイモグラフィにより、遺伝子 (mRNA) 発現は RT-PCR 分析により、遺伝子転写活性はルシフェラーゼ遺伝子に連結した MMP-1 遺伝子プロモーター発現プラスミドを一過性発現し遺伝子レポーター活性を測定することにより、それぞれ検討した。細胞運動能の検討は、8-micrometer 径のポアをもつトランスウエルの上層に 1 型コラーゲンをコートしたチャンバーを作製し、24 時間後に上層から下層に移動した細胞を染色・算定することにより行った。

RhoA 蛋白の特異的阻害剤である C3-transferase 処理を行い、IL-1 β (5 ng/ml) 処理群とコントロール群間で MMP-1 蛋白の発現を、比較検討した。

本実験に用いたヒト膵腺房周囲筋線維芽細胞株 hPFC は、手術時の膵組織から単離培養したものである。本研究に単離された hPFC を細胞株として用いることは、術前に患者およびその家族の同意と承諾を得ている。

C. 研究結果

hPFCにおけるMMPsの蛋白および遺伝子発現検討によると、MMP-1、MMP-2、MMP-3、MT1-MMP、MT3-MMP、TIMP-1、TIMP-2の発現を認めたが、MMP-9の発現は非常に弱かった。この発現パターンは筋線維芽細胞化した活性化星細胞のそれに一致する。ゼラチンザイモグラフィ、RT-PCR分析、遺伝子プロモーター・レポーター活性によると、IL-1 β はhPFCにおけるMMP-1発現を蛋白レベル、mRNAレベル、遺伝子転写レベルで亢進させることが示唆された。

ゼラチンザイモグラフィによる検討によると、IL-1 β によって亢進したMMP-1蛋白発現は、C3-transferaseによって抑制されなかった。RT-PCR分析、遺伝子プロモーター・レポーター活性による検討によっても同様に、IL-1 β によって亢進したMMP-1遺伝子発現と遺伝子転写活性は、C3-transferaseによって抑制されなかった。一方、5 ng/mlのIL-1 β 処理によりhPFCの細胞運動能は有意に亢進したが、その亢進した細胞運動はC3-transferaseによって抑制されなかった。

D. 考察

今回の検討により、IL-1 β はhPFCにおけるMMP-1発現を蛋白レベル、mRNAレベル、遺伝子転写レベルで亢進させることが示唆された。また、低濃度のIL-1 β はhPFCの細胞運動能を亢進させることが示唆された。IL-1 β によるMMP-1の発現亢進と細胞運動能の亢進は、RhoA蛋白の特異的阻害剤であるC3-transferaseによって抑制されなかった。RhoA蛋白はRhoファミリーの一つであり、IL-1 β からMMP-1遺伝子転写と細胞運動能へのシグナル伝達経路におけるRhoファミリーの関与を否定するものではない。現在 preliminary dataながらRhoファミリーの一つであるRac1のdominant-negative mutantを強制発現させたアデノウイルスを感染させることにより、IL-1 β からMMP-1遺伝子転写と細胞運動能へのシグナル伝達経路が阻害されることが示唆されている(Hozawa S, 論文作成中)。Kheradmandらも滑膜細胞においてIL-1 β がRac1を介してコラゲナーゼ-1を亢進させることを報告しており⁴⁾、我々の実験結果を支持している。

現在、ヒト膵腺房周囲筋線維芽細胞hPFCに50 mMと100 mM濃度のアルコールを添加し、ゼラチンザイモグラフィによってMMP-1蛋白の発現をコントロール群と比較検討しており、preliminary dataながらいずれもコントロール群に比較しMMP-

1蛋白の発現は亢進することが示唆されている。C3-transferaseやNF- κ B阻害剤による処理を加え検討を行っているが、今年度の研究成果報告には提示できなかったため、次年度はさらに詳細なシグナル伝達経路の解析を行う予定である。これらの結果をふまえ今後慢性膵炎の新たな治療薬の開発に取り組みたい。

E. 結論

ヒト膵腺房周囲筋線維芽細胞hPFCにおいては、IL-1 β からMMP-1遺伝子転写と細胞運動能へのシグナル伝達経路がRhoA蛋白を介していないことが示唆された。Preliminary dataによるとこのシグナル伝達経路はRac1蛋白によって阻害されることが示唆された。以上の結果はヒト肝星細胞において我々が行った検討にほぼ結果が一致し、このhPFCを用いたin vitroシステムが活性化された星細胞の実験系として検討可能であることが示唆された。アルコール処理による膵星細胞内のシグナル伝達の解析による知見をもとに、慢性膵炎の新たな治療薬の開発が期待される。

F. 参考文献

- 1) Casini A, Galli A, Pignatelli P, Frulloni L, Grappone C, Milani S, Pederzoli P, Cavallini G, Surrenti C. Collagen type I synthesized by pancreatic periacinar stellate cells (PSC) co-localizes with lipid peroxidation-derived aldehydes in chronic alcoholic pancreatitis. *J Pathol* 2000; 192: 81-9.
- 2) Apte MV, Phillips PA, Fahmy RG, Darby SJ, Rodgers SC, McCaughan GW, Korsten MA, Pirola RC, Naidoo D, Wilson JS. Does alcohol directly stimulate pancreatic fibrogenesis? Studies with rat pancreatic stellate cells. *Gastroenterology* 2000; 118: 780-94.
- 3) Masamune A, Kikuta K, Satoh M, Satoh A, Shimosegawa T. Alcohol activates activator protein-1 and mitogen-activated protein kinases in rat pancreatic stellate cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 302: 36-42.
- 4) Kheradmand F, Werner E, Tremble P, Symons M, Werb Z. Role of Rac1 and oxygen radicals in collagenase-1 expression induced by cell shape change. *Science* 1998; 280: 898-902.

G. 健康危険情報

該当なし

H. 研究発表

1. 論文発表 該当なし

2. 学会発表 該当なし

I. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 該当なし

2. 実用新案登録 該当なし

3. その他 該当なし

新しい慢性膵炎モデルの作製

主任研究者 大槻 眞 産業医科大学第三内科 教授

【研究要旨】

軽度の膵管傷害に膵液うっ滞を加えることで慢性膵炎モデルが作製可能かを検討した。同時に膵管上皮細胞を裏打ちする基底膜構成成分である type IV collagen の免疫染色により膵管構造変化を、type IV collagen を基質とする細胞外基質分解酵素(matrix metalloproteinase-2: MMP-2)の活性を zymography 法により検討した。0.1%タウロコール酸単独膵管内注入群及び0.01%アガロース単独膵管内注入群では、膵炎作製28日後には膵腺房細胞傷害と基底膜構造変化は膵炎作製前に復した。混合注入膵炎では、膵炎作製28日後においては、膵腺房細胞の持続的な脱落が認められ間質には一部線維化も伴っていた。さらに、type IV collagen による膵管基底膜の免疫染色の検討においてはtype IV collagenの断列が認められた。Zymography においても対照群においては、活性型MMP-2の酵素活性はそれぞれ膵炎作製28日後には膵炎作製前まで復したのに対し、混合注入群においては、対照群に比し、膵炎作製42日後まで有意に高値を示した。これらのことより一過性の膵管傷害に膵液うっ滞を加えることで、膵管および膵腺房細胞の持続的な傷害が認められた。基底膜は基底膜蛋白の再構築を通じて細胞の再生に関与することが知られており、活性型MMP-2が持続的に高値を示したことから基底膜構造が長期にわたり傷害され、持続的な膵管および膵腺房細胞の傷害を惹起した可能性が示された。

共同研究者

山口泰三、中村早人、木原康之、山本光勝、
田代充生
(産業医科大学第三内科)

A. 研究目的

急性膵炎が起こっても膵管系への変化が生じなければ急性膵炎像はやがて回復するが、主膵管又は一次、二次分枝がその周囲に生じた癒痕によって傷害を起こして膵液のうっ滞がもたらされれば慢性膵炎に移行することが報告されており¹⁾、膵炎の進展増悪には膵管傷害や膵液のうっ滞あるいはその両者が重要な因子であると考えられる。Matrix metalloproteinases (MMPs) および Membrane type MMPs (MT-MMPs) が細胞外基質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^{2,3)}。本研究では、新しい慢性膵炎モデルの作製と膵炎の増悪進展における膵管系傷害の関与を明らかにする目的で、極軽度の膵管傷害に膵液うっ滞を加えることにより、慢性膵炎モデルが作製可能かを検討し、さらに、膵管上皮細胞を裏打ちする基底膜構成成分である type IV collagen の免疫染色により膵管構造変化を、type IV collagen を基質とする MMP-2 の活性を zymography 法により検討した。

B. 研究方法

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0.1%タウロコール酸及び0.01%アガロース40 μ l/100g体重を混合注入した。対照群として0.1%タウロコール酸40 μ l/100g体重及び0.01%アガロース40 μ l/100g体重をそれぞれ単独に膵管内に逆行性に注入し膵炎モデルを作製した。膵炎作製前、膵管内注入7日後、14日後、28日後、42日後、56日後及び84日後にラットを屠殺し膵臓を摘出し、HE 染色及び膵管上皮細胞を裏打ちする基底膜構成成分である type IV collagen の免疫染色により膵管構造変化を組織学的に検討した。さらに type IV collagen を基質とする細胞外基質分解酵素(matrix metalloproteinase-2: MMP-2)の活性を zymography 法により検討した。なお、本実験は、本学の動物実験及び飼育倫理審査委員会の承認を得、動物愛護の配慮のもとに行った。

C. 研究結果

組織学的には0.1%タウロコール酸単独膵管内注入群及び0.01%アガロース単独膵管内注入群では、膵炎作製28日後には膵腺房細胞傷害と基底膜構造変化は膵炎作製前に復した。混合注入膵炎では、膵炎作製28日後においては、膵腺房細胞の持続的な脱落が認められ軽度の線維化も伴っていた。さらに、type

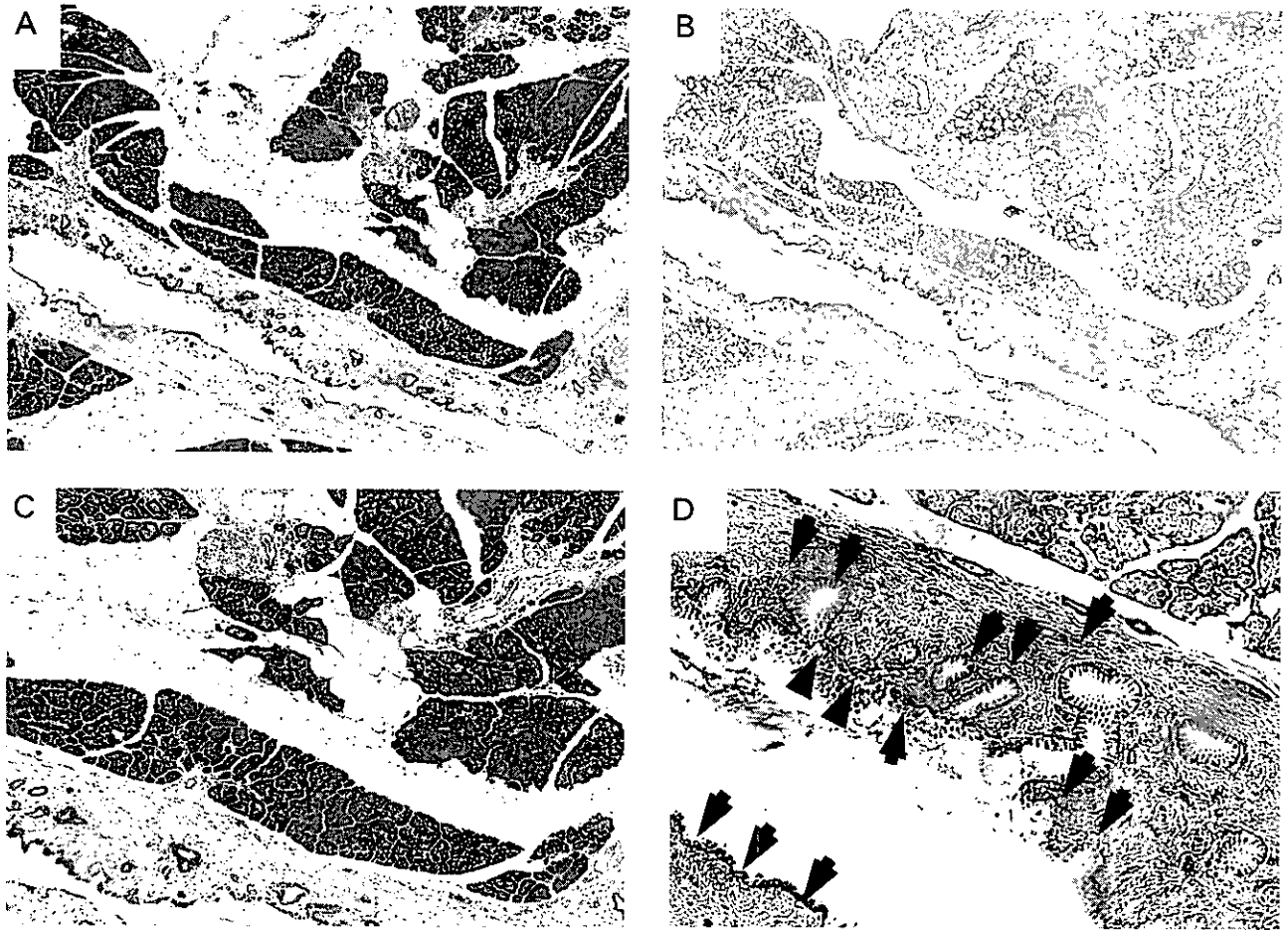


図1 0.1%タウロコール酸及び0.01%アガロース混合注入28日後の組織学的検討
 A (×10倍) と B (×25): H&E染色
 C (×10倍) と D (×50倍): Ttpe IV collagenに免疫染色
 矢印は基底膜断裂像

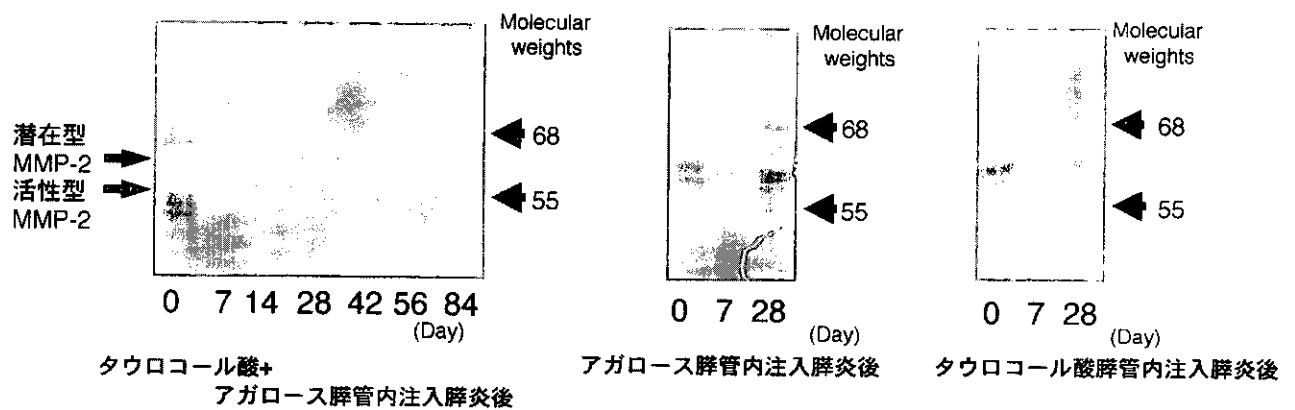


図2 0.1%タウロコール酸及び0.01%アガロース混合注膵管内注入膵炎における zymography

IV collagenによる膵管基底膜の免疫染色の検討においてもtype IV collagenの断列が認められた(図1)。Zymographyにおいても対照群においては、活性型MMP-2の酵素活性はそれぞれ膵炎作製28日後には膵炎作製前まで復したのに対し、混合注入群においては、対照群に比し、膵炎作製42日後まで有意に高値を示した(図2)。

D. 考察

細胞外基質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⁴⁵⁾。MMPsはこのような細胞外基質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⁶⁷⁾。対照群では、膵管内注入後早期に膵腺房細胞傷害と基底膜構造変化は膵炎作製前に復したが、混合注入群では、膵管内注入後長期にわたり膵腺房細胞の脱落と間質の一部線維化が認められ、基底膜構造変化も持続し、同時に、基底膜構成成分であるtype IV collagenを基質とする活性型MMP-2の酵素活性は混合注入後長期にわたり高値を示した。これらのことより一過性の軽度な膵管破壊状態で膵液をうっ滞させることで膵管および膵腺房細胞の持続的な傷害が認められた。基底膜は基底膜蛋白の再構築を通じて細胞の再生に関与することが知られており、活性型MMP-2が持続的に高値を示したことから基底膜構造が長期にわたり傷害され、持続的な膵管および膵腺房細胞の傷害を惹起した可能性が示された。

E. 結語

極軽度の膵管破壊状態に膵液うっ滞が加わることによってヒトの慢性膵炎類似の組織変化を示す慢性膵炎モデルを作製した。腺房細胞の持続的な破壊には活性型MMP-2酵素活性が長期間高値を持続することによるtype IV collagenの破壊が関与している可能性が示された。

F. 参考文献

- 1) Kloppel G, Maillet B. Chronic pancreatitis: evolution of the disease. *Hepatogas-troenterology* 1991; 38: 408-12.
- 2) Haralson MA. Extracellular matrix and growth factors: an integrated interplay controlling tissue repair and progression to disease. *Lab Invest* 1993: 369-72.
- 3) Ruoslahti E, Yamaguchi Y. Proteoglycans

as modulators of growth factor activities. *Cell* 1991; 64: 867-9.

- 4) Turck J, Pollock AS, Lee LK, Marti HP, Lovett DH. Matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A) regulates glomerular mesangial cell proliferation and differentiation. *J Biol Chem* 1996; 271: 15074-83.
- 5) Tyagi SC, Kumar S, Glover G. Induction of tissue inhibitor and matrix metalloproteinase by serum in human heart-derived fibroblast and endomyocardial endothelial cells. *J Cell Biochem* 1995; 58: 360-71.
- 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) 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.

G. 健康危険情報

該当なし

H. 研究発表

1. 論文発表 該当なし
2. 学会発表 該当なし

I. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし

自然発症慢性膵炎モデルWistar Bonn/Kobori (WBN/Kob) ラットにおけるT細胞の役割に関する検討

研究協力者 大原 弘隆 名古屋市立大学大学院医学研究科臨床機能内科学 講師

【研究要旨】

雄性 WBN/Kob ラットの自然発症慢性膵炎における発症・進展、膵腺房細胞のアポトーシスとT細胞との関連性および免疫抑制剤であるタクロリムスの治療効果について検討した。15週齢において、膵小葉内・小葉間にCD4およびCD8陽性T細胞が浸潤し、特にCD8陽性T細胞がアポトーシスを起こした膵腺房細胞に近接していた。タクロリムス投与により、膵腺房細胞のアポトーシス、CD4、CD8陽性細胞浸潤、膵炎の進展はほぼ完全に抑制された。膵腺房細胞のアポトーシスの誘導および慢性膵炎の進展に、CD8陽性T細胞が重要な役割を果たしており、タクロリムスは慢性膵炎の治療薬となり得る可能性が示唆された。

共同研究者

久野 篤、山田珠樹、中沢貴宏、伊藤 誠
(名古屋市立大学大学院医学研究科臨床機能内科学)

A. 研究目的

慢性膵炎は、膵の繰り返す炎症とそれに引き続く非可逆的な膵の線維化を特徴とする病態である。その発症、進展については不明な点が多く、理想的な実験動物モデルも少ない。我々は、自然発症慢性膵炎モデルである Wistar Bonn/Kobori (WBN/Kob) ラットに注目して、その膵炎の発症・進展機序解明のため研究してきた¹⁾。

我々は、雄性 WBN/Kob ラットでは、膵腺房細胞のアポトーシスが15から20週齢にかけて炎症細胞浸潤とともに、著しく増加しており、それが慢性膵炎の発症・進展に深く関与していることを報告した²⁾。また、膵腺房細胞のアポトーシスが内因性コルチコステロンの低下に関連しており、プレドニゾロン(1 mg/kg/day)の投与によって膵の炎症が著しく軽減されることを報告した³⁾。これらの結果は本モデルの膵炎における自己免疫機序の関与を示唆し、我々は本モデルがヒトにおける自己免疫性膵炎の実験動物モデルになり得ると考えている。

一方、非肥満性糖尿病自然発症マウスモデルにおいては、タクロリムスによってその発症が抑制されるという報告を認め、自己免疫的機序が糖尿病モデルの病因として重要であると推察される⁴⁾。さらに、最近になってヒトの慢性膵炎においても細胞性免疫がその病因に重要な役割を果たしていることが判明

してきた⁵⁾。ゆえに、WBN/Kob ラットでも細胞性免疫がその病態生理において重要であることが推測される。

本研究では、雄性 WBN/Kob ラットの慢性膵炎において、膵腺房細胞のアポトーシス、慢性膵炎におけるT細胞の役割を探求するために、以下の項目について検討した。

- 1) 組織学的検討
- 2) タクロリムスの膵腺房細胞のアポトーシス、慢性膵炎に対する効果。

B. 研究方法

- 1) 膵腺房細胞のアポトーシスとT細胞との関連性の組織学的検討

10, 15, 20週齢の雄性 WBN/Kob ラットをペントバルビタール麻酔下に開腹した後、膵を摘出し、連続薄切片を作製し、HE染色および抗F4/80抗体、抗CD4抗体、抗CD8抗体を用いた免疫染色およびTUNEL染色を行った。

- 2) タクロリムスによる治療効果の検討

タクロリムス(低用量0.025 mg/kg/day, 高用量0.1 mg/kg/day)をWBN/Kob ラットに10週齢より1日おきに10週間皮下投与した。対照群には vehicle を投与した。20週齢において膵腺房細胞のアポトーシスと慢性膵炎の程度を各群間で比較した。慢性膵炎へのタクロリムスの抑制効果は、組織学的スコア、顆粒球浸潤の指標である膵 myeloperoxidase (MPO) を用いて判定した。

さらに、光学顕微鏡200倍において無作為に20視野を選出し、その1視野におけるTUNEL染色での陽性細胞数、免疫染色におけるCD4、CD8陽性T細胞

数をそれらの平均値によって定量化し、対照群と高用量群間において比較した。

(倫理面への配慮)

本実験計画は名古屋市立大学の動物擁護委員会に承認された。

C. 研究結果

1) 慢性膵炎時の免疫組織学的所見

15週齢におけるHEと免疫染色の連続切片の解析では、F4/80陽性細胞(単球、マクロファージ)、CD8陽性T細胞、CD4陽性T細胞が小葉間の結合織に浸潤し、特にCD8陽性T細胞が実質内に浸潤していた(図1 A, B, C, D)。さらに、CD8に対する免疫染色の強拡大では、アポトーシスを起こした腺房細胞にCD8陽性T細胞が近接している像がしばしば観察された(図1 E)。

2) タクロリムスによる治療効果

タクロリムス高用量群では対照群における膵重量の低下、組織スコアの上昇、膵MPO活性の上昇は有意に抑制されたが、血漿コルチコステロン値は三群間で著変を認めなかった。TUNEL, CD4, CD8陽性細胞数の定量的な解析では、高用量のタクロリム

スの投与によって対照群に比してTUNEL, CD4, CD8陽性細胞数は減少していた(表1)。

図2にHE, TUNEL染色像を示す。低用量群では、炎症細胞浸潤、浮腫、線維化等の炎症所見は、対照群に比較して抑制されず、TUNEL陽性細胞もしばしば認めた(図2 C, D vs. 図2 A, B)。高用量群では、炎症細胞浸潤、線維化は対照群に比較して有意に抑制され、TUNEL陽性細胞もほとんど認めなかった(図2 E, F vs. 図2 A, B)。

D. 考察

我々は雄性WBN/Kobラットにおいて、T細胞、特にCD8陽性T細胞が膵実質に深く浸潤し、アポトーシスを起こした腺房細胞に近接して存在することを示した。細胞障害性のT細胞はFasリガンドを持ちアポトーシスを誘導することから、膵実質内に浸潤するCD8陽性T細胞が最も膵腺房細胞のアポトーシスに関連していると考えられる。この推測はT細胞の増殖と成熟、そしてT細胞由来のサイトカイン産生を強力に抑制する^{5,6)}、タクロリムスがほぼ完全に腺房細胞のアポトーシスと膵炎を抑制した今回の結果によって裏付けられた。

表1. タクロリムス投与の20週齢WBN/Kobラットの体重、膵重量、組織学的スコア、膵MPO活性、膵腺房細胞アポトーシス数、CD4/CD8陽性T細胞数に与える影響

	溶媒 (n=7)	タクロリムス	
		0.025mg/kg/day (n=6)	0.1mg/kg/day (n=6)
体重 (g)	376.9 ± 5.2	368.7 ± 9.4	352.7 ± 4.7 *#
膵重量 (g/kg)	1.4 ± 0.3	1.3 ± 0.1	1.7 ± 0.1 *#
組織学的スコア	1.94 ± 2.1	1.72 ± 0.35	0.22 ± 0.06 *#
炎症細胞浸潤	2.3	2.5	0.5
間質浮腫	1.1	1.7	0.3
線維化	2.6	2.5	0.7
腺房細胞壊死	2.6	2.5	0.3
出血	1.1	1.2	0.2
膵MPO活性 (unit/g)	5.6 ± 0.2	5.5 ± 0.4	2.2 ± 0.4 *#
血漿コルチコステロン濃度 (ng/ml)	187.8 ± 5.0	172.8 ± 9.4	221.6 ± 16.8 *#
膵腺房細胞アポトーシス数	0.8 ± 0.2	1.0 ± 0.3	0.0 ± 0.0 *#
膵のCD4 陽性T細胞数	3.73 ± 1.13		0.03 ± 0.01 *#
膵のCD8陽性T細胞数	5.50 ± 1.24		0.04 ± 0.02 *#

結果は mean ± SEM か組織学的スコアの平均値で示した。

* p < 0.05 vs. 溶媒, # p < 0.05 vs. タクロリムス0.025 mg/kg/day 投与群.

免疫抑制剤であるタクロリムスは *Streptomyces tsukubaensis* 菌株の発酵物質から抽出され、実験動物における糖尿病、心筋炎などの自己免疫疾患の発症・進展を減弱することが証明されてきた^{3,7)}。この薬剤はすでにヒト炎症性腸疾患の治療に臨床応用されている⁸⁾。しかしながら、タクロリムスはこれまでに、慢性膵炎の動物モデルの治療には使われた報告を認めない。今回、使用された高用量、0.1 mg/kg/day はヒトにおける免疫抑制療法に用いられる量とほぼ同等で、組織学的スコアをはじめとした各種の炎症パラメーターの著しい改善が示すように、本慢性膵炎モデルにおいては十分な治療効果が得られた。しかしながら、ラットにおいて無害な量のセルレインとタクロリムスの併用が膵障害を起こしたという報告もあり⁹⁾、タクロリムスをヒト慢性膵炎の治療に使用する前に慎重に検討する必要がある。

自然発症慢性膵炎モデル、WBN/Kob ラット、においては、プレドニゾロンの投与によって膵の炎症

が著しく軽減されることから、少なくとも部分的には、ヒトの自己免疫性膵炎を反映しており、本疾患の病態生理と効果的な治療戦略の解明のために有用なモデルであると考えられた。

E. 結論

雄性 WBN/Kob ラットにおける膵腺房細胞のアポトーシスの誘導および慢性膵炎の進展に、CD8陽性 T細胞が重要な役割を果たすことが判明した。

免疫抑制剤であるタクロリムスは、本モデルにおけるアポトーシス、膵炎を T細胞の浸潤を軽減させることで抑制し、慢性膵炎の治療薬となり得る可能性が示唆された。

F. 参考文献

- 1) Hashimoto T, Yamada T, Yokoi T, Sano H, Ando H, Nakazawa T, Ohara H, Nomura T, Joh T, Itoh M. Apoptosis of acinar cells is

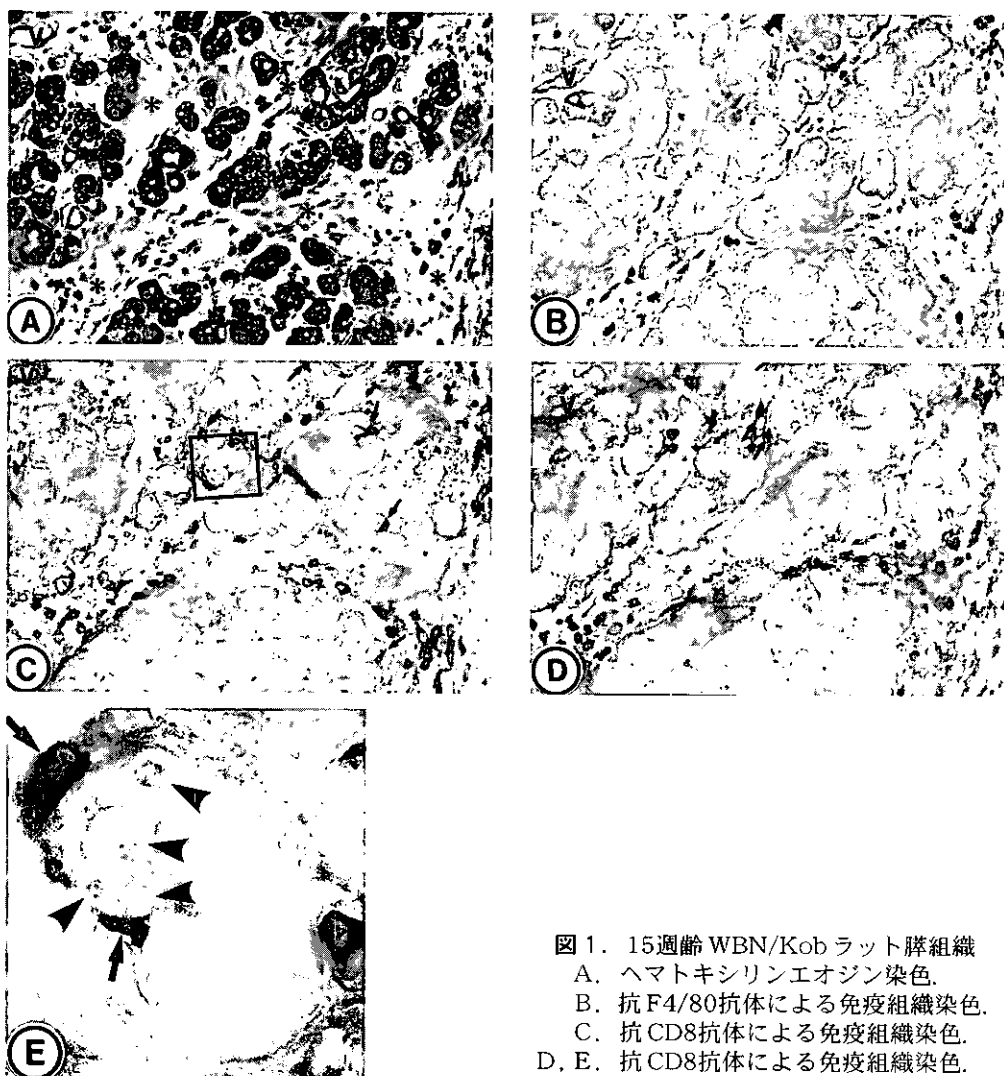


図1. 15週齢 WBN/Kob ラット膵組織
 A. ヘマトキシリンエオジン染色。
 B. 抗 F4/80抗体による免疫組織染色。
 C. 抗 CD8抗体による免疫組織染色。
 D, E. 抗 CD8抗体による免疫組織染色。

involved in chronic pancreatitis in WBN/Kob rats: role of glucocorticoids. *Pancreas* 2000; 21: 296-304.

- 2) Yamada T, Hashimoto T, Sogawa M, Kobayashi S, Kaneda K, Nakamura S, Kuno A, Sano H, Ando T, Kobayashi S, Aoki S, Nakazawa T, Ohara H, Nomura T, Joh T, Itoh M. Role of T cells in development of chronic pancreatitis in male Wistar Bonn/Kobori rats: effects of tacrolimus. *Am J Physiol* 2001; 281: G1397-04.
- 3) Carroll PB, Strasser S, Alejandro R. The effect of FK506 on cyclophosphamide-induced diabetes in the NOD mouse model. *Transplant Proc* 1991; 23: 3348-50.
- 4) Anderson RJ, Dyer PA, Donnai D, Klouda

PT, Jennison R, Braganza JM. Chronic pancreatitis, HLA and autoimmunity. *Int J Pancreatol* 1988; 3: 83-90.

- 5) Kino T, Hatanaka H, Hashimoto M, Nishiyama M, Goto T, Okuhara M, Kohsaka M, Aoki H, Imanaka H. FK-506, a novel immunosuppressant isolated from *Streptomyces* I. *J Antibiot* 1987; 40: 1249-55.
- 6) Kino T, Hatanaka H, Miyata S, Inamura N, Nishiyama M, Yajima T, Goto T, Okuhara M, Kohsaka M, Aoki H, Imanaka H. FK-506, a novel immunosuppressant isolated from *Streptomyces* II. *J Antibiot* 1987; 40: 1256-65.
- 7) Hanawa H, Kodama M, Zhang S, Izumi T, Shibata A. An immunosuppressant com-

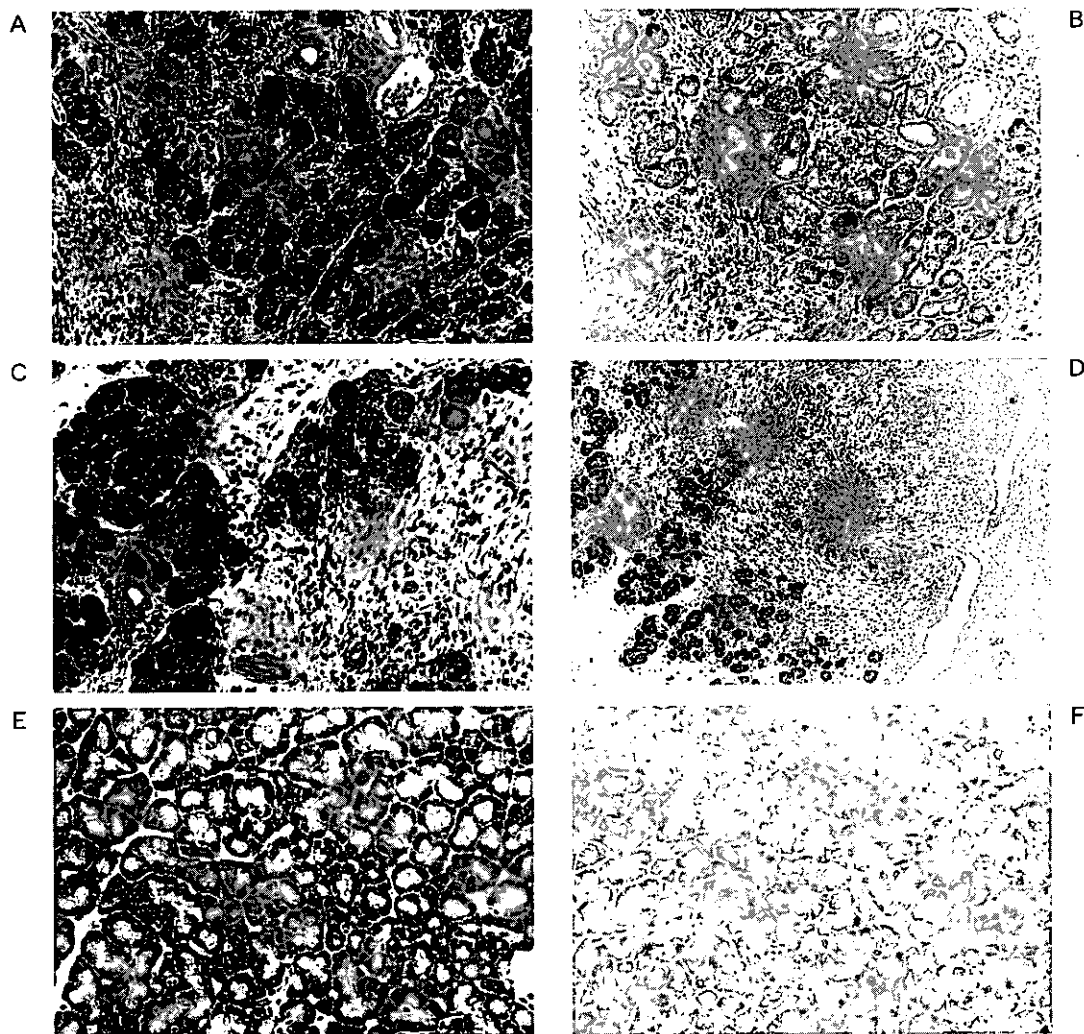


図2. タクロリムス10週間投与後20週齢WBN/Kobラット膵組織 (A, C, E; ヘマトキシリンエオジン染色. B, D, F; TUNEL染色)
A, B. 対照群. C, D. 低用量群 (0.025mg/kg/day). E, F. 高用量群 (0.1mg/kg/day).

pound, FK-506, prevents the progression of autoimmune myocarditis in rats. Clin Immunol Immunopathol 1992; 62: 321-6.

- 8) Choi PM Targan SR. Immunomodulator therapy in inflammatory disease. Dig Dis Sci 1994; 39: 1885-92.
- 9) Ito T, Kimura T, Furukawa M, Yamaguchi H, Goto M, Nakano I, Nawata H. Protective effects of gabexate mesilate on acute pancreatitis induced by tacrolimus (FK506) in rats in which the pancreas was stimulated by caerulein. J Gastroenterol 1994; 29: 305-13.

G. 健康危険情報

該当なし

H. 研究発表

1. 論文発表 該当なし
2. 学会発表 該当なし

I. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし

ラット慢性膵炎におけるmutant MCP-1の膵線維化抑制効果の検討

研究協力者 伊藤鉄英 九州大学大学院病態制御内科 講師

【研究要旨】

主に単球・マクロファージを炎症部位に遊走作用を持つ monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1)は、膵の線維化進展に重要な役割を担っていることが知られている。慢性膵炎の発症と膵線維化における MCP-1 の関与を検討する目的にて、内因性 MCP-1 と競合する dominant negative mutant MCP-1 (mMCP-1) を用い、ラット dibutyltin dichloride (DBTC) 慢性膵炎に対する効果を検討した。既報の方法にて DBTC 7 mg/kg を右内頸静脈より一回投与し慢性膵炎モデルを作成した。DBTC 投与後 4 日目、11 日目、18 日目に MCP-1 の N 末端のアミノ酸 7 個を欠損させた mMCP-1 50 μ g/body を大腿筋に投与した。DBTC 投与後 14 日目、28 日目に sacrifice し、酵素学的検討および組織学検討をおこなった。mMCP-1 治療群では DBTC 群で低下した膵内蛋白含量およびアミラーゼ含量を有意に改善させた。組織学的にも mMCP-1 治療群では DBTC 群で認められた炎症細胞浸潤、線維化、導管形成を 14 日目、28 日目ともに有意に改善した。脂肪変性は 28 日目に有意に改善した。また、アザン染色および α SMA 染色においても mMCP-1 治療群では改善を認めた。以上、mMCP-1 投与により DBTC 慢性膵炎を改善することより、MCP-1 は慢性膵炎の線維化進展に強く関与していることが示唆された。また、mMCP-1 による慢性膵炎の遺伝子治療への可能性が示唆された。

共同研究者

趙 海峰、宜保淳也、河辺 顕、大野隆真、
有田好之、名和田新
〈九州大学大学院病態制御内科〉

A. 研究目的

慢性膵炎進展過程には様々のケモカインなどが深く関与する事が知られおり、その中で、C-Cケモカインファミリーの一つで、主に単球・マクロファージを炎症部位に遊走作用を持つ monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) が、膵線維化に重要な役割を担っていることが考えられている¹⁾。我々は、ラット dibutyltin dichloride (DBTC) 膵線維化モデルが、組織学的および酵素学的に慢性膵炎モデルとなりうること、さらに MCP-1 が、膵線維化初期過程に重要な役割を担っていることを報告した²⁾。今回、DBTC 慢性膵炎の発症と膵線維化における MCP-1 の関与を検討する目的にて、内因性 MCP-1 と競合する dominant negative mutant MCP-1 (mMCP-1) を作成し、ラット DBTC 慢性膵炎に対する mMCP-1 の効果を検討した。

B. 研究方法

Sparmann ら³⁾の DBTC 投与によるラット膵線維化モデルに改良を加え、DBTC 慢性膵炎モデルを作

成した。実際には、雄性 Lewis ラット (200 g) の右内頸静脈より ethanol: glycerol: dimethyl sulfoxide に溶解した DBTC 7 mg/kg の一回投与をおこなった。DBTC 投与後 4 日目、11 日目、18 日目に 50 μ g/body の MCP-1 の N 末端のアミノ酸 7 個を欠損させた mMCP-1 を大腿筋に投与した (図 1)。DBTC 投与後 14 日目、28 日目に sacrifice し、膵外分泌能の指標として膵内蛋白含量およびアミラーゼ含量を測定した。組織学検討では HE 染色にて炎症細胞浸潤、線維化、脂肪変性、導管形成、浮腫を程度により 0 から 3 の 4 段階に分類し評価した。また、線維化程度を明らかにする目的にてアザン染色を、膵星細胞の活性化の指標として α SMA 染色をおこなった。また、膵より total RNA を抽出し、RT-PCR を用いて MCP-1、PDGF および TGF- β の遺伝子発現を検討した。なお、本研究は九州大学動物管理委員会のガイドラインに沿って実験をおこなった。

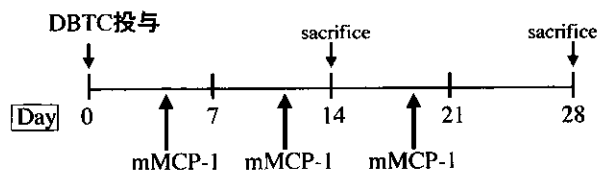


図 1. 実験プロトコール

DBTC 投与後 4 日目、11 日目、18 日目に 50 μ g/bod の mMCP-1 を大腿筋に投与。DBTC 投与後 14 日目、28 日目に sacrifice し酵素学的および組織学的検討を施行。