

時間培養し、さらに 24 時間無血清培養後、valsartan 10^{-7} M \sim 10^{-5} M で 20 分間 preincubate し、ANG II 10^{-5} M と valsartan 10^{-7} M \sim 10^{-5} M 入り培地で 72 時間培養し、cell count を行った。さらに、RT-PCR 法にて MCP-1、TGF- β および PDGF mRNA の発現を検討した。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行った。

C. 研究結果

1. 膵内蛋白含有量及びアミラーゼ含有量(図1)

28 日目の膵内蛋白含有量を図1に示す。DBTC 慢性膵炎群では 92.7 ± 22.8 mg/g \cdot pancreas で、正常膵の 195.1 ± 24.5 に比し低下を認めた。それに対し、valsartan 治療群では 162.7 ± 14.5 と有意な改善を認めた。また、膵内アミラーゼ含有量では、正常膵 $26,827 \pm 4,208$ SU/g \cdot pancreas に対しDBTC 慢性膵炎群では $3,001 \pm 956$ と低下し、valsartan 治療群で $12,225 \pm 5,153$ と有意な改善を認めた。

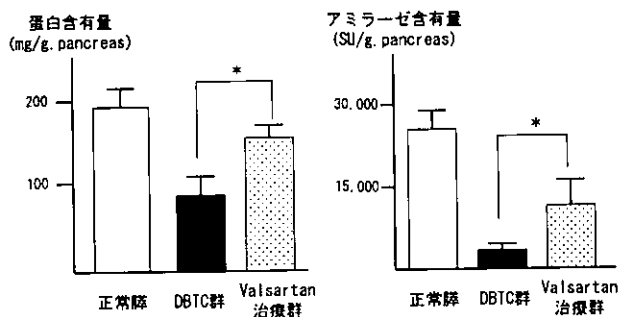


図1 膵内蛋白およびアミラーゼ含有量 (* $P < 0.05$)

2. 組織学的検討(図2)

DBTC 慢性膵炎群では著明な線維化を認めたが、valsartan 治療群では線維化の進展が抑制された。

3. 遺伝子学的検討 *in vivo* (図3)

DBTC 慢性膵炎群では MCP-1、TGF- β および PDGF mRNA の発現を確認したが、valsartan 治療群で発現の程度は抑制された。

4. ANG II 受容体発現の検討

PSC では ANG II type 1a 受容体と、その拮抗作用を持つと推測されている type 2 受容体の発現を確認した。また、7 継代目で発現量の低下を認めたため、以後の実験には 2 から 5 継代までの PSC を使用した。

5. PSC 細胞増殖能の検討 (図4)

ANG II 低濃度群 (10^{-9} M) では $17.1 \pm 6.86 \times 10^4$ 個/ml で、無刺激群 $18.0 \pm 3.17 \times 10^4$ 個/ml

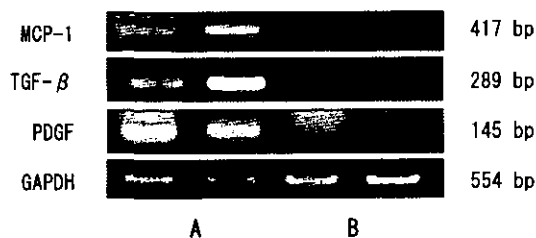


図3 遺伝子学的検討
A: DBTC慢性膵炎群 B: Valsartan治療群

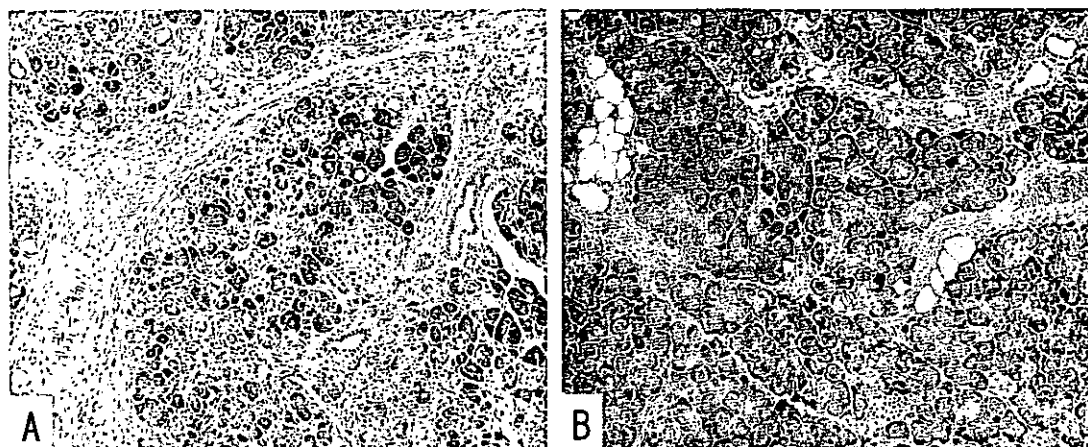


図2 組織学的検討 (H&E染色)
A: DBTC 慢性膵炎群 B: Valsartan 治療群

と変化を認めなかったが、ANG II 高濃度群 (10^{-5} M) で $32.5 \pm 3.80 \times 10^4$ 個/ml と有意に細胞数の増加を認めた。また、valsartan 投与群 (10^{-5} M) では $11.3 \pm 2.63 \times 10^4$ 個/ml と細胞増殖の抑制効果を認めた。

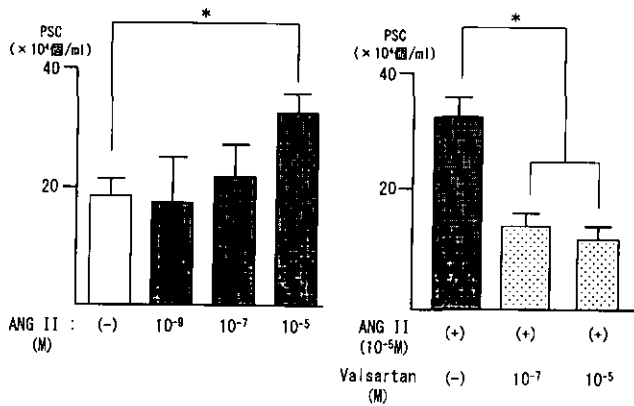


図4 細胞増殖能の検討 (*P<0.05)

6. 遺伝子学的検討 *in vitro* (図5)

ANG II 刺激群では MCP-1, TGF- β および PDGF mRNA の発現を認めた。valsartan 投与群において、低濃度群 (10^{-7} M) では発現したが、高濃度群 (10^{-5} M) で発現の低下を認めた。

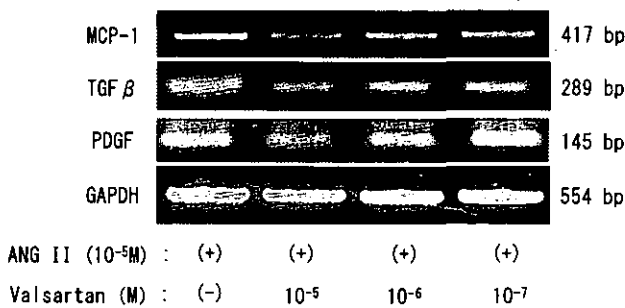


図5 遺伝子学的検討

D. 考察

慢性膵炎は膵実質の変性・脱落、間質の線維化および炎症細胞浸潤を主体とし、次第に膵内外分泌が低下していく疾患である。治療では、病態を把握し、診断が得られれば早期より治療を開始し、膵線維化の進展を抑制することが必要と考えられる。

近年、肝線維化過程において、ANG II が type I 受容体を介して活性化肝星細胞の増殖や TGF- β

産生を促進して肝線維化進展に関与し、さらに ANG II を阻害することにより線維化進展が抑制されることが報告されている^{1,5)}。一方、膵臓においても、肝星細胞に形態的にも機能的にも類似する PSC が同定され、膵線維化に中心的役割を果たすと考えられている⁶⁾。

本研究は、膵線維化進展と ANG II の関与を検討する目的で行った。DBTC 慢性膵炎モデルでは、DBTC 投与後 3 日目までは浮腫性の急性膵炎の所見を呈し組織学的には顆粒球優位の炎症細胞浸潤が著明であるが、その後 7 日目には単球優位の炎症細胞浸潤に変化し、線維化が出現する³⁾。そこで我々は、DBTC 投与後 7 日目より AT1 受容体拮抗薬である valsartan の投与を開始した。28 日目まで連日経口投与した結果、膵内蛋白含有量およびアミラーゼ含有量の改善を認め、DBTC 慢性膵炎で低下していた膵外分泌機能が改善したと考えられた。さらに組織像にて、明らかに膵線維化進展の抑制を認めた。また、慢性膵炎の進展に関与すると考えられている MCP-1、および線維化増殖因子である TGF- β 、PDGF mRNA の発現低下を認めた。*In vitro*においても、ANG II 刺激に対して PSC は増殖し、AT1 受容体拮抗薬投与によりその増殖能は抑制された。MCP-1、TGF- β および PDGF mRNA の発現に関しても同様の結果を得た。

以上より、AT1 受容体を介して ANG II が PSC に作用すると、PSC より MCP-1 が産生されて単球浸潤を誘導し、炎症の慢性化を引き起こす可能性が示唆された。また、PSC が TGF- β や PDGF を産生し、オートクライン的に PSC に作用して増殖を亢進させ、その相互作用により膵線維化が促進される可能性が示唆された。今後さらなる解明により、AT1 受容体拮抗薬が新たな膵線維化抑制治療薬として発展していく可能性が期待される。

E. 結語

慢性膵炎進展における angiotensin II の関与を検討した。Angiotensin II は AT1 受容体を介して膵線維化進展に関与する可能性が示唆された。

F. 参考文献

1. Bataller R, Gines P, Nicolas JM, Gorbign MN, Garcia-Ramallo E, Gasull X, Bosch J,

Arroyo V, Rodes J. Angiotensin II induces contraction and proliferation of human hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 2000; 118: 1149-56.

2. Sparmann G, Merkord J, Jaschke A, Nizze H, Jonas L, Lohr M, Liebe S, Emmrich J. Pancreatic fibrosis in experimental pancreatitis induced by dibutyltin dichloride. *Gastroenterology* 1997; 112: 1664-72.
3. Inoue M, Ino Y, Gibo J, Ito T, Hisano T, Arita Y, Nawata H. The role of monocyte chemoattractant protein-1 in experimental chronic pancreatitis model induced by dibutyltin dichloride in rats. *Pancreas* 2002; 25: e64-70.
4. Schneider E, Schmid-Kotsas A, Zhao J, Weidenbach H, Schmid RM, Menke A, Adler G, Waltenerberger J, Grunert A, Bachem MG. Identification of mediators stimulating proliferation and matrix synthesis of rat pancreatic stellate cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 281: C532-43.
5. Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Nakatani T, Tsujinoue H, Fukui H. Angiotensin-II type 1 receptor interaction is a major regulator for liver fibrosis development in rats. *Hepatology* 2001; 34: 745-50.
6. Bachem MG, Schneider E, Gross H, Weidenbach H, Schmid RM, Menke A, Siech M, Beger H, Grunert A, Adler G. Identification, culture, and characterization of pancreatic stellate cells in rats and humans. *Gastroenterology* 1998; 115: 421-32.

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
- 1) 井上直子, 河辺顕, 伊藤鉄英, 宜保淳也, 大野隆真, 明石哲郎, 小島瑞穂, 有田好之,

名和田新. ラット DBTC 慢性膵炎モデルにおける angiotensin II type1 受容体拮抗薬の膵線維化抑制効果の検討. 第 34 回日本膵臓学会大会 千葉 2003 年 7 月 10-11 日

I. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む.)

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

WBN/Kob ラットにおける慢性膵炎・膵線維化に対する アンジオテンシン II 1 型受容体拮抗薬の抑制効果

研究報告者 大原弘隆 名古屋市立大学大学院臨床機能内科 講師
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臨床機能内科

【研究要旨】

自然発症慢性膵炎モデルである Wistar Bonn/Kobori (WBN/Kob) ラットにおいて, アンジオテンシン II 1 型 (AT1) 受容体拮抗薬であるカンデサルタンの膵炎・膵線維化に対する効果を検討した. 10 週齢の雄性 WBN/Kob ラットにカンデサルタン含有水を 10 週間投与した後に膵組織を採取し, 組織学的な炎症および線維化の評価, 炎症および線維化パラメーターの測定, RT-PCR による transforming growth factor (TGF)- β 1, レニン-アンジオテンシン系 mRNA 発現の検討と α -smooth muscle actin (SMA) に対する膵免疫組織染色を行った. カンデサルタン投与群では膵ミエロペルオキシダーゼ (MPO) 活性, 膵ヒドロキシプロリン含量, 組織スコア, 線維化面積は用量依存性に低下し, α -SMA 陽性細胞は減少した. TGF- β 1 mRNA 発現は抑制されたが, アンジオテンシン II 1 型 (AT1) 受容体 mRNA には著変なく, AT2 受容体, アンジオテンシノーゲン mRNA は増強した. カンデサルタン投与により膵の慢性炎症・線維化は抑制され, その機序として, TGF- β 1 mRNA 抑制を介した膵星細胞の活性化抑制の関連が示唆された. AT1 受容体拮抗薬は慢性膵炎の治療に有用であると考えられた.

A. 研究目的

Wistar Bonn/Kobori (WBN/Kob) ラットは, 雄にのみ 12 週齢頃より膵管周囲と膵の小葉間質に炎症細胞浸潤, 浮腫, 出血を認め, 20 週齢頃には膵外分泌部の線維化を起こす自然発症慢性膵炎モデルである^{1,2)}.

我々はこれまでに WBN/Kob ラットの慢性膵炎に対して, ステロイド, 免疫抑制剤であるタクロリムス, さらにエストラジオールが抑制効果を示すことを報告してきたが³⁻⁵⁾, さらに臨床応用に適した薬剤を模索しているうちに, レニン-アンジオテンシン系抑制薬が心臓, 腎臓, 肝臓において線維化を抑制し, 臓器保護作用を発揮する⁶⁻⁸⁾という報告に注目した. 一方, 膵臓にも内在性にレニン-アンジオテンシン系が存在し⁹⁾, 肝臓における線維化担当細胞である肝星細胞と形態的, 機能的に類似した膵星細胞が存在する¹⁰⁾という報告があることから, 肝臓において線維化抑制効果の認められたレニン-アンジオテンシン系抑制薬が膵臓においても炎症と線維化を抑制するのではないかと仮説を立て, まずアンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害薬であるリシノプリルが WBN/Kob ラットの慢性膵炎を抑制することを報告した¹¹⁾. しかしながら, ACE 阻害薬にはキニン系活性化作用があり¹²⁾, リシノプリルの示した膵炎抑制効

果がアンジオテンシン II 抑制を介したものと必ずしも言い難い. そこで, 本研究では, WBN/Kob ラットにおいてアンジオテンシン II 1 型 (AT1) 受容体拮抗薬であるカンデサルタンの膵炎・膵線維化に対する効果を検討した.

B. 研究方法

10 週齢の雄性 WBN/Kob ラットを無作為に 4 群に分け, 対照群 (n=9) には水を, カンデサルタン治療群には高用量 (n=10): 125mg/l, 中用量 (n=5): 40mg/l, 低用量 (n=5): 10.5mg/l の各濃度のカンデサルタン含有水を 10 週間自由飲水させた. 20 週齢において膵組織を採取し, HE 染色による組織学的スコア (炎症程度を炎症細胞浸潤, 間質の浮腫, 出血, 腺房細胞壊死, 線維化の各項目について 0 から 3 のスケールで評価), Azan 染色組織での線維化面積の割合, 顆粒球浸潤の指標である膵ミエロペルオキシダーゼ (MPO) 活性, 線維化の指標である膵ヒドロキシプロリン含量を測定した.

さらに, RT-PCR による TGF- β 1, AT1 および AT2 受容体, アンジオテンシノーゲン mRNA 発現と α -SMA に対する膵免疫組織染色を各群で比較検討した.

(倫理面への配慮) なお, 本実験は本学の動物実験

およ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

体重、飲水量から計算したカンデサルタン用量は、低用量： 0.80 ± 0.08 mg/kg/day，中用量： 4.34 ± 0.32 mg/kg/day，高用量： 13.92 ± 0.98 mg/kg/day となった。

膵重量、MPO 活性、ヒドロキシプロリン含量を表 1 に示す。20 週齢の WBN/Kob ラットの膵重量はカンデサルタン中用量群と高用量群で対照群に比し有意に増加していた。膵の MPO 活性はカンデサルタン高用量群と中用量群で、膵ヒドロキシプロリン含量は、高用量群で対照群に比べて有意に低下していた。

表 1 カンデサルタン投与による膵重量、膵 MPO 活性、膵ヒドロキシプロリン含量の変化

	膵重量 (g/kg)	MPO活性 (U/g)	ヒドロキシプロリン 含量 (μ g/g)
対照群 (n=6)	1.8 ± 0.4	6.2 ± 0.9	363 ± 90
低用量群 (n=5)	$2.4 \pm 0.5^*$	6.0 ± 4.1	382 ± 208
中用量群 (n=5)	$3.0 \pm 0.4^*$	$2.9 \pm 0.6^*$	264 ± 79
高用量群 (n=5)	$2.8 \pm 0.3^*$	$2.2 \pm 0.5^*$	$124 \pm 41^*$

*: $p < 0.05$ vs. 対照群

膵の肉眼所見では、20 週齢の対照群の膵は強く萎縮し、全体に褐色で多数の点状出血を認めた(図 1 A)。カンデサルタン低用量群では対照群と同様の所見であったが、中用量群では膵萎縮と出血はかなり減弱し、高用量群ではほぼ正常な外観であった(図 1 B)。

図 2 に膵組織の HE およびアザン染色像を示す。対照群の膵では、好中球、リンパ球、形質細胞が塊状に浸潤し、腺房細胞は消失し、脂肪組織で置換されていた。間質の浮腫とヘモジデリン沈着を伴った出血も多数認められた(図 2 A)。それに対して、カンデサルタン高用量群では著しく膵の炎症は減弱しており、血管周囲に少数の炎症細胞浸潤と線維化を認めるのみであった(図 2 C)。アザン染色では対照群において残存した腺房間に厚い膠原繊維を豊富に認めた(図 2 B)。一方、カンデサルタン高用量群では腺房間に微細な膠原繊維をわずかに認めた(図 2 D)。また、総面積に対する線維化面積の割合は、カンデサルタン高用量群 12.2 ± 3.8 %で、対照群 45.2 ± 11.6 %に比べて有意に減少していた。

組織学的スコアの大部分は対照群に比べてカンデサルタン高用量群と中用量群で著しく低い値であった(表 2)。

RT-PCR による検討では、対照群の WBN/Kob ラットの膵では Wistar ラットに比較して TGF- β 1 mRNA は、強く発現しており、高用量のカンデサルタン投与によって、TGF- β 1 は著しく抑制され、アンジオテンシノーゲンはわずかに増強し、AT1 受容体は著変なく、AT2 受容体発現はカンデサルタン高用量群で増強していた(図 3)。

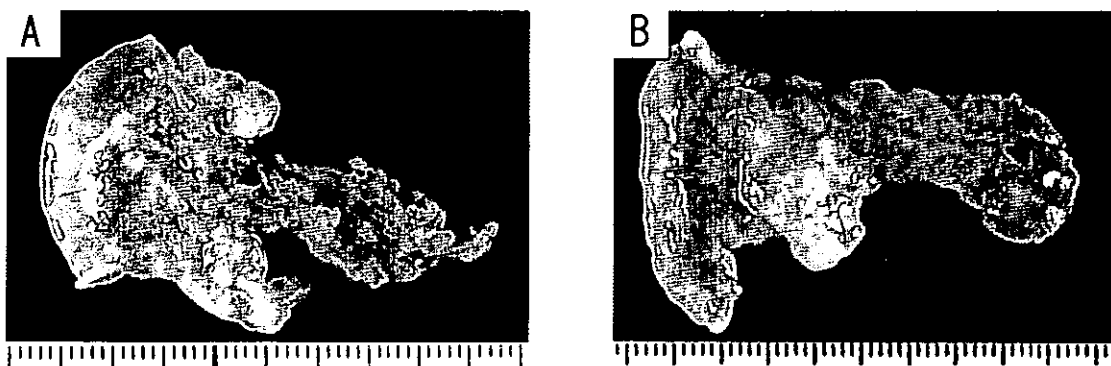


図 1 20 週齢 WBN/Kob ラット膵肉眼像
A: 対照群 B: カンデサルタン高用量群

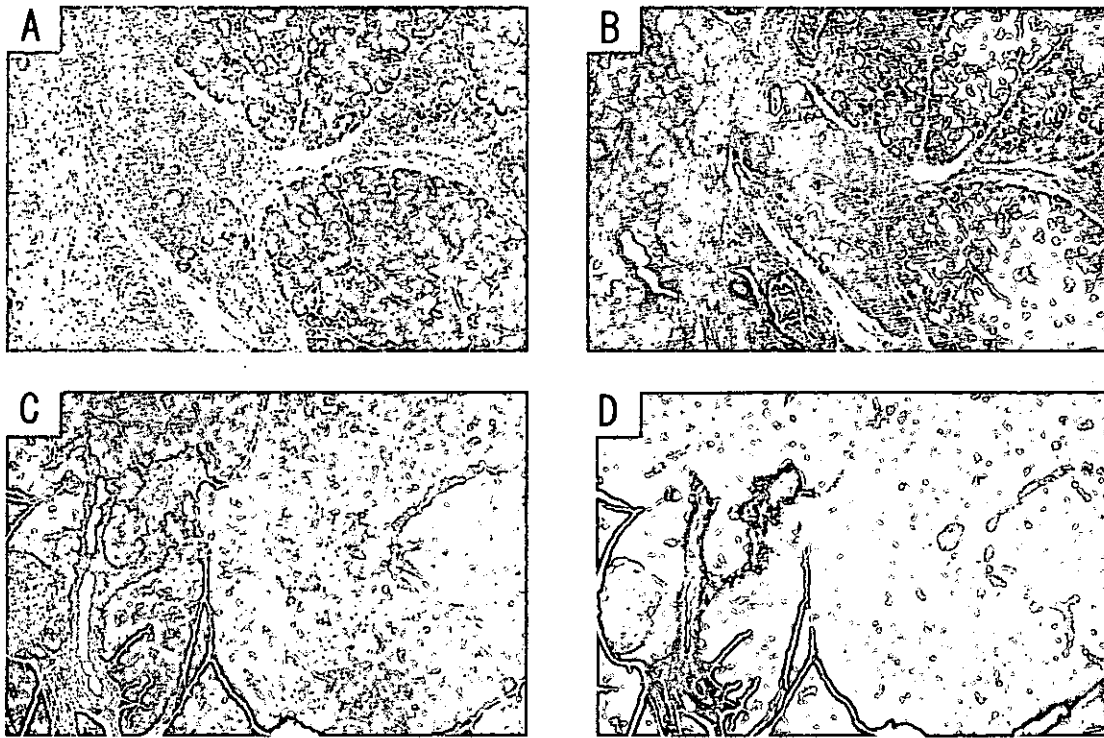


図2 20週齢WBN/Kobラット腎組織像(A, C: HE染色, B, D: Azan染色)
A, B: 対照群 C, D: カンデサルタン高用量群

表2 腎組織学的スコアにおけるカンデサルタンの抑制効果

	組織学的スコア				
	炎症細胞浸潤	間質浮腫	出血	腺房細胞壊死	線維化
対照群 (n=6)	2.2±1.0	1.2±0.8	1.5±0.5	1.0±0.6	1.5±0.5
低用量群 (n=5)	1.6±0.5	1.6±0.5	1.2±0.4	0.8±0.8	1.4±0.5
中用量群 (n=5)	1.0±0.0**	0.4±0.5*	1.0±0.0	0.2±0.4	0.6±0.5***
高用量群 (n=5)	1.0±0.0**	0.2±0.4*	1.0±0.0	0.2±0.4	1.0±0.0

***, **, *: p<0.001, 0.01, 0.05 vs. 対照群

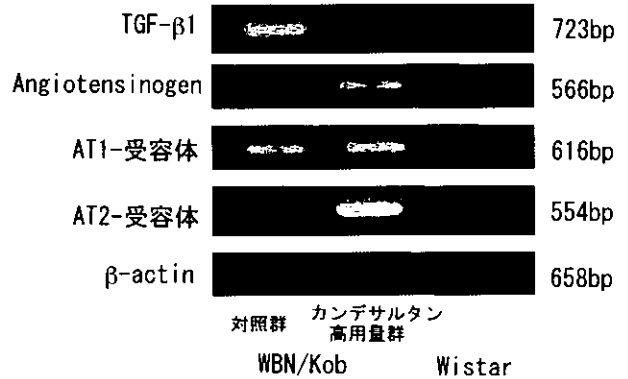


図3 RT-PCRによるTGF-β1, レニン-アンジオテンシン系 mRNA 発現の検討



図4 抗α-SMA腎免疫組織染色像
A: 対照群 B: カンデサルタン高用量群

図4に α -SMAに対する免疫染色を示す。活性化された膵星細胞すなわち α -SMA陽性細胞は、対照群では線維化領域の腺房周囲と血管周囲に多数局在していた。それに対して、カンデサルタン高用量群では α -SMA陽性細胞は血管壁にのみ少数観察された。

D. 考察

図5に我々のACE阻害薬、AT1受容体拮抗薬の慢性膵炎における炎症、線維化抑制機序についての仮説を示す。アンジオテンシンIIは強力な血管収縮作用から膵の虚血を引き起こす可能性があり、また膵星細胞の活性化作用も有することが報告されている。ACE阻害薬は、アンジオテンシンIIの産生抑制およびキニン系活性化による膵虚血の改善とアンジオテンシンIIによる膵星細胞活性化を間接的に抑制することによって、また、AT1受容体拮抗薬は、AT1受容体阻害により膵虚血の改善と膵星細胞の活性化を抑制し、膵炎と線維化を抑制したと考えられた。

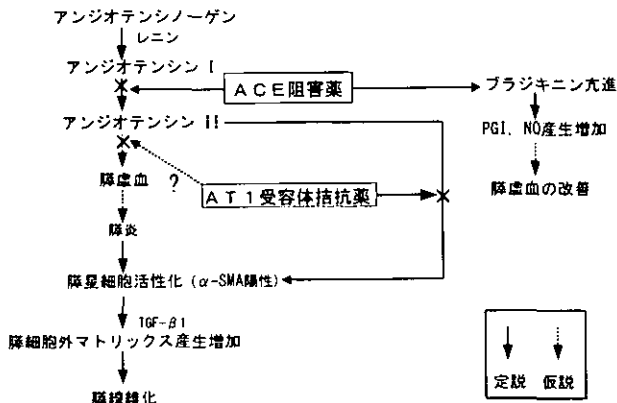


図5 アンジオテンシン変換酵素(ACE)阻害薬・アンジオテンシンII1型(AT1)受容体拮抗薬の膵炎・膵線維化抑制の機序(仮説)

E. 結語

雄性 WBN/Kob ラットにおいて、AT1 受容体拮抗薬によるアンジオテンシンIIの作用阻害によって膵の慢性炎症と線維化は著明に抑制された。その作用機序として、TGF- β 1 mRNA 発現の抑制と膵星細胞の活性化抑制の関連が考えられた。高血圧治療薬として現在広く用いられている AT1 受容体拮抗薬はアンジオテンシンIIを阻害することで慢性膵炎を抑制する可能性が示唆された。

F. 参考文献

1. Ohashi K, Kim JH, Hara H, Aso R, Akimoto T, Nakama K. WBN/Kob rats. A new spontaneously occurring model of chronic pancreatitis. *Int J Pancreatol* 1990; 6: 231-47.
2. Mori Y, Yokoyama J, Nishimura M, Ikeda Y. A new diabetic strain of rat with exocrine pancreatic insufficiency. In: Tiengo A, Del Prato S, Alberti KG, Vanic M, eds. *Diabetes Secondary to Pancreatopathy*. Amsterdam: Elsevier, 1988: 107-12.
3. 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 involved in chronic pancreatitis in WBN/Kob rats: role of glucocorticoids. *Pancreas* 2000; 21: 296-304.
4. 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: G1397-404.
5. Nakamura T, Yamada T, Hashimoto T, Takahashi S, Sogawa M, Ohara H, Nakazawa T, Sano H, Kuno A, Joh T, Nomura T, Arakawa T, Itoh M. Estradiol alleviates acinar cell apoptosis and chronic pancreatitis in male Wistar Bonn/Kobori rats. *Pancreas* 2003; 26: e59-66.
6. Jonsson JR, Clouston AD, Ando Y, Kelemen LI, Horn MJ, Adamson MD, Purdie DM, Powell EE. Angiotensin-converting enzyme inhibition attenuates the progression of rat hepatic fibrosis. *Gastroenterology* 2001; 121: 148-55.
7. Brilla CG, Janicki JS, Weber KT. Cardio-reparative effects of lisinopril in rats with genetic hypertension and left ventricular hypertrophy. *Circulation* 1991; 83: 1771-9.
8. Kagami S, Border WA, Miller DE, Noble NA. Angiotensin II stimulates extracellular matrix protein synthesis through

induction of transforming growth factor- β expression in rat glomerular mesangial cells. J Clin Invest 1994; 93: 2431-7.

9. Leung PS, Chan WP, Wong TP, Sernia C. Expression and localization of the renin-angiotensin system in the rat pancreas. Endocrinol 1999; 160: 3-19.
10. Apte MV, Haber PS, Applegate TL, Norton ID, McCaughan GW, Korsten MA, Pirola RC, Wilson JS. Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation, and culture. Gut 1998; 43: 128-33.
11. Kuno A, Yamada T, Masuda K, Ogawa K, Sogawa M, Nakamura S, Nakazawa T, Ohara H, Nomura T, Joh T, Shirai T, Itoh M. Angiotensin-converting enzyme inhibition attenuates pancreatic inflammation and fibrosis in male Wistar Bonn/Kobori rats. Gastroenterology 2003; 124: 1010-9.
12. Matsusaka T, Ichikawa I. Biological functions of angiotensin and its receptor. Annu Rev Physiol 1997; 59: 395-412.

G. 健康危険情報

該当なし

H. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamada T, Kuno A, Masuda K, Ogawa K, Sogawa M, Nakamura S, Ando T, Sano H, Nakazawa T, Ohara H, Nomura T, Joh T, Itoh M. Candesartan, an angiotensin II receptor antagonist, suppresses pancreatic inflammation and fibrosis in rats. J Pharmacol Exp Ther 2003; 307: 17-23.

2. 学会発表

- 1) 中村聡一, 山田珠樹, 久野 篤, 小川久美子, 大原弘隆, 中沢貴宏, 佐野 仁, 安藤朝章, 青木 茂, 小林真哉, 今井英人, 白井智之, 伊藤 誠. 自然発症慢性膵炎モデル(WBN/Kobラット)における angiotensin II receptor type 1 antagonist (AII A)の炎症・線維化抑制効果について. 第89回日本消化器病学会総会 さいたま 2003年4月24-26日

I. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

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

WBN/Kob ラット慢性膵炎における TP53INP1 遺伝子の発現動態

研究報告者 澤武紀雄 金沢大学がん研究所腫瘍内科 教授
共同研究者 元雄良治, 姜 培紅 金沢大学がん研究所腫瘍内科

【研究要旨】

TP53INP1 遺伝子は腺房細胞のアポトーシスとほぼ平行して膵炎発症期と進展期に発現が増大し、発現の局在は主に膵腺房細胞であった。同モデルで p53 遺伝子は膵炎発症期にのみ強く誘導された。さらにラット膵腺房培養細胞 AR4-2J ではアルギニン刺激後 6 時間で TP53INP1 遺伝子発現はピークに達し、アポトーシスと p53 遺伝子発現のピークは 24 時間後であった。以上より、本遺伝子は腺房細胞のアポトーシスを介して慢性膵炎の発症と進展に関与することが推測された。

A. 研究目的

Tumor protein p53-induced nuclear protein 1 (TP53INP1) 遺伝子は最近発見された、急性膵炎時に膵腺房細胞に強く誘導されるストレス蛋白をコードする遺伝子である¹⁻³⁾。本遺伝子は p53 依存性に発現し、細胞のアポトーシスを促進することが報告されているが⁴⁾、慢性膵炎における発現動態は解明されていない。今回 WBN/Kob ラット慢性膵炎モデルを用いて本遺伝子発現動態を明らかにしようとした。

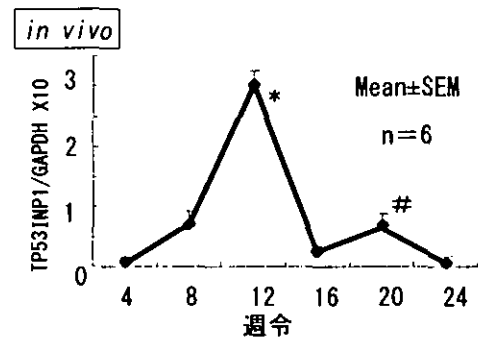
B. 研究方法

4 週令の雄性 WBN/Kob ラットを特殊繁殖飼料 MB-3 で飼育し、4 週毎に犠牲死させ、膵組織を摘出した。TP53INP1 遺伝子発現は RT-PCR 法にて GAPDH との比を取り、半定量化し、その動態を検討した。またアルギニン処理膵腺房培養細胞 AR4-2J においても本遺伝子の発現を検討した。(倫理面への配慮)動物実験に際しては金沢大学実験動物研究施設の承認を得た。

C. 研究結果

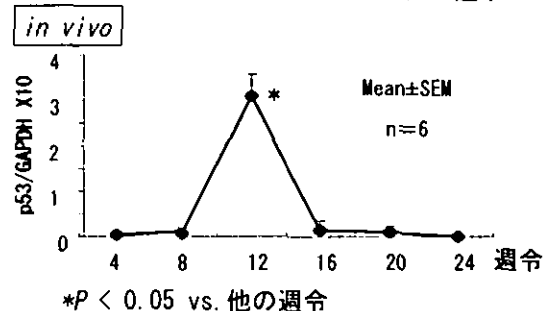
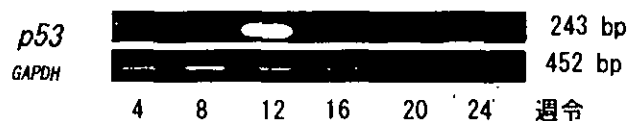
WBN/Kob ラット自然発症慢性膵炎は 12 週令で発症し、炎症のピークは 12 週令、アポトーシス (TUNEL 法) のピークは 12 週令と 20 週令に認められた。本モデルにおける本遺伝子の発現動態を RT-PCR 法で検討したところ、本遺伝子は腺房細胞のアポトーシスとほぼ平行して膵炎発症期と進展期に発現が増大した(図 1)。発現の局在は主に膵腺房細胞であった(*in situ hybridization* 法)。同モデルで p53 遺伝子は膵炎発症期にのみ強く誘導された(図 2)。さらに腺房細胞での発現をラット膵腺房培養細胞 AR4-2J において検討すると、ア

ルギニン刺激後 6 時間で TP53INP1 遺伝子発現はピークに達し(図 3)、アポトーシスと p53 遺伝子発現のピークは 24 時間後であった(図 4)。



* $p < 0.05$ vs. 他の週令. # $p < 0.05$ vs. 16週令

図 1 WBN/Kob ラット膵組織における TP53INP1 遺伝子の発現動態



* $P < 0.05$ vs. 他の週令

図 2 WBN/Kob ラット膵組織における p53 遺伝子の発現動態

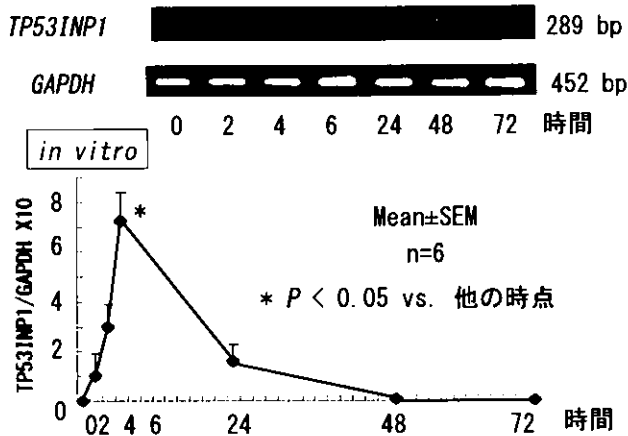


図3 アルギニン負荷ラット膵腺房細胞 AR4-2J における TP53INP1 遺伝子の発現動態

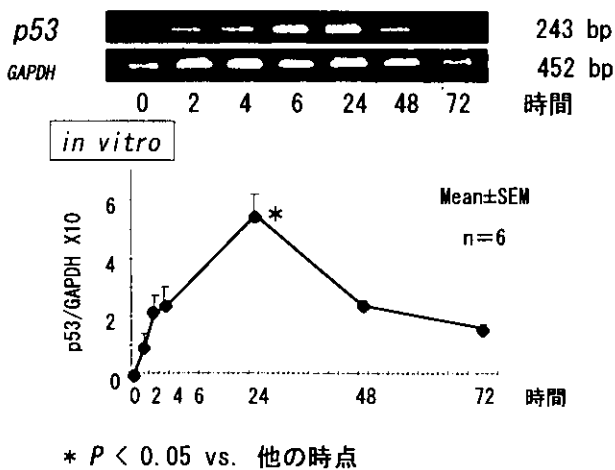


図4 アルギニン負荷ラット膵腺房細胞 AR4-2J における p53 遺伝子の発現動態

D. 考察

TP53INP1 遺伝子は急性膵炎時に過剰発現する遺伝子群の中から発見された新規のストレス蛋白 TP53INP1 をコードする。本遺伝子は急性膵炎時には膵においてのみ発現が誘導される。本研究では慢性膵炎における本遺伝子発現動態をはじめて明らかにした。本遺伝子は WBN/Kob ラットにみられる自然発症慢性膵炎の発症期である 12 週令に強く誘導され、一旦低下した後、慢性膵炎進展期である 20 週令で再度発現が増加した。TUNEL 法で検討した腺房細胞のアポトーシスも 12 週令と 20 週令のふたつのピークを示した。これまでの検討により、Fas, Fas リガンドなどのアポトーシス関連因子も同様の発現動態を取る。一方、

TP53INP1 遺伝子発現は野生型 p53 遺伝子発現に依存することが報告されていることから、本研究においても p53 の発現を検討したところ、p53 mRNA は 12 週令にのみ強く誘導され、20 週令での再増加はみられなかった。また、*in vitro* にて膵腺房細胞株 AR4-2J における両遺伝子の発現動態を比較するとアルギニン刺激後、TP53INP1 が 6 時間、p53 が 24 時間でピークを示した。この *in vitro* の実験では TP53INP1 が p53 に先行して発現が増加していたが、これは TP53INP1 遺伝子発現のすべてが p53 依存性でないことを反映している。私共はこれまでの膵炎関連蛋白や細胞増殖因子などの発現動態に関する成績から、12 週令でのアポトーシス増加は活動性炎症期における腺房細胞の生体防御的反応、20 週令でのアポトーシス増加は腺房細胞の修復・再生を反映しているのではないかと推測している。TP53INP1 遺伝子もこのような機序に関与している可能性が考えられる。

E. 結語

TP53INP1 遺伝子は WBN/Kob ラット自然発症慢性膵炎モデルにおいて膵炎発症期と進展期において発現が増加し、その発現動態は腺房細胞のアポトーシスと平行していたことから、TP53INP1 遺伝子は腺房細胞のアポトーシスを介して慢性膵炎の発症と進展に関与していることが示唆された。

F. 参考文献

1. Okamura S, Arakawa H, Tanaka T, Nakanishi H, Ng CC, Taya Y, Monden M, Nakamura Y. p53DINP1, a p53-inducible gene, regulates p53-dependent apoptosis. *Mol Cell* 2001; 8:85-94.
2. Tomasini R, Samir AA, Vaccaro MI, Pebusque MJ, Dagorn JC, Iovanna JL, Dusetti NJ. Molecular and functional characterization of the stress-induced protein (SIP) gene and its two transcripts generated by alternative splicing. SIP induced by stress and promotes cell death. *J Biol Chem* 2001; 276: 44185-92.
3. Nowak J, Tomasini R, Mattei MG, Azizi Samir LA, Dagorn JC, Dusetti N, Iovanna JL, Pebusque MJ. Assignment of tumor protein p53 induced nuclear protein 1 (TP53INP1)

gene to human chromosome band 8q22 by in situ hybridization. *Cytogenet Genome Res* 2002; 97: 140E.

4. Tomasini R, Samir AA, Pebusque MJ, Calvo EL, Totaro S, Dagorn JC, Dusetti NJ, Iovanna JL. P53-dependent expression of the stress-induced protein(SIP). *Eur J Cell Biol* 2002; 81: 294-301.

G. 健康危険情報

該当なし

H. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Xie MJ, Motoo Y, Iovanna JL, Su SB, Ohtsubo K, Matsubara F, Sawabu N. Overexpression of pancreatitis-associated protein (PAP) in human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Dig Dis Sci* 2003; 48: 459-64.
- 2) Motoo Y, Xie MJ, Su SB, Sawabu N. Molecular mechanisms of therapeutic effects of Saiko-keishi-to on spontaneous chronic pancreatitis in the WBN/Kob rat. *J Trad Med* 2003; 20: 143-9.
- 3) Wakabayashi T, Kawaura Y, Satomura Y, Watanabe H, Motoo Y, Okai T, Sawabu N. Clinical and imaging features of autoimmune pancreatitis with focal pancreatic swelling or mass formation: comparison with so-called tumor-forming pancreatitis and pancreatic carcinoma. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 2679-87.

2. 学会発表

- 1) 元雄良治, 澤武紀雄. 急性膵炎重症化予知マーカーとしての血清 PAP 測定の意義. 第 89 回日本消化器病学会総会(パネルディスカッション3)さいたま 2003年4月24-26日
- 2) 元雄良治, Iovanna JL, Dagorn JC, 毛利久継, 大坪公士郎, 山口泰志, 渡邊弘之, 澤武紀雄. 膵癌における pancreatitis-associated protein(PAP)の発現: 血清・膵液・組織レベルでの検討. 第 34 回日本膵臓学会大会 千葉 2003年7月10-11日
- 3) 姜 培紅, 元雄良治, Iovanna JL, 毛利久継, 澤武紀雄. 自然発症慢性膵炎モデル(WBN/Kob

ラット)における tumor protein p53-inducible nuclear protein 1 (TP53INP1)の発現動態. 第 45 回日本消化器病学会大会(プレナリーセッション) 大阪 2003年10月15-18日

I. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む.)

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

慢性膵炎における膵内神経増生についての検討

研究報告者 岡崎和一 関西医科大学第三内科 教授

共同研究者 高御堂祥一郎, 久保田佳嗣¹⁾, 片岡洋祐, 山田久夫²⁾

¹⁾ 関西医科大学第三内科, ²⁾ 関西医科大学第一解剖

【研究要旨】

自然発症慢性膵炎モデルラット(WBN/Kob ラット)を用いて慢性膵炎時に膵内で増生する末梢神経の起源を神経トレース法で検討した。Horseradish peroxidase(HRP)を用いた逆行性トレース実験において、膵内神経終末から後根神経節(Th9-L1)へトレースされる神経節細胞数はWBN/Kob ラットで減少していた。一方、biotinylated dextran amine(BDA)を用いた順行性トレース実験において、後根神経節(Th13)から膵内へトレースされる神経終末はWBN/Kob ラットで増加していた。以上より、慢性膵炎時には膵内神経の起始ニューロンは減少しているものの、その軸索分枝が増生しているものと考えられた。また免疫組織化学的検討において、WBN/Kob ラットの脊髄後角(Th13)で c-fos の発現が増強していたことより、この軸索分枝の増生と疼痛症状との関連が示唆された。

A. 研究目的

慢性膵炎の病理組織所見として線維化とともに膵内末梢神経の数・経の増加がみられ、疼痛症状との関連が連想されているが、その起源および機能については明らかでない。今回われわれは自然発症慢性膵炎モデルラットを用いて慢性膵炎時に膵内で増生する末梢神経の起源を神経トレース法で検討した。

B. 研究方法

WBN/Kob 系雄性ラット(CP モデル群)は24週齢まで特殊繁殖飼料 MB-3 にて飼育した。対称として標準飼料で飼育した同週齢の正常 Wistar ラット(コントロール群)を用いた。

1. 逆行性軸索輸送物質による神経トレース

各群5匹の24週齢ラットをハロセン吸入麻酔下にて腹部正中開腹した後、0.5% wheat germ agglutinin conjugated horseradish peroxidase (WGA-HRP)と15% horseradish peroxidase(HRP)の混合液(以下 HRP と記述)80 μ l を30G 針を用いて膵組織内および膵被膜下に圧注入し、3日後にジエチルエーテル麻酔下で灌流固定。Th9-L1 の後根神経節および副交感神経に伴走する知覚神経の節状神経節を摘出し、後固定、sucrose 化した後、20 μ m 厚の凍結連続切片を作成した。TMB 法により酵素反応をおこない、各神経節での HRP 陽性細胞数をカウントした。神経節の総細胞数は neutral red で対比染色しカウントした。

2. 順行性軸索輸送物質による神経トレース

各群3匹の22週齢ラットをハロセン吸入麻酔下にて背部正中切開、Th13 の椎弓切除を施行し、左 Th13 の後根神経節を露出。10% BDA 約0.5-1.0 μ l を30G 針を用いて神経節内に圧注入し、2週間後にジエチルエーテル麻酔下で灌流固定。膵臓を摘出し、後固定、sucrose 化した後、20 μ m 厚の凍結連続切片を作成。神経終末のマーカである synaptophysin とトレースされた BDA の蛍光二重染色をおこない、各動物とも任意の3切片での膵内 BDA 陽性神経終末をカウントした。

3. 脊髄後角における c-fos 免疫組織化学

各群3匹の24週齢ラットをジエチルエーテル麻酔下で灌流固定。Th13 の脊髄を摘出し、後固定、sucrose 化した後、20 μ m 厚の凍結連続切片を作成した。抗 c-fos 抗体を用いた免疫組織化学染色をおこない、DAB にて発色した後、任意の3切片における脊髄後角の c-fos 陽性細胞数をカウントした。

(倫理面への配慮)本研究は、関西医科大学動物実験委員会に申請し、許可を受けている。

C. 研究結果

1. 膵内神経終末から各神経節への HRP 逆行性トレース実験において、CP モデル群ではコントロール群に比べ膵支配レベルの後根神経節における HRP 陽性細胞数の割合が減少していた。一方、節状神経節では有意差はみられなかった(図1a, b)。

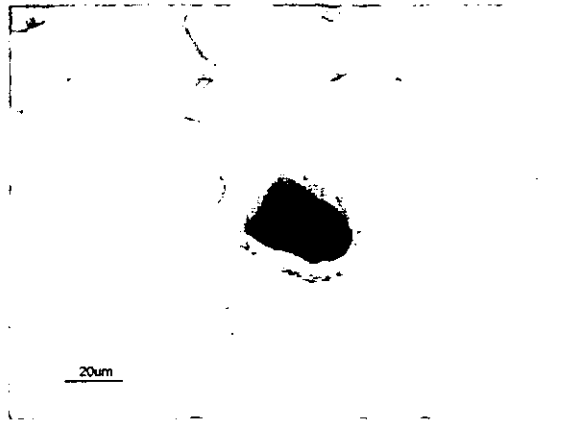


図 1 a HRP により膵臓からトレースされた
脊髄後根神経節細胞 (WBN/Kob ラット)

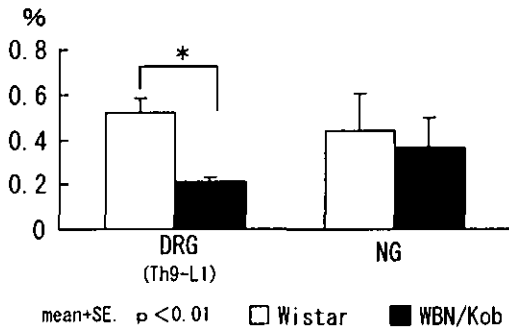


図 1 b 脊髄後根神経節 (Th9-L1) および
節状神経節 (NG) における HRP 陽性細胞の割合

2. 後根神経節 (Th13) から膵内神経終末への BDA 順行性トレース実験では, CP モデル群の膵内において synaptophysin 共陽性の BDA 陽性神経終末がコントロール群に比べ有意に増加していた (図 2 a, b).



図 2 a BDA により脊髄後根神経節 (Th13) から
トレースされた膵内神経軸索 (WBN/Kob ラット)

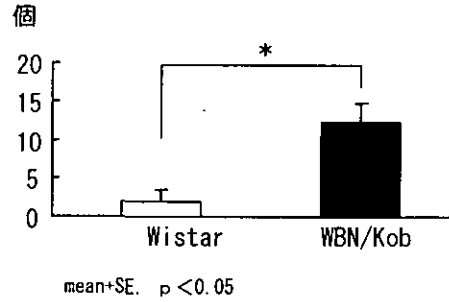


図 2 b 任意の 3 切片における膵内 BDA・synaptophysin
共陽性神経終末数の平均

3. CP モデル群では Th13 の脊髄後角における c-fos 発現が増強しており, コントロール群に対し有意差を認めた (図 3).

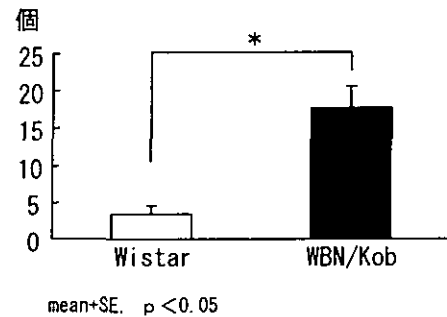


図 3 任意の 3 切片における脊髄後角 c-fos 陽性
神経細胞の合計

D. 考察

慢性膵炎時に膵組織内で増生している神経軸索には各種の神経ペプチドや神経栄養因子が発現しており, その発現の程度と膵炎特有の上腹部痛との相関を考察する論文は多い. 今回の神経トレース実験から, 慢性膵炎の進行により膵臓に投射する後根神経節細胞は減少し, 残存した神経細胞は膵内で軸索分枝を増生していることが示唆された. この軸索分枝の増生は神経細胞の発火閾値の低下, 発火頻度の上昇を惹起し, さらに軸索反射により組織炎症を悪化させる可能性もある. 本モデルでは膵支配レベルの脊髄後角において, 神経興奮のマーカである c-fos の発現が増強しており, この軸索分枝増生と疼痛症状との関連が示唆された.

E. 結語

慢性膵炎時の膵内神経増生は膵臓を支配する神経細胞の数の増加ではなく、膵内軸索分枝の増加によるものと思われた。この神経支配の変化と膵炎時の疼痛症状との関連が示唆された。

F. 参考文献

該当なし

G. 健康危険情報

該当なし

H. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Uchida K, Okazaki K, Asada M, Yazumi S, Ohana M, Chiba T, Inoue T. Case of chronic pancreatitis involving an autoimmune mechanism that extended to retroperitoneal fibrosis. *Pancreas* 2003; 26: 92-4.
- 2) Asada M, Yazumi S, Hisatsune H, Kodama Y, Hasegawa K, Okazaki K, Egawa H, Tanaka K, Chiba T. Endoscopic retrieval of broken external biliary stents from the bile duct after right-lobe living-donor liver transplantation. *Gastrointest Endosc* 2003; 57: 611-4.
- 3) Taniguchi T, Okazaki K, Okamoto M, Seko S, Tanaka J, Uchida K, Nagashima K, Kurose T, Yamada Y, Chiba T, Seino Y. High prevalence of autoantibodies against carbonic anhydrase II and lactoferrin in type 1 diabetes: concept of autoimmune exocrinopathy and endocrinopathy of the pancreas. *Pancreas* 2003; 27: 26-30.
- 4) Pearson RK, Longnecker DS, Chari ST, Smyrk TC, Okazaki K, Frulloni L, Cavallini G. Controversies in clinical pancreatology: autoimmune pancreatitis: does it exist? *Pancreas* 2003; 27: 1-13.
- 5) Okazaki K. Autoimmune pancreatitis is increasing in Japan. *Gastroenterology* 2003; 125: 1557-8.
- 6) 岡崎和一. 自己免疫性膵炎. *最新医学* 2003; 58: 2092-7.
- 7) 岡崎和一. 自己免疫性膵炎の病態とその基礎. *内科* 2003; 92: 734-6.

- 8) 岡崎和一. 慢性膵炎. *成人病と生活習慣病* 2004; 34: 107-9.
- 9) 岡崎和一. 良性閉塞性黄疸の治療の進歩—膵炎. *消化器内視鏡* 2004; 16: 69-76.
- 10) 岡崎和一. 自己免疫性膵炎. *老年消化器病* 2003; 15: 59-65.
- 11) 岡崎和一. 自己免疫性膵炎(1)病因と発症機序. *臨牀消化器内科* 2003; 19: 1771-8.
- 12) 岡崎和一. 自己免疫性膵炎. *現代医療* 2003; 11: 137-43.
- 13) 岡崎和一. 自己免疫性膵炎の内科的治療. *先端医療シリーズ* 25 肝・胆・膵疾患の最新医療 2003; 302-8.
- 14) 岡崎和一. 自己免疫性膵炎の診断基準は? *医薬の門* 2003; 43: 20-1.

2. 学会発表

- 1) Uchida K, Okazaki K, Yoshizawa H, Ohashi S, Chiba T. Involvement of Th1 type cytokines and chemokines in the induction of murine autoimmune pancreatitis. 104th Annual Meeting of the American Gastroenterological Association. Orlando May 17-22, 2003
- 2) Okazaki K, Uchida K, Asada M, Chiba T. Analysis of clinical phenotypes of autoimmune pancreatitis with special reference to immunological markers. 104th Annual Meeting of the American Gastroenterological Association. Orlando May 17-22, 2003
- 3) 河南知晴, 八隈秀二郎, 岡崎和一. 当院で経験した原発性硬化性胆管炎症例における大腸・膵疾患の合併. 第89回日本消化器病学会総会(ワークショップ)さいたま 2003年4月24-26日
- 4) 浅田全範, 岡崎和一, 千葉 勉. 自験例より見た自己免疫性膵炎の実態と病態生理の解析. 第89回日本消化器病学会総会(ワークショップ)さいたま 2003年4月24-26日

I. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む.)

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

膵腺房細胞の cell cycle time - Br3 および IU-4 による二重免疫染色を用いた検討

研究報告者 片岡慶正 京都府立医科大学大学院消化器病態制御学 助教授
共同研究者 阪上順一, 金光大石, 高田龍介, 伊藤令子, 元好朋子,
保田宏明, 岡上 武 京都府立医科大学大学院消化器病態制御学

【研究要旨】

我々は cholecystokinin(CCK)刺激によって約 24 時間後、一過性に膵腺房細胞の増殖が起こることを以前より報告してきた。今回我々は、Wistar 系雄性ラットに内因性 CCK releaser としての protease inhibitor である camostat mesilate を単回経口投与し、CCK レベルを一過性に上昇させた時の膵腺房細胞増殖における cell cycle time について Br3 および IU-4 を用いた二重免疫染色により組織学的に検討した。研究の結果、膵腺房細胞の cell cycle time における S 期に要した時間は約 10.3 時間であった。

A. 研究目的

我々は、ラット膵において cholecystokinin (CCK)刺激の約 24 時間後、一過性に膵腺房細胞の増殖が起こることを報告してきた¹⁾。そこで今回我々は、Wistar 系雄性ラットの内因性 CCK レベルを上昇させたときの膵腺房細胞増殖における cell cycle time, 特に S 期(DNA 合成時間)に要する時間について、Br3 および IU-4 を用いた二重免疫染色による組織学的な検討を研究目的とした。

B. 研究方法

8 週齢 Wistar 系雄性ラット(体重約 200 g)に camostat mesilate(50 mg/kg)を単回経口投与し、20 時間後に 5 mg/kg の bromodeoxyuridine(BrdU)を静脈内投与、23 時間後に 5 mg/kg の iododeoxyuridine(IdU)を静脈内投与し、24 時間後に犠牲死させ膵を摘出した。摘出した膵は methanol に 12 時間、4℃で固定後、パラフィン包埋した。4 μm 切片を作成し、Br3 および IU-4 を用い、immunogold-silver staining, new fuchsin staining にて BrdU, IdU の免疫組織染色を行った。

BrdU 投与時、細胞周期の S 期にある腺房細胞に BrdU が取り込まれるが、その 3 時間後の IdU 投与時、依然 S 期にある細胞では IdU もが取り込まれる。また、BrdU 投与から IdU 投与までの 3 時間のうちに新たに S 期に入った細胞には IdU のみを取り込まれる。Br3 に対する抗体である Br3, および BrdU, IdU の両方に対する抗体である IU-4 を用いて免疫組織染色を行うと、IdU のみ

でラベリングされた細胞核は IU-4 のみにより単一染色され、BrdU, IdU の両方でラベリングされた細胞核は Br3 および IU-4 により二重染色される(図 1)。膵腺房細胞核 4,000 個中の二重染色細胞核数および単一染色細胞核数を同一切片上でカウントし、以下の計算方法を用いて細胞周期の S 期に要した時間(Ts)を算出した²⁾。

$$Ts = (\text{二重染色細胞核数} / \text{単一染色細胞核数}) \times 3$$

尚、動物実験に際しては、京都府立医科大学動物実験指針に基づき同大学動物実験委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

膵腺房細胞核 4,000 個中の二重染色、単一染色された細胞核数をカウントした結果を示す(表 1)。上記の計算方法を用いて算出された S 期に要した時間(Ts)は、10.26 ± 0.49 時間であった。(mean ± SE; n=6)



図 1 Br3, IU-4 による二重染色
矢印: BrdU, IdU ともに陽性の膵腺房細胞
矢頭: IdU のみ陽性の膵腺房細胞

表 1 膵腺房細胞核 4,000 個中の二重染色細胞核数, 単一染色細胞核数, および算出された Ts.

	二重染色細胞核数 (/4,000)	単一染色細胞核数 (/4,000)	Ts(時間)
①	172	55	9.38
②	194	64	9.09
③	219	60	10.95
④	203	66	9.22
⑤	185	46	12.06
⑥	167	46	10.89
mean	190	56.16	10.26
SE	7.96	3.56	0.49

D. 考察

我々は従来から, ラットに内因性 CCK releaser として camostat を経口投与させると一過性の膵腺房細胞の増殖が起こることを報告してきた. 今回我々が, camostat 経口投与により内因性 CCK レベルを一過性に上昇させたときの膵腺房細胞増殖における cell cycle time, 特に S 期 (DNA 合成時間) について検討した結果, S 期に要した時間(Ts)は 10.26 ± 0.49 時間(mean \pm SE)であった. Cell cycle time についてはヒト肝細胞癌において報告されているが, Ts はおよそ 10 時間程度であり, 今回の我々の研究結果と大差はなかった. Camostat による膵腺房細胞増殖は CCK antagonist により阻害されることが報告されているが, 今後上記と同様の方法で CCK-A antagonist として loxiglumide を投与した場合の膵腺房細胞増殖における cell cycle time に与える影響についてもさらに詳細に検討していく予定である. また, camostat 経口投与に代えて CCK-8 を皮下投与し, 外因性に CCK レベルを上昇させた場合についても同様に検討していきたい.

E. 結語

ラットにおいて, 内因性 CCK レベルを一過性に上昇させた時の膵腺房細胞増殖における S 期に要する時間は約 10.3 時間であった.

F. 参考文献

1. 阪上順一. 膵腺房細胞の増殖および細胞死に関する組織学的研究. 膵臓病研究財団第 1 回報告書. 1997; 85-90.
2. Nakajima T, Kagawa K, Deguchi T, Kimura H,

Kakusui M, Katagishi T, Mitsumoto Y, Okanou T, Kashima K, Ashihara T. Novel formula for cell kinetics in xenograft model of hepatocellular carcinoma using histologically calculable parameters. Exp Cell Res 1999; 246: 412-20.

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 (予定を含む.)

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

研究報告者 丸山勝也 国立療養所久里浜病院 院長
共同研究者 朴沢重成 東海大学医学部消化器内科

【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 発現はゼラチンゼイモグラフィ、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 発現を亢進させ、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。

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。本研究では、エタノール、NO、IL-1 β などが、活性化されたヒト膵星細胞のコラーゲン代謝に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、NO、IL-1 β を添加し、コラーゲンおよびマトリックスメタロプロテアーゼ(MMPs and TIMPs)の発現変化とその分子機構を検討するのが目的である。

本年度は、供与を受け保存していた hPFC の viability が非常に悪く、エタノールあるいは NO の供与体を添加した検討を満足に行うことができなかった。したがって、本報告では IL-1 β による MMP-1 の発現調節に関する研究のうち投稿中論文の内容の一部につき報告する。

B. 研究方法

hPFC は滋賀医大内科の五月女、新谷、安藤、馬場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ゼ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 μ m 径の孔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、24 時間後に上層から下層に移動した細胞を染色・算定することによって行った。

RhoA 蛋白の特異的阻害剤である C3-transferase による処理および RhoA および Rac1 の dominant-negative 型を強制発現させるアデノウイルスベクター(AdCARhoAN19 for RhoA, or AdCARacN17 for Rac1)の感染処理を行い、IL-1 β (5 ng/ml)処理群とコントロール群間で、上記のパラメーターの比較検討を行った。

(倫理面への配慮)本実験に用いた 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許可を得ている。

C. 研究結果

IL-1 β によって亢進した MMP-1 の蛋白および遺伝子発現は C3-transferase や RhoA の dominant-negative mutant によって抑制されなかったが、Rac1 の dominant-negative mutant は、IL-1 β による MMP-1 発現亢進を抑制した。

コラーゲンを介した hPFC の細胞運動能は IL-1 β (5 ng/ml)により亢進したが、C3-transferase や AdCARhoAN19 では亢進した細胞運動能は抑制されなかった。しかし、IL-1 β (5 ng/ml)により亢進した hPFC の細胞運動能は、AdCARacN17 によって抑制された。

以上により、①IL-1 β は、hPFC における MMP-1 の発現を遺伝子転写レベルで調節していることが示唆された。②hPFC において、IL-1 β によって亢進した MMP-1 の遺伝子発現は少なくともその一部は低分子量 G 蛋白である Rac1GTPase によって調節を受けていることが示唆された。③IL-1 β

によって亢進した hPFC の細胞運動能も Rac1 によって調節を受けていることが示唆された。

D. 考察

今回の検討にて、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、少なくとも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、あるいは RhoA 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って、抑制されなかった。低分子量 G 蛋白 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た。細胞内アクチンの再構成を介して細胞運動・形態変化の調節に関与している Rho ファミリーが、間質組織の再改変に関わる MMP-1 の発現調節にも関わっていることは、慢性膵炎の際に活性化された膵星細胞の組織内発現を考えると合目的である。Kheradmand さん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¹⁾、我々の実験結果を支持する。他の低分子量 G 蛋白 Rho ファミリーの関与に関しては、今回未検討であり今後検討を加えなければならないと考えられる。

現在、hPFC に 50mM と 100mM の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 ながらもコントロール群と比較し MMP-1 蛋白の発現は亢進することが示唆されている。アルコール添加だけでなく、NO 供与体の添加による検討を予定していたが、本年度は hPFC の viability が非常に悪く満足な検討ができなかった。今年度の研究成果報告には現在投稿中の論文内容の一部を提示させて頂いた。

E. 結語

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が RhoA 蛋白ではなく、少なくとも Rac1 蛋白を介していること

が示唆された。

F. 参考文献

1. 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（予定を含む）

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

Ⅲ. 自己免疫性膵炎

1) 共同研究プロジェクト

自己免疫性膵炎の疫学調査, 自己免疫性疾患に合併する慢性膵炎の実態調査

研究報告者 西森 功 高知大学医学部消化器病態学 講師
共同研究者 大槻 眞 産業医科大学第三内科

【研究要旨】

全国の内科(消化器科を含む), 外科(消化器外科を含む)を標榜する診療科を対象に, 層化無作為抽出法により自己免疫性膵炎の年間受療者数を推計した(有効回収率 33.02%)。その結果, 2002年の1年間に医療機関を受診した患者数は, ①日本膵臓学会による診断基準を満たす自己免疫性膵炎: 900人(95%信頼区間: 670-1,110人), ②診断基準は満たさないが自己免疫性膵炎と考えられる膵炎: 800人(同 410-1,180人), ③上記以外で自己免疫疾患(膠原病)に合併した慢性膵炎: 530人(同 250-810人)であった。また, 過去10年間における診断基準を満たす自己免疫性膵炎362症例の検討より, 自己免疫性膵炎の男女比は2.5:1であった。今後, 回答のあった診療科に対し第二次調査(個人調査)を行い, 自己免疫性膵炎の臨床像や診断基準における問題点を明らかにし, さらに自己免疫性膵炎の治療ガイドラインの策定をめざす。

A. 研究目的

いわゆる膵管狭細型膵炎においてステロイド治療の奏効することが報告され, 自己免疫性膵炎として注目されるようになった¹⁾。2002年には日本膵臓学会から自己免疫性膵炎の臨床診断基準が発表され²⁾, 本疾患概念は認知されつつある。しかし, 本症には未だ不明の点が多く, 多数の症例による臨床像の解析と病態の解明が望まれている。

平成11-13年度本研究班(班長: 小川道雄)ではいわゆる自己免疫性膵炎の実態調査を行い, 基本的な臨床像について検討した³⁻⁶⁾。本調査研究では新しく提示された診断基準をもとに, 自己免疫性膵炎の全国調査(一次調査)を行い, 年間受療者数を推計する。また, 自己免疫性膵炎の診断基準を満たさないが同疾患が疑われる膵炎症例(いわゆる疑診例), あるいは他の自己免疫性疾患に合併した慢性膵炎症例についても全国調査を行う。これらの症例の臨床像について二次調査を行い, 自己免疫性膵炎の診断における問題点と合併病態を明らかにする。また, これまで系統的な検討がされていない治療と予後についても詳細な調査を行い, ステロイド治療の適応と投与方法についてのガイドラインの構築をめざす。

B. 研究方法

1. 調査項目

平成14年1月1日から12月31日の1年間に医療機関を受診した膵炎症例(継続療養症例を含む)につき, 次の項目に該当する症例数を調査す

る。

- ①日本膵臓学会による診断基準²⁾を満たす自己免疫性膵炎症例
 - ②日本膵臓学会による診断基準²⁾は満たさないが自己免疫性膵炎と考えられる膵炎症例
 - ③上記以外で自己免疫疾患(膠原病)に合併した慢性膵炎症例
- さらに, 次の項目を満たす症例についても調査を行う。なお, 項目⑤は共同研究「慢性膵炎の実態調査」の一環として行うものである。
- ④平成5年1月1日から平成14年12月31日の過去10年間において日本膵臓学会による診断基準を満たす自己免疫性膵炎症例
 - ⑤過去1年間の慢性膵炎症例(確診, 準確診で自己免疫性膵炎を含まない)

2. 調査対象と方法

調査対象は全国の内科(消化器科を含む), 外科(消化器外科を含む)を標榜する診療科で層化無作為抽出法による調査を行う。抽出層は大学附属病院, 一般病院500床以上, 400-499床, 300-399床, 200-299床, 100-199床, 99床以下で, 抽出率はそれぞれ, 100%, 100%, 80%, 40%, 20%, 10%, 5%とする(表1)。特に症例が集中すると考えられる病院は特別階層病院として, 全病院を調査対象とする。

調査は郵送法で第一次調査と第二次調査からなる。第一次調査で回答期限までに返送のなかった診療科には再度依頼を行う。第一次調査で「患者