

induced acute pancreatitis. *Pancreatology* 2003; 3: 69–74.

3. Lum JJ, Bauer DE, Kong M, Harris MH, Li C, Lindsten T, Thompson CB. Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell* 2005; 120: 237–248.

G. 健康危険情報

該当なし

H. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Motoo Y, Xie MJ, Mouri H, Sawabu N. Expression of interleukin-8 in human obstructive pancreatitis. *Journal of the Pancreas (JOP)* 2004; 5: 138–144.
- 2) Jiang PH, Motoo Y, Iovanna JL, Pébusque MJ, Xie MJ, Okada G, Sawabu N. Tumor protein p53-induced nuclear protein 1 (TP53INP1) in spontaneous chronic pancreatitis in the WBN/Kob rat: drug effects on its expression in the pancreas. *Journal of the Pancreas (JOP)* 2004; 5: 205–216.
- 3) Jiang PH, Motoo Y, Vaccaro MI, Iovanna JL, Okada G, Sawabu N. Expression of vacuole membrane protein 1 (VMP1) in spontaneous chronic pancreatitis in the WBN/Kob rat. *Pancreas* 2004; 29: 225–230.
- 4) Wakabayashi T, Kawaura Y, Satomura Y, Watanabe H, Motoo Y, Sawabu N. Long-term prognosis of duct-narrowing chronic pancreatitis: strategy for steroid treatment. *Pancreas* 2005; 30: 31–39.

2. 学会発表

- 1) Motoo Y, Jiang PH, Iovanna JL, Sawabu N. Gene expression kinetics of TP53INP1 and VMP1 in chronic pancreatitis in the WBN/Kob rat. Joint meeting of the 11th Meeting of the International Association of Pancreatology and the 35th Annual Meeting of the Japan Pancreas Society. Sendai, July 11–14, 2004
- 2) Wakabayashi T, Satomura Y, Urabe T, Watanabe H, Motoo Y, Sawabu N. Long-term prognosis of duct-narrowing chronic pancreatitis: indications for steroid treatment. Joint meeting of the 11th

Meeting of the International Association of Pancreatology and the 35th Annual Meeting of the Japan Pancreas Society. Sendai, July 11–14, 2004

- 3) 毛利久継, 元雄良治, 大坪公士郎, 山口泰志, 渡邊弘之, 澤武紀雄. ヒト慢性膵炎におけるインターロイキン8の発現. 第101回日本内科学会総会, 東京, 2004年4月8–10日
- 4) 元雄良治, 澤武紀雄. 慢性膵炎の進展機序の基礎的検討と治療薬の効果: 新規膵炎関連蛋白の発現動態を中心に. 第90回日本消化器病学会総会, 仙台, 2004年4月21–23日
- 5) 若林時夫, 里村吉威, 澤武紀雄. 自己免疫性膵炎をめぐる新しい展開: 血清免疫学的異常を伴わない膵管狭細型慢性膵炎の検討. 第46回日本消化器病学会大会・DDW2004 (パネルディスカッション), 福岡, 2004年10月21–24日
- 6) 若林時夫, 川浦幸光, 里村吉威, 卜部 健, 渡邊弘之, 元雄良治, 澤武紀雄. 膵管狭細型慢性膵炎の治療と予後. 第68回日本消化器内視鏡学会総会・DDW2004, 福岡, 2004年10月21–24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の支配様式

研究報告者 岡崎和一 関西医科大学内科学第三 教授

共同研究者

高御堂祥一郎，池浦 司，松下光伸，久保田佳嗣（関西医科大学内科学第三）
片岡洋祐，山田久夫（関西医科大学解剖学第一）

【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知覚神経の終末構造について神経トレース法と免疫組織化学的手法を組み合わせで検討した。Biotinylated Dextran Amine (BDA) により後根神経節（Th13）から膵内へトレースされる後根神経節細胞の軸索の一部は膵内在性の神経細胞の周囲に分布しており，さらにその終末部は内在性神経細胞の近傍にある衛星細胞様の小型細胞を取り囲むような構造をとっていた。この小型細胞は神経特異性蛋白の PGP9.5 陽性であり，後根神経節細胞との神経伝達機構の存在が示唆されたが，今回の検討では詳細は不明であった。

A. 研究目的

慢性膵炎時にみられる膵内神経増生は疼痛症状や炎症の増悪に関与している可能性があるが，増生している神経の機能・終末構造の詳細は明らかでない。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知覚神経の終末構造について神経トレース法と免疫組織化学的手法を組み合わせで検討した。

B. 研究方法

WBN/Kob系雄性ラット（慢性膵炎モデル群）は24週齢まで特殊繁殖用飼料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。

各群5匹の24週齢ラットをハロセン吸入麻醉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% Biotinylated dextran amine (BDA) 約0.5～1.0 μ lを神経節内に圧注入し，2週間後にジエチルエーテル麻醉下で灌流固定。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。さらに，神経系細胞のマーカー（PGP9.5, Neuro D, Nestin, GFAP, GAP-43），膵内分泌細胞のマーカー（Glucagon, Insulin, Somatostatin, PP, PDX-1），免疫系細胞のマーカー（Serotonin, Mast Cell Tryptase, COX-2），各種神経ペプチドと受容体（Substance P, NK-1R, CGRP, RCP, NPY, VIP）とBDAの蛍光二重染色をおこなった。

（倫理面への配慮）

当大学の動物実験倫理委員会の承認を得ている。

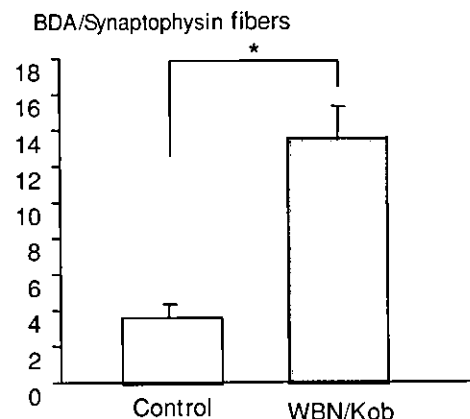


図1 BDAにより脊髄後根神経節（Th13）からトレースされた膵内神経軸索（WBN/Kob ラット）

C. 研究結果

1. 後根神経節 (Th13) から膵内神経へのBDA順行性トレース実験では, 慢性膵炎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優位に増加していた (図1).

2. トレースされた神経の一部は膵内在性の神経細胞・神経節にその終末を伸ばしており, 蛍光二重染色では知覚のtransmitterであるSubstance PやCGRPを含有していた. また, 慢性膵炎モデル群では神経可塑性マーカーのGAP-43が強く発現していた. さらに, この終末部はPGP9.5陽性の衛星細胞様小型細胞を取り囲むような構造をとっていた.

D. 考察

慢性膵炎時に膵組織内で増生している神経軸索と疼痛症状の関連について考察している論文はあるが, その増生神経の起源, 機能の詳細はいまだ不明な点が多い. 今回の神経トレース実験と蛍光二重染色を用いた検討により, 慢性膵炎時に増生・伸長している後根神経節細胞の軸索と膵内在性の神経細胞との密接な関連が示唆された. トレースされた神経終末の一部は膵内在性神経細胞の周囲にあるPGP9.5陽性の衛星細胞様小型細胞を取り囲むように存在していたが, その機能・意義は不明であり今後さらなる調査を要する.

E. 結語

慢性膵炎時に増生している後根神経節細胞の軸索と膵内在性の神経細胞およびその周囲の衛星細胞様小型細胞との間に, なんらかのinteractionの存在を示唆する形態学的変化が観察された.

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) 岡崎和一. フローチャートでみる生活習慣病診療指針1 慢性膵炎. 成人病と生活習慣病 2004; 34: 107-109.
- 2) 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.
- 3) 岡崎和一. 慢性膵炎の成因と臨床像. 消化器の臨床 2004; 7: 466-471.
- 4) 岡崎和一. 膵炎. 産科と婦人科 2004; 71: 1682-1690.

2. 学会発表

- 1) Takamido S, Kataoka Y, Cui Y, Tanano A, Kubota Y, Okazaki K, Yamada H. Intrapancreatic axonal branching of afferent nerve fibers in a rat model for chronic pancreatitis. 11th Meeting of the international association of pancreatology (IAP) 2004. Sendai, July 11-14, 2004.

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

慢性膵炎の新しい治療法に関する研究 —taurineの膵線維化抑制作用に関する研究—

研究報告者 越智浩二 岡山大学大学院生体情報医学 助教授

共同研究者

白髭明典，松下公紀，水島孝明（岡山大学附属病院中央検査部）

【研究要旨】

慢性膵炎の新しい治療法を開発する一環として，taurineの膵の線維化に対する効果を検討した．実験膵線維化モデルとして，Wistar系雄性ラットにDBTC（dibutyltin dichloride）6 mg/kg体重を静注するモデルを用い，1% taurine含有飲料水を与える群とtaurine非含有飲料水を与える群で検討を行った．DBTC投与によって膵に細胞浸潤，実質細胞の脱落，間質の線維化が惹起されるが，その変化はtaurine投与によって抑制され，線維化の定量でも有意に抑制が認められた．taurineの膵線維化抑制作用が明らかになったが，今後その機序，臨床的意義について検討する予定である．

A. 研究目的

現在わが国で行われている慢性膵炎に対する治療法は主に対症療法であり，非可逆的な膵の線維化に対する治療法は確立されてはいない．食生活の欧米化は慢性膵炎の発生頻度を上昇させることが知られているが，その機序についてはいまだ不明である．taurineは主に魚介類に含まれるアミノ酸で，食生活の欧米化とともに，近年日本人の摂取量が減少している．われわれは慢性膵炎の新しい治療法の開発や食生活の欧米化と慢性膵炎の関係を明らかにする目的で，taurineと慢性膵炎との関係を臨床的および実験膵線維化モデルでの検討を行っているが，今回は実験膵線維化モデルでの新しい知見が得られたので，報告する．

B. 研究方法

実験膵線維化モデルとして，体重200～250 gのWistar系雄性ratに，DBTC（dibutyltin dichloride）6mg/体重kgを静脈内投与する方法を用いた．taurine治療群では静注後，1% taurine含有飲料水の飲水を行い，無治療群ではtaurineを含まない飲料水を投与し，それぞれ4週後に屠殺した．屠殺後，膵を摘出し，膵の湿重量を測定し，ホルマリン固定後HE染色，およびmasson染色

を行った．膵の線維化の定量的判定にはmasson染色標本を用い，画像解析ソフト（Pop imaging）により，膵腺房領域，線維化領域を算出し， $\% \text{ fibrotic area} = \frac{\text{fibrotic area}}{\text{fibrotic area} + \text{acinar area}}$ として評価した．対照群として，生後12週のラットを用いた．検定にはt検定を用い，危険率5%以下を有意差とした．なお，研究の遂行にあたっては，当施設の動物実験規定を遵守して行った．

C. 研究結果

DBTC投与によって，著明な細胞浸潤と膵実質細胞の脱落，間質の線維化が惹起された．DBTC投与によって惹起された変化はtaurineの投与により，抑制された（図1）．膵の線維化の定量では，対照群が $0.6 \pm 0.3\%$ （mean \pm SE）であるのに対し，無治療群では $25.7 \pm 11.9\%$ ，taurine治療群では $2.8 \pm 1.9\%$ と，DBTC投与によって生じた膵の線維化はtaurine投与によって有意に抑制された．

D. 考察

DBTCによる膵の線維化は肝臓で代謝され，胆汁中に排泄されたDBTCが胆管上皮を障害し，脱落した上皮が膵管を閉塞し，膵の線維化を生

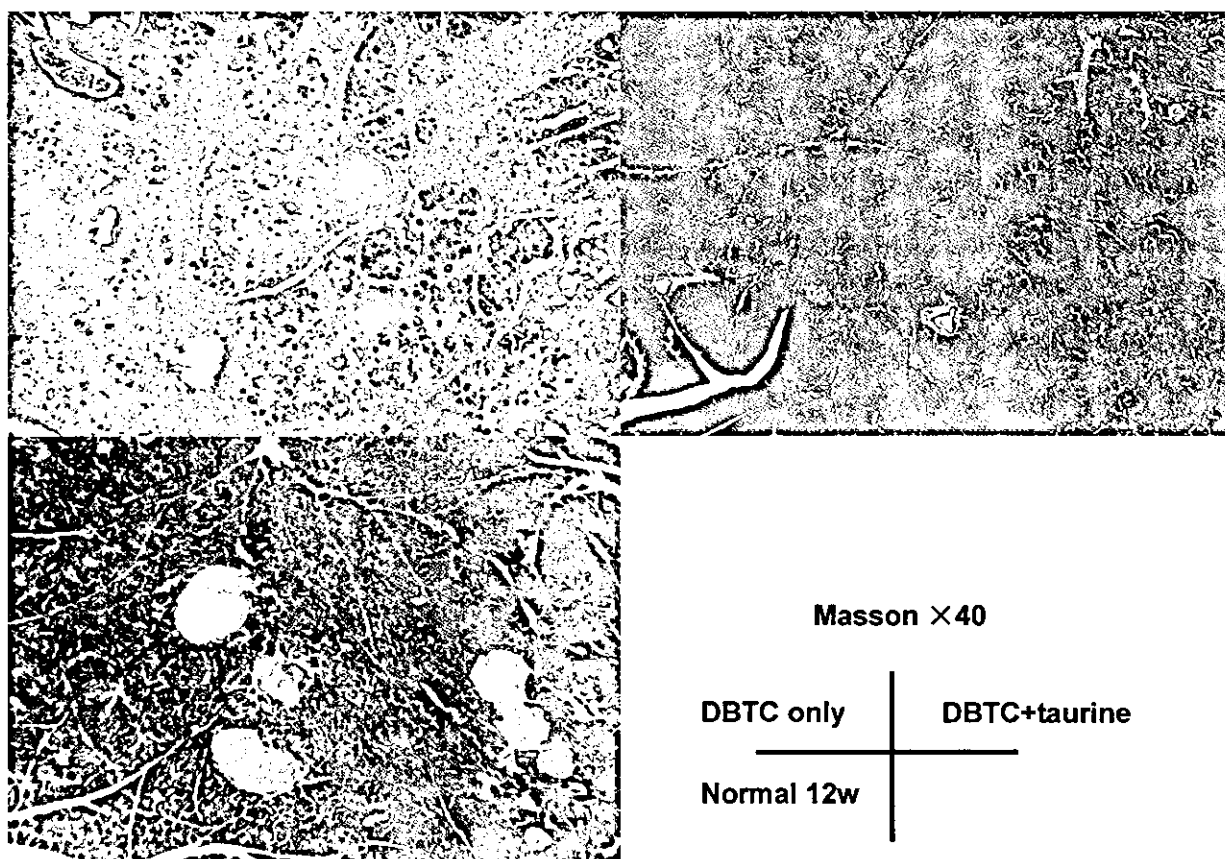


図1 DBTCの膵の線維化に対する taurine の効果

ずることが知られている¹⁾。このDBTCによる膵の線維化を taurine の連日投与によって抑止されることが明らかになった。taurine の線維化抑制効果は肝²⁾や肺³⁾では報告されているが、膵臓では報告されていない。その線維化抑制機能としては、肝では肝星細胞でのG0/G1 phase arrest を起こし、その増殖を抑制するとの報告がある⁴⁾。今後、膵星細胞への taurine の影響を検討し、その線維化抑制機序の解明を行うとともに、慢性膵炎患者での taurine 摂取量や血中、尿中 taurine 濃度の測定を行い、その臨床的な関与についても検討を行う予定である。

E. 結語

DBTCによって惹起される膵の線維化に対し、taurine は抑制効果を認めた。

F. 文献

1. Merkord J, Jonas L, Weber H, Kroning G, Nizze H, Hennighausen G. Acute interstitial pancreatitis in rats induced by dibutyltin dichloride (DBTC): pathogenesis and natural course of lesions.

Pancreas 1997; 15: 392-401.

2. Refik Mas M, Comert B, Oncu K, Vural SA, Akay C, Tasci I, Ozkomur E, Serdar M, Mas N, Alcgir G, Yener N. The effect of taurine treatment on oxidative stress in experimental liver fibrosis. Hepatol Res 2004; 28: 207-215.
3. Schuller-Levis GB, Gordon RE, Wang C, Park E. Taurine reduces lung inflammation and fibrosis caused by bleomycin. Adv Exp Med Biol 2003; 526: 395-402.
4. Chen YX, Zhang XR, Xie WF, Li S. Effects of taurine on proliferation and apoptosis of hepatic stellate cells in vitro. Hepatobiliary Pancreat Dis Int 2004; 3: 106-109.

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

Transforming growth factor- β (TGF- β) をターゲットとした 膵線維化治療の基礎的検討

研究報告者 大槻 眞 産業医科大学消化器・代謝内科 教授

共同研究者

永塩美邦, 浅海 洋, 渡邊史郎, 田口雅史, 田代充生, 木原康之
(産業医科大学消化器・代謝内科)

【研究要旨】

Transforming growth factor- β (TGF- β) をターゲットとした治療戦略が膵線維化の治療法となりうるか, cerulein 反復投与慢性膵炎モデルを用い検討した. 体重20g前後の雄性BALB/c系マウスに, 可溶性TGF- β 受容体発現アデノウイルス (AdT β -ExR) 5×10^8 PFU, β -galactosidase発現アデノウイルス (AdLacZ) 5×10^8 PFU, あるいは生理食塩水のいずれかを1回腹腔内投与し, 3日後より, cerulein $50 \mu\text{g}/\text{kg}$ 体重を1時間ごとに6回腹腔内投与して急性膵炎を惹起させ, この急性膵炎を週3回3週間計9回繰り返すことで膵線維化を作製した. AdLacZ群ではcerulein腹腔内投与3週間にて, 膵腺房の脱落と線維化, 線維化部位に一致して活性化膵星細胞の増殖を認めたが, AdT β -ExR群ではこれらの変化は軽度であった. また, 膵線維化が抑制されたAdT β -ExR群では, 慢性膵傷害後の膵重量は有意に増加した. AdT β -ExR群では, アポトーシスへ誘導される膵腺房細胞数が有意に減少したが, 膵腺房細胞の増殖活性には有意差は認められなかった. TGF- β の作用を抑制すると, 膵線維化のみならず慢性膵傷害後の膵萎縮も有意に抑制された. 抗TGF- β 治療が慢性膵炎の治療法となりうる可能性が示唆された.

A. 研究目的

ヒト慢性膵炎は, 膵実質の脱落と細胞外基質の沈着を特徴とする難治性疾患であり, その有効な治療法はいまだ確立されていない. Transforming growth factor- β (TGF- β) は膵臓をはじめとしたさまざまな臓器の線維化において重要な役割を果たしている. ヒト慢性膵炎の組織ではTGF- β 1が過剰発現しているし¹⁾, TGF- β 1トランスジェニックマウスを作製すると, その膵臓は実質の脱落と細胞外基質の沈着をきたし, 慢性膵炎様となる²⁾. また, TGF- β 1は膵線維化において中心的役割を果たす膵星細胞を活性化し, 細胞外基質産生を刺激する^{3,4)}. したがって, 抗TGF- β 治療が慢性膵炎の治療の一つの選択肢として考えられる.

そこで, II型 TGF- β 受容体の細胞外領域のみを有し, ligand吸着作用によりTGF- β の作用を抑制する可溶性TGF- β 受容体を用いて, TGF- β

をターゲットとした膵線維化治療の可能性に関して基礎的検討を行った.

B. 研究方法

体重20 g前後の雄性BALB/c系マウスに, 可溶性TGF- β 受容体発現アデノウイルス (AdT β -ExR) 5×10^8 PFU, β -galactosidase発現アデノウイルス (AdLacZ) 5×10^8 PFU, あるいは生理食塩水 (生食) のいずれかを1回腹腔内投与し, 3日後より, cerulein $50 \mu\text{g}/\text{kg}$ 体重を1時間ごとに6回腹腔内投与して急性膵炎を惹起させ, この急性膵炎を週3回3週間計9回繰り返すことで慢性膵炎モデルを作製した. 3週間後にマウスを犠牲死させ, 膵線維化を組織学的所見と膵内ヒドロキシプロリン含量にて評価した. 膵星細胞の活性化とその増殖を α -smooth muscle actin (α -SMA) の免疫染色にて評価した. 膵腺房におけるアポトーシスと細胞増殖活性を各々ssDNA陽

AdLacZ

AdT β -ExR

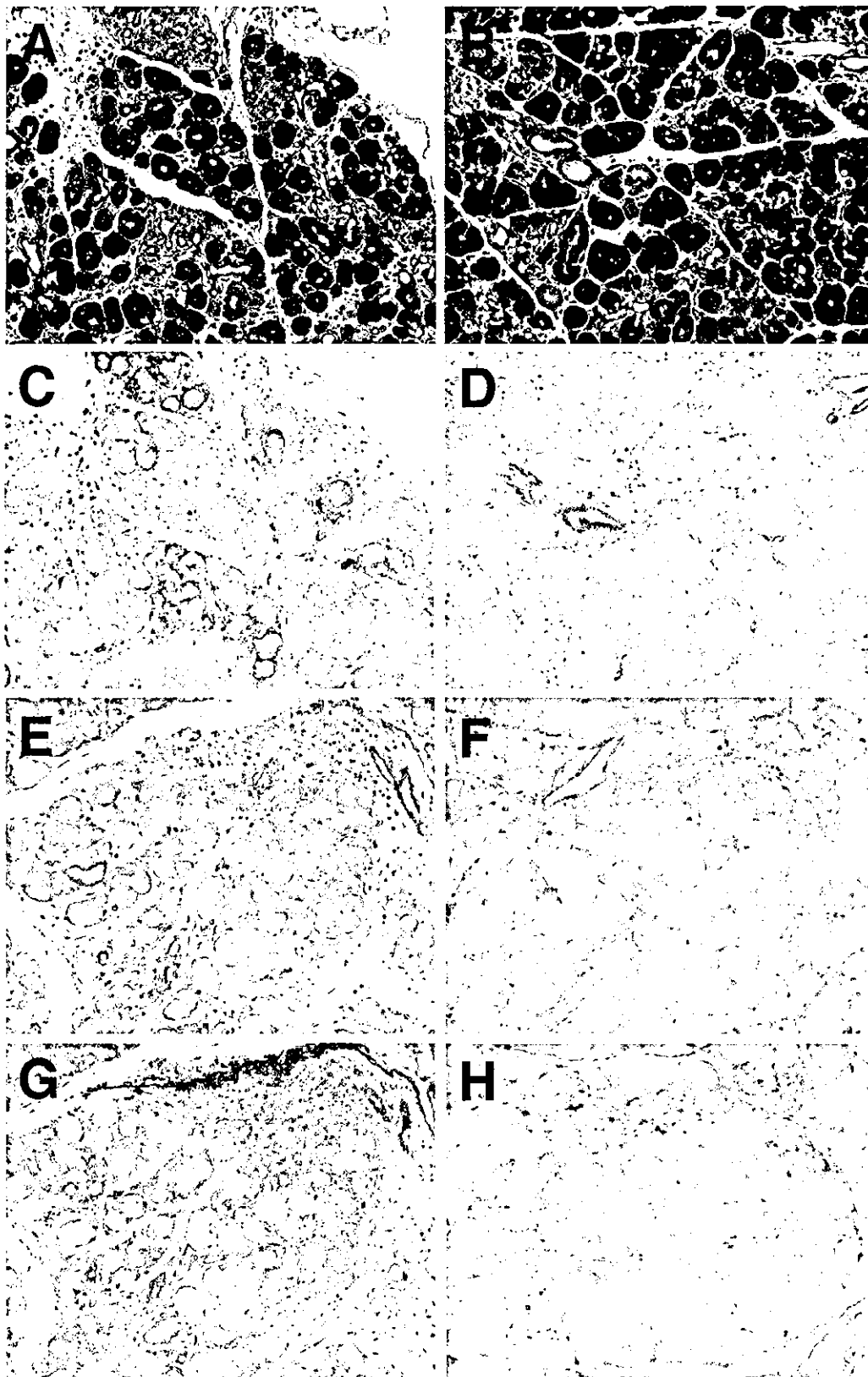


図1 組織学的検討

A, B: Azan 染色 C, D: α -SMA 免疫染色

E, F: Collagen type I 免疫染色 G, H: Fibronectin 免疫染色 (倍率 \times 200)

AdT β -ExR 群では α -SMA 陽性細胞, collagen type I, fibronectin は減少した。

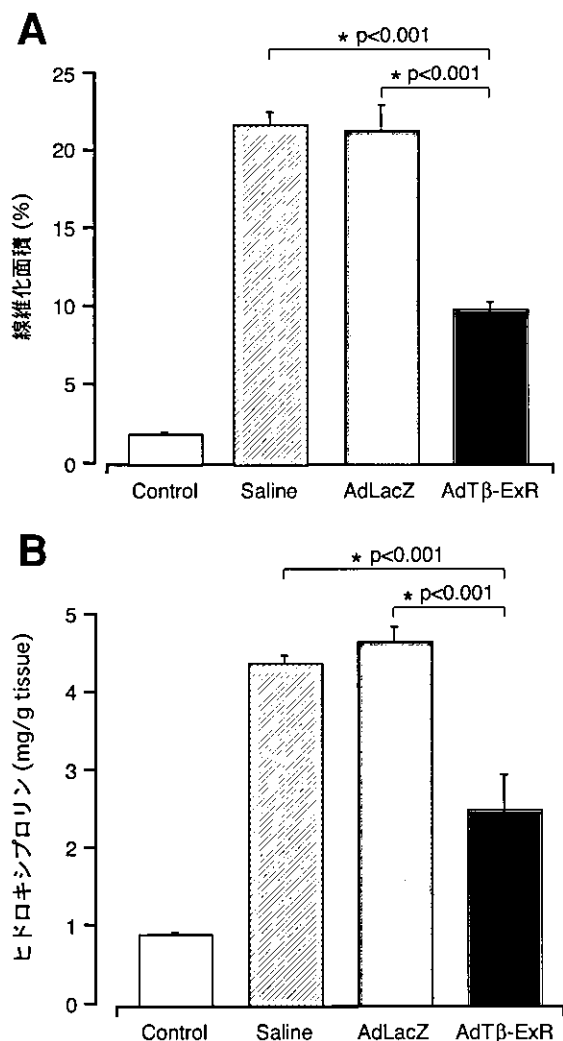


図2 線維化面積と膵内ヒドロキシプロリン含量

A: 線維化面積 B: 膵内ヒドロキシプロリン含量

AdTβ-ExR群では膵線維化面積 (A), 膵内ヒドロキシプロリン含量 (B) とも有意に減少した。

結果はmean ± SEMで示した (4 or 5 mice/group)。

性細胞数と Ki-67 labeling index にて検討した。

(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

AdLacZ群ではcerulein腹腔内投与3週間にて、膵腺房の脱落と線維化、線維化部位に一致して活性化膵星細胞の増殖を認めたが、AdTβ-ExR群ではこれらの変化は軽度であった (図1)。膵線維化面積、膵内ヒドロキシプロリン含量とも、これらの組織学的変化に一致して、AdTβ-ExR群で有意に軽度であった (図2)。

AdLacZ群ではcerulein 3週間投与にて組織学的

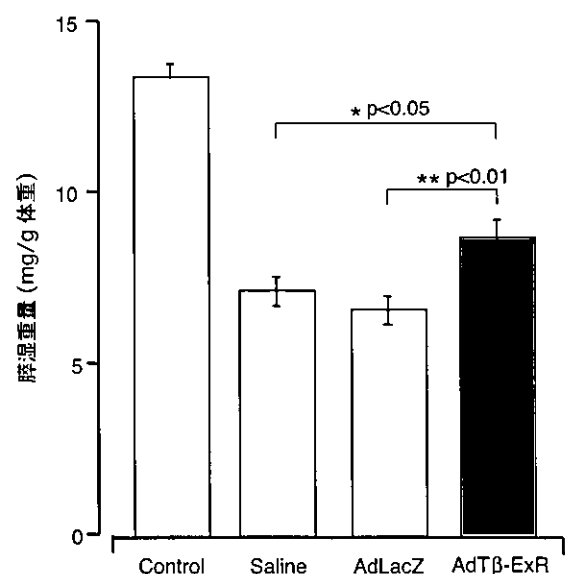


図3 膵湿重量

AdTβ-ExR群では膵湿重量は有意に増加した。

結果はmean ± SEMで示した (5 mice/group)。

所見と一致して膵湿重量が減少したが、膵線維化が抑制されたAdTβ-ExR群では、膵重量は有意に増加した (図3)。AdTβ-ExR群では、膵腺房細胞におけるssDNA陽性細胞数は有意に少なかったが、Ki-67 labeling indexには有意差を認めなかった (図4, 5, 表1)。

D. 考察

TGF-βは細胞外基質の合成、分解、沈着の調節を行う重要なサイトカインである。組織傷害後の長期にわたるTGF-βの過剰発現は、線維増生や細胞外基質の沈着をきたし、重要諸臓器に線維化を引き起こす⁵⁾。ヒト慢性膵炎の組織においてもTGF-β1が過剰発現しているし¹⁾、TGF-β1中和抗体はcerulein急性膵炎の再生過程における細胞外基質沈着を減少させる⁶⁾。しかし、TGF-βの作用を抑制することは持続する膵線維化に対して有効か、さらに慢性傷害を受ける膵臓に対して有益な効果をもたらすかは長らく不明であった。今回の研究で、われわれはTGF-βの作用を抑制すると、持続する膵線維化が減少するだけでなく、アポトーシスへ誘導される膵腺房細胞を阻止することで、慢性傷害を受けた膵臓に対して保護作用をもたらすことを示した。

組織学的検討と膵内ヒドロキシプロリン含量測定による定量的検討において、AdLacZ群と生

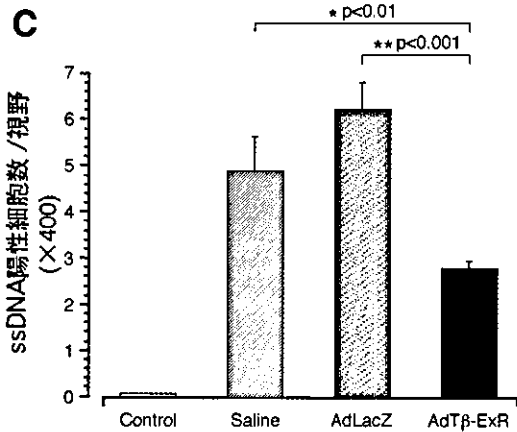
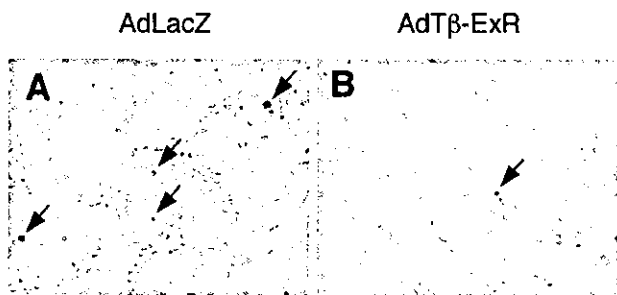


図4 膵腺房細胞のアポトーシス

A, B: ssDNA免疫染色 (倍率×400) B: ssDNA陽性細胞数
AdTβ-ExR群では膵腺房細胞のアポトーシスは有意に減少した。結果はmean ± SEMで示した (5 mice/group)。

表1 Ki-67 Labeling Index

Group	Labeling Index (%)
Cerulein-saline	22.1 ± 2.8
Cerulein-AdLacZ	17.6 ± 1.1
Cerulein-AdTb-ExR	20.0 ± 2.0

Ki-67 labeling indexは切片中の腺房細胞における百分率で表した (倍率×400, 1切片あたり10視野を無作為に抽出)。結果はmean ± SEMで示した (5 mice/group)。

食群では著明な膵線維化をきたしたが, AdTβ-ExR群では膵線維化は有意に抑制された。さらに, 膵線維化において中心的役割を担う活性化膵星細胞の減少を同時に認めた。TGF-βは, この膵星細胞の活性化と細胞外基質合成の両方に重要な役割を果たすことが知られている^{3,4)}。また, 膵星細胞における細胞外基質合成においては, TGF-βを介したオートクリン, パラクリンループの存在が強く示唆されている⁷⁾。したがってTGF-βの作用を抑制することで, これらループを阻止して膵星細胞の活性化と細胞外基質の沈着を抑制したと考えられる。

今回の実験におけるもう一つの重要な所見は,

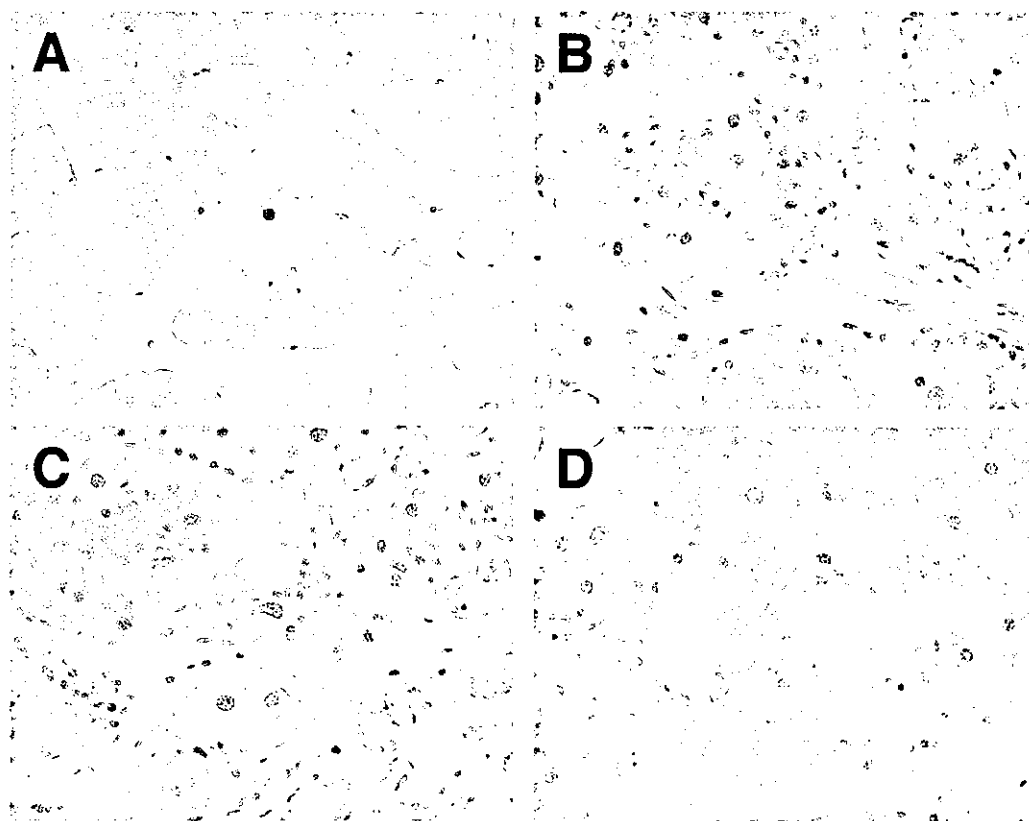


図5 細胞増殖活性 (Ki-67免疫染色)

A: Control B: Cerulein-saline C: Cerulein-AdLacZ D: Cerulein-AdTb-ExR (倍率×400)

正常膵ではKi-67陽性細胞はまれにしか認められないが (A), cerulein 3週間投与するとKi-67陽性細胞は増加した (B, C, and D)。

TGF- β の作用を抑制すると膵重量が有意に増加したことである。細胞外基質は線維化の進展のみならず、組織傷害後の修復過程にも関与している。したがって、TGF- β の作用を阻止して細胞外基質の沈着を抑制することは、慢性傷害を受ける膵臓に対して有益な効果をもたらすかという重要な疑問が生じる。慢性膵炎における膵腺房細胞の脱落にはアポトーシスが重要な役割を果たしていると言われてしている⁸⁾、TGF- β はさまざまな種類の細胞にアポトーシスを引き起こす⁹⁾。したがって今回の検討では、TGF- β の作用を抑制するとアポトーシスへ誘導される膵腺房細胞が減少し、膵萎縮が軽減したと考えられる。しかしながら、TGF- β のシグナルを長期間にわたり遮断すると、炎症や組織壊死といった好ましくない結果を招くことが報告されており¹⁰⁾、われわれは今後も慎重にこれらの問題に取り組んで行く必要がある。

E. 結語

TGF- β の作用を抑制すると、膵線維化のみならず慢性膵傷害後の膵萎縮も有意に抑制されたことから、抗TGF- β 治療が慢性膵炎の治療法となりうる可能性が考えられた。

F. 参考文献

1. Van Laethem JL, Deviere J, Resibois A, Rickaert F, Vertongen P, Ohtani H, Cremer M, Miyazono K, Robberecht P. Localization of transforming growth factor β 1 and its latent binding protein in human chronic pancreatitis. *Gastroenterology* 1995; 108: 1873-1881.
2. Lee MS, Gu D, Feng L, Curriden S, Arnush M, Krahl T, Gurushanthaiah D, Wilson C, Loskutoff DL, Fox H, Sarvetnick N. Accumulation of extracellular matrix and developmental dysregulation in the pancreas by transgenic production of transforming growth factor- β 1. *Am J Pathol* 1995; 147: 42-52.
3. 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: 421-432.
4. Apte MV, Haber PS, Darby SJ, Rodgers SC, McCaughan GW, Korsten MA, Pirola RC, Wilson JS. Pancreatic stellate cells are activated by proinflammatory cytokines: implications for pancreatic fibrogenesis. *Gut* 1999; 44: 534-541.
5. Massague J. The transforming growth factor- β family. *Annu Rev Cell Biol* 1990; 6: 597-641.
6. Menke A, Yamaguchi H, Gress TM, Adler G. Extracellular matrix is reduced by inhibition of transforming growth factor β 1 in pancreatitis in the rat. *Gastroenterology* 1997; 113: 295-303.
7. Luttenberger T, Schmid-Kotsas A, Menke A, Siech M, Beger H, Adler G, Grunert A, Bachem MG. Platelet-derived growth factors stimulate proliferation and extracellular matrix synthesis of pancreatic stellate cells: implications in pathogenesis of pancreas fibrosis. *Lab Invest* 2000; 80: 47-55.
8. Bateman AC, Turner SM, Thomas KS, McCrudden PR, Fine DR, Johnson PA, Johnson CD, Iredale JP. Apoptosis and proliferation of acinar and islet cells in chronic pancreatitis: evidence for differential cell loss mediating preservation of islet function. *Gut* 2002; 50: 542-548.
9. Rotello RJ, Lieberman RC, Purchio AF, Gerschenson LE. Coordinated regulation of apoptosis and cell proliferation by transforming growth factor β 1 in cultured uterine epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 3412-3415.
10. Shull MM, Ormsby I, Kier AB, Pawlowski S, Diebold RJ, Yin M, Allen R, Sidman C, Proetzel G, Calvin D, Annunziata N, Doetschman T. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor- β 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 1992; 359: 693-699.

G. 健康危険情報

該当なし

H. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nagashio Y, Ueno H, Imamura M, Asaumi H, Watanabe S, Yamaguchi T, Taguchi M, Tashiro M, Otsuki M. Inhibition of transforming growth factor β decreases pancreatic fibrosis and protects the pancreas against chronic injury in mice. Lab Invest 2004; 84: 1610-1618.

2. 学会発表

- 1) 永塩美邦, 上野 光, 大概 眞. 可溶性TGF- β 受容体導入による膵線維化治療の試み. 第90回日本消化器病学会総会 (シンポジウム), 仙台, 2004年4月21-23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

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 国立病院機構久里浜アルコール症センター 院長

共同研究者

朴沢重成（東海大学医学部消化器内科学）

【研究要旨】

ヒト膵腺房周囲筋線維芽細胞における、エタノールとNO供与体処理によるマトリックスメタロプロテアーゼ（とくにMMP-2）の発現変化を検討した。エタノールとNO供与体が、それぞれ0.5 M、0.5 mMでhPFCのMMP-2活性を亢進し、それらがMAP kinaseやNF- κ Bを介していることが示唆された。これらのメカニズムの詳細を知るには、遺伝子発現と転写活性に対する変化をさらに検討する必要がある。

A. 研究目的

エタノールが直接筋線維化を刺激することが強く示唆されている¹⁻³⁾。またアルコール性膵炎を含めて、種々の膵障害において酸化ストレスが重要な役割を果たしている。NOは酸化ストレスを介し種々の臓器障害に関与することが知られている。われわれは最近iNOS knock-out miceに高脂肪食を与えると著明な線維化を伴った脂肪性肝炎が作製されることを報告した⁴⁾。したがって、筋線維化に関してもNOが直接関与している可能性がある。

本研究では、エタノールあるいはNO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にエタノールあるいはNOの供与体を添加し、マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)の発現変化とその分子機構を検討する。

B. 研究方法

1. ヒト膵腺房周囲筋線維芽細胞hPFC：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。
2. MMPの発現検討：本年度はゼラチンザイモグラフィによる蛋白発現の変化を比較検討した。
3. NO刺激および薬剤処理：
 - 1) Ethanol

- 2) NO donor: S-nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine (SNAP, a nitric oxide donor), 3-morpholinylsodium N-ethylcarbamate (SIN, a peroxynitrite donor)
- 3) 抗酸化剤：N-acetyl-cysteine (NAC)
- 4) MAP kinase 阻害剤：SB203580 (p38 MAPK specific inhibitor), PD98059 (MAPK & MEK inhibitor)
- 5) NF- κ B 阻害剤：Pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC)

(倫理面への配慮)

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許可を得ている。

C. 研究結果

今回は再現性のあるデータが得られた結果を提示するため、主にMMP-2の発現につき研究結果を報告する。

1. エタノール処理したhPFC細胞培養上清のMMP-2活性 (図1)

エタノールで24時間処理し、その培養上清を用いてgelatin zymographyを行った (図1-a)。採取後の上清にAPMAを加えることにより、活性化されたMMP-2が明らかとなった。エタノール0.5 Mまでは用量依存性にMMP-2活性が亢進し

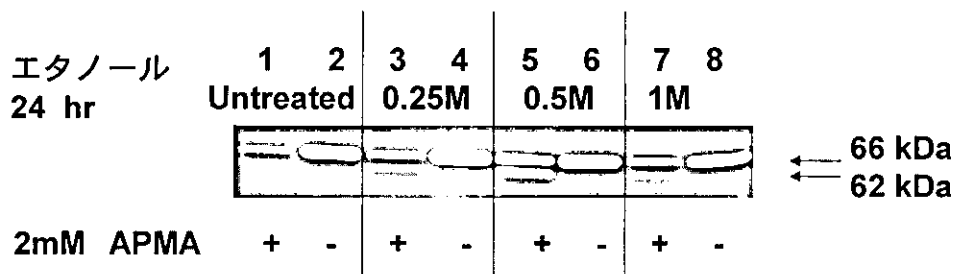


図1-a エタノール処理したhPFC細胞培養上清のMMP-2活性 (dose-dependent study)

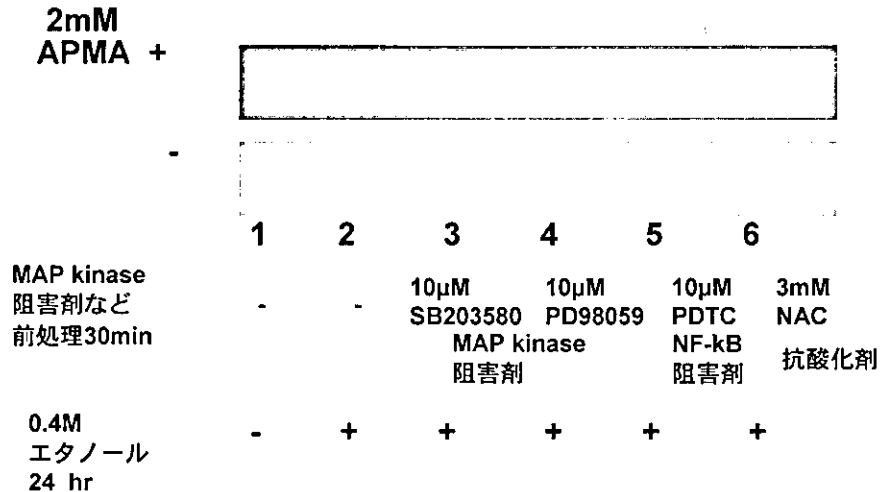


図1-b MAP kinase阻害剤などのMMP-2活性への影響

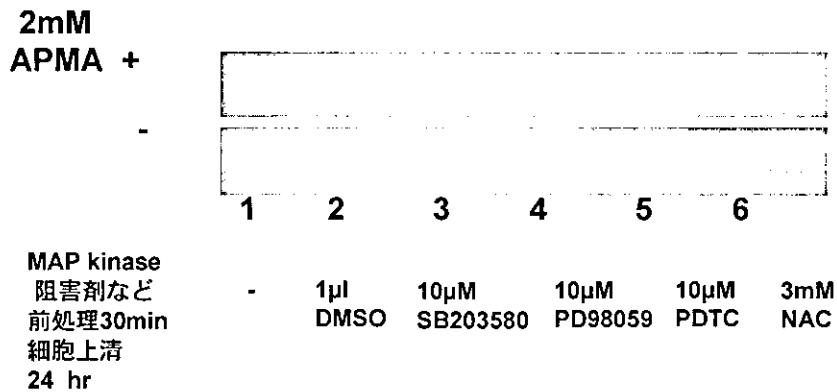


図1-c MAP kinase阻害剤などのMMP-2活性への影響

た。エタノール処理で亢進したMMP-2活性は、MAP kinase阻害剤 (p38 MAPK特異的阻害剤, MAPK&MEK阻害剤) で明らかに抑制された。抗酸化剤でも一部抑制されたが、NF-κB阻害剤では抑制されなかった。

2. SNAP処理したhPFC細胞培養上清のMMP-2活性 (図2)

SNAPで24時間処理し、その培養上清を用いてgelatin zymographyを行った (図2-a)。SNAP 0.5 mMで処理すると活性型MMP-2の発現が亢進した。p38阻害剤、NF-κB阻害剤、抗酸化剤で明らかに、SNAP処理によるMMP-2活性亢進が

抑制された (図2-b)。

3. SIN処理したhPFC細胞培養上清のMMP-2活性 (図3)

SINで24時間処理し、その培養上清を用いてgelatin zymographyを行った (図3-a)。SIN 0.5 mMで処理すると活性型MMP-2の発現が亢進した。MAP kinase阻害剤、NF-κB阻害剤、抗酸化剤のすべてでSIN処理によるMMP-2活性亢進が抑制された (図3-b)。

D. 考察

アルコールによる臓器障害もNOによる臓器障

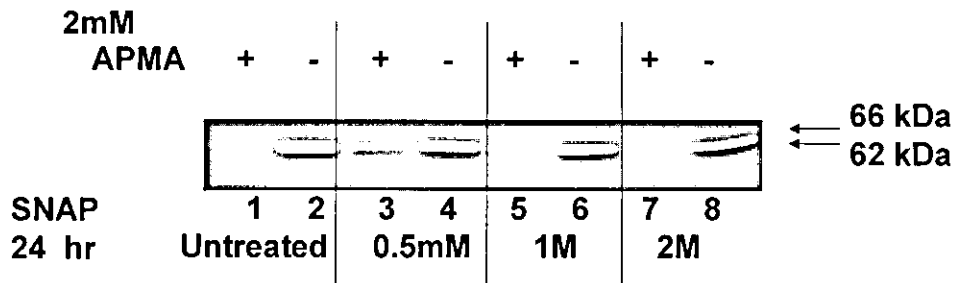


図2-a SNAP処理したhPFC細胞培養上清のMMP-2活性 (dose-dependent study)

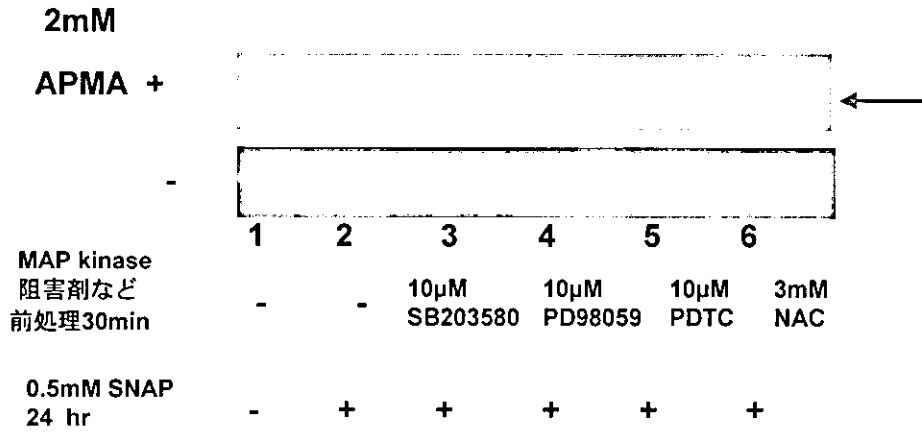


図2-b MAP kinase阻害剤などのMMP-2活性への影響

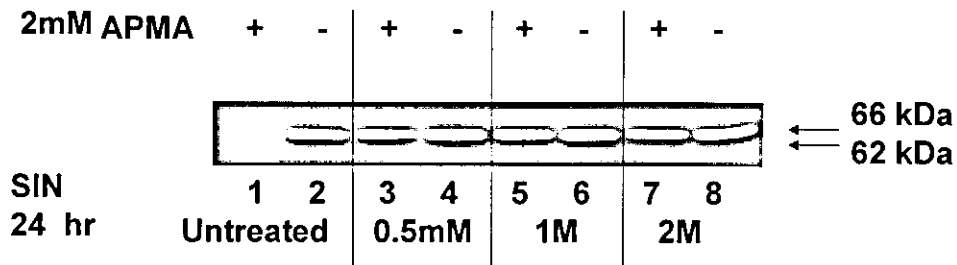


図3-a SIN処理したhPFC細胞培養上清のMMP-2活性 (dose-dependent study)

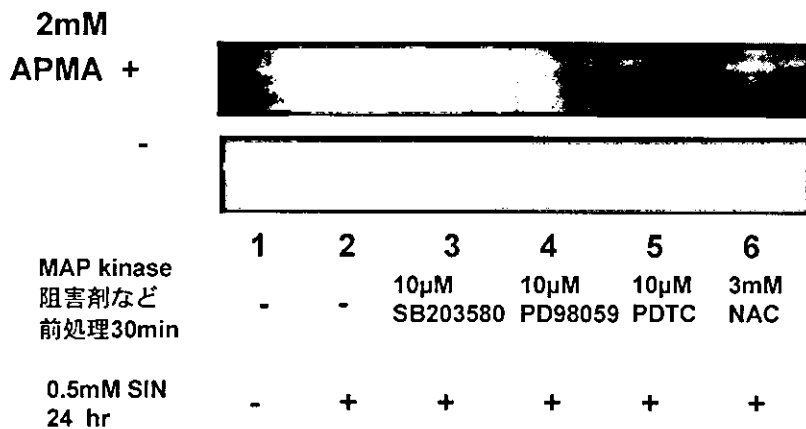


図3-b MAP kinase阻害剤などのMMP-2活性への影響

害も酸化ストレスを介していると考えられている。アルコールとNOによる臓器線維化も酸化ストレスを共通に介している可能性がある。本研究では、睪線維化過程に重要な役割を果た

している睪星細胞のMMP発現に焦点を絞って検討を行った。用いた細胞は、活性化された睪星細胞にphenotypeが近似したヒト睪腺房周囲筋線維芽細胞hPFCである。この細胞を睪星細胞の代

用として *in vitro* 系で用いる問題点は検討会にても指摘されたものの、ヒト膵星細胞の細胞株の確立がまだなされていないことと、この細胞における MMPs とコラーゲンの表現プロフィールが活性化された膵星細胞のそれに一致しているため、現時点においては膵障害時の活性化された *in vivo* の星細胞の挙動をこの細胞が *in vitro* で近似・再現できる唯一の系であると考え、本実験に用いた。

エタノール処理による MMP-2 活性亢進と NO 供与体処理による MMP-2 活性亢進の細胞内シグナル伝達の大きな違いは、NF- κ B を介する (NO 供与体) か否 (エタノール) かであった。酸化ストレスにいたる過程を両者は異なるシグナル伝達系を用いている可能性がある。2 種類の NO 供与体処理による MMP-2 活性亢進の細胞内シグナル伝達には大きな違いはなかった。今回は培養上清中に強制分泌された MMP-2 蛋白の発現と活性をパラメーターにして検討したのみであり現象が記述されたにすぎない。これらのメカニズムを解明するには、今後蛋白活性化に及ぼす機序、遺伝子発現と転写活性に対する変化に検討を加える必要がある。

E. 結語

エタノールと NO が、ある濃度で hPFC の MMP-2 活性を亢進し、それらが MAP kinase や NF- κ B を介していることが示唆された。これらのメカニズムの詳細を知るには、遺伝子発現と転写活性に対する変化をさらに検討する必要がある。

今回は、MMP-2 に関して検討したが、他の MMPs に関しても検討する必要がある。

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: 81-89.
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: 780-794.

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. Chen Y, Hozawa S, Sawamura S, Sato S, Fukuyama N, Tsuji C, Mine T, Okada Y, Tanino R, Ogushi Y, Nakazawa H. Deficiency of inducible nitric oxide synthase exacerbates hepatic fibrosis in mice fed high-fat diet. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 326: 45-51.

G. 健康危険情報

該当なし

H. 研究発表

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

FGF-2 によるヒト腓筋線維芽細胞からの IL-6 の産生誘導

研究報告者 藤山佳秀 滋賀医科大学消化器内科学 教授

【研究要旨】

FGF-2 の発現亢進が、急性、慢性膵炎組織で報告されている。その作用は血管新生などを介した組織修復機転の誘導などと考えられているが、炎症の増悪に対する効果については知られていない。FGF-2 の炎症刺激作用を、ヒト腓筋線維芽細胞からの IL-6 の産生に対する作用の面から検討した。FGF-2 はヒト腓筋線維芽細胞からの IL-6 産生を刺激した。その作用は、IL-17 の作用と同等で、MAP キナーゼの活性化を介した作用と考えられた。FGF-2 は組織修復に作用する一方で、IL-6 の産生誘導など炎症刺激作用を介して膵炎の増悪に関与している。

A. 研究目的

Fibroblast growth factor-2 (FGF-2, 塩基性 FGF) は、さまざまな細胞の増殖、分化を誘導する一方、血管新生を刺激し創傷治癒においても重要な役割を果たしている¹⁾。実験膵炎モデルや急性および慢性膵炎患者から得られた膵組織で、FGF-2 の発現亢進が示されており、膵炎の病態形成への関与が示唆されている²⁾。

われわれは、ヒト腓筋線維芽細胞からの IL-6 の産生を報告してきた³⁾。今回、FGF-2 の IL-6 産生に対する効果を検討した。

B. 研究方法

ヒト腓筋線維芽細胞は、既報の方法に準じて単離し⁴⁾、10% FBS 加 DMEM 培地にて継代培養した。上清中の IL-6 濃度は ELISA にて、IL-6 mRNA 発現は Northern blot 法にて検討した。MAP キナーゼの活性化を Western blot 法にて解析し、その関与について特異的 inhibitor を用いて検討した。

(倫理面への配慮)

ヒト腓筋線維芽細胞分離のための手術材料の提供にあたり、研究目的、方法、予想される結果とその意義、倫理面での配慮について書面による説明のうえ同意を得た。

C. 研究結果

FGF-2 の刺激により培養上清中に濃度および時間依存性に IL-6 の産生が認められた。FGF-2 (100 ng/ml) 刺激は、同濃度の IL-17 刺激と同等

の効果を示した。また、FGF-2 と IL-17 は、IL-6 mRNA 発現に対して、相加作用を示した。この相加作用は、蛋白レベルでも確認された。FGF-2 は MAP キナーゼの ERK1/2 および p38 の速やかなリン酸化を誘導し、これらのキナーゼに対する特異的阻害剤は、FGF-2 誘導性 IL-6 の産生を有意に抑制した。

D. 考察

IL-6 は、さまざまな作用を有する代表的な炎症性サイトカインの一つであり、急性膵炎や慢性膵炎の急性増悪の病態形成への関与がさまざまな報告から明らかにされてきた。われわれは、以前に IL-1 β 、TNF- α 、IL-17 の刺激によりヒト腓筋線維芽細胞から IL-6 が産生されることを見だし、膵局所においてこの細胞が IL-6 の産生細胞として機能し、膵炎の病態形成に重要な役割を果たしていることを示してきた³⁾。今回、FGF-2 が IL-6 産生を誘導する効果を有することが明らかになったが、この知見は、膵局所における IL-6 産生が炎症細胞（単球/マクロファージや T 細胞）に由来する炎症性サイトカインのみならず、間質系細胞に対する growth factor によっても誘導されることを示している。さらに、その作用は IL-17 とほぼ同等の作用として認められ、IL-17 と FGF-2 の同時添加の実験結果から、膵局所における IL-6 の産生が、炎症性サイトカインと growth factor の協調作用として制御されていることが示された。FGF-2 が速やかな MAP キナーゼ (ERK1/2 や p38) のリン酸化を

誘導し、IL-6の産生誘導がこれらのMAPキナーゼの特異的阻害剤でblockされたことから、FGF-2によるIL-6の誘導には、MAPキナーゼを介したpathwayが重要な役割を果たしていると考えられた。

E. 結語

膵炎の病態形成に重要な役割を果たしているIL-6の誘導が、膵組織内で炎症性サイトカインのみならず間質系細胞に由来するgrowth factorによっても制御されている。

F. 参考文献

1. Rifkin DB, Moscatelli D. Recent developments in the cell biology of basic fibroblast growth factor. *J Cell Biol* 1998; 109: 1-6.
2. Ebert M, Yokoyama M, Ishiwata T, Friess H, Buchler MW, Malferttheiner P, Korc M. Alteration of fibroblast growth factor and receptor expression after acute pancreatitis in humans. *Pancreas* 1999; 18: 240-246.
3. Shimada M, Andoh A, Hata K, Tasaki K, Araki Y, Fujiyama Y, Bamba T. IL-6 secretion by human pancreatic periacinar myofibroblasts in response to inflammatory mediators. *J Immunol* 2002; 168: 861-868.
4. Saotome T, Inoue H, Fujimiya M, Fujiyama Y, Bamba T. Morphological and immunocytochemical identification of periacinar fibroblast-like cells derived from human pancreatic acini. *Pancreas* 1997; 14: 373-382.

G. 健康危険情報

該当なし

H. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Andoh A, Bamba S, Fujino S, Inatomi O, Zhang Z, Kim S, Takayanagi A, Shimizu N, Fujiyama Y. Fibroblast growth factor-2 stimulates interleukin-6 secretion in human pancreatic periacinar myofibroblasts. *Pancreas* 2004; 29: 278-283.

2. 学会発表

- 1) Andoh A, Bamba S, Saotome T, Shimada M, Inatomi O, Yasui H, Fujiyama Y. FGF-2 and IL-17 synergistically induce IL-6 secretion in human pancreatic myofibroblasts. Joint Meeting of the 11th Meeting of the International Association of Pancreatology and the 35th Annual Meeting of the Japan Pancreas Society. Sendai, July 11-14, 2004

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

慢性膵炎線維化進展における接着因子の関与

研究報告者 伊藤鉄英 九州大学大学院病態制御内科学 講師

共同研究者

加来豊馬, 大野隆真, 河邊 颯, 有田好之, 宜保淳也, 名和田新
(九州大学大学院病態制御内科学)

【研究要旨】

膵線維化進展には膵星細胞（Pancreatic stellate cell; PSC）が重要な役割を演じていると考えられている。慢性膵炎では単球，リンパ球を主体とした炎症細胞浸潤により，PSCが活性化され，かつ相互作用により膵線維化が進展することが想定されている。【接着因子】は炎症細胞が血管内皮細胞へ結合して組織へ遊走する過程において重要な働きを担うだけでなく，線維化という面においても炎症細胞と線維芽細胞がintegrin/ICAM-1を介した直接結合することにより，さらなる炎症の増幅を招く。われわれは，膵線維化過程における接着因子の関与を明らかにするため，ラットDibutyltin Dichloride (DBTC) 慢性膵炎モデルを用いて検討を行った。さらに，PSCにおける接着因子の関与についても検討した。*in vivo*では既報の方法にてラットDBTC慢性膵炎モデルを作成し，DBTC投与後7日目より β_2 integrin阻害作用を有するIS-741 (50 mg/kg/day)を連日経口投与した (IS-741治療群)。対照群 (DBTC群)として蒸留水を同量経口投与とした。14日および28日目に犠牲死させ，酵素学および組織学的検討と，膵内の接着因子，サイトカイン，ケモカインの発現，免疫組織染色にて単球浸潤と α SMA陽性細胞の検討を行った。*in vitro*ではPSCにおける接着因子の発現を確認し，さらにLPS刺激 (10 ng/ml)に対するIS-741 (20 μ g/ml)のPSC増殖抑制効果を検討した。結果として，*in vivo*ではIS-741治療群で接着因子の発現低下を認め，それに伴って浸潤単球数は減少した。また，サイトカイン・ケモカインの発現も低下し，組織学的には膵線維化は軽減されたようであったが，膵外分泌機能は回復せず，経時的観点からは治療群にても線維化は進展しており，IS-741の慢性膵炎進展阻止効果は不十分であった。*in vitro*ではPSCでのLFA-1およびMac-1の発現はなく，ICAM-1およびVCAM-1の発現を認めた。また，IS-741にはPSC増殖抑制効果はなく，PSCへの直接的な作用は確認できなかった。本実験における β_2 integrin阻害作用は不完全であり，膵線維化進展の阻止効果は不十分であった。また，ICAM-1およびVCAM-1は活性化PSCに高発現しており，新たな線維化治療へのtargetとなり得る可能性が考えられた。

A. 研究目的

接着因子とは細胞同士の接着や細胞と細胞外基質との接着に関与する膜蛋白質の一種で，構造的な見地から，主にインテグリンファミリー，免疫グロブリンスーパーファミリー，セレクトインファミリーなどに分類される。一般的に，炎症細胞が局所組織に浸潤する過程において，細胞表面の接着因子が重要な働きを担うとされる。また，線維化という面からは，遊走してきた白血球と腎線維芽細胞が β_2 integrinとintercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)を介した結合により，線維芽細胞でのAP-1およびNF- κ Bを活

性化させRANTESおよびICAM-1の発現を増強させ炎症を増幅させることが報告¹⁾されており，また，両者の結合により，MCP-1の遺伝子発現が誘導されたとの報告²⁾もある。慢性膵炎では単球，リンパ球を主体とした炎症細胞浸潤により，膵星細胞（Pancreatic stellate cell; PSC）が活性化され，かつ相互作用により膵線維化が進展することが想定されている。PSCの活性化にはPDGFやTGF- β などのサイトカイン，ケモカインが重要とされているが，その他に，活性化PSCにはICAM-1が発現しているとの報告³⁾があり，腎線維芽細胞と同様に，PSCが炎症細胞と

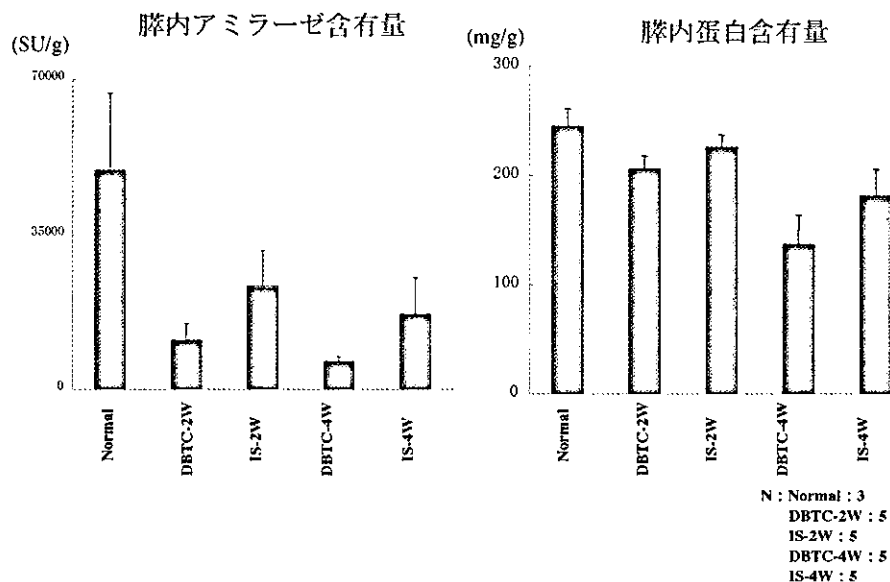


図1 DBTC慢性膵炎群では経時的に蛋白およびアミラーゼ含有量が低下. IS-741治療群では回復傾向はあるものの有意差はなく, 経時的には膵外分泌能は低下した

直接結合して活性化を受ける可能性が考えられる. 以上のことから, 今回われわれは, 膵線維化過程における接着分子の関与を明らかにするため, ラット Dibutyltin Dichloride (DBTC) 慢性膵炎モデルを用いて検討を行った. また, β_2 integrin の一つである LFA-1 の阻害作用を持つ⁴⁾ とされる IS-741 を使用して, その線維化抑制効果についても検討した. さらに, PSC における接着因子の発現に関しても検討を行った.

B. 研究方法

Sparmannら⁵⁾ 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⁶⁾. 実際には雄性 Lewis ラット (180~200 g) の右内頸静脈より, ethanol, glycerol, dimethyl sulfoxide で溶解した DBTC 7 mg/kg の 1 回投与を行った. DBTC 投与後 7 日目から LFA-1 阻害作用を有する IS-741 を蒸留水に溶解し, 50 mg/kg/day の連日経口投与 (IS-741 治療群) を行い, 対照群として同様に DBTC 投与後 7 日目から蒸留水を同量連日経口投与した (DBTC 慢性膵炎群). DBTC 投与後 14 日目および 28 日目に犠牲死させ, 膵臓を摘出し, 膵外分泌能の指標として膵内の蛋白, アミラーゼ含有量を測定した. 組織学的検討では, 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 0~3 の 4 段階に分類し評価し

た. また, 膵臓より total RNA を抽出し, 接着因子 (ICAM-1, VCAM-1, LFA-1, Mac-1, VLA-4) およびサイトカイン, ケモカイン (IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α , TGF- β , MCP-1) の mRNA の発現を RT-PCR を用いて検討した. また, 単球の膵浸潤を明らかにする目的にて ED-1 染色を, PSC の活性化の指標として膵組織の α SMA 染色および Western blot 法により膵内の α SMA 蛋白発現を検討した.

次に, 雄性 Lewis ラット (200~250 g) より膵臓を摘出して Hyaluronidase, Chymotrypsin, DNase, Collagenase-P 処理後, Optipleg を用いた濃度勾配法にて PSC の単離・培養を行った. なお, 以下の検討では第 3~5 継代の PSC を使用した. まず, PSC における接着因子の発現を無刺激状態および各種の刺激 (MCP-1, IL-1 β , IL-6) による変化を RT-PCR 法にて検討した. また, PSC 増殖能に及ぼす IS-741 の効果も検討した. PSC 1×10^3 個/well を 24 時間培養し, さらに 24 時間無血清培養後, LPS (10 ng/ml) 入り培地および LPS (10 ng/ml) + IS-741 (20 μ g/ml) 入り培地で 72 時間培養後, cell proliferation assay を行った.

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.