

表1 FFP置換PDFによる各物質のクリアランス (ml/min) (濾液側からみたクリアランス)

	開始1時間後	開始8時間後
BUN	18.4	18.6
Cre	21.5	25.4
IL-6	18.1	
IL-8	18.8	

表2 6%アルブミン置換PDFによる各物質のクリアランス (ml/min) (濾液側からみたクリアランス)

	開始1時間後	開始8時間後
BUN	19.9	19.9
Cre	21.9	21.7
IL-6	15.4	13.5
IL-8	16.3	16.6

B. 研究方法

血漿分離膜としてクラレのEvacure® EC-2Aを使用した。対象症例として血清総ビリルビン値が5.0mg/dlを超える敗血症、重症急性膵炎症例に対しては、補充液としてFFP15単位を使用し、5.0mg/dl未満の症例には6%アルブミンを補充液として使用した。操作方法是単純血漿交換をしながら中空糸の外側に灌流液を循環させ、補充液として肝不全があるときはFFP、ない場合は6%アルブミンで150 ml/hで用い、QFとQDはサブラッドBSでおのおの600ml/hで約8時間施行した。FFP補充PDFではさらに25%アルブミン50mlを補充した。

PDF施行中は血行動態をはじめ臨床経過を詳細に検討するとともに、PDFの濾液側からみたIL-6、IL-8のクリアランス、BUN、クレアチニンのクリアランスについても検討した。以上から重症急性膵炎に対するPDFの有用性をサイトカイン動態から検討した。

C. 研究結果

PDF施行により循環動態の安定(血管作動薬の減少、尿量の増加)が得られ、SOFAスコアも漸減した。

FFP補充PDFでは開始1時間後のBUN、クレアチニンのPDF濾液側からみたクリアランスはおのおの、18.4ml/min、21.5ml/minであった(表1)²⁾。一方、6%アルブミン補充PDFではBUN、クレアチニンのクリアランスはおのおの、19.9 ml/min、21.9ml/minであった(表2)。

さらに炎症性サイトカインであるIL-6とIL-8のクリアランスは、FFP補充PDFでおのおの、18.1ml/min、18.8ml/minであった²⁾。6%アルブミン補充PDFではおのおの、15.4ml/min、16.3 ml/minであった。

D. 考察

これまでにサイトカインアフェレーシスを目的とした血液浄化法はDHPカラムを使用して直接サイトカインを吸着する方法³⁾や、カットオフ値を大きく設定したsuper high flux膜を用いて大きな分子量を除去する方法⁴⁾が報告されている。PDFもサイトカインアフェレーシスの観点からはこういった血液浄化法の一つと考えられるが、個別症例ごとにバリエーションを持たせることが可能である。前述したとおり、肝不全合併症例では肝不全起因物質の除去のほかに凝固因子補充の目的でFFPを補充液として使用し、そうでない症例に対しては6%アルブミンを補充液として用いることができる。また、6%アルブミン補充PDFでは、PDF濾液側からみたIL-6、IL-8のクリアランスはFFP補充のPDFに遜色ない数値が得られ、血清IL-6、IL-8もPDFの施行とともに順調に低下した。PDF施行開始から1時間後と8時間後のIL-6、IL-8、BUN、クレアチニンのクリアランスに大差がないことから、時間経過による血漿分離膜の膜効率低下は許容できる範囲内と考えられた。使用した血漿分離膜Evacure® EC-2Aのアルブミン篩係数は0.3であることがこれまでの臨床研究で明らかになっており、中分子量物質を標的にしたplasma fractionatorsとして理論どおりの効果を得たことになる。さらにPDFには従来の血漿交換では除去されてしまう抗炎症物質として必要な自己の凝固因子、HGF、IgMやIgAなど免疫グロブリンを保持できるといった特性があり、重症急性膵炎のような感染を危惧する疾患においては有利な点といえる。

また、重症急性膵炎の高ビリルビン血症の機序についてはさまざまな見解があるが、肝類洞に存在するクッパー細胞がエンドトキシンやTNF- α などにより活性化され、食食能が低下す

ることにより肝細胞の胆汁うっ滞やビリルビントransポートの抑制が起こり生じたものと考えられた。PDFではビリルビンのクリアランスが約5.0ml/minを示し、ビリルビン除去効果が示されている。PDF施行中の血清総ビリルビン値の低下はPDFによる直接のビリルビン除去効果以外に、炎症性サイトカイン除去によるクッパー細胞の機能回復、肝細胞のビリルビントransポート機能の回復がもたらされた結果と推察される。

平成18年度の報告書に報告したとおり、血清TNF- α もPDFにより低下した⁵⁾。急性膵炎においてTNF- α は炎症シグナルのトリガーと考えられ、TNF- α を抑制できるということはサイトカインカスケードの上流で炎症を抑制し、TNF- α より下流に位置するIL-6やIL-8の上昇、好中球の動員や活性化を抑制し、重症急性膵炎の病態を改善するものと考えられた。

6%アルブミン補充PDFが重症急性膵炎においてサイトカイン除去効果を示したことは今後の発展性に富んでいることを示唆する。すなわち、重症急性膵炎発症早期の水分バランス是正効果をねらったCRRTとしての早期導入が可能となるからである。CRRTとして施行する副産物にサイトカイン是正効果が加わるため、重症急性膵炎の生体環境を整える役割を果たすことが可能となる。しかし、現在のところ血漿分離膜Evacure® EC-2Aの保険適応は肝不全に基づいたものであり、注意を要する。

E. 結論

重症急性膵炎症例にFFP補充PDFと6%アルブミン補充PDFを施行し、良好な臨床経過を得た。両者とも同等のIL-6、IL-8のクリアランスが得られた。この結果は重症急性膵炎におけるPDFの早期導入の可能性を期待させるものと考えられた。

F. 参考文献

1. Mori T, Eguchi Y, Shimizu T, Endo Y, Yoshioka T, Hanasawa K, Tani T. A case of acute hepatic insufficiency treated with novel plasmapheresis plasma dia-filtration for bridge use until liver

transplantation. Ther Aphere 2002; 6: 463-466.

2. 藤山佳秀, 安藤 朗, 畑 和憲, 五月女隆男. 重症急性膵炎に対する Plasma Dia-Filtratin (PDF) の試み. 厚生労働科学研究費補助金難治性膵疾患克服事業難治性膵疾患に関する調査研究 平成 17 年度総括・分担研究報告書 2006; 120-152.
3. Saotome T, Endo Y, Sasaki T, Tabata T, Hamamoto T, Fujino K, Andoh A, Eguchi Y, Tani T, Fujiyama Y. A case of severe acute pancreatitis treated with CTR-001 direct hemoperfusion for cytokine apheresis. Ther Apher Dial 2005; 9: 367-371.
4. Uchino s, Bellomo R, Goldsmith D, Davenport P, Cole L, Baldwin I, Panagiotopoulos S, Tipping P. Super high flux hemofiltration: A new technique for cytokine removal. Intensive Care Med 2002; 28: 651-655.
5. 藤山佳秀, 安藤 朗, 畑 和憲, 五月女隆男, 江口 豊. 重症急性膵炎に対する Plasma Dia-Filtratin (PDF) の有用性の検討. 厚生労働科学研究費補助金難治性膵疾患克服事業難治性膵疾患に関する調査研究 平成 18 年度総括・分担研究報告書 2007; 182-185.

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Saotome T, Endo Y, Sasaki T, Tabata T, Hamamoto T, Fujino K, Andoh A, Eguchi Y, Tani T, Fujiyama Y. A case of severe acute pancreatitis treated with CTR-001 direct hemoperfusion for cytokine apheresis. Ther Apher Dial 2005; 9: 367-371.
- 2) Inatomi O, Andoh A, Yagi Y, Ogawa A, Hata K, Shiomi H, Tani T, Takayanagi A, Shimizu N, Fujiyama Y. Matrix Metalloprotease-3 Secretion From Human Pancreatic Periacinar Myofibroblasts in response to inflammatory Mediators. Pancreas 2007; 34: 126-132.
- 3) 江口 豊. 「膜型血漿分離器による Plasma Dia-filtration (PDF) -Plasma Filtration with Dialysis- 療法」. 日本アフェレシス学会雑誌 2007; 26: 272-275.

- 4) 江口 豊, 五月女隆男, 吉岡豊一, 中永士師明, 八木克史, 井上静香, 來住優輝, 谷 徹.
Plasma Dia-filtration (PDF) の他施設による有用性の検討. ICU と CCU 別冊 31 別冊 : 14-16.
 - 5) 江口 豊. 重症肝障害における Plasma Dia-filtration (PDF) -Plasma Filtration with Dialysis- 療法. 日本アフェレシス学会雑誌 2007; 26: 310-314.
 - 6) 五月女隆男, 江口 豊. 重症急性膀胱炎に対する Plasma dia-filtration (PDF). 医薬の門 2007; 47: 40 (492) -44 (496) .
2. 学会発表 該当なし

H. 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

重症急性膵炎における感染性合併症，遠隔臓器障害機構の解明

研究報告者 黒田嘉和 神戸大学大学院消化器外科学 教授

共同研究者

新関 亮，安田武生，上田 隆，沢 秀博，中島高広（神戸大学大学院消化器外科学）

【研究要旨】

私どもはこれまでにラット重症急性膵炎において腸管粘膜上皮のアポトーシス誘導が加速され **bacterial translocation** と関連していること，急性膵炎において血清 VEGF 値が有意に上昇していることを報告してきた。そこで，本期間中の研究ではまず重症急性膵炎における腸管粘膜上皮のアポトーシスに対する VEGF の効果を検討した。ラット重症急性膵炎モデルにおいて，VEGF の投与によって回腸粘膜のアポトーシスが有意に低下するとともに腸粘膜の萎縮が改善し，**bacterial translocation** が有意に抑制された。

High Mobility Group Box Chromosomal Protein 1 (HMGB1) は敗血症時の多臓器不全発生の鍵となるメディエーターである可能性が考えられている蛋白である。本研究では重症急性膵炎における HMGB1 の動態とその意義を明らかにするため，臨床的・実験的検討を行った。重症急性膵炎臨床例において血清 HMGB1 値は有意に上昇しており，厚生労働省重症度スコアと有意な正の相関を認めた。また臓器障害併発例，感染併発例，死亡例において高値を示した。ラット重症急性膵炎モデルにおいても血清 HMGB1 値は有意に上昇し，重症度と相関していた。HMGB1 蛋白は各臓器においても発現が増強しており，膵炎の進展や臓器障害の発生時期と一致していた。

次に重症急性モデルにおいて抗 HMGB1 中和抗体を用いて急性膵炎における HMGB1 の関与とその抑制による効果を明らかにするために実験的検討を行った。マウス急性膵炎モデルに比べ抗 HMGB1 抗体を投与したマウス急性膵炎モデルでは血清アミラーゼ，ALT，Cr 値の有意な低下，膵組織における浮腫，出血，炎症細胞浸潤，壊死の軽減，肺組織における浮腫，出血，炎症細胞浸潤，肺胞壁の肥厚の軽減を認めた。一方で実験モデル作製 12 時間後における膵組織の細菌培養陽性率は，急性膵炎モデルに比べて HMGB1 投与群で有意に増加していた。抗 HMGB1 抗体は急性膵炎の進展と遠隔臓器障害を抑制しており，HMGB1 は重症急性膵炎の炎症反応や臓器障害そして感染の成立における重要な情報伝達物質であることが示唆された。

A. 研究目的

重症急性膵炎では炎症を惹起した膵局所の制御のみならず，後期の感染性合併症や多臓器不全の制御が重要であると考えられている。感染成立機構としては腸管からの **bacterial translocation** が重要であると考えられている¹⁾。われわれはこれまで急性膵炎により腸管粘膜上皮におけるアポトーシス誘導が加速され，**bacterial translocation** が増加することを報告してきた^{2~4)}。さらに重症急性膵炎臨床例および急性膵炎モデルにおいて血管内皮細胞に作用する増殖因子である **Vascular endothelial growth factor** (以下 VEGF) が上昇しており，VEGF が肝，腎に

におけるアポトーシス抑制効果を持つことを示した⁵⁾。そこで本研究期間の初年度は重症急性膵炎における腸管粘膜上皮のアポトーシス誘導に対する VEGF の効果を検討した。次年度以降は近年，敗血症モデルの致死性に関係することが証明された蛋白である **High Mobility Group Box Chromosomal Protein 1** (以下 HMGB1) に着目し，重症急性膵炎臨床例および急性膵炎モデルにおける HMGB1 の変化と重症度との相関，ならびに抗 HMGB1 中和抗体投与による急性膵炎の遠隔臓器障害および **bacterial translocation** に対する影響を検討した。

B. 研究方法

1. 臨床的検討

当科に入院した厚生労働省(以下、厚労省)重症度判定基準に基づく重症急性膵炎患者45人において、入院時(発症72時間以内)の血清HMGB1値をELISAにて測定し、臨床因子との関連を解析した。

2. 実験的検討

1)動物：Wistar系雄性ラットおよびC3H/HeN系雌性マウス

2)急性膵炎モデル

cerulein持続静注による浮腫性膵炎、3%・20%デオキシコール酸の膵管に逆行性注入による出血性壊死性膵炎、closed duodenal loopによる急性壊死性膵炎を作製した。

3. 検討項目

A) VEGF投与後にラット急性膵炎モデルを作製し、回腸粘膜におけるアポトーシスの状態(DNA fragmentation ELISAとTUNEL染色)、膵炎の程度(膵HE染色)、回腸末端の絨毛高(HE染色)、bacterial translocation(腸間膜リンパ節の細菌培養)を解析した。

B)ラット急性膵炎モデルにおいて血清HMGB1濃度をELISA法にて測定し、各組織におけるHMGB1蛋白の発現をWestern blottingにて解析した。

C)マウス急性膵炎モデル作製後に抗HMGB1抗体を投与し、血液生化学検査(AST, ALT, LDH, BUN, Cr)、膵組織障害(膵HE染色)、肺組織障害(肺HE染色)、膵への感染(膵組織の細菌培養)を解析した。

(倫理面への配慮)

患者からの採血、臨床因子の解析については十分な説明に基づく同意(口頭および書面によるインフォームドコンセント)を得て行い、個人情報保護に十分に配慮した。また、動物実験は神戸大学大学院医学系研究科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

1. 臨床的検討

重症急性膵炎患者における入院時(発症72時間以内)血清HMGB1濃度は 5.4 ± 1.3 ng/ml(健

常人： 1.7 ± 0.3 ng/ml)であり、有意に増加していた。性差、成因、膵壊死の有無では有意差はなかった。血清HMGB1値は厚労省重症度スコアと有意な正の相関関係を認め、Stage 3 & 4(厚労省スコア9点以上)ではStage 2(厚労省スコア2～8点)より高い傾向にあった(Stage 3 & 4： 8.5 ± 3.6 ng/ml, Stage 2： 3.9 ± 0.6 ng/ml)。血清HMGB1値は、各種血液生化学パラメーターのうちLDH、総ビリルビンおよびCRPとの間に有意な正の相関関係を認めたが、膵アミラーゼやリパーゼとの相関はなかった。臨床経過との関係では、経過中に臓器障害や感染を併発した症例ではより高値をとる傾向にあった(臓器障害なし： 3.3 ± 0.5 ng/ml, 臓器障害あり： 7.5 ± 2.4 ng/ml, 感染なし： 4.7 ± 0.7 ng/ml, 感染あり： 7.8 ± 5.4 ng/ml)。死亡例では生存例より高値をとる傾向があった(生存例： 4.1 ± 0.6 ng/ml, 死亡例： 10.1 ± 5.4 ng/ml)。

2. 実験的検討

A)急性膵炎モデルで増加した回腸粘膜の断片化DNAはVEGF投与によって有意に抑制されていた。同様に急性膵炎モデルでは回腸粘膜のTUNEL陽性細胞が増加していたが、VEGF投与群ではTUNEL陽性細胞が減少していた。小腸絨毛高は急性膵炎モデルでは減少していたが、VEGF投与による改善を認めた。膵炎の組織像はVEGFの投与で変化を認めなかった。

腸間膜リンパ節の細菌培養では細菌培養陽性率は単開腹群の0%に対して膵炎群では71%と有意に増加しており、VEGF投与群では41%と有意に改善していた。

B)ラット急性膵炎モデルにおいて血清HMGB1値は作製6時間後には上昇しており、重症度に比例して高値を示した。時間経過を検討すると、膵炎作製後6～12時間でピーク値に達し、その後緩徐に低下していったが、6～24時間まで有意に上昇していた。各組織におけるHMGB1蛋白の発現を時間経過とともに検討すると、HMGB1蛋白は膵炎作製6時間後から発現が増強していた。膵の発現のピークは6～12時間後、肝・腎・肺・小腸におけるピークは12～18時間後であった。

C)急性膵炎群に比べて抗HMGB1抗体投与群

では血清アミラーゼ、ALT、Cr値の有意な低下がみられた。血清AST、LDH、BUN値は抗HMGB1抗体の投与で変化を認めなかった。

抗HMGB1抗体の投与によって脾、肺における組織学所見の軽減が認められた。脾組織の細菌培養では抗HMGB1抗体投与群では急性脾炎群に比べて細菌培養陽性率が有意に増加していた。

D. 考察

われわれはこれまでの臨床的、実験的検討から重症急性脾炎発症早期から腸管粘膜上皮のアポトーシスを制御することがbacterial translocationの抑止につながるのではと考えている。そこでこれまで報告してきた重症急性脾炎の肝・腎障害に対して防御作用を有するVEGFに着目した。急性脾炎モデルにおけるVEGFの投与は小腸粘膜のアポトーシスおよび萎縮を改善し、腸間膜リンパ節へのbacterial translocationを抑制した。VEGFの受容体は血管内皮細胞に存在するといわれており、小腸粘膜上皮細胞には存在しないと考えられる。よってVEGFの血管新生促進作用により腸管への血流が修復される機序や、血管内皮細胞自体のアポトーシス抑制作用により血管内皮障害が抑制される機序が推測され、腸管粘膜の微少循環が改善することにより腸管粘膜上皮のアポトーシスが抑制されると考えられた。

HMGB1は、活性化マクロファージや壊死細胞からは放出され、細胞外で作用する場合は炎症性サイトカインとして働くと考えられている^{6,7)}。最近の研究において、熱傷時の肝・肺でのHMGB1 mRNAの増加、急性肺障害時の肺組織でのHMGB1蛋白の増加、肝虚血再灌流時の肝でのHMGB1発現の増加が報告されており、本研究ではラット急性脾炎モデルにおいてHMGB1の発現は脾および血中での増強に続いて肝・腎・肺・小腸で増強していた。この結果から急性脾炎における血清HMGB1値の上昇は、脾局所で活性化されたマクロファージと障害脾から遊離されたHMGB1による炎症、細胞障害の結果を反映するとともに、さらには脾でのHMGB1遊離に引き続き誘発される遠隔臓器での

活性化マクロファージと障害組織からのさらなる遊離という悪循環を反映していると推測される。

重症急性脾炎症例および実験脾炎モデルで血清HMGB1値が増加しており、重症度と正の相関を認めた。敗血症モデルや虚血再灌流モデルにおいて抗HMGB1中和抗体の投与による遠隔臓器障害や生存率の改善が報告されているが、本研究によって重症急性脾炎においても抗HMGB1抗体の投与による病態の進展ならびに遠隔臓器障害の抑制効果が示された。これはHMGB1が急性脾炎の局所での反応のみならず、遠隔臓器障害の成立機構にも関与していることを示唆する。

一方でHMGB1は腸管上皮の透過性を亢進させ、bacterial translocationを増加させることが報告されている⁸⁾。急性脾炎においても同様の結果が予測されたが、今回の検討では急性脾炎モデルにおけるbacterial translocationは抗HMGB1抗体の投与によってさらに増加していた。細胞外HMGB1はreceptor for advanced glycosylated end-products (RAGE) やtoll-like receptor (TLR)ファミリー (TLR2, TLR4)を介してNF- κ Bを誘導し、炎症反応を惹起することが明らかにされており、Tsongらは虚血再灌流時の肝障害が、抗HMGB1抗体の投与によって野生型マウスでは軽減できたが、TLR4欠損マウスでは軽減しなかったと報告している⁹⁾。TLR4はグラム陰性桿菌のLPSを認識する受容体であり、HMGB1のシグナルは、LPS誘導による炎症反応と同様の反応を示すことができると考えられる。さらに、TLRは炎症反応だけでなく感染に対しても防御的に働くと推測されているので、HMGB1のシグナルは感染にも影響する可能性がある。

本研究結果より重症急性脾炎においてVEGFによる腸管からのbacterial translocation抑制効果、そしてHMGB1が感染制御ならびに炎症や臓器不全に対する新しい治療の標的になる可能性が示唆された。抗HMGB1中和抗体は急性脾炎の炎症反応に伴う臓器障害を軽減させることが期待されるが、感染性合併症を増悪させる可能性があり、HMGB1のシグナル伝達経路と急性脾炎における役割のさらなる解明が必要である。

と考えられる。

E. 結論

ラット重症急性膵炎モデルにおいて、VEGFは小腸粘膜のアポトーシス誘導および小腸粘膜の萎縮を改善し、腸間膜リンパ節へのbacterial translocationを抑制した。

HMGB1は重症急性膵炎臨床例および実験モデルにおいて重症度に比例して有意に増加していた。重症急性膵炎実験モデルにおける抗HMGB1抗体の投与は膵炎の進展と遠隔臓器障害を抑制しており、HMGB1は重症急性膵炎の炎症反応や臓器障害における重要な情報伝達物質であることが示唆された。一方で抗HMGB1抗体の投与によりbacterial translocationは増悪しており、HMGB1は感染の成立にも深く関与していることが示唆された。

F. 参考文献

1. Beger HG, Bittner R, Block S, Buchler M. Bacterial contamination of pancreatic necrosis. A prospective clinical study. *Gastroenterology* 1986; 91: 433–438.
2. Yasuda T, Takeyama Y, Ueda T, Shinzeki M, Sawa H, Nakajima T, Kuroda Y. Breakdown of intestinal mucosa via accelerated apoptosis increases intestinal permeability in experimental severe acute pancreatitis. *J Surg Res* 2006; 135: 18–26.
3. Shinzeki M, Takeyama Y, Ueda T, Yasuda T, Kishi S, Kuroda Y. Intraperitoneal administration of oxygenated perfluorochemical inhibits bacterial translocation associated with severe acute pancreatitis. *Kobe J Med Sci* 2003; 49: 17–24.
4. Yasuda T, Takeyama Y, Ueda T, Shinzeki M, Kishi S, Sawa H, Nakajima T, Kuroda Y. Protective effect of caspase inhibitor on intestinal integrity in experimental severe acute pancreatitis. *J Surg Res* 2007; 138: 300–307.
5. Ueda T, Takeyama Y, Yasuda T, Matsumura N, Sawa H, Nakajima T, Kuroda Y. Vascular endothelial growthfactor increases in serum and protects against the organ injuries in severe acute pancreatitis. *J Surg Res* 2006; 134: 223–230.

6. Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* 2002; 418: 191–195.
7. Tsung A, Sahai R, Tanaka H, Nakao A, Fink MP, Lotze MT, Yang H, Li J, Tracey KJ, Geller DA, Billiar TR. The nuclear factor HMGB1 mediates hepatic injury after murine liver ischemia-reperfusion. *J Exp Med* 2005; 201: 1135–1143.
8. Sappington PL, Yang R, Yang H, Tracey KJ, Delude RL, Fink MP. HMGB1 B box increases the permeability of Caco-2 enterocytic monolayers and impairs intestinal barrier function in mice. *Gastroenterology* 2002; 123: 790–802.
9. Tsung A, Sahai R, Tanaka H, Nakao A, Fink MP, Lotze MT, Yang H, Li J, Tracey KJ, Geller DA, Billiar TR. The nuclear factor HMGB1 mediates hepatic injury after murine liver ischemia-reperfusion. *J Exp Med* 2005; 201: 1135–1143.

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ueda T, Takeyama Y, Yasuda T, Matsumura N, Sawa H, Nakajima T, Kuroda Y. Vascular endothelial growthfactor increases in serum and protects against the organ injuries in severe acute pancreatitis. *J Surg Res* 2006; 134: 223–230.
- 2) Nakajima T, Ueda T, Takeyama Y, Yasuda T, Shinzeki M, Sawa H, Kuroda Y. Protective effects of vascular endothelial growth factor on intestinal epithelial apoptosis and bacterial translocation in experimental severe acute pancreatitis. *Pancreas* 2007; 34: 410–416.
- 3) Yasuda T, Ueda T, Shinzeki M, Sawa H, Nakajima T, Takeyama Y, Kuroda Y. Increase of high mobility group box chromosomal protein 1 in blood and injured organs in experimental severe acute pancreatitis. *Pancreas* 2007; 34: 487–488.
- 4) Sawa H, Ueda T, Takeyama Y, Yasuda T, Shinzeki M, Nakajima T, Kuroda Y. Blockade of high mobility group box-1 protein attenuates experimental severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2006; 7660–7670.

2. 学会発表

- 1) 安田武生, 上田 隆, 中島高広, 沢 秀博, 松本逸平, 味木徹夫, 藤野泰宏, 鈴木康之, 竹山宜典, 黒田嘉和. 重症急性膵炎患者での血清 High Mobility Group Box Chromosomal Protein 1 (HMGB1) 値. 第 61 回日本消化器外科学会, 横浜 2006 年 7 月
- 2) 安田武生, 上田 隆, 新関 亮, 中島高広, 沢 秀博, 松本逸平, 味木徹夫, 藤野泰宏, 鈴木康之, 竹山宜典, 黒田嘉和. 重症急性膵炎症例における血清 High Mobility Group Box Chromosomal Protein 1 (HMGB1) 値の上昇. 第 48 回日本消化器病学会大会, 札幌 2006 年 10 月
- 3) Yasuda T, Ueda T, Takeyama Y, Nakajima T, Sawa H, Shinzeki M, Takase K, Kuroda Y. Role of high mobility group box chromosomal protein 1 in experimental severe acute pancreatitis. The American Gastroenterological Association Annual Meeting. Washington DC, U.S.A. May 19–24, 2007
- 4) 沢 秀博, 上田 隆, 安田武生, 新関 亮, 中島高広, 竹山宜典, 黒田嘉和. マウス重症急性膵炎モデルに対する抗 HMGB1 中和抗体の効果 第 38 回日本膵臓学会大会, 福岡 2007 年 6 月
- 5) 安田武生, 上田 隆, 中島高広, 沢 秀博, 新関 亮, 竹山宜典, 黒田嘉和, 具 英成. Rat 急性膵炎モデルにおける High Mobility Group Box Chromosomal Protein 1 (HMGB1) の動態. 第 62 回日本消化器外科学会, 東京 2007 年 7 月

H. 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

2. 慢性肺炎

低酸素状態が膵線維化進展に与える影響

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

渡邊史郎, 浅海 洋, 野見山陽子, 永塩美邦, 田口雅史, 木原康之, 中村早人
(産業医科大学消化器・代謝内科)

【研究要旨】

慢性膵炎は膵実質の脱落と線維化を特徴とする慢性進行性の難治性疾患である。ヒト慢性膵炎では膵血流が低下しているうえに、慢性エタノール投与は膵臓(膵腺房細胞, ラ氏島)を低酸素状態にすることが知られている。一方Hypoxia-inducible factor (HIF) -1は低酸素環境下で発現し多くの遺伝子発現を転写レベルで制御する転写因子である。そこで、膵線維化の中心的役割を果たしている膵星細胞(pancreatic stellate cells; PSCs)を用いて、低酸素状態が膵線維化進展に与える影響を検討した。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、PSCsは低酸素状態になっていた。PSCsを低酸素条件下で培養すると、BrdU取込み量と α -SMAタンパクの発現量は増加し、上清中へのコラーゲン分泌量、1型コラーゲンmRNAの発現量も増加した。また、低酸素条件下のPSCsは、HIF-1 α タンパクの発現量は増加し、PKC活性も増加した。さらに、PKC阻害剤は低酸素刺激で誘導されるHIF-1 α 、I型プロコラーゲン α 1 mRNA発現の増加を抑制した。慢性膵炎において膵局所の低酸素状態がPSCsを活性化し膵線維化を進展させる可能性が示唆された。低酸素状態にて誘導されるPSCsの活性化にはHIF-1やPKCが重要な役割を果たしていると考えられた。

A. 研究目的

慢性膵炎は膵実質の脱落と線維化を特徴とする慢性進行性の疾患であり、依然として病因や進展機序が明らかでなく、臨床経過も予測できない難治性疾患である。1998年に膵線維化の中心的役割を果たしているPSCsが分離・同定され^{1,2)}、PSCsを用いた*in vitro*の解析により膵線維化進展の機序が解明されつつある。一方、ヒト慢性膵炎では膵血流が低下している^{3,4)}、さらに慢性エタノール投与により膵臓(膵腺房細胞, ラ氏島)は低酸素状態となることが知られている⁵⁾。一方Hypoxia-inducible factor (HIF) -1は低酸素環境下で発現し各種解糖系酵素, グルコース輸送蛋白, 血管内皮増殖因子(VEGF), 造血因子エリスロポイエチンなど、多くの遺伝子発現を転写レベルで制御する転写因子である。そこで、低酸素状態が膵線維化進展に寄与するかどうかラットPSCsを用いて検討を行った。

B. 研究方法

in vivo : 自然発症慢性膵炎モデルであるWBN/Kobラット(20週齢)に120 mg/kg体重のhypoxyprom-1 (pimonidazole hydrochloride)を静注し、1時間後に犠牲死させ膵臓を摘出しHE染色, Azan染色, α -SMA染色, HIF-1染色, およびhypoxyprom-1染色で組織学的検討を行った。Hypoxyprom-1は低酸素状態の細胞において、タンパク質のチオール基に付加される。付加されたタンパク質を認識する抗hypoxyprom-1抗体で細胞を染色し、低酸素状態の細胞を検出する。

in vitro : Wistar系雄性ラット(200~250g)より膵臓を摘出し、既報に準じて¹⁾ PSCsを単離、培養した。10% 牛胎児血清(FBS)加Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)で24時間細胞を培養した後、0.1% FBS加DMEMに培地を変更しさらに24時間培養した。その後、低酸素状態(3% O₂)でPSCsを培養し以下の項目を検討した。1)細胞増殖をBrdU取込み量で、2)活性化の指標としてPSCsの α -SMA免疫染色, α -SMA

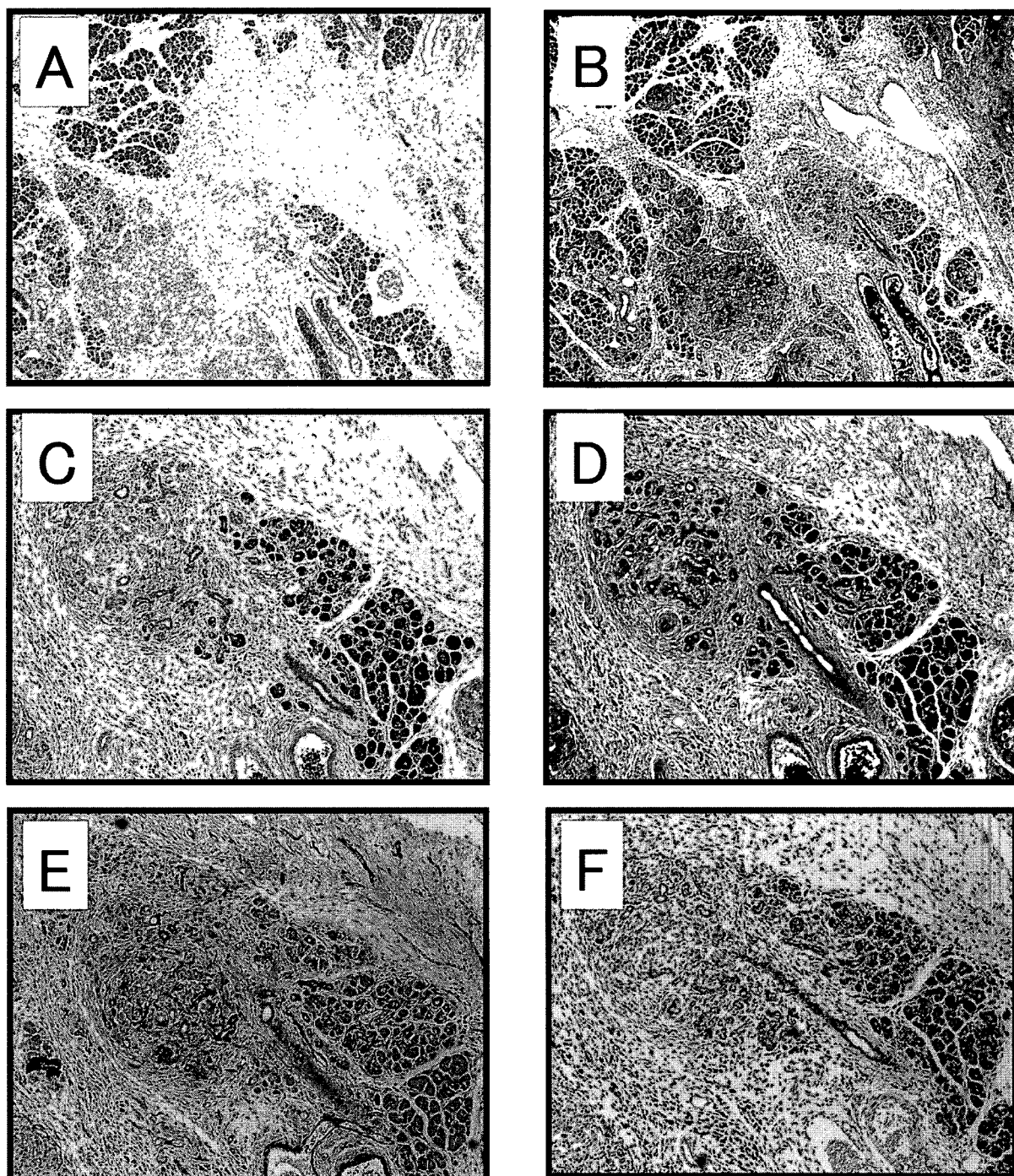


図1 WBN/Kob ラット膵の組織学的検討
A, C: HE 染色, B, D: Azan 染色, E: α -SMA 免疫染色, F: Hypoxyprobe-1 免疫染色

タンパクの発現量を Western blot 法にて, 3) 上清中へのコラーゲン分泌量を Sircol collagen assay kit にて, 4) HIF-1 α 核内タンパクの発現量を Western blot 法にて, 5) PKC 活性を PepTag® Non-Radioactive Protein Kinase Assay にて, 6) HIF-1 α , I 型プロコラーゲン $\alpha 1$ mRNA の発現量を real time RT-PCR 法でそれぞれ検討した. PSCs の α -SMA 免疫染色, α -SMA タンパクの Western blot 法は初継代の PSCs を用いて実験を行い, その他の実験には 2-3 継代培養後の PSCs

を実験に供した. なお, 本実験は, 本学の動物実験および飼育倫理委員会の承認を得(承認番号: AE05-004), 動物愛護の配慮のもとに行った.

C. 研究結果

WBN/Kob ラットの膵組織は膵実質の脱落, 小葉間の線維化を認め慢性膵炎の組織像を呈しており(図 1A-D), 免疫組織学的染色法で α -SMA (図 1E) は脈間周囲と間質に存在する紡錘形の細胞に, hypoxypore-1 (図 1F) は実質細胞, 間質

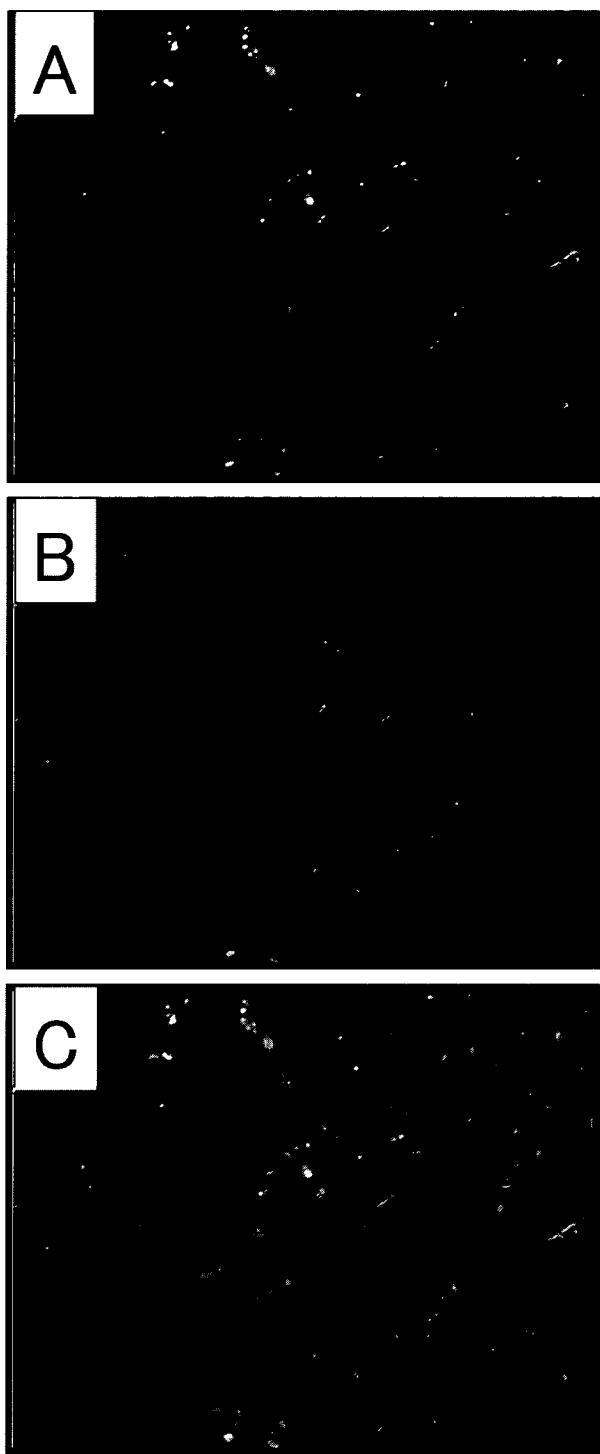


図2 WBN/Kobラット膵の蛍光免疫染色
A: Hypoxyprobe-1 蛍光免疫染色, B: α -SMA 蛍光免疫染色, C: Hypoxyprobe-1 と α -SMA の蛍光二重免疫染色

の紡錘形の細胞に発現していた。また α -SMA と hypoxypore-1 の二重染色では間質に認められる紡錘形の細胞が染色されていた(図2)。

PSCs を低酸素条件下で培養すると、通常培養と比較し培養24, 48時間後に通常培養と比較し BrdU 取り込み量が有意に増加した(図3)。また、低酸素条件下で培養を行ったPSCsは通常培養と

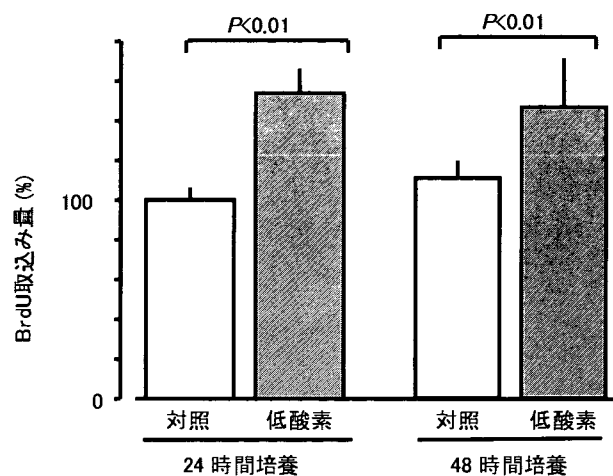


図3 低酸素(3% O_2)条件下の培養がPSCsの細胞増殖に与える影響

対照：通常培養条件(O_2 約20%)，(平均値±標準偏差，n=4)

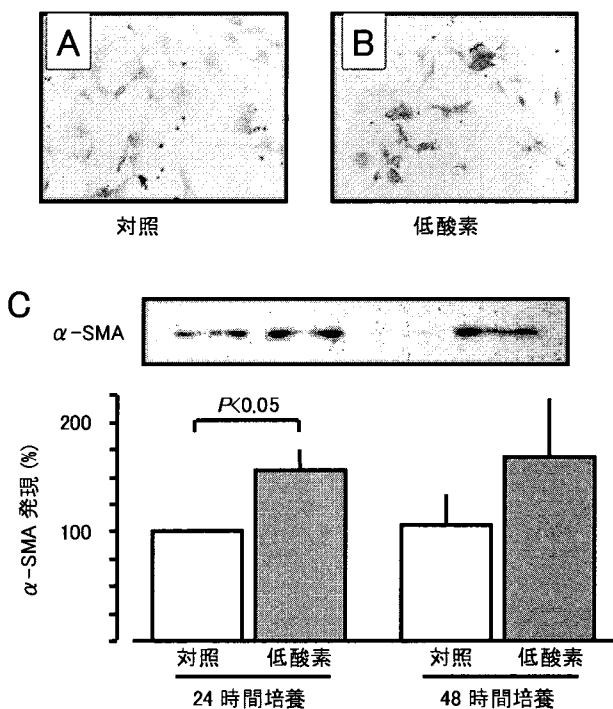


図4 低酸素(3% O_2)条件下で培養したPSCsの α -SMA タンパクの発現に与える影響

A, B: α -SMA 免疫染色 C: Western blot 対照：通常培養条件(O_2 約20%)，(平均値±標準偏差，n=3)

比較し、 α -SMA 陽性細胞が多くみられた(図4A, B)。PSCs の α -SMA タンパクの発現量は、低酸素条件下の培養により有意に増加した(図4C)。さらに、PSCs を低酸素条件下で培養を行うと、上清中へのコラーゲン分泌量と1型コラーゲン mRNA の発現量が有意に増加した(図5)。

WBN/Kobラット膵組織の免疫組織学的染色法で α -SMA (図6A)は脈管周囲と間質に存在する紡錘形の細胞が染色され、HIF-1 α (図6B)は

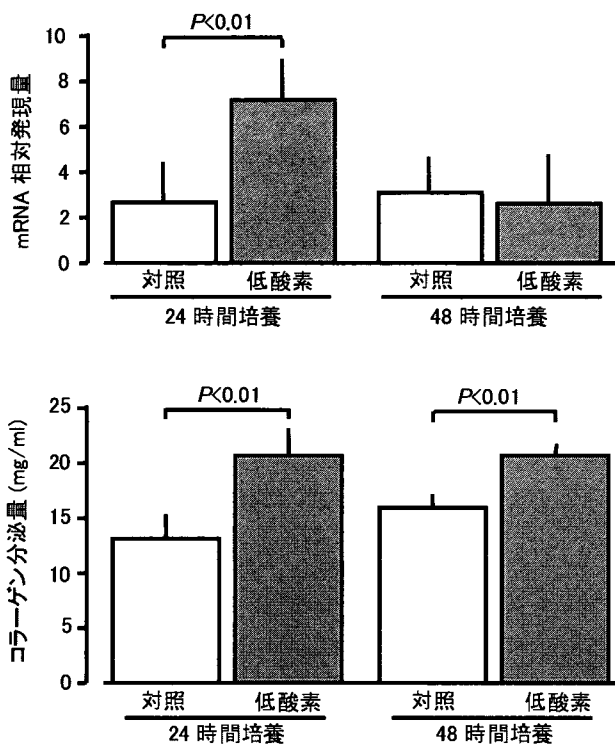


図5 低酸素(3% O₂)条件下で培養したPSCsのI型プロコラーゲン α 1 mRNAの発現量とコラーゲン分泌に与える影響

上段：I型プロコラーゲン α 1 mRNAの発現量，下段：コラーゲン分泌量 対照：通常培養条件(O₂約20%)，(平均値±標準偏差，n=4)

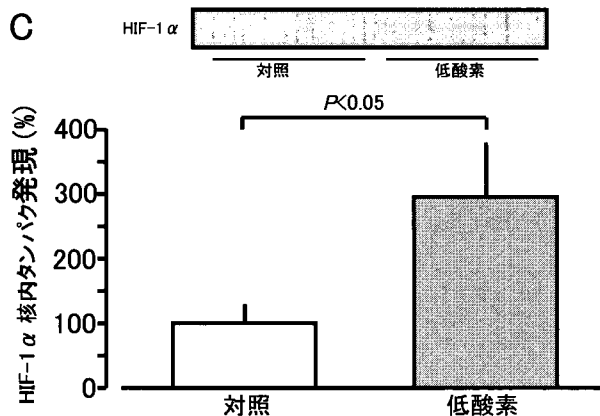
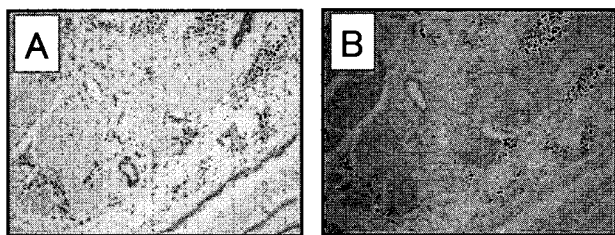


図6 低酸素(3% O₂)条件下で培養したPSCsのHIF-1 α 核内タンパク発現に与える影響

A: WBN/Kobラット臍の α -SMA免疫染色，脈管周囲のほか，間質に存在する紡錘形の細胞が染色された。B: WBN/Kobラット臍のHIF-1 α 免疫染色，間質に存在する細胞の核が強く染色された。C: Western blot，低酸素条件下で1時間培養した後，核内タンパクを抽出しWestern blot法で検討した(平均値±標準偏差，n=3)。

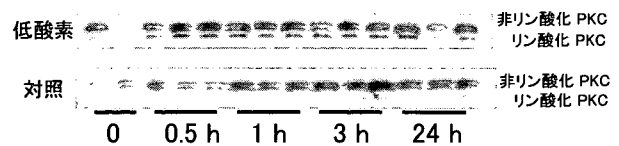


図7 低酸素(3% O₂)条件下で培養したPSCsにおけるPKC活性

対照：通常培養条件(O₂約20%)，(平均値±標準偏差，n=3)。

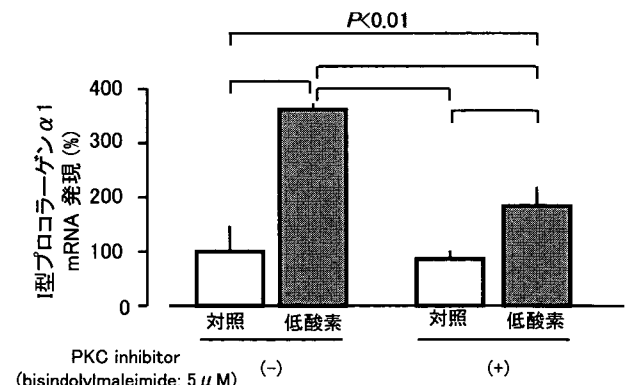
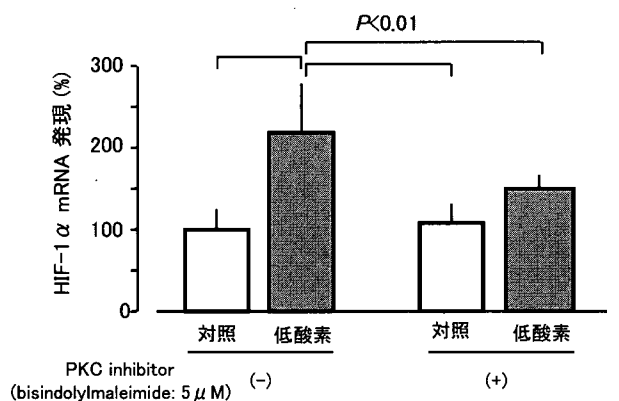


図8 低酸素(3% O₂)条件下で培養したPSCsにおいてPKC阻害剤がHIF-1 α ，I型プロコラーゲン α 1 mRNA発現に与える影響

通常条件下(O₂約20%)および低酸素条件下培養24時間後のPSCsにおいてPKC阻害剤がHIF-1 α ，I型プロコラーゲン α 1 mRNAの発現に与える影響をreal-time PCR法で検討した(平均値±標準偏差，n=3)。

α -SMA陽性細胞と同細胞の核に染色されていた。対照群では脈管周囲に α -SMA陽性細胞を認めるのみで，HIF-1 α の染色は認めなかった。また，PSCsを低酸素条件下で培養すると，培養24

時間後に通常培養と比較しHIF-1 α 核内タンパク量が有意に増加した(図6C)。

低酸素条件下で培養を行ったPSCsは通常培養と比較し、PKC活性の有意な増加が見られた(図7) PSCsのHIF-1 α 、I型プロコラーゲン α 1 mRNAの発現量は、低酸素条件下の培養により有意に増加した。さらにPKC阻害剤によって、低酸素条件下の培養で誘導されるHIF-1 α 、I型プロコラーゲン α 1 mRNA発現の増加は抑制された(図8)。

D. 考察

自然発症慢性膵炎モデルであるWBN/Kobラットの膵臓において、間質に存在する紡錘形の α -SMA陽性細胞がhypoxypromote-1とHIF-1に染色されていた。また、低酸素条件下で培養したPSCsはHIF-1 α タンパクの発現が有意に増加していたことから、慢性膵炎で膵血流が低下している場合や、慢性エタノール投与により膵臓が低酸素状態になっている場合は、PSCsも低酸素状態にありHIF-1 α タンパクが発現していると考えられる。HIF-1は低酸素刺激により、各種解糖系酵素、グルコース輸送蛋白、血管内皮増殖因子(VEGF)、造血因子エリスロポイエチンなどが知られている。PSCsと肝星細胞(HSCs)は遺伝的相同性が極めて高いことが知られているが、PSCsにおいてHSCsよりも増強して認められていた遺伝子の一つにHIF-1 α がある⁶⁾。低酸素刺激が膵線維化およびPSCs活性化の刺激因子として重要であるとともに、膵臓における何らかの臓器特異性を示している可能性があると考えられる。

PSCsを低酸素条件下で培養すると増殖し、活性化され、コラーゲン産生が亢進することから、慢性膵炎では膵血流の低下が膵局所の低酸素状態を惹起し、PSCsが活性化され膵線維化が進展・増悪すると考えられた。また、低酸素刺激で増加したHIF-1 α 、I型プロコラーゲン α 1 mRNA発現は、PKC阻害剤の投与によって有意に抑制されたことから、低酸素刺激で誘導される膵線維化の進展・増悪にPKCが重要な役割を果たしていると考えられた。腎臓における線

維芽細胞の検討においても、低酸素刺激によりHIFはPKCやチロシンキナーゼを介して誘導され、SMAや細胞外基質の合成を調節していることが報告されている⁷⁾。

慢性膵炎では膵血流の低下が膵局所の低酸素状態を惹起し、PSCsが活性化されて膵線維化が進展・増悪すると考えられるが、低酸素刺激による膵線維化の進展増悪にはHIF-1やPKCの関与が重要であると推測される。低酸素誘導遺伝子の制御機構は膵線維化治療の標的となる可能性もあり、今後さらなる解析が必要である。

E. 結論

慢性膵炎において膵局所の低酸素状態がPSCsを活性化し膵線維化を進展させる可能性が示唆された。

F. 参考文献

1. 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: 128-133.
2. 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.
3. Schilling MK, Redaelli C, Reber PU, Friess H, Signer C, Stoupis C, Buchler MW. Microcirculation in chronic alcoholic pancreatitis: a laser Doppler flow study. *Pancreas* 1999; 19: 21-25.
4. Lewis MP, Lo SK, Reber PU, Patel A, Gloor B, Todd KE, Toyama MT, Sherman S, Ashley SW, Reber HA. Endoscopic measurement of pancreatic tissue perfusion in patients with chronic pancreatitis and control patients. *Gastrointest Endosc* 2000; 51: 195-199.
5. McKim SE, Uesugi T, Raleigh JA, McClain CJ, Arteel GE. Chronic intragastric alcohol exposure causes hypoxia and oxidative stress in the

rat pancreas. Arch Biochem Biophys 2003; 417: 34-43.

6. Buchholz M, Kestler HA, Holzmann K, Ellenrieder V, Schneiderhan W, Siech M, Adler G, Bachem MG, Gress TM. Transcriptome analysis of human hepatic and pancreatic stellate cells: organ-specific variations of a common transcriptional phenotype. J Mol Med 2005; 83: 795-805.
7. Norman JT, Clark IM, Garcia PL. Hypoxia promotes fibrogenesis in human renal fibroblasts. Kidney Int 2000; 58: 2351-2366.

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 浅海 洋, 渡邊史郎, 大槻 眞. 脾星細胞 低酸素. 肝胆脾 2007; 55: 1223-1229.

2. 学会発表

- 1) 渡邊史郎, 浅海 洋, 野見山陽子, 田口雅史, 田代充生, 木原康之, 中村早人, 大槻 眞. 第92回日本消化器病学会総会, 北九州 2006年4月20-22日
- 2) Watanabe S, Nagashio Y, Asaumi H, Nomiya Y, Taguchi M, Kihara Y, Nakamura H, Otsuki M. The effect of hypoxia on rat pancreatic stellate cells. The 38th annual meeting of the American Pancreatic Association, Chicago, U.S.A. November 1-3, 2007

H. 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

圧負荷による活性酸素種依存性シグナルの検討

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

浅海 洋, 渡邊史郎, 宮本珠生, 田口雅史, 田代充生, 木原康之, 中村早人
(産業医科大学消化器・代謝内科)

【研究要旨】

慢性膵炎は膵実質の脱落と線維化を特徴とする慢性進行性の難治性膵疾患であり、その膵組織内圧は正常膵よりも上昇していることが知られている。われわれは膵線維化の中心的役割を果たす膵星細胞(pancreatic stellate cell; PSC)に圧負荷を加えるとコラーゲン合成が促進されること、ならびにPSCの活性化・コラーゲン合成に活性酸素種(ROS)が重要な役割を果たしている可能性を示してきた。そこで、圧負荷刺激によるPSC内ROSの働き、および抗酸化剤の治療的可能性について検討した。Wistar系雄性ラットより単離したPSCに圧負荷を加えると、刺激30秒後には細胞内にROSが誘導され、抗酸化剤の前投与により誘導が抑制された。圧負荷刺激によりI型プロコラーゲンおよび α -SMA蛋白発現、遺伝子関連遺伝子発現はいずれも有意に増強したが、いずれも抗酸化剤の前投与により発現が抑制された。p38 MAPKのリン酸化は圧負荷2分後に活性化し、抗酸化剤の前投与により抑制された。これらの結果から、PSCにおいてROSはp38 MAPKより上流に位置し、圧負荷誘導性コラーゲン合成における重要なシグナルとして作用している可能性が示唆された。また、抗酸化剤やポリフェノールなどが、慢性膵炎における膵線維化進展において予防的効果を持つ可能性が考えられた。

A. 研究目的

慢性膵炎は膵実質の脱落と線維化を特徴とする慢性進行性の疾患であるが、病因や進展機序について不明な部分が多く根本的な治療法もない難治性膵疾患である。1998年に膵線維化の中心的役割を果たす膵星細胞(pancreatic stellate cell; PSC)が分離・同定されてから^{1,2)}、PSCを用いた*in vitro*の研究を中心に膵線維化進展の機序が解明されつつある。

慢性膵炎では膵組織内圧が正常膵より高いことが知られている^{3,4)}が、われわれは、圧負荷がPSCのコラーゲンやサイトカインの合成を促進すること⁵⁾を報告した。また、強力な抗酸化剤である緑茶カテキンepigallocatechin gallate (EGCG)がエタノール誘導性のPSC内酸化ストレスを消去し、コラーゲンやサイトカインの合成を抑制することから、PSCの活性化やコラーゲン合成における酸化ストレスや活性酸素種(reactive oxygen species; ROS)の重要性について

報告してきた⁶⁾。そこで、今回われわれは圧負荷という機械的刺激におけるPSC内のROSの働きについて検討した。

B. 研究方法

Wistar系雄性ラット(200～250g)より膵臓を摘出し、既報に準じて³⁾ PSCを分離・培養し、2～3系代目を使用した。10%牛胎児血清(fetus bovine serum; FBS)加Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)で24時間培養後、0.1% FBS加DMEMに培地を変更し、さらに24時間培養した。その後、内部の温度を37℃に保つことのできる密閉したチャンバー内で、コンピューター制御下にヘリウムガスにて80mmHgの圧負荷を加え、以下の項目について以下の項目について検討を行った。①PSC内のROSの誘導をhydroxyphenyl fluorescein (細胞内に発生する高反応性のROSと反応し蛍光を呈する)を用いた蛍光顕微鏡にて、②PSCの活性化の指標として

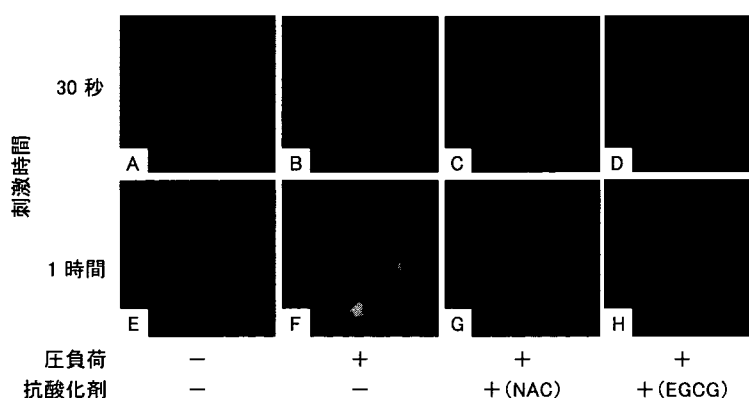


図1 圧負荷刺激(80mmHg)における細胞内ROSの誘導
刺激時間30秒：A)対照群，B)圧負荷(80mmHg)群，C) NAC添加後圧負荷群，D) EGCG添加後圧負荷群。
刺激時間1時間：E)対照群，F)圧負荷(80mmHg)群，G) NAC添加後圧負荷群，H) EGCG添加後圧負荷群。

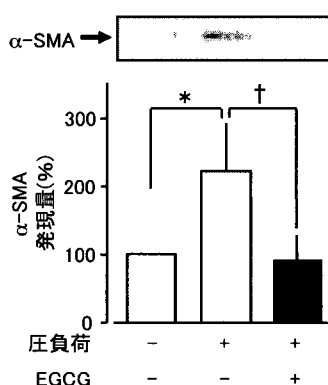


図2 圧負荷刺激(80mmHg)および抗酸化剤EGCGのⅠ型プロコラーゲン α 1蛋白発現に与える影響
圧負荷(80mmHg) 1時間刺激後，24時間培養した後に蛋白抽出を行い，Western blot法にて検討した。平均値 $\pm$ 標準偏差， $n=4$ ，* $P<0.05$ vs. 対照群，† $P<0.05$ vs. 圧負荷群(抗酸化剤非投与群)。

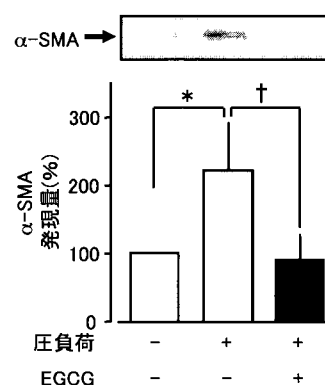


図3 圧負荷刺激(80mmHg)および抗酸化剤EGCGの α -SMA蛋白発現に与える影響
圧負荷(80mmHg) 1時間刺激後，24時間培養した後に蛋白抽出を行い，Western blot法にて検討した。平均値 $\pm$ 標準偏差， $n=4$ ，* $P<0.05$ vs. 対照群，† $P<0.05$ vs. 圧負荷群(抗酸化剤非投与群)。

α -smooth muscle actin (SMA) の mRNA 発現を定量的 RT-PCR 法および蛋白発現を Western blot 法にて，③PSC の細胞外基質産生における影響としてⅠ型プロコラーゲン α 1 の蛋白発現を Western blot 法にて，④線維化関連遺伝子の影響として， α -SMA，Ⅰ型プロコラーゲン，transforming growth factor (TGF)- β 1 の mRNA 発現を定量的 RT-PCR にて，⑤p38 mitogen activated protein kinase (MAPK) のリン酸化(活性化)を Western blot 法にて検討した。

(倫理面への配慮)

本実験は，本学の動物実験および飼育倫理委員会の承認を得，動物愛護の配慮のもとに行った。

C. 研究結果

蛍光顕微鏡による観察では，30秒の圧負荷刺

激にてPSC内にROSの誘導を認める蛍光が認められ，1時間の圧負荷刺激ではその蛍光がさらに増強した(図1B，F)。ところが抗酸化剤であるN-acetyl-L-cysteine (NAC) およびEGCGを添加し前培養すると，圧負荷刺激(30秒刺激および1時間刺激とも)によるPSC内への蛍光発現が抑制され，特にEGCGではその発現がほとんど認められなかった(図1C，D，G，H)。

圧負荷刺激によりPSCにおける α -SMA，Ⅰ型プロコラーゲン α 1蛋白発現は優位に増強され，抗酸化剤EGCGの前投与により圧負荷による両蛋白発現はコントロールと同等のレベルまで抑制された(図2，3)。また α -SMA，Ⅰ型プロコラーゲン α 1，TGF- β 1のmRNA発現も圧負荷により有意に増強され，抗酸化剤EGCGにより有意に抑制された(図4A-C)。

PSCにおいては α -SMAおよびⅠ型コラーゲン

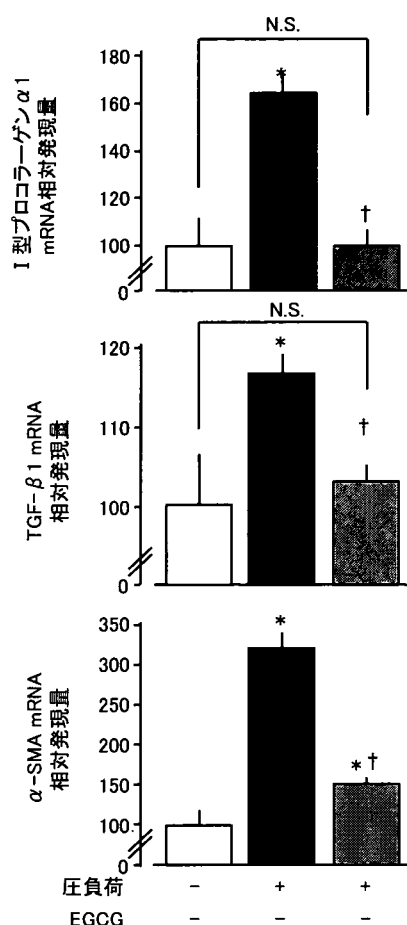


図4 圧負荷刺激(80mmHg)および抗酸化剤EGCGの線維化関連遺伝子発現に与える影響

圧負荷(80mmHg) 1時間刺激後, mRNA抽出を行い定量的RT-PCR法にて検討した. 平均値±標準偏差, $n = 4$, * $P < 0.05$ vs. 対照群, † $P < 0.05$ vs. 圧負荷群(抗酸化剤非投与群).

合成においてp38 MAPKは重要なシグナルとして作用しており, 圧負荷刺激においてp38 MAPKは刺激2分後に有意にリン酸化(活性化)されるが, 抗酸化剤EGCGの前投与により圧負荷誘導性p38 MAPKのリン酸化も有意に抑制された(図5).

D. 考察

PSCに圧負荷を加えると, 刺激後早期に細胞内にROSが誘導され, 刺激の持続によりROSの誘導も増強するものと考えられた. 抗酸化剤は圧負荷誘導性の細胞内ROSの発生を抑制し, α -SMAやI型コラーゲン合成を抑制するものと考えられた. 圧負荷刺激により, ①細胞内ROSの誘導は30秒という早期から認められ, 2分後にp38 MAPKのリン酸化が生じること, ②抗酸化剤の前投与によりp38 MAPKのリン酸化が抑制されたことから, ROSがMAPKなどよりも上

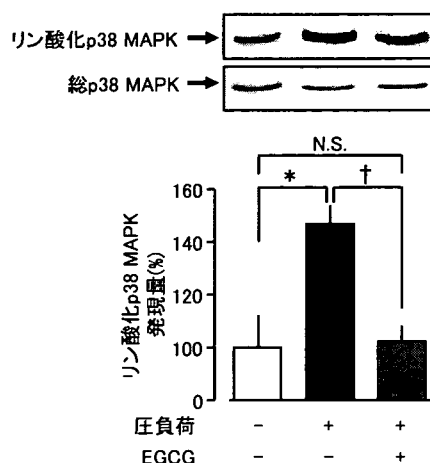


図5 圧負荷刺激(80mmHg)および抗酸化剤EGCGのp38MAPKリン酸化に与える影響

圧負荷(80mmHg) 2分間刺激後, 蛋白抽出を行いWestern blot法にて検討した. 平均値±標準偏差, $n = 4$, * $P < 0.05$ vs. 対照群, † $P < 0.05$ vs. 圧負荷群(抗酸化剤非投与群).

流のシグナルとして作用し, ECMやサイトカイン産生にかかわっている可能性が示唆された. 肝線維化の中心的役割を果たす肝星細胞においても, ROS-p38 MAPK経路が存在することが知られており⁷⁾, 肝星細胞と遺伝的相同性が極めて高いPSCにおいても同様の経路が存在する可能性がある. 今回の検討から, EGCGなどの抗酸化物質により肝線維化進展を抑制する可能性が示唆されたが, まだ不明な点があり, 今後さらなる検討が必要である.

E. 結論

慢性肝炎の肝線維化進展において, 肝星細胞内に発生する活性酸素種が重要な役割を果たしており, 抗酸化剤やポリフェノールなどに肝線維化進展において予防的効果がある可能性が示唆された.

F. 参考文献

1. Apte MV, Haber PS, Applegate TJ, Norton ID, McCaughan GW, Korsten MA, Pirola RC, Wilson JS. Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation, and culture. Gut 1998; 43: 128-133.
2. Bachem M, Schneider E, Grob H, Weidenbach H, Schmid RM, Menke A, et al. Identification, culture and characterization of pancreatic stellate cells in rats and humans. Gastroenterology 1998;

115: 421-432.

3. Jalleh RP, Aslam M, Williamson RC. Pancreatic tissue and ductal pressures in chronic pancreatitis. *Br J Surg* 1991; 78: 1235-1237.
4. Manes G, Buchler M, Pieramico O, Di Sebastiano P, Malfertheiner P. Is increased pancreatic pressure related to pain in chronic pancreatitis? *Int J Pancreatol* 1994; 15: 113-117.
5. Watanabe S, Nagashio Y, Asaumi H, Nomiyama Y, Taguchi M, Tashiro M, Kihara Y, Nakamura H, Otsuki M. Pressure activates rat pancreatic stellate cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 287: G1175-1181.
6. Asaumi H, Watanabe S, Taguchi M, Tashiro M, Nagashio Y, Nomiyama Y, Nakamura H, Otsuki M. Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits ethanol-induced activation of pancreatic stellate cells. *Eur J Clin Invest* 2006; 36: 113-122.
7. Adachi T, Togashi H, Suzuki A, Kasai S, Ito J, Sugahara K, Kawata S. NAD(P)H oxidase plays a crucial role in PDGF-induced proliferation of hepatic stellate cells. *Hepatology* 2005; 41: 1272-1281.

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Asaumi H, Watanabe S, Taguchi M, Tashiro M, Otsuki M. Externally applied pressure activates pancreatic stellate cells through the generation of intracellular reactive oxygen species. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 293: G972-978.

2. 学会発表

- 1) Miyamoto T, Asaumi H, Watanabe S, Taguchi M, Tashiro M, Otsuki M. Pressure induces extracellular matrix and cytokine synthesis in pancreatic stellate cells via generation of reactive oxygen species. The 38th meeting of the European Pancreatic Club. Tampere, FINLAND June 7-10, 2006
- 2) 浅海 洋, 渡邊史郎, 田口雅史, 田代充生, 大槻 眞. 圧負荷により誘導された活性酸素種は

細胞外基質・サイトカイン産生における重要なシグナルとして働く. 第14回日本消化器関連学会週間, 札幌 2006年10月11-14日

- 3) Asaumi H, Watanabe S, Taguchi M, Tashiro M, Otsuki M. Pressure activates pancreatic stellate cells via generation of intracellular reactive oxygen species. Digest Disease Week 2007, Washington, DC., U.S.A. May 19-24, 2007
- 4) Asaumi H, Watanabe S, Taguchi M, Otsuki M. Pressure activates pancreatic stellate cells via generation of intracellular reactive oxygen species. The II Falk Gastro-Conference (Part II) Future Perspectives in Gastroenterology. Germany October 11-12, 2007

H. 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

慢性膵炎および膵癌症例における PSTI 遺伝子変異の解析

研究報告者 船越顕博 国立病院機構九州がんセンター消化器内科 医長

共同研究者

川波賢子（国立病院機構九州がんセンター消化器内科）、伊藤鉄英（九州大学大学院病態制御内科学）
明石哲朗（済生会福岡総合病院）、宮坂京子（東京都老人総合研究所）
中村光男（弘前大学医学部病因・病態検査学）

【研究要旨】

膵分泌性トリプシンインヒビター（PSTI）は膵腺房細胞内で活性化したトリプシンを不活化する膵炎の防御因子として知られている。最近、この遺伝子変異と特発性慢性膵炎、遺伝性膵炎発症との関連が報告されていることから、本研究では、慢性膵炎患者における遺伝的背景を探る目的で PSTI の遺伝子解析を行った。また、長期慢性膵炎は膵癌発症のリスクが高いことも考慮し、膵癌症例でも解析を行った。その結果、6 例の慢性膵炎患者で N34S 変異が見つかった。その内訳は、家族性膵炎 1 例、特発性 3 例、アルコール性 2 例であった。膵癌患者では 4 例、対照とした健常人では 1 例のみこの変異が検出された。

いずれのタイプの慢性膵炎でも PSTI 遺伝子 N34S 変異の出現頻度は膵癌、対照に比べて有意に高率であった。N34S 変異の膵癌発症への関連ははっきりしなかった。

A. 研究目的

正常膵臓では、膵腺房細胞内でトリプシノーゲンがトリプシンに活性化された場合、膵液中に分泌されるトリプシンインヒビター（PSTI）はその活性を阻害する。自己触媒的に進行する膵酵素活性化カスケードを阻止し、自己消化から膵臓を守る第一の防御メカニズムである。一方、PSTI 遺伝子の変異があった場合、膵腺房細胞内のプロテアーゼとそのインヒビターの均衡が失われ、活性化したトリプシンは次々にトリプシンを含む消化酵素を活性化して膵実質の自己消化と炎症を引き起こし、膵炎を発症する¹⁾。

最近、内因性のトリプシン阻害物質である PSTI（pancreatic secretory trypsin inhibitor）の遺伝子変異と特発性慢性膵炎、遺伝性膵炎との関連が報告されている²⁾。欧米ではこの変異は健常人でも数パーセントに見られ³⁾、この遺伝子変異が単独で慢性膵炎を引き起こすとは考えにくい。しかし、PSTI 遺伝子変異が慢性膵炎発症の閾値を下げ、個体側の疾患感受性を規定する因

子になっている可能性が考えられる⁴⁾。

そこで、本研究では慢性膵炎発症における遺伝的背景を探ることを目的に、PSTI 遺伝子変異の解析を行った。また、長期慢性膵炎の患者は膵癌合併のリスクが高い。膵癌症例でも同様の解析を行い、慢性膵炎での遺伝子変異出現頻度と比較検討することとした。

B. 研究方法

・ 88 例の膵炎患者

内訳は遺伝性膵炎 4 例、家族性膵炎 4 例、特発性慢性膵炎 44 例（30 歳未満の若年性が 2 例、30 歳以上の非若年性が 42 例）、アルコール性 30 例、自己免疫性 3 例、急性膵炎 2 例であった。

・ 217 例の膵癌患者

・ 103 例の健常人

（倫理面での配慮）

サンプル採取および遺伝子解析にあたっては各施設の倫理委員会の承認を得た。また患者および家族には検査について十分説明し文書によ