

- Med Res 2008, 13: 481-482.
26. McDonald V, Laffan M, Benjamin S, Bevan D, Machin S, Scully MA. Thrombotic thrombocytopenic purpura precipitated by acute pancreatitis: a report of seven cases from a regional UK TTP registry. *Br J Haematol* 2009, 144: 430-433.
  27. Kusterer K, Poschmann T, Friedemann A, Enghofer M, Zandler S, Usadel KH. Arterial constriction, ischemiareperfusion, and leukocyte adherence in acute pancreatitis. *Am J Physiol* 1993; 265: G165-71.
  28. Bernardo A, Ball C, Nolasco L, Moake JF, Dong JF. Effects of inflammatory cytokines on the release and cleavage of the endothelial cell-derived ultralarge von Willebrand factor multimers under flow. *Blood* 2004; 104: 100-6.
  29. Fossard DP, Kakkar VV. The Limulus test in experimental and clinical endotoxaemia. *Br J Surg* 1974; 61: 798-804.
  30. Bose SM, Verma GR, Mazumdar A, Giridhar M, Ganguly NK. Significance of serum endotoxin and antiendotoxin antibody levels in predicting the severity of acute pancreatitis. *Surg Today* 2002; 32: 602-607.
  31. Ammori BJ, Leeder PC, King RF, Barclay GR, Martin IG, Larvin M, McMahon MJ. Early increase in intestinal permeability in patients with severe acute pancreatitis: correlation with endotoxemia, organ failure, and mortality. *J Gastrointest Surg.* 1999; 3: 252-262.
  32. Opal SM. The host response to endotoxin, antilipopolysaccharide strategies, and the management of severe sepsis. *Int J Med Microbiol* 2007; 297: 365-377.
  33. Reidy MA, Chopek M, Chao S, McDonald T, Schwartz SM. Injury induces increase of von Willebrand factor in rat endothelial cells. *Am J Pathol* 1989; 134: 857-864.
  34. Reiter RA, Varadi K, Turecek PL, Jilka B, Knöbl P. Changes in ADAMTS13 (von Willebrand-factor-cleaving protease) activity after induced release of von Willebrand factor during acute systemic inflammation. *Thromb Haemost* 2005; 93: 554-558.
  35. Gross V, Schölmerich J, Leser HG, Salm R, Lausen M, Rückauer K, Schöffel U, Lay L, Heinisch A, Farthmann EH. Granulocyte elastase in assessment of severity of acute pancreatitis. Comparison with acute-phase proteins C-reactive protein, alpha 1-antitrypsin, and protease inhibitor alpha 2-macroglobulin. *Dig Dis Sci* 1990; 35: 97-105.
  36. Viedma JA, Pérez-Mateo M, Agulló J, Domínguez JE, Carballo F. Inflammatory response in the early prediction of severity in human acute pancreatitis. *Gut* 1994; 35: 822-827.
  37. Hiura H, Matsui T, Matsumoto M, Hori Y, Isonishi A, Kato S, Iwamoto T, Mori T, Fujimura Y. Proteolytic fragmentation and sugar chains of plasma ADAMTS13 purified by a conformation-dependent monoclonal antibody. *J Biochem* 2010; 148: 403-411.
  38. Fujimura Y, Matsumoto M, Kokame K, Isonishi A, Soejima K, Akiyama N, Tomiyama J, Natori K, Kuranishi Y, Imamura Y, Inoue N, Higasa S, Seike M, Kozuka T, Hara M, Wada H, Murata M, Ikeda Y, Miyata T, George JN. Pregnancy-induced thrombocytopenia and TTP, and the risk of fetal death, in Upshaw-Schulman syndrome: a series of 15 pregnancies in 9 genotyped patients. *Br J Haematol* 2009; 144: 742-754.
  39. 下瀬川 徹, 佐藤賢一, 正宗 淳, 他. 急性膵炎, 重症急性膵炎の全国調査. 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服事業. 難治性膵疾患に関する調査研究(研究代表者 下瀬川 徹)平成21年度 総合研究報告書 2010; p35-8.
  40. 峯 徹哉, 明石隆吉, 五十嵐良典, 大原弘隆, 川口義明, 宮川宏之, 西森 功, 森實敏夫, 伊藤鉄英, 入澤篤志, 片岡慶正, 木田光弘, 吉田仁, 花田敬士, 下瀬川 徹. ERCP 後膵炎暫定基準案の検証 [共同研究] 厚生労働科学研究費補助金. 難治性疾患克服事業. 難治性膵疾患に関する調査研究(研究代表者 下瀬川徹)平成21

年度総括・分担研究報告書. 2010, p80-84.

41. Akashi R, Kiyozumi T, Tanaka T, Sakurai K, Oda Y, Sagara K. Mechanism of pancreatitis caused by ERCP. *Gastrointest Endosc* 2002; 55: 50-54.
42. Cheng CL, Sherman S, Watkins JL, Barnett J, Freeman M, Geenen J, Ryan M, Parker H, Frakes JT, Fogel EL, Silverman WB, Dua KS, Aliperti G, Yakshe P, Uzer M, Jones W, Goff J, Lazzell-Pannell L, Rashdan A, Temkit M, Lehman GA. Risk factors for post-ERCP pancreatitis: a prospective multicenter study. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 139-147.

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Morioka C, Uemura M, Matsuyama T, Matsumoto M, Kato S, Ishikawa M, Ishizashi H, Fujimoto M, Sawai M, Yoshida M, Mitoro A, Yamao J, Tsujimoto T, Yoshiji H, Urizono Y, Hata M, Nishino K, Okuchi K, Fujimura Y, Fukui H. Plasma ADAMTS13 activity parallels the APACHE II score, reflecting an early prognostic indicator for patients with severe acute pancreatitis. *Scand J Gastroenterol*. 2008; 43: 1387-96.
- 2) Tsujimoto T, Kawaratani H, Yoshiji H, Uemura M, Fukui H. Recent developments in the treatment of alcoholic chronic pancreatitis. *Current Drug Abuse Reviews*. 2008, 1: 197-202.
- 3) 藤村吉博, 植村正人. 肝産生酵素 ADAMTS13と血栓症. *臨床血液*, 2008, 49: 1420-1433.
- 4) 植村正人, 藤村吉博. TTP. 腎と透析. 2008; 65(増刊号): 421-427.
- 5) 植村正人, 藤村吉博. 血栓性血小板減少性紫斑病. *血栓と循環*. 2008; 16: 15-21.
- 6) 植村正人, 藤村吉博, 福井博. 重症肝・膵疾患における多臓器不全の病態解析-ADAMTS13を中心に 編集 第94回日本消化器病学会総会会長 飯田三雄(発行 日本

消化器病学会)消化器病学の進歩—原点から未来への情報発信— 第94回日本消化器病学会総会記念誌 Ⅲ. 複合領域, 東京, 医学書院, 2009年7月1日発行. p262-266.

- 7) 植村正人, 藤村吉博, 福井博. 急性膵炎重症化と血漿 ADAMTS13活性. 「Annual review 消化器2011, 第Ⅲ章 胆膵-膵臓2」, 林 紀夫, 日比紀文, 上西紀夫, 下瀬川徹, 編. 東京, 中外医学社, 2011年1月刊行予定, p237-244.
- ### 2. 学会発表
- 1) 森岡千恵, 植村正人, 松山友美, 松本雅則, 加藤誠司, 石指宏通, 石川昌利, 辻本達寛, 藤本正男, 沢井正佳, 吉田太之, 美登路昭, 山尾純一, 瓜園泰之, 畑 倫明, 西尾健治, 奥地一夫, 藤村吉博, 福井博. 重症急性膵炎における血漿 ADAMTS13活性と超高分子量 VWF マルチマーの動態. 第94回日本消化器病学会総会(福岡), 2008年5月8日~5月10日
  - 2) 植村正人, 藤村吉博, 福井博重症肝・膵疾患における多臓器不全の病態解析—ADAMTS13を中心に(ワークショップ), 第94回日本消化器病学会総会(福岡), 2008年5月8日~5月10日
  - 3) 森岡千恵, 植村正人, 松山友美, 松本雅則, 加藤誠司, 石指宏道, 石川昌利, 山尾純一, 辻本達寛, 瓦谷英人, 美登路昭, 藤本正男, 吉田太之, 沢井正佳, 瓜園泰之, 畑 倫明, 西尾健治, 奥地一夫, 藤村吉博, 福井博. 重症急性膵炎における血漿 ADAMTS13活性と膵 CT 造影不良域との関連, 第50回日本消化器病学会大会(東京), 2008年10月1日~10月4日.
  - 4) 植村正人. 重症肝膵疾患と ADAMTS13 (シンポジウム), 第29回日本アフェレシス学会(広島), 2008年11月21日~23日.
  - 5) 森岡千恵, 植村正人, 松山友美, 松本雅則, 藤本正男, 加藤誠司, 石指宏道, 石川昌利, 辻本達寛, 沢井正佳, 吉田太之, 美登路昭, 山尾純一, 瓦谷英人, 瓜園泰之, 畑 倫明, 西尾健治, 奥地一夫, 藤村吉

博, 福井 博. 重症急性膵炎における血漿  
エンドトキシン濃度と血漿 ADAMTS13活  
性との関連. 第95回日本消化器病学会総会  
(北海道). 2009年5月7日~9日.

- 6) 森岡千恵, 植村正人, 松本雅則\*, 藤本正  
男, 奥地一夫, 藤村吉博, 福井 博. 重症  
急性膵炎における ADAMTS13の動態. 第  
14回日本病態プロテアーゼ学会(ワークシ  
ョップ)(大阪). 2009年8月21日~22日.
- 7) 森岡千恵, 植村正人, 福井 博. 重症急性  
膵炎における ADAMTS13の動態とその臨  
床的意義. 第51回日本消化器病学会大会  
(パネルディスカッション)(京都). 2009年  
10月14日~17日.
- 8) 森岡千恵, 植村正人, 藤本正男, 松山友  
美, 松本雅則, 加藤誠司, 石指宏通, 石川  
昌利, 辻本達寛, 沢井正佳, 吉田太之, 美  
登路昭, 山尾純一, 瓦谷英人, 山崎正晴,  
畑 倫明, 西尾健治, 奥地一夫, 藤村吉  
博, 福井 博. 重症急性膵炎における顆粒  
球エラスターゼと血漿 ADAMTS13活性と  
の関連. 第96日本消化器病学会総会(新潟).  
2010年4月22日~24日
- 9) 森岡千恵, 植村正人, 藤本正男, 松山友  
美, 松本雅則, 加藤誠司, 石指宏通, 石川  
昌利, 辻本達寛, 沢井正佳, 吉田太之, 美  
登路昭, 山尾純一, 瓦谷英人, 山崎正晴,  
畑 倫明, 西尾健治, 奥地一夫, 藤村吉  
博, 福井 博. 内視鏡的逆行性膵胆管造影  
(ERCP)前後における ADAMTS13活性と  
VWF 抗原の動態. 第52日本消化器病学会  
大会(横浜), 2010年10月13日~16日

#### 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

## インターフェロン制御因子 IRF-2 ノックアウトマウスは調節性膵外分泌の異常を示し、急性膵炎発症初期のモデル動物である

研究報告者 大西洋英 秋田大学大学院医学専攻腫瘍制御医学系消化器内科学講座 教授

共同研究者

真嶋浩聡（秋田大学大学院医学専攻腫瘍制御医学系消化器内科学講座）

### 【研究要旨】

*Irf2*<sup>-/-</sup> マウスは免疫異常や造血系細胞の分化・増殖を検討するためのモデルとして使用されてきたが、膵臓にも明らかな形態学的異常を呈していた。その異常は酵素顆粒と頂端側細胞膜との結合・癒合の障害が原因であり、*Irf2*<sup>-/-</sup> 膵腺房細胞には調節性外分泌が欠如していた。その結果酵素顆粒の酵素顆粒の細胞内充満が生じ、軽度の膵炎が腺房細胞内で進行しており、このマウスは急性膵炎発症初期のモデル動物であることが明らかとなった。IRF2 は転写因子として直接 SNARE 蛋白質を制御してはならず、その間にはおそらく他の分子が介在しており、急性膵炎の発症のメカニズムの解明のために、IRF2 の標的分子の解明が急務である。

### A. 研究目的

インターフェロン(IFN)は抗ウイルス作用の他に、細胞増殖抑制作用や免疫調節作用など極めて多様な生物活性をもち、I型(IFN- $\alpha/\beta$ )とII型(IFN- $\gamma$ )の二つに大別される。IFN系の遺伝子の転写を制御する遺伝子としてIFN制御因子(Interferon Regulatory Factor (IRF))があり、現在9種の遺伝子からなるファミリーを形成している(IRF-1~9)。*Irf2*<sup>-/-</sup> マウスでは骨髄のさまざまな血球前駆体細胞の減少がみられ、造血系細胞の分化・増殖にIRF-2が関与していることが示されてきた<sup>1,2)</sup>が、その他表皮の肥厚を伴う皮膚炎症、膵臓の白色変化等の異常がこのマウスには認められた。形態学的検討により膵の異常は調節性外分泌異常が原因と想定された。急性膵炎発症時には腺房細胞頂端側からの分泌が障害され、側方基底膜からの分泌が起こり、膵酵素が異所性に活性化し、膵炎が進展すると考えられている<sup>3)</sup>。従って、*Irf2*<sup>-/-</sup> 膵に見られる異常は急性膵炎発症時の腺房細胞頂端側からの分泌障害と関連している可能性がある。そこで、我々は、*Irf2*<sup>-/-</sup> マウスの膵臓を詳細に検討し、その異常及び原因を明らかにすることをまず第一の目的とした。次にこのモデルを利用して、急性膵炎の発症のメ

カニズムの解明、及び急性・慢性膵炎の新たな治療ターゲットの開発の可能性を探ることを第二の目的とした。

### B. 研究方法

1. *Irf2*<sup>+/+</sup>, *Irf2*<sup>+/-</sup>, *Irf2*<sup>-/-</sup> マウスの膵組織の詳細な比較検討(HE染色, 電子顕微鏡)。
2. SNARE関連分子の発現量, 局在の検討(ウエスタンブロット, 免疫組織化学)。
3. 血清中の膵酵素量の比較(エラスターゼ1, アミラーゼ)。
4. 単離膵腺房細胞を用いたCCK-8によるアミラーゼ分泌刺激実験。
5. 膵外分泌in vitroモデル細胞を用いたIRF2の外分泌に及ぼす影響の検討。
6. *Irf2*<sup>+/-</sup> マウスと*Irf2*<sup>-/-</sup> マウスの膵におけるオートファジー, トリプシン活性の比較。
7. *Irf2*<sup>-/-</sup>*Ifnar1*<sup>-/-</sup> マウスを用いたI型インターフェロンシグナルの関与の検討。
8. 野生型マウス膵における急性膵炎発症時のIRF2の発現の変化(ウエスタンブロット)。これらの動物実験はすべて、秋田大学バイオサイエンス安全委員会の承認を受け(承認番号1-2019)、秋田大学動物実験規程に

基づき施行した。

### C. 研究結果

1. 通常、腺房細胞の頂端側には多数の酵素顆粒が赤色に、基底側には小胞体が紫色に染色されるが、*Irf2*<sup>-/-</sup> マウスでは、核を除いた細胞質全体が赤色に染色された。電子顕微鏡で観察すると通常よりも小型の酵素顆粒が細胞質全体に密に広がっている像が観察された(図1)。また、通常では、頂端側の管腔から酵素顆粒が分泌される像が見られるが、その像が全く見られなかった。消化酵素であるアミラーゼは唾液腺からも分泌されるが、*Irf2*<sup>-/-</sup> マウスの唾液腺には形態学的異常はみられなかった。

2. 膵腺房細胞における酵素顆粒の分泌は、神経細胞などと同じく SNARE 関連分子によって制御されている。腺房細胞の頂端側には STX2, Munc18b, 側方基底側には STX4, Munc18c, 酵素顆粒上には VAMP2, VAMP8, STX3, Munc18b が存在する。静止状態におい

ては Munc18が STX に結合して SNARE 複合体の形成を阻害している。分泌刺激により Munc18が解離することによって STX が自由となり、二分子の SNAP23及び VAMP と結合することによって、SNARE 複合体が形成され、酵素顆粒と細胞膜の結合・癒合が進行すると考えられている。*Irf2*<sup>-/-</sup> マウスでは、頂端側の SNARE 蛋白が減少し、酵素顆粒上の SNARE 蛋白が増加していた。頂端側の SNARE 蛋白の染色性は、量的な減少と一致して低下していたが、局在に変化はなく、また腺房細胞の極性にも異常はみられなかった。

4. *Irf2*<sup>-/-</sup> マウスの血清中のアミラーゼ、エラスターゼ 1 は *Irf2*<sup>+/+</sup>, *Irf2*<sup>+/-</sup> マウスと比較して低下していた(表1)。

5. *Irf2*<sup>+/+</sup>, *Irf2*<sup>+/-</sup>, *Irf2*<sup>-/-</sup> マウス膵より腺房細胞を単離した後、コレシストキニン(10pM, 100pM CCK8)で刺激し、分泌されるアミラーゼ量を検討した。*Irf2*<sup>-/-</sup> マウスの膵腺房細胞からはアミラーゼ分泌が全くみられな

表1 *Irf2*<sup>+/+</sup>, *Irf2*<sup>+/-</sup>, *Irf2*<sup>-/-</sup> マウスの血清中の膵酵素濃度

	+/+	+/-	-/-	p value	
				+/+ vs -/-	+/- vs -/-
Elastase 1 (ng/dl)	123.6±8.7 (n=8)	131.1±4.6 (n=9)	105.1±4.9 (n=8)	0.08	<0.01
Amylase (U/L)	708.0±22.0(n=8)	723.6±34.4(n=9)	615.5±18.3(n=8)	<0.01	0.02

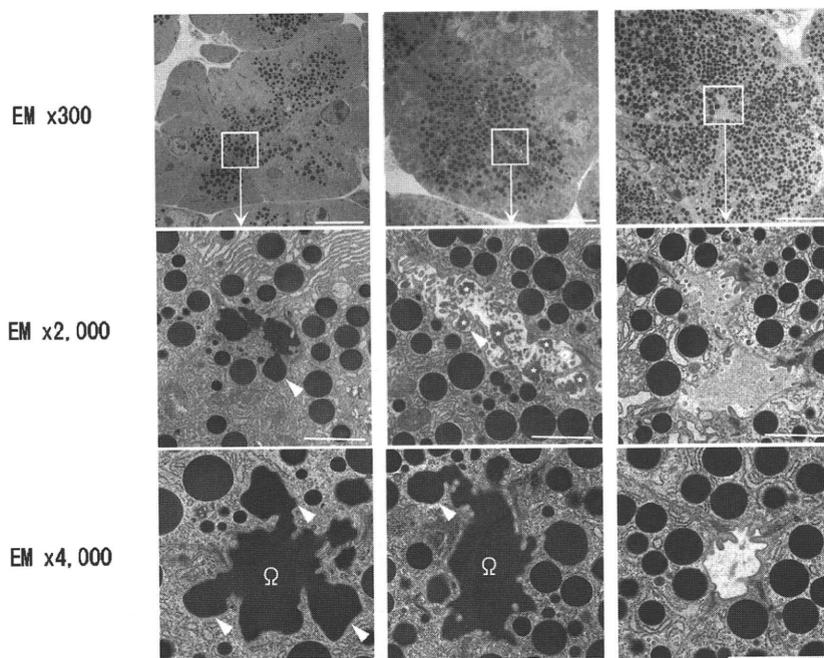


図1 *Irf2*<sup>+/+</sup>, *Irf2*<sup>+/-</sup>, *Irf2*<sup>-/-</sup> マウスの膵腺房の電子顕微鏡像(Bar, 10 μm (×300), 2 μm (×2,000, ×4,000))

かった(図 2A).

6. 膵外分泌モデルとして AR42J 細胞を使用し, *Irf2*<sup>-/-</sup> マウスで認められる分泌異常が *in vitro* モデルでも再現されるかどうかを検討した. AR42J 細胞にレトロウイルスを用いて, IRF2 を過剰発現させた細胞 (GFPirf2), DNA 結合部位のみを過剰発現させたドミナントネガティブ細胞 (GFPirf2dn), コントロール細胞 (GFPcont) を作成した. コレシストキニン (CCK8), カルシウムイオノフォア (A23187), cAMP アゴニスト (8Br-cAMP) で刺激して, そのアミラーゼ分泌を比較検討した(図 2B). 100pM CCK8, 5  $\mu$ M A23187 で刺激すると

GFPirf2dn 細胞ではアミラーゼ分泌は抑制され, GFPirf2 細胞では亢進した. 500  $\mu$ M 8Br-cAMP 単独刺激により誘導されるアミラーゼ分泌は少量のため差がみられなかったが, 5  $\mu$ M A23187 と共に培養すると A23187 の分泌刺激を増強し, コントロール細胞と比較して GFPirf2dn 細胞ではアミラーゼ分泌を抑制, GFPirf2 細胞では増強した. 以上から, AR42J 細胞でも IRF2 の発現レベルに応じて *Irf2*<sup>-/-</sup> マウスにみられる分泌異常が再現され, IRF2 が調節性外分泌に重要な役割を果たしていることが示された.

7. *Irf2*<sup>-/-</sup> 膵腺房細胞を電子顕微鏡で観察すると細胞内に多数の空胞が見られ, その中には電子密度の高い物質や渦巻き状の膜成分も認められた(図 3A). ウェスタンブロットでは微小管結合蛋白質 LC3 の膜結合型 (LC3-II) が *Irf2*<sup>-/-</sup> 膵で増加しており, オートファジーが膵腺房内で進行していることが明らかとなった(図 3B). また, 膵ホモジェネートを用いたトリプシン活性の比較でも, *Irf2*<sup>-/-</sup> 膵ではトリプシン活性が亢進していた(図 3C). HE 染色標本からでは膵炎所見(浮腫, 出血, 好中球浸潤, 壊死)は明らかではないが, *Irf2*<sup>-/-</sup> 膵腺腺房内で軽度の膵炎が進行していることをこれらは示している.

8. IRF2 は IFN 系の遺伝子の転写を負に制御する遺伝子であり, *Irf2*<sup>-/-</sup> マウスでは I 型インターフェロンシグナルが常に亢進状態となっている<sup>1)</sup>. この過剰なインターフェロンシグナルの関与を調べるために, 受容体を欠損したダブルノックアウトマウス *Irf2*<sup>-/-</sup>*Ifnar1*<sup>-/-</sup> マウスを作成し, その膵臓を検討した. このマウスの膵臓には *Irf2*<sup>-/-</sup> マウスと同じ異常が見られたことから, 過剰な I 型インターフェロンシグナルはその原因ではないことが明らかとなった.

9. 野生型マウスにセルレイン膵炎を惹起し, IRF2 の発現の変化を検討した. 膵炎発症時 IRF2 の発現低下が認められ(図 4), この発現低下はセルレイン初回注射後 1 時間でも認められたことから膵炎発症のごく初期の段階で IRF2 が関与している可能性が示唆された.

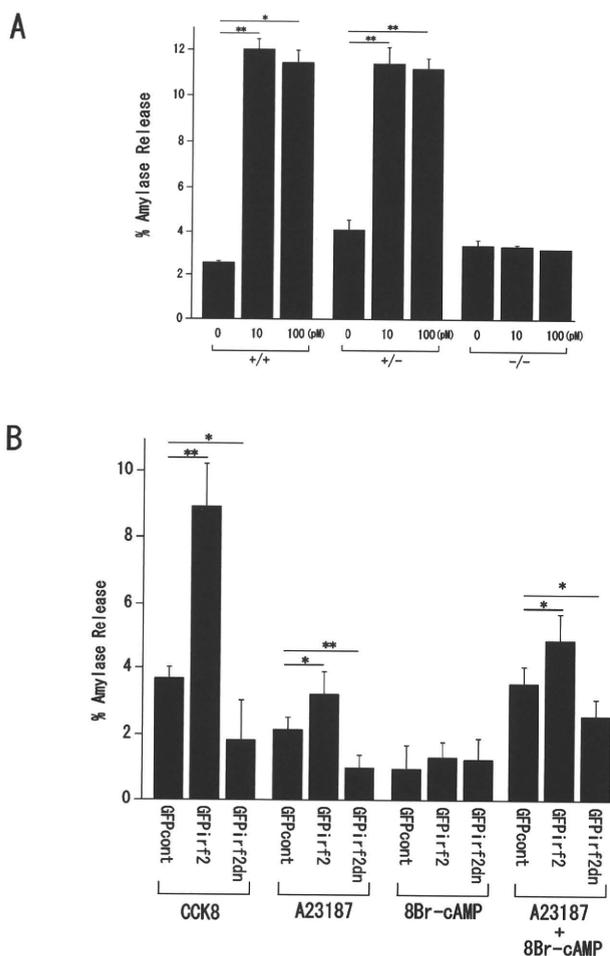


図 2 単離膵腺房細胞及び AR42J 細胞のアミラーゼ分泌刺激実験.

A. *Irf2*<sup>+/+</sup>, *Irf2*<sup>+/-</sup>, *Irf2*<sup>-/-</sup> マウスから膵腺房細胞を単離し, 10pM, 100pM CCK8 で30分間刺激した時のアミラーゼ分泌量(全体量-持続性分泌量)を比較検討した. \*: P<.05

B. コントロール細胞 (GFPcont), IRF2 過剰発現細胞 (GFPirf2), IRF2 ドミナントネガティブ細胞 (GFPirf2dn) を樹立し, 100pM CCK8, 5  $\mu$ M A23187, 500  $\mu$ M 8Br-cAMP で 15分間刺激した時の上清中に分泌されるアミラーゼ量を比較検討した. \*: P<.05, \*\*: P<.01

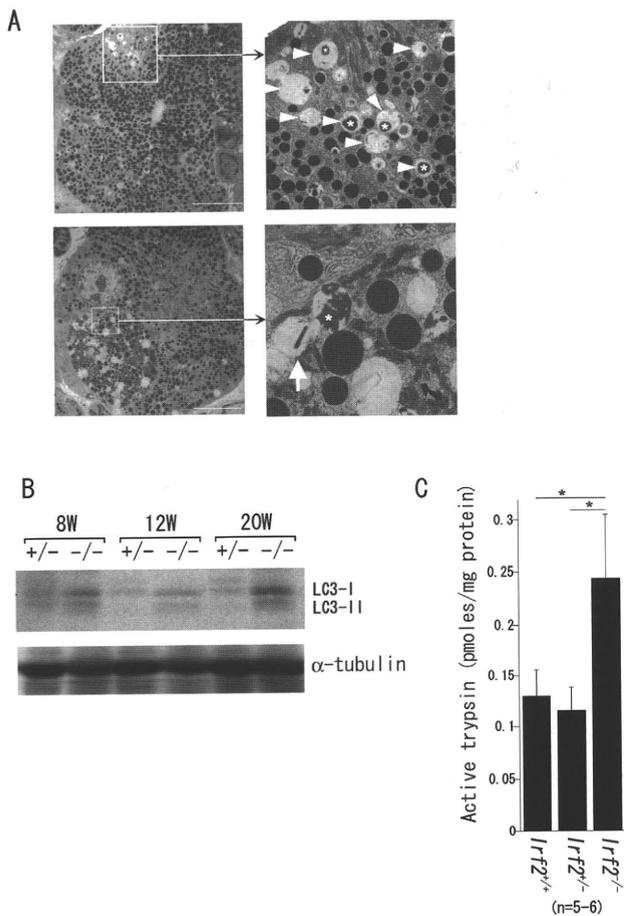


図3 *Irf2*<sup>-/-</sup> 膵腺房細胞の電子顕微鏡像。

- A. 細胞内に多くの空胞を認める(▲). 空胞内には電子密度の高い酵素顆粒と思われる物質が認められる(\*). 渦巻き状の膜成分を含む空胞もあり(↑), オートファジーによるものと考えられる. Bar=10 μm
- B. 微小管結合蛋白質 LC3 のウエスタンブロット. 8週齢, 12週齢, 20週齢の *Irf2*<sup>+/+</sup>, *Irf2*<sup>+/-</sup>, *Irf2*<sup>-/-</sup> マウスの膵ホモジェネートを用いて, 抗 LC3 抗体によりウエスタンブロットを行った. αチューブリンを内部コントロールとした.
- C. トリプシン活性の測定. 12週齢の *Irf2*<sup>+/+</sup>, *Irf2*<sup>+/-</sup>, *Irf2*<sup>-/-</sup> マウス膵ホモジェネートを用いて, トリプシン活性を測定した. \*: P<.05

#### D. 考察

*Irf2*<sup>+/+</sup>, *Irf2*<sup>+/-</sup> マウスの膵はクリーム色でやや光沢があるが, *Irf2*<sup>-/-</sup> マウスの膵は白色で光沢がなく, 一見して異常な色調を呈していた. HE 染色及び電子顕微鏡による検討から, *Irf2*<sup>-/-</sup> 膵では酵素顆粒の分泌が障害され, そのため細胞質全体に酵素顆粒が充満しているものと考えられた. ウエスタンブロット, 免疫組織化学の結果もそれを裏付けるものであった. 実際 *Irf2*<sup>-/-</sup> マウス血清中のエラスターゼ 1, アミラーゼは *Irf2*<sup>+/+</sup>, *Irf2*<sup>+/-</sup> マウスと比較して低下しており, 単離膵腺房細胞は CCK8 刺激によるアミラーゼ分泌を起こさなかった. 以

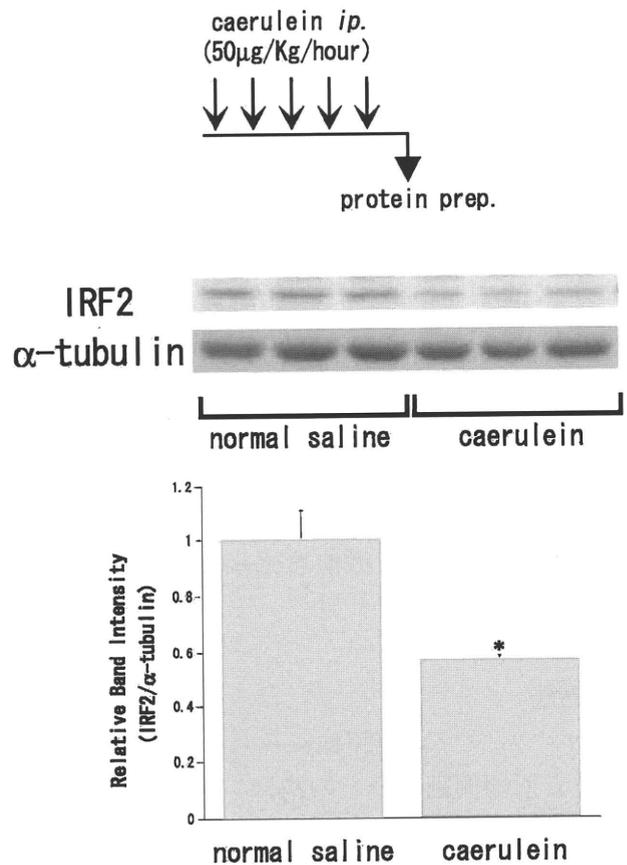


図4 セルレイン膵炎時の IRF2 の発現の変化.

野生型マウスにセルレイン (50 μg/kg) を 1 時間ごとに腹腔内に 5 回投与し, 最終投与後 1 時間で膵臓を摘出し, ウエスタンブロットを行った. バンドの強度を ImageJ を用いて測定し, 定量化した. αチューブリンを内部コントロールとした. \*: P<.05

上から, このマウスでは酵素顆粒と細胞膜の結合・癒合が障害されていると考えられる. 次に膵腺房細胞のモデル細胞を使って, IRF2 の発現が変化すると分泌に障害がおこるかどうかを検討した. 予想通り, ドミナントネガティブ変異体を過剰発現した GFP $\beta$ 2dn 細胞ではアミラーゼ分泌が抑制され, IRF2 を過剰発現した GFP $\beta$ 2 細胞では分泌が増強された. これから IRF2 が調節性膵外分泌に重要な役割を果たしていることが証明された.

*Irf2*<sup>-/-</sup> マウスの膵臓では酵素顆粒の調節性外分泌が障害され, 酵素顆粒が細胞内に蓄積する結果, *Irf2*<sup>-/-</sup> 膵腺房内ではオートファジー, トリプシンの活性化が惹起され, 軽度の膵炎が進行する. この異常は亢進した I 型インターフェロニンシグナルが原因ではなく, IRF2 の特異的な機能障害が原因と考えられる. また唾液腺には異常を認めないことから膵外分泌特

異的な異常である。急性膵炎実験モデルにおいて、膵炎発症早期に IRF2 の発現低下がみられることから、IRF2 は膵炎発症に重要な役割を果たしている可能性が示唆される。IRF2 は転写因子であり、SNARE 蛋白質を直接制御している可能性がある。しかし、定量的 real-time PCR により、SNARE 関連遺伝子の発現レベルを検討したところ、*Irf2*<sup>+/-</sup> 膵と *Irf2*<sup>-/-</sup> 膵では優位な変化が見られなかった。IRF2 の標的となる分子の解明が今後の重要な課題である。また、最近 IRF3 が Bax と直接結合し、アポトーシスを制御していることが示され<sup>4)</sup>、IRF2 もある分子の機能を直接制御している可能性もある。

## E. 結論

*Irf2*<sup>-/-</sup> マウスの膵臓にみられる異常は酵素顆粒と頂端側細胞膜との結合・癒合の障害が原因である。*Irf2*<sup>-/-</sup> マウスの膵腺房細胞では調節性外分泌の障害から軽度の膵炎が細胞内で進行しており、急性膵炎の発症初期のモデルである。その異常の分子モデルでの解明が急務であり、急性・慢性膵炎の新たな治療ターゲットの開発につながる可能性を秘めている。

## F. 参考文献

1. Matsuyama T, Kimura T, Kitagawa M, Pfeiffer K, Kawakami T, Watanabe N, Küngdig TM, Amakawa R, Kishihara K, Wakeham A, Potter J, Furlonger C, Narendran A, Suzuki H, Ohashi PS, Paige CJ, Taniguchi T, Mak TW. Targeted Disruption of IRF-1 or IRF-2 Results in Abnormal Type I IFN Gene Induction and Aberrant Lymphocyte Development. *Cell* 1993; 75: 83-97.
2. Sato T, Onai N, Yoshihara H, Arai F, Suda T, Ohteki T. Interferon Regulator Factor-2 Protects Quiescent Hematopoietic Stem Cells from Type I Interferon-dependent Exhaustion. *Nature Medicine* 2009; 15: 696-701
3. Gaisano HY, Gorelick FS. New Insight Into the Mechanisms of Pancreatitis. *Gastroenterology* 2009; 136: 2040-2044.
4. Chattopadhyay S, Marques JT, Yamashita M,

Peters KL, Smith K, Desai A, Williams BRG, Sen GC. Viral Apoptosis is Induced by IRF-3-mediated Activation of Bax. *EMBO* 2010; 29: 1762-1773.

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kamada K, Mashima H, Goto T, Ohnishi H. MCP-1 inhibits DNA synthesis in rat pancreatic stellate cells. *Akitaigaku* 2009; 36: 185-194.
- 2) Shinozaki S, Mashima H, Ohnishi H, Sugano K. IL-13 promotes the proliferation of rat pancreatic stellate cells through the suppression of NF- $\kappa$ B/TGF-1 pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2010; 393: 61-65.
- 3) Watanabe D, Miura K, Goto T, Nanjo H, Yamamoto Y, Ohnishi H. Solid Pseudopapillary Tumor of the Pancreas with Concomitant Pancreas Divisum. *Journal of Pancreas* 2010; 11: 45-48.
- 4) 真嶋浩聡, 大西洋英. 膵線維化とその治療戦略. *成人病と生活習慣病* 2010; 40: 35-39.
- 5) 真嶋浩聡, 大西洋英. 膵外分泌における腺房細胞内情報伝達と分子メカニズム. *胆と膵* 2010; 31: 535-539.

### 2. 学会発表

- 1) Hirosato M, Yoshikumi Y, Ohnishi H. Up-regulation of JAM-1 in AR42J cells treated with activin A and betacellulin and the diabetic regenerating islets. The International Pancreatic Research Forum 2009, Tokyo, 2009.7.30-31
- 2) 渋谷友美, 大西洋英: Acoustic Radiation Force Impulse (ARFI)による Virtual Touch Tissue Quantification の使用経験について 第38回日本超音波医学会東北地方会, 福島, 2009.9
- 3) Mashima H, Sato T, Horie Y, Ohteki T, Ohnishi H. Interferon regulatory factor-2 plays a pivotal role in exocytosis in pan-

creatic acinar cells. Digestive Disease Week 2010, New Orleans, 2010.5.2-5 (AGA Distinguished Abstract Plenary, oral presentation)

- 4) Mashima H, Sato T, Horie Y, Ohteki T, Ohnishi H. IRF-2 plays a pivotal role in exocytosis in pancreatic acinar cells. Joint Meeting of the International Association of Pancreatology and the Japan Pancreas Society 2010, Fukuoka, 2010.7.11-13
- 5) 真嶋浩聡, 堀江泰夫, 大西洋英 : IRF-2 は膵腺房細胞の調節性外分泌機構に重要な役割を果たす—*Irf2*<sup>-/-</sup> 膵 : 急性膵炎における膵外分泌異常のモデルとしての可能性— (パネルディスカッション) 第18回 JDDW, 横浜, 2010.10.13-16.

#### 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

## 急性膵炎重症化因子としての内臓脂肪の影響

研究報告者 杉山政則 杏林大学医学部外科 教授

共同研究者

鈴木 裕，中里徹矢，長尾 玄（杏林大学医学部外科）

### 【研究要旨】

〔目的〕急性膵炎重症化因子における肥満のタイプ，とくに内臓脂肪の影響を検討。

〔対象〕当院で治療された急性膵炎症例32例。

〔方法〕初診時臨床病理学的因子（年齢，性別，発熱，血液検査値）とBMI，腹囲，内臓脂肪面積，皮下脂肪面積を検討項目とし統計学的に急性膵炎の重症化リスク，局所および全身合併症発生率を検討。重症膵炎は厚生労働省のスコアにて診断。

〔結果〕重症例11例，軽症例21例。局所合併症例は7例，全身合併症は3例で，死亡例は認めず。重症化はSIRS項目3項目以上，白血球数の多い症例が有意に多い結果であった。局所合併症例はAMYが有意に低く，脈拍数が有意に多い結果となった。全身合併症はSIRS項目数3項目以上，Alb低値，CRP高値，脈拍数が有意差を認めた。

〔結論〕今回の検討では肥満や内臓脂肪の急性膵炎重症化・合併症発生率には大きく影響しないと思われた。SIRS項目数の増加や発熱・脈拍数の増加などは重症化や局所・全身合併症などの病状進展を視野に入れ加療すべきと思われた。

### A. 研究目的

近年，急性膵炎と肥満の関係を論じた論文が数多くみられる。欧米諸国の英文論文では局所合併症や全身合併症との相関があり，致死率との相関は低いという報告が多い<sup>1)</sup>。これは，各ガイドラインに反映されており，英国のガイドラインでは肥満は重要な予後規定因子として推奨され(推奨度B)<sup>2)</sup>，多施設によるガイドラインでもBody mass index (BMI) 30 kg/m<sup>2</sup>以上は死亡率を増加させるとしている<sup>3)</sup>。本邦も例外ではなく，急性膵炎ガイドライン—第3版—では，極度の肥満(BMI 30 kg/m<sup>2</sup>以上)は重症化に影響する(推奨度A)と位置付けている。しかし，本研究班で以前行われた調査では，BMIと重症化率，致死率は相関しないと報告されている。これより，内臓脂肪型肥満・皮下脂肪型肥満などの肥満のタイプの違いが急性膵炎の重症化に影響している可能性が考えられた。

本研究の目的は，急性膵炎重症化因子における，肥満のタイプ，とくに内臓脂肪の影響を解析することである。

### B. 研究方法

対象は2006年から2010年まで当院で治療された急性膵炎症例32例(男性28例，女性4例)。重症膵炎の基準は2008年の厚生労働省急性膵炎重症度判定基準をもとに定義し，重症例11例，軽症例21例であった。これらに対し，各臨床病理学的項目(性別，年齢，体温，脈拍数，呼吸回数，初診時血液検査所見(Hct，白血球数，アミラーゼ，アルブミン，Ca，CRP)，全身性炎症反応症候群 Systemic Inflammatory Response Syndrome: SIRS)診断基準における陽性項目数，BMI，腹囲，皮下脂肪面積，内臓脂肪面積，内臓脂肪率(内臓脂肪面積/総脂肪面積))について，急性膵炎重症化，局所合併症(膵壊死，膵膿瘍，膵仮性嚢胞)，全身合併症(腎不全，ショック，呼吸不全)の予測因子を $\chi^2$ 検定，およびMann-Whitney U検定を用いて統計学的に解析した。なお，皮下脂肪面積と内臓脂肪面積はFat Scan Ver4.1(N2システム株式会社)を用いて，初診時に撮影されたCT画像のPacs Dataより臍レベルで測定した。

### C. 研究結果

重症例11例，軽症例21例．局所合併症例は7例，全身合併症は3例で，死亡例は認めず．局所合併症の内訳は，膵壊死が4例，膵膿瘍が2例，膵仮性嚢胞が8例であった．全身合併症の3例は全て呼吸不全で，腎不全やショック，死亡例は認めなかった．

#### (1) 急性膵炎重症化の予測因子

急性膵炎重症化の予測因子としては白血球数とSIRS項目3項目以上，が抽出された(表1)．

#### (2) 局所合併症の危険因子

局所合併症の発生はAMY値が低い症例に有意に多く，脈拍数が有意に多い結果であった．

#### (3) 全身合併症の危険因子

全身合併症の危険因子としては脈拍数が多い症例，CRPが高い症例，血清アルブミンが低い症例が有意差をもって抽出された．

### D. 考察

本研究は，急性膵炎重症化の予測因子と局所合併症および全身合併症の危険因子をretrospectiveに解析しようとするものである．とくに，CT画像より内臓脂肪計測ソフトであるFat Scanを用いて得られた内臓脂肪，皮下脂肪の急性膵炎重症化，局所合併症発生，

全身合併症発生への影響を検討した．近年の肥満と急性膵炎に関する報告では，BMI 25から30 kg/m<sup>2</sup>をカットオフ値として局所合併症や全身合併症が肥満例に多いとの報告が多い<sup>1)</sup>．しかし，本邦ではBMIと致死率・重症化率と

表2 局所合併症の危険因子

	局所合併症		p 値
	あり(7例)	なし(25例)	
性別 男性	5(71.4%)	23(92.0%)	0.201
女性	2(28.6%)	2( 8.0%)	
年齢	53±5	52±20	0.600
体温(°C)	37.0±1.1	36.9±6.6	0.858
脈拍数(/min)	103±25	78±18	0.024
呼吸回数(/min)	19±5	19±4	0.775
Hct(%)	42.3±9.4	44.3±5.2	0.837
WBC(/m <sup>3</sup> )	16,743±8,018	12,700±4,924	0.179
Alb(g/dl)	3.3±0.8	3.9±0.5	0.082
AMY(IU/L)	343.3±312.9	916±758.8	0.030
Ca(mg/DL)	8.5±1.0	8.5±1.1	0.927
CRP(mg/DL)	6.1±7.2	1.8±3.0	0.170
SIRS 陽性項目 3項目以上	3(42.9%)	2( 8.0%)	0.057
腹囲(cm)	90.0±17.9	89.4±13.4	0.837
BMI(kg/m <sup>2</sup> )	21.7±3.7	23.9±4.4	0.350
内臓脂肪面積 (cm <sup>2</sup> )	130.0±76.7	117.1±35.1	0.982
皮下脂肪面積 (cm <sup>2</sup> )	127.0±59.2	132.0±58.9	0.802
内臓脂肪率	0.497±0.2	0.477±0.1	0.569

表3 全身合併症の危険因子

	全身合併症		p 値
	あり(3例)	なし(29例)	
性別 男性	3( 100%)	25(86.2%)	1.000
女性	0( 0%)	4(13.8%)	
年齢	50±5	53±19	0.307
体温(°C)	37.5±1.3	36.8±0.7	0.516
脈拍数(/min)	119.7±21.5	80.8±18.9	0.030
呼吸回数(/min)	25±4.4	18.3±3.7	0.196
Hct(%)	39.3±14.5	44.3±5.0	0.161
WBC(/m <sup>3</sup> )	20,866.7±6,353.2	12,831.0±5,347.3	0.095
Alb(g/dl)	2.6±0.8	3.9±0.5	0.003
AMY(IU/L)	201.0±56.7	851.8±733.0	0.203
Ca(mg/DL)	7.8±1.1	8.6±1.1	0.335
CRP(mg/DL)	13.3±4.1	1.7±2.8	0.024
SIRS 陽性項目 3項目以上	2(66.7%)	3(10.3%)	0.056
腹囲(cm)	102.6±18.6	88.2±13.3	0.342
BMI(kg/m <sup>2</sup> )	24.0±3.2	23.3±4.4	0.298
内臓脂肪面積 (cm <sup>2</sup> )	177.5±90.0	113.8±36.9	0.347
皮下脂肪面積 (cm <sup>2</sup> )	151.6±59	128.7±58.6	0.758
内臓脂肪率	0.53±0.06	0.48±0.1	0.521

表1 急性膵炎重症化の危険因子

	急性膵炎重症化の危険因子		p 値
	重症例(11例)	軽症例(21例)	
性別 男性	8(72.7%)	20(95.2%)	0.106
女性	3(27.3%)	1( 4.8%)	
年齢	56±18	50±18	0.361
体温(°C)	36.9±0.9	36.9±0.7	0.490
脈拍数(/min)	99±26	80±20	0.092
呼吸回数(/min)	21±4	18±4	0.105
Hct(%)	43.2±8.3	44.2±5.0	0.677
WBC(/m <sup>3</sup> )	17,718±6,334	11,419±4,297	0.007
Alb(g/dl)	3.5±0.8	3.9±0.5	0.189
AMY(IU/L)	779.0±597.2	797.0±794.7	0.706
Ca(mg/DL)	8.2±1.2	8.7±1.0	0.292
CRP(mg/DL)	5.1±6.5	1.5±2.4	0.202
SIRS 陽性項目 3項目以上	4(36.4%)	1( 4.8%)	0.037
腹囲(cm)	93.3±8.3	87.6±10.7	0.513
BMI(kg/m <sup>2</sup> )	23.6±4.4	23.3±4.4	0.953
内臓脂肪面積 (cm <sup>2</sup> )	125.9±58.1	116.5±39.5	0.677
皮下脂肪面積 (cm <sup>2</sup> )	130.8±44.9	130.9±65.0	0.736
内臓脂肪率	0.487±0.1	0.478±0.1	0.275

の相関は低い。本研究でも重症化因子、合併症発症の危険因子としての BMI は同等であった。Fat Scan を用いて内臓脂肪、皮下脂肪を測定し、急性膵炎との相関を検討した報告はない。

本研究では内臓脂肪面積、皮下脂肪面積、内臓脂肪率のいずれも有意差を認めなかった。ただ、いずれの検討でも重症例、合併症発症例の方が有意差は認めなかったものの内臓脂肪面積や内臓脂肪率が多い傾向であった。今回は初診時の CT を用いて臍レベルの内臓脂肪・皮下脂肪を測定したが、臍レベルへの炎症の波及によって測定値に影響を及ぼした可能性はある。また、今回は32例と症例数も決して多くなく、さらに症例数を増やすことによって有意差が出る可能性はある。

一般的に重症度判定におけるマーカーとして CRP が有用と認知され、ガイドラインでも推奨度 A と位置付けられ、重症度判定基準の予後因子として CRP 値15 mg/dl 以上が採用されている。本研究では CRP は重症化予測因子や局所合併症危険因子では有意差はなかったが、全身合併症の危険因子として有意に高い結果であった。しかし、重症例や局所合併症合併例においても高い傾向であった。CRP は発症から上昇まで数日の時間差がある。ガイドラインでも、発症より48時間より早期では CRP は重症化を反映しないこともある、としている。そのため、発症より48時間・72時間後の血液検査値で検討すると有意差を認めた可能性はある。しかし、急性膵炎の重症化や合併症発症のリスクを一日でも早期に察知するには初診時の血液検査値を用いて判定するのが理想であり、そのためには他のマーカーも含めて検討する必要があると思われる。

急性膵炎重症化の予測因子は白血球高値例と SIRS 項目 3 項目以上であり、有意差は認めなかったが脈拍数 ( $p = 0.092$ )、呼吸回数 ( $p = 0.105$ ) も高値であった。また、局所合併症発生は脈拍数が多く血清 AMY 値が低い症例に有意に多い傾向であった。有意差はなかったが Alb 値が低い場合 ( $p = 0.082$ )、CRP 値の高値例 ( $p = 0.170$ ) も局所合併症合併例に多い傾向であった。全身合併症としての呼吸不全合併例は

Alb 値低値例、CRP 高値例、血清 Alb 低値例が有意に多かった。有意差はなかったが WBC 高値例 ( $p = 0.095$ )、SIRS 陽性項目 3 項目以上 ( $p = 0.056$ ) も合併例に多い傾向であった。これらを見ると、WBC や CRP などの血液検査上の炎症反応だけでなく、脈拍数や呼吸回数などのバイタルサインも重要で軽視してはいけないということであると思われた。また、血清 Alb 値も急性膵炎重症化におけるマーカーとしての有用性が示唆される結果となった。

## E. 結論

急性膵炎重症化、局所合併症・全身合併症発生には内臓脂肪面積、皮下脂肪面積、内臓脂肪率は有意な危険因子とはならなかった。しかし、重症例、合併症発症例の方が有意差は認めなかったものの内臓脂肪面積や内臓脂肪率が多い傾向であり、今後の症例追加によって有意差が出る可能性がある。また、SIRS 項目数の増加や発熱・脈拍数の増加などは重症化や局所・全身合併症などの病状進展を視野に入れ加療すべきと思われた。

## F. 参考文献

1. 竹山宜典. 急性膵炎重症化因子としての肥満. 肝胆膵 2001; 42: 59-63.
2. UK Working Party on Acute Pancreatitis. UK guidelines for the management of acute pancreatitis. GUT 2005; 54: iii1-iii9.
3. Toouli J, Brooke-Smith M, Bassi C, Carr-Locke D, Telford J, Freeny P, Imirie C, Tandon R. Guidelines for the management of acute pancreatitis. J of Gastroenterology and Hepatology 2002; 17 (Suppl.); S15-S39.

## G. 研究発表

1. 論文発表 該当なし
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好中球由来カテプシン G による 膵組織内アンギオテンシン II 産生系

研究報告者 太田哲生 金沢大学消化器・乳腺・移植再生外科 教授

共同研究者

古河浩之, 中川原寿俊 (金沢大学消化器・乳腺・移植再生外科)

### 【研究要旨】

浮腫性膵炎から壊死性膵炎に至る病態に関して、ラット急性膵炎モデルでの研究を行っている。時間経過とともに膵組織内アンギオテンシン II 含有量が増加しており、膵間質への好中球浸潤も増加していた。アンギオテンシン II 産生系亢進が引き金となり、既存血管の収縮による血流低下が、壊死性膵炎に進展する病態に関与している可能性が推察され、今後さらなる検討予定である。

### A. 研究目的

浮腫性膵炎から重症の壊死性膵炎に至る病態に関して多くの研究がなされているが、この機序が十分に解明されているとは言えない。膵内血流低下が、エンドセリンや NO 等と関連することが報告されているが<sup>1)</sup>、膵炎発症の key molecule である膵トリプシンとの関係が明確ではない。トリプシンは膵炎の発症早期にキニノーゲンを基質にして降圧作用のあるブラジキニンを産生し浮腫性膵炎を引き起こすが、炎症が進行し膵組織の弱酸性下ではアンギオテンシノーゲンを基質にして昇圧作用のあるアンギオテンシン II を産生する<sup>2)</sup>。急性壊死性膵炎の診断の根拠となる膵実質の造影不良域の原因として、アンギオテンシン II 産生系亢進が引き金となり、さらにエンドセリン亢進や NO 低下などが加わって発生する血管収縮による血流低下が関与している可能性が推察される。好中球中のアズール顆粒内にはエラスターゼ以外に、カテプシン G やプロテイナーゼ 3 が含まれており、カテプシン G はレニンアンギオテンシン系非依存性に、アンギオテンシノーゲンを基質にアンギオテンシン II を産生することも知られている<sup>3)</sup>。これらの過程においてヒトでは病変部を採取できず、病態の解明には動物実験が占める割合も大きいため、この研究を計画した。

### B. 研究方法

Wister 系雄ラット (250–300 g) に対し、6% タウロコール酸ナトリウム逆行性膵管内注入 (0.4 mL/kg body weight) にて急性膵炎モデルを作成し、膵組織像の病理学的な検討と、膵組織内アンギオテンシン II 含有量の経時的な測定を行った。さらに急性膵炎モデルにおいて、好中球エラスターゼ阻害薬腹腔内投与 (10 mg/kg body weight) 時における膵組織像を検討した。

### C. 研究結果

中間解析 膵炎モデル作成後、時間経過とともに炎症性細胞浸潤の程度と膵壊死巣の範囲が増大しており、膵組織像膵炎モデル作成後、急性膵炎モデルにおける膵組織中のアンギオテン

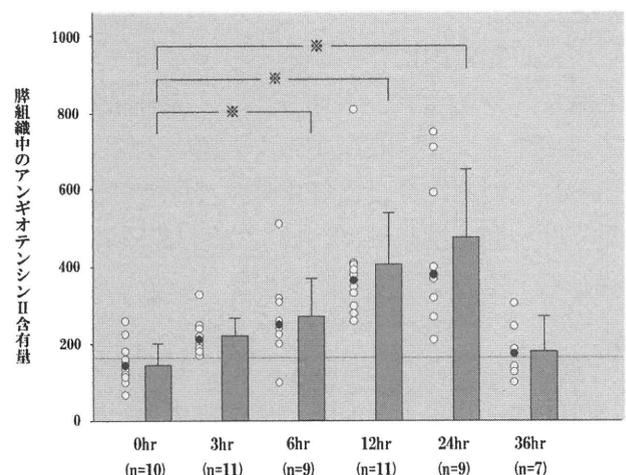


図 1 膵組織中のアンギオテンシン II 含有量の経時的推移

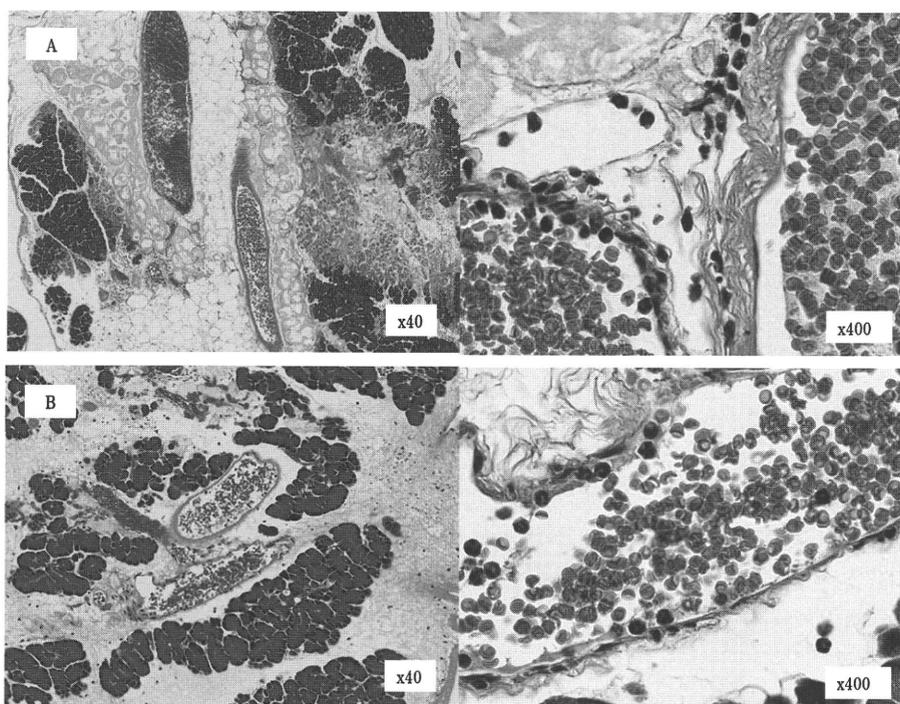


図2 6%タウロコール酸逆行性膵管内注入6時間後ラット急性膵炎組織像  
A：好中球エラスターゼ阻害薬非投与時，B：好中球エラスターゼ阻害薬投与時

シンII含有量は、経時的に増加していた(図1)。好中球は主に静脈壁に接着し膵間質内へ浸潤していたが、好中球エラスターゼ阻害薬を投与した場合は、好中球の接着浸潤は比較的軽度であった(図2)。

#### D. 考察

急性膵炎発症初期における浮腫性膵炎から壊死性膵炎に進展するとともに、レニンアンギオテンシン系非依存性のアンギオテンシンII産生が亢進され、これらによる膵支配動脈の機能的収縮による膵内血流動態の変化が関与していることが推察される。カテプシンGは好中球のアズール顆粒内に存在するセリンプロテアーゼであり、レニンアンギオテンシン系非依存性にアンギオテンシンII産生系を亢進させることが知られている。今後は好中球エラスターゼ阻害薬非投与群と投与群においてさらなる検討を予定している。

#### E. 結論

急性膵炎モデルにおいて壊死性膵炎に進展する際、アンギオテンシンII産生亢進が関与する可能性が推察された。この機序の解明のためさ

らなる検討予定である。

#### F. 参考文献

1. Michael D. Menger, Thorsten Plusczyk, and Brigitte Vollmar. Microcirculatory derangements in acute pancreatitis, *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2001; 8: 187-194.
2. Arakawa K, Ikeda M, Fukuyama J, et al. A pressor formation by trypsin from rennin-denatured human plasma protein, *J Clin Endocrinol Metab* 1976; 42: 599-602.
3. Lloyd B. Klickstein, Carol E. Kaempfer, and Bruce U. Wintroub. The Granulocyte-Angiotensin System, *J Biol Chem*, 1982; 257: 15042-6.

#### G. 研究発表

1. 論文発表 該当なし
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

## 急性膵炎をめぐる諸側面の解析：発症機構，個体差，重症度評価 (renal rim sign, 血小板数の経時的変化)，摂食状態の影響

研究報告者 廣田昌彦 熊本地域医療センター外科 副院長

共同研究者

橋本大輔（熊本地域医療センター外科），大村谷昌樹（熊本大学生命資源研究・支援センター）

### 【研究要旨】

急性膵炎の発症機構，個体差，重症度評価，治療における摂食状態の影響，など諸側面を解析した．急性膵炎の発症機構に関しては，1)オートファジーによるトリプシノーゲンの活性化(トリプシン生成)が関与すること，2)トリプシノーゲンと PSTI(トリプシンインヒビター)の誘導能に個体差があり，それが膵炎の起こしやすさ，起こしにくさに関与する可能性があること，を紹介した．重症化評価については，1) renal rim sign(腹腔内には広範囲に脂肪膵炎が広がるが，腎周囲脂肪膵炎は伴わず腎周囲が rim 状に見える状態)の有無が急性膵炎の重症度評価に有用であること，2)血小板数の推移が重症度評価，予後予測に有用であること，を紹介した．また，治療における摂食状態の影響を，マウスセルレイン膵炎で解析したが，摂食状態(摂食，絶食のいずれも)は急性膵炎の病態に大きな影響は及ぼさなかった．

### A. 研究目的

急性膵炎の治療成績は，近年，向上してはいるが，未だ十分とはいえない．治療成績の向上には，その病態を理解することがまず必要である．そのため，われわれは，急性膵炎をめぐる諸側面から，解明すべきテーマをいくつかあげて，解析を行ってきた．それらの成果の内，難治性膵疾患に関する調査研究班班会議において発表したものを紹介する．

### B. 研究方法

#### 1. 急性膵炎の発症機構

われわれはこれまでに急性膵炎の発症にオートファジーが関与することを明らかにしてきた．オートファジーの結果トリプシノーゲンがトリプシンに変換される可能性と，トリプシンを処理する機構としてオートファジーが誘導される可能性の二つが考えられる．この課題を解決するために，オートファジー惹起遺伝子を欠損させたオートファジーを生じないマウスを用いて解析した．オートファジー惹起遺伝子を全身的に欠損させると生後1日以内に死亡してしまうため，膵腺房細胞特異的にオートファ

ジー惹起遺伝子をノックアウトしたマウス(膵特異的 *Atg5* 欠損マウス)を作成した<sup>1)</sup>．

#### 2. 急性膵炎発症における個体差

急性膵炎の惹起刺激時には，トリプシノーゲンも PSTI(pancreatic secretory trypsin inhibitor)も産生が亢進する．急性膵炎発症への感受性が異なる5種のマウスを用いて，急性膵炎の発症・重症化における種差と，膵炎感受性規定分子であるトリプシノーゲンと PSTI のマウスホモログ (*Prss1* および *Spink3*) の非刺激時，及び膵炎惹起刺激負荷後の発現量(タンパク質，mRNA)を比較解析した．また，*Prss1* と *Spink3* の遺伝子配列も解析した<sup>2)</sup>．

#### 3. 急性膵炎の重症度評価における renal rim sign の意義

腹部 CT 上，Gerota 筋膜にまで脂肪膵炎の広がりが達さないものを Grade I，腹腔内には広範囲に脂肪膵炎が広がるが，腎周囲脂肪膵炎は伴わず腎周囲が rim 状に見える状態を Grade II (renal rim sign 陽性)，腎周囲脂肪膵炎を伴い renal rim が消失する状態を Grade III と分類し，重症度および致死率との関係を解析した<sup>3)</sup>．

#### 4. 急性膵炎の重症度評価における血小板数推移の意義

DICは急性膵炎の重症化のメカニズムに深く関与する。DICのマーカーのうちルーチン検査で測定できる血小板数に注目し、その値の推移(経時的変化)による急性膵炎の重症度評価および予後予測について検討した<sup>4)</sup>。

#### 5. 摂食状態の急性膵炎への影響

マウスのセルレイン膵炎において、摂食と絶食の影響を比較した。飢餓状態はGCN2のリン酸化で、オートファジーはLC3-II(オートファゴゾームと呼ばれる二重膜構造体の形成に関与する分子マーカー)の誘導で、急性膵炎の病態は、組織像、膵湿重量、血中アミラーゼ値で評価した。

(倫理面への配慮)

本研究におけるマウスの取扱いに関しては、National Institute of Health (NIH) animal care guidelines に則って行った。

腹部CTは、その目的の他、有害側面についても説明をし、同意文書を得た上で、施行した。

### C. 研究結果

#### 1. 急性膵炎の発症機構

急性膵炎とはトリプシノーゲンの異所性(膵内)活性化(トリプシン生成)をひきがねとして、組織が膵消化酵素により自己消化を受ける疾病である。

野生型マウスに過度の膵外分泌刺激をかけた場合には、膵腺房細胞内のトリプシン活性が亢進し膵障害が惹起されたのに対し、膵特異的 *Atg5* 欠損マウスでは、過度の膵外分泌刺激をかけても膵腺房細胞内にトリプシン活性は認めず、膵障害も惹起されなかった<sup>1)</sup>。

以上の結果は、1)膵腺房細胞内での異所性トリプシン生成には分泌蛋白質の品質管理・処理機構としてのオートファジーの誘導が必要であること、2)通常は膵腺房細胞内のトリプシン活性は first line defense である PSTI により阻害されて膵障害は生じないこと、および 3) 過度の膵外分泌刺激により生じた膵腺房細胞内のトリプシンの活性が PSTI の制御活性を超えると、トリプシンによる連鎖的な膵消化酵素の

活性化を生じて膵障害を生じる、ということの意味する。

#### 2. 急性膵炎発症における個体差

セルレイン膵炎とコリン欠乏エチオニン食膵炎の系を用いて解析したが、膵炎惹起刺激負荷後に、これら膵炎感受性規定分子の産生が亢進する場合と、亢進しない場合があることが判明した。Prss1(トリプシノーゲンのマウスホモログ)の産生亢進が著明な場合は、膵炎の程度が強く、Spink3(PSTIのマウスホモログ)の産生亢進が著明な場合は、膵炎抵抗性であった。なお、上流のプロモーター領域を3 kb まで塩基配列を解析したところ、*Spink3* では3.1%、*Prss1* では1.5%の塩基配列の違いを認めた。おそらく、プロモーター領域に違いがあり、そのため、トリプシノーゲンと PSTI の誘導に個体差を生じているものと考えられた。

また、オートファジーが惹起されていることを示す分子マーカーである LC3-II の誘導は、膵炎惹起刺激後の *Spink3* の産生誘導が著明なマウスでは抑制されていた<sup>2)</sup>。

#### 3. 急性膵炎の重症度評価における renal rim sign の意義

急性膵炎時には、腹腔内に脂肪膵炎が広がるが、いったん腹腔内と後腹膜腔を境する Gerota 筋膜部で脂肪膵炎の進展がいったんストップする。本状態下では、腎周囲脂肪膵炎は炎症性変化を受けていないため、腎周囲脂肪膵炎が Gerota 筋膜より腹腔側の density の上昇した脂肪膵炎に囲まれ、帯状にくっきりと描出される。この所見を renal rim sign と名づけた。本状態が Grade II に分類される。

腎周囲脂肪膵炎の程度に基づいて、本現象を Grade 化すると、本 Grade 分類は、Ranson スコアおよび致死率と有意に相関していた ( $p < 0.01$ )<sup>3)</sup>。

#### 4. 急性膵炎の重症度評価における血小板数推移の意義

入院時血小板数が  $10 \text{万}/\text{mm}^3$  未満で、入院後5日以内に  $10 \text{万}/\text{mm}^3$  以上に回復しない症例 (type 3, persistent plateletpenia) は予後不良であった (致死率60%)。血小板数が経過を通じて  $10 \text{万}/\text{mm}^3$  以上の症例 (type 1)、および入院

時の血小板数が $10\text{万}/\text{mm}^3$ 以下であっても入院後5日目までに回復する症例(type 2, transient plateletpenia)の予後は良好であった(致死率6%, 1%)<sup>4)</sup>.

#### 5. 摂食状態の急性膵炎への影響

摂食はオートファジーも急性膵炎も惹起しなかった. 絶食は軽度のオートファジーを惹起したが, 急性膵炎の発症には至らなかった. セルレイン投与は, 摂食下, 絶食下のいずれにおいても, オートファジーを強く誘導し, 急性膵炎を惹起した. 絶食下の方が急性膵炎の程度が若干増強したが, 有意差は認めなかった.

### D. 考察

#### 1. 急性膵炎の発症機構

膵腺房細胞が分泌刺激を受け取ると, 膵消化酵素(トリプシノーゲンを含む)の産生とザイモジエンングラニュールの管腔側への移動, 分泌が開始される. その過程でザイモジエンングラニュールの一部は, 分泌蛋白質の品質管理・処理機構としてのオートファジー系へと運ばれる. その結果, ライソゾーム酵素とトリプシノーゲンが同一コンパートメント内(オートファゴライソゾーム)に存在することになり, ライソゾーム酵素であるカテプシンによりトリプシノーゲンが活性化されることになる(トリプシン生成). しかし, 通常はザイモジエンングラニュール内に PSTI が存在するため, トリプシン活性は抑制され, 膵炎は生じない.

ところが, 膵管閉塞, 過剰な膵外分泌刺激時には, オートファジー系で処理されるザイモジエンングラニュール量が増える. 胆石性膵炎や ERCP 後膵炎では前者, アルコール性膵炎では後者を主体とした multifactorial な機序と考えられる. その結果, オートファジーにより生成するトリプシンの量が PSTI の活性を上回ると, 連鎖的な膵消化酵素の活性化から膵の自己消化, すなわち急性膵炎を発症することになる. われわれはこの機構をオートファジー説として提唱した<sup>1,5~7)</sup>.

#### 2. 急性膵炎発症における個体差

膵炎惹起刺激の負荷時にはトリプシノーゲン, PSTI, 両者の産生が増加するが, その誘導能

には量的個体差があり, それが膵炎の起こしやすさ, 起こしにくさに関与すると考えられる. プロモーター領域の解析を臨床例でも行う必要がある.

Spink3 の欠損マウスでオートファジーが過剰に誘導されることを合わせて考えると, Spink3 はオートファジーの誘導を抑制することが考えられた. Spink3 の誘導が著明な場合は, オートファジー誘導とトリプシン活性の両者が抑制されて膵炎抵抗性を, Spink3 の誘導が軽度の場合には, オートファジー誘導とトリプシン活性の抑制が弱いいため膵炎感受性を示すと考えられる<sup>2,7)</sup>.

#### 3. 急性膵炎の重症度評価における renal rim sign の意義

急性膵炎時における脂肪膵炎の腎周囲への進展様式について紹介した. 腎周囲の脂肪膵炎は, 単純に前腎傍腔から後腎傍腔へと進展するのではなく, 前腎傍腔, 後腎傍腔を含む Gerota 筋膜の腹腔側でいったん進展がストップする. さらに重症化した場合に限って, Gerota 筋膜を超えて, 腎周囲脂肪膵炎を発症する.

本現象に基づいて, Grade 分類を行ったが, 本 Grade 分類は, Ranson スコアおよび致死率と有意に相関しており, 急性膵炎の重症度を表すといえる. 従来 of CT 重症度分類は, 「結腸間膜根部」の評価など評価に専門性を必要とするややトリッキーな分類であったが, 本 Grade 分類は, 評価法が単純で専門性を必要とはしない点が利点である<sup>3)</sup>.

#### 4. 急性膵炎の重症度評価における血小板数推移の意義

急性膵炎では, 膵酵素の上昇, 凝固因子, 補体など多くのプロテアーゼが活性化され, プロテアーゼストームと呼ばれる病態が惹起される. 凝固因子の活性化は, 播種性血管内凝固症候群(DIC)発症の要因となり, 出血や微小循環障害を引き起こす. これにより多臓器不全(MOF)が起こり, 急性膵炎の予後を左右する. このように, DIC が急性膵炎の重症化のメカニズムに深く関与していることが考えられる. 血小板数はどの病院でもルーチン検査として測定が可能な DIC のパラメータである. 血

血小板数自体でも急性膵炎の重症度評価は可能であるが、それに加えて血小板数の推移を評価すると、情報量が格段に増加し、非常に優れた急性膵炎の重症度評価法、予後予測法となる。

すなわち、1)血小板数が経過を通じて減少しない場合は予後が良好である、2)血小板数が減少すると予後が不良であるが、後に血小板数が回復する場合は予後は比較的良好である、3)血小板数が減少したまま回復しない場合は予後が極めて不良である。血小板数が減少した症例では血小板数のその後の推移に十分注意を払う必要がある<sup>4)</sup>。

#### 5. 摂食状態の急性膵炎への影響

絶食はオートファジーを誘導し、膵臓の自己消化を促進するので、急性膵炎の治療においては、栄養管理が重要である。治療が長期に及ぶ重症急性膵炎の場合には、経腸栄養か中心静脈栄養の施行が必要と考えられる。

また、摂食が急性膵炎を増悪させるという現象は認めなかった。したがって、イレウスなど経口摂取ができない状況がなければ、経口摂取は可能かもしれない。しかし、一つの動物実験の結果からの考察であるので、この点に関しては結論は慎重であるべきと考える。

#### E. 結論

1)オートファジーの機構により腺房細胞内でトリプシンが産生されるが、生じたトリプシン活性が PSTI の制御活性を超えると膵炎を生じる、2)トリプシノーゲンと PSTI の誘導能に個体差があり、それが膵炎の起こしやすさ、起こしにくさに関与すると考えられる、3) Renal rim の出現 (renal rim sign陽性)、および血小板数の減少状態からの非回復 (persistent plateletpenia) は、急性膵炎の重症化および予後不良のマーカーである。4)摂食状態(摂食、絶食のいずれも)は、マウス急性膵炎の程度に大きな影響は及ぼさない。

#### F. 参考文献

1. Hashimoto D, Ohmuraya M, Hirota M, Yamamoto A, Suyama K, Ida S, Okumura Y, Takahashi E, Kido H, Araki K, Baba H,

Mizushima N, Yamamura K: Involvement of Autophagy in trypsinogen activation within the pancreatic acinar cells. *J Cell Biol* 181: 1065–1072, 2008.

2. Wang J, Ohmuraya M, Suyama K, Hirota M, Ozaki N, Baba H, Nakagata N, Araki K, Yamamura K: Relationship of strain-dependent susceptibility to experimentally induced acute pancreatitis with regulation of Prss1 and Spink3 expression. *Laboratory Investigation* 90: 654–664, 2010.

3. Imamura Y, Hirota M, Ida S, Hayashi N, Watanabe M, Takamori H, Awai K, Baba H: Significance of renal rim grade on computed tomography in severity evaluation of acute pancreatitis. *Pancreas* 39: 41–46, 2010.

4. Fujimura Y, Hirota M, Ichihara A, Takamori H, Baba H: Platelet count as a sensitive and convenient parameter for assessing the prognosis in acute pancreatitis. *Pancreas* 37: 225–227, 2008.

5. 廣田昌彦：急性膵炎成因と病態。日本内科学会雑誌 99: 9–14, 2010.

6. 廣田昌彦, 橋本大輔, 大村谷昌樹, 馬場秀夫：急性膵炎の発症とオートファジー。In: Annual Review 消化器, 林 紀夫, 日比紀文, 上西紀夫, 下瀬川徹, 編, 中外医学社(東京), pp. 212–217. 2010.

7. 廣田昌彦, 橋本大輔, 大村谷昌樹, 山村研一：急性膵炎の発症とオートファジー機構。消化器内科(in press).

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Hashimoto D, Ohmuraya M, Hirota M, Yamamoto A, Suyama K, Ida S, Okumura Y, Takahashi E, Kido H, Araki K, Baba H, Mizushima N, Yamamura K: Involvement of Autophagy in trypsinogen activation within the pancreatic acinar cells. *J Cell Biol* 181: 1065–1072, 2008.

2) Fujimura Y, Hirota M, Ichihara A, Takamori H, Baba H: Platelet count as a sensitive and convenient parameter for as-

- sessing the prognosis in acute pancreatitis. *Pancreas* 37: 225–227, 2008.
- 3) Hirota M, Kanemitsu K, Takamori H, Chikamoto A, Hayashi N, Horino K, Baba H: Percutaneous trans fistulous pancreatic duct drainage and interventional pancreatojejunostomy as a treatment option for intractable pancreatic fistula. *Am J Surg* 196: 280–284, 2008.
  - 4) Suyama K, Ohmuraya M, Hirota M, Ozaki N, Ida S, Endo M, Araki K, Gotoh T, Baba H, Yamamura K: C/EBP homologous protein is crucial for the acceleration of experimental pancreatitis. *Biochem Biophys Res Commun* 367: 176–182, 2008.
  - 5) 廣田昌彦, 大村谷昌樹, 陶山浩一, 尾崎宣之, 井田 智, 田中 洋, 高森啓史, 馬場秀夫: 急性膵炎重症化の分子機構. *胆と膵* 29: 313–316, 2008.
  - 6) 廣田昌彦, 高森啓史, 田中 洋, 生田義明, 佐藤伸隆, 田中洋平, 馬場秀夫: 急性膵炎(重症膵炎を含む). *救急・集中治療* 20: 381–386, 2008.
  - 7) 廣田昌彦, 大村谷昌樹, 馬場秀夫: 急性膵炎: 成因・発症機序・重症化機序. In: *膵疾患へのアプローチ*, 下瀬川徹編, 中外医学社(東京), pp. 11–17, 2008.
  - 8) Hashimoto D, Ohmuraya M, Wang J, Yamamura K, Hirota M, Baba H: Effect of low-molecular weight trypsin inhibitor, nafamostat mesilate, on trypsin activity using the pancreatic acinar cells. *Pancreas* 38: 595–597, 2009.
  - 9) Ozaki N, Ohmuraya K, Hirota M, Ida S, Wang J, Takamori H, Higashiyama S, Baba H, Yamamura K: Serine protease inhibitor Kazal type 1 promotes proliferation of pancreatic cancer cells through the epidermal growth factor receptor. *Mol Cancer Res* 7: 1572–1581, 2009.
  - 10) Ida S, Fujjimura M, Hirota M, Imamura Y, Ozaki N, Suyama K, Hashimoto D, Ohmuraya M, Tanaka H, Takamori H, Baba H: Significance of endothelial molecular markers in the evaluation of the severity of acute pancreatitis. *Surg Today* 39: 314–319, 2009.
  - 11) Ohmuraya M, Ozaki N, Hirota M, Baba H, Yamamura K: Serine protease inhibitor Kazal type 1 (SPINK1) beyond the trypsin inhibitor. *Current Enzyme Inhibition* 5: 110–118, 2009.
  - 12) 橋本大輔, 大村谷昌樹, 廣田昌彦, 高森啓史, 山村研一, 馬場秀夫: 膵腺房細胞内のトリプシン活性とプロテアーゼインヒビター. *Surgery Frontier* 18: 114–119, 2009.
  - 13) 廣田昌彦, 瀧下智恵, 田中洋平, 大村谷昌樹, 馬場秀夫: 急性膵炎の発症に関する遺伝子変異. *侵襲と免疫* 18: 23–28, 2009.
  - 14) 廣田昌彦: 重症急性膵炎に対する膵局所動注療法. *外科治療* 100: 375–379, 2009.
  - 15) 廣田昌彦, 橋本大輔, 大村谷昌樹, 馬場秀夫: 急性膵炎の発症における細胞内イベント. *肝胆膵* 59: 165–171, 2009.
  - 16) 大村谷昌樹, 廣田昌彦, 山村研一: 膵炎発症とオートファジー. *臨床検査* 53: 1585–1589, 2009.
  - 17) Imamura Y, Hirota M, Ida S, Hayashi N, Watanabe M, Takamori H, Awai K, Baba H: Significance of renal rim grade on computed tomography in severity evaluation of acute pancreatitis. *Pancreas* 39: 41–46, 2010.
  - 18) Wang J, Ohmuraya M, Suyama K, Hirota M, Ozaki N, Baba H, Nakagata N, Araki K, Yamamura K: Relationship of strain-dependent susceptibility to experimentally induced acute pancreatitis with regulation of Prss1 and Spink3 expression. *Laboratory Investigation* 90: 654–664, 2010.
  - 19) Ida S, Ohmuraya M, Hirota M, Ozaki N, Hiramatsu S, Uehara H, Takamori H, Araki K, Baba H, Yamamura K: Chronic pancreatitis in mice by treatment with

choline-deficient ethionine-supplemented diet. *Exp Animal* 59: 421-429, 2010.

- 20) 廣田昌彦: 急性膵炎 成因と病態. 日本内科学会雑誌 99: 9-14, 2010.
  - 21) 廣田昌彦, 橋本大輔, 大村谷昌樹, 馬場秀夫: 急性膵炎の発症とオートファジー. In: Annual Review 消化器, 林 紀夫, 日比紀文, 上西紀夫, 下瀬川徹, 編, 中外医学社(東京), pp. 212-217. 2010.
  - 22) 廣田昌彦, 平田敬子, 田上 正: ALI/ARDS 発症は好中球が原因か?. 救急・集中治療 22: 1015-1021, 2010.
  - 23) 廣田昌彦: 膵性胸水. In: 今日の消化器疾患智慮指針, 幕内雅敏, 菅野健太郎, 工藤正俊, 編, 医学書院(東京), pp. 741-742, 2010.
  - 24) 廣田昌彦, 杉田裕樹, 木村 有, 小川道雄: 重症急性膵炎における ALI/ARDS. In: 最新 ARDS のすべて, 石井芳樹編, 医歯薬出版(東京), pp. 157-163, 2010.
  - 25) 廣田昌彦, 田中 洋, 堀野 敬, 高森啓史, 馬場秀夫: 急性膵炎の診断と治療指針. In: 救急・集中治療ガイドライン—最新の治療指針—2010-'11, 岡元和文編, 総合医学社(東京), pp. 265-267, 2020.
  - 26) 廣田昌彦, 橋本大輔, 大村谷昌樹, 馬場秀夫: 急性膵炎の発症とオートファジー. In: Annual Review 消化器, 林 紀夫, 日比紀文, 上西紀夫, 下瀬川徹, 編, 中外医学社(東京), pp. 212-217. 2010.
- G. 研究発表**
- 1) Hirota M, Ohmuraya M. Autophagy activates trypsinogen within the pancreatic acinar cells and induces acute pancreatitis. Joint meeting of the European pancreatic club (EPC) and the international association of pancreatology (IAP), 2008年7月28日, ポーランドウッチ市.
  - 2) 廣田昌彦. 急性膵炎の発症・重症化の機序と治療戦略. 第10回筑後地区肝胆膵研究会, 2008年11月4日, 久留米市.
  - 3) 廣田昌彦. 急性膵炎の発症にはオートファジーの機構が関与する. 第15回外科侵襲とサイトカイン研究会, 2008年12月13日, 盛岡市.
  - 4) Hirota M, Ohmuraya M, Hashimoto D, Yamamura K, Baba H. Autophagy process activates trypsinogen and triggers the development of acute pancreatitis. The 41st Meeting of the European Pancreatic Club. 2009年7月2日, ハンガリーセゲド市.
  - 5) 廣田昌彦, 橋本大輔, 大村谷昌樹, 馬場秀夫. 摂食, 絶食が急性膵炎に及ぼす影響. 第40回日本膵臓学会大会ワークショップ「病態栄養からみた膵疾患の栄養療養」. 2009年7月31日, 東京都.
  - 6) 廣田昌彦. 急性膵炎の発症にはオートファジーの機構が関与する. 第17回日本消化器関連学会週間(JDDW 2009 KYOTO) パネルディスカッション「重症急性膵炎—その病態解明と治療の新展開—」. 2009年10月15日, 京都市.
  - 7) Hirota M. Hereditary pancreatitis: significance of trypsin inhibitory activity. 40th Anniversary Joint Meeting of the American Pancreatic Association & Japan Pancreas Society Controversy Session “Hereditary pancreatitis”. 2009年11月7日, アメリカ合衆国ホノルル市.
  - 8) 廣田昌彦. 急性膵炎の病態と治療. 第94回日本消化器病学会九州支部例会特別企画「消化器病学の新しい展開」. 2009年11月27日, 熊本市.
  - 9) 廣田昌彦. 急性膵炎発症後期におけるサイトカイン産生動態と易感染性について. 第16回外科侵襲とサイトカイン研究会, 2009年12月19日, 東京都.
  - 10) Ohmuraya M, Hirota M, Yamamura K. A mouse line expressing Spink3-driven Cre recombinase. The 42nd Meeting of the European Pancreatic Club. 2010年6月18日, スウェーデンストックホルム市.
  - 11) Ohmuraya M, Ida S, Hirota M, Yamamura K. Pancreatic acinar cell death pathways in