

は、MAP の収益性が低下し、SAP の収益性が増加したことにより達成されたといえる。2010 DPC 制度下においては、APACHE II、SIRS スコアが高いほど最終差額が低かった、すなわち、重症度が高いほど低収益になりがちであったといえる。2012年診療報酬改定によって、2008年重症度スコアが高いほど最終差額が高くなるという逆転がみられた。症例数が少ないため結論は共同研究プロジェクトに譲るが、すくなくとも重症度が高いほど低収益であった傾向は改善されていることが示唆された。

E. 結論

重症急性膵炎では軽症例に比して明らかに多額の資源を投入する治療を行っている。2010年 DPC 制度では重症例・軽症例とも同額の疾患群分類であり、重症度が高いほど低収益となるという問題点があった。2012年診療報酬改定により、急性膵炎の一部の疾患群分類で軽症と重症が区別される改定が実施されて運用されている。これにより、上記の問題点が是正されていた。

F. 参考文献

1. Guda NM, Romagnuolo J, Freeman ML: Chronic of recurrent epigastric pancreatic-type pain with marginal pancreatic hyperenzymemia. CREPE. Curr Gastroenterol Rep 13: 140-149, 2011.
2. 急性膵炎診療ガイドライン2010 [第3版]. 急性膵炎診療ガイドライン2010改訂出版委員会編. 金原出版.
3. 阪上順一, 片岡慶正, 十亀義生, 保田宏明, 吉川敏一. 【膵炎の診断基準・診療ガイドライン改訂と Validation】 急性膵炎の診断基準・診療ガイドライン改訂のポイント 治療と予後 蛋白分解酵素阻害薬の使用法は 持続大量療法, 動注療法, その開始時期. 肝胆膵. 64: 783-792, 2012.
4. 熊本幸司, 安積良紀, 伊佐地秀司. 【膵炎の診断基準・診療ガイドライン改訂と Validation】 急性膵炎の診断基準・診療ガイドライン改訂のポイント 診断 重症度区分の変更, 中等症消

失で致命率は変わったか. 一造影 CT の重症度区分を含めて一. 肝胆膵. 64: 769-776, 2012.

G. 研究発表

1. 論文発表 該当なし
2. 学会発表
 - 1) 阪上順一, 十亀義生, 保田宏明, 片岡慶正, 三木恒治: DPC 対象病院における急性膵炎の収益性予測. 第43回日本膵臓学会大会. 山形. 主題関連セッション. 2012年6月29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

DPC データから見た急性膵炎診療の状況

研究報告者 松田晋哉 産業医科大学公衆衛生学教室 教授

共同研究者

下瀬川徹（東北大学病院）

【研究要旨】

目的 わが国の急性膵炎の医療体制の在り方を検討するための基礎データを作成するために、DPC データを用いて分析を行った。

方法 平成23年度 DPC データから、急性膵炎の入院症例(1,012病院, 19,356件)を抽出し、予後因子のスコア別に出来高換算コストを計算し、分類の妥当性の検証を行った。

結果 予後因子の3群のいずれにおいても、出来高換算コストは手術例で高く、出来高換算コストは手術処置等2(血液ろ過, 人工腎臓, IVH, 人工呼吸)症例で高かった。これらの症例では在院日数も長くなっていた。さらに、予後因子のスコアが高くなるにつれて出来高換算コストは有意に上昇していた(MANOVA: $p < 0.01$)。

考察 出来高換算コストでみると、予後因子で計測される重症度によって大きな差があることが確認された。平成24年度の分類から急性膵炎については重症度スコアによる分類が導入されているが、本研究結果はこの見直しの妥当性を支持するものである。

しかしながら、スコアの記載のない症例も2018例(10.4%)あり、今後、より妥当な評価のためにデータ記載の精度の高める必要があると考えられる。

A. 研究目的

平成15年に特定機能病院等82施設で開始されたDPC制度は、平成24年度には調査対象施設全体で1750施設、病床数で55万床をカバーする規模となった。

B. 研究方法

使用したデータは平成23年度「診断群分類を用いた急性期医療、亜急性期医療、外来医療の評価手法開発に関する研究」班(研究代表者伏見清秀)で収集したものである(平成23年4月1日～平成24年3月31日)。分析は上記研究班の一環として行ったものである。このデータから急性膵炎(060350)19,356例を抽出し、予後因子のスコア別(予後因子3点未満), 予後因子(3点～6点未満), 予後因子6点以上のそれぞれで14ケタのDPC分類別の出来高換算コストをEファイルを用いて計算した。14桁詳細分類別の症例数は以下の通りである。

060350xx99x1xx : 2,199例

060350xx99x0xx : 12,451例

060350xx01x0xx : 713例

060350xx97x1xx : 1,170例

060350xx97x0xx : 2,461例

060350xx01x1xx : 362例

C. 研究結果

図1, 図2, 図3に予後因子のスコア別・DPC 14桁別・診療区分別のコストを示した。予後因子の3群のいずれにおいても、出来高換算コストは手術例で高く、出来高換算コストは手術処置等2(血液ろ過, 人工腎臓, IVH, 人工呼吸)症例で高かった。これらの症例では在院日数も長くなっていた。さらに、予後因子のスコアが高くなるにつれて出来高換算コストは有意に上昇していた(MANOVA: $p < 0.01$)。例えば、060350xx01x1xxの場合、予後因子3点未満は300,454点, 3点～6点未満は413,601点, 予後因子6点以上は974,692点となっている。

予後因子3点未満

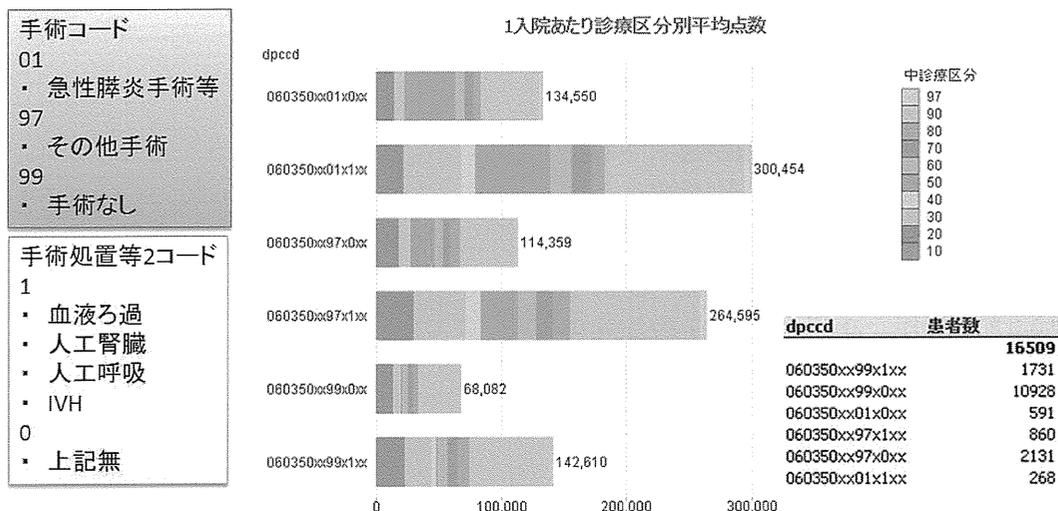


図1 DPC 14桁別に見た1入院あたり診療区別平均点数(出来高換算)

予後因子3点～6点未満

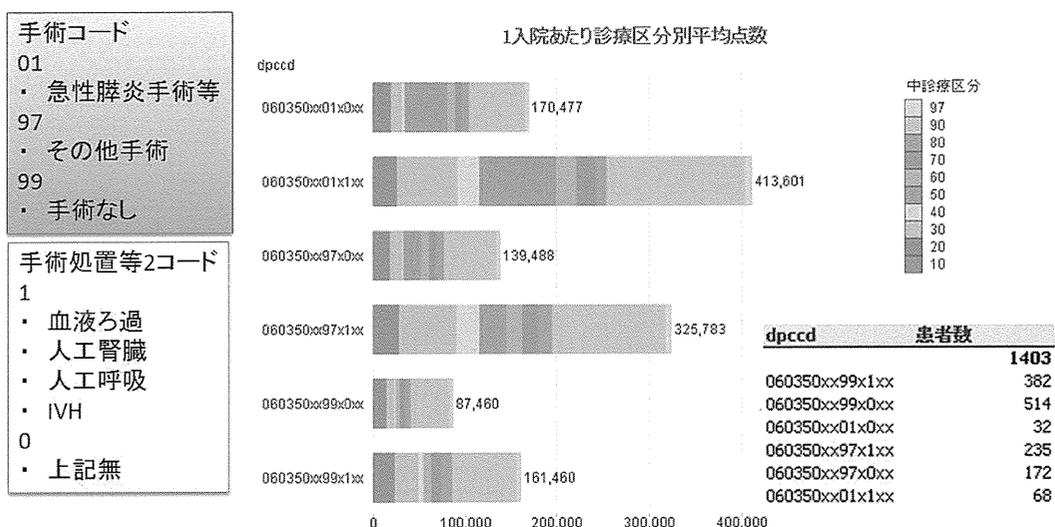


図2 DPC 14桁別に見た1入院あたり診療区別平均点数(出来高換算)

予後因子6点以上

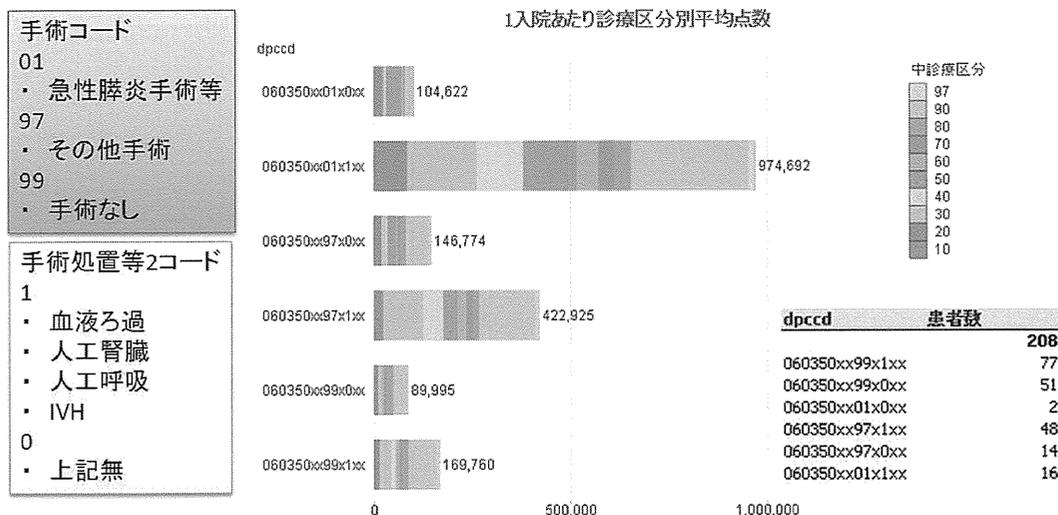


図3 DPC 14桁別に見た1入院あたり診療区別平均点数(出来高換算)

D. 考察

出来高換算コストでみると、予後因子で計測される重症度によって大きな差があることが確認された。平成24年度の分類から急性膵炎については重症度スコアによる分類が導入されているが、本研究結果はこの見直しの妥当性を支持するものである。

しかしながら、スコアの記載のない症例も2018例(10.4%)あり、今後、より妥当な評価のためにデータ記載の精度の高める必要があると考えられる。

E. 結論

急性膵炎の重症度別出来高換算コストをDPCデータに基づいて検証した結果、重症度スコアによる分岐の妥当性が証明された。

F. 参考文献

該当なし

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

ラットならびにヒト膵組織における ADAMTS13 の発現

研究報告者 植村正人 奈良県立医科大学 教授・医療安全推進室長

共同研究者

森岡千恵, 高谷広章, 藤本正男, 沢井正佳, 吉田太一, 美登路昭, 山尾純一, 福井 博
(奈良県立医科大学第三内科)

辰巳晃子, 和中明生 (奈良県立医科大学第2解剖学)

松本雅則, 早川正樹, 藤村吉博 (奈良県立医科大学輸血部)

庄 雅之, 金廣裕道, 中島祥介 (奈良県立医科大学消化器・総合外科学)

高 濟峯 (奈良県立奈良病院外科)

【研究要旨】

正常ラット膵組織を ADAMTS13 の特異的モノクロナル抗体(A10&C7)により免疫組織染色後, 共焦点レーザー顕微鏡にて解析した. 正常膵臓のランゲルハンス島周辺部特異的に ADAMTS13 の発現が認められたが, 本酵素は血管内皮細胞, α , β および δ 細胞には発現されなかった. 現在, 骨髄由来星細胞の可能性も考慮し, in situ hybridization にて検討中である. 同様に主に慢性膵炎組織を用いて検討した結果, α -SMA 染色領域にほぼ一致して ADAMTS13 の発現が認められ, ヒトの膵星細胞は肝星細胞と同様に ADAMTS13 を産生している可能性が示唆され再確認中である.

A. 研究目的

我々はこれまで, 急性膵炎の重症化の発生機序の要因である膵微小循環障害ならびに多臓器不全(multiple organ failure, MOF)に焦点を当て, 新規治療の開発を目指し, 微小血小板血栓形成と密に関連する ADAMTS13 の動態解析とその制御機構を中心に一連の研究を行ってきた¹⁻⁷⁾. 我々は ADAMTS13 が肝星細胞(hepatic stellate cell, HSC)で産生されることを明らかにした⁸⁾が, 膵臓にも星細胞が存在する^{9,10)}. 今回, ラット膵臓に ADAMTS13 産生細胞が存在するか否かを検討し, 次いでヒト慢性膵炎組織を用いて, 膵組織内における ADAMTS13 の存在様式を検討する. これら膵組織内 ADAMTS13 の発現・存在様式を検討することは, 膵内微小循環障害ならびに膵線維化進展機序と ADAMTS13 との関連を明らかにし得る可能性がある.

B. 研究方法

1. ラット各臓器における ADAMTS13 の発現
膵組織内 ADAMTS13 の発現を検討する前

に, 脳, 心臓, 肺, 肝臓, 膵臓, 脾臓, 腎臓の発現を Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction(RT-PCR)と western blotting の両方で検討した. なお, 「ラット膵における ADAMTS13 産生の解析」については, 奈良県立医科大学動物実験管理規程第14条に基づき, 動物実験計画承認申請書を提出し許可(承認番号9632)を得ている.

2. ラット膵組織における ADAMTS13 存在・発現様式

ラット膵組織およびヒト膵疾患(主として慢性膵炎を基盤にした膵癌術後)組織を10% paraformaldehyde(PFA)にて24時間固定後, 凍結切片を作成し, ADAMTS13の特異的モノクロナル抗体(A10&C7)⁸⁾により3,3'-diaminobenzidine(DAB)にて免疫組織染色後, 共焦点レーザー顕微鏡にて解析した. 細胞同定用に用いた一次抗体は, 抗インスリン抗体(MP Biomedicals Inc., Solon, Ohio, United States), 抗グルカゴン抗体(Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, Massachusetts, United States), 抗ソマトスタチンC抗体(Gene-

Tex, Inc. San Antonio, Texas, United States), 二次抗体としては Histofine® Simple Stain Rat MAX PO (MULTI) (Nichirei Corporation, Tokyo, Japan)を用いた. なお, 膵組織内における ADAMTS13 発現に関する研究は「膵癌治療創薬基盤構築を目指した標的分子とバイオマーカーの同定」により奈良県立医科大学倫理委員会の許可(承認番号476)を得ている.

C. 研究結果

1. ラット各臓器における ADAMTS13 の発現

RT-PCR および western blotting の結果, ADAMTS13は肺, 肝臓, 脾臓, 腎臓に強い発現が認められたが(図1), 膵臓, 脳にも淡い ADAMTS13 の発現が観察された(図1).

2. ラット膵組織における ADAMTS13 存在・発現様式

ADAMTS13 に対するモノクロナル抗体 (A10&C7) による DAB 免疫染色では, 膵ランゲルハンス島が特異的に染色され(図 2b, 2c),

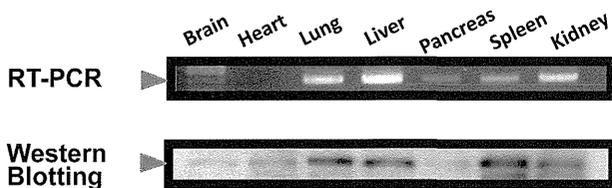


図1 ラット各臓器における ADAMTS13 の発現

一部導管部にも淡く染色された(図 2d). 膵ランゲルハンス島は抗インスリン抗体では瀰漫性(図 2e)に, 抗グルカゴン抗体では辺縁に強く濃染された(図 2f).

共焦点レーザー顕微鏡にて解析した結果, 正常膵ランゲルハンス島周辺部に, 特異的に ADAMTS13 の発現が認められ(図 3b), 抗 VWF 抗体陽性染色部の血管内皮細胞には発現は認められなかった(図 3a, 3d). なお, 抗 ADAMTS13 抗体陽性部は抗インスリン抗体陽性部(β 細胞)と低倍率ではある程度 co-localize しているように見えたが, 高倍率では完全には一致せず, α および δ 細胞にも ADAMTS13 の発現はみられなかった. 現在, 骨髄由来星細胞の可能性も考慮し, in situ hybridization にも検討中である.

同様に主に膵癌術後の慢性膵炎組織を用いて検討した所, α -SMA 染色領域にはほぼ一致して ADAMTS13 の発現が認められ, ヒトの膵星細胞(pancreatic stellate cell, PSC)は HSC と同様に ADAMTS13 を産生している可能性が示唆され再確認中である.

D. 考察

膵ランゲルハンス島は容積にして膵全体の 1~2%であるが, 10%以上の血流支配を受ける¹¹⁾. 膵島は毛細血管の集合体であり, 細胞

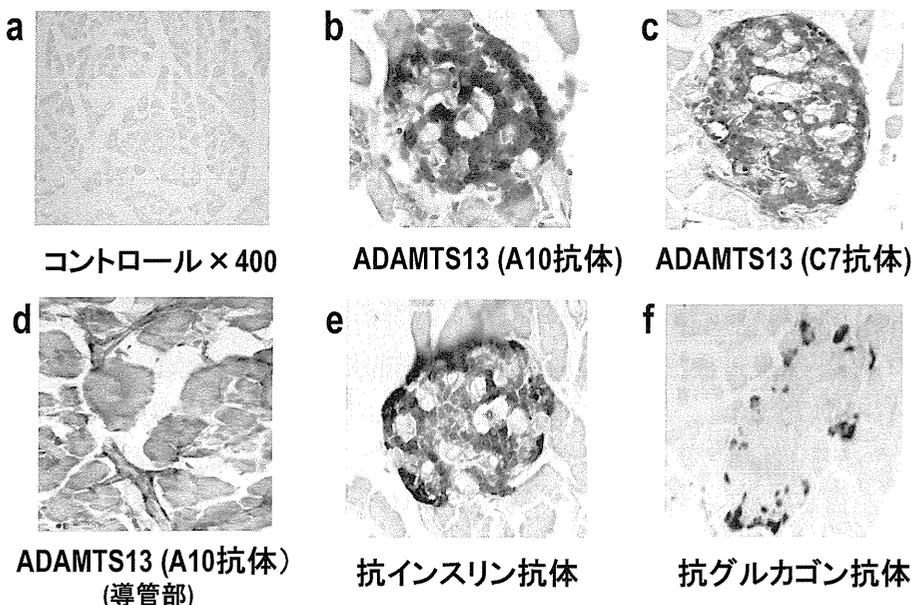


図2 ラット膵における DAB 免疫染色

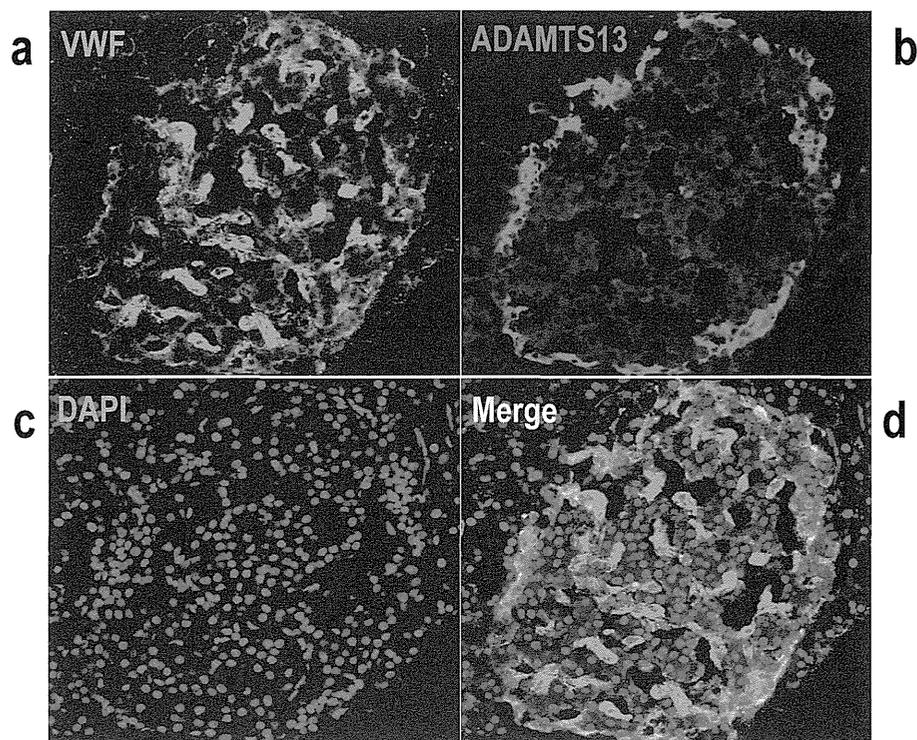


図3 膵ランゲルハンス島周辺部に特異的に ADAMTS13 が発現

策を作りこれが吻合して複雑な立体的網目構造を呈し、腎臓に存在する糸球体のように動脈が直接分岐する構造をとるが、未だ一定した結論は得られていない¹¹⁾。膵島細胞は細胞策の間に腔の広い毛細血管が存在し、毛細血管の内皮細胞は、通常の内分泌器官と同様有窓型であり隔膜を持ち小孔を有する。神経は血管に沿って膵島に入り、副交感神経刺激によりインスリンやグルカゴンの分泌が促進される¹¹⁾。

膵島の微小循環調節は複雑であり、遠隔臓器から血液を介して直接到達する各種ホルモン・栄養素ならびに膵島内の内分泌細胞と外分泌細胞の相互伝達により決定されるという¹¹⁾。最近、糖尿病の膵島移植に際して、血流動態を把握し早期に膵島血流を回復して移植膵島の低酸素状態を改善すると移植成績が向上するという可能性¹²⁾や、2型糖尿病に経口速効型食後血糖降下剤を投与すると血管内皮の一酸化窒素(NO)の合成を介して膵島血流が増加する¹³⁾という2型糖尿病発症と膵島微小循環障害との関連が指摘されている^{13,14)}。今回我々は膵島周辺にADAMTS13の発現を確認したが、ADAMTS13は膵島の微小循環調節を担っている可能性が唆され、今後さらに検討を要する課題である。

一方、1998年、PSCが分離、単離^{9,10)}されて以来、PSCが膵線維化の中心的な役割を担っていることが明らかにされた^{15~19)}。正常膵では、PSCは主に膵腺房細胞周囲、血管周囲ならびに導管周囲に分布するという。PSCは、通常静止状態にあり細胞質にはVitamin Aを多量に含有する脂肪滴が存在するが、膵障害や炎症が惹起されると脂肪滴は消失し、 α -smooth muscle actin (α -SMA)陽性の筋線維芽細胞用の形態を呈する^{9,10,15~19)}。いわゆるPSCの活性化であるが、PSCはHSCと遺伝子発現プロファイルで0.31%に発現差がみられのみで両者は酷似¹⁹⁾しており、PSCが活性化されると、PSCの増殖や遊走を促す血小板由来増殖因子(Platelet-Derived Growth Factor, PDGF)やコラーゲンなどのextracellular matrix (ECM)産生を強力に刺激するTransforming growth factor- β , TGF- β)などのサイトカインや各種受容体に対する受容体の発現が亢進する。最近では骨髄由来星細胞の存在も指摘されている²⁰⁾。一方、PSCはECMを分解するmatrix metalloproteinases (MMP) 2, MMP9およびMMP13を産生することが明らかにされ、PSCはECMの産生と分解の両者のバランスの上で線維化を調節している可能性

がある¹⁵⁾。今回、MMPの一つであるADAMTS13がHSCのみならず⁸⁾、PSCにも発現している可能性があり、今後ADAMTS13を膵微小循環障害と共に膵線維化形成機序との関連の基に検討していく必要がある。

E. 結論

1. 正常ラット膵組織のランゲルハンス島周辺部に特異的にADAMTS13の発現が認められた。本酵素は血管内皮細胞、 α 、 β および δ 細胞には発現されず、ADAMTS13産生細胞同定に付き、今後さらに検討を要する。
2. ヒト膵癌術後の慢性膵炎組織を用いた検討では、 α -SMA染色領域にほぼ一致して、ADAMTS13の発現が認められ、ヒトのPSCはHSCと同様にADAMTS13を産生している可能性が示唆された。
3. 膵ADAMTS13の意義につき、膵微小循環障害と共に膵線維化形成機序との関連の基にも検討していく必要がある。

F. 参考文献

1. 植村正人, 森岡千恵, 高谷広章, 藤本正男, 松山友美, 沢井正佳, 吉田太之, 美登路昭, 山尾純一, 福井博, 松本雅則, 藤村吉博, 西尾健治, 奥地一夫. 丸上永晃, 高濱潤子, 吉川公彦. 急性膵炎重症化と血漿ADAMTS13活性の動態解析. 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23年度 総括・分担研究報告書, 2012年3月; pp119-125.
2. 植村正人, 森岡千恵, 藤本正男, 松山友美, 沢井正佳, 吉田太之, 美登路昭, 山尾純一, 福井博, 松本雅則, 藤村吉博, 西尾健治, 奥地一夫. 急性膵炎重症化と血漿ADAMTS13活性. 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20年度~平成22年度 総合研究報告書, 2011年2月; pp142-153.
3. 植村正人, 森岡千恵, 藤本正男, 松山友美, 沢井正佳, 吉田太之, 美登路昭, 山尾純一, 福井博, 松本雅則, 藤村吉博, 西尾健治, 奥地一夫. 急性膵炎重症化と血漿ADAMTS13活性.

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22年度 総括・分担研究報告書, 2011年2月; pp113-121.

4. 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, p237-244.
5. 植村正人, 森岡千恵, 藤本正男, 松山友美, 沢井正佳, 吉田太之, 美登路昭, 山尾純一, 福井博, 松本雅則, 藤村吉博, 西尾健治, 奥地一夫. 重症急性膵炎におけるADAMTS13活性の動態とその臨床的意義. 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・総合研究報告書, 2010年3月; pp114-122.
6. 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: 1387-1396.
7. 森岡千恵, 植村正人, 高谷広章, 松本雅則, 藤村吉博, 福井博. 重症急性肝炎におけるADAMTS13活性の動態とその臨床的意義. *消化器内科*. 52: 2011; 200-208.
8. Uemura M, Tatsumi K, Matsumoto M, Fujimoto M, Matsuyama T, Ishikawa M, Iwamoto TA, Mori T, Wanaka A, Fukui H, Fujimura Y. Localization of ADAMTS13 to the stellate cells of human liver. *Blood* 2005; 106: 922-924.
9. 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.
10. Bachem MG, Schneider E, Gross H, Weiden-

- bach H, Schmid RM, Menke A, Siech M, Beger H, Grünert A, Adler G. Identification, culture, and characterization of pancreatic stellate cells in rats and humans. *Gastroenterology* 1998; 115: 421-432.
11. Ballian N, Brunnicardi FC. Islet vasculature as a regulator of endocrine pancreas function. *World J Surg* 2007; 31: 705-714.
 12. Chan N, Obenaus A, Tan A, Sakata N, Mace J, Peverini R, Chinnock R, Sowers LC, Hathout E. Monitoring neovascularization of intraportal islet grafts by dynamic contrast enhanced magnetic resonance imaging. *Islets* 2009; 1249-1255.
 13. Iwase M, Nakamura U, Uchizono Y, Nohara S, Sasaki N, Sonoki K, Iida M. Nateglinide, a non-sulfonylurea rapid insulin secretagogue, increases pancreatic islet blood flow in rats. *Eur J Pharmacol* 2005; 518: 243-250.
 14. Huang Z, Jansson L, Sjöholm A. Gender-specific regulation of pancreatic islet blood flow, insulin levels and glycaemia in spontaneously diabetic Goto-Kakizaki rats. *Clin Sci.* 2008; 115: 35-42.
 15. Phillips PA, McCarroll JA, Park S, Wu MJ, Pirolo R, Korsten M, Wilson JS, Apte MV. Rat pancreatic stellate cells secrete matrix metalloproteinases: implications for extracellular matrix turnover. *Gut* 2003; 52: 275-282.
 16. Masamune A, Watanabe T, Kikuta K, Shimosegawa T. Roles of pancreatic stellate cells in pancreatic inflammation and fibrosis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2009; (11 Suppl): S48-54.
 17. Masamune A, Kikuta K, Watanabe T, Satoh K, Hirota M, Hamada S, Shimosegawa T. Fibrinogen induces cytokine and collagen production in pancreatic stellate cells. *Gut* 2009; 58: 550-559.
 18. Erkan M, Adler G, Apte MV, Bachem MG, Buchholz M, Detlefsen S, Esposito I, Friess H, Gress TM, Habisch HJ, Hwang RF, Jaster R, Kleeff J, Klöppel G, Kordes C, Logsdon CD, Masamune A, Michalski CW, Oh J, Phillips PA, Pinzani M, Reiser-Erkan C, Tsukamoto H, Wilson J. StellaTUM: current consensus and discussion on pancreatic stellate cell research. *Gut* 2012; 61: 172-178.
 19. Erkan M, Weis N, Pan Z, Schwager C, Samkharadze T, Jiang X, Wirkner U, Giese NA, Ansoerge W, Debus J, Huber PE, Friess H, Abdollahi A, Kleeff J. Organ-, inflammation- and cancer specific transcriptional fingerprints of pancreatic and hepatic stellate cells. *Molecular Cancer* 2010; 9: 88.
 20. Watanabe T, Masamune A, Kikuta K, Hirota M, Kume K, Satoh K, Shimosegawa T. Bone marrow contributes to the population of pancreatic stellate cells in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009; 297: G1138-1146.
- G. 研究発表**
1. 論文発表
 - 1) 植村正人, 藤村吉博. 「教科書には載っていない臨床検査 Q & A」: 臨床検査のすべて. ADAMTS13の測定法とその臨床的意義について教えて下さい. 編集主幹 濱崎直孝, 編集委員 池田康夫, 伊藤喜久, 岩田 敏, 片山善章, 坂本穆彦, 山田俊幸. 臨床検査, 東京, 医学書院. 2012; 56; 1168-1171.
 2. 学会発表
 - 1) 森岡千恵, 植村正人, 高谷広章, 松本雅則, 藤村吉博, 福井 博. 重症アルコール性肝炎ならびに重症急性膵炎におけるADAMTS13の動態とその臨床的意義. 京都, 2012年4月13~15日.
 - 2) 森岡千恵, 植村正人, 福井 博. 重症急性膵炎(SAP)に対する膵 Perfusion CT 像と血漿 ADAMTS13 活性の動態 第98回日本消化器病学会近畿支部例会, 神戸, 2013年2月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

メタボロミクスを用いた膵炎治療薬の探索

研究報告者 増田充弘 神戸大学大学院医学研究科消化器内科学分野 助教

共同研究者

坂井 文, 吉田 優, 西海 信, 塩見英之, 有阪好史, 久津見弘, 早雲孝信, 東 健
(神戸大学大学院医学研究科消化器内科学分野)

【研究要旨】

急性膵炎は一旦重症化すると致死率の高い疾患であるため、新たな治療薬の探索が必要であると考えられている。本研究では2種類の膵炎モデル(セルレイン誘発性膵炎, アルギニン誘発性膵炎)を用いて、急性膵炎における低分子代謝物の変動をガスクロマトグラフ質量分析計(GC/MS)を用いたメタボロミクスにより網羅的に解析した。そして、膵炎に特徴的な変動を示す低分子代謝物を見出し、急性膵炎の治療へつながる知見が得られるかどうかを検討した。まず、膵炎モデルマウスの血清・膵組織を採取し膵炎が発症していることを確認した上で低分子代謝物の変動をGC/MSで解析したところ、陰性対照群と比較して有意に変動する代謝物が数種類同定できた。2種類の膵炎モデルで共通した変動を示す低分子代謝物が数種類見られ、その中でも膵組織で有意に減少したグルタミン酸・O-ホスホエタノールアミンに注目し、セルレイン処理したマウスに投与した結果、共に膵炎を改善させることが確認できた。以上より、GC/MSを用いたメタボロミクスは膵炎に特徴的な変動を示す低分子代謝物を同定でき、膵炎治療薬の探索に有用であると考えられた。

A. 研究目的

急性膵炎は年々増加傾向にある疾患であり、細胞内酵素の活性による膵組織の自己消化と言われているが、正確な病態は未だ明らかにされていない。一旦重症化すると全身性炎症反応症候群に発展し死亡することもあり、重症急性膵炎は難治性膵疾患の一つとされ、新たな治療薬の探索が必要であると考えられている^{1~3}。メタボロミクスは、様々な条件下における低分子代謝物の特徴や相互作用を、包括的、かつ、網羅的に探索する研究手法である^{4~6}。そこで、急性膵炎で生じる低分子代謝物の変動を評価するため、2つの膵炎モデルマウス、すなわち、セルレイン誘発性膵炎モデルとアルギニン誘発性膵炎モデル、における血清、ならびに、膵組織中の代謝物をガスクロマトグラフ質量分析計(GC/MS)により分析し、その変動代謝物が急性膵炎の重症度に影響するか否かについて検討した。

B. 研究方法

セルレイン膵炎モデル作成のため、C57BL/6Jマウス(9-10週齢, オス)に50 $\mu\text{g}/\text{kgBW}$ セルレインを1時間毎に6回腹腔内投与し、初回投与から8時間後に血清, ならびに、膵組織を採取した⁷⁾(図1A)。また、アルギニン膵炎モデル作成のため、C57BL/6Jマウス(9-10週齢, オス)に4.7 g/kgBW L-アルギニン塩酸塩を1時間毎に2回腹腔内投与し、初回投与

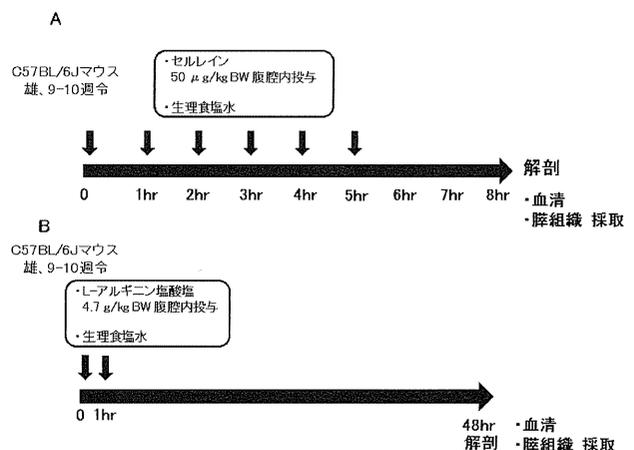


図 1

から48時間後に血清と脾組織とを採取した⁸⁾ (図 1B)。両モデルにおいて、血清中の脾アミラーゼ活性を測定し、また、脾組織はホルマリン固定後組織切片を作成して HE 染色を行うことで組織学的評価を実施した⁹⁾。上記方法により脾炎モデルが作成されていることを確認した。このセルレイン脾炎モデルマウスと陰性対照群、アルギニン脾炎モデルマウスと陰性対照群の血清と脾組織を用いてメタボローム解析を実施し、代謝物プロファイルと比較検討した。各検体から水溶性代謝物を抽出し、GCMS 測定のため誘導体化処理を行った後、ガスクロマトグラフ質量分析計 (GCMS-QP2010 Ultra) を用いて代謝物の網羅的解析を実施した¹⁰⁾。

また、グルタミン酸と O-ホスホエタノールアミンをセルレイン脾炎モデルマウスに投与する実験を実施した。50 mg/kgBW or 100 mg/kgBW Glu, あるいは、200 mg/kgBW or 400 mg/kgBW PEA をセルレイン初回投与から 1 時間後より 1 時間毎に 5 回腹腔内投与し、8 時間後に血清と脾組織を採取した (図 3)。血清中の脾アミラーゼ活性と脾組織中のミエロペルオキシダーゼ (MPO) 活性の測定、脾組織の HE 染色を行い、生化学的、および、組織学的に脾炎の変化を評価した。

(倫理面への配慮)

本実験ではマウスモデルを用いて急性脾炎の病態・新規治療法を検討する。マウスはヒトと同じ哺乳類で高い遺伝子相同性を持つだけでなく、免疫学において動物実験としての長い歴史と様々な知見が集積されている。また、実験の再現性を保障する遺伝的に均一な「近交系」が確率されているため、急性脾炎に対する効果を生体内で検討することが可能であると考えられる。本実験では急性脾炎による病態生理を個体レベルで検討することが必須であるため、動物を使用しない他の実験法は採用できず、上記理由より使用する動物としてマウスが最適と考えられた。

実験により動物が被る苦痛に関して、セルレイン・アルギニンを腹腔内投与した際、薬物代謝によって生じる軽度の全身倦怠感・脾炎による腹痛・腹部不快感・軽度～中等度の発熱が考

えられる。動物の行動 (摂食・歩行状態) より大きな苦痛は感じていないと判断できるが、腹痛・全身衰弱による摂食困難・歩行困難などの耐え難い苦痛が観察される場合には速やかに安楽死させている。マウスより血清・脾組織を採取する際の安楽死の方法として、フェノキシエタノール麻酔下 (23 G の注射針を用いて腹腔内投与) で頸椎脱臼を行いマウスの苦痛軽減を図っている。動物実験計画書 承認番号 P101010。

C. 研究結果

1) セルレイン脾炎、アルギニン脾炎におけるメタボローム解析

マウスの血清と脾組織を用いて代謝物の解析を行ったところ、セルレイン脾炎の血清で同定可能な低分子代謝物を 93 物質見出した。その中で陰性対照群と比較して有意に増加した代謝物は 3 物質、減少した代謝物は 16 物質であった。また脾組織では 129 物質が同定可能であり、有意に増加した代謝物は 32 物質、減少した代謝物は 10 物質であった。一方、アルギニン脾炎の血清で同定可能な低分子代謝物は 120 物質であり、陰性対照群と比較して有意に増加した代謝物は 7 物質、減少した代謝物は 33 物質であった。また脾組織では 133 物質が同定可能であり、有意に増加した代謝物は 19 物質、減少した代謝物は 18 物質であった。よって脾炎の発症によって代謝物プロファイルが変動することが判明した。その中でもエネルギー産生に関与する TCA 回路の中間代謝物の変動が顕著であった。また、脾炎特異的に変動する代謝物として、セルレイン脾炎とアルギニン脾炎に共通して有意な変動を示す代謝物質を数種見出した。その中でも、脾組織中で有意に減少する代謝物としてグルタミン酸と O-ホスホエタノールアミンに注目した (図 2)。

2) グルタミン酸添加によるセルレイン脾炎への影響

グルタミン酸は両脾炎モデルにおいて脾組織中での存在量が有意に減少していたことより (図 2A, C), セルレイン脾炎モデルマウスにグルタミン酸を投与する実験を実施した。この結

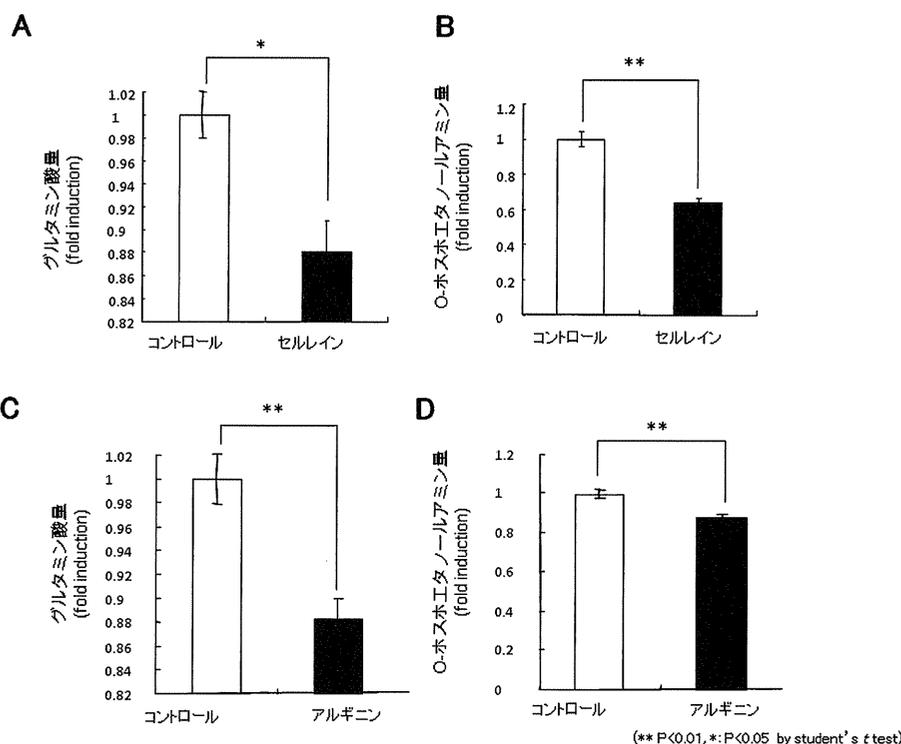


図 2

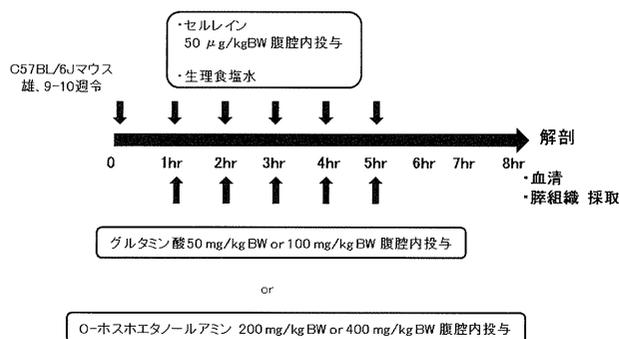


図 3

果, グルタミン酸投与により膀胱で上昇していた血清アミラーゼ値, 膀胱組織の MPO 活性が低下し, 病理組織学的にも膀胱の改善が確認できた(図 4). よって, グルタミン酸投与により膀胱の改善効果が得られることが明らかになった.

3) O-ホスホエタノールアミン(PEA)添加によるセルレイン膀胱炎への影響

PEA も両膀胱炎モデルにおいて膀胱組織中で存在量が有意に減少していたことから(図 2B, D), セルレイン膀胱炎モデルマウスに PEA を投与する実験を実施した. この結果, グルタミン酸と同様に, PEA 投与により膀胱で上昇していた血清アミラーゼ値, 膀胱組織の MPO 活性が低下し, 病理組織学的にも膀胱の改善が確認できた(図 5). よって, PEA 投与により膀胱の

改善効果が得られることが明らかになった.

D. 考察

メタボロミクスとは, 内因性・外因性要因(酵素因子・病理学的因子・環境因子・生活スタイル)などを含めた, ある条件下での低分子代謝物の特徴や相互的關係を包括的, かつ, 網羅的に探究する研究手法である. すなわち, メタボローム解析を実施することで細胞や組織の代謝過程について様々な情報を得ることができると考えられる. 今回の研究結果では, 急性膀胱炎が生じることによって代謝物プロファイルが変動することが明らかとなった. 特に, エネルギー産生に関与する TCA 回路の中間代謝物は血清と膀胱組織とで変動パターンが異なり, 急性膀胱炎におけるエネルギー代謝の変化を全身レベル, ならびに, 細胞レベルで評価できた. したがって, メタボローム解析の手法を採用することで急性膀胱炎における代謝過程の全体的な展望をみることができると考える.

また, 今回の研究では 2 つの膀胱炎モデルにおいて共通して変動する代謝物が観察され, 膀胱炎特異的に変動する代謝物と考えられた. その中でも, 膀胱組織中で有意に減少する代謝物としてグルタミン酸と O-ホスホエタノールアミン

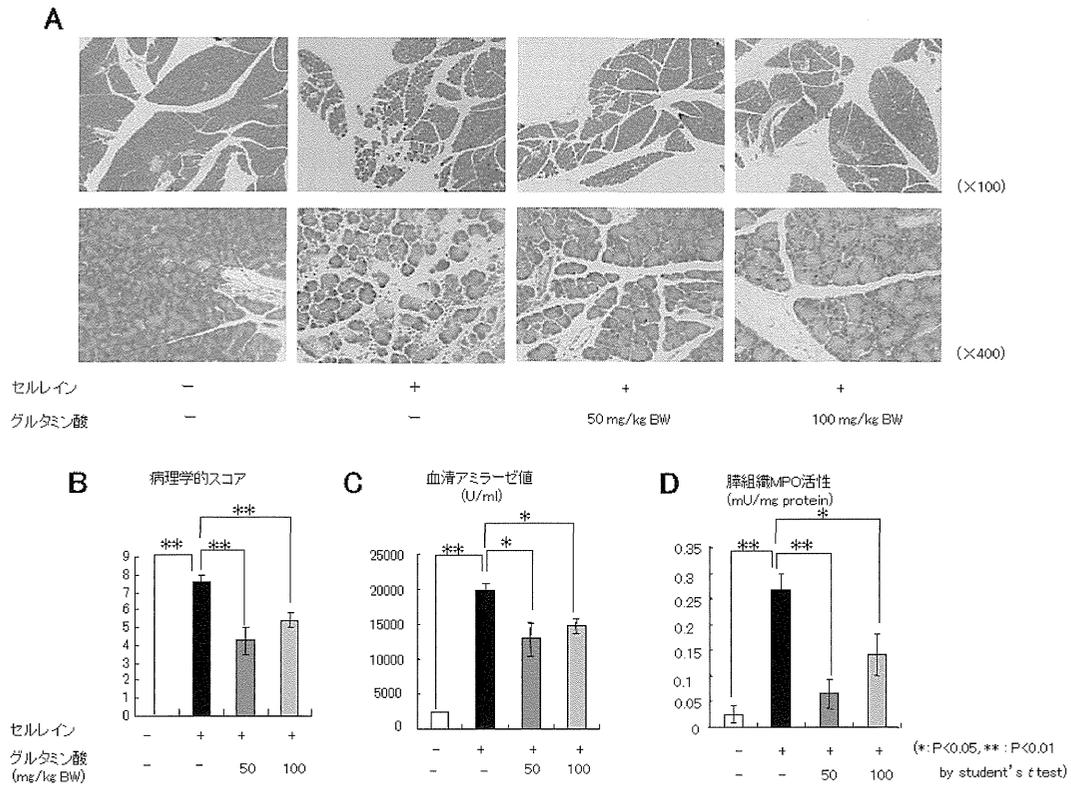


図 4

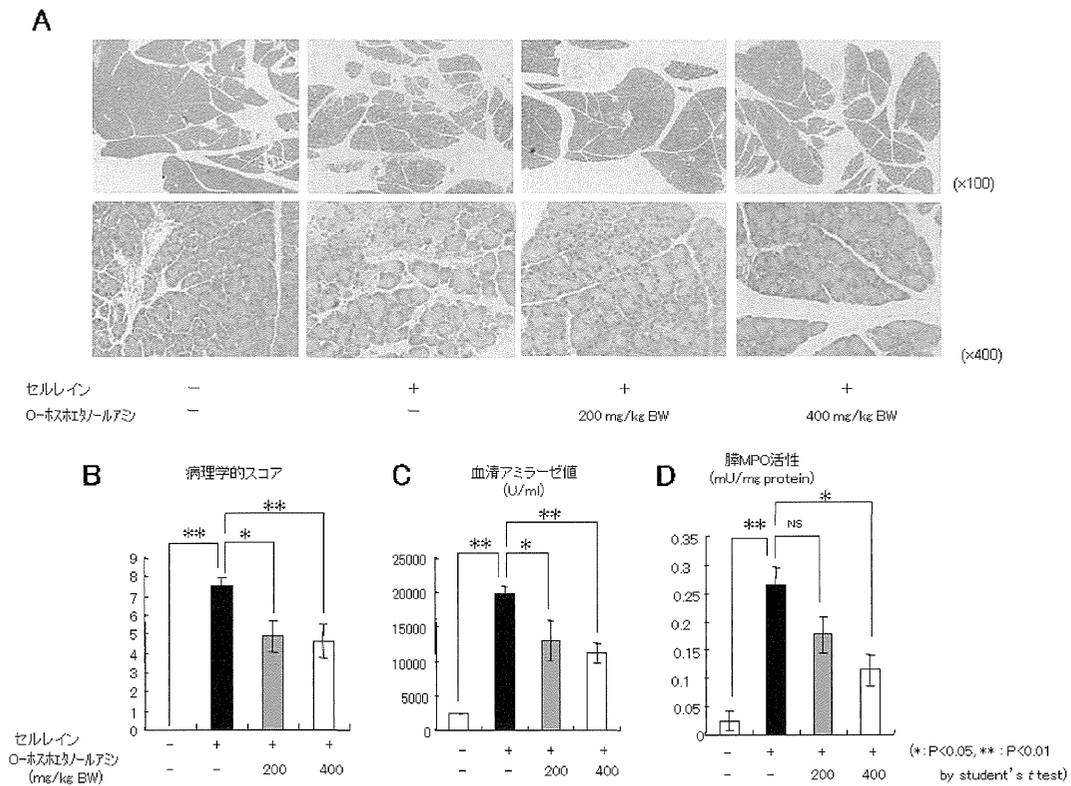


図 5

(PEA)が見出された。グルタミン酸はエネルギー産生過程における器質の一つである¹¹⁾。急性膵炎では全身のエネルギー需要が増加する^{12,13)}。また、膵腺房細胞内では ATP 量が減

少し、膵炎の経過中に生じる他の障害を受けやすくなると言われている^{14,15)}。グルタミン酸を添加した実験では、グルタミン酸投与により膵炎改善効果が得られることが示された。この効

果はエネルギー産生が増加したことで、膵液中に分泌されるグルタミン酸も増加し、小腸での栄養吸収に効果的に作用したためと考えられる¹⁶⁾。

PEAは生体膜磷脂質の主な構成成分であるホスファチジルエタノールアミンの前駆体であり、PEA存在下で細胞増殖する場合には、PEAを効果的に細胞内、続いて、リン脂質内に取り入れる^{17,18)}。また、膵炎では膵腺房細胞膜の流動性が上昇し、細胞障害や脆弱性に関係していると言われている¹⁹⁾。今回、PEAを添加した実験では、PEA投与により膵炎改善効果が得られた。この効果は、生体膜のリン脂質を合成する際の器質であるPEAの増加によって細胞膜に効果的に影響を与えた可能性が考えられる。

E. 結論

急性膵炎モデルマウスの血清と膵組織を用いてメタボローム解析を実施した結果、メタボロミクスは膵炎における代謝物の変動を反映できるということ、さらには、メタボロミクスにより急性膵炎に対して治療効果のある物質を探索できることが証明できた。これらの結果は、メタボロミクスを通じてこれまで明らかにされていない様々な病態やその治療に導くことができる可能性が示唆された。

F. 参考文献

1. Frossard JL, Steer ML, Pascor CM. Acute pancreatitis, *Lancet*. 2008; 371: 143-152.
2. Bhatia M, Brady M, Shokuhi S, Christmas S, Neoptolemos JP, Slavin J. Inflammatory mediators in acute pancreatitis, *J Pathol*. 2000; 190: 117-125.
3. Hayashi T, Ishida Y, Kimura A, Iwakura Y, Mukaida N, Kondo T. IFN-gamma protects cerulein-induced acute pancreatitis by repressing NF-kappa B activation, *J Immunol*. 2007; 178: 7385-7394.
4. Oliver SG, Winson MK, Kell DB, Baganz F. Systematic functional analysis of the yeast genome, *Trends Biotechnol*. 1998; 16: 373-8.
5. Nambiar PR, Gupta RR, Misra V. An "Omics" based survey of human colon cancer, *Mutat Res*. 2010; 693: 3-18.
6. Yoshida M, Hatano N, Nishiumi S, Irino Y, Izumi Y, Takenawa T, Azuma T. Diagnosis of gastroenterological diseases by metabolome analysis using gas chromatography-mass spectrometry, *J Gastroenterol*. 2011; doi: 10.1007/s00535-011-0493-8.
7. Chinzei R, Masuda A, Nishiumi S, Nishida M, Onoyama M, Sanuki T, Fujita T, Moritoh S, Itoh T, Kutsumi H, Mizuno S, Azuma T, Yoshida M. Vitamin K3 attenuates cerulein-induced acute pancreatitis through inhibition of the autophagic pathway, *Pancreas*. 2011; 40: 84-94.
8. Dawra R, Sharif R, Phillips P, Dudeja V, Dhaukhandi D, Saluja AK. Development of a new mouse model of acute pancreatitis induced by administration of L-arginine, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007; 292: G1009-18.
9. Eşrefoğlu M, Gül M, Ates B, Batçioğlu K, Selimoğlu MA. Antioxidative effect of melatonin, ascorbic acid and N-acetylcysteine on caerulein-induced pancreatitis and associated liver injury in rats, *World J Gastroenterol*. 2006; 12: 259-264.
10. Tsugawa H, Bamba T, Shinohara M, Nishiumi S, Yoshida M, Fukusaki E. Practical non-targeted gas chromatography/mass spectrometry-based metabolomics platform for metabolic phenotype analysis, *J Biosci Bioeng*. 2011; 112: 292-298.
11. Plaitakis A, Zaganas I. Regulation of human glutamate dehydrogenases: implications for glutamate, ammonia and energy metabolism in brain, *J Neurosci Res*. 2001; 66: 899-908.
12. Dickerson RN, Vehe KL, Mullen JL, Feurer ID. Resting energy expenditure in patients with pancreatitis, *Crit Care Med*. 1991; 19: 484-490.
13. Ioannidis O, Lavrentieva A, Botsios D. Nutrition support in acute pancreatitis, *JOP*. 2008; 9: 375-390.

14. Halangk W, Matthias R, Schild L, Meyer F, Schulz HU, Lippert H. Effect of supramaximal cerulein stimulation on mitochondrial energy metabolism in rat pancreas. *Pancreas*. 1998; 16: 88–95.
15. Lüthen RE, Niederau C, Ferrell LD, Grendell JH. Energy metabolism in mouse pancreas in response to different dosages of a CCK analogue, *Pancreas*. 11 (1995) 141–146.
16. Newsholme P, Procopio J, Lima MM, Pithon-Curi TC, Curi R. Glutamine and glutamate — their central role in cell metabolism and function, *Cell Biochem Funct*. 2003; 21: 1–9.
17. Kano-Sueoka T, Errick JE. Effects of phosphoethanolamine and ethanolamine on growth of mammary carcinoma cells in culture, *Exp Cell Res*. 1981; 136: 137–145.
18. Durand S, Estival A, Vieu C, Clemente F, Douste-Blazy L. Lipid content of human and rat pancreas, *Pancreas*. 1987; 2: 326–332.
19. Wang ZH, Ohshio G, Okada N, Imamura T, Tanaka T, Kohmoto M, Yoshida M, Tanaka J, Arii S, Sasaoki T, Funaki N, Imamura M. Effects of cholecystokinin and carbachol on membrane fluidity in pancreatic acini, *Dig Dis Sci*. 1996; 41: 1511–1517.

3月21日～23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

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sakai A, Nishiumi S, Shiomi Y, Kobayashi T, Izumi Y, Kutsumi H, Hayakumo T, Azuma T, Yoshida M. Metabolomic analysis to discover candidate therapeutic agents against acute pancreatitis, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2012; 522: 107–120.

2. 学会発表

- 1) 坂井 文, 吉田 優, 小林 隆, 西海信, 増田充弘, 塩見英之, 有坂好史, 久津見弘, 早雲孝信, 東 健, メタボロミクスを用いた膵炎治療薬の探索, 第99回日本消化器病学会総会, 城山観光ホテル・かごしま県民交流センター, 2013年

急性膵炎の発症における p62 蛋白の役割

研究報告者 大村谷昌樹 熊本大学生命資源研究・支援センター技術開発分野 准教授

【研究要旨】

ユビキチン結合タンパク質 p62 はオートファゴソームマーカーである LC3 に直接結合し、オートファジーにより選択的に分解される基質である。我々は急性膵炎ではオートファジーが誘導されるにもかかわらず、p62の発現が上昇するという矛盾したデータを得ていた。そのため、急性膵炎における p62 の意義を明らかにするため、膵臓特異的 p62 欠損マウスを樹立した。このマウスはほぼ正常で、飢餓刺激を加えてもオートファジーに関わる遺伝子群の発現には差が見られなかった。しかし、膵炎惹起刺激(セルレイン投与)を行った p62 欠損マウス膵臓では、膵炎の重症度(病理スコア、血清アミラーゼ活性、膵内トリプシン活性)には影響を及ぼさないが、オートファジー関連遺伝子の発現が野生型と異なることを見いだした。膵腺房細胞において、p62 がオートファジーの制御及び活性に影響を及ぼしている可能性が示された。

A. 研究目的

細胞には、大別してユビキチン-プロテアソーム系とマクロオートファジー(以降、オートファジー)-リソソーム系の2つのタンパク質分解経路が存在する。オートファジーは、細胞が飢餓状態になると細胞質にあるタンパク質やオルガネラを二重の脂質膜で非選択的に取り囲み(オートファゴソーム)、リソソーム酵素で分解し、再利用するという分解系である。最近になりポリユビキチン化タンパク質もオートファジーにより特異的に分解されていることがわかってきたが、オートファゴソームには基質の選択性がないため、基質に特異的なタンパク質分解を行うためのアダプタータンパク質が必要となる。p62(別名 Sequestosome1/SQSTM1/A170)はオートファゴソームの主要な構成タンパク質である LC3 との結合ドメインをもつため、ポリユビキチン化タンパク質の選択的オートファジーにおける主要なアダプタータンパク質であると考えられている¹⁾。

また、多くの抗酸化タンパク質の遺伝子発現は転写因子 Nrf2 タンパク質によって制御されるが、非ストレス下では、Nrf2はユビキチンリガーゼ Keap1 タンパク質に結合し、プロテアソームにより恒常的に分解されている。異常蓄積した p62 は Keap1 と直接結合することで、Keap1 と Nrf2 の結合が競合的に阻害されて、

Nrf2 は分解されずに安定化され、それに引き続いて抗酸化タンパク質が誘導されることが知られている¹⁾。

このように様々な機能を有する p62 の急性膵炎における役割を明らかにする目的で、膵臓特異的 p62 欠損マウスを樹立して、解析を行った。

B. 研究方法

(倫理面への配慮)

1. 膵臓特異的 p62 欠損マウスの樹立

条件的 p62 欠損マウスと Ptf1a-cre マウスを交配して、p62^{ff};Ptf1a-cre マウスを樹立した。尚、コントロールには p62^{ff} マウスを用いた。すべて生後 2 ヶ月齢のマウスを用いた。

2. セルレイン膵炎モデルの作製

セルレイン 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を 1 回又は 7 回腹腔内投与して、病理学的、血清アミラーゼ活性、トリプシン活性の測定を行った。尚、動物実験に関しては、熊本大学の規則にのっとり、すでに動物実験計画書と遺伝子組換え生物等第二種使用等計画書を提出し、承認を得ている。

平成 24 年度熊本大学動物実験計画の承認番号：C24-265

課題名：Serine protease inhibitor Kazal type 3 (Spink3, 別名 Pancreatic secretory trypsin inhibitor: PSTI)の機能解析

遺伝子組換え生物等第二種使用等計画の承認番号：20-053

課題名：消化器癌(消化管, 肝, 膵等)における炎症と癌に関わるヒト疾患モデルマウスの作製と解析(平成21年2月2日より5年間)

C. 研究結果

1) オートファジー欠損による p62 の変化(図 1)

コントロールマウス(Atg5ff)の膵臓に饑餓刺激を与えると, p62タンパク質の発現レベルが低下した. オートファジー欠損マウス(Atg5ff;Spink3cre)の膵臓では, オートファジー欠損に伴い, p62の蓄積がみられる. 饑餓刺激でも p62の低下はみられない. 我々は急性膵炎ではオートファジーが誘導されることを明らかにしてきたが²⁾, コントロールマウスにセルレインを7回腹腔内に投与した場合, p62の発現が上昇した. またオートファジー欠損マウスにおいても, 同程度に発現上昇がみられた. この結果から, 急性膵炎では異常(過剰)なオートファジーが誘導されるが, その活性はむしろ低下している可能性が示唆された. また, その原因が p62 蓄積によるものと示唆された.

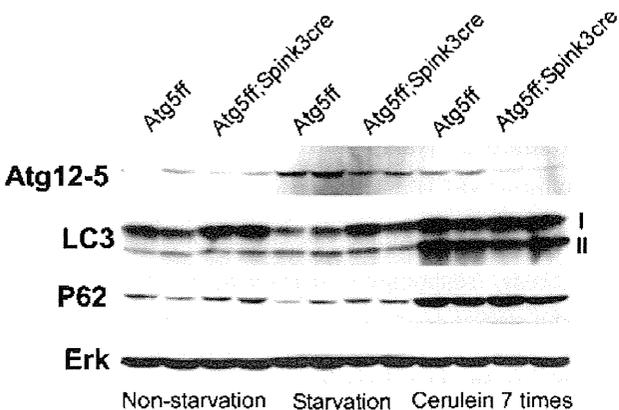


図 1 急性膵炎による p62 の変化

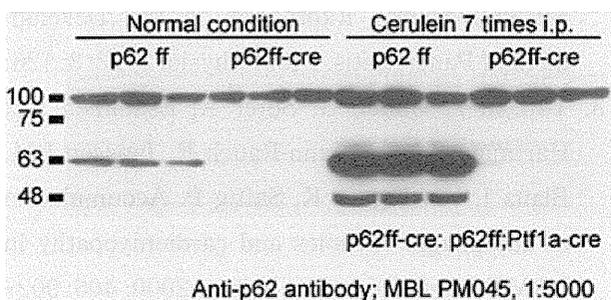


図 2 急性膵炎による p62 の変化

2) 膵臓特異的 p62 欠損マウスの樹立(図 2)

そこで急性膵炎における p62 の役割を明らかにする目的で, 膵臓特異的 p62 欠損マウスを樹立した. このマウスはメンデルの法則に従って生まれ, その後の成長もコントロール(p62ff)に比べ, 差を認めなかった.

このマウスに饑餓刺激を行い, オートファジー関連蛋白の挙動を調べたが, 特に差を認めなかった(data not shown).

3) セルレイン膵炎の重症度(図 3)

2ヶ月齢のマウスにセルレインを腹腔内投与して病理(HE 染色), 血清中のアミラーゼ活性(7回投与), 膵内トリプシン活性(1回投与)を測定したが, 有意差はみられなかった.

4) オートファジー関連タンパク質の異常(図 4)

P62欠損に伴い, オートファジー関連タンパク質のウエスタンブロッティングを行った. 饑餓誘導(通常のオートファジーを誘導)では差がみられなかったが, セルレイン刺激を加えることで, オートファジーの誘導, および分解に関わるタンパク質に変化を生じることが明らかとなった.

D. 考察

p62の欠損に伴い, オートファジーに関連する ULK1 (Atg1), Beclin 1, LC3 の変化が確認された. LAMP-2 は, I 型膜貫通糖タンパクで, リソソーム膜の主要な糖タンパクの一つで

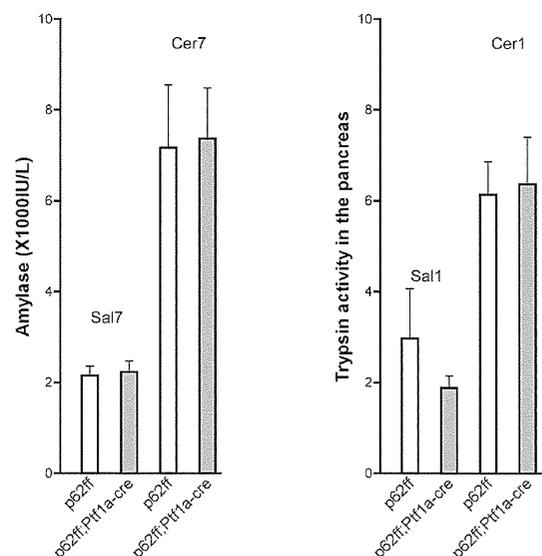


図 3 急性膵炎(セルレイン)の重症度

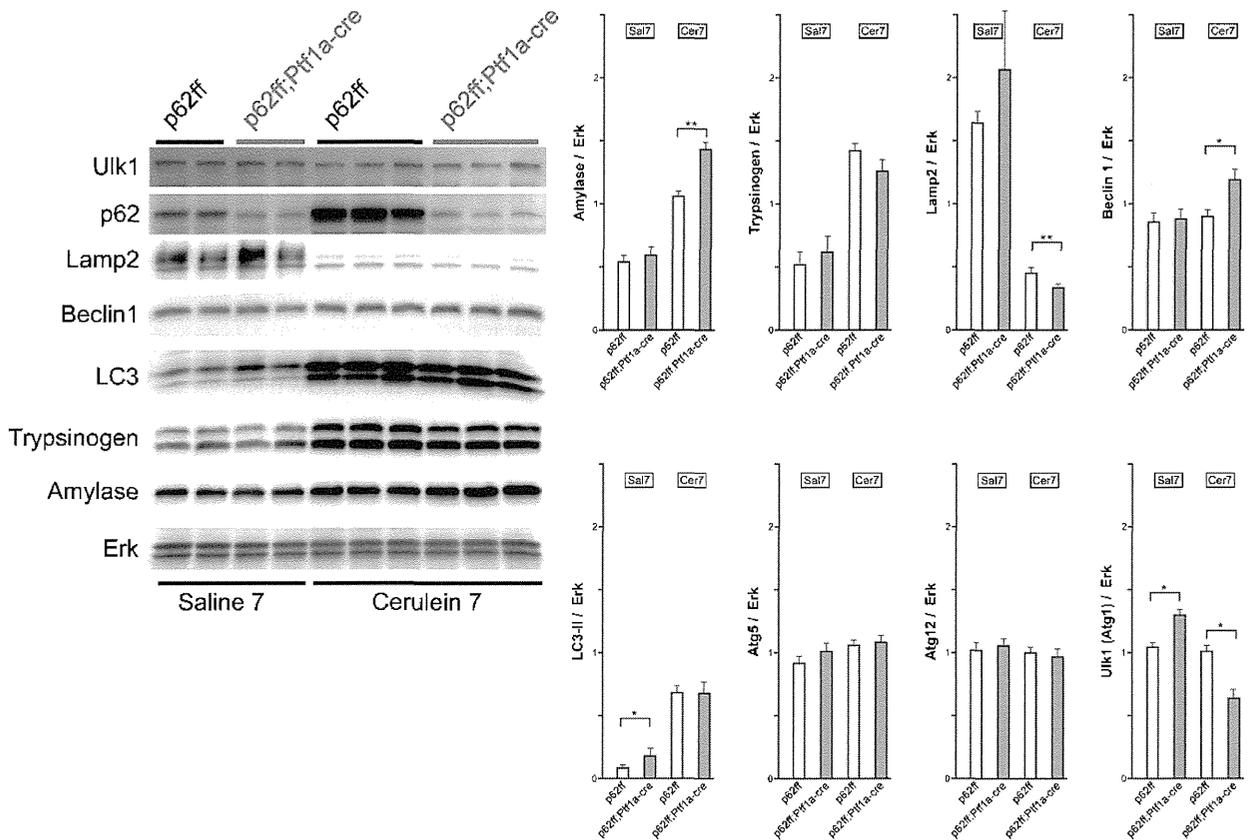


図4 P62欠損に伴うオートファジー関連タンパク質の異常

ある。このノックアウトマウスでは、オートファゴソームとリソソームの融合が上手く行かず、オートファゴソームが蓄積することが知られている³⁾。今回の実験では、トリプシン活性、アミラーゼ活性共に有意な差が見られなかった。しかし、以前、我々が行った実験ではp62欠損マウスでは、これらの値が有意に上昇し、今後さらなる検討が必要と考えられた。

また、急性膵炎モデルもセルレインモデルだけでは不十分であるため、既にコリン欠損エチオニン(CDE)食膵炎の準備が完了し、今後、両モデルにおける重症度、膵内トリプシン活性の測定を行う予定である。

E. 結論

急性膵炎によって誘導されるオートファジーは、その有無にかかわらずp62の発現量が変わらないことから、オートファジー活性の低下がトリプシノーゲンの異所性(膵房細胞内)活性化を引き起こしている可能性がある。またp62の欠損はいくつかのオートファジー関連蛋白の変化を引き起こし、膵炎の発症と重症化に関わ

っている可能性がある。

F. 参考文献

1. Komatsu M, Kurokawa H, Waguri S, Taguchi K, Kobayashi A, Ichimura Y, Sou YS, Ueno I, Sakamoto A, Tong KI, Kim M, Nishito Y, Iemura S, Natsume T, Ueno T, Kominami E, Motohashi H, Tanaka K, Yamamoto M. The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. *Nat Cell Biol* 2010; 12: 213-223.
2. Ohmuraya M, Sugano A, Hirota M, Takaoka Y, Yamamura K. Role of Intrapancreatic SPINK1/Spink3 Expression in the Development of Pancreatitis. *Front Physiol* 2012; 3: 126.
3. Tanaka Y, Guhde G, Suter A, Eskelinen EL, Hartmann D, Lullmann-Rauch R, Janssen PM, Blanz J, von Figura K, Saftig P. Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice. *Nature* 2000; 406: 902-906.

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ohmuraya M, Sugano A, Hirota M, Takaoka Y, Yamamura K. Role of Intrapancreatic SPINK1/Spink3 Expression in the Development of Pancreatitis. *Front Physiol* 2012; 3: 126.
- 2) Piao X, Komazawa-Sakon S, Nishina T, Koike M, Piao JH, Ehlken H, Kurihara H, Hara M, Van Rooijen N, Schutz G, Ohmuraya M, Uchiyama Y, Yagita H, Okumura K, He YW, Nakano H. c-FLIP Maintains Tissue Homeostasis by Preventing Apoptosis and Programmed Necrosis. *Sci Signal* 2012; 5: ra93.

2. 学会発表

- 1) Ohmuraya M, Notohara K, Araki K, Hirota M, Yamamura K. Insufficient Levels of Serine Protease Inhibitor Kazal (SPINK) Produced by Partial Expression of SPINK1 in Spink3 Deficient Pancreas Result in Chronic Pancreatitis. 米国 DDW. San Diego, CA. 平成24年 5月19-22日.
- 2) 大村谷昌樹, 能登原憲司, 廣田昌彦 ヒト *SPINK1* 遺伝子ノックインマウスの樹立と解析 第43回日本膵臓学会大会 山形市 平成24年 6月28-29日.
- 3) Ohmuraya M, Notohara K, Araki K, Baba H, Yamamura K. Chronic pancreatitis triggers factors promoting pancreatic cancer development in genetically engineered mouse model. 第71回日本癌学会大会 札幌市 平成24年 9月19-21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

急性膵炎モデル IRF2KO マウスを用いて、 膵炎発症の分子メカニズムの解明を目指す。

研究報告者 大西洋英 秋田大学大学院医学系研究科消化器内科 教授

共同研究者

真嶋浩聡（秋田大学大学院医学系研究科消化器内科）

【研究要旨】

Irf2^{-/-} マウスの膵臓では調節性外分泌障害が起こり、酵素顆粒が腺房細胞内に充満している。その結果オートファジーの亢進、トリプシンの異所性活性化が生ずる。つまり、このマウスの膵臓は急性膵炎の初期像を模倣するモデルであり、このモデルを利用して、急性膵炎発症の分子メカニズムの解明を目指す。

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- α/β)とII型(IFN- γ)の二つに大別される。I型IFNはウイルス感染時にほとんど全ての細胞種から産生されて抗ウイルス状態を誘導するほか、自然免疫及び獲得免疫に関与するサイトカインである。II型IFNは主に免疫細胞、特にT細胞やNK細胞より産生され、免疫調節性サイトカインとして働く。これらの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))が発見され、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)。

I型IFNの機能を解析するために、1993年 *Irf1*^{-/-}, *Irf2*^{-/-} マウスが作成された¹⁾。*Irf2*^{-/-} マウスでは白血球、血小板が減少し、骨髄で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た^{1,2)}。その他に、生後数週齢からの脱毛、表皮の肥厚をとともう皮膚炎症が認められ、IFN応答性の異常とCD8⁺T細胞に依存した病態であることが明らかにされた³⁾。また、クリーム色でやや光沢がある *Irf2*^{+/+}, *Irf2*^{+/-} マウスの膵臓と比較して、*Irf2*^{-/-} マウスの膵臓は白色で光沢がなく、一見して異常な色調を呈した。我々は、*Irf2*^{-/-}

マウスの膵臓を詳細に検討することにより、その異常が膵調節性外分泌異常(特にSNARE蛋白の変異)に由来すること、このモデルが急性膵炎発症初期の像を模倣することを明らかにした⁴⁾。

IRF2は転写因子であるが故に、SNARE蛋白の転写を直接制御していることが予想されたが、その後検討をすすめてゆくともうそうではないことが分かってきた。そこで、このモデルを利用して、IRF2の直接的な標的の同定、膵炎発症のメカニズムの解明、および新たな治療法の可能性を探ることを本研究の目的とした。

B. 研究方法

1. *Irf2*^{+/-}, *Irf2*^{-/-} 膵におけるSNARE分子の発現(タンパク, mRNAレベル)の比較(ウエスタンブロット, Real-time PCR)。

2. cDNAマイクロアレイを用いた *Irf2*^{+/-}, *Irf2*^{-/-} 膵の遺伝子発現レベルの比較および膵炎関連候補遺伝子群の抽出。

3. 膵腺房細胞株AR42J細胞(IRF2過剰発現, ドミナントネガティブIRF2過剰発現, コントロール)における発現の比較(Real-time PCR)による候補遺伝子の絞り込み。

4. 野生型マウスにおける急性膵炎発症時の発現の変化(Real-time PCR, 免疫組織化学)による候補遺伝子の絞り込み。

これらの動物実験はすべて、秋田大学バイオサ