

学 位 論 文

Doctor's Thesis

論文題名：膵分泌性トリプシン・インヒビター欠損マウスの  
膵腺房細胞におけるオートファジー細胞死  
(Autophagic Cell Death of Pancreatic Acinar Cells in  
Pancreatic Secretory Trypsin Inhibitor Deficient Mice)

著者名：大村谷 昌樹

Masaki Ohmuraya

指導教官名	： 神経発生学担当教授	大久保 博晶
審査委員名	： 消化器内科学担当教授	佐々木 裕
	分子遺伝学担当教授	森 正敬
	小児科学担当教授	遠藤 文夫

2005 年度

## 目次

要旨	1
発表論文リスト	3
謝辞	6
略語一覧	7
第一章 研究の背景と目的	8
1-1. 膵炎とは	
1-2. 膵炎の発症機構 —カテプシン B 説と autoactivation 説—	
1-3. 膵炎の重症化機構	
1-4. 遺伝子変異によって生じる膵炎	
1-5. カチオニックトリプシノーゲンの遺伝子変異による膵炎の発症機構	
1-6. Pancreatic Secretory Trypsin Inhibitor (PSTI) とは	
1-7. <i>PSTI</i> の遺伝子変異を伴う膵炎家系の発見	
1-8. 遺伝学的研究材料としてのマウス	
1-9. マウスでの遺伝学的解析	
1-10. 哺乳動物遺伝学における ES 細胞の意義	
1-11. <i>Psti</i> 欠損マウスの作製の背景と目的	

第二章 実験方法 . . . . . 22

2-1. マウス genomic DNA の抽出

2-2. PCR による genotyping

2-3. Southern blot analysis

2-4. フェージ・ライブラリー・スクリーニング

2-5. RNA 抽出

2-6. Northern blot analysis

2-7. マウス Psti 抗体に対するポリクローナル抗体作製

2-8. Western blot analysis

2-9. Histological and immunohistochemical analysis

2-10. BrdU incorporation analysis

2-11. アポトーシスの検出

2-12. Electron microscopy

2-13. *Psti*<sup>-/-</sup>-GFP-LC3 マウスの樹立と解析

2-14. Trypsin assay

2-15. ES 細胞培養

2-16. エレクトロポレーションによる ES 細胞への DNA の導入

2-17. キメラマウスの作製 —凝集法を用いて—

2-18. マウス・セルレイン急性膵炎モデルの作製

2-19. 血糖値の測定

第三章 Pancreatic Secretory Trypsin Inhibitor 欠損マウスの作製 . . . . . 30

3-1. Genomic Southern blot analysis

3-2. ファージ・ライブラリー・スクリーニング

3-3. Targeting vector の作製

3-4. エレクトロポレーションとキメラマウスの作製

第四章 Pancreatic Secretory Trypsin Inhibitor 欠損マウスの解析 . . . . . 34

4-1. 出生率および生存率

4-2. 表現型の解析

4-3. 電子顕微鏡による解析

4-4. *Psti* ホモ欠損マウスとオートファジー

4-5. 野生型とヘテロ欠損マウスの膵炎刺激による膵障害度の違い

第五章 オートファジー . . . . . 39

5-1. オートファジー (autophagy) とは

5-2. オートファジーの機構

5-3. オートファジーとプログラム細胞死

第六章 考察 . . . . . 41

第七章 結語 . . . . . 44

第八章 参考文献 . . . . . 45

## 要旨

トリプシノーゲン遺伝子の点突然変異により遺伝性膵炎を発症する機構が報告されている。しかし、未だ約半数の遺伝性膵炎の患者の原因遺伝子は明らかにはされていない。膵炎発症の機構の一つとして、膵内のトリプシンインヒビターである膵分泌性トリプシンインヒビター (PSTI) の分子変異により、活性化トリプシンへの結合能が低下する可能性があることから、PSTI 遺伝子の変異によってトリプシン活性の制御ができなくなり、膵炎を発症する機構が想定される。熊本大学消化器外科で診療した孤発性膵炎 30 例および家族性膵炎 25 例の計 55 症例において PSTI 遺伝子の変異検索を行った。その結果、エクソン 3 の 34 番目のアミノ酸に Asn (AAT) から Ser (AGT) への置換を伴う変異 (101A→G: Asn34Ser) と、エクソン 4 の 67 番目のアミノ酸に Arg (CGC) から Cys (TGC) への置換を伴う変異 (199C→T: Arg67Cys) を認めた。さらに個体レベルで、PSTI 機能を調べる目的で、われわれは遺伝子ターゲティング法を用いて *Psti* 欠損マウスを作製し、解析を行った。*Psti* 欠損マウスでは膵腺房細胞 (外分泌細胞) の空胞変性が胎生 16.5 日より始まり、出生後その変性がさらに著しくなった。空胞は autophagosome および autophagosome と lysosome が融合した autolysosome であり、オートファジー (自食作用) が亢進していることが明らかとなった。出生後 3 日には成熟した腺房細胞が消失したが、その細胞死の形態はアポトーシスでもネクローシスでもない、オートファジー細胞死であることが判明した。その後、新たな腺房細胞の再生は見られなかった。したがって *Psti* は膵腺房細胞の integrity の維持と再生に不可欠であることが示された。

## **Abstract**

**Background & aims:** Pancreatic secretory trypsin inhibitor (PSTI), which is structurally similar to epidermal growth factor, is thought to inhibit trypsin activity and to prevent pancreatitis. Point mutations in the *PSTI* gene seem to predispose humans to pancreatitis; however, the clinical significance of *PSTI* mutations remains controversial. This study aimed to elucidate the role of PSTI.

**Methods:** We generated *Psti*-deficient (*Psti*<sup>-/-</sup>) mice by gene targeting in mouse embryonic stem cells. Embryonic and neonatal pancreases were analyzed morphologically and molecularly. Specific probes were used to show the typical autophagy occurring during acinar cell death.

**Results:** In *Psti*<sup>-/-</sup> mice, the pancreas developed normally up to 15.5 days postcoitum (dpc). However, autophagic degeneration of acinar cells but not ductal or islet cells started from 16.5 dpc; with rapid onset of cell death occurring in the pancreas and duodenum within a few days after birth, resulting in death by 14.5 days postpartum (dpp). There was limited inflammatory cell infiltration and no signs of apoptosis. At 7.5 dpp, residual duct-like cells in the tubular complexes strongly expressed pancreatic duodenal homeodomain containing protein 1 (Pdx1), a marker of pancreatic stem cells without any sign of acinar cell regeneration.

**Conclusions:** The progressive disappearance of acinar cells in *Psti*<sup>-/-</sup> mice was due to autophagic cell death and impaired regeneration. Thus, *Psti* has essential roles for maintenance of integrity and regeneration of acinar cells.

## 発表論文リスト

### 主論文

**Masaki Ohmuraya, Masahiko Hirota, Masatake Araki, Noboru Mizushima, Makoto Matsui, Takao Mizumoto, Kyoko Haruna, Shoen Kume, Motohiro Takeya, Michio Ogawa, Kimi Araki, Ken-ichi Yamamura**

**Autophagic Cell Death of Pancreatic Acinar Cells in Serine Protease Inhibitor Kazal Type 3 Deficient Mice. *Gastroenterology* 129(2):696-705, 2005.**

### 参考文献

1. Maeda K, **Ohmuraya M**, (7名中5番目): Pro-inflammatory role of trypsin and protease activated receptor-2 in rat model of acute pancreatitis. *Pancreas* 31(1): 54-62, 2005.
2. Hirota M, **Ohmuraya M**, (4名中3番目) : Significance of trypsin inhibitor gene mutation in the predisposition to pancreatitis. In: Ogawa M, Yamamoto T, Hirota M, eds. *The Biological Response to Planned and Unplanned Injuries: Cellular, Molecular and Genetic Aspects*. Amsterdam: Elsevier B.V., 41-8, 2003.
3. Hirota M, **Ohmuraya M**, (4名中3番目) : From acute to chronic pancreatitis: the role of mutations in the pancreatic secretory trypsin inhibitor gene. *J Pancreas* 4 (2): 83-8, 2003.
4. Hirota M, **Ohmuraya M**, (9名中6番目) : Non-occlusive mesenteric ischemia and its associated intestinal gangrene in acute pancreatitis. *Pancreatology* 3(4):316-22, 2003.
5. **Ohmuraya M**, (筆頭著者、他6名): Generation of pancreatic secretory trypsin inhibitor gene knockout mice. In: Ogawa M, Yamamoto T, Hirota M, eds. *The Biological Response to Planned and Unplanned Injuries: Cellular, Molecular and Genetic Aspects*. Amsterdam: Elsevier B.V., 197-8, 2003.
6. Inoue K, **Ohmuraya M**, (6名中5番目): Endothelin is involved in pancreatic and intestinal ischemia during severe acute pancreatitis. In: Ogawa M, Yamamoto T, Hirota M, eds. *The Biological Response to Planned and Unplanned Injuries: Cellular, Molecular and Genetic Aspects*. Elsevier B.V., 187-91, 2003.



7. Maeda K, Ohmuraya M, (7 名中 6 番目): The effect of TNF- $\alpha$  converting enzyme inhibitors on cytokine response in acute pancreatitis. In: Ogawa M, Yamamoto T, Hirota M, eds. The Biological Response to Planned and Unplanned Injuries: Cellular, Molecular and Genetic Aspects. Amsterdam: Elsevier B.V., 173-5, 2003.
8. Inoue K, Ohmuraya M, (6 名中 5 番目) : Further evidence for endothelin as an important mediator of pancreatic intestinal ischemia in severe acute pancreatitis. *Pancreas* 26 (3): 218-23, 2003.
9. Kimura Y, Ohmuraya M, (7 名中 6 番目) : Dynamic aspects of granulocyte activation in acute pancreatitis. In: Ogawa M, Yamamoto T, Hirota M, eds. The Biological Response to Planned and Unplanned Injuries: Cellular, Molecular and Genetic Aspects. Amsterdam: Elsevier B.V., 177-81, 2003.
10. Kimura Y, Ohmuraya M, (7 名中 6 番目) : Dynamic aspect of granulocyte activation in rat severe acute pancreatitis. *Pancreas* 27 (2): 127-32, 2003.
11. 広田昌彦、大村谷昌樹、(14 名中 2 番目) : 膵炎発症の分子機構 : 膵内トリプシノーゲンの活性化とその制御機構の破綻. *細胞* 37 (8): 6-10, 2005.
12. 大村谷昌樹、(筆頭著者、他 2 名) : 疾患および侵襲に対する生体反応と遺伝子多型. *侵襲と免疫* 13 (2/3): 9-16, 2004.
13. 広田昌彦、大村谷昌樹、(8 名中 3 番目) : 急性膵炎の発症と重症化の予知. *胆と膵* 25 (11): 691-4, 2004.
14. 広田昌彦、大村谷昌樹 (2 名中 2 番目) : 慢性膵炎の発症に関与する遺伝子変異. *胆と膵* 25 (9): 579-86, 2004.
15. 広田昌彦、大村谷昌樹、(11 名中 8 番目) : 急性膵炎におけるサイトカイン動態. *膵臓* 19 (1): 10-22, 2004.
16. 広田昌彦、大村谷昌樹、(6 名中 4 番目) : ショックにおけるメディエーター対策. *侵襲と免疫* 12 (1/2): 23-8, 2003.
17. 井上耕太郎、大村谷昌樹、(6 名中 5 番目) : エンドセリンは重症急性膵炎における腹腔内臓器 (膵・腸管) の微小循環不全発症の重要なメディエーターである. *膵臓* 18: 616-7, 2003.
18. 広田昌彦、大村谷昌樹、(10 名中 7 番目) : 本邦における急性膵炎診療の現況. *胆*

と膝 23 (10): 795-800. 2002.

## 謝辞

熊本大学発生医学研究センター・器官形成部門・臓器形成分野において、熊本大学大学院薬学研究科臓器形成学、山村研一教授、熊本大学大学院医学研究科外科学第二講座、小川道雄教授のご指導の下、本研究を行いました。多くのご指導を頂き、深く感謝いたします。

熊本大学発生医学研究センター・器官形成部門・臓器形成学、荒木喜美助教授、熊本大学大学院医学研究科消化器外科学講座、廣田昌彦助教授、熊本大学生命資源研究・支援センター・バイオ情報分野、荒木正健助教授には日々の実験手法から論文の指導まで幅広いご指導を頂きました。深く感謝いたします。

熊本大学大学院医学研究科細胞病理学講座、竹屋元裕教授には病理組織の標本作製と診断についてご指導いただきました。熊本大学発生医学研究センター・再建医学部門・幹細胞制御分野、糸昭苑教授には免疫染色の診断についてご指導いただきました。財団法人東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所・代謝制御研究部門、水島昇博士にはオートファジーに関する貴重なご意見を頂きました。臓器形成学、実験補助員の中田三千代さんには病理組織検査の技術的なご指導を頂きました。

臓器形成学教室、外科学第二講座の皆様には有形無形の多くのご協力とご指導を頂きました。

最後に本研究を遂行するにあたり熊本大学大学院医学研究科神経発生学、大久保博晶教授にご協力いただきました。

心から感謝いたします。

## 略語一覧

BPTI, basic pancreatic trypsin Inhibitar

BrdU, bromodeoxyuridine

dpc, days postcoitum

dpp, days postpartum

EGF, epidermal growth factor

ES cell, embryonic stem cell

GFP, green fluorescent protein

ICM , inner cell mass

LC3, microtubule-associated protein 1 light chain 3

PCNA, proliferating cell nuclear antigen

Pdx1, pancreatic duodenal homeodomain containing protein 1

PSTI, pancreatic secretory trypsin inhibitor

SIRS , systemic inflammatory response syndrome

SPINK1, serine protease inhibitor Kazal type 1

## 第一章 研究の背景と目的

### 1-1. 膵炎とは

膵臓には消化酵素を大量に合成し、その消化酵素を膵液として分泌する外分泌機能がある。この膵液は、膵管を通り十二指腸へと達する。そのため、膵臓に何らかの原因で炎症が起こったり、消化酵素が膵内で活性化されると、膵臓の自己消化がおこる。このように、膵臓局所に急性の炎症が起きた状態を急性膵炎という。その炎症が膵臓局所にとどまらず、全身に波及すると、多臓器不全などを起こし、死の転帰をたどることもあり、重篤化する危険をはらんだ疾患である。

一方、慢性膵炎は膵臓に炎症を繰り返すことによって、膵構成細胞の脱落、線維化、膵石形成などをきたす疾患である。疼痛、糖尿病、消化吸収障害、膵癌の合併などをきたす。

膵臓の炎症であるから、主に上腹部痛で発症する。主な原因としては、アルコール、胆石、特発性がある。胆石性膵炎は胆道系の炎症の膵臓への波及や胆石による膵管の閉塞が原因と考えられているが、アルコール性膵炎や、特発性膵炎における発生機序はいまだ明らかではない。

急性膵炎では、診断基準（表1）に示されているように、上腹部痛に加え、血中、尿中の膵酵素の上昇、および画像（CTなど）における膵臓の炎症所見（浮腫、壊死など）が認められる。また急性膵炎はその重症度から、軽症、中等症、重症の3つにわけられる。軽症と中等症の死亡率が数%であるのに対し、重症例の死亡率は約30%という予後不良の疾患であるため、重症であるか否かは非常に重要な問題となってくる。それは、炎症が膵臓の周囲組織にとどまっているか、あるいは全身に及んでいるのか、と言い換えることもできる。

ではなぜ、膵臓局所の炎症が全身に及んでいるのか、それは高サイトカイン血症を引

き起こすためといわれているが、その機序については、いまだ研究段階である。また重症化する人と、しない人がいるのかなどの疑問も解決されておらずいまだ未知の分野であり、今回私が膵炎へのなりやすさについて、研究を始めようと考えた理由でもある。

このように、急性膵炎、なかでも重症急性膵炎は非常に重篤な疾患であるが、重症であるかどうかを判定するための、重症度スコアを用いた重症度判定基準、さらに重症の中での予後を反映した Stage 分類と、Stage 別の致死率について、表 2 に示す。

表 1. 急性膵炎の診断基準

- ① 上腹部に急性腹痛発作と圧痛がある。
- ② 血中、尿中あるいは腹水中に酵素の上昇がある。
- ③ 画像で膵に急性膵炎に伴う異常がある。

上記3項目中2項目以上を満たし、他の疾患及び急性腹症を除外したものを急性膵炎とする。ただし慢性膵炎の急性発症は急性膵炎に含める。

表 2. 急性膵炎の重症度判定基準と重症度スコアおよびStage 分類

予後因子①：ショック，呼吸困難，神経症状，重症感染症，出血傾向， $Ht \leq 30\%$ ， $BE \leq -3mEq/l$ ， $BUN \geq 40mg/dl$  (or  $Cr \geq 2.0mg/dl$ )

各2点

予後因子②： $Ca \leq 7.5mg/dl$ ， $FBS \geq 200mg/dl$ ， $PaO_2 \leq 60mmHg$ ， $LDH \geq 700IU/l$ ，総蛋白 $\leq 6.0g/dl$ ，プロトロンビン時間 $\geq 15$ 秒，血小板 $\leq 10$ 万/ $mm^3$ ，CT Grade IV/V

各1点

予後因子③：SIRS診断基準における陽性項目数 $\geq 3$

2点

年齢 $\geq 70$ 歳

1点

上記スコアの合計によりStage 0-4に分類する

Stage	重症度スコア	重症度分類	致死率
Stage 0	0点	軽症	0%
Stage 1	1点	中等症	0%
Stage 2	2~8点	重症 I	11%
Stage 3	9~14点	重症 II	29%
Stage 4	15~27点	最重症	67%

## 1-2. 膵炎の発症機構 —カテプシン B 説と autoactivation 説—

急性膵炎は古くから、膵内においてまず、proenzyme であるトリプシノーゲンがトリプシンに活性化され、そして今度はその活性化トリプシンが他の消化酵素のカスケードを活性化することにより始まる、消化酵素による‘自己消化’とされてきた。そして、消化酵素活性化の場は長い間、膵管内や間質といった‘腺房細胞外’と考えられてきた。しかし、すべての急性膵炎の発症機序を説明することはできなかった<sup>1</sup>。1960年頃より、活性化は‘腺房細胞内’からでもおこりうるという考え方が生まれた。そして、正常では腺房細胞内において容易に活性化されにくい仕組みがある中で、トリプシノーゲンがどのようなメカニズムにより活性化されるかに、強い関心が寄せられた。

1984年頃よりハーバード大学の Steer らのグループは、急性膵炎の発生初期過程を研究するのに最適とされるラットセルレイン膵炎モデル<sup>2</sup>の発生メカニズムを研究し、膵腺房細胞においてトリプシノーゲンはライソゾーム酵素：カテプシン B により活性化されトリプシンになるという説を発表した<sup>3-7</sup>。これは sorting error されたライソゾーム酵素：カテプシン B がトリプシノーゲンと共存することによりそれを活性化し、急性膵炎が始まるとするものである。このカテプシン B 説は、以後 15 年以上にわたり広く受け入れられ、ほぼ絶対的なものと考えられてきた。

しかし、1991年頃よりその説の矛盾点が指摘され始め、トリプシノーゲンは膵腺房細胞内のセリンプロテアーゼ活性と酸性環境のもとで活性化し急性膵炎が始まるといふ autoactivation 説が注目され始めた<sup>8</sup>。現在、膵腺房細胞内におけるトリプシノーゲンの活性化の機序に関してはこのカテプシン B 説と autoactivation 説が最も有力な二大仮説とされているが<sup>9</sup>、いまだに結論は得られてはいない。



表 3. 急性膵炎発生メカニズムに関するカテプシン B 説と autoactivation 説

	トリプシノーゲンを 活性化する因子	pH 環境	カテプシン B の役割
カテプシン B 説	カテプシン B	中性～ アルカリ	トリプシノーゲンを トリプシンに活性化 する
autoactivation 説	low pH セリンプロテアーゼ	酸性	活性化された膵消化 酵素活性を消去する

### 1-3. 膵炎の重症化機構

急性膵炎の重症化機構には、大きく分けて二つある。一つは組織破壊、あるいは感染の結果、産生される炎症性サイトカインによる全身性炎症反応 (Systemic Inflammatory Response Syndrome: SIRS) に伴う遠隔臓器障害を生じる機序であり、もう一つは、膵プロテアーゼによる膵、および膵周囲組織の自己消化の結果、重篤な腹腔内合併症 (仮性動脈瘤、腸管穿孔、腹腔内循環不全 : splanchnic ischemia、感染) を生じる機序である。これらは互いにオーバーラップするところも多い。急性膵炎の重症化機序においては、膵プロテアーゼとサイトカインの二つがキーワードであり、膵プロテアーゼは急性膵炎の発症だけでなく、重症化にも重要な役割を担っている。

### 1-4. 遺伝子変異によって生じる膵炎

膵炎は臨床上、成因別に分類されることが多いが、いろいろな検索にもかかわらず現時点では原因がはっきりしない症例も数多く存在し、これら成因不明の症例を特発性膵炎と区分している。特発性膵炎の中には、疑われる原因は存在するものの、それが明らかな原因としては断定できない症例が含まれることがある。例えばアルコール膵炎として分類されないほどの飲酒量であっても膵炎を発症する場合もあり、その場

合特発性に分類される可能性もあり、明確に特発性膵炎を定義することは難しい場合もある。しかし、できるだけ成因を除外したうえで、特発性と定義する必要がある。

一方、遺伝子変異による膵炎として、最近トリプシノーゲン遺伝子の変異により膵炎を発症する遺伝性膵炎が報告されている。また高脂血症や高カルシウム血症の結果、二次性に膵炎を生じる遺伝性疾患や、膵嚢胞線維症の場合のように、遺伝子変異が膵炎の原因ではあるが、全身疾患の部分症状としての膵炎を生じる場合もある。その他、トリプシノーゲン以外の膵酵素や、膵酵素インヒビターの遺伝子異常による膵炎、あるいは、膵炎に対する感受性、抵抗性を修飾する遺伝子変異も存在すると考えられる。

#### 1-5. カチオニックトリプシノーゲンの遺伝子変異による膵炎の発症機構

遺伝子変異による膵炎として、1996年に遺伝性膵炎家系のマイクロサテライトマーカーを用いた連鎖解析により、遺伝性膵炎の疾患遺伝子が第7染色体長腕（7q35）に存在することが明らかとなった<sup>10,11</sup>。さらにこれとほぼ同時期に、7q35に遺伝子座位があるT細胞レセプターα鎖のゲノムDNA配列（685kb）が報告され、この多重遺伝子ファミリーのクラスターの中に偽遺伝子を含む8つのトリプシノーゲンの遺伝子が含まれることが明らかとなった<sup>12</sup>。この8つのトリプシノーゲン遺伝子のうち、機能をもった蛋白を合成するのは、カチオニックトリプシノーゲン遺伝子、アニオニックトリプシノーゲン遺伝子、メソトリプシノーゲン遺伝子の3つである。そのなかでカチオニックトリプシノーゲンはヒトでは最も高濃度で存在し、活性化されやすく、また分解されにくいという性質がある。

この報告に基づいてWhitcombらは、遺伝性膵炎患者のゲノムDNAよりカチオニックトリプシノーゲンのそれぞれ5つのエクソンの塩基配列を決定し、カチオニックトリプシノーゲンのエクソン3における点突然変異（365G→A；Arg122His）を発見した<sup>13</sup>。さらにWhitcombらは、カチオニックトリプシノーゲンの結晶解析から同遺伝子のエクソン3のArg122His変異によりトリプシンが自己分解に抵抗性を獲得し、持続的なトリプシン活性化を生じるとの膵炎の発生機序に分子レベルでの仮説を提唱した<sup>13</sup>。また、他の遺伝性膵炎家系でカチオニックトリプシノーゲンのエクソン2

における変異（86A→T；Asn29Ile）も発見された<sup>14</sup>。その後も遺伝性膵炎に関する変異として、68A→G（Lys23Arg）、47C→T（Ala16Val）、65A→G（Asp22Gly）、-28delTCCが発見された<sup>14-16</sup>。わが国においてもArg122HisとAsn29Ileの変異を有する遺伝性膵炎家系の存在が認められている<sup>17</sup>。

カチオニックトリプシノーゲン遺伝子の変異に伴う遺伝性膵炎は常染色体優性遺伝で、その浸透率は80%といわれている<sup>18</sup>。トリプシン活性を増強させるメカニズムについては5つの異なる機序があると考えられている。Arg122Hisは、活性化されたトリプシンの不活化に障害があることが証明されている<sup>19-21</sup>。さらにトリプシノーゲンの活性化（autoactivation）の亢進もArg122Hisにより生じていることも明らかにされている。Asp22GlyやLys23Argはactivation peptide cleavage siteの変異で、トリプシノーゲンの活性化が促進されている状態である<sup>16</sup>。Ala16Valはsignal peptide cleavage siteの変異でこれもトリプシノーゲンの活性化の亢進をきたすとされる。また-28delTCCは転写の亢進が原因といわれ、Asn29Ileは高次構造の変化に伴う膵分泌性トリプシンインヒビター（pancreatic secretory trypsin inhibitor：PSTI）との結合能の低下や、酸性域での安定性の上昇がトリプシン活性の上昇の原因と考えられている。すなわち、いずれの遺伝子変異も膵内トリプシン活性の上昇を惹起する、あるいは惹起しうるものである（表4）。

表4. トリプシノーゲンの遺伝子変異によりトリプシン活性が増強する機構

- 1、 トリプシンの不活性化（autolysis）の障害：Arg122HisH
- 2、 トリプシノーゲンの活性化（autoactivation）の亢進：Arg122His、Asn29Ile、Ala16Val、Asp22Gly、Lys23Arg
- 3、 PSTIとの結合能の低下：Asn29Ile
- 4、 トリプシンの酸性域での安定性の上昇：Asn29Ile
- 5、 転写の亢進：-28delTCC

#### 1-6. Pancreatic Secretory Trypsin Inhibitor (PSTI) とは

膵臓には2つのトリプシン・インヒビターが存在する。塩基性膵トリプシン・インヒビター (basic pancreatic trypsin Inhibitar ; BPTI) と、膵分泌性トリプシン・インヒビター (pancreatic secretory trypsin inhibitor ; PSTI) である。

BPTI はウシやヒツジなどの反芻動物の膵臓の他、肺臓、耳下腺、肝臓、脾臓、リンパ腺などの各種臓器に分布している。最初に Kunitz と Northrop によりウシ膵臓から単離され<sup>22</sup>、Kassell らによって一次構造が決定された<sup>23</sup>。

一方、PSTI は1948年 Kazal らがウシ膵臓 8165 kg から分離、精製、結晶化した酸性トリプシン・インヒビターである<sup>24</sup>。哺乳動物の膵液中に分泌されるインヒビターであるため膵分泌性トリプシン・インヒビター(PSTI)と呼ばれている。PSTI はセリンプロテアーゼインヒビター Kazal タイプ1 (serine protease inhibitor Kazal type I : SPINK1) ともよばれることも多い。Greene らによりその一次構造が決定され<sup>25</sup>、1987年に堀井らは、ヒト膵臓細胞より PSTI の cDNA をクローニングし、これによりヒト PSTI をコードするエクソン領域が明らかとなった<sup>26</sup>。PSTI は23個のシグナルペプチドを有する79個のアミノ酸からなる蛋白である。PSTI は膵臓内で活性化したトリプシンを阻害することにより、トリプシンによって引き起こされる様々な酵素前駆体の連鎖的活性化を抑え、膵臓を自己消化から守る役割を負っていると考えられている。

膵液中に分泌される PSTI の生理作用は、膵管内で少量のトリプシノーゲンの活性化がおこった場合、直ちにこのトリプシンと結合し、連鎖反動的な膵内における膵酵素の活性化を防ぎ、膵臓を自己消化から護ることにある。PSTI のトリプシン阻害作用は一時的であり、トリプシンと PSTI を混合しておく、一度消失していたトリプシン活性が時間とともに再び出現してくる。これは PSTI が酵素消化をうけて失活したことによるもので、蛋白分解酵素が腸内で消化酵素として作用する本来の目的とかなっていると考えられてきた。

トリプシンをはじめとする膵プロテアーゼは、膵内においてはトリプシノーゲンなどの不活性型としてチモーゲン顆粒内に区画されているため、膵内においては通常、自己消化は起きない。しかし十二指腸液や胆汁の逆流など何らかの原因によって、膵内においてトリプシノーゲンがトリプシンに活性化されると、膵の自己消化から膵炎

が惹起されると考えられる。

活性化されるトリプシンの量が総トリプシノーゲン量の 1/5 までであれば、即座に PSTI が結合することによって、トリプシンは不活性化され、膵臓は自己消化から守られる。しかし、膵内においてトリプシン活性量が多かったり、PSTI トリプシン結合能が低下していると、膵炎を惹起しやすい状況が起こりうることが想定される。このように、トリプシンと PSTI は矛と盾のような関係にある (図 1)。

### 1-7. PSTI の遺伝子変異を伴う膵炎家系の発見

PSTI は膵臓内で活性化したトリプシンを阻害することにより、トリプシンにより引き起こされるさまざまな酵素前駆体の連鎖的活性化を抑え、膵臓を自己消化から守る役割を負っていると考えられている。それゆえ膵炎発症の制御に重要な因子であるといえる。つまりトリプシンの異常のみではなく、PSTI に異常があって活性型トリプシンに PSTI が結合できず、膵炎を発症するという仮説が考えられる。

そこで熊本大学外科学第二講座において孤発性膵炎 30 例および家族性膵炎 25 例の計 55 症例において PSTI 遺伝子の変異検索を行った<sup>27</sup>。その結果、エクソン 3 の 34 番目のアミノ酸に Asn (AAT) から Ser (AGT) への置換を伴う変異 (101A→G: Asn34Ser)と、エクソン 4 の 67 番目のアミノ酸に Arg (CGC) から Cys (TGC) への置換を伴う変異 (199C→T: Arg67Cys) を認めた。Asn34Ser は、イントロン 1 に IVS1-37T→C、イントロン 3 に IVS3-69insTTTT 変異 (T5 が T9 となる) を必ず伴っていた。この Asn34Ser 変異とイントロン領域の 2 つの領域は、他国からの報告<sup>28</sup>でも必ず共存していた。

Asn34Ser と Arg67Cys による膵炎発症については次のような機序が考えられる。まず Asn34Ser 変異についてであるが、site-directed mutagenesis により作製したリコンビナント蛋白を用いた *in vitro* の実験では、トリプシンの阻害活性に低下を認めなかった<sup>29</sup>。しかし、Asn34Ser 変異は、前述のようにイントロンの変異を伴っており、単純なアミノ酸置換の影響だけではなく、スプライシングの異常、つまりイントロンの切

り出しに変化を与えることによって PSTI タンパク質の機能喪失をきたす可能性がある。一方、Arg67Cys についてであるが、成熟型 PSTI は 3 つの分子内ジスルフィド結合 (C32-C61, C39-C58, C47-C79) を有する。これらの 6 つのシステイン残基をはじめとして、PSTI のアミノ酸は種を超えて高度に保存されている。Arg67Cys 変異では新たに生じたシステイン残基によって PSTI の高次構造が大きくかわり、トリプシンとの結合力が低下することが十分に予想される<sup>30</sup>。ウシのトリプシン・インヒビターである basic pancreatic trypsin inhibitor (BPTI) は、アプロチニンという薬品名で知られているが、PSTI と同様の分子量で同じく 3 つの分子内ジスルフィド結合を有する。BPTI では、必ず同じジスルフィド結合のペアが形成されるわけではないことや、変異があるとトリプシン制御活性が落ちること、が報告されており<sup>31</sup>、PSTI でも十分に同様の現象が起こり得ると考えられる。

以上のように Asn34Ser および Arg67Cys の両者とも PSTI の活性を低下させる可能性がある。PSTI の遺伝子変異は PSTI タンパク質の loss of function によってトリプシン活性制御に異常をきたし、膵炎が発症しやすい状況を生じるといえる。

カチオニックトリプシノーゲンの遺伝子変異は優性遺伝形式で膵炎が発症する。一方、PSTI の Asn34Ser 変異においては、これまでの文献報告をまとめると、ホモ接合体において発症率が高く (49/50 : 98%)、劣性遺伝形式での発症と思われる<sup>30</sup>。この他、Witt ら<sup>28</sup> は 2T→C 変異を膵炎家系に報告しているが、この変異は start codon を消失させ、PSTI 分子の欠失につながる。本家系は dominant trait で膵炎を発症しており、PSTI 遺伝子が一アレル分全く発現されない、すなわち PSTI 活性が 1/2 以下になれば、膵炎の発症率が高くなることを意味する。PSTI の遺伝子変異の種類による発症率の差は、遺伝子変異によりどれほど PSTI 活性が低下するかにかかっていると いえる。

#### 1-8. 遺伝学的研究材料としてのマウス

あるものの働きを知るために、そのものをなくす、余分につけ加える、別の場所に移し換えてみる、ほかのものに入れ替えてみる、あるいは部分的に修飾してみるとい

うのは実験生物学が古来伝統としてきたところである。遺伝学的アプローチにおいては、ある生物学的現象を理解するために遺伝的に変わったもの・変異体を単離する。DNAが遺伝子の実体であることに始まる遺伝の基本的な仕組みの解明が、ファージ、大腸菌を材料として、変異体を用いての解析によっていたことはいうまでもない。多細胞体に特徴的な現象への研究の展開においても遺伝学的アプローチの有効性は、とりわけショウジョウバエでの発生における形づくりに関わる研究成果にいかんなく示されている。現在、多細胞生物体において遺伝学的アプローチの材料として活躍しているのは、ショウジョウバエでありネマトーダ（線虫, *C. elegans*）である。しかし進化の系統樹において、両者の体制は哺乳動物と大きく異なる。

哺乳動物における近年の研究の発展は手技としての遺伝子工学とともに、材料として培養細胞に負ってきた。培養細胞系が今後とも有力な研究材料であることに変わりはないが、個体におけるその本来の機能を解明しようとするとき、培養細胞レベルでできることには自ずと限りがある。ヒトを中心とする哺乳動物での個体レベルでの諸現象に興味を持つとき、脊椎動物とりわけ哺乳動物での遺伝学的研究材料として、おそらく将来に渡ってマウスにまさる実験材料はないと考えられる。

### 1-9. マウスでの遺伝学的解析

マウスでの実験遺伝学は、受精卵への DNA 注入によるトランスジェニックマウスの作製によって初めて道が拓かれたといっても過言ではない<sup>32</sup>。1980年のことである。これは核に注入された DNA の染色体への組み込みが 100 に 1 程度の頻度でおこることによる。しかしこの方法には

①調べることは基本的に過剰発現による効果である。

②どのようなプロモーターあるいはエンハンサーを用いるにせよ、導入した遺伝子の発現は無作為な組み込み部位の影響を受け、実際どのような発現が起こっているかは、作製したトランスジェニックマウスについてそれぞれ調べてみるまでわからない。

③現在トランスジーンが発現に、性格づけされたプロモーター・エンハンサーのバラ

エティーは限られたものでしかない。

などの問題点がある。あるものの働きを知るには、余分に付け加えること以外に無くしてやることによって知見が得られる。しかし遺伝子の発現あるいは機能をなくすことは、受精卵への DNA 注入によるトランスジェニックマウスによっては、ごく例外的な場合を除いて一般的にはできない。

マウスでの遺伝学の悲願は約 3 万個と推定される遺伝子の中で 1 個の遺伝子（あるいは遺伝子の一部の領域）に狙いをすまして特異的に変異を導入することであった。このための方法として唯一考えられるのは、特異的に変異させた遺伝子 DNA（あるいはその一部）を導入し、相同組換えにより内在する遺伝子と置き換えることである。しかし酵母などと異なり哺乳動物（胚）細胞では、導入した遺伝子の大部分は染色体上に無作為（非相同的）に組み込まれ、相同組換えの起こる確率は非相同組換えの千分の 1 程度の頻度にすぎない。従って相同組換え体を得るには  $10^6$  個程度の細胞を対象としなければならず、受精卵など胚を対象としては不可能なことである。

#### 1-10. 哺乳動物遺伝学における ES 細胞の意義

受精後マウス胚は分割し、3 日後には 16 割球となるが、これまでの期間 1 個 1 個の割球は独立し顕微鏡下で明瞭に区別することができる。その後外側を占める割球間に強い細胞接着が起こり（コンパクション）、1 個 1 個の割球の区別が明瞭でない桑実胚となり、割球間で内側・外側の区別ができる。その後 1 日経ったマウス 4 日胚は栄養外胚葉と呼ばれる将来胎盤形成にあずかる外側の一層の細胞と、内部細胞塊（inner cell mass: ICM）と呼ばれる、内側の細胞よりなる。マウスの体を構成するすべての細胞はこの ICM の一部に由来し、従って ICM は全ての細胞に分化する能力を有する未分化細胞である。

1981 年イギリスケンブリッジの Martin Evans ら<sup>33</sup>によって、4 日胚より直接 ICM と同等と考えられる胚性幹細胞（embryonic stem cell: ES 細胞）を培養できること、また 1984 年同グループの Bradley, Robertson ら<sup>34</sup>により、培養された ES 細胞を宿主 4



日胚に再注入し仮親の子宮で発生生育させると、宿主胚の ICM 由来の細胞と注入した ES 細胞由来の細胞より体の各組織が構成されるキメラマウスが得られ、何より、注入した ES 細胞はキメラマウスで生殖細胞にも分化し、その子で ES 細胞由来の遺伝的背景を持つマウスの得られることが報告された。このことは培養された ES 細胞 1 個 1 個はマウス 1 匹 1 匹と等価で、マウス個体を扱う代わりに ES 細胞として培養系の世界でマウスを遺伝的に取り扱えることを意味する。培養下で変異させた ES 細胞からキメラマウスをたて ES 細胞由来の子孫マウスを得ることにより、変異マウスを作製することが可能となった。

#### 1-10. *Psti* 欠損マウスの作製の背景と目的

以上をまとめると

- (1) 本来、消化管内で活性化されるべき消化酵素であるトリプシノーゲンが、膵内で活性化されることが膵炎発症の引き金である。
- (2) PSTI は、内因性のトリプシン・インヒビターで、accidental に膵内で生成したトリプシン活性を制御している蛋白である。
- (3) トリプシン遺伝子の point mutation によって膵炎を発症する家系が存在する (遺伝性膵炎)。この場合における膵炎発症の機構の一つに、PSTI との結合性の低下があげられている。

遺伝性膵炎のうち、約 50%の家系ではトリプシン遺伝子に mutation を認めない為、その他の遺伝子異常で膵炎を発症する、あるいは発症しやすい形質となる機構が予想される。つまり *PSTI* 遺伝子の異常により膵炎を発症する、あるいは発症しやすい形質となることが考えられる。熊本大学消化器外科からの報告<sup>27</sup>を含めて、他施設からもほぼ同時期に *PSTI* の点突然変異と遺伝性膵炎の関係が報告された<sup>28, 35, 36</sup>。しかし、この意見には反論も多く、まだ *PSTI* 遺伝子の異常により膵炎を発症するという結論は得られていない<sup>37-41</sup>。

そこで私は PSTI と遺伝性膵炎の関係を明らかにする目的で、*Psti* 欠損マウスの作製を開始した。実際に PSTI のトリプシン阻害活性をなくした状態で

①膵炎を自然発症するか

②膵炎惹起刺激に対して、膵炎を生じ易いか

③膵炎を生じた場合その重症度はどうか

を検索することにした。それにより、PSTI の膵炎制御機構における重要性、および *PSTI* に遺伝子変異が存在する家系の膵炎発症機構が明らかに出来ると考えた。

## 第2章 実験材料と方法

遺伝子targeting法を用いた*Psti* 欠損マウスを作製するにあたり、さまざまな遺伝子工学的手法とES細胞培養法を用いたため、その方法の要約を以下に示す。なお本実験に際しては、実験計画を提出し、承認を得てから実行した（平成16年度熊本大学動物実験計画の承認番号：16-082、課題名：膵分泌性トリプシンインヒビター（*PSTI*) 遺伝子欠損マウスの解析および平成15年度熊本大学組換えDNA実験計画の承認：整理番号35番、課題名：可変型ノックアウトベクターの開発）。また、動物実験を行うにあたってはHelsinki宣言、及びNIH animal care guidelineの記載事項を順守した。

### 2-1. マウス genomic DNA の抽出

マウスの尻尾を1 cm 程寸断し、はさみで小さな断片とした。細胞溶解液 0.6 ml、10% SDS 80  $\mu$ l、proteinase K 20 mg/ml stock) 2  $\mu$ l を加え 55°C で3時間インキュベートした。組織が完全に溶解した後、等量のフェノール・クロロホルムを加え、攪拌した。15,000 rpm、5分遠心後、上層をとり、等量のイソプロパノールを加え攪拌し、DNA を沈殿させた。15,000 rpm、1分遠心し、上清を捨て、沈殿した genomic DNA を70% エタノールでリンスし、乾燥させた。100  $\mu$ l TE に溶解し、4°C で保存した。

試薬類の組成を以下に示す。

細胞溶解液：1×SSC、1 mM EDTA、20 mM Tris HCl (pH 7.5)

### 2-2. PCR による genotyping

Targeting vector の neo cassette 内、および *Psti* のエクソン1およびイントロン1に設定したプライマーを用いて PCR を行うことにより、genotyping を行った。

**neo cassette (544 bp targeted)**

neo-F: 5' -agaggctattcggctatgac- 3'

neo-R: 5' -caccatgatattcggcaagc- 3'

***Psti* exon 1- intron 1 (292 bp wild)**

mPsti-1: 5' -agttcttctggctttgcaccc- 3'

mPsti-24: 5' -ctttgccaccacatcccaaatg- 3'

PCR 反応条件 : 94°C 5 分 → (94°C 30 秒、56°C 30 秒、72°C 30 秒) ×30 サイクル → 72°C  
10 分

### 2-3. Southern blot analysis

6 µg の genomic DNA を制限酵素で消化し、0.8% アガロースゲルで、電気泳動し、変性液を用いてナイロンメンブレン (Roche, Basel, Switzerland) に転写した。プローブは DNA フラグメントを digoxigenin (DIG) DNA labeling and detection Kit (Roche) を用いて DIG ラベルした。転写が完了したメンブレンは 2×SSC で洗浄し、80°C で baking した後、HB 液中で 65°C 1 時間プレハイブリダイゼーションを行い、次にプローブを加えた HB 中で 65°C over night (O/N) ハイブリダイゼーションさせた。65°C で wash1 液 10 分 2 回、wash2 液で 10 分 5 回、室温で HB1 液 10 分 2 回洗浄し、HB2 液でブロッキングした後、アルカリフォスファターゼ標識抗 DIG 抗体 (Roche) を用いて室温 30 分抗体反応を行った。次に HB1/0.3% tween20 で 10 分 4 回、HB3 液で 5 分洗浄し、アルカリフォスファターゼの発光基質である Disodium 3-(4-methoxyphosphoryloxy-1,2-dioxetane-3,2-(5-chloro) tricyclo [3.3.1.1<sup>3</sup>,7] decan}-4-yl)phenyl phosphate (CSPD, Roche) と 5 分反応させ、X 線フィルムを感光してシグナルを検出した。

試薬類の組成を以下に示す。

変性液 : 10N NaOH 40 ml, 5 N NaCl 120 ml, 水で 1l に調整

HB 液: 20×SSC 100 ml, 10% SDS 5 ml, N-lauroylsarcosine 0.4 g, blocking reagent 2 g,  
水で 1l に調整

wash 1 液： 20×SSC 50 ml, 10% SDS 5 ml, 水 445 ml

wash 2 液： 20×SSC 5 ml, 10% SDS 5 ml, 水 490 ml

HB1 液： 1 M Tris HCl (pH 7.3) 50 ml, 5M NaCl 15 ml, 水 435 ml

HB2 液： blocking reagent 5 g, HB1 液 500 ml

HB3 液： 1 M Tris HCl (pH 9.5) 5 ml, 5 M NaCl 1 ml, 1 M MgCl<sub>2</sub> 2.5 ml, 水 41.5 ml

#### 2-4. ファージライブラリースクリーニング

C57BL/6 マウスゲノム DNA ライブラリーは熊本大学医学部遺伝発生研究施設形態形成部門、相沢慎一教授（現在、神戸理化学研究所）より提供していただいた。ファージ-SM 液と宿主大腸菌 K802 を混合し、37°C 15 分保温した。50°C で保存しておいた NZY トップアガロースとよく混ぜ、あらかじめ作製し、37°C で保温しておいた NZY プレートに均一に拡げた。39°C 10 時間保温し、溶菌したファージプレートにメンブレン（Roche）を載せ、転写させた。あとは Southern blot analysis と同じ方法でハイブリダイゼーションを行い、ポジティブと思われるシグナルの周辺半径 3mm くらいをつつき、SM 中に懸濁し、二次スクリーニングおよび三次スクリーニングを行った。ポジティブクローンはプレートライセート法 (QIAGEN lambda midi kit, QIAGEN, Hilden, Germany) で DNA の調製を行った。

試薬の組成を以下に示す。

SM 液： 50 mM Tris HCl (pH7.5)、100 mM NaCl、10 mM MgSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O、0.01% ゼラチン

NZY 培地： 1% NZ amine, 0.5% Yeast Extract, 0.5% NaCl

#### 2-5. RNA 抽出

マウスの臓器からの total RNA の抽出はすべて sepaSol (Nacalai Tesque, Kyoto) を用いて行った。サンプルに sepaSol を加えポリトロンホモジナイザーで細胞を破壊した。0.2 倍量のクロロホルムを加えて激しく振盪後、4℃ 15 分遠心し、上層を注意深く取った。等量のプロパノールを加え攪拌し沈殿させた。遠心後上清を捨て沈殿した RNA を 70% エタノールでリンスし、風乾した。500 µl Tris-EDTA (TE) に溶解し、-80℃で保存した。

## 2-6. Northern blot analysis

全 Psti cDNA 配列を含むプラスミドを NcoI 制限酵素で線状化して、これを鋳型にし、DIG RNA Labeling Kit (Roche) を用いて、DIG 標識 RNA プローブを合成した。

10 µg の total RNA を 1% アガロースゲルで電気泳動し、10×SSC を用いてナイロンメンブレン (Roche) に転写した。転写が完了したメンブレンは 80℃で 2 時間 baking をした後、68℃ 1 時間プレハイブリダイゼーションを行い、次に 68℃ O/N でハイブリダイゼーションさせた。2×SSC, 1% SDS で 10 分 2 回、0.1% SSC, 0.1% SDS で 15 分、2 回 wash し、buffer 1 に 1 分浸し、buffer 2 に入れ 60 分ブロッキングを行った後、アルカリフォスファターゼ標識抗 DIG 抗体 (Roche) を用いて室温で 30 分抗体反応を行った。次に buffer 1/0.3% tween20 で 15 分 2 回、buffer2 液で 5 分洗浄し、アルカリフォスファターゼの発光基質である CSPD と 5 分反応させ、X 線フィルムを感光してシグナルを検出した。

試薬類の組成を以下に示す。

buffer 1 : マレイン酸 11.6 g, NaCl 8.77 g, NaOH にて pH 7.5 に調整し、水で 1l に調整

buffer 2 : 1M Tris HCl (pH9.5) 5 ml, 5M NaCl 1 ml, 1M MgCl<sub>2</sub> 2.5 ml, 水 41.5 ml

## 2-7. マウス Psti 蛋白に対するポリクローナル抗体作製

マウス Psti 蛋白に対するポリクローナル抗体は市販されていなかったため、ペプチドの合成より行った。

マウス Psti : MKVAVIFLLS ALALLSLAGN TFSAKVTGKE ASCHDAVAGC  
PRIYDPVCGT DGITYANECV LCFENRKRIE PVLIRKGGPC (80 アミノ酸)

(参考: ヒト PSTI : MKVTGIFLLS ALALLSLSGN TGADSLGREA KCYNELNGCT  
KIYDPVCGTD GNTYPNECVL CFENRKRQTS ILIQKSGPC (79 アミノ酸) でマウス Psti  
との相同性は 60%)

C 末側 NRKRIE PVLIRKGGPC (65~80 アミノ酸) のペプチドを合成した後、ウサギに接種し抗 Psti 抗体を作製した。

## 2-8. Western blot analysis

膵臓をlysate bufferに入れ、氷中でホモジナイズした。15,000 rpm、5分遠心し、上清を取り、蛋白濃度をBradford法 (BioRad Protein Assay, BioRad) で測定した。

Extract (20µg protein/lane) は20% (Psti 検出) および16% (microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) 検出) のポリアクリルアミドゲルにアプライし、定電流20mA、90分で泳動した。泳動後、ゲルをポリビリニデンジフルオライドメンブレン (Immobilon polyvinylidene difluoride filter, Millipore, MA) にセミドライ法で転写した。室温で1時間ブロッキング (5%skim milk-PBS) を行い、抗Psti抗体: 500倍希釈、抗LC3抗体: 2000倍希釈で反応させた。二次抗体として抗rabbit IgG抗体conjugated with horseradish peroxidase (Amersham Biosciences Corp., NJ) で30分反応させ、ECL plus Western Blotting Detection system (Amersham) と5分反応させ、X線フィルムを感光してシグナルを検出した。

LC3-II/LC3-I定量分析はDensitograph soft ware library version 4 (ATTO, Tokyo, Japan) で行った。

試薬の組成を以下に示す。

lysate buffer: HEPES 50 mM, pH 7.4, NaCl 150 mM, TritonX-100 0.1%, glycerol 10%, NaF 1 mM, Na orthovanadate 2 mM, EDTA 1 mM, protease inhibitor cocktail (1:100 dilution, Sigma-Aldrich Corp.)

## 2-9. Histological and immunohistochemical analysis

組織は 10% formalin で O/N 固定し、パラフィン包埋を行った。組織切片を作製し、hematoxylin-eosin (HE) 染色で観察した。免疫組織学的染色は一次抗体に以下の抗体を用いた。

rabbit anti-insulin antibody (diluted 1:200, Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA)

rabbit anti-glucagon antibody (DAKO, CA)

goat anti-amylase antibody (diluted 1:200, Santa Cruz Biotechnology, Inc.)

rabbit anti-pancreatic duodenal homeodomain containing protein 1 (Pdx1) antibody (diluted 1:500, CHEMICON International, Inc., CA)

monoclonal anti-proliferating cell nuclear antigen (PCNA) antibody (diluted 1:500, Novocastra Laboratories Ltd, UK).

これら一次抗体はマウス抗原と cross reactivity があることを確認した。これら一次抗体の検出には biotin-streptavidin system (Vector Laboratories, CA) を用いた。

## 2-10. BrdU incorporation analysis

膵臓の tubular complex 上皮細胞の細胞分裂活性をみるため、マウス腹腔内に thymidine analogue である bromodeoxyuridine (BrdU) (Sigma-Aldrich Corp.) を1回 (100 mg/kg body weight) 投与して、その24時間後に膵臓を摘出した。パラフィン包埋をおよび切片を作製し、抗BrdU抗体 (monoclonal anti-BrdU antibody, diluted 1:20, DAKO) で免疫染色を行った。

## 2-11. アポトーシスの検出

Terminal transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) assay でアポトーシスの検出を行った。in situ apoptosis detection kit (Wako, Osaka, Japan) を用いた。



## 2-12. Electron microscopy

膵組織は2.5% glutaraldehydeで固定した。固定したサンプルはepoxy resinにて包埋した。超薄切切片を作製し、uranyl acetateで染色を行った。H-7500 electron microscope (Hitachi, Tokyo) で観察を行った。

## 2-13. *Psti*<sup>-/-</sup>-GFP-LC3 マウスの樹立と解析

出生後0.5日の*Psti*<sup>-/-</sup>-green fluorescent protein (GFP)-LC3 マウスの膵臓を摘出、固定、切片とし、GFP-蛍光の観察を行った。IX81 fluorescence microscope (Olympus, Tokyo) および ORCA ER CCD camera (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu) を使用した。

## 2-14. Trypsin assay

膵臓腺房細胞内トリプシン活性はトリプシン特異的基質 benzoyl-L-arginine *p*-nitroanilideを膵臓ホモジネート液と反応させ、410 nmの吸光度を測定することにより定量した。測定値は膵ホモジネートのDNA濃度で補正した。

## 2-15. ES細胞培養

ES細胞は熊本大学医学部遺伝発生研究施設形態形成部門、相沢慎一教授らにより樹立されたTT2細胞株を用いた<sup>42</sup>。ネオマイシン耐性マウス線維芽細胞はmouse embryonic fibroblast (MEF) 培地でコンフルエントに培養した後、100 mg/mlマイトマイシンCで3時間処理し、ゼラチンコートディッシュに播種し、ES細胞用フィーダー細胞とした。

## 2-16. エレクトロポレーションによるES細胞へのDNAの導入

エレクトロポレーションはすべてBio-Rad Gene Pulser setを用いて行った。導入するDNA (線状化したtargeting vector 100 μg) とES細胞 (5×10<sup>6</sup>個) を0.8 mlのPBSに懸濁し、エレクトロポレーション用キュベットに加え、エレクトロポレーションした。エレクトロポレーションの条件は電圧0.8kVolts、capacitance 3.0 μFaradで行った。エレクトロポレーション後48時間で200 mg/mlネオマイシンによるselectionを開始し、7日間継続した。ネオマイシン耐性コロニーをピックアップし48穴ディッシュに播種、培養し、凍結保存した。これらクローンES細胞の一部からgenomic DNAを抽出した。

### 2-17. キメラマウスの作製—凝集法を用いて—

過排卵させたICRメスマウスをICRオスマウスと交配させて0.5日胚 (2 cell stage) を得た。O/Nで培養後、桑実胚 (morula) の透明体除去後、ES細胞を凝集させ、1日間*in vitro*で培養し、胚盤胞 (blastocyst) となったものを、偽妊娠状態のICRメスマウスの子宮に戻しキメラマウスを作製した。得られたキメラマウスの中でTT2 ES細胞の寄与率が高いものを毛色から判断し、C57BL/6と交配した。得られたF1マウスの遺伝子型を解析しヘテロマウスを同定した。

### 2-18. マウス・セルレイン急性膵炎モデルの作製

生後6~7週の雄 (22~24 g) の*Psti* 野生型マウスと*Psti* ヘテロ欠損マウスを、実験前日夜より絶食とした。1時間毎にセルレイン 50 mg/kg body weight i.p.を行い、最終投与の1時間後に採血、膵臓摘出を行った。

### 2-19. 血糖値の測定

GLUCOCARD™ (Arkray, Inc., Kyoto) を用いた

### 第3章 Pancreatic Secretory Trypsin Inhibitor 欠損マウスの作製

#### 3-1. Genomic Southern blot analysis

Targeting vector を作製するために、PstI 遺伝子周辺のゲノム DNA をファージ・ライブラリーより得ることとした。そのためにはファージ・ライブラリーをスクリーニングのためのプローブが必要となる。研究を始めた当初、ヒト及びラットの PSTI については cDNA 配列とイントロン-エクソン境界部位はすでに明らかとなっていたため、それを参考にしてマウス PSTI cDNA 配列よりエクソン-イントロン構造を推定した (図2)。

```

      10      20      30      40      50      60
GCACCCTGTATAGTTCTTCTGGCTTTTGCACCCAGATCTTCGACAATGAAGGTGGCTGTC
                                     開始コドン
                                     インtron1挿入部位
      70      80      90      100     110     120
ATCTTTCTTCTCAGTGCTTTGGCCCTGCTGAGTTTAGCAG | GTAACACTTTTTCAGCTAAG

      インtron2挿入部位
      130     140     150     160     170     180
GTGACTGGAAAAGAG | GCTAGTTGCCATGATGCAGTGCGGGATGTCCCAGAATTTATGAT

      190     200     210     220     230     240
CCTGTGTGTGGGACTGACGGAATTACTTTATGCCAATGAATGTGTTCTGTGCTTTGAAAAC

      インtron3挿入部位
      250     260     270     280     290     300
AG | GAAACGCATAGAGCCTGTCCTCATTTCGAAAAGGTGGGCCTTGCTTGAAAAGTCAAGATTT
                                     終止コドン

      310     320     330     340     350     360
TGAACTCTGTTATGGCTACCGTAATGTTTGGCAAGTGGGTTTCGTTGAATAAATGCATCTG

      370
AACAT
```

## 図 2. マウス *Psti* エクソン-イントロン構造

推定したエクソン (1-4) にイントロン 1-3 を挟むようにセンスおよびアンチセンス・プライマー (mPsti-1-6) を設定し、C57BL/6 マウス腎臓由来ゲノム DNA を鋳型として PCR を行った。

### イントロン 1

mPsti-1: 5'-agttcttctggcttttcacccc-3'

mPsti-2: 5'-ctcttttccagtcaccttagct -3'

### イントロン 2

mPsti-3: 5'- agctaaggttgactggaaaagag-3'

mPsti-4: 5'- gacatcccgccactgcatcat-3'

### イントロン 3

mPsti-5: 5'- tgtgtgggactgacggaattc -3'

mPsti-6: 5'-aggacaggctctatgcgtttc-3'

PCR 反応条件 : 96°C 5 分 → (96°C 20 秒、55°C 10 分) ×30 サイクル → 55°C 7 分

その結果イントロン 1 の PCR で 3 本のバンド (約 2 kb, 1 kb and 0.8 kb) のバンドが見られ、イントロン 2 および 3 では (当初) バンドが見られなかった。そのため、イントロン 1 の PCR で得られた PCR 産物を鋳型として新たにエクソン内に作製したプライマーを用いて nested PCR を行った。

mPsti-7: 5'-aaaggatccagatcttcgacaatgaagg -3'

mPsti-8: 5'-aaagaattccagtcaccttagctgaaa -3'

なお mPsti-7 には BamHI を、mPsti-8 には EcoRI のアダプター配列を加えた。

PCR 反応条件 : 96°C 5 分 → (96°C 20 秒、55°C 10 分) ×30 サイクル → 55°C 7 分

その結果約 2 kb の単一バンドが得られた。この単一のバンドをゲルより切り出して、EcoRI および BamHI で切って確認すると、BamHI で切った際に、約 0.8 kb と 1.2 kb のバンドに切断されるが、EcoRI では 2 kb の単一バンドであることがわかった。つまりこの fragment 内に少なくとも 1 つの BamHI のサイトがあることが判明した。そのため、この fragment を 0.8 kb と 1.2 kb の 2 本に分けて、プラスミドベクターに挿入した。

この fragment がイントロン 1 であることを確認するため、T3 および T7 プライマーでシーケンスを行った。0.8 kb の fragment はエクソン 1 の配列と一致し、イントロン 1 の上流であることが、確認できた。しかしでは 1.2 kb の fragment はエクソン配列と一致しなかった。これは後で判ったことだが、イントロン 1 の下流、エクソン 2 より 30 bp 上流に BamHI のサイトが存在していたため、エクソン 2 がすべて欠けた状態でプラスミドベクターに挿入したためであった。

イントロン 1 の上流と確認できた 0.8 kb の fragment を元に digoxigenin (Dig) DNA labeling and detection Kit (Roche, Basel, Switzerland) を用いてプローブを作製し、genomic Southern blotting を行った。EcoRI, BamHI および PstI で C57BL/6 ゲノム DNA を切断した場合約 6 kb, 3 kb および 4 kb の単一のバンドが認められ、ファージライブラリースクリーニングに必要なプローブを得ることが出来た。

### 3-2. ファージ・ライブラリー・スクリーニング

イントロン 1 の上流の 0.8 kb を鋳型にして作製したプローブを用いてファージ・ライブラリーよりスクリーニングを行い、1 個のクローンを得ることができた。プレートライセート法で DNA の調製を行い、制限酵素 XbaI で insert を 4 つの fragment に分けてプラスミドベクターにサブクローニングした。解析の結果、ファージ DNA はイントロン 1 より 5'側のみしかカバーしていなかったため、イントロン 2 と 3 は PCR

法によりクローニングした (イントロン2は約 1.5 kb で、イントロン3は約 4 kb であることを確認した)。これまでの実験により targeting vector の作製に必要な全領域を得ることができた。

### 3-3. Targeting vector の作製

得られた各 fragment の制限酵素地図の作成を行い、エクソン1の開始コドン (atg) の直前にある Bgl II のサイトに *lox71*-PGK promoter-neomycin resistant gene (neo)-*lox2272* を挿入し、2.2 kb left arm、8 kb の right arm、よって相同領域は計 10.2 kb の targeting vector を作製した (図 3)。また濃縮効率を高める目的でジフテリア毒素 A フラグメント (DT-A) 遺伝子-polyA を付加した。すなわち、ランダムにこの相同組換えベクターが挿入された ES 細胞クローンは、DT-A が発現し、その細胞は死ぬことが期待される。一方、相同組換えクローンは、DT-A は除去されるので、このようなクローンだけを濃縮することができる。Targeting vector の構造を図 3 に示す。さらに targeting vector の外側 (5'側) に、相同組み換え体を検出するためのスクリーニング用のプローブ (5'-probe) を作製した。

### 3-4. エレクトロポレーションとキメラマウスの作製

Targeting vector 100 µg を NotI で線状化し、TT2 ( $6 \times 10^7$  個) にエレクトロポレーション法で導入した。ポレーション後は 10cm dish 5 枚に播種した。48 時間後より G418 selection (200 µg/ml) を開始した。G418 selection 後 7 日目に 355 個のコロニーを pick up し、48 well dish より培養を開始した。これらのクローンを、5'-probe を用いた Southern blot analysis により解析した結果、3 クローンの相同組み換え体を得ることができた (図 4)。

この 3 クローンの ES 細胞を用いて 8 細胞期胚との aggregation 法によりキメラマウスを作製したが、この 3 クローンのすべてで germ line transmission を確認した。

## 第4章 Pancreatic Secretory Trypsin Inhibitor 欠損マウスの解析

### 4-1. 出生率および生存率

*Psti* ヘテロ欠損マウスは *Psti* mRNA および蛋白質の発現が野生型に比較して約半分に減っているにもかかわらず (図 5)、肉眼的および病理学的に差を認めず、妊娠および出産が可能であった。

*Psti* ヘテロマウス同士の交配により、*Psti* ホモ欠損マウスを得ることができた。*Psti* ホモ欠損マウスでは Northern blotting および Western blotting 解析でも発現が見られなかった (図 5)。胎生 18.5 日 (出産前日)、出生直後 (0.5 日)、出生 3 週間後の遺伝子型 (表 5) は PCR 法を用いて、尻尾より抽出した DNA を用いて行った (図 6)。

	<i>Psti</i> <sup>+/+</sup>	<i>Psti</i> <sup>+/-</sup>	<i>Psti</i> <sup>-/-</sup>
胎生 18.5 日	13	44	21
出生後 0.5 日	33	72	36
出生後 3 週	56	155	0

表 5. 胎生 18.5 日 (出産予定の 12 時間前)、出生後 0.5 日、出生 3 週間後の遺伝子型

出生前、および出生直後は野生型、ヘテロ欠損マウスおよび *Psti* ホモ欠損マウスの比はメンデルの法則に従った。つまり、*Psti* が欠損しても、胚性致死とはならないことが示された。しかし、出生 3 週間後には、*Psti* ホモ欠損マウスは存在しないことが判った。つまり、胚性致死とはならないが、出生後 3 週以内にすべて死亡してしまうことが判明した。

肉眼的に出生直前および、出生直後には *Psti* ホモ欠損マウスはほぼ正常で、ミルクの哺乳も正常に可能であった。しかしその後の成長障害が著しく、出生後 2.5 日では体重が有意に少なかった。その後も体重の増加がほとんど見られなかった (図 7)。

生存曲線は出生後 2.5 日で 60%の *Psti* ホモ欠損マウスが死亡（図 8）し、最長で 14.5 日であった（図 9）。

成長障害の原因を調べる目的で、解剖を行った。胎生 18.5 日では *Psti* ホモ欠損マウスは野生型と比べ差が見られなかった（図 10 上段）。しかし 出生後 3.5 日では、膵臓が著しく萎縮し、脾臓も萎縮が見られた（図 10 下段）。また十二指腸、小腸は拡張し、食物（ミルク）が停滞し、貯留しているようであった。異常が見られた臓器は膵臓、十二指腸、小腸、脾臓であったため、それぞれの臓器の病理学的検討を行った。

#### 4.2. 表現型の解析

胎生 15.5 日の膵臓は分枝した管状構造が見られ、まだチモーゲン顆粒を含む外分泌細胞は形成されていない。これは *Psti* 欠損マウスでも差が見られなかった。胎生 16.5 日になると、野生型及びホモ欠損マウスにも腺房細胞が明瞭に認められる。胎生期の膵臓外分泌細胞の発生には *Psti* は関与していない（図 11A）。しかし、*Psti* ホモ欠損マウスの膵腺房細胞ではすでに空胞変性（vacuolization）を認めた。この結果より、空胞変性はチモーゲン顆粒の出現とほぼ同時に始まることが示唆された。胎生 18.5 日では *Psti* ホモ欠損マウスにおいて、この膵腺房細胞に見られる空胞変性がさらに著しくなった（図 11B）。さらに出生後 0.5 日では、腺房細胞の変性がさらに著しくなり（図 11C）、出生後 1.5 日では tubular complexes（管状様構造の集合体）が形成され、通常の状態の腺房細胞は全くなくなってしまった（図 11D）。

出生後 3.5 日では正常な腺房細胞は完全に消失し、抗アミラーゼ抗体陽性細胞はわずかに認められるのみであった（図 11J）。同じ日齢までのランゲルハンス氏島（islets）は形態的にほぼ正常で、インスリンおよびグルカゴンに対する免疫染色でも野生型と差を認めなかった（図 11G-J）。

出生後 7.5 日では、tubular complex のままで、これは胎生 15.5 日の発生途中の膵臓とよく似ていた（図 11F）。興味深いことに炎症細胞の浸潤はわずかにしか見られず、新たな腺房細胞の形成は見られなかった。腺房細胞の空胞変性は野生型およびヘテロ欠損マウスでは見られなかった（図 11A-F）。この結果より、*Psti* が欠損することで膵腺房細胞に特異的に変性が起こり、出生後 2-3 日ですべての腺房細胞が消失してしまう



ことが判明した。

出生後 7.5 日の膵臓では、新たに形成された腺房細胞は見られなかった。この組織を抗 pancreatic duodenal homeodomain containing protein 1 (Pdx1) 抗体で免疫染色を行った。これは膵幹細胞のマーカーとされている<sup>43</sup>。この tubular complex の上皮細胞は強く Pdx1 抗原を発現しており、膵臓未分化細胞である可能性が示唆された (図 11L)。しかし抗 proliferating cell nuclear antigen (PCNA) 抗体染色で染色される細胞は見られず (図 11L)、bromodeoxyuridine (BrdU) の取り込みもみられなかった (data not shown)。したがって、*Psti* ホモ欠損マウスの膵臓では、出生後一度脱落した膵腺房細胞の再生が見られないことが確認された。

脾臓も出生前にはほぼ正常の大きさであったが、出生後著しく萎縮した (図 10)。しかし、病理組織学的には野生型と差を認めなかった。

十二指腸および小腸も出生前にはほぼ正常で、絨毛の形態も差が見られないが、出生後 3.5 日になると、管腔径が著しく拡張し、HE 染色で見ると平滑筋は薄く伸展され、絨毛の破壊が著しかった (図 12)。この変化も *Psti* の欠損に伴う変化と考えられた。また出生後 0.5~2.5 日までの各遺伝子型の newborn の血糖値には有意な差が見られなかった (data not shown)。

*Psti* 欠損マウスの成長障害および死因は膵臓外分泌機能不全による消化不良と、十二指腸小腸の絨毛の崩壊による吸収不全によるものと考えられた。膵臓外分泌細胞の発生が完全に欠失する p48 欠損マウスが出生後まもなく死亡するという報告<sup>44</sup>とも矛盾しないと考えられた。

膵臓の外分泌細胞が変性し、脱落する過程で、terminal deoxynucleotidyl transferase UTP nick end labeling (TUNEL) assayにより apoptosisの検出を試みたが、アポトーシス細胞は認められなかった (図13)。

#### 4-3. 電子顕微鏡による解析

走査型電子顕微鏡を用いて膵臓腺房細胞の観察を行った。胎生18.5日の膵臓外分泌細胞ではzymogen granuleが細胞質内に充満し、野生型とこの点では差が見られない。しかしこの時点ですでに多くの空胞が観察された (図14A)。

出生後0.5日ではこの空胞が著しく増加し (図14B)、それらいくつかは細胞内小器官 (cellular organelles) を含んでいた (図14C)。以上の結果よりこれら空胞の小体

はオートファジーに伴う空胞 (autophagic vacuoles) であることが示唆された。細胞質内の変性が著しいのに対し、核の変化は乏しく、apoptotic body formationも観察されなかった (図14D)。また全ての腺房細胞では細胞膜がきれいに保たれており、壊死 (ネクロシス) とは明らかに異なる所見であった。内分泌細胞 (図14E、arrowhead) と膵管上皮細胞 (図14E、F、arrow) は正常であった。

出生後1.5日では腺房細胞数は減少し、またサイズは著しく小さく (図14F)、残存した腺房細胞の細胞質には様々な形態の空胞が細胞質を占拠し、核を圧迫していた。この結果細胞死に至ったと考えられた (図14G)。ある腺房細胞では巨大な空胞が、すでに消化された細胞内小器官を含んでいた (図14H)。最終的に変性し死に至った細胞はマクロファージに呑食された (図14I)。電顕を用いた形態学的な観察より *Psti* ホモ欠損マウスの膵臓腺房細胞がいつせいに細胞死を起し脱落するのはネクロシスでもアポトーシスでもない細胞死が原因であることが示された。核の変化以前に多数のオートファジー空胞が細胞質を占拠し、細胞死にいたる経路は、主要な生理的細胞死の一形態であるオートファジー細胞死 (autophagic cell death、type II cell deathとも呼ばれる) である可能性が示唆された。

#### 4-4. *Psti* ホモ欠損マウスとオートファジー

この空胞が本当にオートファジーに由来した空胞であるのかを調べるため microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) の発現を調べた。この LC3 は autophagosome 関連蛋白である<sup>45</sup>。LC3 蛋白には2タイプ、LC3-I と LC3-II が存在する。細胞質型 (cytosolic) LC3-I 蛋白 (18 kDa) は LC3-II (16 kDa) に変換され、autophagosome の膜 (内側および外側) に結合する。つまり LC3-II の (LC3-I に対する) 相対的な量が autophagosome 形成の程度と関連する。図 15 では *Psti* ホモ欠損マウスの膵臓が野生型およびヘテロ欠損マウスと比較して、LC3-II の量が多いことが判った (LC3-II/LC3-I 比は 野生型 0.56 (SD = 0.24) に対し *Psti* ホモ欠損マウス 2.23 (SD = 0.10))。つまり LC3-II の相対的な上昇は *Psti* ホモ欠損マウスの膵臓においてオートファジーが亢進していることを示している。この LC3-II が相対的に上昇する現象はセルレイン膵炎マウスの膵臓と同様であった (LC3-II/LC3-I はコントロールマウス 0.70 (SD=0.46) に対し、セルレイン膵炎マウス 2.06 (SD = 0.57)) (図 15)。

さらに我々は、green fluorescent protein (GFP)-LC3 マウスと *Psti* ホモ欠損マウスの

交配を行った。この GFP-LC3 マウスは GFP 蛍光を検出することで LC3 の発現と局在を同時にモニターできるマウスである<sup>46</sup>。出生後 0.5 日の *Psti* 野生型-GFP-LC3 マウスではわずかに蛍光が細胞質において認められるのみであるのに対し、*Psti* ホモ欠損-GFP-LC3 マウスにおいては細胞質に著しい蛍光が観察され、しかも一部は ring-like 構造を示し、GFP-LC3 蛋白が autophagosome の膜に結合していることを示唆していた (図 16)。GFP-LC3 の蛍光が電顕の結果に比べて少ない理由は autophagosome が lysosome と融合して、autolysosome になる過程で、LC3 が分解されてしまうため、と考えられた。

これらの結果より *Psti* 欠損マウスの膵腺房細胞では異常は autophagosome の形成が引き起こされ、その結果オートファジー細胞死が引き起こされることが示唆された。血清アミラーゼ値は出生後 0.5 日の *Psti* ホモ欠損マウスでは、セルレイン膵炎マウスとほぼ同じ値まで上昇していた (図 17)。この結果は細胞死が起きる過程で、膜の破壊が起こり、アミラーゼを含む細胞内構成成分が一部放出されたためと考えられた。

ではなぜ *Psti* ホモ欠損マウスの膵腺房細胞ではオートファジーが誘導されるのか？ PSTII は膵腺房細胞内でも accidental に活性化されたトリプシンの活性を制御していることが予想されるため、*Psti* が欠損することによりトリプシン活性が制御できなくなり、それに伴ってオートファジーが誘導され、オートファジー細胞死が引き起こされる可能性がある。そこで *Psti* ホモ欠損マウス膵ホモジネートのトリプシン活性を測定した。膵臓ホモジネートのトリプシン活性は図 18 のごとく各遺伝子型で差を認めなかった。

#### 4-5. 野生型とヘテロ欠損マウスの膵炎刺激による膵障害度の違い

野生型と *Psti* ヘテロ欠損マウスのセルレイン膵炎に対する血清アミラーゼ活性を比較した (図 19)。野生型マウスにセルレイン 3、6 および 9 回腹腔内投与を行った際のアミラーゼ活性は 14,080、17,860 および 33,800 IU/l ( $n=5$ ) であった。これに対して *Psti* ヘテロ欠損マウスでは 12,000、20,500 および 33,620 IU/l ( $n=5$ ) であり、野生型と *Psti* ヘテロ欠損マウスとの間には差が見られなかった。つまり *Psti* 活性が 50% 残っていればセルレイン刺激による急性膵炎では膵障害度に差がないことが判明した。

## 第五章 オートファジー

### 5-1. オートファジー (autophagy) とは

オートファジー (autophagy) は、細胞が持っている、細胞内のタンパク質を分解するための仕組みの一つであり自食 (じしょく) とも呼ばれる。酵母からヒトにいたるまでの真核生物に見られる機構であり、細胞内での異常なタンパク質の蓄積を防いだり、過剰にタンパク質合成したときや栄養環境が悪化したときにタンパク質のリサイクルを行ったり、細胞質内に侵入した病原微生物を排除することで生体の恒常性維持に関与している。このほか、個体発生の過程でのプログラム細胞死や、ハンチントン舞踏病などの疾患の発生、細胞のがん化抑制にも関与することが知られている。

細胞は、タンパク質を新たに作り出す機構だけでなく、作ったタンパク質が不要になった場合に分解する機構も持っている。この機構をタンパク質分解と呼ぶが、これにはユビキチン-プロテアソーム系 とオートファジーの二つの主要な機構が存在する。ユビキチン-プロテアソーム系では、分解するべきタンパク質の一つ一つに、ユビキチン分子が複数結合することでプロテアソームにより認識されて分解されるというかたちで個々のタンパク質ごとの分解が行われるのに対し、オートファジーでは、一度に多くのタンパク質が分解される。このためオートファジーによるタンパク質分解のことは バルク分解とも呼ばれる。

### 5-2. オートファジーの機構

細胞がある種のストレス (アミノ酸飢餓の状態や、異常タンパク質の蓄積) に晒されると、細胞質中の一部で、過剰に作られたタンパク質や異常タンパク質と共にリン脂質が集まり、autophagosome または autophagic vesicle と呼ばれる細胞内構造の形成がはじまる。集積したリン脂質は脂質二重膜を形成し、さらにそれが成長していくことで、細胞質成分やオルガネラなどを二重のリン脂質の膜で取り囲んだ小胞が形成される。この小胞形成には、Atg タンパク質と呼ばれる一群のタンパク質が関与している。autophagosome が形成されると、次に autophagosome と細胞内の lysosome が膜

融合を起こす。こうして lysosome と融合したものを autolysosome と呼ぶ。autolysosome の内部で、autophagosome に由来する分解すべきタンパク質と、lysosome に由来するさまざまなタンパク分解酵素が反応し、この結果、autophagosome に取り込まれていたタンパク質はアミノ酸やペプチドに分解される。

### 5-3. オートファジーとプログラム細胞死

ヒトを含む高等生物の個体発生の過程では、いちど分裂によって生じた細胞が自発的に死んでいくことでさまざまな形態形成が進む。このときに見られる細胞死は、その生物が遺伝情報にあらかじめ含んでいる、すなわちプログラムされていた、という意味からプログラム細胞死 (programmed cell death) と呼ばれる。このプログラム細胞死は、そのときの細胞形態上の違いから、3 型に分類されている (表 6) が、特にこの中でも 1 型のアポトーシスおよび 2 型のオートファジーを伴う細胞死が主要な経路とされている<sup>47-49</sup>。オートファジーを伴う細胞死は、この 2 型プログラム細胞死である。オートファジーに関連する遺伝子の働きを抑制すると個体発生の過程で異常が起こることが明らかになっており、オートファジーを伴うプログラム細胞死が生物の発生過程において重要であることが判っている。

## 第六章 考察

当初我々は、PSTIは活性化されたトリプシンと結合し、膵臓に含まれる消化酵素の活性化を抑制していると考えており、*Psti*が欠損するとトリプシン活性を不活性化できず、その結果活性化された他の消化酵素とともに膵腺房細胞の自己消化を引き起こすと考えていた。しかしながら、*Psti* ホモ欠損マウスの膵腺房細胞では、胎生16.5日からautophagyによると思われる空胞変性が始まり、その変性が次第に激しくなり、出生後わずか2~3日の間に、しかも一斉に細胞死が引き起こされ、その後の再生が抑制されることが判明した。また十二指腸および小腸絨毛も脱落し、その結果出生後14日以内にすべて死亡してしまうことも判明した。つまり*Psti*活性は周産期の膵腺房細胞のintegrityの維持に不可欠であり、しかも再生にも関与していることを示唆することができた。

*Psti* ホモ欠損マウスは出生後14日以内に死亡してしまう。しかも出生後3.5日までに約半数が死亡してしまうが、その期間では血糖値に異常は見られない。したがって、*Psti* ホモ欠損マウスの死因は、膵臓外分泌系の障害が主であって、内分泌には異常がないことが伺える。また十二指腸および小腸の絨毛の消失によって起こる吸収障害も死因と考えられた。

膵臓腺房細胞の脱落のメカニズムとしては、ネクローシス、アポトーシスおよびオートファジー細胞死 autophagic cell deathのいずれかが関与していると推測できる(表6)。急性膵炎では活性化されたトリプシンによって、ネクローシスが観察される。ネクローシスの特徴は初期の細胞とその細胞内小器官の膨張 (swelling) であり、細胞膜の崩壊である。*Psti* ホモ欠損マウスでは腺房細胞およびその細胞内小器官のswellingは全く観察されなかった。また細胞膜の構造は保たれ、ネクローシスで見られる細胞内容物の撒き散らしは見られなかった。アポトーシスは生理的細胞死に区別され、正常構造の細胞膜内で、種々のproteaseやnucleaseによって遂行される。特徴は核の変化が顕著で、DNAの分解が細胞質の変化に先立って行われる。*Psti* ホモ欠損マウスではアポトーシス小体の形成は見られず、またTUNEL染色でも陰性であった。*Psti* ホモ欠損マウスの膵腺房細胞でみられた特徴的所見は多数の空胞であり、この空胞はオートファジーに由来したものであることを証明した。過度なautophagosomeが出生後急激に形成され、それを抑制できず、その結果、腺房細胞死に陥ったと考えら

れた。*Psti* ホモ欠損マウスで見られる膵腺房細胞死はネクローシスやアポトーシスではない、生理的細胞死の主要な一つであるオートファジー細胞死であった。

オートファジーはいくつかのステップを介する動的なものであり、autophagosome が細胞質や細胞内小器官を膜で取り囲んで lysosome と融合し、autolysosome を形成する。autolysosome 内で、内容物は分解され、また新たな細胞構成成分として再利用される。オートファジーは細胞質の内容物を分解、および飢餓に対する反応として誘導されるが、誤って合成された蛋白が細胞質内に蓄積するのを分解することで防いでいるとも考えられている。さらに細胞のホメオスタシスの維持にも重要で、細胞分化、組織の再構築、成長のコントロール、細胞の防御や環境への適応にも関与しているとされている。実際に autophagosome の形成に必須である *Atg5* 欠損マウスは正常に生まれてはくるものの、生後1日以内に死亡してしまう<sup>50</sup>。オートファジー細胞死は生理的細胞死の一つとされ、アポトーシスとは対照的にカスパーゼに依存しないとされている<sup>51</sup>。

*Psti* ホモ欠損マウスの作製により典型的なオートファジーが膵腺房細胞死の過程でおきていることがオートファジー特異的プローブを用いて証明された。ではなぜ *Psti* ホモ欠損マウスの膵腺房細胞でオートファジーが誘導されるのか？まだはっきりとした結論は出ていないが、二つのことが考えられる。まず一つは腺房細胞にとって細胞障害性のある消化酵素の活性化を autophagosome が包み込んで処理しようとする、つまり細胞自身を守るためにオートファジーが誘導される、という考えである。*Psti* ホモ欠損マウスでは腺房細胞内でのトリプシンの活性化が引き起こされ、トリプシンあるいはそれに伴って活性化された他の消化酵素によってオートファジーが誘導される。現時点での解析では、TAP も検出されず、free trypsin 活性も、野生型マウスとほぼ等しいので、トリプシンが活性化されているというデータは出ていない。しかし、この検出法で、野生型の free trypsin 活性もやや高い傾向を示し、正確の測定できていないとの可能性もある。そこで、別の方法で再検討中である。もう一つの考えは *Psti* が膵腺房細胞で autophagosome を制御している、という考えである。*Psti* が欠損することによって、autophagosome が無秩序に形成され、細胞死に至るというものである。*Psti* ホモ欠損マウスにおいて、本来 PSTI を大量に含有する肝細胞には過剰なオートファジーは見られなかった。

*Psti* ホモ欠損マウスの膵臓では出生後いっせいに腺房細胞が脱落したあとで、新た

な腺房細胞の形成が見られなかった。急性および慢性膵炎後の変化また嚢胞性線維症や膵臓癌において、tubular complexが見られる<sup>52</sup>。これは、膵腺房細胞が一斉に脱落した後に形成されるもので、このcomplexの上皮細胞から、新たな膵腺房細胞が形成されると考えられている。実験的に作製したラット急性膵炎モデルでも、tubular complexが形成され、その上皮細胞はPdx1抗原陽性で細胞分裂活性もあり、この上皮細胞から新たな腺房細胞が再生することが示唆されている<sup>53</sup>。Pstiホモ欠損マウスでは、tubular complexにPdx1強陽性細胞が存在したにもかかわらず、細胞分裂は見られず、腺房細胞の再生も観察されなかった。PSTIは構造がEpidermal Growth Factor (EGF)とよく似ており<sup>54</sup>、またEGFレセプター欠損マウスでも膵上皮細胞の増殖が抑制されることが示されている<sup>55</sup>。さらにPSTIは、in vitroの実験において、さまざまな細胞の増殖活性を有することも知られている<sup>56,57</sup>。以上よりPsti活性は膵臓外分泌細胞のintegrityの維持に不可欠であるばかりでなく、膵腺房細胞の再生における重要な因子であることが示唆される。

PSTIは膵腺房細胞だけでなく、食道から大腸にいたる消化管の上皮に強く発現が認められる。PSTIがトランスフォームされていない消化管上皮細胞を増殖させる<sup>58</sup>、胃粘膜の炎症や萎縮<sup>59</sup>および炎症性腸疾患<sup>60</sup>ではPSTIの発現が低下している、粘膜上皮の再生部位ではPSTIが過剰に発現する<sup>61</sup>、ヒト小腸粘膜におけるPSTIの産生と分泌は粘膜の防御システムとして機能している<sup>62</sup>などの報告があり、消化管粘膜の増殖や、構造保持、修復に関する報告がある。Psti欠損マウスの主に十二指腸、小腸で見られた表現型もこれら過去の報告を裏付けるものと考えられる。

近年オートファジーあるいはオートファジー細胞死が、Danon病<sup>63</sup>における筋の変性、Parkinson病における神経変性<sup>64</sup>、Huntington病<sup>65</sup>やAlzheimer病<sup>66</sup>における神経細胞の脱落などに関係していることが証明されてきた。これまでは、主に骨格筋や神経の変性疾患の報告であった。しかし、Pstiホモ欠損マウスより得られた結果と、PSTI遺伝子の点突然変異と遺伝性膵炎の関係が報告されていることをあわせて考えると、膵炎がトリプシンの活性化によるのではなく、オートファジーによる細胞死によって引き起こされるという新しい仮説を提唱することができるものと思われる。



## 第七章 結語

今回 *Psti* 欠損マウスを樹立したことにより、新たな知見がいくつか得ることができた。しかし未解明な部分もまだ多く（たとえばヒト PSTI の点突然変異と遺伝性膵炎との関係、オートファジーと膵炎との関係、等）、今後さらなる研究が必要である。

## 第八章 参考文献

1. 大谷泰一, プロテアーゼインヒビター—急性膵炎発症メカニズムとその作用部位・機序—. 消化器科 1994;19:478-486.
2. Lampel M, Kern HF. Acute interstitial pancreatitis in the rat induced by excessive doses of a pancreatic secretagogue. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* 1977;373:97-117.
3. Steer ML, Meldolesi J, Figarella C, Pancreatitis. The role of lysosomes. *Dig Dis Sci* 1984;29:934-938.
4. Saluja A, Hashimoto S, Saluja M, Powers RE, Meldolesi J, Steer ML, Subcellular redistribution of lysosomal enzymes during caerulein-induced pancreatitis. *Am J Physiol* 1987;253:G508-G516.
5. Steer ML, Meldolesi J, The cell biology of experimental pancreatitis. *N Engl J Med* 1987;316:144-150.
6. Hirano T, Saluja A, Ramarao P, Lerch MM, Saluja M, Steer ML, Apical secretion of lysosomal enzymes in rabbit pancreas occurs via a secretagogue regulated pathway and is increased after pancreatic duct obstruction. *J Clin Invest* 1991;87:865-869.
7. Hirano T, Saluja A, Ramarao P, Lerch MM, Steer ML, Effects of chloroquine and methylamine on lysosomal enzyme secretion by rat pancreas. *Am J Physiol* 1992;262:G439-G444.
8. Leach SD, Modlin IM, Scheele GA, Gorelick FS, Intracellular activation of digestive zymogens in rat pancreatic acini. Stimulation by high doses of cholecystokinin. *J Clin Invest* 1991;87:362-366.
9. Whitcomb DC, Early trypsinogen activation in acute pancreatitis. *Gastroenterology* 1999;116:770-772.
10. Whitcomb DC, Preston RA, Aston CE, Sossenheimer MJ, Barua PS, Zhang Y, Wong-Chong A, White GJ, Wood PG, Gates LK et al., A gene for hereditary pancreatitis maps to chromosome 7q35. *Gastroenterology* 1996;110:1975-1980.

11. Le Bodic L, Bignon JD, Raguénès O, Mercier B, Georgelin T, Schnee M, Soulard F, Gagne K, Bonneville F, Muller JY et al.. The hereditary pancreatitis gene maps to long arm of chromosome 7. *Hum Mol Genet* 1996;5:549-554.
12. Rowen L, Koop BF, Hood L, The complete 685-kilobase DNA sequence of the human beta T cell receptor locus. *Science* 1996;272:1755-1762.
13. Whitcomb DC, Gorry MC, Preston RA, Furey W, Sossenheimer MJ, Ulrich CD, Martin SP, Gates LK, Amann ST, Toskes PP et al.. Hereditary pancreatitis is caused by a mutation in the cationic trypsinogen gene. *Nat Genet* 1996;14:141-145.
14. Gorry MC, Ghabbaizadeh D, Furey W, Gates LK, Preston RA, Aston CE, Zhang Y, Ulrich C, Ehrlich GD, Whitcomb DC, Mutations in the cationic trypsinogen gene are associated with recurrent acute and chronic pancreatitis. *Gastroenterology* 1997;113:1063-1068.
15. Witt H, Luck W, Becker M, A signal peptide cleavage site mutation in the cationic trypsinogen gene is strongly associated with chronic pancreatitis. *Gastroenterology* 1999;117:7-10.
16. Teich N, Ockenga J, Hoffmeister A, Manns M, Mössner J, Keim V, Chronic pancreatitis associated with an activation peptide mutation that facilitates trypsin activation. *Gastroenterology* 2000;119:461-465.
17. Nishimori I, Kamakura M, Fujikawa-Adachi K, Morita M, Onishi S, Yokoyama K, Makino I, Ishida H, Yamamoto M, Watanabe S et al., Mutations in exons 2 and 3 of the cationic trypsinogen gene in Japanese families with hereditary pancreatitis. *Gut* 1999;44:259-263.
18. Sibert JR, Hereditary pancreatitis in England and Wales. *J Med Genet* 1978;15:189-201.
19. Várallyay E, Pál G, Patthy A, Szilágyi L, Gráf L, Two mutations in rat trypsin confer resistance against autolysis. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;243:56-60.
20. Sahin-Tóth M, Gráf L, Tóth M, Trypsinogen stabilization by mutation Arg117-->His: a unifying pathomechanism for hereditary pancreatitis? *Biochem*

- Biochem Biophys Res Commun 1999;264:505-508.
21. Sahin-Tóth M. Human cationic trypsinogen. Role of Asn-21 in zymogen activation and implications in hereditary pancreatitis. *J Biol Chem* 2000;275:22750-22755.
  22. Kunitz M. Northrop IH. Isolation of crystalline trypsinogen, trypsin, a trypsin inhibitor, and an inhibitor-trypsin compound. *J Gen Physiol* 1936;19:991-1007.
  23. Kassell B. Laskowski M. The basic trypsin inhibitor of bovine pancreas. V. The disulfide linkages. *Biochem Biophys Res Commun* 1965;20:463-468.
  24. Kazal LA. Spicer DS, Brahinsky RA, Isolation of a Crystalline Trypsin Inhibitor-Anticoagulant Protein from Pancreas. *J Am Chem Soc* 1948;70:3034-3040.
  25. Greene LJ, Pubols MH, Bartelt DC, Human pancreatic secretory trypsin inhibitor. *Methods Enzymol* 1976;45:813-825.
  26. Horii A, Kobayashi T, Tomita N, Yamamoto T, Fukushige S, Murotsu T, Ogawa M, Mori T, Matsubara K, Primary structure of human pancreatic secretory trypsin inhibitor (PSTI) gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1987;149:635-641.
  27. Kuwata K, Hirota M, Sugita H, Kai M, Hayashi N, Nakamura M, Matsuura T, Adachi N, Nishimori I, Ogawa M, Genetic mutations in exons 3 and 4 of the pancreatic secretory trypsin inhibitor in patients with pancreatitis. *J Gastroenterol* 2001;36:612-618.
  28. Witt H, Luck W, Hennies HC, Classen M, Kage A, Lass U, Landt O, Becker M. Mutations in the gene encoding the serine protease inhibitor, Kazal type 1 are associated with chronic pancreatitis. *Nat Genet* 2000;25:213-216.
  29. Kuwata K, Hirota M, Shimizu H, Nakae M, Nishihara S, Takimoto A, Mitsushima K, Kikuchi N, Endo K, Inoue M et al., Functional analysis of recombinant pancreatic secretory trypsin inhibitor protein with amino-acid substitution. *J Gastroenterol* 2002;37:928-934.
  30. Hirota M, Kuwata K, Ohmuraya M, Ogawa M. From acute to chronic pancreatitis:

- the role of mutations in the pancreatic secretory trypsin inhibitor gene. *JOP* 2003;4:83-88.
31. Goldenberg DP, Frieden RW, Haack JA, Morrison TB. Mutational analysis of a protein-folding pathway. *Nature* 1989;338:127-132.
  32. Gordon JW, Scangos GA, Plotkin DJ, Barbosa JA, Ruddle FH, Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980;77:7380-7384.
  33. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981;292:154-156.
  34. Bradley A, Evans M, Kaufman MH, Robertson E, Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature* 1984;309:255-256.
  35. Pfützner RH, Barmada MM, Brunskill AP, Finch R, Hart PS, Neoptolemos J, Furey WF, Whitcomb DC, SPINK1/PSTI polymorphisms act as disease modifiers in familial and idiopathic chronic pancreatitis. *Gastroenterology* 2000;119:615-623.
  36. Chen JM, Mercier B, Audrezet MP, Raguene O, Quere I, Ferec C, Mutations of the pancreatic secretory trypsin inhibitor (PSTI) gene in idiopathic chronic pancreatitis. *Gastroenterology* 2001;120:1061-1064.
  37. Whitcomb DC, How to think about SPINK and pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 2002;97:1085-1088.
  38. Threadgold J, Greenhalf W, Ellis I, Howes N, Lerch MM, Simon P, Jansen J, Charnley R, Laugier R, Frulloni L et al.. The N34S mutation of SPINK1 (PSTI) is associated with a familial pattern of idiopathic chronic pancreatitis but does not cause the disease. *Gut* 2002;50:675-681.
  39. Shimosegawa T, Do point mutations in the PSTI (SPINK1) gene truly contribute to the pathogenesis of chronic pancreatitis? *J Gastroenterol* 2001;36:645-647.
  40. Chandak GR, Idris MM, Reddy DN, Bhaskar S, Sriram PV, Singh L, Mutations in the pancreatic secretory trypsin inhibitor gene (PSTI/SPINK1) rather than the

- cationic trypsinogen gene (PRSS1) are significantly associated with tropical calcific pancreatitis. *J Med Genet* 2002;39:347-351.
41. Drenth JP, te Morsche R, Jansen JB, Mutations in serine protease inhibitor Kazal type 1 are strongly associated with chronic pancreatitis. *Gut* 2002;50:687-692.
  42. Yagi T, Tokunaga T, Furuta Y, Nada S, Yoshida M, Tsukada T, Saga Y, Takeda N, Ikawa Y, Aizawa S, A novel ES cell line, TT2, with high germline-differentiating potency. *Anal Biochem* 1993;214:70-76.
  43. Jonsson J, Carlsson L, Edlund T, Edlund H, Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature* 1994;371:606-609.
  44. Krapp A, Knöfler M, Ledermann B, Bürki K, Berney C, Zoerkler N, Hagenbüchle O, Wellauer PK, The bHLH protein PTF1-p48 is essential for the formation of the exocrine and the correct spatial organization of the endocrine pancreas. *Genes Dev* 1998;12:3752-3763.
  45. Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y, Yoshimori T, LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J* 2000;19:5720-5728.
  46. Mizushima N, Yamamoto A, Matsui M, Yoshimori T, Ohsumi Y, In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol Biol Cell* 2004;15:1101-1111.
  47. Clarke PG, Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol (Berl)* 1990;181:195-213.
  48. Lockshin RA, Zakeri Z, Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:545-550.
  49. Lockshin RA, Zakeri Z. Caspase-independent cell deaths. *Curr Opin Cell Biol* 2002;14:727-733.
  50. Kuma A, Hatano M, Matsui M, Yamamoto A, Nakaya H, Yoshimori T, Ohsumi Y, Tokuhiisa T, Mizushima N, The role of autophagy during the early neonatal

- starvation period. *Nature* 2004;432:1032-1036.
51. Kitanaka C, Kuchino Y. Caspase-independent programmed cell death with necrotic morphology. *Cell Death Differ* 1999;6:508-515.
  52. Bockman DE. Morphology of the exocrine pancreas related to pancreatitis. *Microsc Res Tech* 1997;37:509-519.
  53. Taguchi M, Yamaguchi T, Otsuki M. Induction of PDX-1-positive cells in the main duct during regeneration after acute necrotizing pancreatitis in rats. *J Pathol* 2002;197:638-646.
  54. Yamamoto T, Nakamura Y, Nishide J, Emi M, Ogawa M, Mori T, Matsubara K. Molecular cloning and nucleotide sequence of human pancreatic secretory trypsin inhibitor (PSTI) cDNA. *Biochem Biophys Res Commun* 1985;132:605-612.
  55. Miettinen PJ, Huotari M, Koivisto T, Ustinov J, Palgi J, Rasilainen S, Lehtonen E, Keski-Oja J, Otonkoski T. Impaired migration and delayed differentiation of pancreatic islet cells in mice lacking EGF-receptors. *Development* 2000;127:2617-2627.
  56. Ogawa M, Tsushima T, Ohba Y, Ogawa N, Tanaka S, Ishida M, Mori T. Stimulation of DNA synthesis in human fibroblasts by human pancreatic secretory trypsin inhibitor. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1985;50:155-158.
  57. Niinobu T, Ogawa M, Murata A, Nishijima J, Mori T. Identification and characterization of receptors specific for human pancreatic secretory trypsin inhibitor. *J Exp Med* 1990;172:1133-1142.
  58. Fukuda M, Fujiyama Y, Sasaki M, Andoh A, Bamba T, Fushiki T. Monitor peptide (rat pancreatic secretory trypsin inhibitor) directly stimulates the proliferation of the nontransformed intestinal epithelial cell line, IEC-6. *Digestion* 1998;59:326-330.
  59. Playford RJ, Hanby AM, Quinn C, Calam J. Influence of inflammation and atrophy on pancreatic secretory trypsin inhibitor levels within the gastric mucosa. *Gastroenterology* 1994;106:735-741.

60. Playford RJ, Hanby AM, Patel K, Calam J. Influence of inflammatory bowel disease on the distribution and concentration of pancreatic secretory trypsin inhibitor within the colon. *Am J Pathol* 1995;146:310-316.
61. Marchbank T, Chinery R, Hanby AM, Poulson R, Elia G, Playford RJ. Distribution and expression of pancreatic secretory trypsin inhibitor and its possible role in epithelial restitution. *Am J Pathol* 1996;148:715-722.
62. Bohe H, Bohe M, Lundberg E, Polling A, Ohlsson K. Production and secretion of pancreatic secretory trypsin inhibitor in normal human small intestine. *J Gastroenterol* 1997;32:623-627.
63. Nishino I, Fu J, Tanji K, Yamada T, Shimojo S, Koori T, Mora M, Riggs JE, Oh SJ, Koga Y et al., Primary LAMP-2 deficiency causes X-linked vacuolar cardiomyopathy and myopathy (Danon disease). *Nature* 2000;406:906-910.
64. Anglade P, Vyas S, Javoy-Agid F, Herrero MT, Michel PP, Marquez J, Mouatt-Prigent A, Ruberg M, Hirsch EC, Agid Y. Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease. *Histol Histopathol* 1997;12:25-31.
65. Kegel KB, Kim M, Sapp E, McIntyre C, Castaño JG, Aronin N, DiFiglia M. Huntingtin expression stimulates endosomal-lysosomal activity, endosome tubulation, and autophagy. *J Neurosci* 2000;20:7268-7278.
66. Cataldo AM, Hamilton DJ, Barnett JL, Paskevich PA, Nixon RA. Properties of the endosomal-lysosomal system in the human central nervous system: disturbances mark most neurons in populations at risk to degenerate in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 1996;16:186-199.



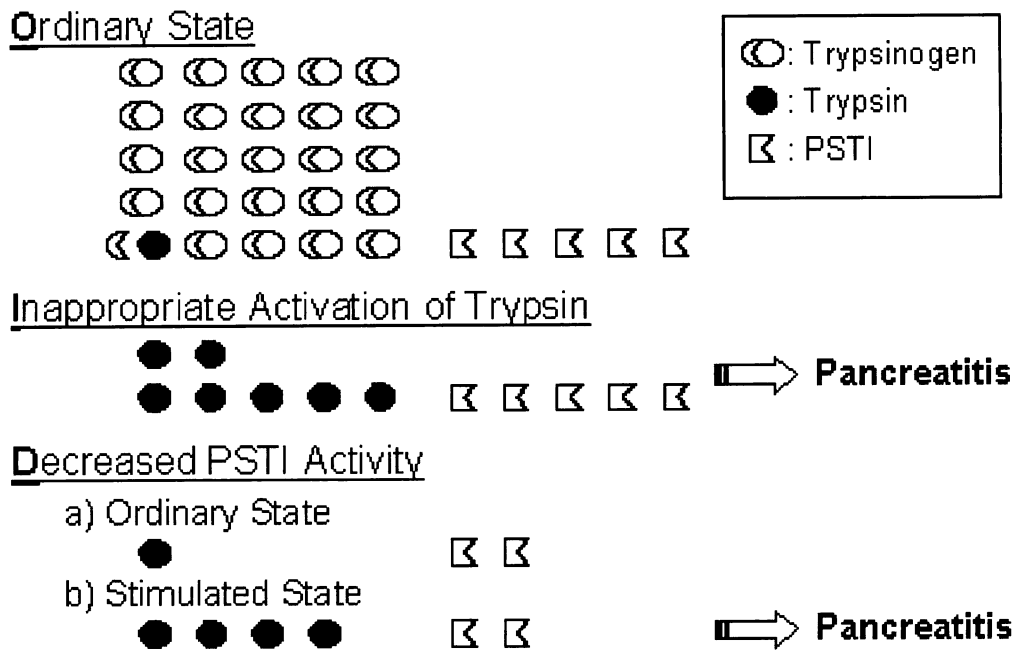


図1. トリプシンとPSTIの膵臓内でのバランス

遺伝子変異によりPSTIの活性が低下すると膵炎を発症しやすくなると推定される。Hirota, M, et, al. From acute to chronic pancreatitis: the role of mutations in the pancreatic secretory trypsin inhibitor gene. JOP 4(2) ; 83-88, 2003 より引用

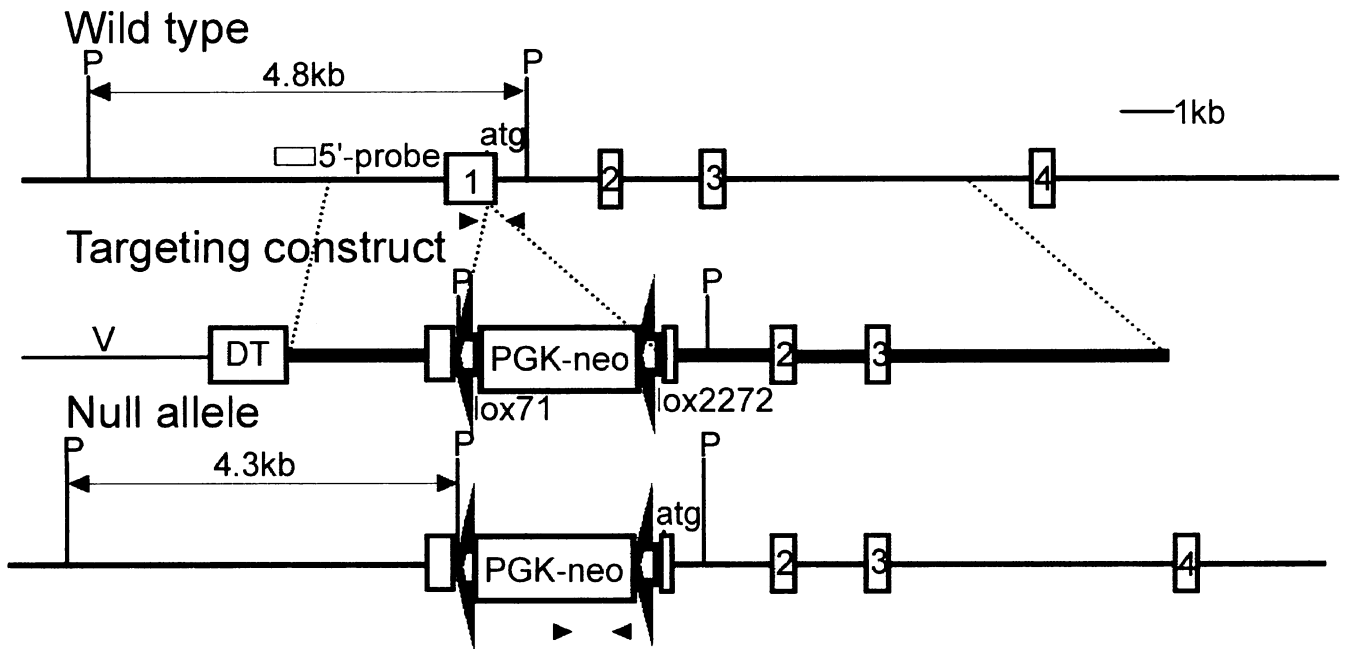
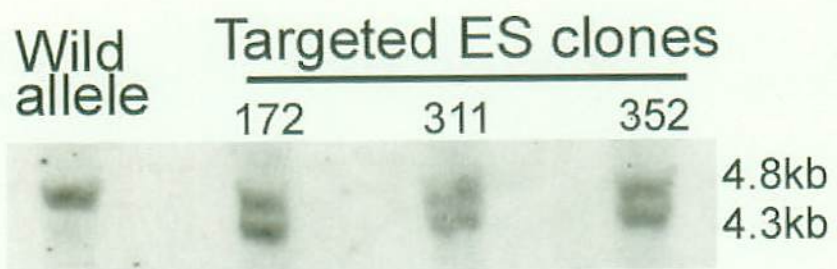


図3. Targeting vectorのconstruct

野生型*Psti* 遺伝子と5'-probe (上段)、targeting vector (中段)、組み換え後の配列 (下段)。Exons、5'-probe、ジフテリア毒素Aフラグメン (DT-A) 遺伝子-polyA (DT) とおよびネオマイシン耐性遺伝子 (neo) はopen boxで示している。制限酵素 PstI sites (P) は相同組み換え体検出のためのSouthern blottingの際に使用した。Closed trianglesはPCR primerを示している。



☒4. Genomic Southern blotting (PstI digestion)

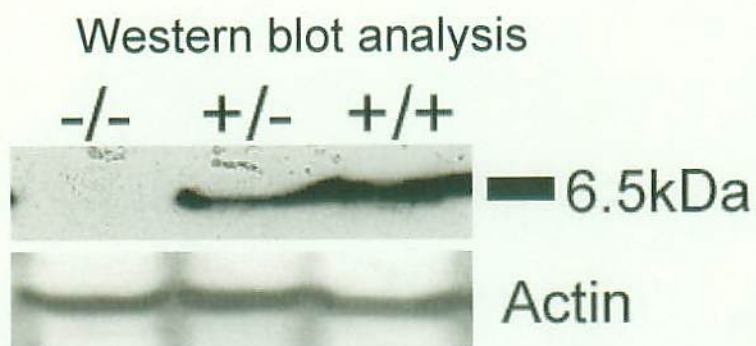
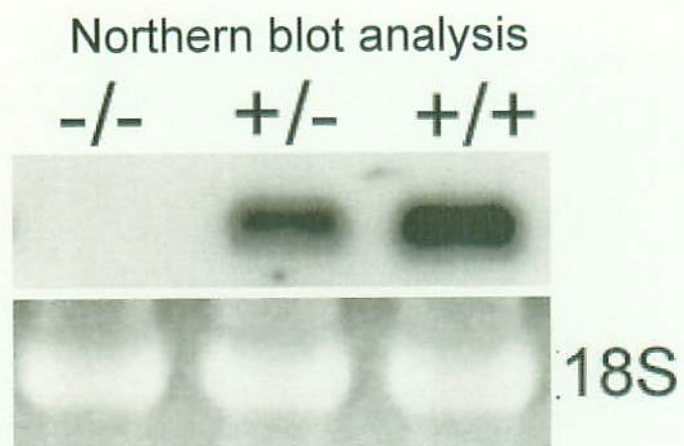


図5. NorthernおよびWestern blot analysis

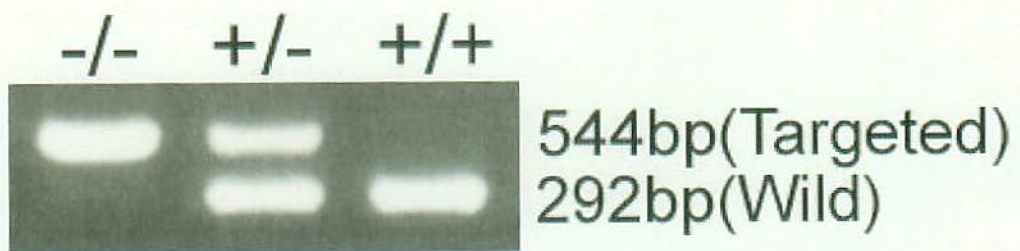


図6. PCR法によるgenotyping

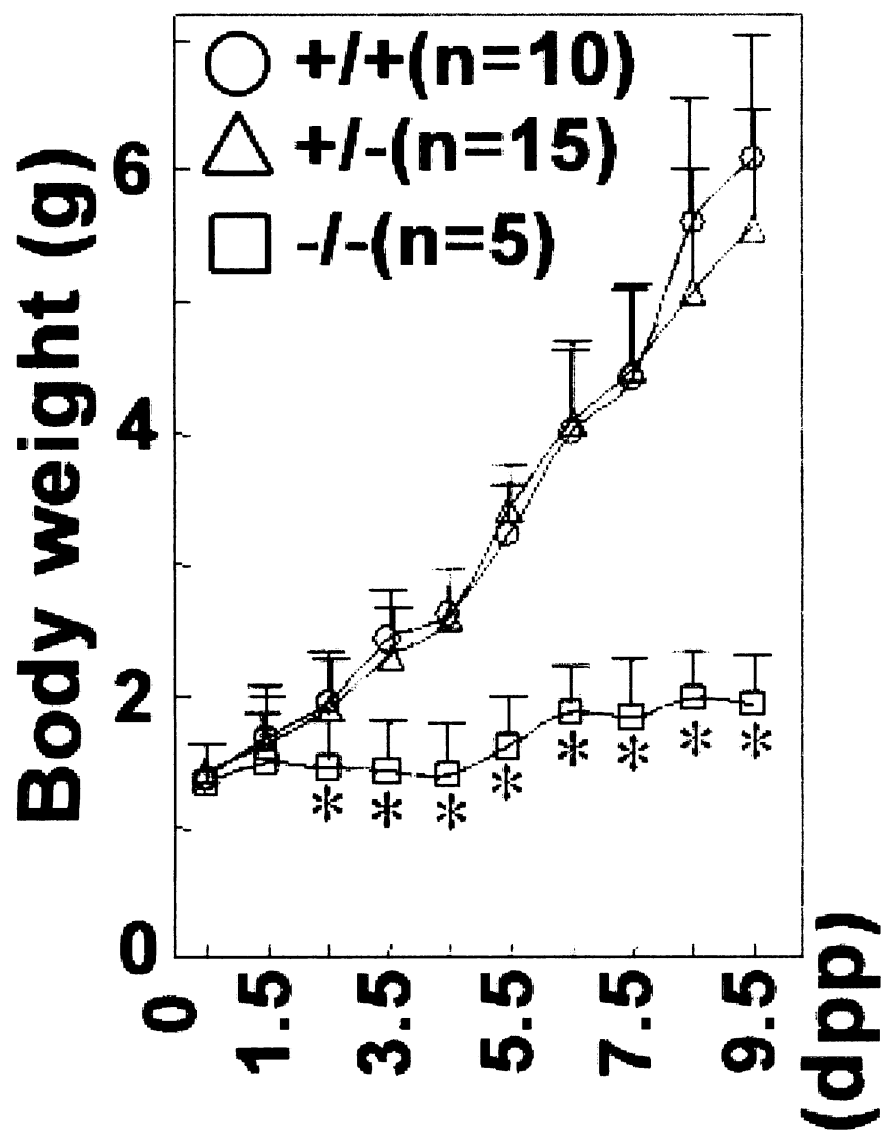


图7. 体重增加曲线

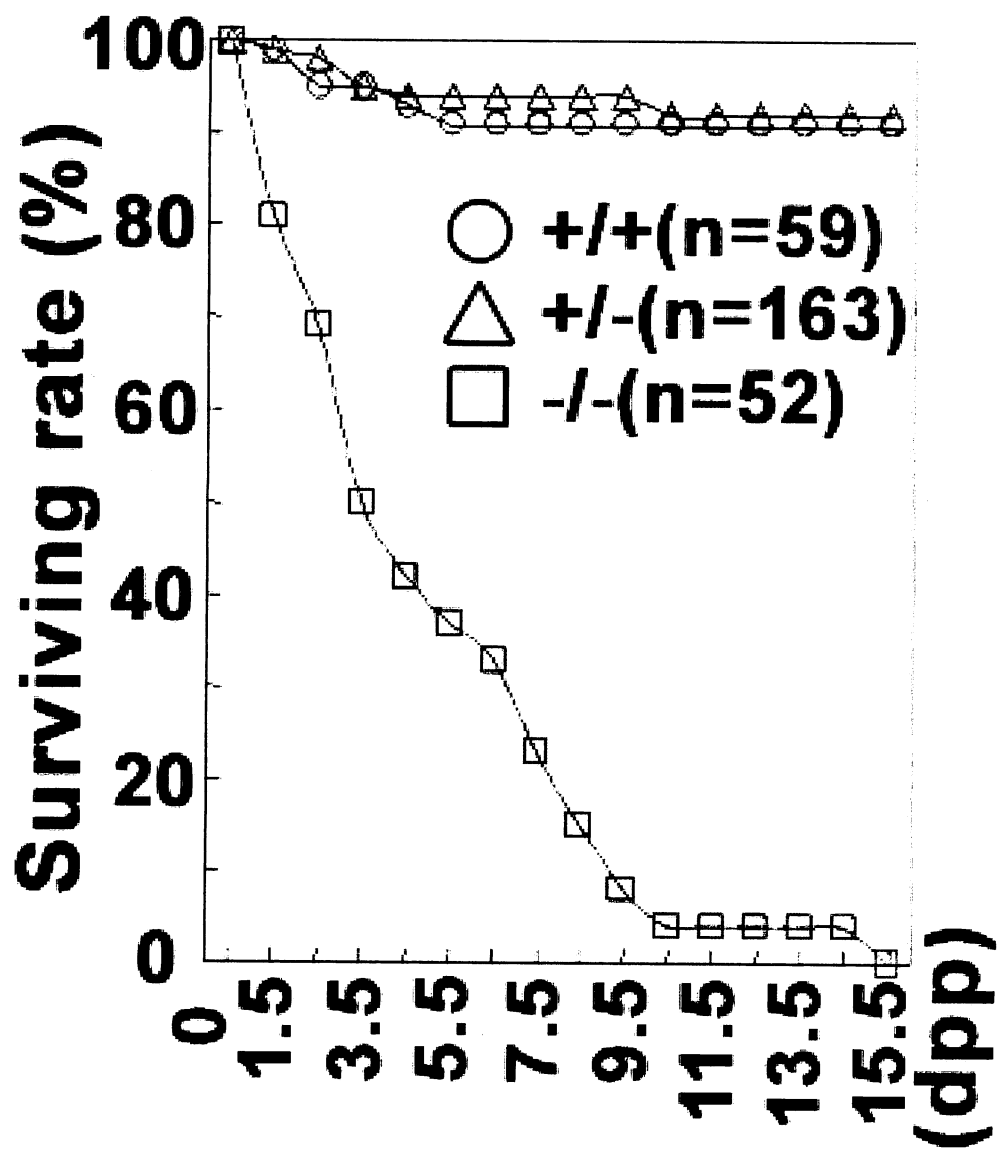


図8. 生存曲線

14.5 dpp



図9. 出生後14日の野生型と*Psti* ホモ欠損マウス



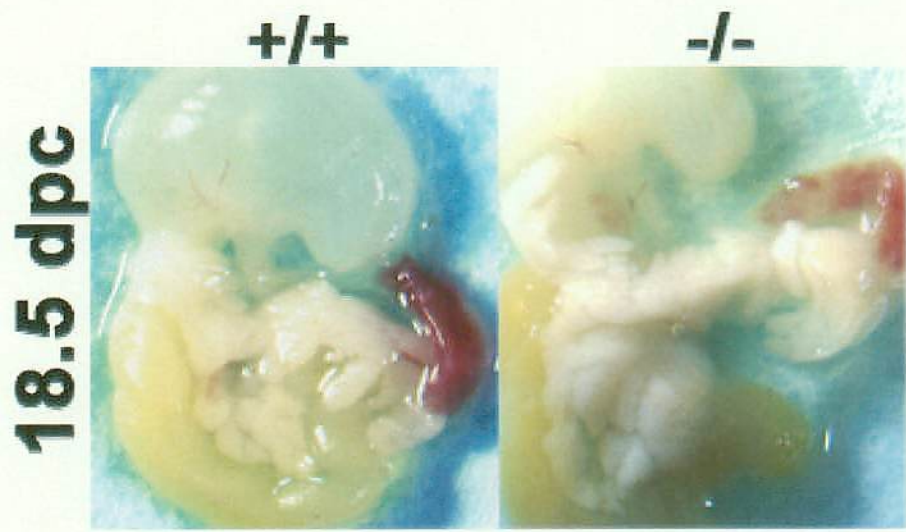


図10. 解剖所見：胎生18.5日（18.5dpc）、出生後3.5日（3.5dpp）



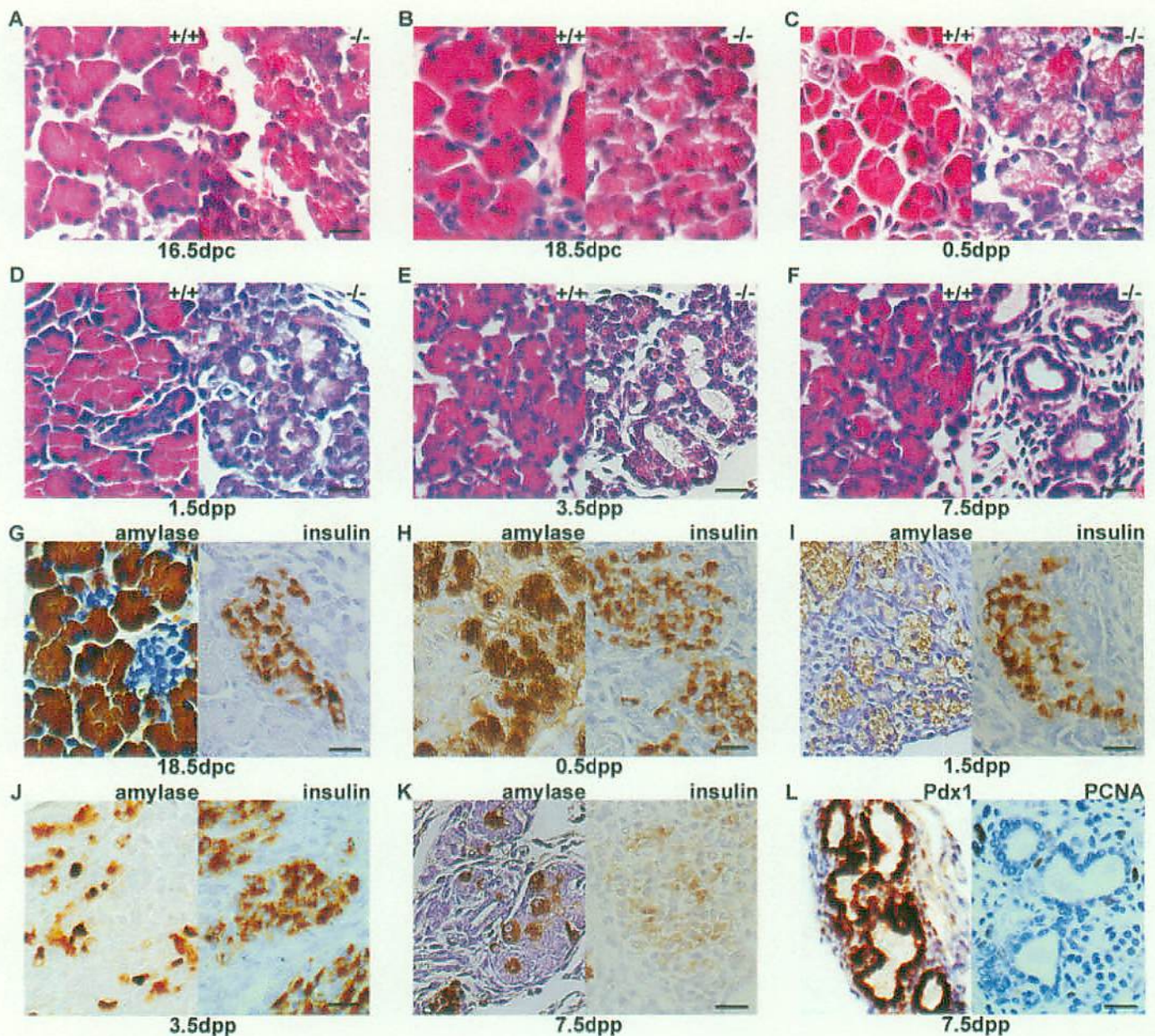


図11. 膵臓のHE染色および免疫染色

(A)胎生16.5日：空胞変性がすでに始まっている。(B)胎生18.5日、(C)出生後0.5日：Psti欠損マウス膵ではさらに空胞変性が激しくなる。(D-F) 出生後1.5、3.5および7.5日：正常な腺房細胞は消失し、tubular complexが見られる。炎症細胞の浸潤は僅かにしか見られない。(G-K)抗アミラーゼおよび抗インスリン抗体を用いた免疫染色。(L)抗Pdx1および抗PCNA抗体を用いた免疫染色  
Bar: 20  $\mu$ m.



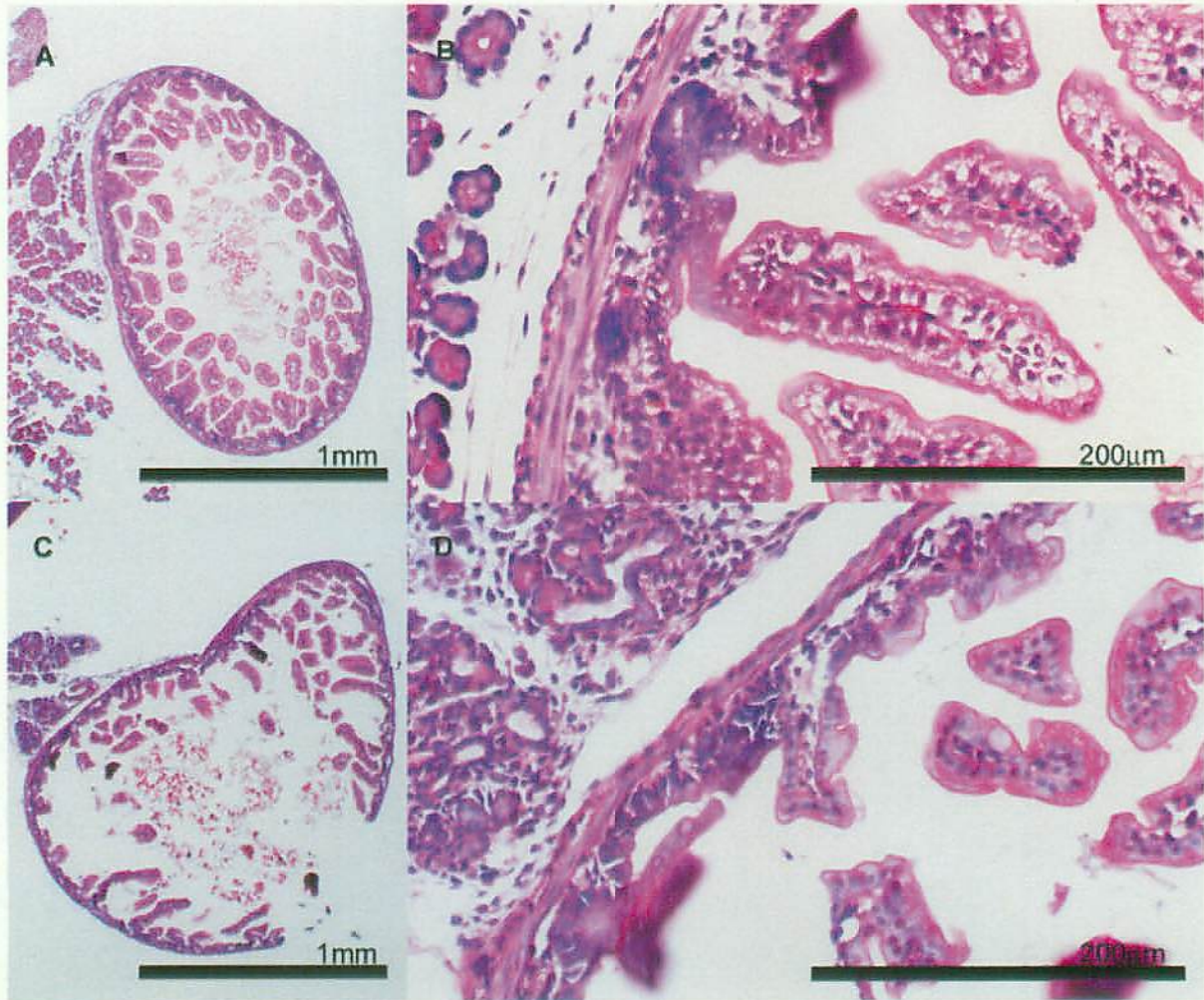
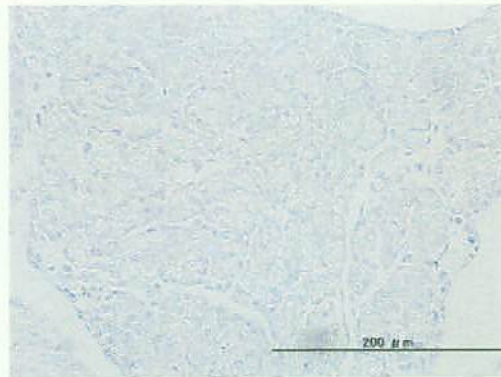
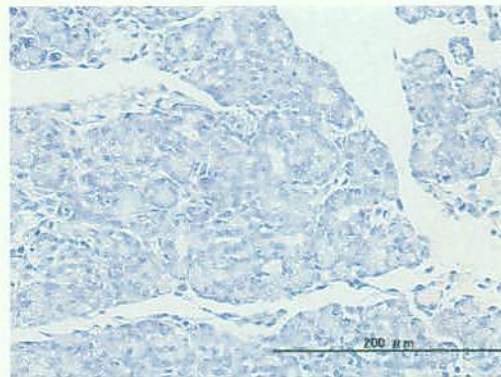


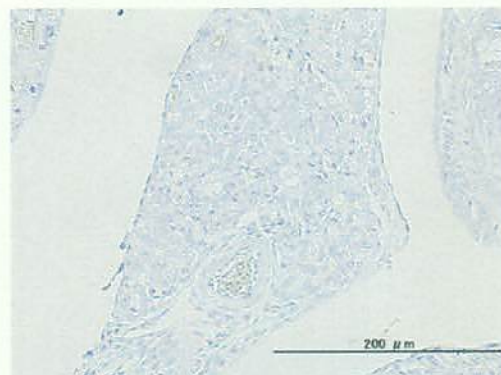
図12. 十二指腸 A、B：野生型、C、D：*Psti* ホモ欠損マウス ともに出生後3.5日



出生後0.5日



出生後1.5日



出生後2.5日

図13. *Psti*ホモ欠損マウス膵臓の  
TUNEL staining



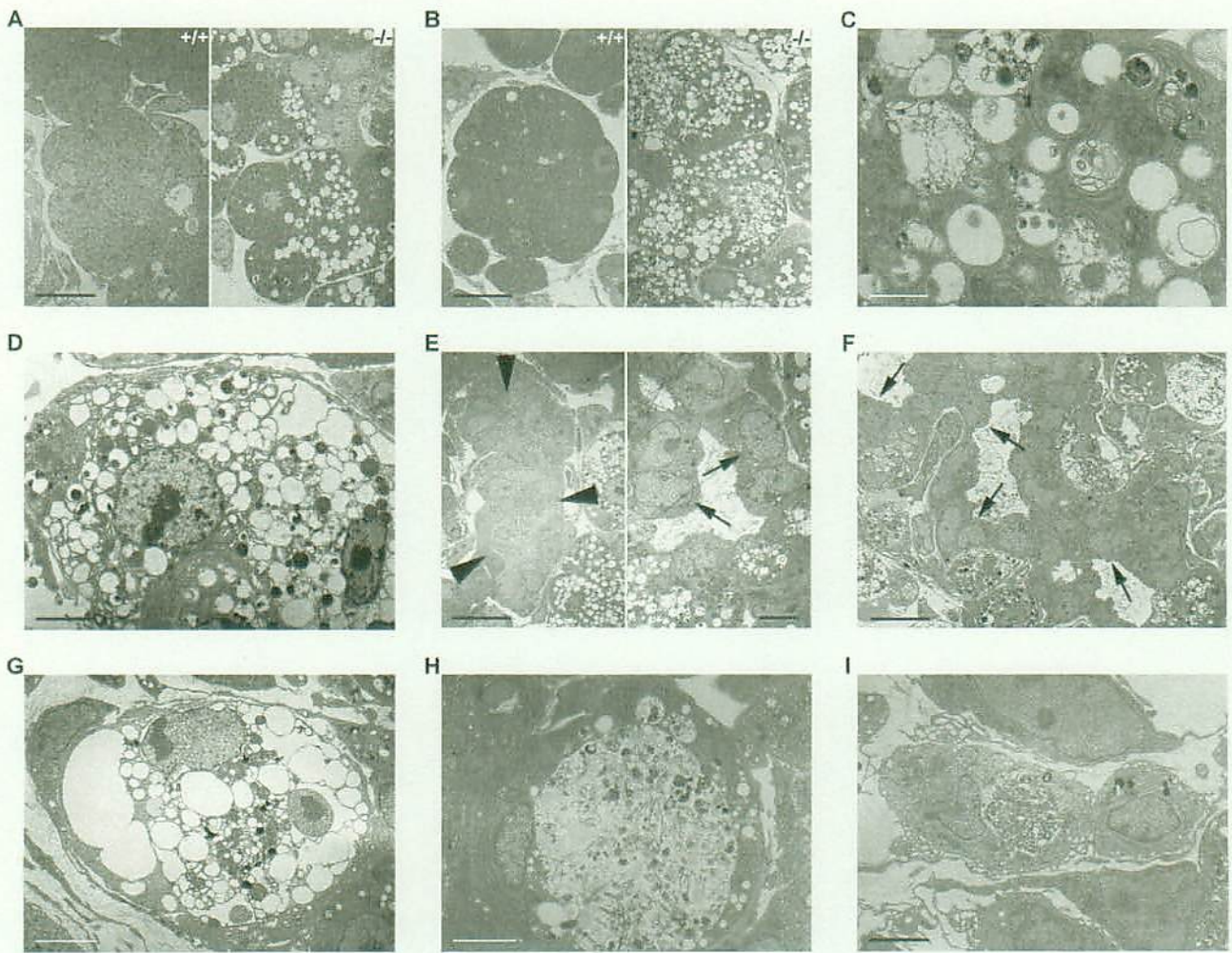


図14. 電顕による解析 (A) 胎生18.5日 (B-F) 出生後0.5日 (G-I) 出生後1.5日。  
 Bar : 12  $\mu\text{m}$  (A, B and F), 1.5  $\mu\text{m}$  (C), 4  $\mu\text{m}$  (D), 19 $\mu\text{m}$  (E), 2.2  $\mu\text{m}$  (G), 3.5  $\mu\text{m}$  (H)、 3 $\mu\text{m}$  (I)

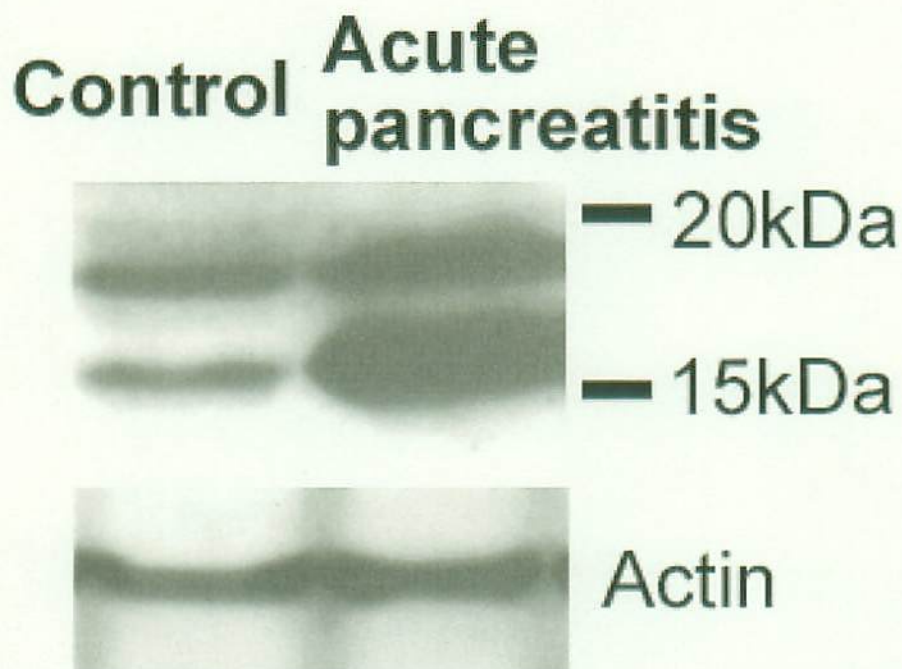
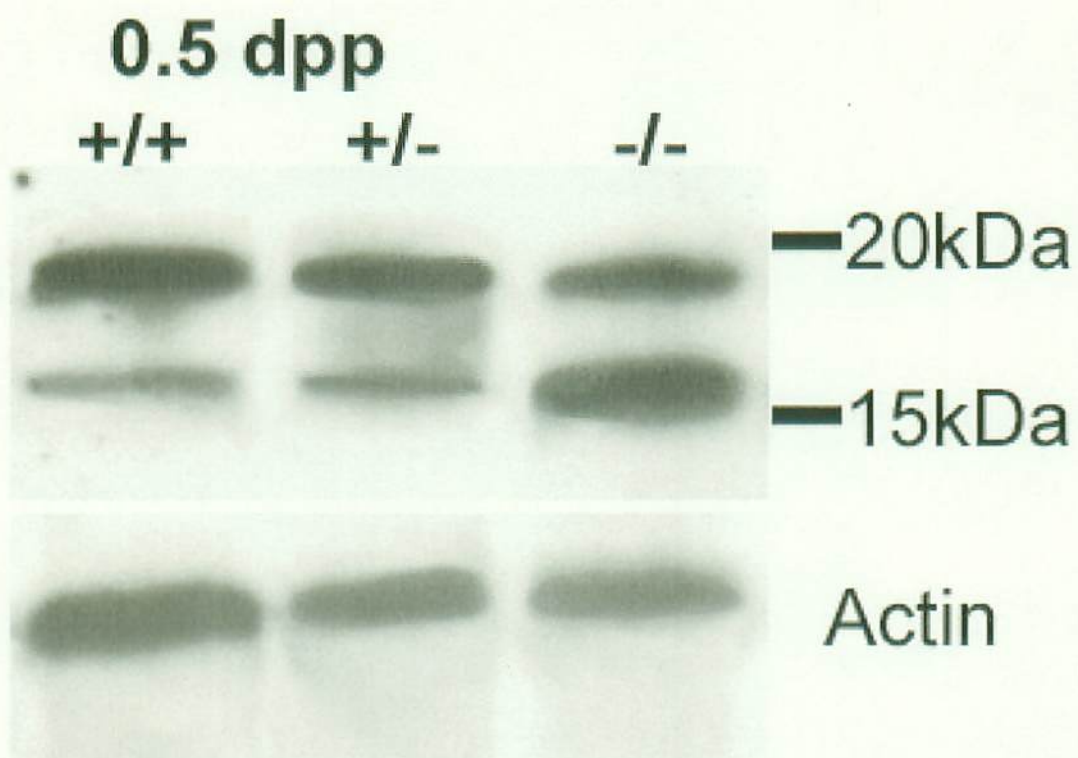


図15. anti-LC3抗体によるWestern blot analysis

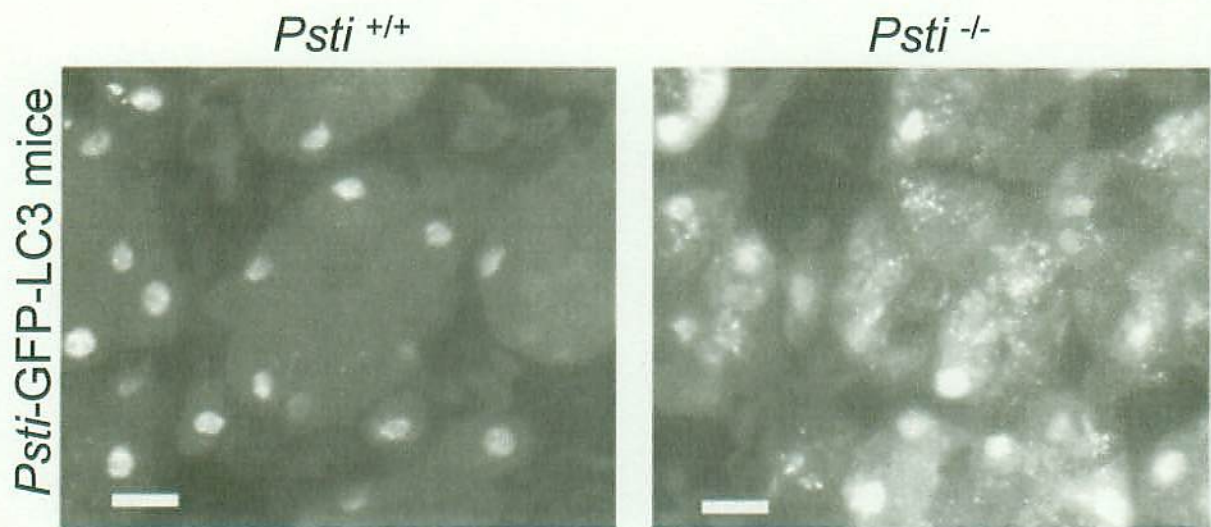


図16. *Psti*-GFP-LC3マウスの解析



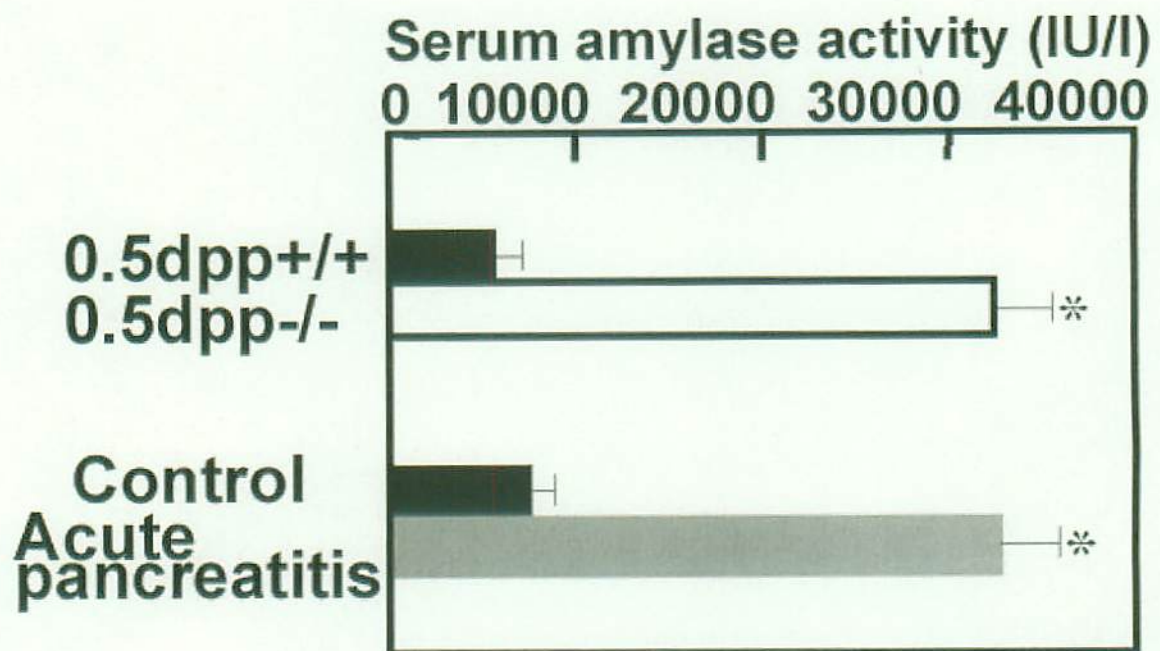


図17. 血清アミラーゼ活性



410nm吸光度 / DNA濃度( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )

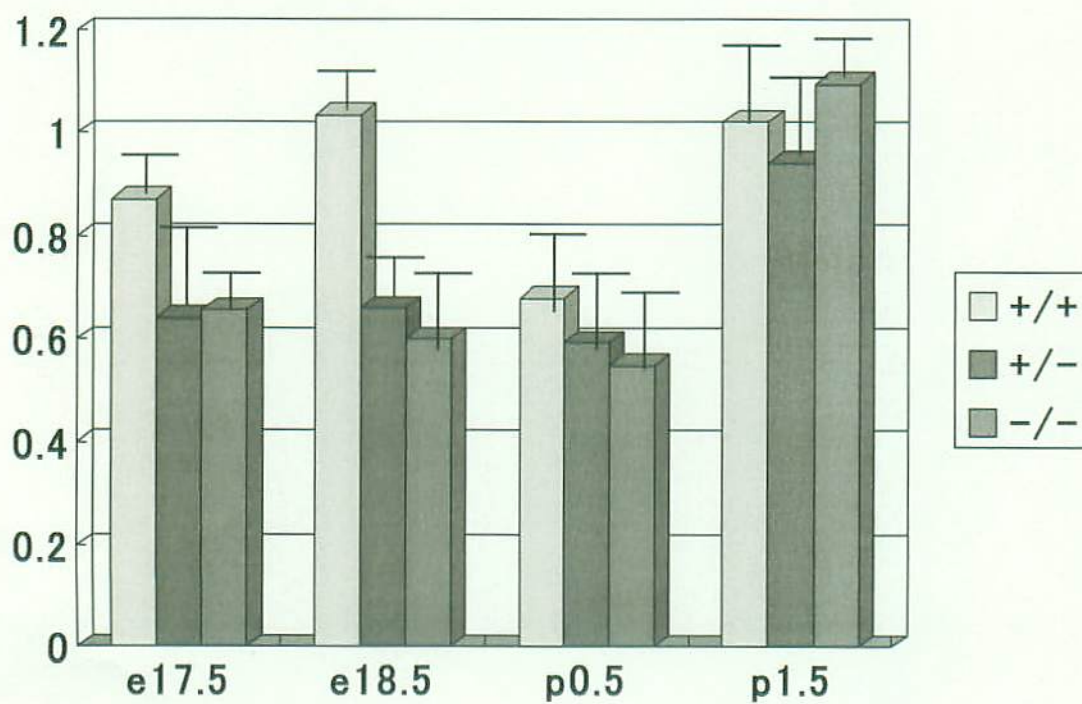


図18. 各発生段階 (胎生17.5日 (e17.5)、同18.5日(e18.5)、出生後0.5日(p0.5)、同1.5日(p0.5))の膵臓ホモジネートのトリプシン活性

血清アミラーゼ  
活性(IU/l)

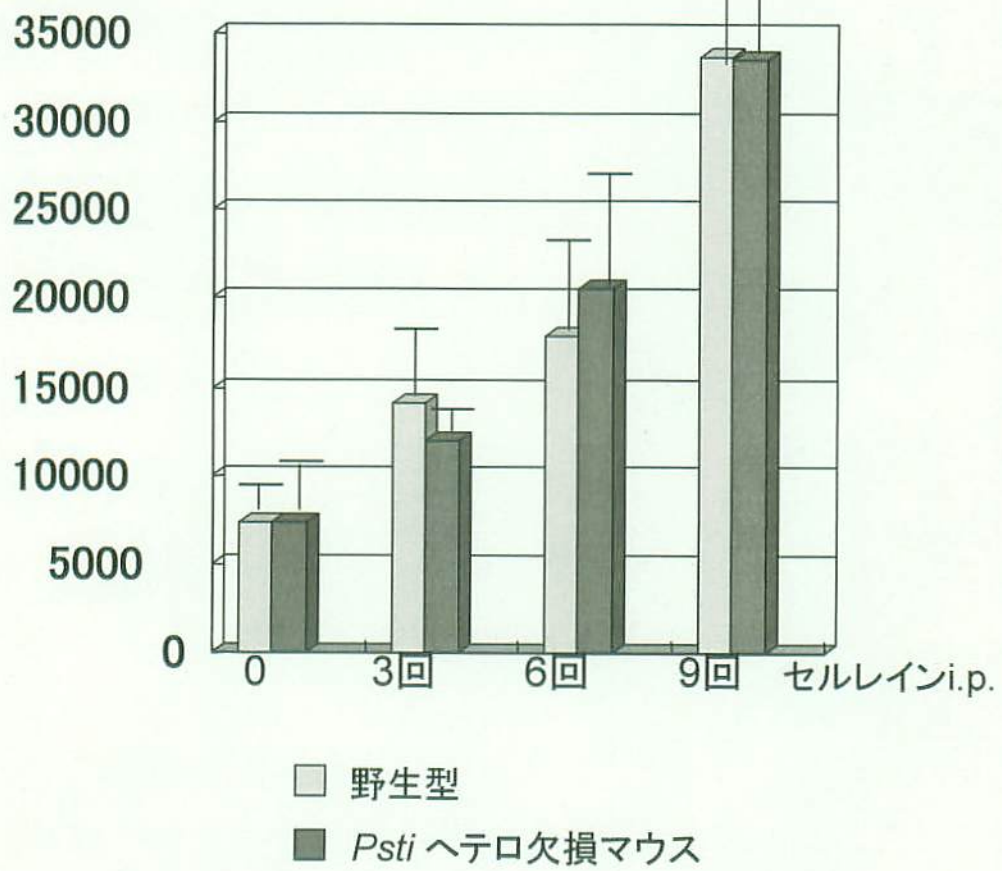


図19. セルレイン膵炎マウスのアミラーゼ活性

表6. 発生過程で見られる生理的細胞死の形態学的特徴に基づく分類  
(Clarke, Zakeri et al)

	生理的細胞死			ネクローシス
	タイプ1 (apoptosis)	タイプ2 (autophagic cell death)	タイプ3 (non-lysosomal disintegration)	
核	核の凝縮 顕著なピクノー シス	ときにピクノー シスが見られる が顕著ではない (核変化に乏し い)	後期に崩壊	核変化に乏しい
細胞質	容積の減少	多数の自食空 胞 (autophagoso me)	全般的な崩壊、 細胞内小器官 の拡張	細胞の膨化と細 胞膜の破綻を 特徴とする
終末像	断片化し、周辺 細胞による貪食 を介して迅速に 処理される	断片化し、のち に周辺細胞によ り貪食処理され ることもある	非常に細かい 断片に分断化し、 周辺細胞による 貪食処理は見 られない	内容物の漏洩 が起こり、炎症 の原因となる
頻度・部位	しばしば見られ る細胞死のタイ プで、孤立した 状態で起きるこ とが多い	しばしば見られ る細胞死のタイ プで、細胞がま とまって脱落す る状況で起きる ことが多い	まれに見られる。 空胞化軟骨細 胞でのみ確認さ れている。	制御されない、 強度の外的要 因により生ずる 受動的な細胞 死