

## 熊本大学学術リポジトリ

### Kumamoto University Repository System

Title	急性膵炎の重症化におけるオートファジーとCHOPの役割
Author(s)	陶山, 浩一
Citation	
Issue date	2008-03-25
Type	Thesis or Dissertation
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2298/11094">http://hdl.handle.net/2298/11094</a>
Right	

学位論文

**Doctor's Thesis**

急性膵炎の重症化におけるオートファジーと CHOP の役割

**(Roles of Autophagy and C/EBP homologous protein (CHOP) In the  
Progression of Acute Pancreatitis)**

陶山 浩一

**Koichi Suyama**

熊本大学大学院医学教育部博士課程臨床医科学専攻消化器外科学

指導教員

馬場 秀夫教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程臨床医科学専攻消化器外科学

山村 研一教授

熊本大学大学院薬学教育部博士課程生命薬科学専攻臓器形成学

2008 年 3 月

学位論文

**Doctor's Thesis**

論文題名：急性膵炎の重症化におけるオートファジーと CHOP の役割

**(Roles of Autophagy and C/EBP homologous protein (CHOP) In the  
Progression of Acute Pancreatitis)**

著者名：陶山 浩一

**Koichi Suyama**

指導教員名：熊本大学大学院医学教育部博士課程臨床医科学専攻消化器外科学 馬場秀夫 教授

熊本大学大学院薬学教育部博士課程生命薬科学専攻臓器形成学 山村研一 教授

審査委員名：	消化器内科学担当教授	佐々木 裕
	小児科学担当教授	遠藤 文夫
	分子遺伝学担当教授	尾池 雄一

2008 年 3 月

## 目次

要旨 ..... 1

発表論文リスト ..... 2

謝辞 ..... 4

略語一覧 ..... 5

第一章 研究の背景と目的 ..... 6

1-1. 膵炎とは

1-2. 膵炎の発症機構 —Co-localization 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)、serine protease inhibitor Kazal type (SPINK) とは

1-7. *PSTI (Spink1)* 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. *Spink3* 欠損マウスの表現型

- 1-12. オートファジーとは
- 1-13. オートファジーの機構
- 1-14. オートファジーとプログラム細胞死
- 1-15. *Spink3/Atg5* 二重欠損マウスの作成と解析
- 1-16. 小胞体ストレスとは
- 1-17. 小胞体ストレスと膵炎
- 1-18. セルレインおよび LPS 投与によるマウス急性膵炎
- 1-19. マウス急性膵炎における小胞体ストレス応答の発現解析
- 1-20. *Chop* 欠損マウスを用いた急性膵炎の重症度解析
- 1-21. *Chop/Spink3* 二重欠損マウスの作成と解析

## 第二章 実験方法 ..... 24

- 2- 1. マウス genomic DNA の抽出
- 2- 2. PCR による genotyping
- 2- 3. *Spink3/Atg5* 二重欠損マウスの作成
- 2- 4. Histological analysis
- 2- 5. Electron microscopy
- 2- 6. RNA 抽出
- 2- 7. Western blot analysis

2-8. アポトーシスの検出

2-9. トリプシン活性の測定

2-10. セルレイン急性膵炎の作製

2-11. LPS およびセルレイン共投与による重症急性膵炎の作製

2-12. 血清アミラーゼ値の測定

2-13. RT-PCR による各種遺伝子の発現解析

2-14. *Chop/Spink3* 二重欠損マウスの作成

第三章 *Spink3 / Atg5* 二重欠損マウスの解析 ..... 32

3-1. 出生率および生存率

3-2. 表現型の解析

3-3. 電子顕微鏡による解析

3-4. 血清アミラーゼ値の解析

3-5. 腺房細胞におけるトリプシン活性の解析

第四章 セルレイン投与による急性膵炎における小胞体ストレスの発現解析 ..... 34

4-1. セルレイン膵炎マウスの膵組織像

4-2. セルレイン膵炎マウスにおける血清アミラーゼ値の解析

4-3. セルレイン膵炎マウスと小胞体ストレス

第五章 *Chop* 欠損マウスにおけるセルレイン膵炎の解析 ..... 36

5- 1. *Chop* 欠損マウスにおけるセルレイン膵炎の膵組織像

5- 2. 血清アミラーゼ値の解析

5- 3. TUNEL 染色

5- 4. CHOP、caspase-11、caspase-1、IL-1 $\beta$  の発現解析

第六章 LPS+セルレイン投与による重症急性膵炎の解析 ..... 38

6- 1. 膵組織像

6- 2. 血清アミラーゼ値の解析

6- 3. Caspase-9、caspase-3 の発現解析

6- 4. TUNEL 染色

6- 5. CHOP、caspase-11、caspase-1、IL-1 $\beta$  の発現解析

第七章 *Chop* 欠損マウスにおける LPS+セルレイン投与による重症急性膵炎の解析・・ 40

7- 1. 膵組織像

7- 2. 血清アミラーゼ値の解析

7- 3. Caspase-9、caspase-3 の発現解析

7- 4. TUNEL 染色

7- 5. CHOP、caspase-11、caspase-1、IL-1 $\beta$  の発現解析

第八章 *Chop/Spink3* 二重欠損マウスの解析 ..... 42

8- 1. 膵組織像

8- 2. 血清アミラーゼ値の解析

第九章 考察 ..... 43

第十章 結語 ..... 46

第十一章 参考文献 ..... 47

図表

## 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、いま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 (pancreatic secretory trypsin inhibitor; PSTI、もしくは serine protease inhibitor Kazal type; SPINK) 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。そこで、PSTI 機能を調べる目的で、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、解析を行ったところ、出生直後から膵腺房細胞は著明な空胞変性を来し、出生後 3.5 日目までに膵組織はほぼ消失した。空胞変性はオートファジーによるものであった。そのオートファジーの意義を調べる目的で、我々は *Psti* 遺伝子とオートファジーに必須である *Atg5* (autophagy related gene 5) 遺伝子の二重欠損マウスを作成した。*Psti/Atg5* 二重欠損マウスでは、膵腺房細胞内のトリプシン活性は低下し、膵組織の変性は軽減した。以上より、*Psti* 欠損マウスにおいて、オートファジーにより膵腺房細胞のトリプシンが活性化され膵組織の変性が進行することが示唆された。

*Psti* 欠損マウスの膵臓でオートファジーの亢進を認めたこと、およびマウスの急性膵炎モデルにおいてもオートファジーの誘導を認めたことから、膵臓におけるオートファジーの誘発因子が何であるのかという疑問が生じた。細胞内の蛋白質の品質管理機構に小胞体が大きな役割を有することから小胞体が発する小胞体ストレスによりオートファジーが誘発される可能性を考えた。また、最近、炎症性疾患と小胞体ストレスの関係も指摘されている。マウスの急性膵炎モデルにおける小胞体ストレスについて解析したところ、急性膵炎時には小胞体ストレスの誘導が亢進していた。そこで、小胞体ストレスが惹起されたときに細胞死もしくは炎症反応を誘導するシグナル伝達経路の主要な因子である C/EBP homologous protein (*Chop*) の遺伝子欠損マウスに、重症急性膵炎を誘起した。その結果、野生型に比して *Chop* の遺伝子欠損マウスでは膵炎の重症度が軽減した。このことは、膵炎の重症化に *Chop* が重要な役割を果たしていることを示唆する。ただし、*Chop* と *Psti* のダブルノックアウトマウスでは表現型に変化がなかったことから、現時点ではオートファジーと小胞体ストレス・*Chop* 経路の間には関連性はないと考えた。

発表論文リスト

関連論文

①. **Koichi Suyama**, Masaki Ohmuraya, Masahiko Hirota, Nobuyuki Ozaki, Satoshi Ida, Motoyoshi Endo, Kimi Araki, Tomomi Gotoh, Hideo Baba, Ken-ichi Yamamura

**C/EBP Homologous Protein Is Crucial for the Acceleration of Experimental Pancreatitis: *Biochemical and Biophysical Research Communications*: 2008 Feb: 367(1): 176-182.**

2. Daisuke Hashimoto, Masaki Ohmuraya, Masahiko Hirota, Akitsugu Yamamoto, **Koichi Suyama**, Kimi Araki, Hideo Baba, Noboru Mizushima, Ken-ichi Yamamura

**Involvement of autophagy in trypsinogen activation within the pancreatic acinar cells: *Journal of Cell Biology*: in revision**

その他の論文

1. **Koichi Suyama**, Toru Beppu, Takatoshi Ishiko, Shin-ichi Sugiyama, Katutaka Matsumoto, Koichi Doi, Toshiro Masuda, Chitoshi Ohara, Hiroshi Takamori, Kei-ichiro Kanemitsu, Masahiko Hirota, Hideo Baba

**Spontaneous rupture of adrenocortical carcinoma: *American Journal of Surgery*. 2007 Jul;194(1):77-8.**

2. 広田昌彦, 陶山浩一 (16人中11番目)  
急性膵炎の重症化とNOMI その病態と対策  
胆と膵(0388-9408)27巻1号 Page7-12(2006.01)

3. 広田昌彦, 陶山浩一 (19人中14番目)

急性膵炎 重症化の過程 血流動態からみた急性膵炎の重症化機序  
肝・胆・膵(0389-4991)51巻6号 Page1069-1073(2005.12)

4. 陶山浩一, 別府透, 石河隆敏, 杉山眞一, 土居浩一, 増田稔郎, 池田貯, 高森啓  
史, 辻龍也, 金光敬一郎, 江上寛, 馬場秀夫  
肺癌左副腎転移に対する腹腔鏡補助下摘除術の経験

癌と化学療法(0385-0684)32巻11号 Page1839-1841(2005.10)

5. 広田昌彦, 陶山浩一 (18人中4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(1346-7557)37巻8号 Page300-304(2005.07)

## 謝辞

熊本大学大学院医学薬学研究部消化器外科学、馬場秀夫教授、熊本大学大学院医学薬学研究部臓器形成学、山村研一教授、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、荒木喜美准教授、熊本大学大学院医学薬学研究部分子遺伝学、後藤知己講師、熊本大学大学院医学薬学研究部消化器外科学、廣田昌彦准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。

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科細胞生理学分野、水島 昇教授 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。徳島大学疾患酵素学研究センター、奥村裕司博士には、トリプシン活性測定に関する貴重なご助言を頂き、かつ実際の測定を行って頂きました。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、中田三千代実験補助員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、消化器外科学教室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、熊本大学旧第二外科の先輩でもある、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、大村谷昌樹研究員(現熊本大学大学院先端機構 特任助教)には研究のイロハから始まり、各種の研究手法、論文の読み方、研究に対する姿勢など、直接的なご指導・ご鞭撻を頂きました。

心から感謝いたします。

## 略語一覽

dpc, days postcoitum

dpp, days postpartum

ES cell, embryonic stem cell

LC3, microtubule-associated protein 1 light chain 3

PSTI, pancreatic secretory trypsin inhibitor

Atg5, autophagy related gene 5

SIRS, systemic inflammatory response syndrome

SPINK1, serine protease inhibitor Kazal type 1

Spink3, serine protease inhibitor Kazal type 3

CHOP, C/EBP homologous protein

UPR, unfolded protein response

LPS, lipopolysaccharide

XBP-1, X-box binding protein 1

BiP, Ig H chain binding protein

ERAD, endoplasmic reticulum-associated degradation

## 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症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つに分けられる。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、高サイトカイン血症の発症機序については、いまだ研究段階である。またなぜ重症化する人と、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、今回私が膵炎発症・進展過程のメカニズムについて、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。重症であるかどうかを判定するための、スコアを用いた重症度判定基準、予後を反映する Stage 分類と Stage 別の致死率について、表 2、3 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

---

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 $\leq$ -3 mEq/l	
BUN $\geq$ 40 mg/dl (or Cr $\geq$ 2.0 mg/dl)	各2点
予後因子②: Ca $\leq$ 7.5 mg/dl, FBS $\geq$ 200 mg/dl, PaO <sub>2</sub> $\leq$ 60 mmHg	
LDH $\geq$ 700 IU/l, 総蛋白 $\leq$ 6.0 g/dl, プロトロンビン時間 $\geq$ 15秒	
血小板 $\leq$ 10万/mm <sup>3</sup> , 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。	

---

表3. 急性膵炎のStage 分類

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 —Co-localization 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。1960年頃より、活性化は‘腺房細胞内’からでも起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>1</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>2-4</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。最近では、必ずしもカテプシン B だけにこだわるのではなく、リソゾームとチモーゲン顆粒が共存するようになるということで、Co-localization 説として紹介されている。

一方、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う autoactivation 説が注目され始めた<sup>5</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 co-localization 説と autoactivation 説が最も有力な二大仮説(表4)とされているが、いまだに結論は得られてはいない。

表4. 急性膵炎発生メカニズムに関する co-localization 説と autoactivation 説

	トリプシノーゲンを 活性化する因子	膵房細胞内 のpH 環境	カテプシンBの役割
Co-localization 説	カテプシンB	中性～アルカリ	トリプシノーゲン活性化
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

膵炎は临床上、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>6, 7</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 $\alpha$ 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>8</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>6</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>6</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>9</sup>。その後も遺伝性膵炎に関係する変異として、68A→G (Lys23Arg)、47C→T (Ala16Val)、65A→G (Asp22Gly)、-28delTCCが発見された<sup>9, 10</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>11</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>12</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性化に障害があることが証明されている<sup>13-15</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>10</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5)。

表5. 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 Inhibitor ; 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>16</sup>、Kassell らによって一次構造が決定された<sup>17</sup>。アプロチニンという商品名で急性膵炎に対して使用されていたが、ウシ蛋白であるためアレルギー反応が起きやすいことから、最近では使用されなくなった。

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。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 の現在の正式な名称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、マウスでは serine protease inhibitor Kazal type 3: *Spink3*) である。Greene らによりその一次構造が決定され<sup>18</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>19</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、連鎖反応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比較的弱く、しかも活性阻害は一時的である。トリプシンと PSTI を混合しておくと、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、膵プロテアーゼ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、PSTI の阻害能を超えると、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。

#### 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。

そこで熊本大学旧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>20</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>21</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>22</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変わり、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>23</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、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>23</sup>。この他、Witt ら<sup>21</sup> は 2T→C 変異を膵炎家系に報告しているが、この変異は initiation 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 活性が低下するか依存するといえる。

## 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、ほかのものと入れ替えてみる、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ままでもない。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。それは 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 回に 1 回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。ある遺伝子/タンパク質の働きを知るには、余分に付け加えること以外に欠失させることによっても知見が得られる。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ない、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 Evans ら<sup>24</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 らにより、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、ES 細胞由来の遺伝的背景を持つ子孫マウスが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経て 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。

#### 1-11. *Psti*(*Spink3*) 欠損マウスの表現型

以上の遺伝子ターゲティング法を用いた遺伝子改変マウスの作成技術を用いて、私が所属した熊本大学発生医学研究センター臓器形成学教室において、*Psti* (以下、*Spink3*) 欠損マウスが作成された。*Spink3* 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。空胞はオートファゴゾームおよび、オートファゴゾームとライソゾームが融合したオートライソゾームであり、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。また、*Spink3* 欠損マウスでは、新たな腺房細胞の再生が見られなかった。したがって *Spink* 分子は膵腺房細胞の integrity の維持と再生に不可欠であると考えられた<sup>25</sup>。

#### 1-12. オートファジーとは

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、ハンチントン舞蹈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。

### 1-13. オートファジーの機構

細胞がある種のストレスである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、オートファゴソームまたはオートファジックベジクル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。オートファゴソームが形成されると、次にオートファゴソームと細胞内のライソソームが膜融合を起こす。こうしてライソソームと融合したものをオートライソソームと呼ぶ。オートライソソームの内部で、オートファゴソームに由来する分解すべきタンパク質と、ライソソームに由来するさまざまなプロテアーゼが反応し、この結果、オートファゴソーム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。

### 1-14. 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、一度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細胞死が主要な経路とされている。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報告されており、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明らかとなってきた。

表6. 細胞死の種類

	プログラム細胞死		
	タイプ 1 アポトーシス	タイプ 2 オートファジー細胞死	ネクローシス
核	核の濃縮、顕著なピクノーシスがみられる。	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。
細胞質	容積の減少を特徴とする。	多数の自食空胞(オートファゴゾーム)が出現。	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事もある。	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。	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である。

## 1-15. *Spink3/Atg5* 二重欠損マウスの作成と解析

以上のことから、*Spink3* 欠損マウスにおける膵腺房細胞の破壊には、オートファジーが関連していることが示唆された。それでは、オートファジーはどのようなメカニズムで腺房細胞の破壊に関与しているのだろうか？この疑問を解決するために、オートファジーに必須とされる autophagy related gene 5 (*Atg5*) 遺伝子と *Spink* 遺伝子の二重欠損マウスを作成し、その表現型を解析することとした。そうすることで、今なお不明な点が多い急性膵炎の発症機構の解明を試みた。

膵臓におけるオートファジーの誘発因子は何であろうか。膵臓には豊富な小胞体が存在すること、細胞内の蛋白質を管理するという点でオートファジーと小胞体に共通点があること、細胞がストレスに曝されると小胞体ストレス応答が発現することから、膵臓のオートファジーの誘導に小胞体ストレスが関わっている可能性を考えた。

## 1-16. 小胞体ストレスとは

小胞体には、多種多様な分子シャペロン(小胞体のフォールディング能力を増強する小胞体シャペロンや GRP78/Bip、GRP94、GRP170 などの UPR: unfolded protein response を誘導する分子)やフォールディング酵素(ジスルフィド結合や糖鎖付加を触媒する)が存在し、これら小胞体シャペロンの作用により通常新生タンパク質はきわめて効率よく折り畳まれている。しかしながら、時として(確率論的にも)高次構造形成に失敗することはあるようで、このような場合、小胞体関連タンパク質分解機構 (endoplasmic reticulum-associated degradation: ERAD) が対処する。すなわち、高次構造の異常なタンパク質は小胞体内から細胞質へ送り出され、ユビキチン・プロテアソーム系によって処分される。新規に合成されたタンパク質の 30% は一度も使われることなく分解されるとも言われている。フォールディングと分解という 2 つの全く逆方向の作用により小胞体における品質管理機構は成立している。

小胞体ストレスとは、このようなバランスに変化が生じた結果、小胞体内に高次構造の異常なタンパク質が蓄積する状況を指す。①環境要因的なストレスなどによりフォールディング装置や分解装置が破綻した場合、②装置は正常であってもそれらの処理能力を超える量のタ

ンパク質が小胞体内に送り込まれる場合、③遺伝子変異などによって元来正常にフォールディングができないタンパク質が合成されるとき、などに小胞体ストレスが起こる。これに対する細胞側の備えを小胞体ストレス応答とよぶ。

小胞体内にフォールディングできないタンパク質が蓄積すると、細胞は以下の三つの応答をする。①小胞体にそれ以上新生タンパク質が送り込まれないようにして負荷を軽減する翻訳抑制、②小胞体シャペロンの転写誘導による小胞体内フォールディング容量の増強、③ ERAD 因子の転写誘導による分解機構の容量の増強、である。いずれもきわめて合目的的応答である。それでも状況が改善しない場合には、アポトーシスを起こして細胞が死滅する。

#### 1-17. 小胞体ストレスと急性膵炎

最近の遠藤らの報告では、小胞体ストレス応答に伴う CHOP の発現と、肺の炎症性疾患の関連が指摘されている<sup>26</sup>。Chop 遺伝子の欠損マウスでは、LPS (lipopolysaccharide) を気管内投与して作成した肺炎の重症度が減弱する。本現象は、CHOP から Caspase-11 を経て IL-1 $\beta$  産生へと至る経路の抑制による<sup>27</sup>。一方、アルギニンを腹腔内投与することで作成したラットの実験性急性膵炎モデルにおいて、小胞体ストレス応答が亢進していたとする報告がある<sup>28</sup>。このことから、肺炎のみならず、急性膵炎の進展にも小胞体ストレスが関与している可能性があると考え、Chop 遺伝子の欠損マウスに急性膵炎を惹起させる実験系を計画した。Chop 欠損マウスは正常に出生・発育し、通常の状態では特に変わった表現型は示さない。

#### 1-18. セルレインおよび LPS 投与によるマウス急性膵炎

セルレインはコレシストキニンのアナログであり、膵臓の腺房細胞に過剰な外分泌負荷を誘導し、急性膵炎を惹起する作用がある<sup>25</sup>。この場合の急性膵炎は、腺房細胞間の軽度の浮腫と炎症細胞浸潤を伴う、比較的軽症な膵炎である。マウスが死に至ることもほ

とんどない。一方、LPS は生体内で iNOS を誘導し、各種の炎症性サイトカインを活性化させ systemic inflammatory response syndrome (SIRS) を惹起する物質である。例えば、LPS を経気管的に投与すると、septic lung model を作成することができる<sup>26</sup>。また、LPS の腹腔内単独投与でも、軽度の急性膵炎は惹起される。更に LPS とセルレインを併用することで重症化した急性膵炎モデルを作成することが出来る<sup>29, 30</sup>。これまでの報告を参考にして、LPS の投与回数を若干アレンジし、セルレインと合わせて腹腔内投与することで、私はより重症化した急性膵炎を作成した。

#### 1-19. マウス急性膵炎における小胞体ストレス応答の発現解析

マウスに、セルレイン(1時間おきに6-12回)を腹腔内投与して急性膵炎を作成し、セルレインの投与量と膵炎の重症度、小胞体ストレス応答の発現、カスパーゼ11や IL-1 $\beta$ 等の炎症性メディエータの発現との関係を解析した。また、マウスに LPS とセルレインを投与して重症膵炎を惹起させ、同様に小胞体ストレス応答の発現と炎症性メディエータの発現を解析した。

#### 1-20. *Chop* 欠損マウスを用いた急性膵炎の重症度解析

熊本大学分子遺伝学、後藤知己博士のご好意により、*Chop* 欠損マウス(*Chop*<sup>-/-</sup>マウス)を供与して頂いた。*Chop*<sup>-/-</sup>マウスは、正常に発育し、繁殖可能である。LPS とセルレインによる重症急性膵炎を野生型(*Chop*<sup>+/+</sup>)マウス、および *Chop*<sup>-/-</sup>マウスで惹起し、表現型の比較を行った。

#### 1-21. *Chop/Spink3* 二重欠損マウスの作成と解析

当初の疑問である、オートファジーと小胞体ストレスの関係を検討するために、*Chop* 遺伝子と *Spink3* 遺伝子の二重欠損マウスを作成し、その表現型を解析した。

## 第二章 実験材料と方法

本実験を行うにあたり、さまざまな分子生物学・遺伝子工学的手法を用いたため、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19年度熊本大学動物実験計画の承認番号:19-156、課題名:膵分泌性トリプシンインヒビター(PSTI)の機能解析および平成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 (Sodium dodecylsulfate) 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 Tris-EDTA (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 (NaCl-sodium citrate)、1 mM EDTA、20 mM Tris HCl (pH 7.5)

### 2-2. PCR ( polymerase chain reaction )による genotyping

*Psti* (以下、*Spink3*) については、targeting vector<sup>25</sup> の neo cassette 内、および *Spink3* 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'

*Spink3* exon 1- intron 1 (292 bp wild)

mPsti-1: 5' -agttcttctggcttttgaccc- 3'

mPsti-24: 5' -ctttgccaccacatcccaaag- 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

*Atg5* については、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 水島昇先生(現・東京医科歯科大学)のご教授により、targeting vector の neo cassette により置換される *Atg5* gene の exon3 内、および置換部位の外側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。

*Wild-type allele* (351 bp)

5exon 3-1: 5' -gaatatgaaggcaccctgaaatg-3'

APG5 Short2: 5' -gtactgcataatggttaactcttgc-3'

*Knockout allele* (574 bp)

APG5 check2: 5' -acaacgtcgagcacagctgccaagg-3'

APG5 Short2: 5' -gtactgcataatggttaactcttgc-3'

PCR 反応条件: 94°C 5 分→(94°C 30 秒、60°C 30 秒、72°C 1 分)×30 サイクル  
→72°C 7 分

*Chop* については、wild allele 内に以下の2ヶ所、knockout allele にも以下の2ヶ所のプライマーを設定し、別々のバンドでそれぞれの allele を確認することで genotyping を行った。

*Wild-type allele* (約 1.1kbp)

sCHOP1: 5'-cctggattaagcttggtagt-3'

aCHOP5: 5'-ggacgcagggtcaagagtag-3'

### *Knockout allele* (約 650bp)

nCHOP-1 (neo cassette 内): 5'-gagaaaaaagagtacaaatggcctgg-3'

mChop: 5'-atgccttctatcgccttcttgacgag-3'

PCR 反応条件: 94°C 5 分 → (94°C 30 秒、60°C 30 秒、72°C 1 分) × 30 サイクル → 72°C  
7 分

## 2-3. *Spink3/Atg5* 二重欠損マウスの作成

*Spink3* ヘテロ欠損マウスは、熊本大学発生医学研究センター臓器形成分野にて、遺伝子ターゲティング法により樹立されたものを使用した<sup>25</sup>。*Atg5* ヘテロ欠損マウスは、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 水島昇先生(現・東京医科歯科大学)より頂いた。それぞれのヘテロマウスを交配し、*Spink3/Atg5* ダブルヘテロマウスを得た。ダブルヘテロマウスを生殖可能週数まで育て、交配して、*Spink3/Atg5* 二重欠損(ダブルノックアウト)マウスを作成した。

## 2-4. Histological 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。

## 2-5. Electron microscopy

腓組織は 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。

## 2-6. 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, Japan) 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°C 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 TEに溶解し、-80°Cで保存した。

## 2-7. Western blot analysis

脾臓をlysate bufferに入れ、水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, Bio-Rad, Hercules, CA) で測定した。

Extract (20 µg protein/lane) は12%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, Bedford, 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caspase-9抗体、抗caspase-3抗体、抗actin抗体いずれも1000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, Piscataway, 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。

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, St. Louis, MO)

## 2-8. 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。

## 2-9. トリプシン活性の測定

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 Boc-Gln-Ala-Arg-MCA を用いて反応産物であるAMCの生成量を分光蛍光光度計にて測定した。測定値は膵ホモジネートのタンパク質濃度で補正した。酵素活性は1分間あたり  $1 \mu\text{mol}$  のAMC生成量を 1 unit と定義した。

## 2-10. セルレイン急性膵炎の作製

生後6~7週の雌 (18~22 g) のマウスを、実験前日夜より絶食とした。1時間毎にセルレイン  $50 \mu\text{g}/\text{kg}$  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。

## 2-11. LPSおよびセルレイン共投与による重症急性膵炎の作製

上記セルレイン投与に加えて、LPSを実験前日夜の絶食開始時、当日朝のセルレイン1回目投与時、夕方のセルレイン最終投与時の計3回、それぞれ $500 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{body weight}$  i.p.を行い、重症化した膵炎モデルを作成した。

## 2-12. 血清アミラーゼ値の測定

マウスより採血した血液を、 $4^{\circ}\text{C}$ 、15,000 rpmで5分間遠心した。上清をアミラーゼの測定に利用した。測定には、アミラーゼ特異的基質である Gal-G2-CNP を使用した。

## 2-13. RT-PCR法による各種遺伝子の発現解析

注出したRNAより、Invitrogen社のThermoscript RTキットを用いて、cDNAを作成した。解析の目的とする遺伝子に応じたプライマー(下記)を使用してPCRを行い、1%アガロースゲルによる電気泳動で分離を行い、メッセージレベルでの遺伝子の発現解析を行った。

使用したプライマー:

IL-1 $\beta$  (384bp)

sense primer, 5'-ACTCATTGTGGCTGTGGAGAAG-3'

antisense primer, 5'-GCCGTCTTTCATTACACAGGAC-3'

Caspase-1 (372bp)

sense primer, 5'-ACACGTCTTGCCCTCATTATCTGC-3'

antisense primer, 5'-CCACTCCTTGTTTCTCTCCACG-3'

Caspase-11 (439bp)

sense primer, 5'-GCGTTGGGTTTTTGTAGATGCC-3'

antisense primer, 5'-ATGTGCTGTCTGATGTCTGGTG-3'

BiP (231bp)

sense primer, 5'-GAAAGGATGGTAAATGATGCTGAG-3'

antisense primer, 5'-GTCTTCAATGTCCGCATCCTG-3'

CHOP (357bp)

sense primer, 5'-CATACACCACCACACCTGAAAG-3'

antisense primer, 5'-CCGTTTCCTAGTTCTTCCTTGC-3'

G3PDH (380bp)

sense primer, 5'-GGAAAGCTGTGGCGTGATG-3'

antisense primer, 5'-CTGTTGCTGTAGCCGTATTC-3'

XBP-1 (600bp)

sense primer, 5'-AAACAGAGTAGCAGCGCAGACTGC-3'

antisense primer, 5'-GGATCTCTAAAACCTAGAGGCTTGGTG-3'

PCR 反応条件:

IL-1 $\beta$ , Caspase-11, Caspase-1, CHOP: 94°C 5分→(94°C 15秒、55°C 30秒、68°C

1分)×30サイクル→72°C 7分

BiP, G3PDH, XBP-1: 94°C 5分→(94°C 15秒、55°C 30秒、68°C 1分)×27サイクル  
→72°C 7分

## 2-14. *Chop/Spink3* 二重欠損マウスの作成

*Chop* および *Spink3* それぞれのヘテロマウスを交配し、*Chop/Spink3* ダブルヘテロマウスを得た。ダブルヘテロマウスを生殖可能週数まで育て、交配して、*Chop/Spink3* 二重欠損 (ダブルノックアウト) マウスを作成した。

### 第三章 *Spink3/Atg5* 二重欠損マウスの解析

#### 3-1. 出生率および生存率

*Spink3/Atg5* 二重ヘテロマウス同士を交配することで、*Spink3/Atg5* 二重欠損マウスが出生する。理論上は、1/16 (6.25%)の割合で *Spink3/Atg5* 二重欠損マウスが出生することになる。これまでに実際に得られたマウスの総数とそのうち *Spink3/Atg5* 二重欠損マウスが占める割合を、出生直後の 0.5 dpp と出生直前の 16.5~18.5 dpc について図1に示す。この結果によると、*Spink3/Atg5* 二重欠損マウスが正常に出生してくる割合はかなり低いことになる。

そこで、*Spink3/Atg5* 二重ヘテロマウスを交配して得られる出生1週間目までの仔について、各遺伝子型における生存期間の比較を行った。結果は図2に示す。*Spink3/Atg5* 二重欠損マウスは出生したとしても早期に死亡しており、*Spink3* 単独欠損マウス(以下、*Spink3*<sup>-/-</sup>マウス)よりも生存期間は短かった。

#### 3-2. 表現型の解析

*Spink3*<sup>-/-</sup>マウスでは、出生直後より膵臓に過剰な空胞変性を認め(図 3C)、出生 3.5 日までに膵組織は自己消化によりほとんど消失し、空胞はオートファジーの誘導によるものであることが以前に臓器形成分野より報告されている<sup>25</sup>。それに対し、*Spink3/Atg5* 二重欠損マウスでは、0.5 dpp における膵組織の空胞出現・腺房細胞の破壊像が組織学的に減弱した(図 3D)。

#### 3-3. 電子顕微鏡による解析

電子顕微鏡による観察では、*Spink3*<sup>-/-</sup>マウスの膵腺房細胞は、オートファジーの誘導による多数の空胞の出現を認めた。一方、*Spink3/Atg5* 二重欠損マウスの膵腺房細胞では、電子顕微鏡上も空胞の出現頻度は低下していた(図 4)。

### 3-4. 血清アミラーゼ値の解析

次に、*Spink3/Atg5* 二重ヘテロマウスの交配で得られる仔マウスの 0.5 dpp における血清アミラーゼ値について検討した(図 5)。野生型の血清アミラーゼ値は  $3,960 \pm 555$  IU/L であった。一方、*Spink3*<sup>-/-</sup> マウスでは血清アミラーゼは著明に上昇していた ( $15,500 \pm 5,887$  IU/L)。 *Spink3/Atg5* 二重欠損マウスではアミラーゼ値の上昇は抑制されていた ( $8,700 \pm 5,042$  IU/L)。

### 3-5. 膵房細胞におけるトリプシン活性の解析

急性膵炎の発症過程において、正確な機序は不明であるが膵腺房細胞内のトリプシン活性が上昇する。実際に、*Spink3*<sup>-/-</sup> マウスでは膵腺房細胞中のトリプシン活性が上昇していた(図6)。一方、*Spink3/Atg5* 二重欠損マウスでは、トリプシン活性は *Spink3*<sup>-/-</sup> マウスに比して約 30%程度の減少を認めた。

以上の結果より、*Spink3/Atg5* 二重欠損マウスの膵腺房細胞では、*Spink3*<sup>-/-</sup> マウスに比して組織学的、生化学的な破壊像が減弱しており、それは直接的にはトリプシン活性の低下によるものであると考えられた。*Spink3*<sup>-/-</sup> マウスと *Spink3/Atg5* 二重欠損マウスの違いは、オートファジーの有無である。すなわち、オートファジーが存在することで、膵腺房細胞内におけるトリプシンが活性化されている可能性が示唆された。

## 第四章 セルレイン投与による急性膵炎モデルと、同モデルにおける小胞体ストレスの発現解析

### 4-1. セルレイン膵炎マウスの膵組織像

ICR マウスにセルレインを腹腔内投与し、セルレイン膵炎マウスを作成した(図7)。セルレインの投与量に比例して、組織学的な膵の炎症・破壊像は増強した(図7A)。また、オートファジーの誘導を示す、LC3-IIの発現も増強した(図7B)。

### 4-2. セルレイン膵炎マウスにおける血清アミラーゼ値の解析

セルレイン膵炎マウスモデルにおける血清アミラーゼ値は、生食投与群で $8,467 \pm 1,101$  IU/L、セルレイン6回、9回、12回投与群でそれぞれ $29,933 \pm 14,478$ 、 $53,067 \pm 8,247$ 、 $59,267 \pm 22,049$  IU/Lであった(図8)。このように、アミラーゼ値は膵の組織学的な破壊像に比例して著明な上昇を認めた。すなわち、急性膵炎の増強に伴って、オートファジーの亢進と血清アミラーゼ値の上昇が認められ、オートファジーが膵炎の進展に関わりがある可能性が示唆された。

以上の実験を、C57BL/6Jマウスでも行った。ICRマウスと同傾向の結果であったが、同じセルレインの投与量で比較すると、C57BL/6Jマウスの方が組織の破壊像・血清アミラーゼ値の上昇共に軽微であった。すなわち、同じマウスであっても、系統によって膵炎の重症度に差がある可能性が示唆された。

### 4-3. セルレイン膵炎マウスと小胞体ストレス

最近、肺の炎症性疾患に小胞体ストレスが関与している可能性が指摘されている<sup>26, 27</sup>。急性膵炎の発症、重症化機構の解明を目的として、セルレイン膵炎マウスにおける小胞体ストレスの誘導を検討した。

小胞体膜上にはIRE1、PERK、ATF6といったストレスセンサーが存在し、小胞体ストレスの亢進とともにそれらのセンサーが活性化する(図9)。その下流にはいくつかの物質が介在するが、特にXBP-1とCHOPが主要な働きを有する。小胞体ストレス

は細胞を保護するために誘導される機構であり、細胞内の過剰な不良蛋白の蓄積により誘導される。それにより、細胞は蛋白合成を一時的に停止したり、不良蛋白を分解して細胞を守ろうとする。しかし、ストレスが過剰となりその修復が不可能となったとき、最終的にはアポトーシスが誘導されてその細胞自体が排除される。これは、生体全体を保護するという意味では、合目的な反応である。この小胞体ストレスからアポトーシスが誘導される際に、中心的な役割を示すのが核内の転写因子CHOPである（図9）。

CHOPが誘導されると、その標的遺伝子はいまだ不明であるが、ミトコンドリアを介してcaspase-9およびcaspase-3のアポトーシス誘導性カスパーゼが活性化されてアポトーシスに至るとされている。一方、それとは別にCHOPから炎症を惹起する経路の存在が示唆されている。これは、CHOPによりcaspase-11、caspase-1といったIL-1 $\beta$ 誘導性カスパーゼが活性化されて最終的にproIL-1 $\beta$ がIL-1 $\beta$ に変換されておこるものである。すなわち、過剰な小胞体ストレスによりCHOPが誘導されると、アポトーシスとIL-1 $\beta$ 産生の両者が惹起されることになる（図9）。

セルレイン膵炎マウスでは、セルレインの投与量にほぼ比例してBiP、XBP-1の発現亢進を認めた（図10）。これは、膵炎の進展に伴って小胞体ストレスが誘導されることを示す結果である。更に、CHOPについても次第に発現の増強を認めており、急性膵炎における小胞体ストレス-CHOP 経路の関与が確認された。

## 第五章 Chop 欠損マウスにおけるセルレイン膵炎モデルの解析

### 5-1. Chop 欠損マウスにおけるセルレイン膵炎の膵組織像

小胞体ストレス-CHOP 経路と膵炎の更なる関係を検証するために、Chop 欠損マウス ( $Chop^{-/-}$ マウス) を用いてセルレイン膵炎実験を行った。図11に組織像を示す。セルレイン12回投与群で比較したが、Chop 野生型マウス(以下、 $Chop^{+/+}$ マウス)と  $Chop^{-/-}$ マウスの間に、明らかな差異は認めなかった。

### 5-2. 血清アミラーゼ値の解析

セルレイン膵炎において、 $Chop^{+/+}$ マウスと  $Chop^{-/-}$ マウスのいずれも血清アミラーゼ値の上昇を認めたが、両者間に有意な差を認めなかった(図12)。

### 5-3. TUNEL 染色および caspase-3、caspase-9 の発現解析

セルレイン膵炎において、 $Chop^{+/+}$ マウスと  $Chop^{-/-}$ マウス間で TUNEL 染色陽性細胞の出現頻度には有意な差を認めなかった(図13)。また、いずれにおいてもアポトーシス誘導性カスパーゼである caspase-9 および caspase-3 の活性化は認めなかった(図14)。

### 5-4. CHOP、caspase-11、caspase-1、IL-1 $\beta$ の発現解析

$Chop^{+/+}$ マウスにおけるセルレイン膵炎では軽度の CHOP の発現を認めた。しかし、IL-1 $\beta$  誘導性カスパーゼである caspase-11 と caspase-1 は  $Chop^{+/+}$ マウスでは軽度の発現を認めるのみ、 $Chop^{-/-}$ マウスでは発現がなく、さらにいずれのマウスにおいても IL-1 $\beta$  の発現は認めなかった(図15)。以上の結果より、マウスのセルレイン膵炎モデルでは、膵炎の程度について CHOP の有無による差は認めなかった。単純に考えると、急性膵炎と CHOP の発現の

間に関連性はないということになる。

しかしながら、セルレイン膵炎マウスにおける CHOP の誘導が比較的軽微であったこと、更に CHOP が十分に誘導されたときに活性化するはずの caspase-9 や caspase-11 等が活性化されていなかったことから、セルレイン単独投与による軽症急性膵炎では、CHOP の経路の関与を検討するには不十分である可能性を我々は考えた。

## 第六章 LPS・セルレイン投与による重症急性膵炎モデルの解析

### 6-1. 膵組織像

急性膵炎と CHOP の関連を正確に検証する手段として、より重症化した膵炎モデルが必要と考え、セルレインに加えて LPS をマウスに投与して膵炎モデルを作成した。これは、以前に両者を併用することでより重症化した膵炎を誘起することができるとする報告があるためである<sup>31, 32</sup>。その報告では、LPS は単回投与であったが、方法にも示したようにそれを3回投与とすることでさらに重症化した膵炎を惹起することを試みた。

C57BL/6J マウスを用いて実験を行ったところ、組織学的にはセルレイン単独群に比して、LPS 併用群で明らかに炎症所見・腺房細胞破壊像の増強を認めた(図16)。LPS 単独投与群については、セルレイン6回投与程度の炎症像であった。

### 6-2. 血清アミラーゼ値の解析

同様のマウスで血清アミラーゼ値について解析した。生食投与群、セルレイン単独12回投与群、LPS 単独3回投与群、セルレイン12回+LPS3回併用群(セルレイン+LPS群)、において、アミラーゼ値はそれぞれ  $970 \pm 171$ 、 $5,400 \pm 1,419$ 、 $2,600 \pm 1,418$ 、 $11,067 \pm 1,762$  IU/L であった。このように、LPS を併用することで血清アミラーゼは更に上昇した(図17)。すなわち、セルレインにLPSを併用することで、組織学的のみならず生化学的にも急性膵炎の重症度が増悪することを示唆した。

### 6-3. Caspase-9、caspase-3 の発現解析

この実験系で、アポトーシス誘導性のカスパーゼである caspase-9 および caspase-3 の発現を解析したところ、セルレイン+LPS群で両者とも軽度の発現を認めた(図18)。

#### 6-4. TUNEL 染色

セルレイン+LPS 群で TUNEL 陽性細胞の増加を認めた(図 19)。

#### 6-5. BiP、CHOP、caspase-11、caspase-1、IL-1 $\beta$ の発現解析

セルレイン+LPS 群で BiP と CHOP の著明な誘導を認めた。また、CHOP の下流のカスケードで、IL-1 $\beta$  誘導性のカスパーゼである caspase-11 と caspase-1、および IL-1 $\beta$  の発現増強を認めた(図 20)。

以上のことから、セルレインに LPS を併用することで、脾臓において強い小胞体ストレスが誘導され、その結果として CHOP が強く発現し、その下流のカスケードが活性化することでアポトーシスおよび IL-1 $\beta$  産生反応の亢進が起こることが判明した。したがって、この実験系を用いれば、脾炎と CHOP の関連がより正確に検証できると考えた。

## 第七章 *Chop* 欠損マウスにおける LPS・セルレイン投与による重症急性膵炎モデルの解析

### 7-1. 膵組織像

前章の結果を受け、*Chop*<sup>+/+</sup>マウスおよび *Chop*<sup>-/-</sup>マウスにセルレインおよび LPS を投与してその表現型を比較した。セルレイン+LPS 群では、*Chop*<sup>+/+</sup>マウスでセルレイン単独群に比して急性膵炎の重症度が増悪したが(図 21A, C, E)、*Chop*<sup>-/-</sup>マウスではセルレイン単独投与時以上の急性膵炎の重症化は認めなかった(図 21B, D, F)。すなわち、セルレイン+LPS 群では、*Chop*<sup>+/+</sup>マウスに比して *Chop*<sup>-/-</sup>マウスで急性膵炎の重症度が減弱した。

### 7-2. 血清アミラーゼ値の解析

生食群、セルレイン 12 回群、セルレイン+LPS 群それぞれについての血清アミラーゼ値は、*Chop*<sup>+/+</sup>マウスで 940±35、8,085±1,761、10,690±692 IU/L、*Chop*<sup>-/-</sup>マウスで 990±159、7,940±482、7,920±1,032 IU/L であった(図 22)。このように、*Chop*<sup>-/-</sup>マウスではセルレイン単独投与時以上の上昇は認めなかった。*Chop*<sup>+/+</sup>マウスでは、LPS を併用することでアミラーゼ値は更に上昇した。このことは、セルレインに LPS を加えた重症化した膵炎のモデルにおいては CHOP が血清アミラーゼの上昇、すなわち膵細胞障害にも寄与していることを示唆する。

### 7-3. Caspase-9、caspase-3 の発現解析

アポトーシス誘導性のカスパーゼ、すなわち caspase-9 および caspase-3 は、セルレイン+LPS 群において、*Chop*<sup>+/+</sup>マウスおよび *Chop*<sup>-/-</sup>マウスの両方で軽度の発現を認めるが、両者に有意差はなかった(図 23)。

#### 7-4. TUNEL 染色

*Chop*<sup>+/+</sup>マウスのセルレイン+LPS 群では、TUNEL 陽性細胞を認めた。しかし、*Chop*<sup>-/-</sup>マウスのセルレイン+LPS 群では TUNEL 陽性細胞をほとんど認めなかった(図 24)。

#### 7-5. CHOP、caspase-11、caspase-1、IL-1 $\beta$ の発現解析

*Chop*<sup>+/+</sup>マウスのセルレイン+LPS 群では、CHOP、IL-1 $\beta$  誘導性のカスパーゼである caspase-11 と caspase-1、および IL-1 $\beta$  の著明な発現増強を認めた。しかし、*Chop*<sup>-/-</sup>マウスのセルレイン+LPS 群ではこれらの分子の発現増強は認めなかった(図 25)。

以上の結果より、セルレインに LPS を併用した重症急性膵炎モデルでは膵炎の重症化の進展に小胞体ストレス-CHOP 経路、特に IL-1 $\beta$  誘導性のカスパーゼ系が関与していることが示された。

## 第八章 *Chop/Spink3* 二重欠損マウスの解析

*Spink3* 欠損マウスで膵臓に誘導されたオートファジーと、小胞体ストレス応答の関係を検討するために、*Chop/Spink3* 二重欠損マウスを作成し、0.5 dppにおける膵臓の表現型と血清アミラーゼ値について検討した。

### 8-1. 膵組織像

*Chop/Spink3* 二重欠損マウスでは、HE 染色上は *Spink3*<sup>-/-</sup>マウスの膵臓とほぼ同程度の腺房細胞の破壊像を認めた(図 26)。

### 8-2. 血清アミラーゼ値の解析

血清アミラーゼ値についても *Chop/Spink3* 二重欠損マウスと *Spink3*<sup>-/-</sup>マウスに有意な差は認めなかった(図 27)。

以上の結果より、オートファジーの進展と、小胞体ストレス-CHOP 経路には関連がないと結論した。

## 第九章 考察

本研究では、急性膵炎の発症、重症化機構の解明を目的とした。

まず、*Spink3* 欠損マウスで認めた膵腺房細胞の空胞変性、すなわちオートファジーの誘導が膵にどのような影響を及ぼすのかを検討する目的で *Spink3/Atg5* 二重欠損マウスを作成した。セルレイン膵炎ではオートファジーの誘導も亢進していたため、*Spink3* 欠損マウスにおけるオートファジー誘導の意義が判明すればオートファジーの膵炎に対する意義の解明にも繋がることになる。結果に示したように、*Spink3/Atg5* 二重欠損マウス、すなわちオートファジーが惹起されないマウスでは、膵腺房細胞の破壊像は減弱し、血清アミラーゼ値は低下した。このことは、オートファジーが存在することで、膵炎の進展が促進されている可能性を示唆する。実際に、*Spink3/Atg5* 二重欠損マウスでは膵のトリプシン活性が低下していたことから、オートファジーによってトリプシンが活性化されていると考えられる。これは急性膵炎発症のメカニズムとしてこれまで提唱されていた co-localization 説、autoactivation 説を包含して説明できるオートファジー説ということになる。急性膵炎時には膵臓にオートファジーが出現し、それが腺房細胞内のトリプシノーゲンを活性化する、というメカニズムである。その証明には、これから多くの検証が必要であるが、この *Spink3/Atg5* 二重欠損マウスの解析により少なくともその端緒が切れたということができよう。

ここで、オートファジー（ひいては、おそらく急性膵炎）を誘発する因子は何か？という疑問が生ずる。我々が着目したのは、小胞体ストレスであった。その理由として、①膵臓は蛋白質のターンオーバーが早い臓器であり、正常の膵組織には他臓器に比して豊富な小胞体を認めること ②オートファジーと小胞体の間に“タンパク質を管理する”という共通の役割があること ③結果に示したように、実際にマウスのセルレイン膵炎では、オートファジーの誘導とは別に小胞体ストレスが誘導されていたことが挙げられる。すなわち、この段階で、小胞体ストレス応答の発現→オートファジーの誘導→急性膵炎の発症・重症化 というストーリーを推測した。

最近の報告では、アルギニン投与による膵炎でも小胞体ストレスが誘導されていた<sup>28</sup>。我々は小胞体ストレス応答の中で CHOP という分子に着目し、*Chop* のノックアウトマウスを用いて、急性膵炎と小胞体ストレス-CHOP 経路の関係を検証した。セルレイ

ン単独膵炎では、CHOPの有無で差を認めなかった。オートファジーはセルレイン単独膵炎でも著明に誘導されることから、この段階で小胞体ストレス-CHOP経路とオートファジーの関連性は低いと判断した。しかし、セルレイン単独膵炎ではCHOPの発現が軽度であったことから、CHOPの経路が膵炎の進展過程で果たす正確な役割を検討するためには、違った実験系で検討する必要があると判断した。

そこで、セルレインとLPSを併用した重症膵炎モデルについて検討した。LPSは単球を刺激して各種のサイトカインを分泌させるエンドトキシンである。そのサイトカインによりNOが活性化され、そのNOの作用で毛細血管拡張と血管壁の透過性が亢進して細胞にダメージを与える。したがって、セルレインとLPSの併用によりマウスに重症化した膵炎を誘導することができる。LPSを投与して膵炎を重症化させるとCHOPがなければ膵炎が軽症化することを確認した。当初は、CHOPからアポトーシスに至るcaspase-9、caspase-3が*Chop*<sup>-/-</sup>マウスで抑制されているのではないかと考え、膵炎が軽症化する原因としてアポトーシスの抑制を考えていた。すなわち、アポトーシスが膵炎の重症化を促進している、とするものである。これはこれまでに提唱されてきた説<sup>33, 34</sup>と逆の意見ということになる。

しかし実際はセルレイン+LPS群でもそれらのアポトーシス誘導性カスパーゼはそれほど発現しておらず、さらにその発現の程度についても*Chop*<sup>+/+</sup>マウスおよび*Chop*<sup>-/-</sup>マウス間で差を認めなかった。すなわち、膵炎の重症化の進展に、CHOP-アポトーシスの経路は関与が低いという結果であった。

次に、CHOPからcaspase-11, caspase-1へと続く炎症反応の経路について検討した。すると、*Chop*<sup>-/-</sup>マウスのセルレイン+LPS群では、その経路が著明に抑制されていた。すなわち、膵炎の重症化進展に大きく寄与するのは、小胞体ストレス-CHOP-Caspase-11の経路であることが示された。

しかし、TUNEL染色でみると、*Chop*<sup>+/+</sup>マウスに比して*Chop*<sup>-/-</sup>マウスのセルレイン+LPS群ではTUNEL陽性細胞の著明な減少を認めた。このことは、*Chop*<sup>-/-</sup>マウスでやはりアポトーシスが抑制されている可能性を示唆する。Caspase-1やIL-1 $\beta$ には、アポトーシスを誘導する働きもあるとされることから、このアポトーシスの抑制も小胞体ストレス-CHOP-Caspase-11

の経路の抑制によるものであると思われる。

一方、小胞体-CHOP 経路とオートファジーの関係を更に検証する目的で、CHOP と *Spink3* の二重欠損マウスを作成したが、*Spink3* 欠損マウスと二重欠損マウスの間には表現型に差を認めなかった。すなわち、やはり、小胞体-CHOP 経路とオートファジーの間には関連はないと結論する。

しかしながら、これで小胞体ストレス応答そのものとオートファジーの関係が完全に否定されたわけではない。なぜなら、今回の実験で検証したのは、膵炎とCHOPの関係だからである。CHOP はあくまでも、小胞体ストレス応答の結果として活性化される転写因子であり、*Chop* のノックアウトマウスでは小胞体ストレス自体が抑制されているわけではない。したがって、小胞体ストレスとオートファジーの関係をより詳細に検討するためには、IRE1、PERK、ATF6 といった小胞体ストレスセンサーが抑制された状況でオートファジーがどうなるか、それら小胞体ストレスセンサー分子と *Spink3* のダブルノックアウトを行うとどのような表現型になるのか、などの検討が必要である。

## 第十章 結語

本研究により、これまでほとんど解明されていなかった急性膵炎の発症過程が

- ① オートファジーとの関わり
- ② 小胞体ストレス(CHOP 経路)との関わり

で一部解明されたといえる。急性膵炎の発症にはオートファジーが、重症化には小胞体ストレスが関与するといえる。しかしながらその正確な機序の解明や、治療への応用についてははるか長い道のりを要すると思われ、この分野における基礎研究をさらに進めていくことが肝要である。

## 第十一章 参考文献

1. 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(2): 97-117.
2. Steer ML, Meldolesi J, Figarella C. Pancreatitis. The role of lysosomes. *Dig Dis Sci* 1984; 29(10): 934-8.
3. 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(4 PT 1): G508-16.
4. Steer ML, Meldolesi J. The cell biology of experimental pancreatitis. *N Engl J Med* 1987; 316(3): 144-50.
5. 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(1): 362-6.
6. Whitcomb DC, Gorry MC, Preston RA, Furey W, Sossenheimer MJ, Ulrich CD et al. Hereditary pancreatitis is caused by a mutation in the cationic trypsinogen gene. *Nat Genet* 1996; 14(2): 141-5.
7. Le Bodic L, Bignon JD, Ragueneas O, Mercier B, Georgelin T, Schnee M et al. The hereditary pancreatitis gene maps to long arm of chromosome 7. *Hum Mol Genet* 1996; 5(4): 549-54.
8. Rowen L, Koop BF, Hood L. The complete 685-kilobase DNA sequence of the human beta T cell receptor locus. *Science* 1996; 272(5269): 1755-62.
9. Gorry MC, Ghabbaizedeh D, Furey W, Gates Jr LK, Preston RA, Aston CE et al. Mutations in the cationic trypsinogen gene are associated with recurrent acute and chronic

pancreatitis. *Gastroenterology* 1997; 113(4): 1063-8.

10. Teich N, Ockenga J, Hoffmeister A, Manns M, Mossner J, Keim V. Chronic pancreatitis associated with an activation peptide mutation that facilitates trypsin activation. *Gastroenterology* 2000; 119(2): 461-5.

11. Nishimori I, Kamakura M, Fujikawa-Adachi K, Morita M, Onishi S, Yokoyama K et al. Mutations in exons 2 and 3 of the cationic trypsinogen gene in Japanese families with hereditary pancreatitis. *Gut* 1999; 44(2): 259-63.

12. Sibert JR. Hereditary pancreatitis in England and Wales. *J Med Genet* 1978; 15(3): 189-201.

13. Varallyay E, Pal G, Patthy A, Szilagyi L, Graf L. Two mutations in rat trypsin confer resistance against autolysis. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 243(1): 56-60.

14. Sahin-Toth M, Graf L, Toth M. Trypsinogen stabilization by mutation Arg117-->His: a unifying pathomechanism for hereditary pancreatitis? *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 264(2): 505-8.

15. Sahin-Toth M, Toth M. Gain-of-function mutations associated with hereditary pancreatitis enhance autoactivation of human cationic trypsinogen. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 278(2): 286-9.

16. Kunitz M, Northrop JH. The isolation of crystalline trypsinogen and its conversion into crystalline trypsin. *Science* 1934; 80(2083): 505-6.

17. KASSELL B, RADICEVIC M, ANSFIELD MJ, LASKOWSKI Sr M. The basic trypsin inhibitor of bovine pancreas. Iv. The linear sequence of the 58 amino acids. *Biochem Biophys Res Commun* 1965; 18: 255-8.

18. Greene LJ, Pubols MH, Bartelt DC. Human pancreatic secretory trypsin inhibitor. *Methods Enzymol* 1976; 45: 813-25.

19. Horii A, Emi M, Tomita N, Nishide T, Ogawa M, Mori T et al. Primary structure of human pancreatic alpha-amylase gene: its comparison with human salivary alpha-amylase gene. *Gene* 1987; 60(1): 57-64.
20. Kuwata K, Hirota M, Sugita H, Kai M, Hayashi N, Nakamura M et al. Genetic mutations in exons 3 and 4 of the pancreatic secretory trypsin inhibitor in patients with pancreatitis. *J Gastroenterol* 2001; 36(9): 612-8.
21. Witt H, Luck W, Hennies HC, Classen M, Kage A, Lass U et al. Mutations in the gene encoding the serine protease inhibitor, Kazal type 1 are associated with chronic pancreatitis. *Nat Genet* 2000; 25(2): 213-6.
22. Kuwata K, Hirota M, Shimizu H, Nakae M, Nishihara S, Takimoto A et al. Functional analysis of recombinant pancreatic secretory trypsin inhibitor protein with amino-acid substitution. *J Gastroenterol* 2002; 37(11): 928-34.
23. Hirota M, Kuwata K, Ohmuraya M, Ogawa M. From acute to chronic pancreatitis: the role of mutations in the pancreatic secretory trypsin inhibitor gene. *Journal of Pancreas* 2003; 4(2): 83-8.
24. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981; 292(5819): 154-6.
25. Ohmuraya M, Hirota M, Araki M, Mizushima N, Matsui M, Mizumoto T et al. Autophagic cell death of pancreatic acinar cells in serine protease inhibitor Kazal type 3-deficient mice. *Gastroenterology* 2005; 129(2): 696-705.
26. Endo M, Oyadomari S, Suga M, Mori M, Gotoh T. The ER stress pathway involving CHOP is activated in the lungs of LPS-treated mice. *J Biochem (Tokyo)* 2005; 138(4): 501-7.
27. Endo M, Mori M, Akira S, Gotoh T. C/EBP homologous protein (CHOP) is crucial for the induction of caspase-11 and the pathogenesis of lipopolysaccharide-induced

inflammation. *J Immunol* 2006; 176(10): 6245–53.

28. Kubisch CH, Sans MD, Arumugam T, Ernst SA, Williams JA, Logsdon CD. Early activation of endoplasmic reticulum stress is associated with arginine-induced acute pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 291(2): G238–45.

29. Kimura K, Shimosegawa T, Abe R, Masamune A, Satoh A, Takasu A et al. Low doses of lipopolysaccharide upregulate acinar cell apoptosis in cerulein pancreatitis. *Pancreas* 1998; 17(2): 120–6.

30. Ding SP, Li JC, Jin C. A mouse model of severe acute pancreatitis induced with caerulein and lipopolysaccharide. *World J Gastroenterol* 2003; 9(3): 584–9.

31. Lombardi B, Estes LW, Longnecker DS. Acute hemorrhagic pancreatitis (massive necrosis) with fat necrosis induced in mice by DL-ethionine fed with a choline-deficient diet. *Am J Pathol* 1975; 79(3): 465–80.

32. Koike H, Steer ML, Meldolesi J. Pancreatic effects of ethionine: blockade of exocytosis and appearance of crinophagy and autophagy precede cellular necrosis. *Am J Physiol* 1982; 242(4): G297–307.

33. Kaiser AM, Saluja AK, Sengupta A, Saluja M, Steer ML. Relationship between severity, necrosis, and apoptosis in five models of experimental acute pancreatitis. *Am J Physiol* 1995; 269(5 PT 1): C1295–304.

34. Kaiser AM, Saluja AK, Lu L, Yamanaka K, Yamaguchi Y, Steer ML. Effects of cycloheximide on pancreatic endonuclease activity, apoptosis, and severity of acute pancreatitis. *Am J Physiol* 1996; 271(3 PT 1): C982–93.

## Spink3/Atg5 二重欠損マウスの解析(図1~6)

図1: *Spink3/Atg5* 二重欠損マウスの割合  
(*Spink3*<sup>+/-</sup> *Atg5*<sup>+/-</sup> マウス同士の交配)

検討時期(日)	総数	うち、W KO (%)
0.5 dpp	423	7 (1.65%)
16.5 dpc~18.5 dpc	95	5 (5.26%)

N.S.  
(p=0.08)

図2: *Spink3*<sup>+/-</sup> *Atg5*<sup>+/-</sup> マウス同士の交配によって得られる仔の  
遺伝子型別の生存期間(生後一週間まで)

(死亡日)

遺伝子型	0.5dpp	1.5dpp	2.5dpp	3.5dpp	7.5dpp	7.5dpp(生存)	1.5日生存率 / 7.5日生存率 %
<i>Spink3</i> <sup>+/+</sup> <i>Atg5</i> <sup>+/+</sup>						9	100 / 100
<i>Spink3</i> <sup>+/-</sup> <i>Atg5</i> <sup>+/+</sup>	1					9	90 / 90
<i>Spink3</i> <sup>-/-</sup> <i>Atg5</i> <sup>+/+</sup>	1	1	1			1	50 / 25
<i>Spink3</i> <sup>+/+</sup> <i>Atg5</i> <sup>+/-</sup>	1	1				13	87 / 87
<i>Spink3</i> <sup>+/-</sup> <i>Atg5</i> <sup>+/-</sup>	1					24	96 / 96
<i>Spink3</i> <sup>-/-</sup> <i>Atg5</i> <sup>+/-</sup>		1	1	3	1	6	92 / 50
<i>Spink3</i> <sup>+/+</sup> <i>Atg5</i> <sup>-/-</sup>	1	1				0	0 / 0
<i>Spink3</i> <sup>+/-</sup> <i>Atg5</i> <sup>-/-</sup>	5	5	1			0	9 / 0
<i>Spink3</i> <sup>-/-</sup> <i>Atg5</i> <sup>-/-</sup>	2	2				0	0 / 0

図3: 0.5dppにおける膵組織像(HE染色) Scale bar; 50  $\mu$  m

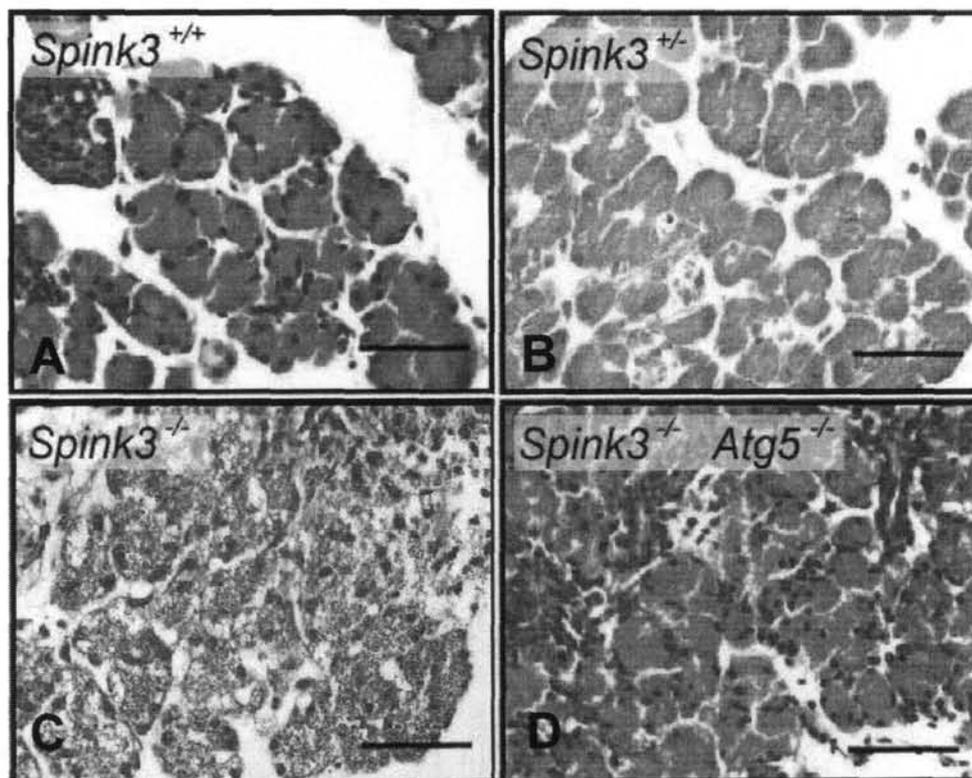


図4: 0.5dppにおける膵組織像(電子顕微鏡像) Scale bar; 2  $\mu$  m

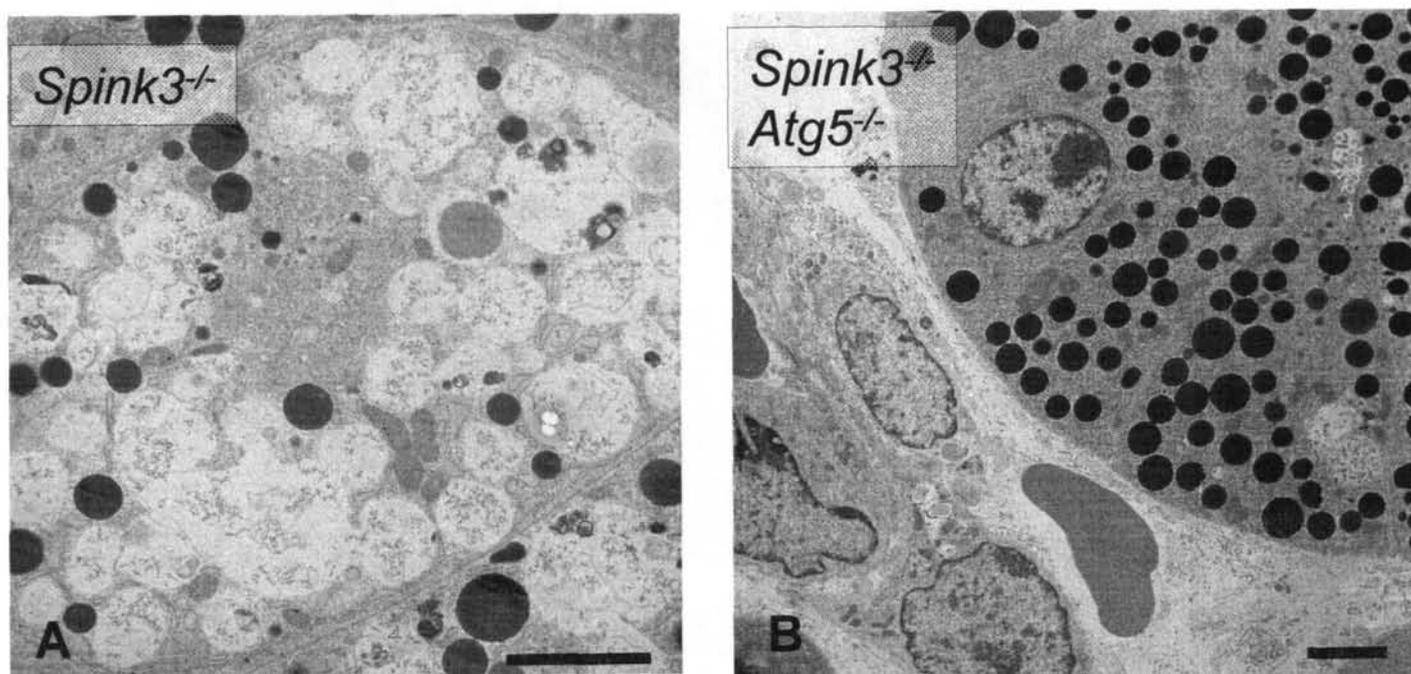


図5: 野生型、*Spink3*<sup>-/-</sup>、W KOの血清アミラーゼ値 (0.5dpp)

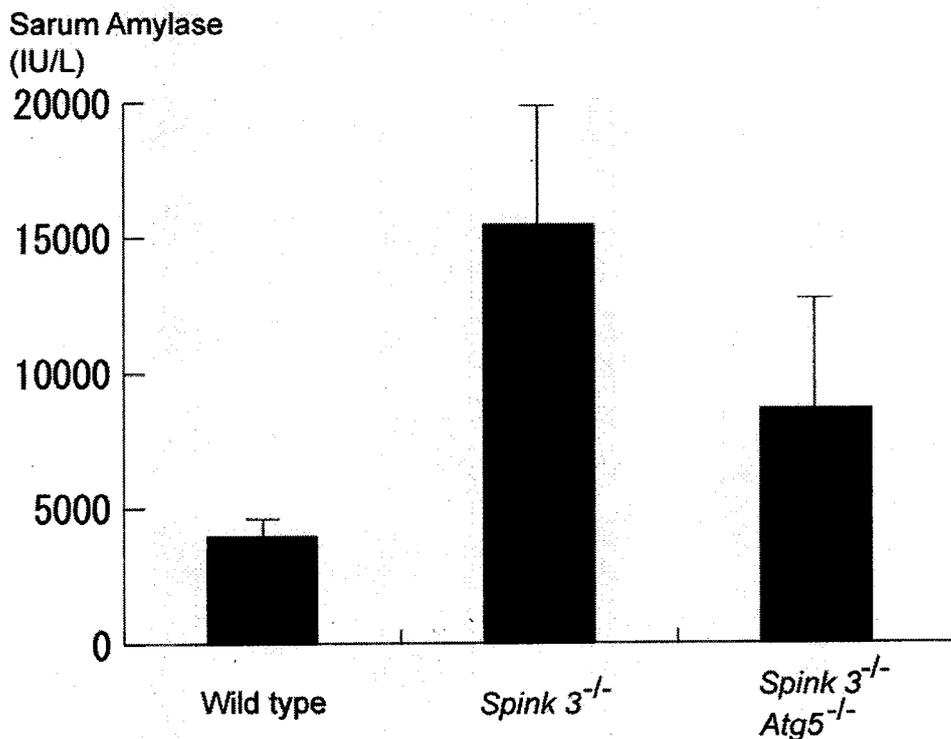
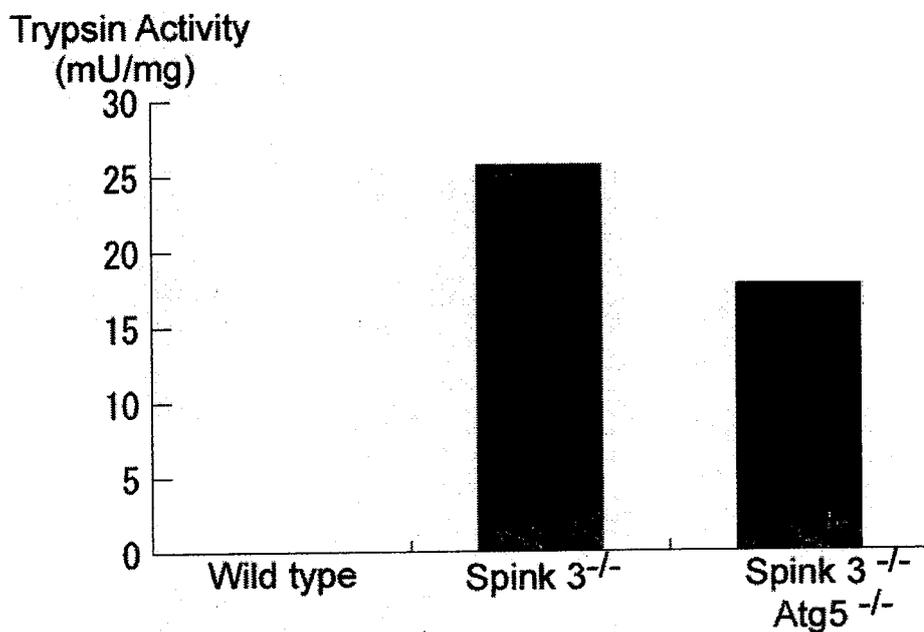


図6: 野生型、*Spink3*<sup>-/-</sup>、W KOの膵トリプシン活性 (0.5dpp)



## セルレイン膵炎とオートファジー、小胞体ストレス(図7~10)

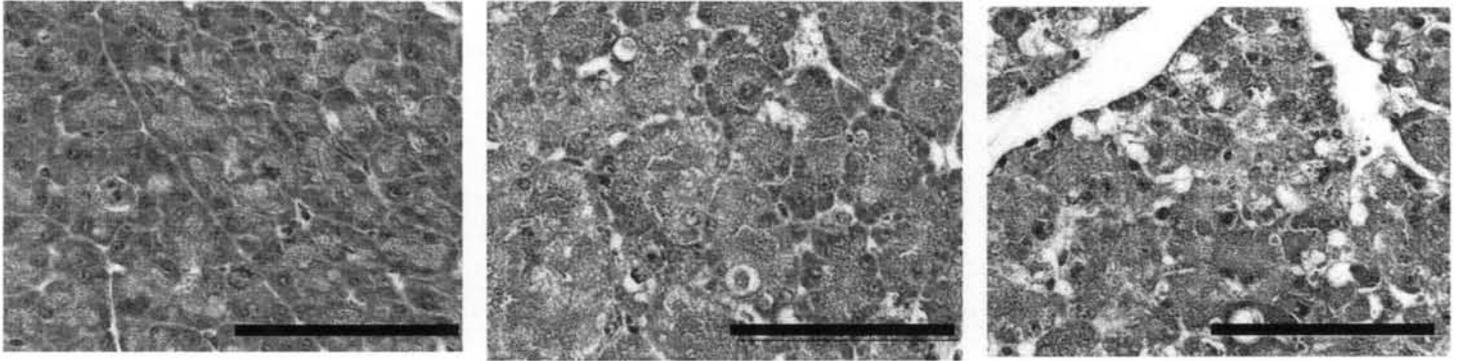
図7: セルレイン膵炎マウスの膵組織像およびオートファジーの発現

A: 膵組織像(HE染色) Scale bar; 100  $\mu$ m

Control (生食投与)

セルレイン9回投与

セルレイン12回投与



B: オートファジーの発現(Western blot)

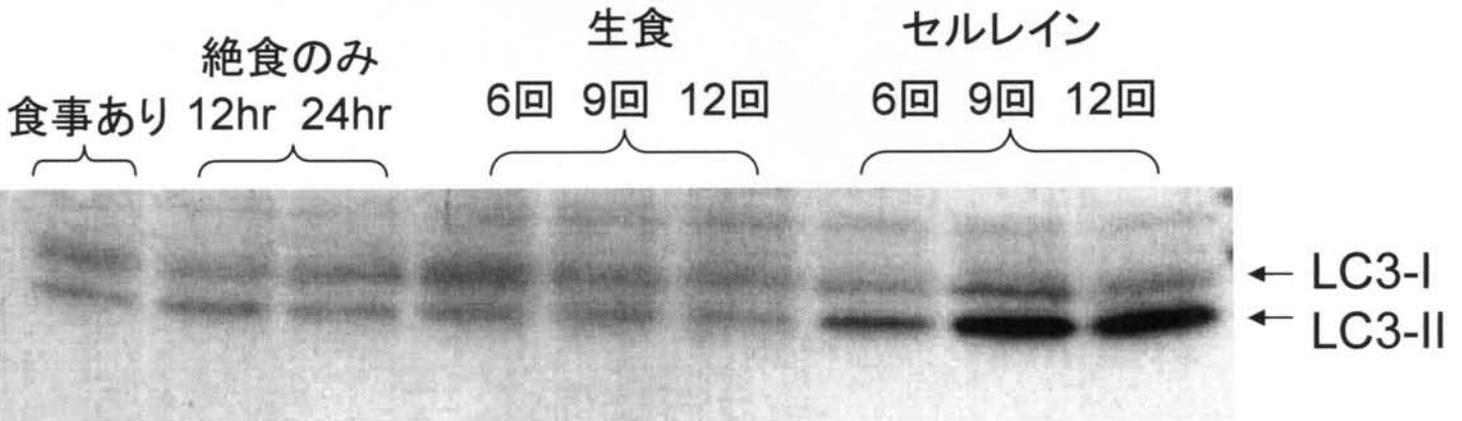


図8: セルレインマウスにおける血清アミラーゼ値

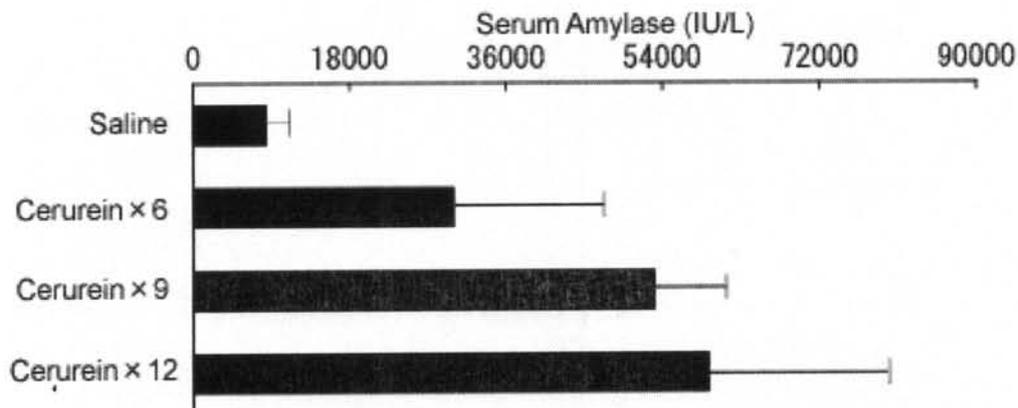
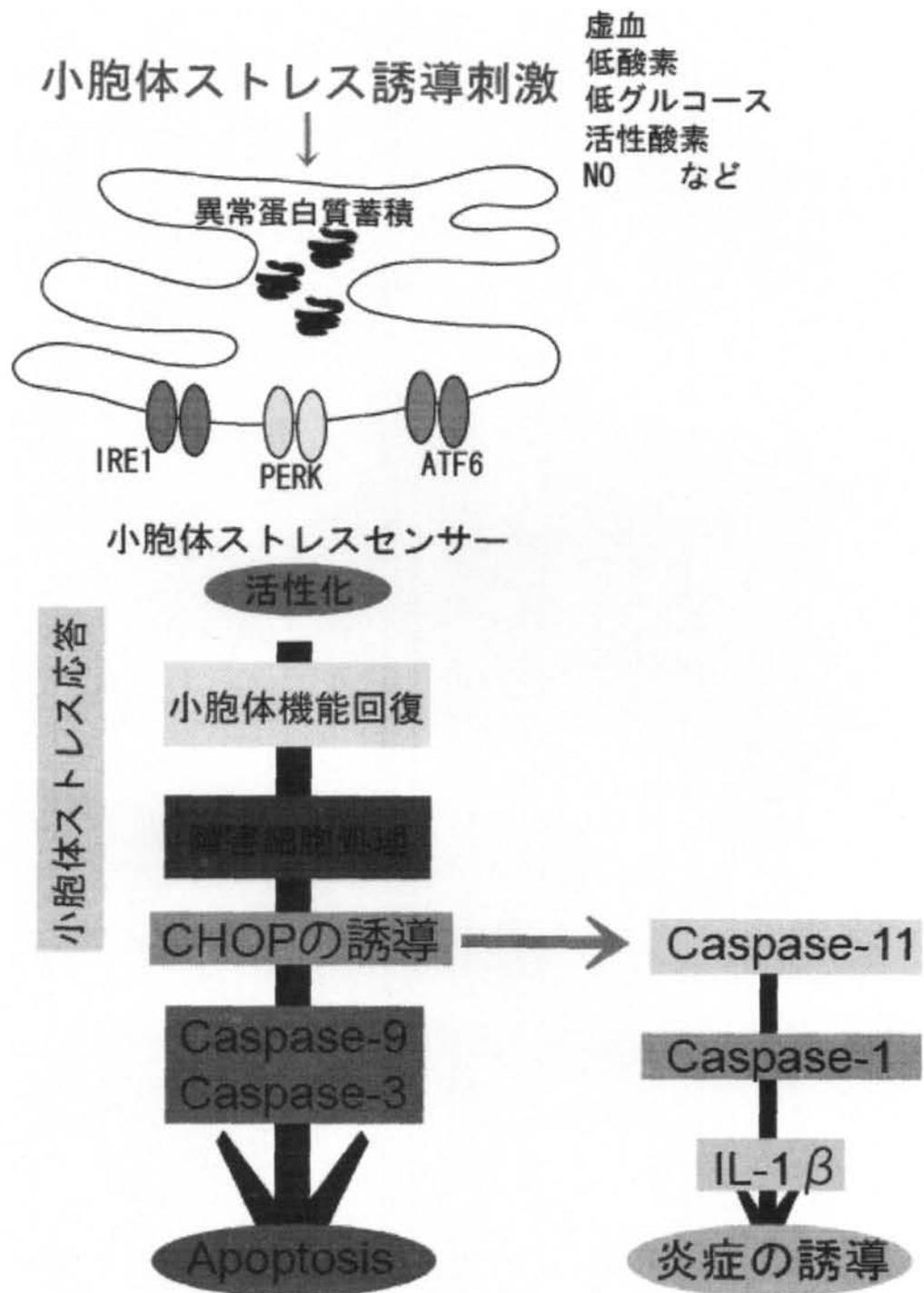


図9: 小胞体ストレス応答の概略





# Chop<sup>-/-</sup>マウスに対するセルレイン膵炎(図11~15)

図11: 膵組織像(HE染色); Scale Bar 100 μm

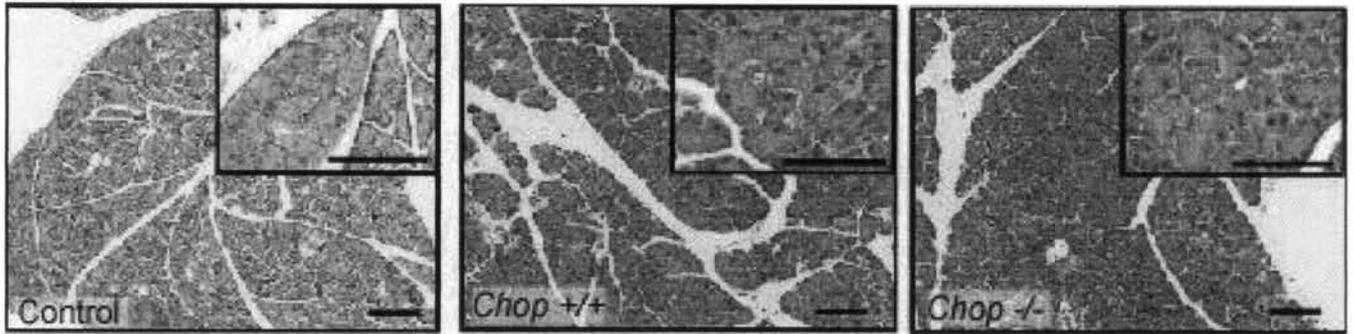


図12: 血清アミラーゼ値

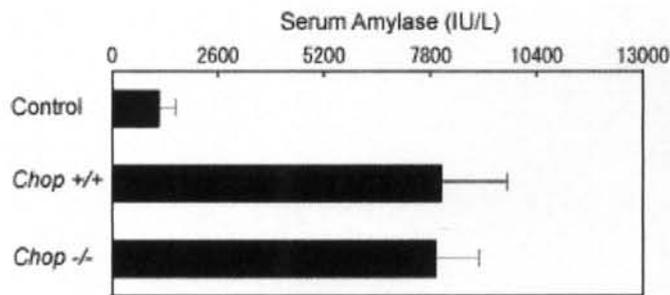


図13: TUNEL染色

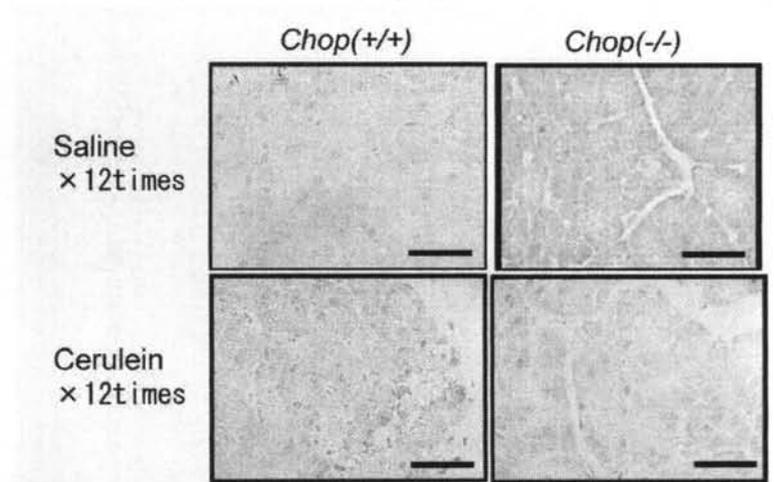


図14: Caspase-9, Caspase-3 の発現

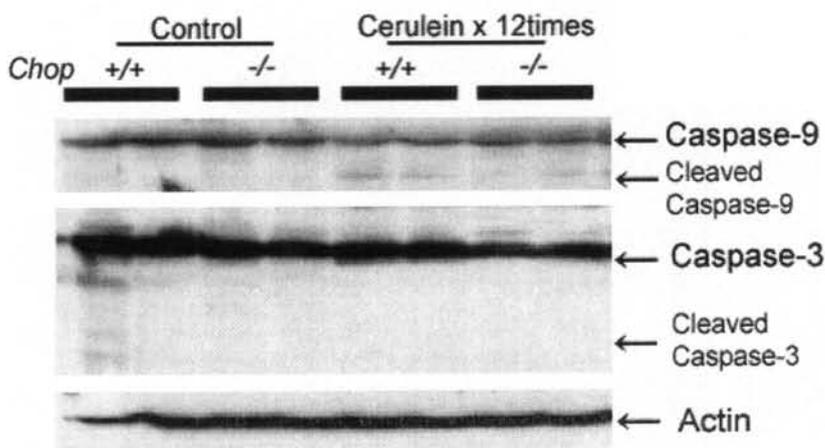
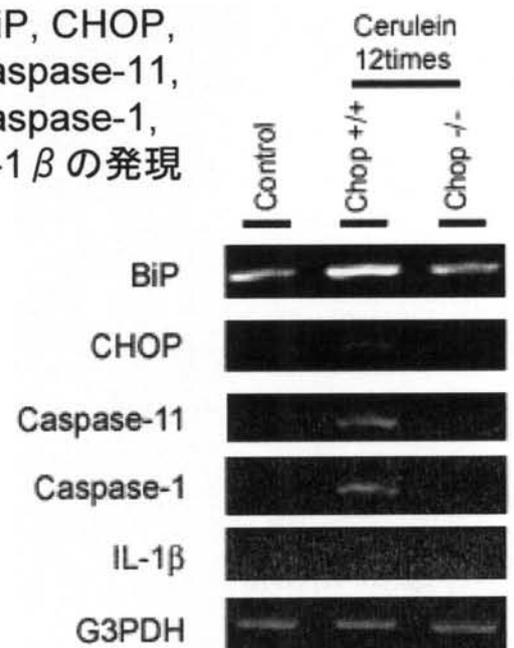


図15: BiP, CHOP, Caspase-11, Caspase-1, IL-1β の発現



# C57BL/6Jマウスに対するセルレイン+LPS膵炎(図16~20)

図16: 膵組織像(HE染色); Scale Bar 100  $\mu$ m

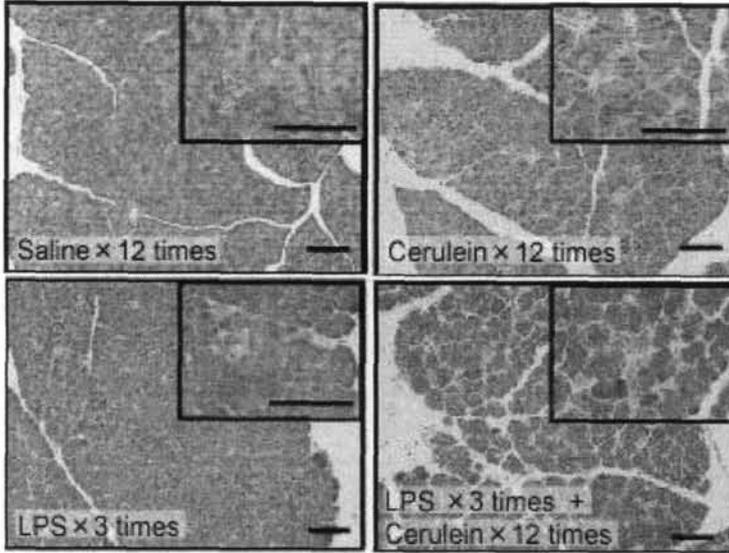


図17: 血清アミラーゼ値

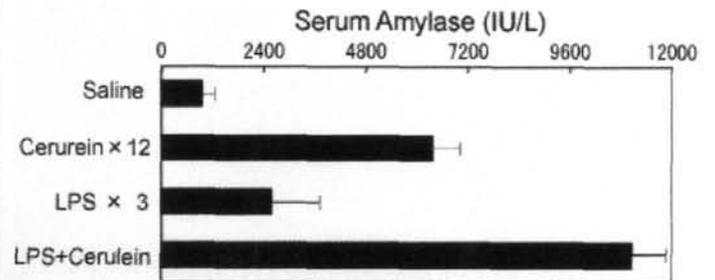


図18: Caspase-9、Caspase-3 の発現

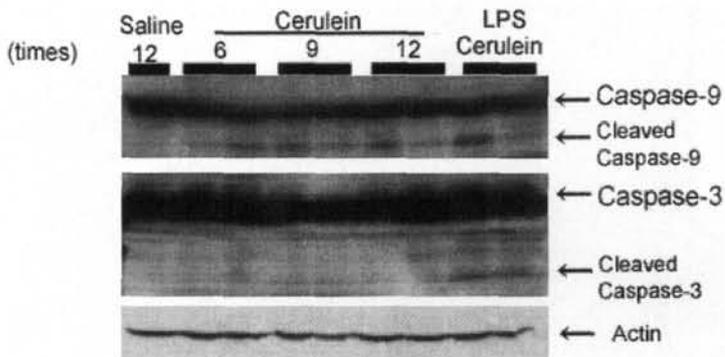


図19: TUNEL染色; Scale bar 50  $\mu$ m

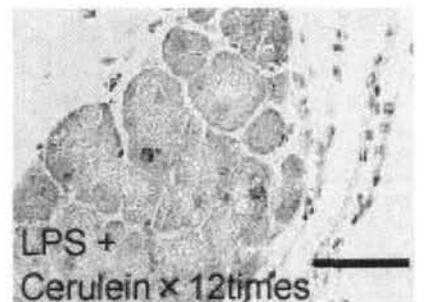
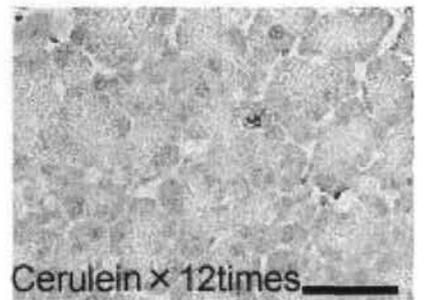
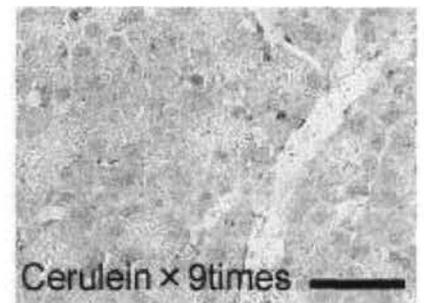
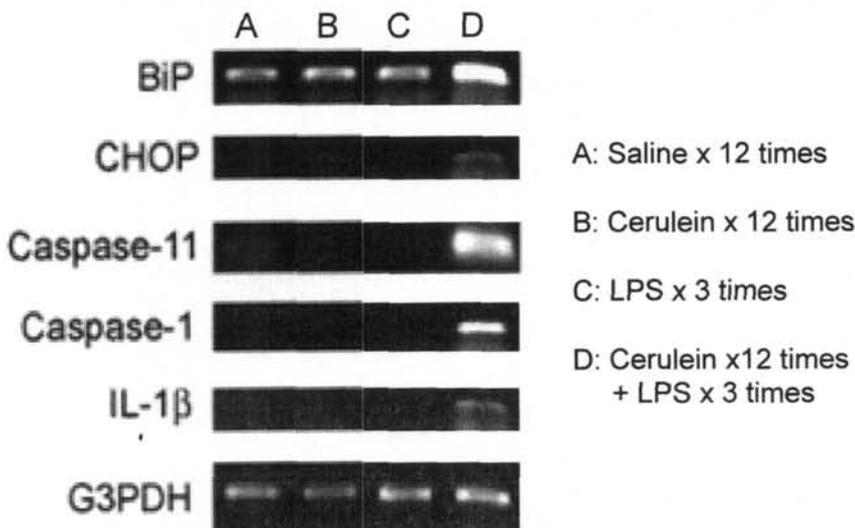


図20: BiP, CHOP, Caspase-11, Caspase-1, IL-1 $\beta$  の発現



# *Chop*<sup>-/-</sup>マウスに対するセルレイン+LPS膵炎(図21~25)

図21:膵組織像(HE染色) Scale bar; 100  $\mu$  m

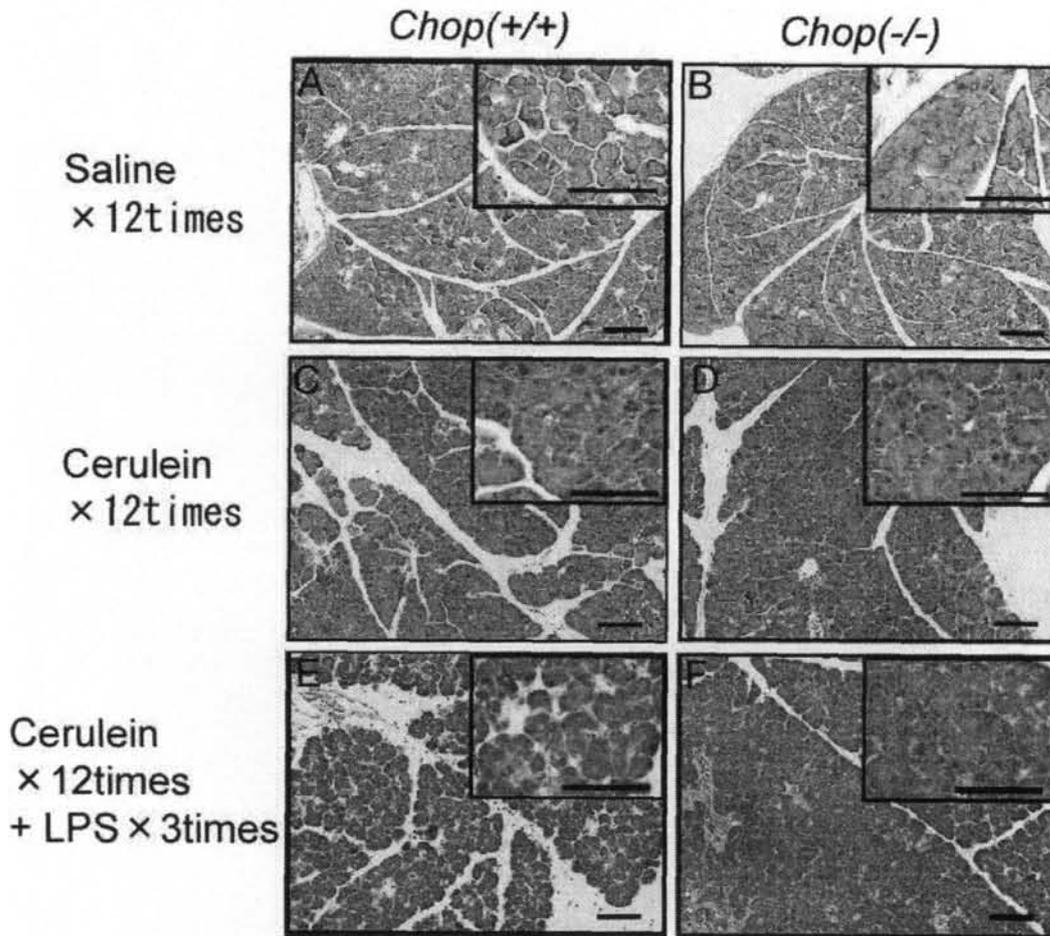


図22: 血清アミラーゼ値

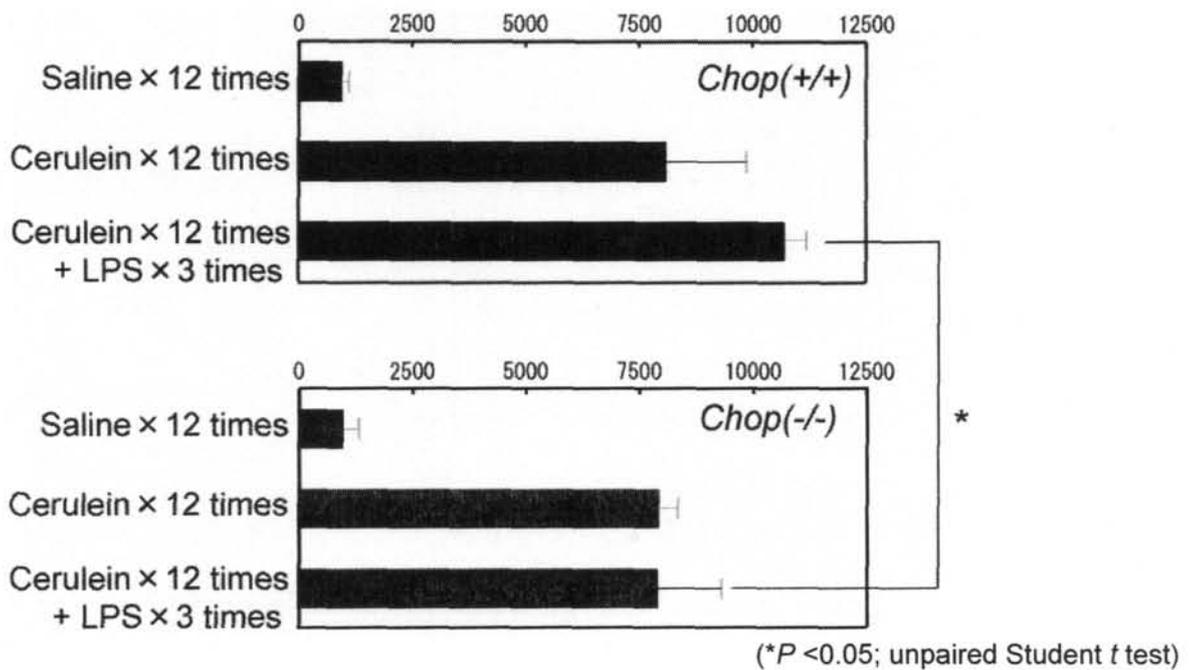
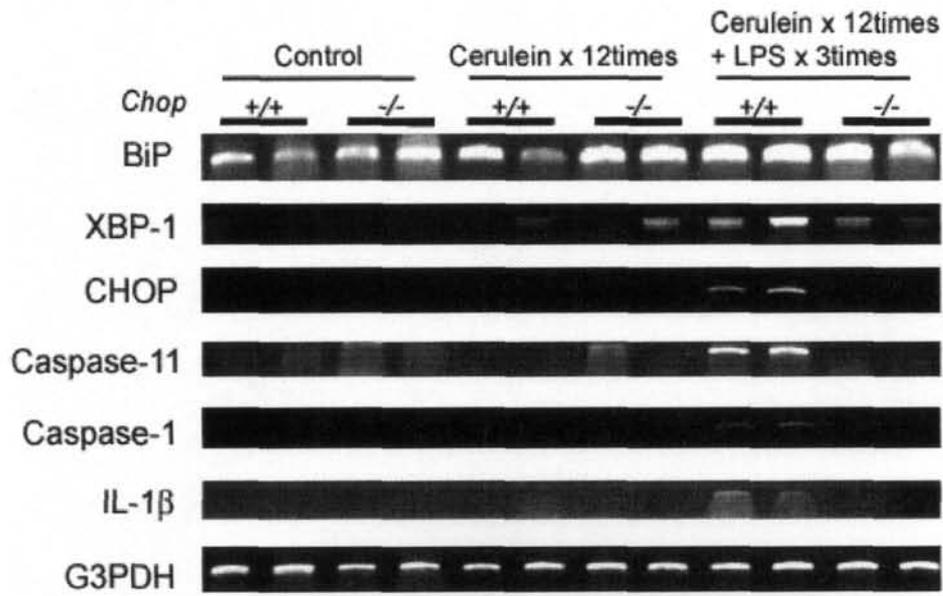


図25: BiP, CHOP, Caspase-11, Caspase-1, IL-1 $\beta$  の発現



## Chop/Spink3二重欠損マウスの表現型(図26~27)

図26:膵組織像(HE染色) Scale bar; 100  $\mu$  m

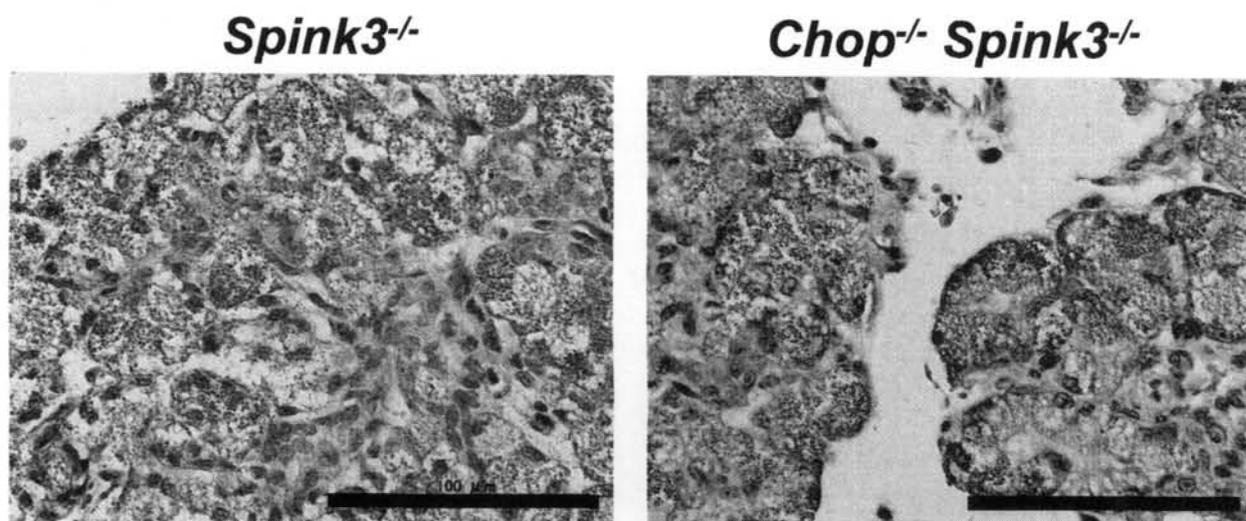


図27: 血清アミラーゼ値

