

学 位 論 文 要 約

研究題目

Reg family proteins contribute to inflammation and pancreatic stellate cells activation in chronic pancreatitis

(Reg ファミリー蛋白は慢性膵炎における炎症と膵星細胞の活性化を制御している)

兵庫医科大学大学院医学研究科

医科学専攻 生体応答制御系

分子遺伝医学 (指導教授 大村谷昌樹)

氏 名 陳文婷

【諸言】慢性膵炎(chronic pancreatitis; CP)は、急性膵炎発作を繰り返しながら、あるいは、膵実質の持続的な炎症により、慢性的に膵外・内分泌障害が進行し、膵臓の“線維化”と“実質細胞の脱落”(組織リモデリング)を特徴とする原因不明の炎症性疾患である。消化・吸収障害、糖尿病に加え、膵癌を高頻度に発症することから(一般人口の 10-20 倍)、病態の解明と治療法の開発が不可欠である。そこで当研究室で樹立した CP モデルマウス (X-SPINK1) の膵臓をマイクロアレイで解析した結果、複数の *Regenerating gene (Reg)* ファミリー遺伝子が高い発現を示すことを見いだした。*Reg* ファミリー遺伝子はラットの再生中の膵島で見られ、ヒト、マウスにおいて *REG* 1~4 に分類されている。炎症を起こした膵臓、消化管上皮組織の修復と再生に関与しているとされ、抗炎症作用、抗アポトーシス作用などの他の機能を持つことも見いだされている。これまでにそれぞれの単一のノックアウトマウスが樹立されているが、顕著な表現型がなく、個体における *Reg* ファミリー蛋白の機能は明らかにされていない。

【研究目的】*Reg* ファミリー蛋白のマウス (個体) における機能を明らかにし、発生や生理的条件下における役割を解析する。次に、当研究室で樹立した CP モデルマウスと交配し、慢性膵炎の発症過程における *Reg* ファミリー蛋白の役割を明らかにする。

【研究方法】マウス *Reg1-3 (Reg1, 2, 3a, 3b, 3d, 3g)* の 6 遺伝子は 6 番染色体の約 100kb にクラスターを形成しており、他の遺伝子は含まれていない。CRISPR/Cas9 システムを用いて、この 100kb の領域を欠失した受精卵を作製し、*Reg1-3* 欠損マウス (*Reg^{-/-}*) を樹立した。次に *Reg^{-/-}* と X-SPINK1 を交配して、*Reg^{-/-}*;CP マウスを樹立し、出生後、1 週齢、2 週齢、4 週齢、そして 8 週齢の膵臓の形態、炎症性サイトカインの発現、膵外分泌機能、および膵星細胞 (pancreatic stellate cells; PSCs) の活性化を調べた。

【結果】*Reg^{-/-}* マウスは予想されたメンデル比率で生まれ、その後の成長に異常は見られなかった。また *Reg* ファミリー蛋白の発現が高い膵臓、消化管上皮組織には病理学的に異常は見られなかった。次に *Reg^{-/-}* と X-SPINK1 を交配して、*Reg^{-/-}*;CP マウスを樹立した。出生直後は CP マウス、*Reg^{-/-}*;CP マウス共に、モザイク状に膵腺房細胞の壊死が見られ、差がなかった。しかし、2 週齢以降、CP マウスは約半数が死亡したのに対し、*Reg^{-/-}*;CP マウスは致死性がレスキューされ、また、体重減少も見られなかった。HE 染色とコラーゲン染色 (Azan 染色) を行い、*Reg^{-/-}*;CP マウスでは腺房細胞の脱落、炎症細胞の浸潤、線維化が抑制されていた。また定量 PCR の結果、炎症性サイトカインの産生も抑制されており、*Reg* ファミリー蛋白の欠損が CP への進展を阻止することが示された。

次に線維化が抑制されたメカニズムを明らかにするため、蛍光免疫染色を行い、活性化した PSCs (膵線維化の原因細胞) のマーカーである α SMA を用いて解析を行った。Azan 染色のデータと一致して、*Reg*^{-/-};CP マウスは 2 週齢から著しく α SMA の発現レベルが減少しており、Reg ファミリー蛋白は PSCs の活性化を促進することで、膵炎後の修復に貢献する一方、線維化を促進し、慢性炎症の持続に寄与している可能性が示された。

【考察】 本研究のメカニズムとして、Reg ファミリー蛋白が膵腺房細胞から放出され、免疫細胞を引き寄せ、PSCs を活性化させることが考えられた。Reg ファミリー蛋白とこれらの細胞の相互関係は、持続的な炎症を引き起こし、線維化を促進している可能性がある。また、CRISPR/Cas9 システムを使用して *Reg1-3* のグローバルノックアウトマウスを作製したため、慢性膵炎で見られる Reg ファミリー蛋白の臓器特異的または時期特異的な変化を正確に反映していない可能性がある。また残り一つの Reg ファミリー蛋白である Reg4 が代償的に働いているのか、今後の研究が必要である。

【結語】 この研究結果は、炎症性サイトカイン、免疫細胞、PSCs と Reg ファミリー蛋白の間で複雑な相互作用があることを示しており、これらにより CP では持続的な炎症と線維化が生じている可能性がある。本研究は Reg ファミリー蛋白の CP の発症における新たな知見を提供し、有望な治療対象となり得る可能性を示唆している。今後は、Reg ファミリー蛋白を標的とした新たな CP 治療法の開発の可能性を検討する必要がある。