

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860531

研究課題名(和文) 膵筋線維芽細胞におけるWntシグナル経路と膵線維化進展の相互作用についての検討

研究課題名(英文) Wnt signaling in pancreatic periacinar myofibroblasts in response to inflammatory and fibrotic mediators

研究代表者

稲富 理 (INATOMI, OSAMU)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：70530351

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は膵筋線維芽細胞におけるWntシグナルを介した膵線維化進展機序の解明を目的とする。Micro array assayによる網羅的解析では培養細胞においてIL-1がWnt2および5aの発現を強く誘導した一方で、Wnt4の発現は抑制された。IL-1はWntの核内転写因子であるRUNXの発現を誘導した。またTGF- β の刺激によりWnt4の発現が誘導された。セルレイン誘導慢性膵炎モデルマウスの線維化領域ではWnt4,5aの発現が共に亢進していた。膵慢性炎症の場におけるサイトカインとWntの関係性が明らかとなり、複数の転写因子を介した相互作用による線維化進展への関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study was designed to investigate the mechanism of pancreatic fibrogenesis via Wnt signaling in pancreatic myofibroblasts (activated stellate cells). Microarray assay showed that IL-1 stimulation induced the mRNA level of wnt2, 5a, and RUNX. On the other hands, TGF- β stimulation induced the mRNA level of Wnt 4, 9,11. Wnt 4 and 5a expression were significantly increased in the mild fibrotic area in the cerulean-induced chronic pancreatitis model mice. These findings suggest that Wnt signaling may be involved in pancreatic fibrogenesis in response to various inflammatory and fibrotic mediators.

研究分野：膵

キーワード：膵線維化 筋線維芽細胞 Wnt

1. 研究開始当初の背景

我が国では慢性膵炎の患者数は年間 45000 人を超えており(厚生労働省難治性膵疾患調査班)、新規発症患者数は人口 10 万人あたり 14.4 人と年々増加傾向である。原因にはアルコール性が最も多いが、女性では約半数が特発性とその機序は未だ不明な点も多い。不可逆的な線維化が進行すれば、膵石形成に伴う難治性疼痛や膵癌発生のリスク因子となる。慢性膵炎は膵臓の内部に、不規則な線維化、細胞浸潤、実質の脱落、肉芽組織などの慢性変化が生じ、不可逆的な膵機能の低下を伴う病態であり、中でも膵線維化形成は慢性膵炎の病理学的特徴である。ここ近年、膵腺房周囲に存在する星細胞や筋線維芽細胞が膵線維化において中心的役割を担うことが明らかにされて以来、これらの細胞を用いた分子細胞学的研究が精力的に推進されてきた(A.Masamune, *et al.* Gut 2009, A.Nishida, O.Inatomi, *et al.* Gut 2010, W.Lin, O.inatomi, *et al.* Int J Exp Pathol 2012)。

我々の教室は、ヒト膵臓から単離した膵筋線維芽細胞の機能を報告し(T.Saotome, T.Bamba, *et al.* Pancreas 1997)、膵線維化の機能解析をテーマとした基礎研究に以前より取り組んできた。これまでの研究により、膵線維化は細胞外基質の合成・分解機構の破綻の結果もたらされることが明らかにされ、細胞外基質の主たる分解酵素であるマトリクスメタロプロテアーゼ(MMP)は、膵線維化の進展において極めて重要な役割を担っている(T.Tasaki, T.Bamba, *et al.* Pancreatology 2007, A.Philips, *et al.* Gut 2003)。申請者は膵筋線維芽細胞が T 細胞から IL-17 の刺激を受けて、MMP を産生し、膵線維化の促進に参与することを報告した(O.Inatomi, A.Andoh, *et al.* Pancreas 2008,)。

一方、Wnt シグナルは動物の胎生期における諸器官の分化に必須の蛋白であるが、初期分化以降の段階でもさまざまな臓器で恒常的発現が認められている。これらの役割は長らく解明されていなかったが、近年になって、皮膚や腸管上皮の創傷治癒や、関節リウマチなど慢性炎症性疾患における線維化への関与といった重要な役割が次々と指摘されてきた。Wnt シグナル経路には カテニン経路 PCP 経路 Ca^{2+} 経路(非 カテニン経路)、の 3 種類に分類されるが、皮膚・肝・肺の線維化では Wnt1 が カテニン経路を介して TGF- β 誘導に影響を与え、膵筋線維芽細胞と同じく間葉系細胞である骨滑膜細胞では、Wnt が MMP-3 の誘導を増強し、また皮膚の melanoma 細胞では Wnt5a の刺激によりチロシンキナーゼが活性化し MMP-13 が誘導されることが報告されている(A.Akhmetshina, *et al.* Nat comm 2012, LH Weng, *et al.* Arthritis Rheum 2012)。

本研究は、これらの他臓器における研究結果を参考に、サイトカインクロストークを介した Wnt signaling の、膵線維化に対する関与の可能性に着目したものである。

2. 研究の目的

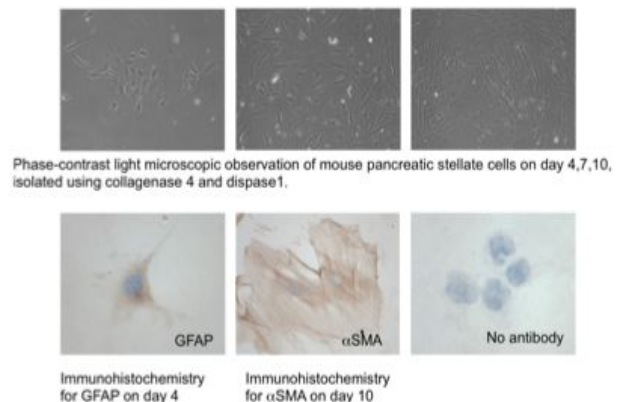
膵筋線維芽細胞における Wnt シグナル発現の網羅的解析

セルレイン誘導慢性膵炎モデルにおける Wnt 発現の検討

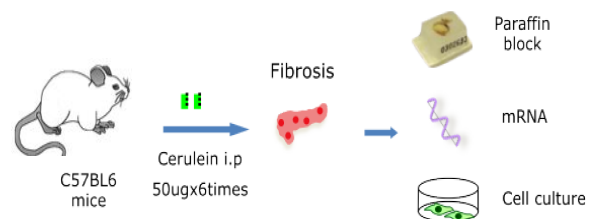
膵筋線維芽細胞における各サイトカインの刺激により誘導される Wnt 発現および核内転写因子の解析

3. 研究の方法

膵切除標本から collagenase、dispase を用いてヒト筋線維芽細胞の単離培養を行った。単離細胞は免疫染色にて SMA 養成 GFAP 陽性であることを確認した。IL-1、TNF、TGF- β (100ng/ml)で 12 週間刺激後に mRNA を抽出しマイクロアレイ法にて Wnt シグナルの解析を行った。



C57BL6 マウスにセルレインを反復投与して作成した膵線維化モデルマウスを用いた。HE 染色および SMA の免疫染色、sirius red 染色にて線維化を確認した。mRNA を抽出し、RT-PCR 法にて Wnt の発現を解析した。



単離培養した膵筋線維芽細胞を用いて様々なサイトカイン(100ng/ml)で刺激し、Wnt2,4,5a mRNA の発現を検討した。IL-1 による wnt5a の発現について濃度依存性・時間依存性に検討した。IL-1 による RUNX の発現を検討した。

4. 研究成果

膵筋線維芽細胞における Wnt シグナル発現の網羅的解析

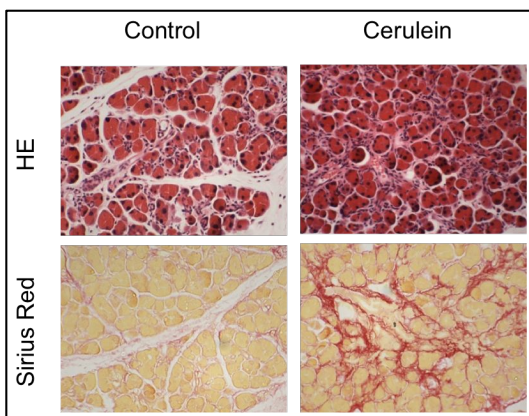
Wnt5a は IL-1 および TNF 双方の刺激により発現増強が認められた一方で炎症抑制サイトカイン TGF- β の刺激では発現が抑制された。Wnt4 は IL-1 の刺激により発現が抑制された。Wnt 4, 9, 11 は TGF- β の刺激により発現が増強した。

TGF- β 刺激	
Description	Log2Ratio
WNT 1	1.27
WNT 2	0.87
WNT 3	-
WNT 4	1.77
WNT 5A	0.54
WNT 5B	1.57
WNT 7A	
WNT 8A	1.16
WNT 8B	1.72
WNT 9	6.73
WNT 10A	1.03
WNT 11	14.83
WNT 16	2.76

TNF 刺激		IL-1 刺激	
Description	Log2Ratio	Description	Log2Ratio
WNT 1	2.87	WNT 1	-
WNT 2	0.06	WNT 2	3.61
WNT 3	1.24	WNT 3	0.77
WNT 4	-	WNT 4	0.59
WNT 5A	1.83	WNT 5A	6.27
WNT 5B	0.59	WNT 5B	0.71
WNT 7A		WNT 7A	1.41
WNT 8A	2.40	WNT 8A	0.30
WNT 8B	1.72	WNT 8B	-
WNT 9	-	WNT 9	-
WNT 10A	-	WNT 10A	-
WNT 11	0.78	WNT 11	1.15
WNT 16	3.25	WNT 16	1.00

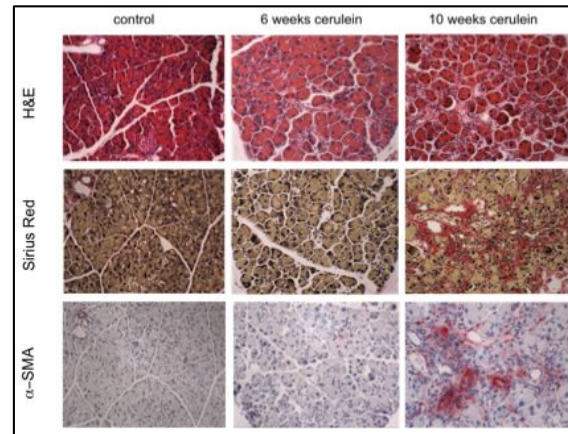
膵線維化モデルマウスを用いた Wnt 発現の検討

セルレインの反復投与により線維化を誘導した膵炎モデルマウスではコントロールマウスに比較して Wnt1, 4, 5a, 5b の発現亢進を認めた。



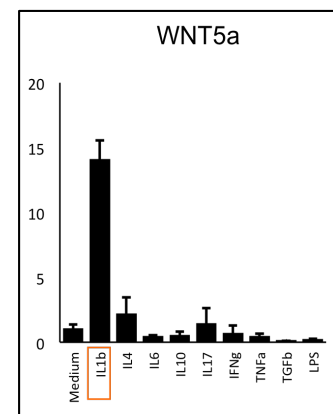
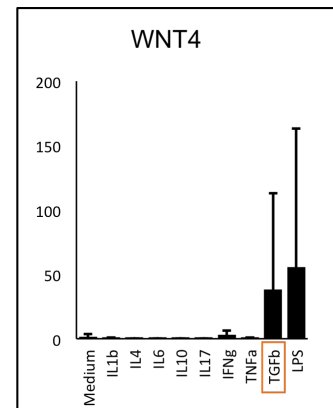
	Canonical pathway	Non-canonical pathway
positive	Wnt 1	Wnt 4, 5a, 5b
negative	Wnt 3, 6, 7, 8a, 8b	Wnt 2, 11, 13, 16

線維化進展の段階による Wnt 発現の相違を検討するため、セルレインの投与量を 1/6 に減らし、可逆的な mild fibrosis を誘導したマウスでは、Wnt5a の発現亢進を認めた一方で、Wnt4 発現の亢進は認めなかった。炎症の強い初期段階では Wnt5a が、また線維化が不可逆的に進展した Wnt4 がそれぞれ線維化の進展に寄与している可能性が示唆された。



In vitro でのサイトカイン刺激による Wnt 発現と核内転写因子発現の検討

microarray assay および膵炎モデルマウスの検討結果から培養膵筋線維芽細胞を用いてサイトカインの刺激に対する Wnt2, 4, 5a, 5b, 9, 11 発現の誘導を検討したところ、TGF- β (100ng/mL) の刺激により Wnt4 の発現が有意に上昇した。また、IL-1 (100ng/mL) の刺激により Wnt5a の発現誘導を有意に認めた。これらの結果は膵炎モデルマウスでの検討と同様に、炎症に反応して誘導



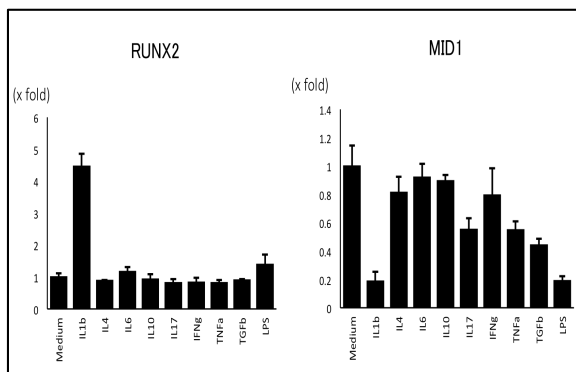
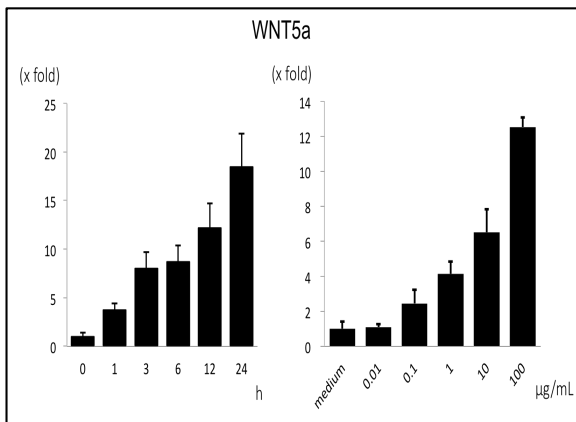
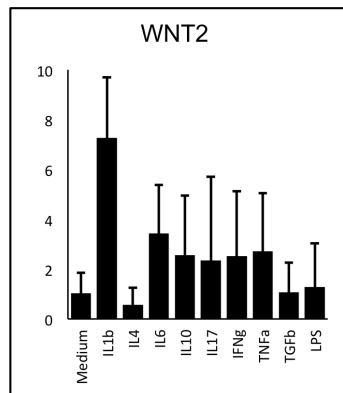
される線維化初期と線維化が進展した後期で異なる Wnt の関与が示唆された。

一方、Wnt2,4,5a,5b,9,11 に関しては炎症性里カインによる発現上昇を認めたと、

Wnt4,5a と比較して軽度であった。

TGF-、IL-1 による Wnt4,Wnt5a の発現誘導は濃度依存性、時間依存性に相関を認め、直接的な作用が示唆された。

Wnt の下流シグナルである核内転写因子発現の検討では IL-1 の刺激により RUNX2 の発現増強および MID1 の発現低下を認め、腓筋線維芽細胞内での IL-1 と Wnt signaling のクロストークにこれらの関与が示唆されたが、SiRNA やリン酸化阻害剤などを用いた検討はまだ行っていない。



5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕
特記すべきことなし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

稲富 理 (OSAMU INATOMI)
滋賀医科大学・医学部・助教
研究者番号：70530351