

論 文 要 旨

Inhibition of the dephosphorylation of eukaryotic initiation factor 2 α ameliorates murine experimental pancreatitis

(eIF2 α 脱リン酸化の抑制はマウス実験的膵炎を改善させる)

関西医科大学 内科学第三講座
(指導：岡崎 和一 教授)

青 井 一 憲

【研究目的】

膵腺房細胞では消化酵素を含む様々な蛋白が大量に合成されている。合成された蛋白は小胞体 (endoplasmic reticulum: ER) に輸送され、シャペロン蛋白の作用により高次構造をもつ機能性蛋白が形成される。しかし、炎症などにより ER 機能が障害されると、細胞内には異常蛋白が蓄積して ER ストレス状態に陥る。細胞はこのストレスに対して細胞の恒常性を維持するため、ER ストレス応答 (unfold protein response: UPR) と呼ばれる機能を有する。UPR は、ER での蛋白翻訳の抑制、折りたたみ機能の強化、異常蛋白が蓄積した細胞に細胞死 (アポトーシス) を誘導する作用により構成される。ER ストレスに対するセンサーとして、protein kinase RNA-like ER kinase (PERK)、inositol-requiring enzyme 1 (IRE1)、activating transcription factor 6 (ATF6) が知られている。

急性膵炎は予後良好な疾患であるが、重症化した場合死亡率が 30% と高く、膵炎の進展と ER ストレスは密接に関係している。これまで膵炎と ER ストレスに関して IRE1 および ATF6 経路の研究報告はあるが、PERK 経路については十分検討されていない。PERK 経路では ER ストレスによる PERK リン酸化を介して eIF2 α リン酸化が誘導され、リン酸化された eIF2 α が蛋白翻訳を抑制し、小胞体での蛋白蓄積による負荷を軽減する。本研究では、eIF2 α 脱リン酸化を抑制する薬剤である Salubrinal (Sal) を用いて、PERK シグナル伝達の増強による膵炎の治療効果について検討した。

【研究方法】

6-8 週齢の野生型マウス C57/BL/6 マウスに cerulein (Cer) 50 μ g/kg を 1 時間毎に 6 回腹腔内に投与し、投与終了直後に lipopolysaccharide (LPS) 10mg/kg を投与した。LPS 投与直後と 3 時間後に様々な濃度の Sal を腹腔内投与した。対照群にはリン酸緩衝生理食塩水を投与した。

初回 Cer 投与から 24 時間後にマウスを屠殺し、血清採取と膵臓の摘出を行った。血清アミラーゼ測定を行い、血清中サイトカインはサイトカイン測定キットを用いて測定した。膵炎の重症度は、膵組織の炎症細胞浸潤、浮腫、壊死について病理学的スコアリングシステムを用いて評価した。膵組織の ER ストレス関連蛋白の発現をウエスタンブロットで評価した。膵腺房細胞のアポトーシスについて TUNEL 法で検討した。

【結果】

血清アミラーゼは、Cer/LPS 投与による膵炎発症群では対照群と比べて有意に上昇した。Sal 投与により無治療群と比べてアミラーゼ上昇は抑制され、2.5mg/kg 投与群で有意な抑制を認めた。病理組織学的検討では、Cer/LPS 投与により膵腺房細胞の壊死、高度の炎症細胞浸潤、間質の浮腫を認め、Sal 投与により濃度依存性に膵炎の改善を認めた。膵炎病理スコアでは、炎症、壊死、合計スコアにおいて Sal 2.5mg/kg 投与群において無治療群と比べて有意な改善を認めた。そのため、以後の項目については Sal 2.5mg/kg 投与群で検討した。

血清サイトカイン (IL-1 β 、IL-6、IL-10、TNF- α 、IFN- γ) は、Cer/LPS 投与による膵炎発症群では対照群と比べて有意に上昇した。膵炎発症マウスに Sal 投与を投与することにより、無治療群と比べて IL-1 β 、IL-6、IL-10、TNF- α は有意に低下した。

膵組織中 eIF2 α は Sal 投与群と非投与群間で有意差は認められなかったが、リン酸化 eIF2 α は Sal 投与群で上昇を認め、リン酸化 eIF2 α /eIF2 α 比も有意に上昇した。ER ストレス関連蛋白に関して、Sal 投与群で glucose-regulated protein 78 (GRP78)、CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein (CHOP)、cleaved caspase-3 は有意に低下し、activating transcription factor 4 も有意差はないものの低下を認めた。TUNEL 法による染色では、Sal 投与群においてアポトーシス細胞の減少を認めた。

【考察】

PERK 経路では、eIF2 α のリン酸化を介して蛋白翻訳が抑制され ER ストレス負荷を軽減する。PERK 経路における蛋白翻訳制御は、インスリン分泌を行う膵 β 細胞のように豊富な ER を持つ細胞において、ER ストレス軽減に重要な役割を果たしていることが報告されている。

本研究において、膵腺房細胞での Cer/LPS 刺激による ER ストレスに対して、eIF2 α 脱リン酸化を抑制することにより PERK 経路のシグナル伝達が増強され膵炎が軽減することが明らかとなった。その機序として、eIF2 α 脱リン酸化阻害薬の投与によるリン酸化 eIF2 α の増加に加えて、ER ストレス関連蛋白である GRP78、CHOP、cleaved caspase-3 の発現抑制が小胞体ストレスを軽減し、膵炎が改善したと推察された。

以上より、薬剤投与による PERK シグナル伝達の増強は膵炎の新規治療法になりうることが示された。