

|          |   |  |
|----------|---|--|
| 研究種目     | <input type="checkbox"/> 奨励研究助成金  | <input type="checkbox"/> 研究成果刊行助成金                   |
|          | <input type="checkbox"/> 21 世紀研究開発奨励金<br>(共同研究助成金)                      | <input type="checkbox"/> 21 世紀教育開発奨励金<br>(教育推進研究助成金) |
| 研究課題名    | 膵炎、膵線維化および膵発癌における p38MPAK の役割の解明  |  |
| 研究者所属・氏名 | 研究代表者：医学部 消化器内科 講師 櫻井 俊治<br>共同研究者：医学部 消化器内科 教授 工藤 正俊<br>医学部 生化学 教授 宗像 浩 |  |

## 1. 研究目的・内容

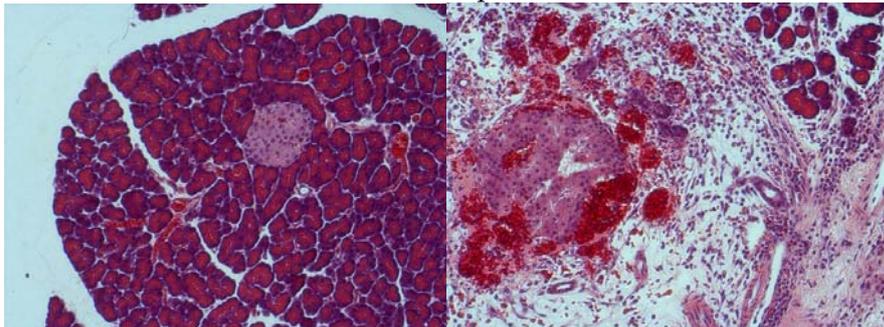
Mitogen activated protein kinase (MAPK)は炎症からの発癌に深く関わっている。p38 $\alpha$ は Heat shock protein (HSP) 27, Hemo-oxygenase-1 などストレス応答蛋白の発現、もうひとつの MAPK のメンバーである c-Jun N-terminal kinase (JNK)の活性化および活性酸素類 (ROS) 産生を制御することで肝細胞の恒常性維持に重要な役割を果たしている (Sakurai et al., 2008)。また、慢性膵炎発症における ROS の重要性を報告した (Sakurai et al., 2011)。このようなことから、p38MAPK により制御される ROS および酸化ストレス制御遺伝子が膵炎、膵線維化および膵発癌に深くかかわっていることが予想される。そこで、膵炎、膵線維化および膵発癌における p38、JNK の役割を検討し、MAPK を標的とする新規治療薬の開発を目指すことを目的とした。

## 2. 研究経過及び成果

自然発症の慢性膵炎動物モデルである WBN/Kob ラットを用いて、p38MAPK, JNK の膵障害への影響について検討した。雄の WBN/Kob ラットに、p38MAPK 阻害剤である SB203580 および JNK 阻害剤である SP600125 を、4 週齢より 6 週間投与した。コントロールに比べて p38MAPK 阻害剤を投与されたラットでは、組織学的検討および MPO 活性アッセイを用いて検討した結果、膵実質細胞障害および炎症の増悪を認めた。実質細胞障害が亢進する一方で、ランゲルハンス島の障害は限定的であった。実際、糖負荷試験では p38MAPK 阻害剤の影響はほとんど見られなかった。p38MAPK の阻害により、膵臓において抗酸化作用のある HSP27 の発現が低下し、ROS の蓄積が亢進した。更に、p38 阻害により、アポトーシス誘導蛋白である BAD の発現が亢進した。

Control

p38MAPK inhibitor



JNK の肝細胞、炎症細胞での重要性は報告されているが、膵実質細胞障害においては、JNK の阻害剤を投与したラットとコントロールラットの間には明らかな差を認めなかった。糖負荷試験でも JNK 阻害剤の影響は認めなかった。

膵細胞株 PANC-1 において、ラット膵臓と同様に、p38 の阻害により HSP27 の発現は低下し、BAD の発現が亢進したが、BAD のリン酸化には影響しなかった。siRNA を用いて HSP27 を knock-down することで、ROS 産生および TNF $\alpha$  による細胞死が亢進したが、BAD の発現には影響しなかった。HSP27 のリン酸化がこの細胞死に影響していた。p38MAPK の 4 つのサブタイプのうち、この細胞株においては、p38 $\beta$  が重要であることがわかった。また、siRNA により p38 $\delta$  の発現を低下させることで、細胞周期が亢進した。

p38MAPK は HSP27 の発現を亢進させることで、ROS の蓄積を抑制し、また BAD の発現を抑制することで、膵臓の恒常性維持に貢献している。p38MAPK、HSP27、活性酸素類を標的とすることで、慢性膵炎をコントロールする新しい治療法の開発が可能になるかもしれない。

### 3. 本研究と関連した今後の研究計画

今後膵癌モデルマウスを用いて、膵発癌における MAPK の影響を検討する。Tgfr2 floxed mouse, mutant Kras transgenic mouse および Ptf1a-Cre transgenic mouse を掛け合わせ、膵臓特異的な TGF $\beta$ -receptor 欠損および KRAS の活性化により膵癌が発生する。このマウス発癌モデルと p38 floxed mouse を掛け合わせることで、膵臓特異的な p38 $\alpha$  の欠損が膵発癌に及ぼす影響について検討する。コントロールマウスとともに 2 週齢、4 週齢において sacrifice する。マウス生存率への p38 $\alpha$  の影響も検討する。 $\beta$ -catenin の免疫染色にて膵発癌に重要である経路の活性化を測定する。膵臓における ERK, p38, JNK 活性、Akt 活性をそれぞれのリン酸化抗体を用いて測定する。腫瘍部および非腫瘍部における細胞死および細胞増殖を HE, TUNEL, BrdU staining および NIH image を用いて定量する。血管新生への影響は CD31 抗体を用いた免疫染色にて測定する。ROS の蓄積は OxyBlot を用いて測定する。Cyclin A, D, E, p21, p53, Noxa, Puma, EGFR などの細胞増殖および細胞死を制御する遺伝子発現を Q-RT-PCR、Western blot を用いて測定する。

### 4. 成果の発表等

| 発表機関名                         | 種類 (著書・雑誌・口頭) | 発表年月日(予定を含む) |
|-------------------------------|---------------|--------------|
| Free Radical Biology Medicine | 雑誌            | 2012         |
|                               |               |              |
|                               |               |              |
|                               |               |              |