

博士の学位論文審査結果の要旨

申請者

佐藤 渉

横浜市立大学大学院医学研究科 医科学専攻
消化器・腫瘍外科学

審査委員

主査	横浜市立大学大学院医学研究科教授	田村智彦
副査	横浜市立大学附属市民総合医療センター泌尿器腎移植科教授	上村博司
副査	横浜市立大学大学院医学研究科教授	大橋健一

博士の学位論文審査結果の要旨

Caerulein-induced pancreatitis augments the expression and phosphorylation of collapsin response mediator protein 4

(急性・慢性膵炎組織において Collapsin Response Mediator 4 の発現とそのリン酸化は亢進する)

急性膵炎はアルコールや胆石などの要因により膵酵素の活性化が誘発され、大量の細胞死がもたらされる膵臓の急性炎症反応である。重症化した場合、死亡率は高く、罹患率は近年増加している。反復性急性膵炎は繊維化を伴い慢性膵炎へと発展すると考えられておる。慢性膵炎は膵癌の重要なリスク因子とされており、膵癌発症のリスクは約 13.3 倍とされている。膵癌は最も死亡率の高い癌の一つであり、病態の解明が急務である。膵癌細胞は collapsin response mediator protein 4 (以下 CRMP4) を強発現し、静脈浸潤、肝転移と予後増悪に深く関わる事が報告されている (Hiroshima, Nakamura et al., 2013)。しかしながら、これまでに CRMP4 と急性膵炎・慢性膵炎との関連性は解明されていない。CRMPs は神経軸索ガイダンス分子である Sema3A の下流分子であり、Cdk5 などのリン酸化酵素によりリン酸化され制御される。リン酸化された CRMPs は細胞骨格を制御し、神経細胞の成長円錐を退縮する。リン酸化機構の解明は CRMPs の機能的解析に極めて重要である。

膵癌細胞で CRMP4 が高発現することから、そのリスク因子である急性膵炎・慢性膵炎組織に CRMP4 が発現し、またリン酸化されるという仮説を立てた。セルレイン誘発性膵炎モデルマウスを用いた解析を行った。

方法として急性・慢性膵炎モデルマウスはコレシストキニンAゴニストであるセルレインの複数回注射によって作成した。急性膵炎モデルは 1 時間毎に 50 μ g/Kg のセルレインを 7 回腹腔内注射し、48 時間後に同量を投与し作成した。慢性膵炎モデルは 5 μ g のセルレインを 1 日 1 回、週 5 日間、計 6 週間投与し作成した。膵炎組織は CRMP4 の発現強度とそのリン酸化を抗 CRMP4 抗体とリン酸化 CRMP4 抗体を用いた免疫組織学的染色、ウェスタンブロットを行い評価した。また、蛍光免疫染色で抗 CD3 抗体または抗 Cdk 5 抗体と共染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて共局在の有無や CRMP4 発現部位の詳細な解析を行った。

免疫組織学的染色では CRMP4 は急性膵炎・慢性膵炎ともに主に浸潤したリンパ球と膵腺房細胞の細胞質の一部に発現していた。リン酸化 CRMP4 の発現も同

様のパターンで発現していた。慢性膵炎ではより腺房細胞の細胞質に CRMP4・リン酸化 CRMP4 の発現が目立つ傾向があった。CRMP4 は CD3 陽性細胞と共局在しており T リンパ球に発現していることが明らかになった。また、Cdk5 も急性・慢性膵炎組織で発現が促進されており、一部リン酸化 CRMP4 と共局在を示した。

急性・慢性膵炎は膵実質と浸潤 T リンパ球に CRMP4 発現を促進する。一部のリン酸化 CRMP4 と Cdk5 の共局在は Cdk5 が CRMP4 のリン酸化に部分的に貢献している可能性を示唆した。これらの結果より CRMP4 が膵臓の炎症反応に関わっており、膵癌発癌にも影響を及ぼしている可能性も示唆された。そのために今後は膵前癌病変である PanIN での CRMP4 発現を解析する必要がある。膵内の炎症反応における CRMP4 の機序を解明することにより急性・慢性膵炎だけでなく膵癌の発癌機構や膵癌の新たな治療戦略の開発に寄与すると考えられた。

急性膵炎・慢性膵炎組織において CRMP4 発現とリン酸化の促進が示された。CRMP4 は膵炎治療のターゲットとなる可能性があり、膵癌発癌機構に関わっている可能性がある。

まず、上村副査より以下の質問がされた。

- 1) in vitro の実験、特に膵間質に関して何か解析を行ったか
- 2) vivo の n 数が少ないが、それはどうしてか。
- 3) 膵炎組織で Cdk5 とリン酸化 CRMP4 の共局在が限定的であったことに関してはどう考察しているか。
- 4) *Crmp4*^{-/-}マウスで急性膵炎の重症度が変わらないのはどうしてか。
- 5) 膵癌は間質が占める割合が大きく、IL-6 などのサイトカインが重要といわれているが、CRMP4 との関係はどうか。

以上の質問に対し、以下の回答がなされた。

- 1) vitro の解析は行っていない。過去に腺房細胞にセルレインやタウロコール酸を投与し遺伝子発現を解析した実験は報告されているが今回は検証していない。
- 2) 急性膵炎・慢性膵炎の実験系を確立するのに時間がかかりこれ以上増やせなかった。いずれももっと n を増やすべきだったと思う。
- 3) Cdk5 のみでリン酸化されているとは考え難い。DYRK2 など他のリン酸化酵素が関わっている可能性が高いと考える。

- 4) CRMP4 が T 細胞に発現していることから好中球浸潤が主体の急性膵炎では差が出なかったのではないかと考えている.
- 5) CRMP4 と末梢組織の炎症に関する報告はないため炎症性サイトカインとの関連性はわからない.

次に大橋副査より以下の質問がなされた.

- 1) 間質に浸潤した T リンパ球が CRMP4 を発現しているというのはわかったが、フローサイトメトリーなど、どのリンパ球が CRMP4 を発現しているのか解析したか.
- 2) 腺房細胞の細胞膜の近くに CRMP4 が発現しているように見えたが、この役割は何なのか. *Crmp4*^{-/-}マウスと野生マウスの急性膵炎で phenotype に差がないがどう考えているか. *Crmp4*^{-/-}マウスの一般的な phenotype は何か、内臓系に差はないのか.

以上の質問に対し、以下の回答がなされた.

- 1) 行っていない. リンパ球の CRMP4 発現の意義はまだわかっていない.
- 2) まだ CRMP4 の膵炎における役割はわからない. *Crmp4*^{-/-}マウスは性欲が亢進すると報告されているが内臓疾患に関してはわからない.

最後に田村主査より以下の質問がなされた.

- 1) 急性膵炎患者が増加している背景は何か.
- 2) 慢性膵炎患者のうち膵癌に至る症例は 5%とのことだが、膵癌全体で慢性膵炎があった症例はどれくらいの割合か.
- 3) 腺房細胞が腺管構造様になる ADM(acinar-ductal metaplasia)は興味深い、なぜ腺管様になるのか.
- 4) CRMP4 が膵炎組織の間質に存在するはわかったが、この事象が膵炎から膵癌にかけてどの様に働いていくと考えているのか.

以上の質問に対して、以下の回答がなされた.

- 1) アルコール摂取量や喫煙者が増えたかどうかは把握していない. 高脂血症や胆石による急性膵炎症例も増加しているのかもしれない.
- 2) 把握していない. 慢性膵炎患者は自覚症状がない症例も多いので正確に把握

することが難しいかもしれない。CT で偶発的に膵石が見つかり慢性膵炎と診断される症例がある。

- 3) なぜ腺管構造になる必要があるかわからない。ただ、膵癌の 9 割以上は膵管細胞癌であり、腺房細胞癌はかなり頻度が低い。膵管細胞癌に至るには ADM が必要と思われる。
- 4) もともと膵癌間質のプロテオーム解析で CRMP4 が膵癌に発現していることがわかった。膵炎, PanIN, 膵癌に発展する過程で CRMP4 が細胞骨格を制御し関わっているのではないかと思う。CRMP4 の上流分子は Sema3A だと考えている。

以上のような質疑応答がされた。

本学位論文は膵癌の重要リスク因子である膵炎組織に CRMP4 が発現していることを報告し、膵癌にも発現していることから発癌促進に関与することが示唆された貴重な報告である。実験動物の個体数の少なさや、CRMP4 の膵炎に対する直接的な影響などが不明瞭であるなどの問題点はあるが、申請者は本学位論文の内容を中心に幅広い質問に的確に答え、この課題について深い理解と洞察を持っていることを示した。よって本研究は医学博士の学位に値するものと判定された。