

氏 名 (本籍) き 木 村 憲 治  
学位の種類 博 士 (医 学)  
学位記番号 医 博 第 1 4 3 3 号  
学位授与年月日 平 成 10 年 3 月 25 日  
学位授与の条件 学位規則第 4 条第 1 項該当  
研究科専攻 東北大学大学院医学系研究科  
(博士課程) 内科学系専攻  
学位論文題目 膵腺房細胞のアポトーシスにおける内因性糖質コ  
ルチコイドの役割  
—副腎摘除ラット, 副腎摘除セルレイン膵炎モデ  
ルおよび AR42J 細胞を用いた検討—

(主 査)

論文審査委員 教授 豊 田 隆 謙 教授 松 野 正 紀  
教授 近 藤 尚 武

# 論文内容要旨

## 【研究目的】

内因性糖質コルチコイドは炎症の進展を抑制すると考えられているが、急性膵炎の進展過程における役割や、膵腺房細胞の生存に及ぼす直接作用については未だ不明である。

そこで、本研究では膵腺房細胞の生存に対する内因性糖質コルチコイドの役割と、急性膵炎の進展過程に認められる膵腺房細胞死におけるアポトーシスの関与、その誘導機序に対する糖質コルチコイドの役割を検討することを目的とした。

## 【研究結果】

アポトーシスはTdT-mediated dUTP-biotin Nick End Labeling (TUNEL)、透過型電子顕微鏡 (EM)、共焦点レーザー顕微鏡、および筆者らが開発した EM-TUNEL 連続切片によって確認した。

副腎摘除によってラット膵腺房細胞にアポトーシスが出現したが、内分泌細胞、膵管上皮細胞には出現しなかった。また、他の消化器系臓器ではアポトーシスの増加は認められなかった。

膵腺房細胞のアポトーシスは、cholecystokinin (CCK) analogue であるセルレインの高用量刺激によって著明に増加した。

副腎摘除ラットにハイドロコチゾンを補充するとアポトーシス出現頻度は、対照ラットと同程度まで抑制された。副腎摘除ラットのセルレイン刺激によるアポトーシス出現の増強も、ハイドロコチゾンの補充によって有意に抑制された。

糖質コルチコイド受容体拮抗剤である RU38486 (RU) を培養液中に添加すると、膵腺房細胞株 AR42J 細胞にアポトーシスが誘導された。アポトーシスは共焦点レーザー顕微鏡、DNA のアガロースゲル電気泳動によって確認した。形態学的に核の断片化が認められ、アポトーシスに特徴的な DNA の `ladder-like pattern` が確認された。

AR42J 細胞の生存率は、培養液中に添加する RU の用量に依存して低下し、この生存率の低下はデキサメサゾンの用量に依存して抑制された。

RU 処理によって AR42J 細胞の核内へのカルシウム流入が生じることが、共焦点レーザー顕微鏡を用いた検討で示された。

RU 処理によって AR42J 細胞に wild type-p53 mRNA の発現が認められた。

以上の結果から、ラット膵腺房細胞はその生存が内因性糖質コルチコイドに依存する特殊な細胞であることが示された。糖質コルチコイドの枯渇によって腺房細胞のセルレイン刺激に対する

アポトーシス誘導の閾値が低下する可能性も明らかとなった。またアポトーシス誘導機序に wild type-p53 が関与していること、核内へのカルシウム流入が核内カルシウム依存性エンドヌクレアーゼの活性化に関与している可能性が示された。

### 【本研究の意義】

TUNEL 陽性細胞の超微形態の新しい確認法をはじめて開発し、炎症細胞浸潤を伴う実験モデルにおけるアポトーシス出現頻度の評価法を確立した。

副腎摘除ラット，AR42J 細胞を用いて，膵腺房細胞のアポトーシスに対する糖質コルチコイドの抑制作用をはじめて証明した。

急性膵炎進展過程における腺房細胞死および炎症抑制機序に内因性糖質コルチコイドが重要な役割を果たしている可能性をアポトーシスの観点から明らかにした。

以上の研究成果から，内因性糖質コルチコイドは，急性膵炎において膵腺房細胞のアポトーシス誘導および炎症細胞による腺房細胞破壊を抑制する機序を介して膵炎の進展を予防する新しい機序を提示し，膵炎研究に新たな一頁を付け加えた。

## 審査結果の要旨

この論文は、膵腺房細胞の生存における内因性糖質コルチコイドの役割と、急性膵炎の進展過程で生じる腺房細胞死とアポトーシスの関係、およびその機序について糖質コルチコイドの役割を中心に詳細な検討を行った研究である。

副腎摘除ラット、副腎摘除セルレイン膵炎モデル、膵腺房細胞株 AR42J 細胞を用いた実験で以下の点が明らかにされた。

1) 副腎摘除によって膵腺房細胞に特異的にアポトーシスが誘導された。2) 副腎摘除ラットでは、cholecystokinin の analogue であるセルレインの高用量投与で惹起される急性膵炎モデルにおいて、腺房細胞のアポトーシス出現は著明に増加した。3) 上記いずれでも、ヒドロコチゾンの投与によって腺房細胞のアポトーシスは有意に抑制された。4) In vitro の実験では、糖質コルチコイド受容体拮抗剤 RU38486 (RU) の添加によって、AR42J 細胞にアポトーシスが誘導された。5) RU による AR42J 細胞の生存率低下は、デキサメサゾンの同時添加によって有意に改善した。6) RU で誘導される AR42J 細胞のアポトーシスでは、細胞の形態変化に先だって核内へのカルシウム流入が観察された。7) RU 処理によって AR42J 細胞に wild type p53 mRNA の誘導が認められた。

以上の結果から、ラット膵腺房細胞は、その生存が糖質コルチコイドに依存する消化器系臓器の中では特殊な細胞である可能性、高濃度セルレイン刺激によって誘導される膵腺房細胞死の閾値が、内因性糖質コルチコイドの枯渇によって低下する可能性が明らかにされた。また、このような膵腺房細胞アポトーシスの細胞内機序として、wild type p53 の関与や、核内のカルシウム依存性エンドヌクレアーゼ活性化の関与が示されている。

審査では以下の点が質問事項として挙げられた。1) 膵腺房細胞のうち、アポトーシスに陥るものとそうでない細胞があるが、この違いをどのように考えるか。2) ヒトの急性膵炎では膵腺房細胞のアポトーシスは認められるか。3) セルレイン膵炎において膵腺房細胞がアポトーシスに陥る機序として考えられるものは何か。4) AR42J 細胞のアポトーシス誘導に対するセルレインの作用を in vitro でも確認したか。

それぞれに対する回答を以下に示した。1) 個々の細胞における bcl/bax family のバランスの相違や、細胞防御因子としての heat shock protein, superoxide dismutase などのレベルの相違が関与している可能性が考えられる。2) ヒト急性膵炎における膵腺房細胞のアポトーシスの報告は認められていない。その理由として、膵炎組織では活性化膵酵素によって自己融解が急速に進むため、手術標本を用いてもアポトーシスを捉えることは難しいと考えられる。3) Platelet activating factor (PAF) の関与を示唆している報告があるが、本研究では確認していない。PAF や tumor necrosis factor- $\alpha$  など cytokine を含む炎症性メディエーターが関与している可能性は充分考えられる。4) 高用量の CCK を添加しても、AR42J 細胞にアポトーシスは誘導されなかった。AR42J 細胞では CCK-A 受容体と CCK-B 受容体の発現比率が変化していると報告されている。

本研究は、膵腺房細胞の生存と死に内因性糖質コルチコイドが重要な役割を演じており、また、アポトーシスという観点から膵炎の病態における組織防御機構に新しい知見を提供するものと考えられ、学位に値する。