



Title	Dysregulation of PI3K and Hippo signaling pathways synergistically induces chronic pancreatitis via CTGF upregulation
Author(s)	田村, 猛
Citation	大阪大学, 2021, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/85304
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

Synopsis of Thesis

氏名 Name	田村 猛
論文題名 Title	Dysregulation of PI3K and Hippo signaling pathways synergistically induces chronic pancreatitis via CTGF upregulation (PI3KおよびHippoシグナル伝達経路の制御異常は、CTGF発現上昇を介して慢性膵炎を相乗的に誘発する)
論文内容の要旨	
〔目的(Purpose)〕	
慢性膵炎は膵臓への持続的な刺激により病理学的に線維性炎症を認める疾患で、膵発癌の危険因子として重要視されているが、未だ有効かつ特異的な治療法は確立していない。そのため、この発症機序の解明や治療標的の探索が急務である。PI3K/Hippoシグナル伝達経路の主要構成因子PTEN/SAV1は近年、膵癌の発癌促進因子あるいは予後予測因子としての役割が報告されているが、慢性膵炎における役割については不明な点が多い。本研究はPTEN/SAV1を介して慢性膵炎におけるPI3K/Hippoシグナル伝達経路の意義を検討し、治療標的としての可能性を検証することを目的とした。	
〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕	
6週齢のC57BL/6雄マウスを用い、CCKアナログであるセルレインの腹腔内反復投与、または膵管結紮法により2種類の慢性膵炎マウスモデルを作成し、それらの膵組織を用いてPTEN/SAV1発現量の検討を行った。遺伝子発現は定量的PCR法(RT-PCR法)を用いて、蛋白発現は免疫染色法を用いて各々解析した。その結果、コントロールと比較して慢性膵炎領域においてPTEN/SAV1の有意な発現低下を認めた。そこでCre/lox Pシステムを用いてPTEN/SAV1単独あるいは両者を膵臓特異的にノックアウト(KO)した変異マウスを作成した。すると6週齢においてPTENあるいはSAV1を単独でKOしたマウスは野生型マウスと比較して表現型に差異は認められなかった一方、PTEN/SAV1両者をKOしたマウス(PTEN/SAV1 KOマウス)の膵臓にはacinar-to-ductal metaplasia (ADM)やマクロファージ浸潤を伴う炎症、膵星細胞(PSC)の活性化を伴う線維化を認め、慢性膵炎を自然発症したと考えられた。 次にPTEN/SAV1を制御する転写因子について検討した。転写因子データベースであるTRANSFACを用いて検索し、CCAAT/enhancer binding protein alpha (CEBPA)がPTEN/SAV1を制御する上流転写因子として同定された。2種類の慢性膵炎マウスモデルの膵組織を用いてRT-PCR法で解析すると、コントロールと比較して慢性膵炎領域においてCEBPAは有意に発現が低下していた。またIn vitroの検討で、マウス膵腺房細胞株(266-6)においてsiRNAを用いてCEBPAをノックダウン(KD)し、RT-PCR法で解析した結果、コントロールと比較してPTEN/SAV1の発現量は有意に低下し、Hippo経路の標的遺伝子であるCTGFやADM関連マーカーであるSOX9の発現量は有意に上昇した。さらにsiRNAを用いてCEBPA/CTGF両者をKDした266-6においてSOX9の発現上昇は有意に抑制された。また266-6とマウスマクロファージ細胞株(RAW 264.7)、あるいはC57BL/6マウスの膵臓から単離したPSCとの共培養を行い、膵腺房細胞の表現型の変化がマクロファージやPSCに与える影響について検討した。siRNAを用いてCEBPA発現低下させた266-6と共培養したRAW 264.7あるいはPSCにおいて、RT-PCR法で検討すると、コントロールと比較して、各々TNFαやIL-1β、CCL2などの炎症性サイトカインの有意な発現上昇、あるいはTGFβ1やCOL1A1、COL1A2などの線維化促進因子の有意な発現上昇を認めた。さらにsiRNAを用いてCEBPA/CTGF両者を発現低下させた266-6と共培養したRAW 264.7あるいはPSCにおいて、炎症性サイトカインや線維化促進因子の発現上昇は有意に抑制された。 そこで次にPTEN/SAV1 KOマウスにCTGFのKOを追加した変異マウス(PTEN/SAV1/CTGF KOマウス)を作成し、6週齢における表現型を検討した。するとPTEN/SAV1/CTGF KOマウスの膵臓はPTEN/SAV1 KOマウスと比較して組織学的にADMや線維化が抑制され、RT-PCR法で炎症性サイトカインや線維化促進因子の発現量の有意な低下を認め、慢性膵炎像が改善した。さらにセルレイン誘発慢性膵炎マウスモデルに対してコントロールIgG抗体あるいは抗CTGF中和抗体を投与して表現型を検討した。すると抗CTGF中和抗体を投与したマウスの膵臓はコントロールIgG抗体を投与したマウスと比較してADMや線維化が抑制され、RT-PCR法で炎症性サイトカインや線維化促進因子の発現は有意に低下し、やはり慢性膵炎像が改善した。 最後にヒトの閉塞性膵炎や慢性膵炎の切除検体を用いて、免疫染色法で蛋白発現量を検討した。するとコントロールと比較して膵炎領域において、有意なPTEN/SAV1の発現低下およびCTGFの発現上昇を認めた。	
〔総括(Conclusion)〕	
慢性膵炎発症の重要かつ新たな分子基盤として、膵腺房細胞におけるPI3K/Hippoシグナル伝達経路の制御異常が明らかとなり、下流エフェクターであるCTGFを標的とすることが慢性膵炎の有効な治療戦略となる可能性が示唆された。	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 田村 猛			
論文審査担当者		(職)	氏 名
	主 査	大阪大学教授	竹 原 徹 郎
	副 査	大阪大学教授	蘭 池 章
	副 査	大阪大学教授	熊 手 塚 淳
論文審査の結果の要旨 慢性膵炎は膵癌の発生母地として重要視されているが、未だ有効な治療法が存在せず、発症機序の解明や治療標的の探索が急務とされる。本研究は膵癌発症に寄与するPI3K/Hippoシグナル伝達経路に注目し、各々の経路の構成因子であるPTENとSAV1の発現が慢性膵炎マウスモデルで減弱していることを見出した。次にPTENとSAV1を膵腺房細胞で欠失させたマウスを作成すると、慢性膵炎が自然発症することを発見した。また膵腺房細胞においてPTEN/SAV1の発現低下により過剰産生された分泌蛋白CTGFが、腺房-導管異形成の誘導、マクロファージからの炎症性サイトカイン産生、膵星細胞からの線維化関連因子産生を促進し、慢性膵炎の発症に寄与することを明らかにした。さらにCTGFの欠失や抗CTGF中和抗体を用いた治療により慢性膵炎が改善することをマウスモデルで証明した。最後にPI3K/Hippo経路の制御異常やCTGF発現亢進がヒト慢性膵炎組織で認められることを発見した。以上より、本研究は慢性膵炎発症の新たな分子基盤としてPI3K/Hippo経路の制御異常を明らかにし、CTGFが慢性膵炎の新たな治療標的となる可能性を示唆しており、学位の授与に値すると考えられる。			