

氏名	きたみ ちえ 北見 智恵
学位	博士 (医学)
学位記番号	新大博(医)第1724号
学位授与の日付	平成20年1月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
博士論文名	Dynamics of Aquaporin 1 and Aquaporin 8 in the pancreas : Experimental study with Caerulein-induced pancreatitis model (ラットセルレイン誘発急性膵炎モデルにおけるアクアポリン1とアクアポリン8の動態)
論文審査委員	主査 教授 青柳 豊 副査 教授 畠山 勝義 副査 教授 山本 格

博士論文の要旨

【背景・目的】水チャンネル Aquaporin (AQP) は細胞膜で水の能動的移動に関わっており、膵においては、AQP1,4,5,8,12 が発現している。またラットセルレイン誘発膵炎モデルは浮腫性膵炎として確立されており、間質浮腫、腺房細胞の膨化、炎症細胞浸潤が特徴とされている。さまざまな研究がこのモデルで行われているが、AQP との関係調べた研究はない。今回我々は遺伝子発現とその蛋白発現を膵局所で明らかにするため、AQP1 と AQP8 を選び、ラット膵炎モデルにおける AQP 発現とその変動を形態学的変化と比較検討した。【方法】200-250g の Wistar 系ラットを用い、コレシストキニンアナログであるセルレイン 10 μ g/kg/h を 3 時間持続静注し急性膵炎モデルを作成した。投与後 3 時間 (急性膵炎期:Cn3h 群), 72 時間 (治癒期: Cn72h 群) に開腹し、膵を摘出した。また生食のみの静注を対照群とした。定量的 RT-PCR(TaqMan 法), ウェスタンブロット法、および免疫組織化学染色を用い、AQP1,AQP8 の発現および変動を検討した。AQP mRNA 発現は GAPDH mRNA 発現に対する比(%)で表し、結果は Mann-Whitney の U 検定で比較した。形態的变化は HE 染色および ApopTaq[®]を用いて検討した。【結果】AQP1 mRNA は対照群 23.9 \pm 21.8, Cn3h 群 8.6 \pm 8.4, Cn72h 群 2.3 \pm 2.2, AQP8 mRNA は対照群 4.7 \pm 3.2 Cn3h 群 2.1 \pm 1.5, Cn72h 群 1.7 \pm 1.1 と経時的に減少し、Cn72h 群では有意に減少していた(AQP1: p=0.015, AQP8: p=0.029)。AQP1 では Cn72h 群で対照群、Cn3h 群と比し有意に減少していた (p=0.001、p=0.015)。一方 AQP8 では Cn3h 群と Cn72h 群では有意差は認めなかった(p=0.546)。Western blot 法では AQP1,AQP8 とも 28kDa にバンドを認めた。AQP1 の蛋白発現はセルレイン投与で変化はなかった。AQP8 の蛋白発現は Cn3h 群、Cn72h 群で対象群に比し有意に低下していた。免疫組織染色では、AQP1 は膵管上皮と血管内皮に発現を認めた。膵管上皮の AQP1 は、Cn3h,Cn72h 群ともに発現が低下した。血管内皮の AQP1 は強発現

し、セルレイン投与で発現強度は変化しなかった。AQP1 はラ氏島細胞や腺房細胞には発現を認めなかった。また AQP8 は腺房細胞の腺腔側に発現を認め、対象群に比し、Cn3h 群で低下していたが、Cn72h 群ではわずかに回復していた。HE 染色では Cn3h 群で間質の浮腫と腺房細胞の膨化、炎症細胞浸潤を認め、急性膵炎像を呈したが、Cn72h 群ではそれらの所見は回復していた。ApopTaq[®]によるアポトーシスの発現については、Cn3h 群の腺房細胞にのみ、アポトーシスを認め、対照群、Cn72h 群では、認めなかった。また膵管上皮においては、いずれの群でもアポトーシスは認めなかった。【考察】1.腺房細胞膨化と AQP8 について：セルレイン誘発膵炎モデルでは間質の浮腫と腺房細胞の膨化が起こり、48 時間で回復する。浮腫という観点からみると、腺房細胞の AQP8 発現減少により、腺房細胞から血管腔への水輸送が減少し、腺房細胞の膨化に関与している可能性がある。また、AQP8 の回復は組織学的回復よりも遅れると考えられた。2.mRNA と蛋白発現の解離について：本研究で、mRNA と蛋白発現に解離が認められた。これは他研究でも報告があるように、mRNA と蛋白における安定性と turn over の相違によるものと考えられた。3.膵管上皮 AQP1 の減少について：急性膵炎モデルにおいては、腺房細胞の障害が主たる病態であるとされており、文献的にも腺房細胞が選択的に障害され、膵管細胞やラ氏島細胞は変化を受けないと報告されている。本研究でも形態的には膵管上皮の障害は認めず、アポトーシス細胞も認めなかった。しかし、膵管 AQP1 の発現は、急性膵炎期、治癒期ともに低下していた。この膵管上皮の AQP1 減少は、膵管上皮の潜在的な障害が持続していることを示唆している可能性が考えられた。このような潜在的な膵管上皮障害の存在が膵炎において膵管ネットワークを破壊し、膵外分泌機能低下をきたす可能性も考えられた。【結語】AQP1,AQP8 の発現低下は浮腫性膵炎における潜在的な細胞障害を示唆し、浮腫性膵炎発症メカニズムの一部に関与している可能性があると思われた。

(論文審査の要旨)

本件研究では AQP1 と AQP8 を選び、ラット膀胱炎モデルにおける AQP 発現とその変動を形態学的変化と比較検討した。

Wister 系ラットを用いセルレインを持続静注し急性膀胱炎モデルを作成した。投与後 3 時間 (急性膀胱炎期, 3h), 72 時間 (治癒期, 72h) に膀胱を摘出し, 定量的 RT-PCR, ウェスタンブロット法, および免疫組織化学染色を用い, AQP1, AQP8 の発現および変動を検討した。

AQP1, AQP8 mRNA は対照群に比較し 3h 群, 72h 群で経時的に減少していた。AQP1 の蛋白発現はセルレイン投与で変化はなかったが, AQP8 の蛋白発現は 3h 群, 72h 群で対象群に比し有意に低下していた。免疫組織染色では, AQP1 は膀胱管上皮と血管内皮に発現を認め, 膀胱管上皮の AQP1 は, 3h, 72h 群ともに発現が低下した。これらは, 腺房細胞の AQP8 発現減少により, 腺房細胞から血管腔への水輸送が減少し, 腺房細胞の膨化に関与していること, ならびに膀胱管上皮 AQP1 減少が膀胱管上皮の潜在的な障害を来し, 膀胱管ネットワークを破壊し膀胱外分泌機能低下をきたす可能性を示していると考えられた。

以上本研究においては, AQP1, AQP8 の発現低下は浮腫性膀胱炎発症メカニズムの一部に関与している可能性がある事を明らかにしたものであり, この点に学位論文としての価値を認めた。