



# Vitamin K3 attenuates cerulein-induced acute pancreatitis through inhibition of the autophagic pathway

鎮西, 亮

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2010-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲5052

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005052>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏 名	鎮西 亮
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学 位 記 番 号	博い第 5052 号
学位授与の 要 件	学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与の 日 付	2010 年 9 月 25 日

【 学位論文題目 】

Vitamin K3 attenuates cerulein-induced acute pancreatitis through inhibition of the autophagic pathway （ビタミン K3 がオートファジー経路を介してセルレインによる急性膵炎を軽減する）

審 査 委 員

主 査	教 授	匂坂 敏朗
	教 授	具 英成
	教 授	平井 みどり

(課程博士関係)

## 学 位 論 文 の 内 容 要 旨

### Vitamin K3 attenuates cerulein-induced acute pancreatitis through inhibition of the autophagic pathway

ビタミン K3 がオートファジー経路を介してセルレインによる  
急性膵炎を軽減する

神戸大学大学院医学系研究科医科学専攻  
消化器内科学  
(指導教員：東 健教授)

鎮 西 亮

## はじめに

急性膵炎は、大きくは軽症と重症とに分類される。軽症急性膵炎は、間質性膵炎とも呼ばれ、膵血流は保たれている。一方、重症急性膵炎はしばしば臓器不全や局所合併症を伴い、膵血流の破綻、虚血による膵壊死を認めることもある。急性膵炎患者の約 2 割が重症化し、そのような患者は治療の甲斐も無く不幸な転帰をとることがある。近年、膵腺房細胞内での不適切なトリプシノーゲンからトリプシンへの活性化が、膵炎の引き金となるという報告がある。そして急性膵炎動物モデルにおいてオートファジーがトリプシノーゲンをエンドソームやリソソーム送る役割を担っているとの報告もある。だが膵炎発症のメカニズムについては、未だ解明されていない部分が多い。

ビタミン K (VK) は、ビタミン K1 (VK1)・ビタミン K2 (VK2)・ビタミン K3 (VK3) を含む、脂溶性ビタミンの一種である。VK1 は、最も良く知られた VK であり、緑葉野菜や海藻類などに豊富に含まれている。VK2 は細菌により作り出されるビタミンである。人工合成物である VK3 はプロビタミンであり、体内で活性型へと変換される。VK は血液凝固や骨代謝への関与が知られており、また抗癌作用や酸化ストレスを介してのアポトーシス誘導作用に関する報告もある。とくに VK3 は、肝臓・口腔・咽頭・乳腺・膀胱や血液など様々な癌細胞株に対して強い抗癌作用を報告されている。しかし、VK3 の抗炎症効果については明確になっていない。

本研究でわれわれはまず、セルレイン膵炎が VK1, VK2, VK3 投与により減弱し得るかについて実験を行った。次に、急性膵炎においてオートファジーが誘導されているかを確かめ、VK3 がそれを抑制するかを調べた。また GFP-LC3 発現 HeLa 細胞株において、VK3 がオートファジーを抑制するかを VK1, VK2 と比較して検討を行った。

## 1. VK3 はマウスのセルレイン膵炎を減弱させた。

VK3 の急性膵炎に対する効果を明らかにするために、本研究ではマウスのセルレイン膵炎モデルが使用された。セルレイン投与群では膵組織の HE 標本において、著明な炎症所見を認めた。VK3 の 1 回投与群と 2 回投与群においては、炎症所見の低下が見られた。血清アミラーゼ測定においても、VK3 投与でアミラーゼの低下傾向が見られた。膵組織のトリプシノーゲン活性も VK3 投与により有意に低下していた。一方、VK1 と VK2 の投与によっては、炎症所見の改善は認めなかった。これらの結果により、VK3 が急性膵炎を抑制し、その効果が VK1 と VK2 より強いことが示唆された。

## 2. VK3 はセルレイン膵炎におけるオートファジーを抑制した。

次に VK3 が急性膵炎を減弱させる機構について調べられた。過去に、セルレイン刺激がオートファジーを惹起し、それが直接膵炎発症と関与しているとの報告がなされていた。そこでわれわれは、VK3 がオートファジー経路を抑制することにより急性膵炎を減弱させているとの仮定を立てた。まず GFP-LC3 マウスを用いてセルレイン投与がオートファジーを引き起こすかが試された。セルレイン投与後 8 時間では、高度な炎症所見を伴うが、24 時間後には炎症所見は消退していた。その時のオートファジーの推移を膵組織の免疫染色で確認したが、炎症所見と並行するようにセルレイン投与 8 時間後に強いオートファジーの発現を確認できた。またウエスタンブロッティング

グによる LC3-II の発現も、同様の結果を示していた。

続いて VK3 の腹腔内投与が急性膵炎によるオートファジーを抑制するかを検討した。その結果、免疫染色においてもウエスタンブロッティングにおいても、また電子顕微鏡撮影においても VK3 投与によるオートファジー抑制効果が証明された。

### **3. VK3 はセルレインによるオートファゴソームとリソソームの共局在を制御した。**

急性膵炎発症初期には、膵分泌顆粒とリソソームの共局在が見られ、そのことが急性膵炎発症を引き起こすと考えられている。そしてその共局在にオートファジーが大きな役割を果たしているとの報告がある。そこでセルレイン膵炎下でのオートファゴソームとリソソームの共局在についての検討が行われた。急性膵炎においては高い割合でオートファゴソームとリソソームの共局在が観察されたが、VK3 投与により共局在は有意に低下していた。これらの結果により VK3 の急性膵炎抑制効果は、発症初期の段階で発現していることが示唆された。

### **4. VK3 は HeLa 細胞においてラパマイシン誘導オートファジーを抑制した。**

VK3 のオートファジー抑制効果を in vitro でも証明するため、GFP-LC3 を定常的に発現する HeLa 細胞株を用いて実験が行われた。mTOR を抑制することでオートファジーを誘導することが知られているラパマイシンが使われた。免疫染色にて検討したが、ラパマイシン投与によりオートファゴソームの形成は著明に増加した。そして VK3 投与によりそのオートファジー誘導は有意に抑制された。VK1 と VK2 は、有意な抑制効果を示さなかった。VK3 の抑制効果はウエスタンブロッティングによっても証明された。

### **おわりに**

今回のわれわれの検討で、VK3 のオートファジー経路を介した急性膵炎抑制効果が示された。この結果が急性膵炎に対する新しい治療戦略へ繋がる可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨			
受 付 番 号	甲 第 2129 号	氏 名	鎮 西 亮
論 文 題 目 Title of Dissertation	Vitamin K3 attenuates cerulein-induced acute pancreatitis through inhibition of the autophagic pathway ビタミン K3 がオートファジー経路を介してセルレインによる急性 膵炎を軽減する		
審 査 委 員 Examiner	主 査 勾 坂 敏 朗 Chief Examiner 副 査 具 英 成 Vice-examiner 副 査 平 井 み どり Vice-examiner		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

目 的
急性膵炎患者は約2割が重症化し、そのような患者は治療の甲斐も無く不幸な転帰をとることがある。近年、膵臓細胞内での不適切なトリプシノーゲンからトリプシンへの活性化が、膵炎の引き金となるという報告がある。そして急性膵炎動物モデルにおいてオートファジーがトリプシノーゲンをエンドソームやリソソーム送る役割を担っているとの報告もある。ビタミンK (VK) は、ビタミンK1(VK1)・ビタミンK2(VK2)・ビタミンK3(VK3)を含む、脂溶性ビタミンの一種である。VK3は、様々な癌細胞株に対する強い抗癌作用を報告されている。しかし、抗炎症効果については未だ明らかにされていない。
本研究では、マウスの急性膵炎がVK3投与により減弱し得るかについて実験を行い、オートファジーとの関与について検討した。
方 法
マウスの急性膵炎は、セルレインを1時間毎に6回腹腔投与することにより誘導された。VK3はセルレイン投与前の1回、またはセルレイン投与前と投与後の2回腹腔内注射された。膵臓の炎症の程度は病理組織学的評価、膵酵素の測定により行われた。オートファジーの評価は、共焦点顕微鏡観察、ウェスタンブロット法、電子顕微鏡観察により行われた。またHeLa細胞株においては、オートファジーはラパマイシンによって誘導され、共焦点顕微鏡観察、ウェスタンブロット法により評価された。
結 果
1、VK3はマウスのセルレイン膵炎を減弱させた。
セルレイン投与群では膵組織のHE標本において、著明な炎症所見を認めた。VK3の1回投与群と2回投与群においては、炎症所見の低下が見られた。血清アミラーゼ測定においても、VK3投与でアミラーゼの低下傾向が見られた。膵組織のトリプシノーゲン活性もVK3投与により有意に低下していた。一方、VK1とVK2の投与によっては、炎症所見の改善は認めなかった。これらの結果により、VK3が急性膵炎を抑制し、その効果がVK1とVK2より強いことが示唆された。

<b>2. VK3 はセルレイン膵炎におけるオートファジーを抑制した。</b>
まず GFP-LC3 マウスを用いてセルレイン投与がオートファジーを引き起こすかが試
された。セルレイン投与後 8 時間では、高度な炎症所見を伴うが、24 時間後には炎症
所見は消退していた。その時のオートファジーの推移を膵組織の免疫染色で確認し
たが、炎症所見と並行するようにセルレイン投与 8 時間後に強いオートファジーの発
現を確認できた。またウエスタンブロッティングによる LC3-II の発現も、同様の結果を
示していた。続いて VK3 の腹腔内投与が急性膵炎によるオートファジーを抑制するかを
検討した。その結果、免疫染色においてもウエスタンブロッティングにおいても、また
電子顕微鏡観察においても VK3 投与によるオートファジー抑制効果が証明された。
<b>3. VK3 はセルレインによるオートファゴソームとリソソームの共局在を制御した。</b>
急性膵炎発症初期には、膵分泌顆粒とリソソームの共局在が見られ、そのことが急
性膵炎発症を引き起こすと考えられている。そしてその共局在にオートファジーが大
きな役割を果たしているとの報告がある。そこでセルレイン膵炎下でのオートファゴソ
ームとリソソームの共局在についての検討が行われた。急性膵炎においては高い割
合でオートファゴソームとリソソームの共局在が観察されたが、VK3 投与により共局在
は有意に低下していた。これらの結果により VK3 の急性膵炎抑制効果は、発症初期
の段階で発現していることが示唆された。
<b>4. VK3 は HeLa 細胞においてラバマイシン誘導オートファジーを抑制した。</b>
共焦点顕微鏡観察にて検討したが、ラバマイシン投与によりオートファゴソームの形
成は著明に増加した。そして VK3 投与によりそのオートファジー誘導は有意に抑制さ
れた。VK1 と VK2 は、有意な抑制効果を示さなかった。VK3 の抑制効果はウエスタン
ブロッティングによっても証明された。
<b>結論</b>
本研究により、VK3 のオートファジー経路を介した急性膵炎抑制効果が示された。VK3
による急性膵炎の新しい治療方法の可能性が示唆された。
以上、本研究は急性膵炎における VK3 の炎症抑制効果を明らかにする上で重要な示唆
を与えるものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究は、博士（医学）の学
位を得る資格があると認める。