

慢性膵炎におけるケモカインの発現とその意義

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/4505

慢性膵炎におけるケモカインの発現とその意義

金沢大学大学院医学系研究科がん医科学専攻腫瘍統御学
(主任：澤武紀雄教授)

毛 利 久 継

ケモカインは好中球をはじめ、単球/マクロファージ、好塩基球、T細胞などの走化活性、血管内皮との接着など様々な生物学的作用を有し、多くの急性ならびに慢性炎症性疾患に関与することが指摘されている。本研究では、自然発症慢性膵炎モデルWBN/Kobラットを用い、慢性膵炎におけるケモカインの発現とその炎症・線維化過程における病態生理学的意義を検討した。WBN/Kobラットの膵組織を採取し、cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC)などのケモカイン発現の変化を経時的に評価し、また、抗炎症薬IS-741投与の同モデルに対する効果と、ケモカイン発現に及ぼす影響を調べた。WBN/Kobラットでは、慢性膵炎は12週齢において組織学的に確認され、炎症のピークは12週齢、線維化のピークは16週齢であった。CINCとMCP-1のmRNAは膵炎発症期の12週齢で強く誘導され、その後低下した。またMIP-2は20週齢で再上昇傾向を示した以外、他のケモカインと同様の推移を示した。WBN/KobラットにIS-741を投与したところ、投与群では12週齢における間質の浮腫・出血・炎症細胞浸潤、16週齢における腺房細胞の変性・膵の線維化といった所見は有意に抑制された。また、CINCをはじめとするケモカイン発現は、いずれも12週齢にて非投与群と比較しIS-741投与群では明らかに低値であった。IS-741は好中球やマクロファージの血管内皮への接着・浸潤を抑制し、CINCの作用を減弱させ、結果的に慢性膵炎の進展を抑制したものと考えられた。以上より、ラット慢性膵炎におけるケモカインの膵実質細胞における発現が細胞浸潤を助長し、慢性膵炎の発症・進展に関与するとともに、ケモカインの作用を抑制する薬剤の投与が慢性膵炎の治療に有用である可能性が示唆された。

Key words chronic pancreatitis, interleukin-8, WBN/Kob rat, AR4-2J cells, chemokine, IS-741

慢性膵炎は不可逆的に膵外分泌組織が破壊される進行性の炎症疾患である。病因としてアルコール過剰摂取によるものが最も多いが、原因が不明で特発性とされるものも多く、さらにその組織破壊の正確なメカニズムは解明されていない。インターロイキン (interleukin, IL)-8はCXCケモカインスーパーファミリーに属し、広範な領域で炎症の前駆的役割を果たしている。IL-8は当初好中球の遊走因子として見出され^{1)~5)}、これまでリンパ球、単球、内皮細胞、線維芽細胞、肝細胞、角質細胞などの種々の細胞で産生されることが報告されている^{1)~5)}。またIL-8は敗血症⁶⁾、虚血再還流肝障害モデル⁷⁾などの急性炎症疾患のみならず、ウイルス性慢性肝炎⁸⁾、慢性糸球体腎炎⁹⁾、特発性肺線維症¹⁰⁾等の慢性炎症組織においても発現が亢進しており、その炎症の進展・慢性化への関与が示唆されている。膵炎に関しては、これまで急性膵炎におけるIL-8の発現亢進が報告されており^{11)~17)}、感染性壊死性膵炎のマーカーとしての有用性や¹²⁾ 予後・重症度との相関が示されている。一方、最近慢性膵炎についても若干の報告¹⁵⁾¹⁶⁾があるが、慢性膵炎におけるIL-8発現の意義に関しては不明な点が多い。特にヒト慢性膵炎においては病初期の組織を得ることは困難であり、また経時的にその組

織学的変化を評価することは不可能である。本研究では、自然発症慢性膵炎モデルであるWBN/Kobラットの膵組織を用い、CINC (IL-8スーパーファミリーに属し、ヒトGRO- α のホモログ¹⁷⁾)及び他の代表的ケモカインである単球走化性タンパク質 (monocyte chemoattractant protein, MCP-1) と、macrophage inflammatory protein (MIP-2)の発現の経時変化を分子生物学的及び病理学的に検討し、慢性膵炎の病勢との関連性を検討した。さらに、抗炎症作用を有し、新規膵炎治療薬として期待されているIS-741をWBN/Kobラットに投与し、その効果を組織学的に評価した。また、IS-741のケモカイン発現動態に及ぼす影響を分子生物学的、病理学的に検討した。さらに、膵腺房由来AR4-2J細胞、ヒト慢性膵炎組織におけるケモカイン発現とその局在について評価し、その意義について検討した。

対象と方法

I. 自然発症慢性膵炎モデル (WBN/Kobラット)

4週齢の雄性WBN/Kobラット (日本SLC社、体重約80g) を蛋白質28.1%、脂肪6%と両者を豊富に含む特殊繁殖飼料MB-3 (船橋農場) で24週間飼育した。4週間隔で6匹のラットを屠

平成13年7月22日受付、平成15年9月8日受理

Abbreviations: CINC; cytokine-induced neutrophil chemoattractant; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; IL-8, interleukin-8; iNOS, inducible nitric oxide synthase; ISH, In situ hybridization; MCP-1, monocyte chemoattractant protein; MIP-2, macrophage inflammatory protein; TGF- β ₁, transforming growth factor- β ₁; TNF- α , tumor necrosis factor- α

殺し、膵臓を摘出した。一部を4%パラフォルムアルデヒドにて4℃・16時間固定後、パラフィン包埋し、切片作製後、HE染色にて病理組織像を検討した。間質の浮腫・出血・炎症細胞浸潤・腺房細胞の変性・線維化・膵管の過形成といった慢性膵炎でみられる所見を各々病理学的項目とし、その領域が組織標本全体に占める割合を計測し、病変が認められないときをスコア0、病変が25%以下のときをスコア1、病変が25から50%のときをスコア2、病変が50%以上のときをスコア3とする基準にてスコア化した。さらに、CINC、MCP-1、MIP-2を半定量的逆転写PCR反応 (reverse transcription-PCR, RT-PCR) 法により検出した。

II. IS-741 投与実験

抗膵炎薬としてIS-741 (石原産業, 住友製薬, 大阪, 日本) を前述の飼料MB-3中に0.012%の濃度に調整し、WBN/Kobラットに経口的に4週齢より与え投与群とした。またMB-3のみ与えた群をコントロール群とした。8週齢, 12週齢, 16週齢での時点で各群のラットを屠殺し、膵臓を摘出し前述のごとくHE染色を行った。8週齢, 12週齢, 16週齢の各時点で、コントロール群はそれぞれ8匹, 10匹, 8匹, IS-741投与群はそれぞれ6匹, 8匹, 6匹を実験に用いた。前述のスコアを同様に用い、病理組織像を比較した。さらに組織の一部を用い、半定量的RT-PCR法によりCINC、MCP-1、MIP-2のmRNAの発現を検討した。

III. ヒト膵組織

1987年4月から2002年3月までに金沢大学がん研究所腫瘍内科およびその関連施設にて診断し、外科的切除を受けた患者を対象とした。疾患の内訳は慢性膵炎 (閉塞性) 26例 (膵管癌17例, 乳頭部癌4例, 良性嚢胞性膵腫瘍5例), 膵管癌14例であった。また対照として、胃癌の胃全摘手術の際に合併切除された正常膵9例を用いた。手術にて得られた膵組織を10%中性緩衝ホルマリンにて約16時間固定後パラフィン包埋し、3~4μmの組織切片を作製した。なお、切除標本を実験に用いることに関しては、本人あるいは家族にあらかじめ文書で同意を得た。

IV. 細胞培養及び処理

ラット膵腺房細胞由来のAR4-2J細胞 (大日本製薬, 大阪) をF12K培地 (10%胎児牛血清, ペニシリン, カナマイシンを含む) にて5%CO₂, 37℃のインキュベーター中で培養した。AR4-2J細胞の培地中にメナジオン (menadione, シグマ アルドリッチ ジャパン, 東京), ラット腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor, TNF)-α (Pepro Tech EC, London, UK), ヒト形質変換成長因子 (transforming growth factor, TGF)-β₁ (R&D System, Inc., Minneapolis, USA) を各々50μM, 100ng/mL, 5ng/mLの最終濃度に調整し、添加した。同様の処理を計6回行い、実験を繰り返した。

V. IL-8 免疫染色

ヒト膵組織切片を100%キシレンにて5分間, 2回, 100%エタノールで3分間2回, 90%エタノールで3分間, 70%エタノールで3分間の脱パラフィン処理を行った。免疫染色にはDAKO LSAB キット (ダコ・ジャパン, 京都) を用いた。一次抗体には抗ヒトIL-8モノクローナル抗体 (Genzyme, Minneapolis, USA) を50倍希釈して用い、4℃にて16時間反応させた。続いてビオチン標識二次抗体 (ダコ・ジャパン) を反応させ、さらに3-アミノ-9-エチルカルバゾール (3-amino-9-ethylcarbazole) にて発色させた。その後ヘマトキシリンにて核染色を行い封入し

た。また一次抗体の陰性対照として正常マウスIgGを用い、同様の方法にて免疫染色を行った。

VI. RT-PCR

RNA isolation kit (Ultraspec-II, Biotex Laboratories, Inc., Houston, USA) を用いてラット膵組織より総RNAを抽出した。また、Simple Nucleic Acid Prep (S.N.A.P.) RNA extraction kit (Invitrogen, Groningen, Netherlands) を用いてAR4-2J細胞より全RNAを抽出した。種々の遺伝子のcDNAはRT-PCR kit (StrataScript RT-PCR kit), (Stratagene, Inc., La Jolla, CA, USA) を用いて合成した。PCRに使用したGRO/CINC, MCP-1, MIP-2, 誘導型一酸化窒素産生酵素 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) のプライマー (sense, antisense) の配列は以下の通りである。

GRO/CINCは5'プライマーとして5'-GAAGATAGATTGCA CCGATG, 3'プライマーとして3'-CTTTACACACTC TCCGATAC¹⁸⁾, MCP-1は5'-CACTATGCAGGTCTCTGTACAG, 3'-ACCTGGTCTTGGTTCCTACTCTAG¹⁹⁾, MIP-2は5'-CAGTGAGCTGCGCTGTCCAAT, 3'-GACTTGTTCCTCGTT CCGATTGA¹⁵⁾, iNOSは5'-GTGAGGATCAAAAAGTGGGG, 3'-CACCAGGTTGGACGTCCA²⁰⁾, 内部コントロールとしてはグリセルアルデヒド3リン酸脱水素酵素 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) プライマー (Clontech Laboratories, Inc., San Diego, USA) を用いた。PCR産物は電気泳動にて検出し、発現強度は画像解析ソフトウェア (ATTO Densitograph ver. 3.02) (アトー, 東京) を用いて測定した。各々のmRNAのGAPDH mRNAと比較した発現強度 (各々のmRNA/GAPDH mRNA) を計測することにより半定量的解析を行った。

VII. 生体内局所ハイブリダイゼーション (*in situ* hybridization, ISH) 法

ISHにはISHキット (Maxim Biotech, Inc., San Francisco, USA) を用いた。ヒトIL-8オリゴヌクレオチドプローブ (Biognostik GmbH, Gottingen, Germany) の濃度を250ng/mlとし、42℃にて一晩インキュベーションした。42℃で蛋白阻害緩衝液で3度洗浄し、アルカリフォスファターゼの作用下に塩化ニトロブルーテトラゾリウム (nitroblue tetrazolium chloride, NBT)/5-ブromo-4-クロロ-3-インドールリン酸 (5-bromo-4-chloro-indolylphosphate, BCIP) を発色させた。Nuclear Fast Red (Biomega, Inc., Foster City, USA) を用い核染色を行い、封入した。陰性コントロールとして、連続切片をセンスプローブと反応させた。これらのプローブはDNA labelling kit (Biotin-High Prime, Böehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany) を用いてビオチン標識を行った。

VIII. 統計処理

検定にはunpaired t検定, Mann-Whitney's U検定, X²検定を用いた。P<0.05をもって統計学的に有意差ありと判定した。

成 績

I. WBN/Kob ラット膵の病理組織学的推移

WBN/Kobラット膵の組織学的評価に際し、間質の浮腫、腺房細胞の変性、炎症細胞の浸潤、出血、線維化、膵管細胞の過形成などの慢性膵炎で病理学的にみられる所見が標本内で占める領域を算定し、以下のようにスコア化した²¹⁾。スコア0, 病変無し; スコア1, 25%以下; スコア2, 25%から50%; スコ

ア3, 50%以上.

経時的にWBN/Kobラットの膵病変の推移をみると, 表1に示すように4週齢及び8週齢では病理学的変化は認められなかったが, 12週齢で慢性膵炎の組織学的所見が出現した. 間質の浮腫, 出血, 炎症細胞浸潤のピークは12週齢, 腺房細胞の変性, 線維化, 膵管細胞の過形成のピークは16週齢であった.

II. WBN/Kobラット膵における各種ケモカインのmRNAの発現

4, 8, 12, 16, 20, 24週齢のWBN/Kobラット膵組織から抽出したRNAより各ケモカインに対するプライマーを用いて得られたRT-PCR産物を2%アガロースゲルにて電気泳動を行ったところ, 図1Aに示すように, 4週齢でCINC mRNAは367bpに, MIP-2 mRNAは210bpの位置に発現が確認され, 12週齢で最も強く発現した. それらのサイズは既報のもの一致した^{18)~19)}. またMCP-1 mRNAは294bpの位置に8週齢から発現が確認され, 12週齢で強く発現した. これも既報のものと同じサイズは一致

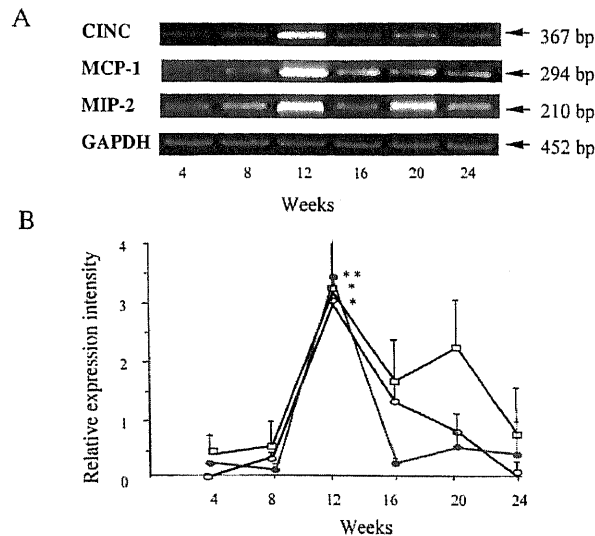


Fig. 1. (A) Expression of CINC, MCP-1, MIP-2 mRNA analyzed by RT-PCR in the pancreas of the WBN/Kob rats every 4 weeks. GAPDH was used as an internal control. (B) Relative expression intensity of CINC, MCP-1, MIP-2 mRNA. Expression peaked at 12 weeks. * $P < 0.05$, versus other time points (Bonferroni/Dunn analysis). The data are presented as the $\bar{X} \pm \text{SEM}$ ($n=6$). Closed circles, CINC, mRNA; open circles, MCP-1 mRNA; open squares, MIP-2 mRNA.

した¹⁹⁾.

発現した各々のmRNAのGAPDH mRNAと比較した発現強度を計測することにより半定量的に解析すると, 図1Bに示すごとく, CINC mRNAとMCP-1 mRNAは12週齢でピークに達したのち, 減少し, 他週と比べ12週齢で有意に高値であった. MIP-2 mRNAは12週齢でピークを示し, 4, 8及び24週齢と比べ有意に高値であった. また, MIP-2 mRNAは16週齢以後も比較的発現が遅延し, 20週齢で軽度再上昇を示したが, 16週齢及び24週齢と比べ有意差は認められなかった.

III. IS-741の投与効果

自然発症慢性膵炎モデルであるWBN/Kobラットに通常のMB-3飼料のみを与えた群をコントロール群とし, 飼料に新規膵炎治療薬IS-741を配合して投与した群における膵組織の病理組織学的所見とCINC, MCP-1, MIP-2 mRNA各ケモカインの発現を比較した. 図2に示すごとく, IS-741投与群で病変はコントロール群と比較し明らかに軽度であり, 病理スコアを用いた評価で検討すると, 表2のようにIS-741投与群では12週齢における間質の浮腫, 細胞浸潤の程度がコントロール群と比較し有意に軽度であった. また16週齢における腺房細胞の変性, 線維化の程度もコントロール群と比較し有意に軽度であった.

各ケモカインの動態を比較すると, IS-741投与群でCINC, MCP-1, MIP-2 mRNAの発現はいずれも図3に示すように, 炎症のピークである12週齢でも弱く, 半定量的に解析すると図4に示すごとく, いずれのケモカインの発現レベルも12週齢でコントロール群と比較し有意に低値であった.

IV. AR4-2J細胞におけるCINC, iNOS発現

膵腺房細胞由来培養細胞AR4-2Jにおいて, メナジオン処理後, 0, 2, 4, 8, 16, 24時間の各時点での経時変化を検討すると, CINC mRNAは処理後2時間で発現が確認され, iNOS mRNAは未処理の状態でも軽度発現しており, 2時間以降明瞭となった(図5A). また, GAPDH mRNAの発現強度と対比することにより求めた半定量解析ではCINC mRNAは処理後8時間, iNOS mRNAは2時間後にピークを示した(図5B). 次にTGF- β_1 , TNF- α をAR4-2J細胞の培養液中に添加し, 処理後24時間の時点のCINC発現強度をRT-PCR法にて比較すると, これらサイトカインの単独添加ではCINCの発現はごくわずかしか誘導されなかったが, 両者を同時に添加した群で図6Aに示すごとくCINC発現が強く誘導された. 半定量解析にて発現強度を比較すると, 図6Bに示すごとくTGF- β_1 , TNF- α 両者添加群で有意にCINC発現が高かった.

Table 1. Histological findings of the pancreas in WBN/Kob rats (H&E)

Weeks ($\bar{X} \pm \text{SEM}$)	Interstitial edema	Hemorrhage	Inflammatory cell infiltration	Acinar degeneration	Fibrosis	Ductal hyperplasia
4 (n=6)	0	0	0	0	0	0
8 (n=6)	0	0	0	0	0	0
12 (n=6)	1.50 \pm 0.22*	1.50 \pm 0.22*	2.50 \pm 0.22*	1.67 \pm 0.30	0.92 \pm 0.40	0.83 \pm 0.48
16 (n=6)	1.33 \pm 0.21	1.30 \pm 0.21	2.10 \pm 0.31	2.50 \pm 0.20*	2.55 \pm 0.30*	1.83 \pm 0.40*
20 (n=6)	1.33 \pm 0.52	1.17 \pm 0.17	1.60 \pm 0.33	2.17 \pm 0.17	1.56 \pm 0.34	1.17 \pm 0.17
24 (n=6)	1.33 \pm 0.58	1.00 \pm 0.00	1.30 \pm 0.58	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00

Histologic findings of pancreas in the WBN/Kob rat. Pathological scores were based on hematoxylin and eosin staining. Data are $\bar{X} \pm \text{SEM}$ ($n=6$). Scores: absence of lesion=0, involvement percentage of <25%=1, 25-50%=2, >50%=3. * $P < 0.05$ vs. other weeks.

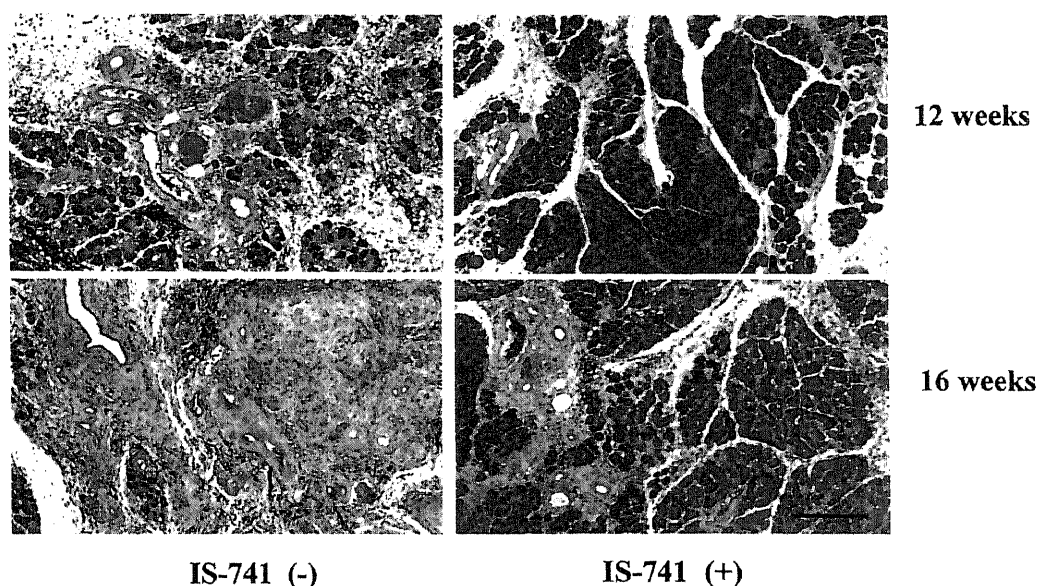


Fig. 2. The changes of histological findings of chronic pancreatitis in the WBN/Kob rat at 12 and 16 weeks based on hematoxylin and eosin staining. Only mild pathologic changes were seen in the IS-741-treated WBN/Kob rats at each time point. Bar indicates 100 μ m.

Table 2. Histological findings of the pancreas in IS-741-treated WBN/Kob rats (H&E)

Weeks ($\bar{X} \pm \text{SEM}$)	Interstitial edema	Hemorrhage	Inflammatory cell infiltration	Acinar degeneration	Fibrosis	Ductal hyperplasia
Control						
8 (n=8)	0	0	0	0	0	0
12 (n=10)	1.08 \pm 0.23	1.13 \pm 0.15	2.40 \pm 0.15	1.33 \pm 0.30	0.92 \pm 0.40	0.58 \pm 0.29
16 (n=8)	0.89 \pm 0.12	1.00 \pm 0.21	1.64 \pm 0.12	2.36 \pm 0.20	2.55 \pm 0.30	1.73 \pm 0.27
IS-741						
8 (n=6)	0	0	0	0	0	0
12 (n=8)	0.22 \pm 0.015*	0	0.50 \pm 0.33**	0.75 \pm 0.53	0.75 \pm 0.50	0.63 \pm 0.42
16 (n=6)	0.58 \pm 0.47	0.50 \pm 0.22	1.08 \pm 0.27	1.17 \pm 0.31*	1.17 \pm 0.31*	1.00 \pm 0.25

Histological findings of pancreas in the IS-741-treated WBN/Kob rat. Pathological scores were based on hematoxylin and eosin staining. Data are $\bar{X} \pm \text{SEM}$. Scores: absence of lesion=0, involvement percentage of <25%=1, 25-50%=2, >50%=3. * P <0.05; ** P <0.01 vs. compared with control.

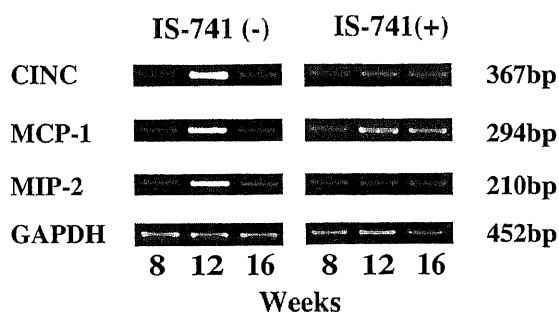


Fig. 3. Gene expression of CINC, MCP-1, MIP-2 in pancreas of WBN/Kob rat from 8 to 16 weeks. RNA was isolated and cDNA was synthesized and analyzed by RT-PCR. Product sizes are indicated at the right. GAPDH was used as the internal control.

V. ヒト膵組織における IL-8 蛋白発現

ヒト膵組織において、免疫組織学的に IL-8 の発現を検討したところ、慢性膵炎組織では、腺房細胞、増殖膵管細胞、間質の浸潤細胞の細胞質に IL-8 が強く発現していた (図 7A)。各膵組織における IL-8 の発現率をみると、慢性膵炎組織では 26 例中 19 例 (73%) で IL-8 が陽性であったが、膵癌組織 14 例及び正常膵組織 9 例では全て陰性であった (表 3)。

ヒト慢性膵炎組織における膵線維化の程度を、一切片中に占める線維化領域の割合を算出し、以下の様に分類した。0: 正常 (grade 0); 25% 以下: 軽度 (grade 1); 25% から 50%: 中等度 (grade 2); 50% 以上: 高度 (grade 3)。これに基づき、慢性膵炎 26 例の線維化の程度を検討すると、grade 1 は 11 例、grade 2 は 6 例、grade 3 は 9 例に分けられた。IL-8 発現の程度を腺房細胞、間質の炎症細胞、膵管細胞別に検討すると (図 8)、

腺房細胞では高度線維化群でIL-8発現率は低下していた。一方、膵管細胞、炎症細胞では線維化が進展するに従って発現率が高くなった。

Ⅵ. ヒト膵組織におけるIL-8 mRNA発現 (ISH)

ISH法により慢性膵炎組織におけるIL-8 mRNAの局在を検討すると、図7Bに示すごとく免疫染色の結果と同様に、腺房細胞、炎症細胞、膵管細胞の細胞質で発現が確認された。また膵癌細胞では陰性であった。

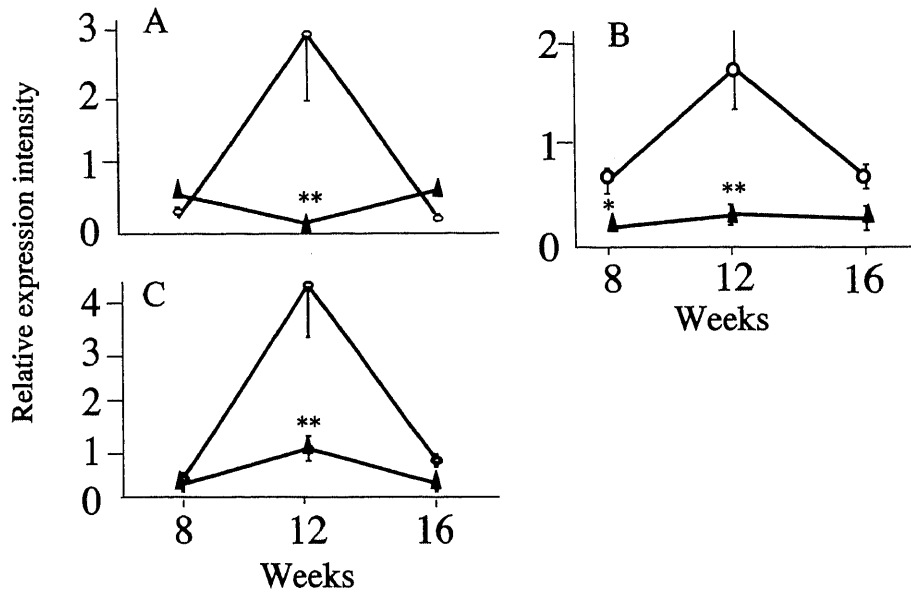


Fig. 4. Relative gene expression intensity of CINC (A), MCP-1 (B), MIP-2 (C) in the course of chronic pancreatitis in the WBN/Kob rat. The relative expression intensity of each mRNA band was determined with an image analyzer and the ratio of each mRNA/GAPDH mRNA was calculated. GAPDH was an internal control, and the data are presented as the $\bar{X} \pm \text{SEM}$. Open circles, untreated WBN/Kob rat (n=6); closed triangles, IS-741-treated WBN/Kob rat (n=6). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, IS-741-treated WBN/Kob rats compared with untreated WBN/Kob rats.

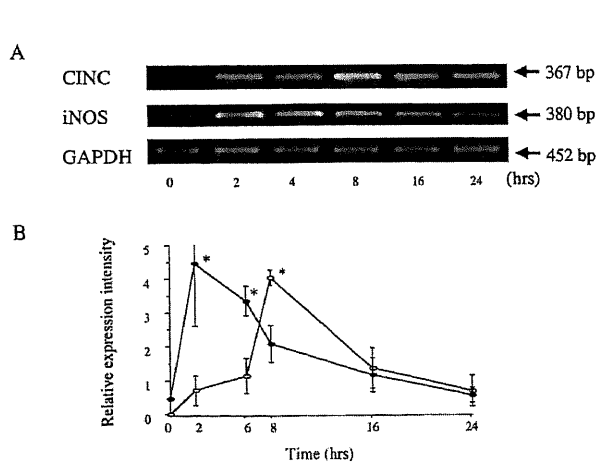


Fig. 5. (A) Expression of CINC and iNOS mRNA analyzed by RT-PCR in AR4-2J cells treated with $50 \mu\text{mol/L}$ menadione. GAPDH was used as an internal control. (B) Relative expression intensity of CINC and iNOS mRNA. The CINC and iNOS mRNA peaked at 8 hrs and 2 hrs, respectively. * $P < 0.05$, versus 0, 16 and 24 hrs (Bonferroni/Dunn analysis). The data are presented as the $\bar{X} \pm \text{SEM}$ (n=6). Open circles, CINC mRNA; closed circles, iNOS mRNA.

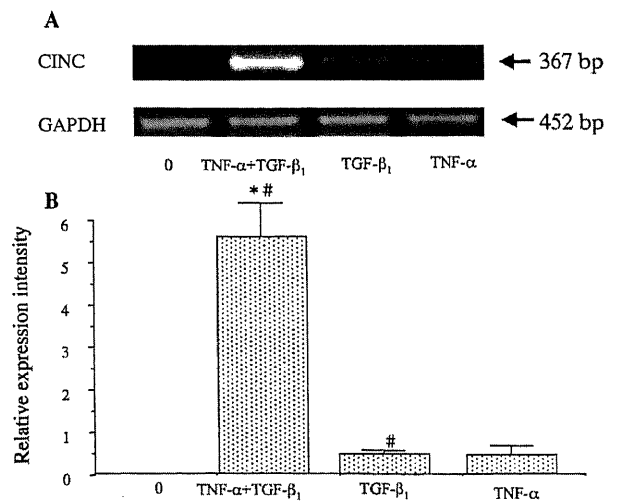


Fig. 6. (A) Expression of CINC mRNA analyzed by RT-PCR. In AR4-2J cells treated with $\text{TNF-}\alpha$ and $\text{TGF-}\beta_1$ for 24 hrs. GAPDH was used as an internal control. (B) Relative expression intensity of CINC mRNA. * $P < 0.05$, versus AR4-2J cells treated with $\text{TNF-}\alpha$ and/or $\text{TGF-}\beta_1$ for 24hr (Bonferroni/Dunn analysis). The data are presented as the $\bar{X} \pm \text{SEM}$ (n=6). # $P < 0.01$, versus untreated AR 4-2J cells.

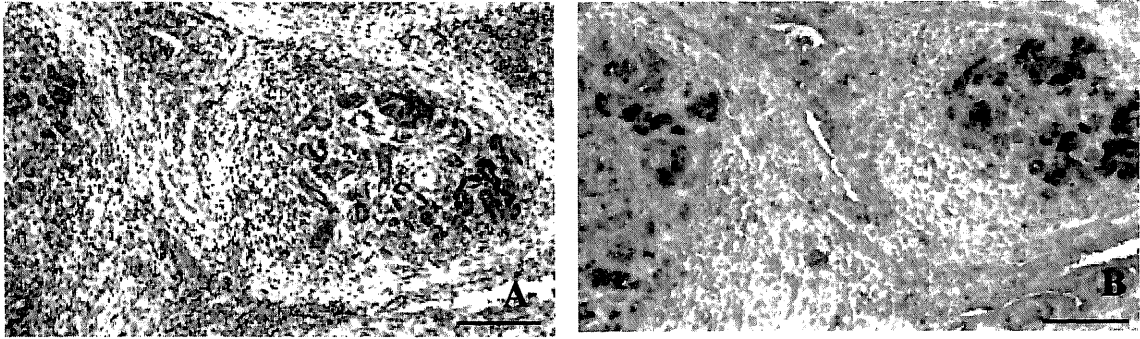


Fig. 7. IL-8 expression in human chronic pancreatitis tissue detected by immunohistochemistry and *in situ* hybridization (ISH). (A) IL-8 protein was localized to the cytoplasm of acinar cells, proliferating ductal cells and infiltrating inflammatory cells. Bar indicates 200 μ m. (B) The results of ISH were similar to those of immunohistochemistry. Bar indicates 100 μ m.

Table 3. IL-8 expression in human pancreatic diseases

	IL-8 immunoreactivity n (%)
Normal pancreas (n=9)	0 (0)
Pancreatic cancer (n=14)	0 (0)
Chronic pancreatitis (n=26)	19 (73.1)

Statistical analysis was performed using the χ^2 test. * $P < 0.01$; ** $P < 0.02$.

考 察

ケモカインは好中球遊走促進作用を有することから、各種炎症性疾患において重要な役割を担うとされている。慢性膵炎におけるケモカインの発現については既にいくつかの報告がなされているが¹⁵⁾¹⁶⁾、慢性膵炎の発症・進展過程におけるIL-8発現の経時的変化についてはこれまで報告されていない。さらに、ヒト慢性膵炎の発症・進展過程を病理形態学的あるいは病態生理学的に検討することは実際には不可能である。そこで本研究では、自然発症慢性膵炎モデルであるWBN/Kobラットを用いて膵炎の発症・進展過程と対比しながら、CINCを中心として各種ケモカインの動態を検討した。本モデルでは特殊な薬物やストレスを必要とせず、慢性膵炎の発症や進展を観察できる。高蛋白・高脂肪食である特殊繁殖飼料MB-3で飼育すると、本モデルでは病理学的には8週齢まで膵組織は正常であるが、12週齢で間質の浮腫、出血、炎症細胞浸潤のピークを示し、16週齢で腺房細胞変性・脱落線維化、膵管過形成のピークを示した。半定量的RT-PCR法によるCINC mRNAの経時的検討では、慢性膵炎の発症に一致し、病理組織学的に炎症性変化の極期である12週齢でCINC mRNA発現のピークが認められた。また、線維化・実質の破壊が進行した16週齢で、CINC mRNA発現レベルは低下した。このように膵組織における炎症所見を反映してCINC mRNAが増減したことから、CINC発現は本モデルにおける慢性膵炎の病勢を反映していると考えられた。さらに、病理学的に正常な4週齢および8週齢のWBN/Kobラット膵組織で、既にCINC mRNAは弱いながらも発現していた。このよう

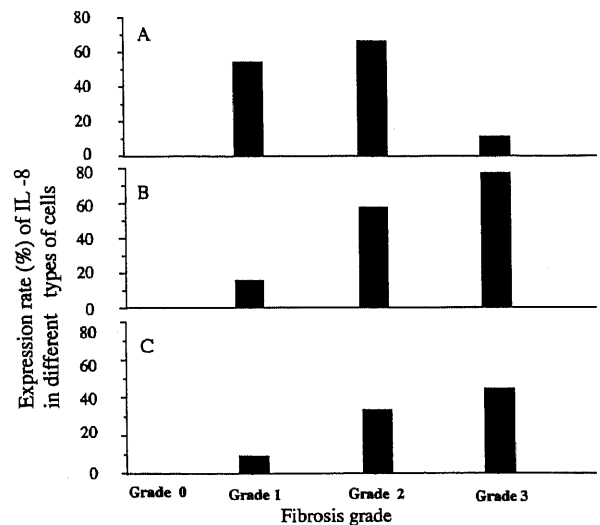


Fig. 8. IL-8 expression in each cell type in the progression human chronic pancreatitis. (A), acinar cells; (B), infiltrating cells; (C), ductal cells. The expression rate of IL-8 was decreased in acinar cells and increased in proliferating ductular cells and interstitial infiltrating cells as pancreatic fibrosis progressed.

に慢性膵炎発症前あるいは初期段階で既にCINC mRNAが発現していることより、CINCがその発症に関与している可能性示唆された。しかし膵炎発症前のCINCの発現が、膵組織中の細胞に局在するかは不明である。

慢性膵炎の重要な病理学的変化は膵線維化であり、これが慢性膵炎との大きな違いである。ケモカインが膵線維化に関与するか否かを検討した報告はない。一方、肺線維症とIL-8を比較とするケモカインとの関係に関しては、特発性肺線維症患の肺胞洗浄液中IL-8レベルが増加すると報告されている²²⁾。今回の研究において、膵線維化とケモカインの関係に焦点を当てると、まずWBN/Kobラットの慢性膵炎モデルではCINC mRNAのピークが12週齢で、膵線維化のピークが16週齢に認められたことから、膵線維化の重要なメディエーターであるTGF- β 1などを介してCINCが膵線維化を促進する可能性が考えられる。実際には本研究の図6で示したように複数の因

相互に作用してサイトカイン・ケモカインネットワークを形成しており、本研究もそのネットワークの一部をみていると思われる。

次に、ヒトの慢性膵炎の膵線維化の程度を3段階に分けて、その程度とIL-8発現との関連を検討したところ、膵線維化の初期（軽度）にはIL-8発現細胞は腺房細胞が主であり、中等度の線維化では間質浸潤細胞や膵管細胞でのIL-8発現が増加し、これら3者のいずれにおいてもIL-8の発現がみられた。そして高度の膵線維化では残存する腺房細胞でのIL-8発現は低下し、IL-8発現細胞のほとんどが間質浸潤細胞と膵管細胞で占められるようになった。このように慢性膵炎における膵線維化の程度によってIL-8発現細胞の構成が変化することも本研究で明らかになった。まず腺房細胞からIL-8が産生され、paracrine的に周囲に炎症細胞を集め、その浸潤細胞からもIL-8が放出され、炎症・線維化が惹起されるという膵組織内での各種細胞間のクロストークが存在する可能性も考えられる。より直接的にIL-8の膵線維化への関与を証明するためには、例えばIL-8により膵星細胞が活性化されるか否かを検討する必要がある。一般的に線維化は炎症と密接に関連しており、本研究はラット慢性膵炎における炎症とそれに続く線維化の経過をケモカイン発現動態とともに観察したとも言える。

IL-8蛋白の局在についてSaurerら¹⁵⁾は、ISH法を用いてヒト慢性膵炎におけるIL-8 mRNAの発現を検討し、IL-8 mRNA発現細胞は膵管細胞・腺房中心細胞・間質浸潤細胞であると報告している。またDi Sebastianoら¹⁶⁾は、免疫染色法にてIL-8蛋白は、主として膵内神経周囲に浸潤したマクロファージに発現したと報告している。今回の我々の検討では、IL-8発現細胞の構成はヒト慢性膵炎の病期によって異なっており、IL-8は実質・間質の両者の細胞において産生され、お互いにクロストークしている可能性が示唆される。

MCP-1はC-Cケモカインファミリーに属する代表的ケモカインである。MCP-1は単球/マクロファージを特異的に遊走させる因子として同定され、単球/マクロファージからのライソゾーム酵素や、活性酸素を放出させる機能を有する²⁴⁾。また肺線維症²⁵⁾や慢性肝炎²⁶⁾などの組織の炎症、線維化との関連を示唆する報告もみられる。Gharaee-Kermaniら²⁷⁾はラットから単離した線維芽細胞を用い、MCP-1刺激により線維芽細胞のコラーゲン及びTGF- β_1 遺伝子が誘導されたと報告し、線維芽細胞の活性化との関与を推察している。またSaurerら¹⁵⁾はヒト慢性膵炎においてMCP-1 mRNAが線維芽細胞、腺房中心細胞、間質浸潤細胞などで発現することを報告している。本研究では、WBN/KobラットにおいてMCP-1 mRNAは12週齢でピークを示し、以後漸減した。当教室のSuら²¹⁾は同モデルを用い、TGF- β_1 およびフィブロネクチンの膵組織における発現について検討したところ、12週齢で双方のmRNAがピークを示し、MCP-1と同様16週以降漸減していた。このような従来教室の成績と併せ考慮すれば、線維芽細胞や膵星細胞におけるMCP-1発現が線維芽細胞のコラーゲンやTGF- β_1 発現を促し、膵の線維化を助長することが推察される。以上のように従来炎症の惹起に関与すると考えられてきたケモカインが、慢性膵炎の膵線維化にも密接に関与することが示唆される。

MIP-2はIL-8と同様CXCケモカインに属する。Keaneら²⁸⁾はマウスのプレオマイシン誘導膵線維症モデルを用いMIP-2発現について検討し、MIP-2中和抗体投与により肺の線維化が軽減

したと報告している。それに対し、Hogaboam²⁹⁾らはアセトアミノフェン急性肝障害モデルにアデノウイルスベクターを用いてMIP-2発現を誘導すると、肝障害が抑制されたと報告しており、このモデルにおいてMIP-2が肝細胞に対し保護的に働き、急性肝障害後の肝再生に寄与する可能性について述べている。膵に関しては、ラットのセルレイン急性膵炎モデルを用いたPastorら³⁰⁾の報告があり、抗MIP-2抗体投与により膵炎およびそれに伴う肺障害が軽減されたと報告している。本研究では、WBN/Kobラット慢性膵炎においてMIP-2 mRNAは12週齢でピークを示し、20週齢で軽度増加を呈した。上述した様にMIP-2は炎症の誘導と組織の再生という2面性をもつと考えられ、組織破壊・再生のどちらに傾くかは、その発現量やその他の因子の関与により決定されると推定される。膵炎の活動性のピークにおいてMIP-2 mRNAがピークを示したことは、MIP-2がCINCと同じCXCケモカインに属することからも、この時点では炎症細胞浸潤・組織破壊を助長しているものと考えられる。またMIP-2が慢性膵炎が沈静化した後の20週齢で増加していたことは、この時点での腺房細胞の再生と関連しているのかも知れない。

IS-741は新しく合成されたジアミノピリジン系の抗炎症薬であり、当初フォスホリパーゼA2の特異的阻害剤として開発されたが、実際にはインテグリンファミリーに属するMac-1 (CD11b/18)の発現を抑制することで白血球の接着や浸潤を抑制する作用を有するといわれている³¹⁾。実験的急性膵炎においてIS-741投与の有効性が報告されている^{32)~35)}が、慢性膵炎における検討はまだまだなされていない。本研究では、IS-741投与により明らかにWBN/Kobラットの慢性膵炎の進展を阻止し、同時にCINC等の各種ケモカインの発現も明らかに抑制した。また、Liangら³⁴⁾はラットセルレイン急性膵炎モデルにおいてIS-741を投与すると、膵及び肺のマクロファージのCINC産生が抑制されたことを報告している。一方、今回の検討により、ラット膵腺房細胞由来AR4-2J細胞を用いた*in vitro*の実験で、TNF- α やTGF- β_1 などのサイトカインの刺激によりCINC発現が誘導されることを見出した。さらに、CINCは好中球や単球/マクロファージの血管内皮への接着を引き起こすことが知られている³⁶⁾。以上のことを考慮すると、IS-741が投与されたWBN/Kobラットでは、好中球やマクロファージ、NK細胞で発現される細胞表面抗原であるMac-1発現がIS-741により抑制される結果、膵への白血球浸潤、特に慢性炎症に不可欠な単球/マクロファージの浸潤が抑制され、浸潤細胞から放出されるサイトカイン刺激が减弱し、腺房細胞や線維芽細胞におけるケモカインの発現が抑制されることが推定される。さらに、膵組織での各種ケモカインの発現量が減少することにより、細胞の浸潤が抑制され、組織破壊と線維化の進展抑制に結びつくと思われ。

一般に慢性膵炎の発生の一因に膵虚血が想定され、WBN/Kobラットにおける慢性膵炎の発生にも膵虚血が関与している可能性が指摘されている³⁷⁾。その際に酸化ストレスにより発生したフリーラジカルの関与が重要とされている³⁸⁾³⁹⁾。本研究の*in vitro*の実験で用いたメナジオンはキノン化合物で酸化ストレスとして作用し、フリーラジカルを産生してiNOSとCINCを誘導したものと推察される。ケモカインは酸化ストレス時に各種細胞⁴⁰⁾⁴¹⁾において誘導されることが報告されている。iNOSは大量の一酸化窒素(NO)合成を触媒し、その活性

は酵素が分解されるか、あるいはNO産生細胞が死滅するまで持続する⁴²⁾。NOには、組織での酸化ストレスを増強する一方で、活性化された好中球の血管内皮への接着を抑制する作用がある⁴³⁾。実験的急性膵炎におけるNOの動態に関する報告をみると、軽症の膵炎ではNOは膵の微小循環の悪化を改善し、血管透過性を抑制することで膵に対して組織保護的に作用するが⁴⁴⁾⁴⁵⁾、細菌感染が合併した場合などでは、NOが過剰に産生されることにより、血管平滑筋の弛緩、過剰な血管透過性の亢進、NO自体の組織傷害性などの悪影響を及ぼすとされている⁴⁶⁾。また、当教室のMotooら⁴⁷⁾はNOの基質であるアルギニン投与により、ラット膵腺房AR4-2J細胞にアポトーシスを引き起こすことを報告している。今回培地中へのメナジオン添加による酸化ストレスによりAR4-2J細胞がCINCとiNOSのmRNAを誘導することを証明した。以上より、生体では低酸素状態(虚血)が膵腺房細胞のCINC発現を誘導し、増加したCINCにより膵への炎症細胞浸潤が促進されると推測される。また、同時に産生されたiNOSがNOを誘導し、これが直接障害を引き起こしている可能性も考えられる。CINCによって促進される炎症細胞浸潤に対しNOが抑制的に働き、組織保護作用を示すか否かはNOの産生量により左右されるのであろう。

Andohら⁴⁸⁾は、ヒト膵組織より単離した膵腺房細胞周囲線維芽細胞を用いた検討で、サイトカインTNF- α は線維芽細胞におけるIL-8およびMCP-1発現を速やかに誘導すると報告している。またKumarら⁴⁹⁾は、TGF- β_1 はラット肺胞上皮細胞のCINC発現を誘導すると述べている。当教室の謝らはWBN/Kobラットにおいて膵腺房細胞がTNF- α ⁵⁰⁾とTGF- β_1 ²¹⁾を発現し、各々8週齢、12週齢でピークを示すと報告している。今回*in vitro*において、TNF- α とTGF- β_1 の同時投与でCINCがラット膵腺房細胞で強く誘導されたことからTNF- α とTGF- β_1 等のサイトカインは、慢性膵炎におけるケモカイン発現の誘導に関与している可能性がある。こうしたサイトカイン及びケモカインカスケードあるいはネットワークが特に慢性膵炎の発症時期に活性化されると考えられる。

ヒト慢性膵炎において、IL-8は膵腺房細胞で発現し炎症細胞を遊走させることで組織破壊を助長している可能性がある。ヒト慢性膵炎はその原因(例えばアルコール)が除去された場合にも、不可逆的でときに進行性の経過をたどる。これには何らかの因子により一度膵腺房細胞でのIL-8産生が始まると炎症反応が持続・遷延化する機構が作動し、その結果IL-8発現が慢性膵炎の不可逆性に関与している可能性がある。急性膵炎と慢性膵炎の関係は長年議論されている。今日慢性膵炎の発症は急性膵炎の反復と密接に関連していると一般に認識されているが、急性膵炎の反復状態から慢性膵炎への移行を決定する因子が何かはいまだに明らかとなっていない。急性膵炎におけるIL-8の関与に関してはこれまでいくつか報告されている。また実験的急性膵炎モデルにおいて抗IL-8抗体を投与することにより、肺障害が軽減されたとの報告もあり⁵¹⁾、IL-8が急性膵炎の重症化に深く関与していることも示唆されている。急性膵炎時に誘導されたTNF- α やIL-1 β 等のサイトカインによりIL-8が炎症浸潤細胞以外に膵実質細胞にも誘導され、それが炎症細胞の浸潤を促進し、組織破壊が進行することが繰り返されると、何らかの機構によりIL-8発現の制御機構が破綻し、慢性膵炎へと進展してしまうのかもしれない。

結 論

自然発症慢性膵炎モデルWBN/Kobラット、ラット膵腺房由来AR4-2J細胞、ヒト慢性膵炎組織を用い、慢性膵炎におけるケモカインの発現とその病態生理学的意義を検討し、以下の結論を得た。

1. CINC mRNAはWBN/Kobラットの膵炎発症期および炎症の極期である12週齢で強く誘導され、その後低下した。
 2. WBN/Kobラットに抗炎症薬IS-741を投与すると、非投与群に比し投与群で慢性膵炎の各病理所見は有意に改善し、またCINC発現も明らかに抑制された。
 3. 酸化ストレス(メナジオン)負荷やサイトカイン(TNF- α とTGF- β_1 同時投与)によりAR4-2J細胞にCINC mRNAが強く誘導された。
 4. ヒト慢性膵炎の検討にて、膵線維化が軽度の例では膵腺房細胞に、膵線維化が高度の例では膵管細胞や間質浸潤細胞にIL-8がより強く発現していた。
- 以上のように、ケモカインが慢性膵炎の発症と進展に関与し、ケモカインの発現制御が慢性膵炎の治療に繋がる可能性が示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御検閲を賜りました金沢大学大学院医学系研究科がん医科学専攻腫瘍統御学澤武紀雄教授に深甚なる謝意を捧げます。また終始直接ご指導を賜りました同教室元雄良治助教授に心から感謝致します。さらに、多大なるご協力を頂きました同教室員の皆様には厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Matsushima K, Oppenheim J J. Interleukin 8 and MCAF: novel Inflammatory cytokines inducible by IL-1 and TNF. *Cytokine* 1: 2-13, 1989
- 2) Hebert C A, Baker J B. Interleukin-8: a review. *Cancer Invest* 11: 742-750, 1993
- 3) Mukaida N, Okamoto S, Ishikawa Y, Matsushima K. Molecular mechanism of interleukin-8 gene expression. *J Leukoc Biol* 56: 554-558, 1994
- 4) Baggiolini M, Loetscher P, Moser B. Interleukin-8 and the chemokine family. *Int J Immunopharmacol* 17: 103-108, 1995
- 5) Bar-Emi M. Role of interleukin-8 in tumor growth and metastasis of human melanoma. *Pathobiology* 67: 12-18, 1999
- 6) Matsumura F, Yamaguchi Y, Goto M, Ichiguchi O, Akizuki E, Matsuda T. Xanthine oxidase inhibition attenuates kupffer cell production of neutrophil chemoattractant following ischemia-reperfusion in rat liver. *Hepatology* 28: 1578-1587, 1998
- 7) Mitsuhashi H, Hata J, Asano S, Kishimoto T. Appearance of cytokine-induced neutrophil chemoattractant isoforms and immunolocalization of them in lipopolysaccharide-induced acute lung inflammation in rats. *Inflamm Res* 48: 588-593, 1999
- 8) Masumoto T, Ohkubo K, Yamamoto K. Serum IL-8 levels and localization of IL-8 in liver from patients with chronic viral hepatitis. *Hepatogastroenterology* 45: 1630-1634, 1998
- 9) Rebenok AZH, Tikhonov II, Chizh AS. Role of IL-8 and defensins in pathogenesis of chronic glomerulonephritis and pyelonephritis (in Russian with English abstract). *Ter Arkh* 71:

- 62-67, 1999
- 10) Lynch JP III, Standiford TJ, Rolfe MW. Neutrophilic alveolitis in idiopathic pulmonary fibrosis. The role of interleukin-8. *Am Rev Respir Dis* 145: 1433-1439, 1992
 - 11) Mahler O, Susanne B, Lausten O. Graded experimental acute pancreatitis: monitoring of a renewed rabbit model focusing on the production of interleukin-8 (IL-8) and CD11b/CD18. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 11: 137-149, 1999
 - 12) Rau B, Steinbach G, Gansauge F. The potential role of procalcitonin and interleukin 8 in the prediction of infected necrosis in acute pancreatitis. *Gut* 41: 832-840, 1997
 - 13) Gross V, Anderson R, Leser H-G. Interleukin-8 and neutrophil activation in acute pancreatitis. *Eur J Clin Invest* 22: 200-203, 1992
 - 14) Berney T, Gasche Y, Robert J. Serum profiles of interleukin-6, interleukin-8, and interleukin-10 in patients with severe and mild acute pancreatitis. *Pancreas* 18: 371-377, 1999
 - 15) Saurer L, Reber P, Schaffner T. Differential expression of chemokines in normal pancreas and in chronic pancreatitis. *Gastroenterology* 118: 356-367, 2000
 - 16) Di Sebastiano P, Di Mola FF, Di Febbo C, Baccante G, Porreca E, Innocenti P, Friess H, Büchler M W. Expression of interleukin 8 (IL-8) and substance P in human chronic pancreatitis. *Gut* 47: 423-428, 2000
 - 17) Watanabe K, Suematsu M, Iida M. Effect of rat CINC/ gro, a member of the interleukin-8 family, on leukocytes in microcirculation of rat mesentery. *Exp Mol Pathol* 56: 60-69, 1992.
 - 18) Himi T, Yoshioka I, Kataura A. Production and gene expression of IL-8-like cytokine GRO/CINC-1 in rat nasal mucosa. *Acta Otolaryngol* 117: 123-127, 1997
 - 19) Pandol SJ, Periskic S, Gukovsky I, Zaninovic V, Jung Y, Zong Y, Solomon TE, Gukovskaya AS, Tsukamoto H. Ethanol diet increases the sensitivity of rats to pancreatitis induced by cholecystokinin octapeptide. *Gastroenterology* 117: 706-716, 1999
 - 20) Walz A, Schmutz P, Mueller C. Regulation and function of the CXC chemokine ENA-78 in monocytes and its role in disease. *J Leukoc Biol* 62: 604-611, 1997
 - 21) Su SB, Motoo Y, Xie MJ, Miyazono K, Sawabu N. Expression of transforming growth factor-beta in spontaneous chronic pancreatitis in the WBN/Kob rat. *Dig Dis Sci* 45: 151-159, 2000
 - 22) Carre PC, Mortenson RL, King TE Jr, Noble PW, Sable CL, Riches DW. Increased expression of the interleukin-8 gene by alveolar macrophage in idiopathic pulmonary fibrosis. A potential mechanism for recruitment and activation of neutrophils in lung fibrosis. *J Clin Invest* 88: 1802-1810, 1991
 - 23) Car BD, Meloni F, Luisetti M, Semenzato G, Gialdroni G, Walz A. Elevated IL-8 and MCP-1 in the bronchoalveolar lavage fluid of patients with idiopathic pulmonary fibrosis and pulmonary sarcoidosis. *Am J Respir* 149: 655-659, 1994
 - 24) Mukaida N, Harada A, Matsushima K. Interleukin-8 (IL-8) and monocyte chemoattractant and activating factor (MCAF/MCP-1), chemokines essentially involved in inflammatory and immune reactions. *Cytokine Growth Factor Rev* 9: 9-23, 1998
 - 25) Zhang K, Gharaee-Kermani M, Jones ML, Warren JS, Phan SH. Lung monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *J Immunol* 153: 4733-4741, 1994
 - 26) Marra F, DeFranco R, Grappone C, Milani S, Pastacaldi S, Pinzani M, Romanelli RG, Laffi G, Gentilini P. Increased expression of monocyte chemoattractant protein-1 during active hepatic fibrogenesis: correlation with monocyte infiltration. *Am J Pathol* 152: 423-430, 1998
 - 27) Gharaee-Kermani M, Denholm EM, Phan SH. Costimulation of fibroblast collagen and transforming growth factor beta1 gene expression by monocyte chemoattractant protein-1 via specific receptors. *J Biol Chem* 271: 17779-17784, 1996
 - 28) Keane MP, Belperio JA, Moore TA, Moore BB, Arenberg DA, Smith RE, Burdick MD, Kunkel SL, Strieter RM. Neutralization of the CXC chemokine, macrophage inflammatory protein-2, attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *J Immunol* 162: 5511-5518, 1999
 - 29) Hogaboam CM, Simpson KJ, Chensue SW, Steinhauser ML, Lukacs NW, Gauldie J, Strieter RM, Kunkel SL. Macrophage inflammatory protein-2 gene therapy attenuates adenovirus- and acetaminophen-mediated hepatic injury. *Gene Ther* 6: 573-584, 1999
 - 30) Pastor CM, Rubbia-Brandt L, Hadengue A, Jordan M, Morel P, Frossard JL. Role of macrophage inflammatory peptide-2 in cerulein-induced acute pancreatitis and pancreatitis-associated lung injury. *Lab Invest* 83: 471-478, 2003
 - 31) Yamauchi J, Sunamura M, Shibuya K, Takeda K, Kobari M, Matsuno S. A novel diamino-pyridine derivative prevents excessive leukocyte infiltration in aggravation of acute necrotizing pancreatitis. *Digestion* 60: 40-46, 1999
 - 32) Yotsuya S, Shikama H, Nakano I, Sakai K, Kato M, Sugi H, Takada H, Koga Y. A novel synthetic anti-acute pancreatitis agent, IS-741. *Digestion* 60: 34-39, 1999
 - 33) Kimura H, Yotsuya S, Yuki S, Sugi H, Shigehara I, Haga T. Synthesis and antipancreatitis activities of novel N-(2-sulfonylamino-5-trifluoromethyl-3-pyridyl) carboxamide derivatives as phospholipase A2 inhibitors. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 43: 1696-1700, 1995
 - 34) Liang J, Yamaguchi Y, Matsumura F, Okabe K, Akizuki E, Matsuda T, Ohshiro H, Nakano S, Ishihara K, Ogawa M. Novel carboxamide derivative (IS-741) attenuates lung injury in rats with cerulein-induced pancreatitis complicated by endotoxemia. *Dig Dis Sci* 44: 341-349, 1999
 - 35) Yamaguchi Y, Okabe K, Liang J, Matsumura F, Akizuki E, Matsuda T, Ohshiro H, Nakano S, Ishihara K, Ogawa M. The novel carboxamide derivative IS-741 reduces neutrophil chemoattractant production by bronchoalveolar macrophages in rats with cerulein-induced pancreatitis complicated by sepsis. *Digestion* 60: 52-56, 1999
 - 36) Gerszten RE, Garcia-Zepeda EA, Lim YC, Yoshida M, Ding HA, Gimbrone MA Jr, Luster AD, Luscinskas FW, Rosenzweig A. MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular

- endothelium under flow conditions. *Nature* 398: 718-723, 1999.
- 37) Ohashi K, Kim JH, Hara H, Aso R, Akimoto T, Nakama K. WBN/Kob rats. A new spontaneously occurring model of chronic pancreatitis. *Int J Pancreatol* 6: 231-247, 1990
- 38) Szuster-Ciesielska A, Daniluk J, Kandefler-Szerszen M. Oxidative stress in blood of patients with alcohol-related pancreatitis. *Pancreas* 22: 261-266, 2001
- 39) Matsumura N, Ochi K, Ichimura M, Mizushima T, Harada H. Study on free radicals and pancreatic fibrosis-pancreatic fibrosis induced by repeated injections of superoxide dismutase inhibitor. *Pancreas* 22: 53-57, 2001
- 40) Shi Q, Le X, Abbruzzese JL, Wang B, Mukaida N, Matsushima K, Huang S, Xiong Q, Xie K. Cooperation between transcription factor AP-1 and NF-kappaB in the induction of interleukin-8 in human pancreatic adenocarcinoma cells by hypoxia. *J Interferon Cytokine Res* 19: 1363-1371, 1999
- 41) Dong W, Simeonova PP, Gallucci R, Matheson J, Fannin R, Montuschi P, Flood L, Luster MI. Cytokine expression in hepatocytes: role of oxidant stress. *J Interferon Cytokine Res* 18: 629-638, 1998
- 42) Rodeberg DA, Chaet MS, Bass RC, Arkovitz MS, Garcia VF. Nitric oxide: an overview. *Am J Surg* 170: 292-303, 1995
- 43) Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 4651-4655, 1991
- 44) Werner J, Fernandez-del Castillo C, Rivera JA, Kollias N, Lewandrowski KB, Rattner DW, Warshaw AL. On the protective mechanisms of nitric oxide in acute pancreatitis. *Gut* 43: 401-407, 1998
- 45) Liu X, Nakano I, Yamaguchi H, Ito T, Goto M, Koyanagi S, Kinjoh M, Nawata H. Protective effect of nitric oxide on development of acute pancreatitis in rats. *Dig Dis Sci* 40: 2162-2169, 1995
- 46) Kikuchi Y, Shimosegawa T, Satoh A, Abe R, Abe T, Koizumi M, Toyota T. The role of nitric oxide in mouse cerulein-induced pancreatitis with and without lipopolysaccharide pretreatment. *Pancreas* 12: 68-75, 1996
- 47) Motoo Y, Taga K, Su SB, Xie MJ, Sawabu N. Arginine induces apoptosis and gene expression of pancreatitis-associated protein (PAP) in rat pancreatic acinar AR4-2J cells. *Pancreas* 20: 61-66, 2000
- 48) Andoh A, Takaya H, Saotome T, Shimada M, Hata K, Araki Y, Nakamura F, Shintani Y, Fujiyama Y, Bamba T. Cytokine regulation of chemokine (IL-8, MCP-1, and RANTES) gene expression in human pancreatic periacinar myofibroblasts. *Gastroenterology* 119: 211-219, 2000
- 49) Kumar NM, Rabadi NH, Sigurdson LS, Schunemann HJ, Lwebuga-Mukasa JS. Induction of interleukin-1 and interleukin-8 mRNAs and proteins by TGF- β_1 in rat lung alveolar epithelial cells. *J Cell Physiol* 169: 186-199, 1996
- 50) Xie MJ, Motoo Y, Su SB, Sawabu N. Expression of tumor necrosis factor- α , interleukin-6, and interferon- γ in spontaneous chronic pancreatitis in the WBN/Kob rat. *Pancreas* 22: 400-408, 2001
- 51) Osman MO, Kristensen JU, Jacobsen NO, Lausten SB, Deleuran B, Deleuran M, Gesser B, Matsushima K, Larsen CG, Jensen SL. A monoclonal anti-interleukin 8 antibody (WS-4) inhibits cytokine response and acute lung injury in experimental severe acute necrotising pancreatitis in rabbits. *Gut* 43: 232-239, 1998

Expression of chemokine and its potential role in chronic pancreatitis Hisatsugu Mouri, Department of Experimental and Clinical Oncology, Graduate School of Medical Science, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 – J. Juzen Med Soc., **112**, 120 – 130 (2003)

Key words chronic pancreatitis, chemokine interleukin-8, WBN/Kob rat, IS-741

Abstract

Chemokine has various biological effects such as leukocyte chemotaxis, and its associations with various inflammatory diseases have been reported. In the current study, we attempted to analyze the expression of chemokines in chronic pancreatitis (CP) using a spontaneous CP model (WBN/Kob rats) and the therapeutic effect of an anti-inflammatory agent, IS-741. We also investigated the expression of CINC in rat pancreatic acinar AR4-2J cells and human pancreatic tissues. Histological findings of CP appeared at 12 weeks in the WBN/Kob rats. The peaks of inflammation and fibrosis were at 12 and 16 weeks, respectively. The expression of CINC mRNA was significantly induced at the onset of pancreatitis at 12 weeks and decreased thereafter. The administration of IS-741 to WBN/Kob rats significantly reduced interstitial edema, hemorrhage, and infiltration of inflammatory cells at 12 weeks, and the degeneration of acinar cells and fibrosis at 16 weeks. Furthermore, the expression of CINC and other chemokines significantly decreased. These results suggest that CINC play an important role in the onset and progression of CP and that IS-741 ameliorates chronic pancreatitis by suppressing the actions of chemokines. Moreover, inhibiting the expression of chemokine may be useful for the treatment of CP.