

令和 5 年 5 月 24 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K08468

研究課題名(和文)自己免疫性膵炎の病態形成における腸内細菌の役割

研究課題名(英文)Role of intestinal bacteria in the pathogenesis of autoimmune pancreatitis

研究代表者

井上 潤 (Inoue, Jun)

神戸大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50631561

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：自己免疫性膵炎(AIP)は血清IgG4高値を特徴とする、自己免疫的機序により起こる原因不明の膵炎である。本研究の目的は、AIPにおける腸内細菌に対する腸管免疫の状態を解析し、AIPの病態との関連を明らかとすることである。

本研究では、AIP患者の腸管において分泌されている免疫グロブリン量の各アイソタイプを解析し、AIP患者においてIgG4の腸管分泌が亢進していることを明らかとした。また腸管に異常分泌されたIgG4と結合する菌をMACSおよびFACAにより分離し次世代シーケンサーにより解析した。本研究でAIPの腸内細菌に対する腸管免疫の変化が明らかとなり、AIP病態の基礎的知見となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血清IgG4高値を特徴とした自己免疫的機序により起こる膵炎である自己免疫性膵炎(AIP)は、原因が不明であるため現時点で特異的な治療が存在しない。長期のステロイド治療による合併症や時に診断が困難な事などが問題となっており、メカニズム解明が重要である。本研究によりAIPにおける腸内細菌に対する腸管免疫の状態の変化が明らかとなり、AIPの病態解明につながる基礎的知見の一端となると考えられ社会的意義は大きいと考える。

研究成果の概要(英文)：Autoimmune pancreatitis (AIP) is an autoimmune-mediated pathology of unknown etiology characterized by elevated serum IgG4 levels. The purpose of this study is to analyze the state of intestinal immunity against intestinal bacteria in AIP and clarify its relationship with the pathology of AIP.

In this study, we analyzed the amount of each isotype of immunoglobulin secreted in the intestinal tract of AIP patients and clarified that the intestinal secretion of IgG4 is enhanced in AIP patients. Microbiome that bind to IgG4 abnormally secreted in the intestinal tract were isolated by MACS and FACA and analyzed by next-generation sequencing. In this study, changes in the state of intestinal immunity against microbiota in AIP were clarified, providing basic knowledge of the pathogenesis of AIP.

研究分野：消化器内科学

キーワード：自己免疫性膵炎 腸内細菌 腸管免疫

1. 研究開始当初の背景

自己免疫性膵炎 (AIP) の社会的問題点と背景

自己免疫性膵炎(AIP)は血清 IgG4 高値を特徴とする、自己免疫的機序により起こる原因不明の膵炎である。AIP はステロイド治療が奏功するが、再燃率は 30-40%と高い。そのため長期間のステロイド投与期間が必要となり糖尿病や悪性疾患といった合併症の出現が危惧される。AIP の正確な診断と治療開発のためには、メカニズム解明が重要であるが、これまで AIP の発病のメカニズムはいまだ明らかではない。

AIP のメカニズム

これまでに、AIP 患者 IgG をマウスに投与することでマウス膵臓細胞外マトリックスに障害を引き起こすことを申請者の共同研究グループが見出し (Gut 2016;65:1322-1332.) さらに、AIP 患者において細胞外マトリックスタンパクの一つであるラミニン 511 に対する自己抗体を見出している (Sci Transl Med. 2018 Aug 8;10(453).)。またその他にも様々な自己抗体がこれまで報告され、これらのことから一部の AIP は自己抗体を介した病態であることが考えられた。しかし、自己抗体が形成されるメカニズムは未だ解明されていない。近年、E.coli を用いた AIP モデルマウスから E.coli の Flic が AIP 様の膵炎発症に関与していることを報告され (Pancreatology 14(2014)100-106)、さらに、AIP と慢性膵炎患者間での腸内細菌叢の構成に違いがあることが報告されている (Tohoku J Exp Med.2018 Feb;244(2):113-117)。これらの背景から、AIP の病態に腸内細菌が関与している可能性が示唆される。しかしながら、腸内細菌が存在する腸管は人体最大の免疫器官であるにもかかわらず、免疫の異常をきたしている AIP において腸内細菌に対する腸管の免疫について研究はほとんどなされていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、自己免疫性膵炎 (AIP) において、腸内細菌に対する腸管免疫の状態を解析し、腸内細菌および腸管免疫が AIP の病態にどのように関与しているかを明らかとすることである。

3. 研究の方法

(a) AIP 患者の腸管内免疫グロブリンサブタイプ濃度の測定

AIP 患者において腸管内 IgA、IgG(class1~4)の各目根拠グロブリン濃度を、糞便サンプルを用いて ELISA 法にて解析し、AIP 患者の腸管免疫を免疫グロブリンの観点で健常者と比較検討した。

(b) AIP 患者の腸管内に分泌する免疫グロブリンと結合する腸内細菌の分離

AIP 患者で腸管内に分泌している免疫グロブリンと結合する腸内細菌を MACS および FACS でソーティングし結合する腸内細菌を分離し、菌量の相対量を 16SrRNA 領域を対象としたリアルタイム PCR で確認した。

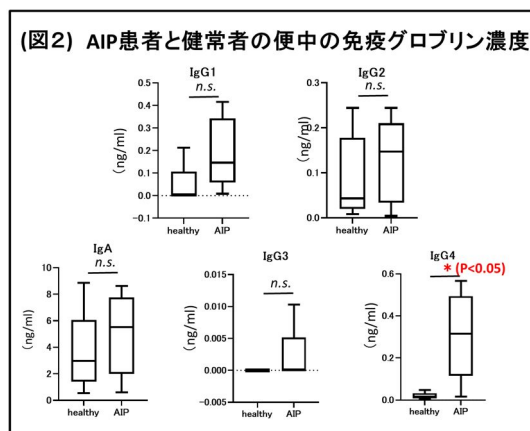
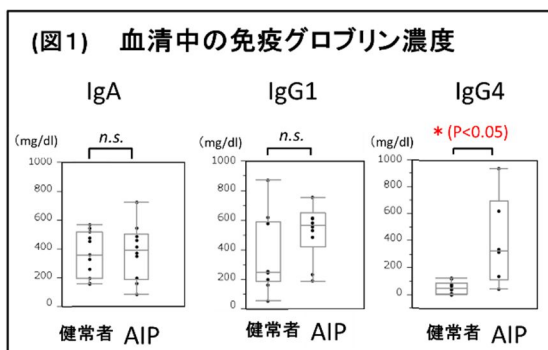
(c) AIP 患者の腸管内に分泌する免疫グロブリンと結合する腸内細菌の同定

次世代シーケンサーを用いて上記で分離した腸内細菌の菌叢解析を行い、腸管免疫に関わっている可能性のある腸内細菌の同定を行った。

4. 研究成果

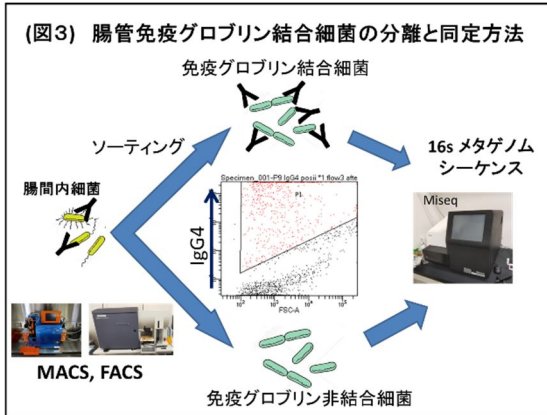
(a) AIP 患者の腸管内免疫グロブリンサブタイプ濃度の測定

AIP 患者の腸管免疫を解析する目的で免疫グロブリン濃度を解析した。健常者と AIP 患者の血清免疫グロブリンの測定を行い、AIP 患者で有意に IgG4 の上昇を認めた (図 1)。これらの患者の、便中の免疫グロブリン濃度を ELISA 法にて解析した。IgA、IgG1、IgG2、IgG3 は健常者と AIP 患者で有意差は認めなかったものの、IgG4 濃度は AIP 患者において有意に上昇していた (図 2)。これらのことから AIP 患者の腸管内の免疫グロブリンは血清と同様に IgG4 のみ有意に上昇しており、全身性の免疫と同様に腸管免疫の異常が示唆された。

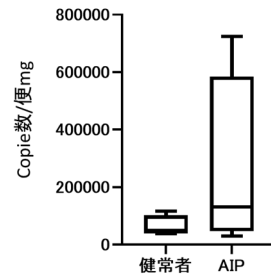


(b) AIP患者の腸管内に分泌する免疫グロブリンと結合する腸内細菌の分離

便検体が十分量あるAIP患者4名と健常者4名で、腸管内に分泌している免疫グロブリンと結合する腸内細菌をMACSおよびFACSでソーティングし結合する腸内細菌を分離し(図3の左)、菌量の相対量を16SrRNA領域を対象としたリアルタイムPCRで解析した。有意差はないもののAIP患者でIgG4と結合する菌量が多い傾向にあり(図4)、腸管に分泌されたIgG4はIgAと同様に菌との結合能を有していることが示唆された。これらのことから、AIP患者において腸内細菌に対する特有の腸管免疫が存在する可能性が示唆された。

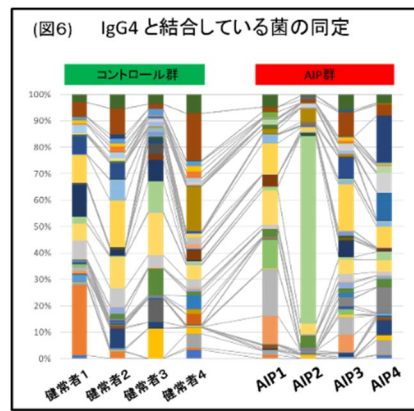
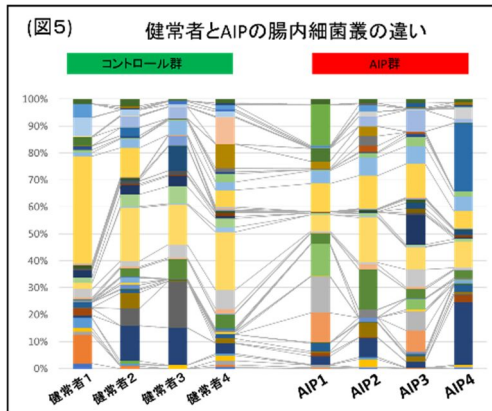


(図4) MACSでIgG4 sortingした後のIgG4陽性の菌の相対量の比較(qPCR)



(c) AIP患者の腸管内に分泌する免疫グロブリンと結合する腸内細菌の同定

次に、上記で分離した腸内細菌からDNAを抽出し次世代シーケンサーを用い、菌叢構成を解析した(図3右)。便中の菌叢構成(図5)と比較すると、IgG4と結合する腸内細菌はもとの菌叢構成とは異なっていた(図6)。これらのことからIgG4は特定の腸内細菌と特異的・選択的に結合していることが示唆された。



また、AIP患者間でもIgG4と結合する腸内細菌は異なることが示唆されるが、その中でも、健常者と比べよりAIPのIgG4と結合しやすい腸内細菌を解析した。IgG4と結合していた菌量とIgG4と結合していなかった菌量の比をICIスコアとして各菌で算出した(図7)。AIPのIgG4と結合している菌のうち割合が多い菌(図7のAIP群IgG4+割合(%))の列を参照)の中で健常者のIgG4と結合している菌の割合が低い菌(IgG4+菌の比率:AIP/controlの列を参照)かつ、ICIが高い菌(ICI scoreの列を参照)を、AIPのIgG4と結合しやすい菌として、4菌種抽出した。

(図7) IgG4に結合しやすい菌種の同定

	AIP群 IgG4+ 割合(%)	Control群 IgG4+ 割合(%)	IgG4+菌の比率: AIP/control	ICI score
Firmicutes__Lachnospiraceae__Blautia__	18.69	3.9	4.79	1.8
Firmicutes__Luminoceae__	9.68	7.44	1.3	0.41
Firmicutes__f__Lachnospiraceae__s__	6.61	9.94	0.66	-1.12
Bacteroidetes__g__Prevotellaceae__torques	6.09	0.34	17.94	-1.23
Proteobacteria__Fasteuriales__Haemophilus__parainfluenzae	4.42	0.47	9.43	1.03
Bacteroidetes__Prevotellaceae__copri	4.33	0.26	16.27	-1.36
Proteobacteria__f__Pseudomonadaceae__Pseudomonas__	4.15	8.17	0.51	-0.31
Lactobacillales__Streptococcaceae__Streptococcus	3.42	0.45	7.62	1.02
Bacteroidetes__f__Paraproteobacteria__Phreatobacterales	3.33	0.3	11.1	-1.33
Firmicutes__Clostridia__Clostridiales__g__s__	3.02	3.45	0.87	0.01
Firmicutes__g__Veillonella__disper	2.68	0.42	6.37	0.45
Firmicutes__f__Veillonellaceae__Magamonas	2.58	0.69	3.74	-0.95
Firmicutes__f__Luminoceae__Luminoceae__	2.24	3.49	0.64	1.01
Firmicutes__f__Veillonellaceae__Dialister	1.97	4.4	0.45	0.5
Bacteroidetes__Bacteroidales__Bacteroides	1.92	2.52	0.76	0.02
Actinobacteria__Bifidobacterium__bifidobacterium	1.82	1.56	1.16	0.03
Firmicutes__f__Lachnospiraceae__Coprococcus	1.79	5.74	0.31	1.21
Firmicutes__g__Faecalibacterium__prausnitzii	1.75	2.22	0.79	-0.06
Firmicutes__Clostridia__Clostridiales__Lachnospiraceae__Other	1.47	5.42	0.27	-0.15
Firmicutes__Clostridia__Clostridiales__Lachnospiraceae__Dorea	1.22	1.54	0.79	0.92

Abundance 0% 40%

ICI = $\log \left(\frac{\text{IgG4+ abundance}}{\text{IgG4- abundance}} \right)$

4菌種は、それぞれ、*Blautia*属の菌、*Haemophilus parainfluenzae*、*Streptococcus*属の菌、および*Veillonella disper*であった。これらの菌がどのようにAIPの免疫と関わっているかを明らかにすることは、AIPの病態解明につながる可能性があると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Asaji Naoki, Inoue Jun, Hayashi Hiroki, Tokunaga Eri, Shimamoto Yusaku, Kinoshita Masato, Tanaka Takeshi, Sakai Arata, Yano Yoshihiko, Ueda Yoshihide, Kodama Yuzo	4. 巻 6
2. 論文標題 Constitution of mucosa associated microbiota in the lower digestive tract does not change in early stage of non alcoholic fatty liver disease with fecal dysbiosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 JGH Open	6. 最初と最後の頁 677 ~ 684
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jgh3.12803	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hoshi Namiko, Inoue Jun, Sasaki Daisuke, Sasaki Kengo	4. 巻 105
2. 論文標題 The Kobe University Human Intestinal Microbiota Model for gut intervention studies	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Applied Microbiology and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 2625 ~ 2632
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00253-021-11217-x	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	酒井 新 (Sakai Arata) (50792636)	神戸大学・医学部附属病院・特定助教 (14501)	
研究分担者	見玉 裕三 (Kodama Yuzo) (80378687)	神戸大学・医学研究科・教授 (14501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------