

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293172

研究課題名(和文) 自然免疫システムの制御を用いた膵炎の新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel therapy for pancreatitis through activation of innate immunity

研究代表者

渡邊 智裕 (WATANABE, TOMOHIRO)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40444468

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円

研究成果の概要(和文)：腸内細菌の全身臓器への移行は膵炎患者において、しばしば観察されるが、腸内細菌に対する免疫反応が膵炎の発症に果たす役割は不明である。本研究においては、自然免疫反応受容体であるNOD1の活性化が膵炎の発症に果たす役割について、検討した。NOD1 リガンドであるFK565とcholecystokinin (CCK)アナログであるCeruletinの投与により、線維化と炎症細胞浸潤を伴う慢性膵炎の誘導が可能であった。NOD1はCCK経路と協調して、腺房細胞からのIL-33とIFN-betaの産生を誘導した。腺房細胞によるこれらの自然免疫反応はTh1とTh2反応の双方を誘導し、膵炎を惹起すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Although bacterial translocation is sometimes seen in patients with severe pancreatitis, it remains largely unknown how innate immune responses against intestinal microflora regulate the development of pancreatitis. In our previous study, we identified nucleotide-binding oligomerization domain 1 (NOD1) as a pathogenic innate immune receptor for experimental pancreatitis. In this study, we developed a new model of chronic pancreatitis induced by repeated administration of NOD1 ligand and ceruletin, a cholecystokinin receptor (CCKR) agonist. The development of chronic pancreatitis induced by synergistic activation of CCKR and NOD1 requires IL-33 and IFN-beta production by acinar cells. IL-33 produced by acinar cells induces pro-fibrogenic factors such as IL-13 by Th2 cells whereas IFN-beta induces Th1 responses. Therefore, synergistic activation of NOD1 and CCKR results in IL-33-dependent pancreatitis characterized by Th1 and Th2 responses.

研究分野：消化器内化学

キーワード：膵炎 自然免疫反応

1. 研究開始当初の背景

- (1) 膵炎患者の約 20%が重症化し、重症膵炎の予後が悪いことが知られているが、病態生理に立脚した膵炎の治療法は確立されていない。
- (2) 膵炎患者においては、腸内細菌の全身臓器への移行が誘導されているが、腸内細菌に対する免疫反応が膵炎の発症に及ぼす効果については、十分に解明されていない。
- (3) 膵炎の発症には、膵臓の消化分解酵素である Trypsinogen の活性化と膵臓組織の自己消化が重要な役割を果たしていると考えられてきたが、Trypsinogen 欠損マウスにおいても、実験膵炎の発症が認められることが報告され、膵炎の発症機序を膵臓酵素の活性化のみで説明することが不可能であることが判明している。
- (4) 膵炎の発症に関与する病的な自然免疫反応さらには、自然免疫反応により誘導される獲得免疫反応の詳細は判明していない。蛋白分解酵素阻害薬による膵臓の消化分解酵素の活性化阻害は膵炎の治療に十分な成果を挙げていない。免疫反応の制御を応用した膵炎の新規治療法が開発されれば、有効な治療法が存在しない多くの膵炎患者にとって、非常に大きな福音となることが予測される。

2. 研究の目的

- (1) 研究代表者らは、Cholecystokinin アナログである Cerulein 投与により、誘導される急性膵炎モデルにおいて、腸内細菌に対する免疫反応が病的に働いていることを明らかにしている。その際に、腸内細菌を認識することにより活性化される自然免疫反応受容体である Nucleotide-binding oligomerization domain 1 (NOD1)が重要な役割を果たしていることを見出している (Immunity 2012;37:326-338)。また、NOD1 ligand である FK156 と少量の Cerulein 投与により誘導される新規膵炎モデルの樹立に成功した。しかしながら、NOD1 の活性化が慢性膵炎の発症に果たす役割は不明である。そこで、本研究では NOD1 の活性化を用いた慢性膵炎モデルを樹立することを目指した。
- (2) 上記の膵炎モデルを用いて、慢性膵炎の発症に関わる細胞とサイトカインのネットワークを明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

- (1) NOD1 ligand である FK565 と少量の Cerulein 投与を週 2 回、合計 14 回投与することにより、NOD1 の活性化を用いた新規慢性膵炎モデルを誘導した。
- (2) 上記の膵炎モデルにおいて、どのような液性因子が膵臓局所に誘導されているのか？検討した。
- (3) I 型 IFN 受容体 (IFNAR) 欠損マウス及び NOD1 欠損マウスを用いた骨髄キメラマウスを作成し、慢性膵炎の誘導に必要な細胞とその効果分子の同定を行った。
- (4) IL-33 受容体 (ST2) 及び IL-13 に対する中和抗体を投与し、IL-33-IL-13 経路が膵炎の発症に果たす役割について、検討した。

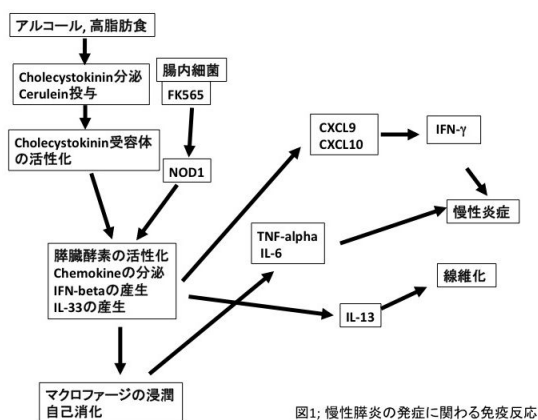
4. 研究成果

- (1) FK565 投与による NOD1 の活性化と Cerulein 投与による Cholecystokinin 受容体の活性化により、炎症細胞浸潤と線維化を伴う慢性膵炎を誘導することができた。
- (2) 上記モデルでは、膵臓組織において、自然免疫反応に関連する液性因子 (MCP-1, IL-33, CXCL9, CXCL10, TNF-alpha, IL-6) 及び獲得免疫反応に関連する液性因子 (IFN-gamma, IL-13) の発現上昇を認めた。
- (3) 骨髄キメラマウスを用いた検討により、膵炎の発症には非血球系細胞に発現する NOD1 の存在が必須であること、つまり、膵臓腺房細胞に発現する NOD1 が必要であることが明らかになった。その一方で、IFNAR の発現は血球系細胞あるいは非血球系細胞のいずれかに存在すれば膵炎は誘導可能であった。
- (4) ST2 抗体の投与による IL-33 経路の阻害により、炎症細胞浸潤と線維化が抑制され、腺房細胞より分泌される IL-33 が膵炎の発症に病的な役割をしていることが明らかになった。
- (5) IL-13 中和抗体の投与により、膵臓の線維化は抑制されたが、炎症細胞浸潤は抑制されなかった。
- (6) T, B 細胞を欠く RAG1 欠損マウスにおいて、膵炎は誘導されなかった。
- (7) 以上の結果から、慢性膵炎の発症には、以下の免疫経路が関与することが明らかになった (図 1 参照)。

NOD1 経路と Cholecystokinin 受容体が相乗的に働き、膵臓腺房細胞から、IFN-beta、IL-33、MCP-1 の産生を誘導する。

これらの液性因子の産生に反応して、TNF-alpha を産生する炎症性マクロファージが膵臓に浸潤する。

腺房細胞から分泌される IL-33 は炎症細胞浸潤と膵臓の線維化を引き起こすが、線維化には Th2 サイトカインである IL-13 が重要な役割をしている。



## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 3 件)

- (1) Watanabe T\*, Sadakane Y, Yagama N, Sakurai T, Ezoe H, Kudo M, Chiba T, Strober W. \*Corresponding author. Nucleotide-binding oligomerization domain 1 acts in concert with the cholecystokinin receptor agonist, cerulein, to induce IL-33-dependent chronic pancreatitis. *Mucosal Immunol.* 査読有、in press, DOI: 10.1038/mi.2015.144.
- (2) Arai Y, Yamashita K, Kuriyama K, Shiokawa M, Kodama Y, Sakurai T, Mizugishi K, Uchida K, Kadowaki N, Takaori-Kondo A, Kudo M, Okazaki K,

**Strober W**, Chiba T, Watanabe T\*.

\*Corresponding author. Plasmacytoid Dendritic Cell Activation and IFN- $\alpha$  Production Are Prominent Features of Murine Autoimmune Pancreatitis and Human IgG4-Related Autoimmune Pancreatitis. *J Immunol.* 査読有、Vol. 195, No. 7, 2015, pp3033-44. DOI: **10.4049/jimmunol.1500971.**

- (3) Watanabe T\*, Asano N, Meng G, Yamashita K, Arai Y, Sakurai T, Kudo M, Fuss IJ, Kitani A, Shimosegawa T, Chiba T, Strober W. \*Corresponding author. NOD2 downregulates colonic inflammation by IRF4-mediated inhibition of K63-linked polyubiquitination of RICK and TRAF6. *Mucosal Immunol.* 査読有、Vol 7, No. 6, pp1312-25 DOI: 10.1038/mi.2014.19.

〔学会発表〕(計 4 件)

- (1) Watanabe T. Immune mechanisms of pancreatitis (招待講演). 1st Kyoto University UC San Diego Joint Symposium Kyoto, Kyoto, Japan, 2015 Mar.
- (2) 渡邊智裕、千葉勉。腸内細菌により活性化される NOD1 が膵炎の発症に果たす役割。JDDW, 東京、2015, 10月。
- (3) Watanabe T. Activation of Toll-like receptors and NOD-like receptors in monocytes and basophils is involved in the immunopathogenesis of IgG4-related disease. (招待講演). 2nd International Symposium on IgG4-RD & Associated Conditions Honolulu, USA, 2014, Feb.

- (4) Watanabe T. Sensing of commensal organisms by the intracellular sensor NOD1 mediates experimental pancreatitis. (招待講演). JSGE-APAGE Joint Conference Asian-Pacific Topic Conference, Kobe, Japan, 2014 Oct.

〔図書〕(計 2 件)

- (1) Watanabe T., Chiba T, Strober W. 分担執筆 ; Chapter 88 Immune mechanisms of pancreatitis. Mucosal Immunology 4th Edition. Academic Press, 2015, 1719-1736.
- (2) 渡邊智裕、千葉勉。分担執筆; IgG4 関連疾患と自然免疫。IgG4 関連疾患 実践的臨床から病因へ。前田書店。2015, 171-6.

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

取得状況(計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

〔その他〕  
ホームページ等 なし

## 6 . 研究組織

- (1)研究代表者  
渡邊 智裕 (WATANABE TOMOHIRO)  
京都大学医学研究科准教授  
研究者番号 : 40444468
- (2)研究分担者 なし  
( )  
研究者番号 :
- (3)連携研究者 なし  
( )  
研究者番号 :