

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09468

研究課題名(和文)自己免疫性膵炎の免疫病態と線維化における自然免疫の関与に関する研究

研究課題名(英文)Role of innate immunity in the development of autoimmune pancreatitis

研究代表者

岡崎 和一 (OKAZAKI, Kazuichi)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：70145126

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：わが国より発信された新規疾患概念である1型自己免疫性膵炎(AIP)の病態と発症機序の解明を目的として、病態における自然免疫系の関与を検討した。細胞性因子として、活性化好塩基球、2型自然リンパ球(ILC-2)、M2マクロファージが、またエクソソームの網羅的サイトカインプロファイル検索により、自然免疫に関与するサイトカインとしてIL-33の関与が明らかになり、Th2シフトに関与する可能性が明らかにされた。特に、TLR陽性のCD163陽性マクロファージ(M2-M₁)、TLR陽性好塩基球の有意な増加を認めた。smad2,3リンカー一部リン酸化抗体を用いた免疫組織化学法データを解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自己免疫性膵炎はIgG4関連疾患の膵病変であり、現在指定難病となっているが、原因不明で治療法も確立していない。本研究により、自然免疫系異常が疾患の病態や発症に関連することが示唆された。特に、IL-35、好塩基球、miRNA-21などが標的分子や細胞として新規治療ターゲットになる可能性があり、その意義は高いと思われる。

研究成果の概要(英文)：Recently, abnormal innate immunity has been demonstrated in some patients with IgG4-RD. Activation of NOD-2 and toll-like receptor (TLR) ligands on monocytes or basophils from patients with IgG4-related AIP enhances IgG4 responses via B-cell activating factor (BAFF) and IL-13, although the specific pathogens still remain unclear (47,48). We identified abundant infiltration of TLR-7 positive M2-macrophages in the pancreatic tissues from type 1 AIP, and activated basophils via TLR signaling in the peripheral blood were increased and infiltrated into the pancreatic tissue, which suggested that increased activated basophils may be involved in the development of type 1 AIP. We identified increased miRNA-21-5p from circulating extracellular vesicles and IL-35 was significantly increased in type 1 AIP. In animal models, mice activated by ligands of TLR3 or TLR4, and TNP-IgE mutant mice induce immune-mediated cholangitis, pancreatitis, and sialadenitis similar to human IgG4-RD.

研究分野：消化器内科学

キーワード：IgG4関連疾患 自己免疫性膵炎 自然免疫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

1 型 AIP はわが国より発信された疾患概念であり、高 IgG4 血症や IgG4 陽性形質細胞の著しい浸潤と線維化 (storiform fibrosis) が特徴である (Okazaki K, et al. Gut 2002, J Gastroenterol 2009)。しばしば硬化性胆管炎、硬化性唾液腺炎、後腹膜線維症などを合併することより、近年 IgG4 関連疾患の膵病変として注目されている。病態形成や発症機序は不明であるが、遺伝子学的背景に環境因子、自然免疫、獲得免疫などが複雑に関与している可能性が指摘されている (Okazaki K. Pancreas:2015)。申請者らは 疾患関連抗原の探索では膵 cDNA 組込み蛋白発現ベクターと患者血清を用いて本疾患で障害される各臓器に分布する carbonic anhydrase (CA)-II、lactoferrin、pancreas secretory trypsin inhibitor (PSTI) を同定し (Okazaki K, et al; Gastroenterology:2000, Gut:2003, Pancreas:2006) これらを標的抗原とするモデル動物を作成 (Lab Invest:2002) 病変部の Th1/Th2/Th17 免疫バランスにおいて、初期では Th1、病変完成期は Th2 優位 (Okazaki K et al, Gastroenterology:2000, Lab Invest:2002, Pancreas:2005) 発症に関する制御性 T 細胞 (Treg) と B 細胞 (Breg) の役割として、胸腺由来 FoxP3⁺CD4⁺RA⁺CD25^{high}naïve Treg (Miyoahi, Okazaki, et al. Pancreas,2008)および骨髄由来 CD19⁺CD24^{high}CD27⁺Breg の減少とともに接着因子 integrin 活性化に重要な macrophage stimulating 1 (mst1) 遺伝子のメチル化 (Tomiyama, Okazaki, et al. PLoS One. 2013、Fukuhara, Okazaki K, et al. Biochem Biophys Res Commun: 2015) による naïve Treg の機能低下を示唆した。一方、本症に特徴的な IgG4 産生亢進機序として、末梢で誘導される FoxP3⁺CD4⁺RA⁺CD25^{high}Treg (inducible memory Treg) や CD19⁺CD24^{high}CD38^{high}Breg (Sumimoto K, Okazaki K, et al. Pancreas:2013)の増加と IL-10 を介する機序 (J Gastroenterol 2010, Clin Immunol Review, 2011) に加え、TLR や NOD を介する自然免疫系の活性化異常と B 細胞活性化因子 (BAFF) (Arthritis Rheum. 2012, J Gastroenterol. 2012, Int J Rheumatol:2013, J Immunol: 2015) の関与を示唆した。すなわち IgG4 産生には IL-10 が病態抑制因子として、自然免疫系を介し BAFF が病態促進因子として関わることを明らかにした。さらに発症に関与する自然免疫系細胞として好中球細胞外トラップ (neutrophil extracellular trap :NETs) (J Immunol: 2015) とともに慢性アレルギー炎症 (IgE-CAI) (Nat. Med. 19: 1005-1013, 2013.) に関連する活性化好塩基球 (J Gastroenterol. 2012) や M2 マクロファージの関与 (Pancreas:2015) から、本症の病態における自然免疫系の関与を明らかにした。さらに、近年、免疫調節における 3 グループの自然リンパ球 (innate lymphoid cells:ILC1,2,3) や MAIT 細胞 (mucosa-associated invariant T cell) が注目され、特にグループ 2 の自然リンパ球 (ILC2s) は IL-25、IL-33 に反応し Th2 サイトカイン (IL-5、IL-9、IL-13) を産生し、IgE-CAI と目されるアトピー性皮膚炎で好酸球遊走などの発症にかかわる可能性と抑制的機能をもつ MAIT の関与が指摘されている。

2. 研究の目的

わが国より発信された新規疾患概念である 1 型自己免疫性膵炎(AIP)の病態と発症機序の解明を目的として、本症が慢性アレルギー炎症(IgE-CAI)である可能性とともに免疫学的病態と線維化形成機序における自然免疫系の関与について検討する。すなわち、患者および動物モデルの末梢血と病変部に浸潤する自然免疫系細胞について、主に活性化好塩基球、自然リンパ球 (innate lymphoid cells)、Mucosal-associated invariant T cell (MAIT 細胞)、樹状細胞、M2 単球(Mo)/マクロファージ(Mφ)をサイトカインプロファイルとともに分析し、線維化に関与する線維芽細胞とこれら細胞の smad2,3 リンカー部リン酸化を介する TGFβ シグナル伝達系を解析する。

3. 研究の方法

(1) 臨床検討

自己免疫性膵炎、慢性膵炎の血清および膵、胆管、肝組織浸潤 CD68陽性マクロファージ (M1-Mφ)、CD163陽性マクロファージ(M2-Mφ)、ILT-2/ILT-3+ Mo/Mφ/DC、好塩基球、MAIT細胞、自然リンパ球の解析、膵・肝生検組織を用いてM1-Mφ、M2-Mφ、ILT-2/ILT-3+ Mo/Mφ/DCを抗CD68、抗CD163、抗ILT-2/ILT-3抗体を用いて免疫組織化学的に計測する。各TLR (TLR-3、TLR-4、TLR-9) の発現、CD80、CD86 を免疫組織化学的に検討する。Smad2,3リンカー部リン酸化抗体、C末端リン酸化抗体を用いた免疫組織化学法により浸潤細胞、線維芽細胞を解析する。

(2) 基礎的検討

モデル動物の膵および胆管、肝組織を用いて臨床的方法に準じて検討する。

各マウスで採取した膵・肝生検組織を用い M1-Mφ、M2-Mφ、PIR-B+ Mo/Mφ/DC、好塩基球、MAIT細胞、自然リンパ球上の各 TLRs を抗体を用いて免疫組織化学的に検討する。Smad2,3 リンカー部リン酸化抗体、C末端リン酸化抗体を用いた免疫組織化学法により浸潤細胞、線維芽細胞を解析する。

4. 研究成果

概要：わが国より発信された新規疾患概念である 1 型自己免疫性膵炎(AIP)の病態と発症機序の解明を目的として、本症が慢性アレルギー炎症(IgE-CAI)である可能性とともに免疫学的病態と線維化形成機序における自然免疫系の関与について検討した。臨床的検討では、病態における自然免疫系の関与として、細胞性因子として、患者末梢血を用いたフローサイトメトリーにより、活性化好塩基球、2型自然リンパ球 (ILC-2)、M2 マクロファージが、また患者血漿中のエクソソームを用いた網羅的サイトカインプロファイル検索により自然免疫に関与するサイトカインとして IL-33 の関与が明らかになった。特に、TLR 陽性の CD163 陽性マクロファージ(M2-Mφ)、TLR 陽性好塩基球の有意な増加を認めた。エクソソームの網羅的miRNA 探索によりmiRNA21 の高発現が確認され Th2 シフトに関与する可能性が明らかにされた。smad2,3 リンカー部リン酸化抗体を用いた免疫組織化学法データを解析した。動物モデルでの検討では、アレルギーモデルマウス (TNP-IgE マウス) を用いたマウスモデルを作成中し、病理組織学的にヒト類似病変を認めた。抹消血液のフローサイトメトリーにより M1/M2 細胞、好塩基球、MAIT 細胞、自然リンパ球の解析を行うとともに、膵、肝の組織を用いて臨床的方法に準じて免疫組織化学的に検討した。さらに Smad2,3 リンカー部リン酸化抗体、C末端リン酸化抗体を用いた免疫組織化学法により浸潤細胞、線維芽細胞を解析し、モデルマウスにおける線維化の機序を検討した。

(1) 臨床検討：

自己免疫性膵炎では、慢性膵炎患者に比して、TLR陽性のCD163陽性マクロファージ(M2-Mφ)、TLR陽性好塩基球の有意な増加を認めた。

膵組織検討では、TLR陽性細胞の浸潤単核球に対する比率は、TLR7が1型AIP(0.053 ± 0.012)で最も多かった。1型AIP においてTLR7を表出している細胞は、CD68陽性(0.734 ± 0.021)もしくはCD163陽性細胞(0.789 ± 0.031)のM2マクロファージであった。喘息では局所においてM2マクロファージへの分化を誘導しているとされる好塩基球については、13例中10例において1型AIPの切除膵に認めACPでは認められなかった。浸潤している好塩基球は、10例中2例でTLR2を発現し、2例でTLR2と4を発現し、6例でTLR4が発現していた。1型AIP患者末梢血の好塩基球では、TLR4

刺激により1型AIP群(9.875%±7.262)が健常人群(5.05%±3.79)に比べ有意な活性化率の上昇を認めた($p < 0.05$)。ILCについては、1型AIPではILC2とILC3(0.140±0.083%, 0.055±0.043%)が健常人(0.054±0.039%, 0.018±0.017%; $p < 0.05$)に比し優位に増加していた。MAIT細胞、自然リンパ球の解析、各患者で採取した膵・肝生検組織を用いてM1-M ϕ 、M2-M ϕ 、ILT-2/ILT-3+Mo/M ϕ /DCを抗CD68、抗CD163、抗ILT-2/ILT-3抗体を用いて免疫組織化学的に計測する。各TLR (TLR-3、TLR-4、TLR-9)の発現、CD80、CD86を免疫組織化学的に検討する。Smad2,3リンカー部リン酸化抗体、C末端リン酸化抗体を用いた免疫組織化学法により浸潤細胞、線維芽細胞を解析し、AIPにおける花筈状線維化と慢性膵炎の線維化の相違を明らかにする。

(2) 基礎的検討

モデル動物:アレルギーモデルマウス(TNP-IgEマウス)を用いたマウスモデルを作成中し、膵および胆管、肝組織における、M1/M2細胞、好塩基球、MAIT細胞、自然リンパ球の解析を膵、肝の組織を用いて臨床的方法に準じて検討した。各マウスで採取した膵・肝生検組織を用いてM1-M ϕ 、M2-M ϕ 、PIR-B+Mo/M ϕ /DC、好塩基球、MAIT細胞、自然リンパ球上の各TLRsを抗体を用いて免疫組織化学的に検討した。Smad2,3リンカー部リン酸化抗体、C末端リン酸化抗体を用いた免疫組織化学法により浸潤細胞、線維芽細胞を解析し、モデルマウスにおける線維化の機序を検討した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kamisawa T, Zen Y, Nakazawa T, Okazaki K.	4. 巻 3
2. 論文標題 Advances in IgG4-related pancreatobiliary diseases.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The lancet. Gastroenterology & hepatology	6. 最初と最後の頁 575-585
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1016/S2468-1253(18)30121-3.	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 Ito T, Kawa S, Matsumoto A, Kubota K, Kamisawa T, Okazaki K, Hirano K, Hirooka Y, Uchida K, Masuda A, Ohara H, Shimizu K, Arakura N, Masamune A, Kanno A, Sakagami J, Itoi T, Ito T, Ueki T, Nishino T, Inui K, Mizuno N, Yoshida H, Sugiyama M, Iwasaki E, Irisawa A, Shimosegawa T, Chiba T.	4. 巻 48
2. 論文標題 Risk Factors for Pancreatic Stone Formation in Type 1 Autoimmune Pancreatitis: A Long-term Japanese Multicenter Analysis of 624 Patients	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pancreas	6. 最初と最後の頁 49-54
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1097/MPA.0000000000001210.	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 Notohara K, Kamisawa T, Uchida K, Zen Y, Kawano M, Kasashima S, Sato Y, Shiokawa M, Uehara T, Yoshifuji H, Hayashi H, Inoue K, Iwasaki K, Kawano H, Matsubayashi H, Moritani Y, Murakawa K, Oka Y, Tateno M, Okazaki K, Chiba T.	4. 巻 53
2. 論文標題 Gastrointestinal manifestation of immunoglobulin G4-related disease: clarification through a multicenter survey.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of gastroenterology	6. 最初と最後の頁 845-853
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1007/s00535-017-1420-4.	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 Okazaki K, Uchida K.	4. 巻 94
2. 論文標題 Current perspectives on autoimmune pancreatitis and IgG4-related disease.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.	6. 最初と最後の頁 412-427.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.2183/pjab.94.027.	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 Uchida K, Okazaki K	4. 巻 401
2. 論文標題 Roles of Regulatory T and B Cells in IgG4-Related Disease.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Curr Top Microbiol Immunol.	6. 最初と最後の頁 93-114
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/82_2016_41.	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 -

1. 著者名 Okazaki K, Umehara H.	4. 巻 401
2. 論文標題 Current Concept of IgG4-Related Disease.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Curr Top Microbiol Immunol.	6. 最初と最後の頁 1-17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/82_2016_47.	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 -

1. 著者名 Kato K, Ikeura T, Yanagawa M, Tomiyama T, Fukui T, Uchida K, Takaoka M, Nishio A, Uemura Y, Satoi S, Yamada H, Okazaki K.	4. 巻 17
2. 論文標題 Morphological and immunohistochemical comparison of intrapancreatic nerves between chronic pancreatitis and type 1 autoimmune pancreatitis.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Pancreatology	6. 最初と最後の頁 403-410
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pan.2017.02.009.	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 Tanaka T, Zhang W, Sun Y, Shuai Z, Chida AS, Kenny TP, Yang GX, Sanz I, Ansari A, Bowlus CL, Ippolito GC, Coppel RL, Okazaki K, He XS, Leung PSC, Gershwin ME.	4. 巻 66
2. 論文標題 Autoreactive monoclonal antibodies from patients with primary biliary cholangitis recognize environmental xenobiotics.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Hepatology	6. 最初と最後の頁 885-895
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/hep.29245.	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 該当する

1. 著者名 Yanagawa M, Uchida K, Ando Y, Tomiyama T, Yamaguchi T, Ikeura T, Fukui T, Nishio A, Uemura Y, Miyara T, Okamoto H, Sato S, Okazaki K.	4. 巻 53
2. 論文標題 Basophils activated via TLR signaling may contribute to pathophysiology of type 1 autoimmune pancreatitis.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Gastroenterol	6. 最初と最後の頁 449-460
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 1007/s00535-017-1390-6.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mori S, Tahashi Y, Uchida K, Ikeura T, Danbara N, Wakamatsu T, Kusuda T, Takahashi Y, Yanagawa M, Matsushita M, Ohe C, Michiura T, Inoue K, Kon M, Okazaki K.	4. 巻 56
2. 論文標題 Sclerosing Esophagitis with IgG4-positive Plasma Cell Infiltration.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Intern Med.	6. 最初と最後の頁 3023-3026
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.8095-16	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Notohara K, Kamisawa T, Uchida K, Zen Y, Kawano M, Kasashima S, Sato Y, Shiokawa M, Uehara T, Yoshifuji H, Hayashi H, Inoue K, Iwasaki K, Kawano H, Matsubayashi H, Moritani Y, Murakawa K, Oka Y, Tateno M, Okazaki K, Chiba	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Gastrointestinal manifestation of immunoglobulin G4-related disease: clarification through a multicenter survey.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Gastroenterol.	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 1007/s00535-017-1420-4.	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 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 7件)

1. 発表者名 内田一茂、柳川雅人、岡崎和一
2. 発表標題 IgG4関連消化器疾患における現状と課題 1型自己免疫性膵炎における自然免疫の関与
3. 学会等名 第104回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kazuichi Okazaki
2. 発表標題 Type 2 AIP : Is it underdiagnosed or really rare in Japan ?
3. 学会等名 Joint Meeting of the Asian-Oceanic Pancreatic Association, the Korean Pancreatobiliary Association, and Korean Pancreas Surgery Club 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kazushige Uchida, Masato Yanagawa, Tsukasa Ikeura, Toshihiro Tanaka, Takashi Tomiyama, Takashi Yamaguchi, Yugo Ando, Toshiro Fukui, Nishio Akiyoshi, Sohei Satoi, Kazuichi Okazaki
2. 発表標題 The role of basophils in the pathogenesis of type 1 autoimmune pancreatitis.
3. 学会等名 Joint Meeting of the Asian-Oceanic Pancreatic Association, the Korean Pancreatobiliary Association, and Korean Pancreas Surgery Club 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kazuichi Okazaki
2. 発表標題 IgG4 Sclerosing Cholangitis-Japanese experience
3. 学会等名 Taiwan Digestive Disease Weeek (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yanagawa M. Uchida K, Okazaki K
2. 発表標題 Involment of Basophils with Type1 Autoimmune Pancreatitis
3. 学会等名 49th Annual Meeting of the American Pancreatic Association (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 49th Annual Meeting of the American Pancreatic Association
2. 発表標題 Updates on IgG4 related diseases
3. 学会等名 APDW2018 (Asian Pacific Digestive Week) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岡崎和一
2. 発表標題 私と自己免疫性膵炎研究
3. 学会等名 第48回日本膵臓学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 柳川雅人, 内田一茂, 岡崎和一
2. 発表標題 1型自己免疫性膵炎における活性化好塩基球の検討
3. 学会等名 第48回日本膵臓学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kazushige Uchida, Kazuichi Okazaki
2. 発表標題 Immunological Aspects in Type 1 Autoimmune Pancreatitis.
3. 学会等名 International Pancreatic Research Forum 2017 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kazuichi Okazaki
2. 発表標題 Immunologic abnormality in the pathogenesis of autoimmune pancreatitis
3. 学会等名 22nd Yonsei Institute of Gastroerology Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年～2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Kazuichi Okazaki	4. 発行年 2017年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 128
3. 書名 IgG4-Related Disease	

〔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	内田 一茂 (UCHIDA Kazushige) (40411516)	高知大学・医学部・教授 (34417)	
研究分担者	西尾 彰功 (NISHIO Akiyoshi) (50362463)	関西医科大学・医学部・准教授 (34417)	