

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09053

研究課題名(和文) 膵炎発症抑制に關する制御性B細胞の解析と治療応用の検討

研究課題名(英文) Study on the role of regulatory B cells and their therapeutic application to acute and autoimmune pancreatitis

研究代表者

西尾 彰功 (NISHIO, Akiyoshi)

関西医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50362463

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)：制御性B細胞による膵炎の抑制効果について検討した。野生型マウスとB細胞が欠損したIgM欠損マウスにセルレイン/リポポリサッカライドを投与し膵炎の重症度を検討したが、両群に差がみられなかった。制御性B細胞が欠損したCD19欠損マウスでは膵炎が重症化し、野生型マウス由来のインターロイキン10産生B10細胞を膵炎マウスに移入すると膵炎が軽減した。野生型マウスと比較して、CD19欠損マウスではポリI:C投与により自己免疫性膵炎が発症した。以上より、膵炎発症に制御性B細胞が関与しており、制御性B細胞の投与により膵炎発症の抑制が示され膵炎の有効な治療法となりうることを示された。

研究成果の概要(英文)：To clarify the role of regulatory B cells in the development of acute pancreatitis, we studied a murine model of experimental pancreatitis induced by cerulein and lipopolysaccharide. There was no difference in the severity of pancreatitis between wild type and B cell-deficient mice. Pancreatitis deteriorated in CD19-deficient mice that lack regulatory B cells. However, administration of interleukin 10-producing B10 cells ameliorated pancreatitis in CD19-deficient mice. In contrast with wild type mice, CD19-deficient mice developed autoimmune pancreatitis by administration of poly I:C. Taken together, regulatory B cells are supposed to be involved in the suppression of pancreatitis, suggesting the usefulness of them in the treatment of pancreatitis.

研究分野：消化器内科学

キーワード：制御性B細胞 急性膵炎 自己免疫性膵炎 細胞移入

1. 研究開始当初の背景

急性膵炎は、膵局所の炎症で終息する軽症例から重症感染症や全身性の炎症症候群により多臓器不全を合併し致死的となりうる重症例まで、多彩な臨床像を呈する膵臓の急性炎症である。慢性膵炎は、炎症細胞浸潤を伴う膵の線維化と腺房細胞の変性・脱落が非可逆的に進行し、末期には膵内外分泌機能不全に至る病態で、膵癌の危険因子と考えられている。急性膵炎、慢性膵炎ともアルコールが主たる原因である。

膵炎発症には膵組織内での消化酵素の活性化による自己消化が主因とされてきたが、近年宿主の免疫反応の関与も含めた「多中心説」が新たに提唱されている。急性膵炎のモデルとされるセルレイン誘発膵炎では CD4 陽性 T 細胞が膵炎発症に重要であることが報告されており、我々はマウスのアルコール性膵炎を解析した結果、自然免疫の活性化に加えて獲得免疫が膵炎発症に関与していることを明らかにした。また、我が国に多い自己免疫性膵炎型は、病因は不明であるが免疫異常が病態形成に関与していると考えられており、ステロイドが有効であるが治療中断でしばしば再燃をきたす。

免疫担当細胞である B 細胞は液性免疫を介して免疫を促進的に制御することが広く知られているが、近年は抗体産生のみならず抗原提示やサイトカイン産生を介して T 細胞活性化の抑制にも重要な働きを示すことが明らかとなっている。マウスを用いた検討では、B 細胞は免疫応答を促進的のみならず抑制的にも作用することが証明されており、促進的機能を示す B 細胞群に対して制御性 B 細胞の概念が提唱されている。このような免疫抑制作用を示す B 細胞は抗炎症性サイトカインであるインターロイキン 10 (IL-10) 産生が特徴とされており、マウスにおいては CD1^dhi CD5⁺CD19^{hi} の細胞表面マーカーを有することが知られている。近年ヒトの IL-10 産生性 B 細胞の亜集団として CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} 及び CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺ B 細胞が報告されている。我々の検討では、ヒト自己免疫性膵炎において CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺ B 細胞の増加と CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} B 細胞の減少が認められており、病因との関連性が示唆される。

これまで制御性 B 細胞と疾患の関連については SLE や自己免疫性脳脊髄炎のマウスモデルで検討がなされており、制御性 B 細胞の移入により炎症の改善が報告されている。消化器領域においては、T 細胞受容体 鎖欠損マウスによる自然発症の炎症性腸疾患モデルにおいて、B 細胞が腸炎の発症抑制に重要であることが報告されている。B 細胞の抑制効果は IL-10 産生を介すること、gut-associated lymphoid 組織の B 細胞で CD1d 発現が上昇していること、腸間膜リンパ節由来の B 細胞移入で腸炎が抑制されるがその機序として抑制性 T 細胞を増加させることが示された。デキストラン硫酸ナトリウム

(DSS) 誘発性腸炎においても制御性 B 細胞の欠損による腸炎の増悪と脾臓由来の制御性 B 細胞移入による炎症の軽減が報告されている。しかし、DSS 腸炎は化学的刺激で誘導される腸炎であり、制御性 B 細胞は自己免疫反応の抑制に加えて他の原因による炎症の抑制にも関与している可能性がある。潰瘍性大腸炎で抗 CD20 抗体による B 細胞除去療法で症状の増悪がみられた症例が報告されており、制御性 B 細胞の除去による増悪が示唆される。他方、自己免疫性膵炎患者に対して抗 CD20 抗体の投与で改善した症例が報告されており、免疫反応を促進させる B 細胞と制御性 B 細胞の不均衡が疾患の発症や増悪と関連している可能性が推測されるが詳細な検討は行われていない。

近年マウス内臓脂肪組織の間質には多数の CD19⁺CD45R^B 細胞が存在し、脾臓の B 細胞と異なりインターロイキン 10 を恒常的に発現していることが明らかとなった。脂肪組織の B 細胞は脾臓などの B 細胞より IL-10 の発現が高く、CD8 陽性 T 細胞と B 細胞の共培養では T 細胞の活性化を抑制し、細胞移入による抗炎症効果が報告されている。

2. 研究の目的

本研究では膵炎発症の抑制における制御性 B 細胞の働きを検討するとともに、制御性 B 細胞を用いて膵炎のコントロールを目指すことを目的とした。特に、同系マウス由来の制御性 B 細胞の細胞移入の検討に加えて、膵炎を発症したマウスの制御性 B 細胞を用いた検討は自己の免疫担当細胞を用いた膵炎の新規治療について検討した。

3. 研究の方法

(1) 8 週齢の野生型 C57BL/6 マウスにセルレイン/ lipopolysaccharide (LPS) を投与し急性膵炎モデルを作製した。6 週齢 MRL/Mp マウスに poly I:C を 8 週間にわたり週 2 回腹腔内投与し自己免疫性膵炎モデルを作製した。これら膵炎モデルにおける脾臓、膵臓、脾臓及び腹腔内脂肪組織の制御性 B 細胞の動態について対照マウスと比較検討した。

(2) 遺伝子欠損マウス (CD19 欠損-制御性 B 細胞欠損、免疫グロブリン μ 鎖欠損-B 細胞欠損) C57BL/6 マウスを用いて制御性 B 細胞欠損時の膵炎の重症度の変化について対照群と比較検討した。

(3) 急性膵炎モデルと自己免疫性膵炎モデルを用いて、分離培養した制御性 B 細胞の移入により膵炎の改善がみられるか検討した。

4. 研究成果

(1) 野生型マウスと IgM 欠損 C57/B6 マウスにセルレイン/LPS 投与を行い、血清膵酵素レベルと組織学的な膵炎について検討したが、両群間で膵炎の程度に明らかな差は見られなかった。B 細胞欠損マウスでは免疫応答を促進させる B 細胞と抑制性 B 細胞の両者が欠

損しており、膵炎の程度に差がみられない原因と推定された。

(2) LPS が toll-like receptor (TLR)4 のリガンドであることより、TLR2 と TLR9 リガンド投与による膵炎発症について検討した。両者とも膵炎を誘導したが、野生型に比べてインターロイキン 10 (IL-10) 欠損マウスで膵炎が増強し、膵炎発症抑制における IL-10 産生の重要性が示された。膵炎発症マウスの脾臓細胞を同系免疫不全マウスに移入しても膵炎は発症せず、TLR2,4 刺激による膵炎発症は自己免疫的機序でないことが示された。

(3) 制御性 B 細胞が欠損した CD19 欠損マウスにセルレイン/LPS を投与して膵炎の重症度について検討した。CD19 欠損マウスでは野生型マウスと比較して血清アミラーゼが上昇し、組織学的に膵炎の重症化が認められた。野生型マウスから分離した IL-10 産生 B10 細胞を移入した後にセルレイン/LPS を投与すると、非移入群と比較して膵炎の軽減が認められ、セルレイン/LPS により誘導されるマウス急性膵炎モデルにおいて野生型マウスから分離した IL-10 産生 B10 細胞を移入した後にセルレイン/LPS を投与すると、非移入群と比較して膵炎の軽減が認められ

(4) CD19 欠損マウスにポリ I:C を投与してマウス自己免疫性膵炎の発症について検討した。野生型マウスにポリ I:C を投与しても膵炎は発症しなかった。しかし、CD19 欠損マウスにポリ I:C を投与すると自己抗体産生を伴った膵炎の発症が認められた。免疫不全 RAG2 欠損マウスに膵炎発症マウスの脾臓細胞を養子移入すると同様の膵炎が発症し、CD19 欠損マウスにポリ I:C を投与して誘導される膵炎は自己免疫的機序によるものと考えられ、自己免疫性膵炎自己免疫性膵炎発症に IL-10 産生 B 細胞が抑制的に働いていることが示された。

以上より、セルレイン誘発膵炎および自己免疫性膵炎モデルの発症抑制には制御性 B 細胞が関与しており、野生型マウスから分離した IL-10 産生 B10 細胞を移入すると膵炎が軽減することが示された。

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 12 件)

Induction of PIR-A/B⁺ DCs in the in vitro inflammatory condition and their immunoregulatory function. Matsui F, Inaba M, Uchida K, Nishio A, Fukui T, Yoshimura H, Satake A, Yoshioka K, Nomura S, Okazaki K. J Gastroenterol. 2018 doi: 10.1007/s00535-018-1447-1. 査読有
Basophils activated via TLR signaling may contribute to pathophysiology of type 1 autoimmune pancreatitis.

Yanagawa M, Uchida K, Ando Y, Tomiyama T, Yamaguchi T, Ikeura T, Fukui T, Nishio A, Uemura Y, Miyara T, Okamoto H, Satoi S, Okazaki K. J Gastroenterol. 2018;53:449-460. doi: 10.1007/s00535-017-1390-6. 査読有
Techniques of ERCP with a conventional endoscope in pancreatoduodenectomy anatomy. Matsushita M, Koyabu M, Nishio A, Seki T, Okazaki K. Gastrointest Endosc. 2017;86:747-748. doi: 10.1016/j.gie.2017.05.007. 査読有
Smad2/3 Linker phosphorylation is a possible marker of pancreatic stem/progenitor cells in the regenerative phase of acute pancreatitis. Sakao M, Sakaguchi Y, Suzuki R, Takahashi Y, Kishimoto M, Fukui T, Uchida K, Nishio A, Matsuzaki K, Okazaki K. Pancreas. 2017;46:605-613. doi: 10.1097/MPA.0000000000000759. 査読有
Inverted Appendix: Final Diagnosis or Endometriosis? Matsushita M, Nishio A, Seki T, Okazaki K. Am J Gastroenterol. 2016;111:746. doi: 10.1038/ajg.2016.69. 査読有
Endoscopic and/or laparoscopic full-layer resection of gastric ectopic pancreas arising from submucosal and muscular layers. Matsushita M, Hachimine D, Nishio A, Seki T, Okazaki K. Gastrointest Endosc. 2016;84:547. doi: 10.1016/j.gie.2016.02.035. 査読有
Pathogenesis and Carcinogenesis of the Appendix in Ulcerative Colitis. Matsushita M, Nishio A, Seki T, Okazaki K. Am J Gastroenterol. 2017;112:184. doi: 10.1038/ajg.2016.312. 査読有
Morphological and immunohistochemical comparison of intrapancreatic nerves between chronic pancreatitis and type 1 autoimmune pancreatitis. Kato K, Ikeura T, Yanagawa M, Tomiyama T, Fukui T, Uchida K, Takaoka M, Nishio A, Uemura Y, Satoi S, Yamada H, Okazaki K. Pancreatology. 2017;17:403-410. doi: 10.1016/j.pan.2017.02.009. 査読有
Phosphorylation of Smad2/3 at the specific linker threonine residue indicates slow-cycling esophageal stem-like cells before re-entry to the cell cycle. Takahashi Y, Fukui T, Kishimoto M, Suzuki R, Mitsuyama T, Sumimoto K, Okazaki T, Sakao M,

Sakaguchi Y, Yoshida K, Uchida K, Nishio A, Matsuzaki K, Okazaki K. Dis Esophagus. 2016;29:107-15. doi: 10.1111/dote.12277. 査読有
Smad2/3 linker phosphorylation is a possible marker of cancer stem cells and correlates with carcinogenesis in a mouse model of colitis-associated colorectal cancer. Suzuki R, Fukui T, Kishimoto M, Miyamoto S, Takahashi Y, Takeo M, Mitsuyama T, Sakaguchi Y, Uchida K, Nishio A, Okazaki K. J Crohns Colitis. 2015;9:565-74. doi: 10.1093/ecco-jcc/jjv073. 査読有
Comparison of neutrophil infiltration between type 1 and type 2 autoimmune pancreatitis. Mitsuyama T, Uchida K, Sumimoto K, Fukui Y, Ikeura T, Fukui T, Nishio A, Shikata N, Uemura Y, Sato S, Mizuno N, Notohara K, Shimosegawa T, Zamboni G, Frulloni L, Okazaki K. Pancreatology. 2015; 15:271-80. doi: 10.1016/j.pan.2015.03.005. 査読有
Possible involvement of Toll-like receptor 7 in the development of type 1 autoimmune pancreatitis. Fukui Y, Uchida K, Sakaguchi Y, Fukui T, Nishio A, Shikata N, Sakaida N, Uemura Y, Sato S, Okazaki K. J Gastroenterol. 2015;50:435-44. doi: 10.1007/s00535-014-0977-4. 査読有

〔学会発表〕(計 11 件)

加藤 孝太、膵炎の病態解明を目指した最新の基礎研究 慢性膵炎と1型自己免疫性膵炎における膵内神経システムの免疫組織学的検討、第 48 回日本膵臓学会大会、2017 年
坂尾 将幸、急性膵炎再生期における Smad2/3 リンカー部リン酸化の前駆細胞マーカーとしての可能性、第 48 回日本膵臓学会大会、2017 年
内田 一茂、自己免疫性膵炎(1 型・2 型)における好中球浸潤の違いについて、第 53 回日本消化器免疫学会、2016 年
Kazushige Uchida, Analysis of neutrophil in type 1 and type 2 autoimmune pancreatitis. 第 47 回日本膵臓学会大会、2016 年
Masayuki Sakao, Phosphorylation of smad2/3 at specific linker threonine during pancreatitis indicates slow-cycling stem-like cells, Asian Pacific Digestive Week 2016
Kazushige Uchida, The pathophysiological role of toll-like receptor signaling in type 1 autoimmune pancreatitis. Asian Pacific Digestive Week 2015
Toshiro Fukui, Carcinogenic and stem

cell-like phenotypes of smad2/3 linker phosphorylation in a mouse model of colitis-associated colorectal cancer. Asian Pacific Digestive Week 2015
Masahiro Takeo, Repeated stimulation with zymosan, a cell wall component of Saccharomyces Cervisiae, induces chronic pancreatitis in mice. Asian Pacific Digestive Week 2015
Kazushige Uchida, The role of Toll-like receptor signaling in the pathophysiology of type 1 autoimmune pancreatitis. 115th Annual Meeting of the American Gastroenterological Association 2015
Toshiyuki Mitsuyama, Analysis of neutrophil infiltration in type 1 and type 2 autoimmune pancreatitis. 115th Annual Meeting of the American Gastroenterological Association 2015
岡崎 敬、eIF2 脱リン酸化抑制を介した小胞体ストレス軽減による膵炎改善効果の検討. 第 101 回日本消化器病学会総会、2015 年

〔図書〕(計 0 件)

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西尾 彰功 (NISHIO. Akiyoshi)
研究者番号：5 0 3 6 2 4 6 3

(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：

(4)研究協力者
なし ()