

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590762

研究課題名（和文） 自己免疫性膵炎発症における自然免疫の関与と自己抗原の解析

研究課題名（英文） Role of innate immunity in the pathogenesis of autoimmune pancreatitis and analysis of its autoantigens

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

研究成果の概要：自己免疫性膵炎の病態を解明するために、マウス膵炎モデルを解析した。各種 toll-like receptor リガンドを投与し血清サイトカインの動態と膵炎の発症を検討した結果、インターロイキン 10 が膵炎の発症抑制に重要と考えられた。さらに、膵分泌性トリプシンインヒビター (PSTI) に対する自己抗体が PSTI のトリプシン結合部と反応してその活性を抑制し、トリプシンの活性化を促進して膵炎を増悪させる可能性を明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：自己免疫性膵炎、自然免疫、toll-like receptor、自己抗体、抗原エピトープ
膵分泌性トリプシンインヒビター

1. 研究開始当初の背景

自己免疫性膵炎(AIP)は、自己免疫機序により発症する膵炎の1病型であり、近年我が国を中心に疾患概念が確立され注目を集めている。臨床的検討より、膵臓のびまん性炎症変化だけでなく、限局性膵病変の存在、膵臓への多数の IgG4 陽性形質細胞の浸潤、血中 IgG4 上昇などが報告されている。しかし、IgG4 陽性形質細胞浸潤や血中 IgG4 上昇の病的意義は明らかでなく、AIP の病態は未だ十分に解明されていない。

臨床面からの病態解明が進んでいない現

状では、実験動物モデルの解析が病態解明に有効な方法と考えられる。AIP の動物モデルとして膵炎を自然発症する MRL/MpJ マウスが知られているが、このマウスは生後6ヶ月以降加齢とともに膵炎を発症し、合成2重鎖 RNA である polyinosinic polycytidylic acid (poly I:C) 投与により発症が促進される。我々の検討では膵組織像はヒト AIP に類似しており、ヒトでみられる抗 lactoferrin (LF) 抗体、抗 carbonic anhydrase (CA-II) 抗体、抗核抗体などの自己抗体産生も認められることより、ヒト AIP に極めて類似した動物モ

デルと考えられる。しかし、MRL/MpJ マウスは遺伝的背景が複雑であり、同じ遺伝的背景を有する免疫不全マウスも存在せず、自己反応性T細胞クローンの樹立や養子移入実験を含めた詳細な検討には適さない。

我々はこれを克服するために新規マウスモデルを作製した。野生型 C57BL6 マウスはMRL/MpJ マウスとは異なり膵炎を自然発症せず、poly I:Cを投与しても膵炎は起こらない。しかし、interleukin(IL)-10 遺伝子を欠損させた C57BL6 マウスに poly I:Cを投与すると膵炎が発症することを見出した。この膵炎モデルはMRL/MpJ マウスに類似の膵炎組織像を示し、血清中に各種自己抗体の産生が認められた。それ故、遺伝的背景に加えて toll-like receptor (TLR) 刺激やそれに関係したサイトカイン産生が膵炎発症に関与している可能性があり、AIP の病態解明には自然免疫の関与と自己抗原の解析が重要と考えられる。

2. 研究の目的

自己免疫性膵炎の病態解明を目的として、ヒト AIP に類似したマウスモデルを用いて膵炎の発症機序の解析と発症における自然免疫の関与を検討した。さらに、膵炎マウスにおける自己抗体産生の状態と自己抗体と反応する自己抗原分子の解析を行った。

3. 研究の方法

(1) 予備的検討で、野生型 C57BL6 マウスに poly I:C を投与しても膵炎は発症しないが、C57BL6 由来 IL-10 欠損マウスに投与した場合膵炎が発症することを見いだした。組織学的検討では、膵腺房細胞および導管を含めた外分泌腺の炎症が主体で、ランゲルハンス島は炎症の後期まで破壊されず維持されていた。poly I:C が TLR3 のリガンドであることより、様々な TLR リガンドを投与して膵炎発症およびその程度を比較検討した。6 週齢の MRL/MpJ マウスと IL-10 欠損マウスに各種 TLR リガンド(poly I:C, lipopolysaccharide (LPS), CpG-oligodeoxynucleotide (ODN)) および対照としてリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を週 2 回、最長 12 週間腹腔内投与した。TLR リガンド投与開始 3 週後、6 週後、12 週後にマウスを脱血死させ、組織学的な膵炎の程度を重症度スコアにて評価した。膵組織凍結標本を用いて、3 週後、6 週後、12 週後の膵に浸潤した炎症細胞の状態について、CD4、CD8、CD138、B220 に対する抗体を使用して免疫組織化学的に検討した。さらに、各種 TLR リガンドおよび PBS で刺激したマウス血清中のサイトカイン (IL-4、IL-10、IL-12、IFN- α 、IFN- γ 、TNF- α 、)

を ELISA 法および multiplex suspension array 法で測定した。各群マウスの膵臓における TLR3、TLR4、TLR9 の mRNA 発現を real time-PCR で比較検討した。

(2) 膵炎マウス血清中の自己抗体について、LF、CA-II、膵分泌性 trypsin inhibitor (PSTI)、glutamic acid decarboxylase (GAD) に対する自己抗体の頻度を ELISA 法で測定した。さらに PSTI の合成ペプチドを作製し、ELISA 法により抗 PSTI 抗体が反応する抗原エпитオープの解析を行った。

4. 研究成果

(1) MRL/MpJ マウスに poly I:C (TLR3 リガンド) や CpG-ODN (TLR9 リガンド) を投与すると膵炎が発症したが、LPS (TLR4 リガンド) 投与では膵炎の発症はみられなかった。各群の血清サイトカインについて検討した結果、いずれの群でも炎症性サイトカインは増加したが、膵炎を発症しなかった LPS 投与群では膵炎を発症した poly I:C 投与群や CpG 投与群に比べて抗炎症性サイトカインである IL-10 産生が有意に亢進しており、IL-10 が膵炎の発症を抑制していると推測された。poly I:C 投与では膵における TLR3 の mRNA 発現量増加がみられ、LPS 投与で TLR4 の mRNA 発現量増加がみられたことより、positive feedback により TLR リガンド刺激が増幅される可能性が示唆された。さらに、野生型マウスに poly I:C を投与しても膵炎は発症しなかったのに対し、IL-10 欠損マウスでは poly I:C 投与により大腸炎の増悪とともに膵炎が発症したことより、膵炎発症抑制に IL-10 が重要であることが裏付けられた。

LPS を poly I:C や CpG-ODN に併用投与したマウスでは、LPS による膵炎抑制はみられず、逆に膵炎の程度が増強した。血清サイトカインの検討では、併用投与により炎症性サイトカインの増加が IL-10 の増加を上回り、TLR 刺激の結果生じた炎症性サイトカインと抗炎症性サイトカインの不均衡が自己反応性 T 細胞の活性化を引き起こし、AIP の発症に至ると考えられた。また、LPS 併用投与群では膵炎に加え線維化も進行しており、LPS 投与による血清 TNF- α の増加が膵線維化に関与している可能性が示唆された。自然免疫の活性化により引き起こされるサイトカインバランスの不均衡がヒトにおいて AIP の発症の契機となっているか臨床的検討が重要と考えられる。

(2) 膵炎を発症した IL-10 欠損マウス脾細胞を Rag2 欠損マウスに移入した結果、CD4 陽性 T 細胞の移入で膵炎が発症したが CD8 陽性 T

細胞の移入では膵炎が発症せず、CD4陽性T細胞が膵炎発症に関与するeffector細胞であることが示された。

(3) AIPでは、血中IgG、IgG4上昇に加えLFやCA-IIなどに対する自己抗体が検出される。poly I:C投与により膵炎を発症したMRL/MpJマウスにおいてもヒトAIPと同様に自己抗体産生がみられることより、膵炎マウスモデルにおける自己抗体産生の状態について検討した。膵炎マウスでは、免疫グロブリン分画は全体に増加していたが、ヒトAIPとは異なり特異的IgGサブクラスの増加は認められなかった。免疫組織学的検討では、膵臓の炎症細胞浸潤の主体はB220陽性細胞(B細胞)で、濾胞形成を伴い膵実質内に広範に浸潤がみられた。CD138陽性細胞(形質細胞)は濾胞近傍と間質に浸潤していた。CD4およびCD8陽性T細胞は主に濾胞周囲に認められた。血清中の自己抗体の検討では、ヒトAIPと同様にLFやCA-IIなどに対する自己抗体が認められ、抗LF抗体は45.8%に陽性で、抗CA-II抗体は33.3%に陽性であった。抗PSTI抗体は91.7%と高率に認められた。GADに対する抗体産生は認められなかった。

(4) SPINK3(マウスのPSTIホモログ)の合成ペプチドを作製し、抗PSTI抗体が反応する抗原エпитープの解析を行った結果、膵炎マウス血清は合成ペプチド1(アミノ酸1-25)に82.3%が反応し、合成ペプチド2(17-41)に75%が反応したが、合成ペプチド3(32-56)に対する反応性は認められなかった。膵炎マウスの血清の大半がSPINK3蛋白のトリプシン結合部位(18-21)を含む合成ペプチドに反応性を示した。これは、AIPにおける抗PSTI抗体産生がPSTI活性の抑制を介してトリプシンの活性化を促進し、膵炎の進展に関与している可能性を初めて示したものであり、ヒトAIPにおいても同様の病態がみられるか今後の検討課題である。

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 10 件)

- ① Masanori Asada, Akiyoshi Nishio, Takuji Akamatsu (11名、2番目). Analysis of humoral immune response in experimental autoimmune pancreatitis in mice. *Pancreas*. 39:224-231;2010. 査読有
- ② Mitsunobu Matsushita, Akiyoshi Nishio, Kazuichi Okazaki (5名、4番目). Atypical retroperitoneal fibrosis associated with biliary stricture: IgG4-related sclerosing disease? *Scand J Gastroenterol*. 44:1146-1147;2009. 査読有
- ③ Kazushige Uchida, Akiyoshi Nishio, Kazuichi Okazaki (12名、3番目). Long-term outcome of autoimmune pancreatitis. *J Gastroenterol*. 44:726-732;2009. 査読有
- ④ Mitsunobu Matsushita, Akiyoshi Nishio, Kazuichi Okazaki (6名、5番目). Epinephrine sprayed on the papilla for prevention of post-ERCP pancreatitis. *J Gastroenterol*. 44:71-75;2009. 査読有
- ⑤ Junya Tanaka, Norihiko Watanabe, Akiyoshi Nishio (7名、6番目). Human TSLP and TLR3 ligands promote differentiation of Th17 cells with a central memory phenotype under Th2-polarizing conditions. *Clin Exp Allergy*. 39:89-100;2008. 査読有
- ⑥ Takuji Akamatsu, Norihiko Watanabe, Akiyoshi Nishio (8名、7番目). Human TSLP directly enhances expansion of CD8+ T cells. *Clin Exp Immunol*. 154:98-106;2008. 査読有
- ⑦ Masahiro Kido, Norihiko Watanabe, Akiyoshi Nishio (9名、7番目). Fatal autoimmune hepatitis induced by concurrent loss of naturally arising regulatory T cells and PD-1-mediated Signaling. *Gastroenterology*. 154:98-106;2008. 査読有
- ⑧ Daisaku Hachimine, Akiyoshi Nishio, Kazuichi Okazaki (13名、4番目). Involvement of Smad3 phosphoisoform-mediated signaling in the development of colonic cancer in IL-10-deficient mice. *Int J Oncol*. 32:1221-1226;2008. 査読有
- ⑨ Toshiro Fukui, Akiyoshi Nishio, Kazuichi Okazaki (14名、2番目). Cross-primed CD8+ cytotoxic T cells induce severe Helicobacter-associated gastritis in the absence of CD4+ T cells. *Helicobacter*. 12:486-497;2007. 査読有
- ⑩ Kazuyuki Saga, Toshiro Fukui, Akiyoshi Nishio (8名、7番目). Localized cytomegalovirus reactivation after radiotherapy for

high-grade gastric lymphoma.
Gastrointestinal Endoscopy.
65:545-547;2007. 査読有

(2)研究分担者
なし

〔学会発表〕(計7件)

(3)連携研究者
なし

- ① 西尾彰功. マウスモデルを用いた自己免疫性膵炎発症における自然免疫の関与. 第51回日本消化器病学会大会 2009年10月15日 京都
- ② Masahiro Kido. Fetal autoimmune hepatitis induced by concurrent loss of naturally arising regulatory T cells and PD-1-mediated signaling. 2008年度日本免疫学会学術集会 2008年12月1日 京都
- ③ Akiyoshi Nishio. Effect of various toll-like receptor stimulation on the development of murine autoimmune pancreatitis. 109th Annual Meeting of the American Gastroenterological Association. 2008年5月20日 米国 サンディエゴ
- ④ Norihiko Watanabe. Development of a new mouse model of fatal autoimmune hepatitis. 109th Annual Meeting of the American Gastroenterological Association. 2008年5月20日 米国 サンディエゴ
- ⑤ Akiyoshi Nishio. The role of innate immunity in the pathogenesis of murine autoimmune pancreatitis. 15th United European Gastroenterology Week. 2007年10月30日 フランス パリ
- ⑥ Akiyoshi Nishio. Interleukin 10 is essential for prevention of murine autoimmune pancreatitis induced by poly I:C administration. 108th Annual Meeting of the American Gastroenterological Association. 2007年5月19日 米国 ワシントン
- ⑦ Masanori Asada. The role of innate immunity in the pathogenesis of murine experimental model of autoimmune pancreatitis. 108th Annual Meeting of the American Gastroenterological Association 2007年5月19日 米国 ワシントン

6. 研究組織

(1)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