

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：34417

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17476

研究課題名（和文）自己免疫性膵炎の発症病態や制御機構に関わるIL-35の働き

研究課題名（英文）IL-35 associate with the Th2 response and the differentiation of Tregs in type 1 AIP.

研究代表者

田中 敏宏 (TANAKA, Toshihiro)

関西医科大学・医学部・研究医員

研究者番号：70548700

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：サイトカインの網羅解析を行い、IL-35、IL-29が自己免疫性膵炎患者において、優位に上昇していることを確認した。また自己免疫性膵炎患者の膵組織において、IL-12p35とEBI3の免疫染色及び二重染色を行い、優位にIL-35サブユニットの二重染色陽性細胞数が多い結果であった。又膵組織内における制御性T細胞のマーカーであるFoxp3陽性細胞とIL-35陽性細胞との三重染色における陽性細胞も確認している。これにより自己免疫性膵炎患者において抹消血・膵組織自体にIL-35の関与し、制御性T細胞を介して、炎症に抑制性に関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで詳細が不明瞭であった自己免疫性膵炎の病態において、その一端となるIL-35とIL-29の関与が明らかになった。抑制性の制御をすることによって、今後治療への応用や、さらなる病態の解明につながる糸口となると考えられる。

研究成果の概要（英文）：IgG4-related disease (IgG4-RD) is a systemic inflammatory disease, which includes type 1 autoimmune pancreatitis (AIP). Interleukin-35 (IL-35) exhibits immunosuppressive effects in several autoimmune diseases. However, the expression of IL-35 had not been reported so far in type 1 AIP. We evaluated the association between IL-35 and several cytokines, which mediate the function of Tregs in type 1 AIP. This study identified elevated expression of plasma IL-35 and tissue IL-35 subunits in patients with type 1 AIP. This might lead to inflammation suppression via activated eTregs. IL-35 might be associated with this anti-inflammatory role, especially against the Th2 response through several cytokines and the differentiation of Tregs in type 1 AIP.

研究分野：消化器内科

キーワード：IL-35 自己免疫性膵炎 制御性T細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

IgG4-related pancreatitis (Autoimmune Pancreatitis :AIP)の病態には、制御性 T 細胞(regulatory T cell:Treg)と制御性 B 細胞(regulatory B cell:Breg)が関与すると報告されているが、関与するメディエーターや詳細な関係性は未だ不明な点が多い。そこでより多く循環血液に存在する Treg に関与し、抑制的な働きをされると考えられる IL-35 を中心としたサイトカインと AIP の病態との関連に注目した。AIP に関して、IL-35 が病態にどのように関わるかは未だ報告はない。そのサイトカインが病勢のバイオマーカー及び今後の新たな治療法となるかを検討するために、AIP 発症時の状態、治療寛解時及び再燃時の IL-35 の血清 data と制御性 T 細胞の状態を検討する。ヒト検体で末梢血中の Treg を用いて、IL-35 との関係性やその下流シグナル解析を進め、AIP 膵組織でもその発現について確認を行う。自己免疫性膵炎モデルマウス(MRL/Mp)を用いて Treg の関与と IL-35 の関係性の確認も行う。マウスモデルでの炎症のメカニズムが類似していれば、recombinant IL-35(rIL-35)の vector を用いて in Vitro で rIL-35 を作成し、投与することで治療応用の可能性を検討することができると考えられる。

2. 研究の目的

本研究により、AIP における IL-35 の関与する病態の解明を行う。AIP の病態において、IL-35 の発現に関与する細胞は不明な点が多く、その同定と機能解析を行うことで、AIP 本体の病態の解明につながる。具体的には発症時、治療後寛解時期及び再燃時の患者血清や血球を用いて IL-35 や制御性 T 細胞分画の動きを比較検討する事で、重症度や再燃の指標マーカーとなりうるか検討する。また IL-35 の示す抑制性を示すメカニズムや治療への応用の解析のため、臨床検体における機能解析とともに、マウスモデルを用いて治療としての有用性を検討する。

3. 研究の方法

(1)組織学的な IL-35 の発現比較と IL-35 発現細胞の同定

AIP 患者の手術標本と disease control の標本を用いて、IL-35 の subunit である IL-12p35, EBi3 の抗体を用いて免疫染色を施行しその発現量の比較を行う。IL-35 subunit は様々な細胞で発現している可能性もあることから、発現細胞の同定のため、T 細胞 (CD4) , B 細胞(CD19), 形質細胞(CD138), マクロファージ等のマーカーにより免疫組織学的に二重染色を行う。実際の末梢血中のそれらの細胞での発現も、RNA 抽出キットを用いて行い、cDNA を作成し IL-12p35 と Ebi3 の発現を qPCR にて比較検討を行う。

(2)Treg とそのサブクラスの IL-35 発現比較

IL-35 に関与する報告として、Treg の関与が強く示唆されている。Treg については、転写因子の Foxp3 が master regulator であることが知られており、CD4, CD45RA 及び Foxp3 にて分類することで、活性化のない naïve Treg(CD4⁺Foxp3^{low}CD45RA⁺)と活性化した制御性 T 細胞(CD4⁺Foxp3^{hi}CD45RA⁻)及び Foxp3⁺陽性にも関わらず制御性 T 細胞でない CD4⁺Foxp3^{low}CD45RA⁻の分画を識別することができる。これまでの報告では、AIP 患者においては CD4⁺CD25⁺Treg が上昇することを確認しているが、その分画内における Foxp3 陽性率など Foxp3 を用いた Treg の分類との関係性を明らかにする。そこで AIP, disease control 及び健常者の血球を用いて、CD4⁺CD25^{hi}で Foxp3 陽性に相当する分画の比率を CD127 も含めて検討するとともに、それぞれの mRNA の解析を行う為に、CD4, CD127, CD45RA 及び CD25 を用いて naïve Treg, 活性型 Treg の分画を FACS にて回収し、IL-35 subunit (EBi3, p35)の発現を qPCR にて比較する。

(3)IL-35 下流シグナルの解析

FACS で回収した Treg の細胞 1.0×10^3 個の細胞より RNA 抽出を行い、そこから cDNA を作成

し qPCR 用いて STAT1,3 及び 4 について発現量の解析を行う。

4 . 研究成果

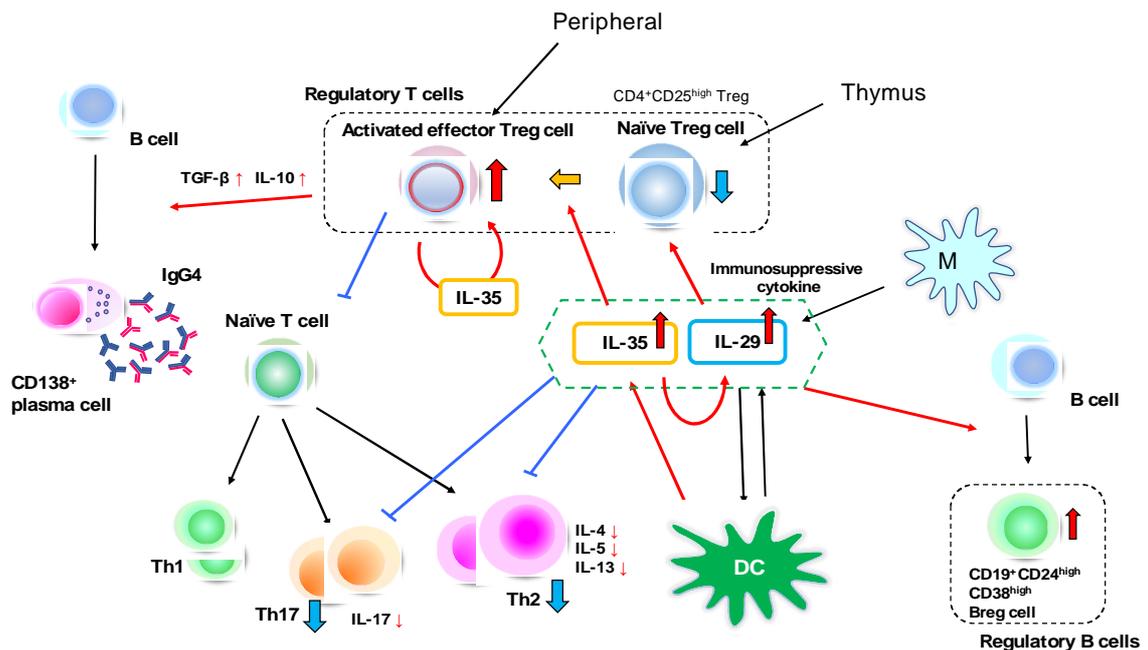
自己免疫性膵炎患者の血漿・慢性膵炎患者血漿・健常者の血漿を用いて,サイトカインの網羅解析を行い,IL-35・IL-29 が自己免疫性膵炎患者において,優位に上昇していることを確認している.以前に当研究室にて CD4 リンパ球内の naive 制御性 T 細胞の減少と,effector 制御性 T 細胞の増加を報告している.またこれまでの報告にて,IL-35 は制御性 T 細胞から出される報告もある.再度患者血球にて effector 制御性 T 細胞が優位に増加していることを確認し,自己免疫性膵炎の制御に制御性 T 細胞の増減とそこからの IL-35 発言が関与しているのではないかと考えた.末梢血にて IL-35 の関与が示唆された為,自己免疫性膵炎患者の膵組織においても発現の増加があるのかを確認するために,IL-35 のサブユニットである IL- 12p35 と EBi3 の免疫染色及び二重染色を行い,慢性膵炎患者組織に対して影響を与えているのかを検討した.慢性膵炎患者組織と比較して優位に IL-35 サブユニットの二重染色陽性細胞数が多い結果であった.又膵組織内における制御性 T 細胞のマーカーである Foxp3 陽性細胞と IL-35 陽性細胞との三重染色における陽性細胞も確認している.

ここまでで,末梢血中の effector 制御性 T 細胞の増加と,自己免疫性膵炎病変自体においてと両方で,IL-35 の関与が確認された.解析可能な n 数に達した時点で,制御性 T 細胞の分画解析と合わせて,論文化して投稿とした.

自己免疫性膵炎患者の血清・血漿の症例数を増やし,解析を行い,さらに自己免疫性膵炎の治療後・臨床的寛解を得た患者における制御性 T 細胞の分画の解析や,サイトカインの動きも確認し,治療法の評価も可能であれば,評価の方針としていた.

また動物実験に関係するマウスやリコンビナントの IL-35 などを用いた,動物実験における治療の有用性等も検討は行っていたが,実験ができず未評価となった.

図、自己免疫性膵炎のメディエーター



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Ito T, Tanaka T, Nakamaru K, Tomiyama T, Yamaguchi T, Ando Y, Ikeura T, Fukui T, Uchida K, Nishio A, Okazaki K.	4. 巻 55
2. 論文標題 Interleukin-35 promotes the differentiation of regulatory T cells and suppresses Th2 response in IgG4-related type 1 autoimmune pancreatitis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Gastroenterol .	6. 最初と最後の頁 789-799
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00535-020-01689-5	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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------