

機関番号：34417

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20590810

研究課題名（和文）

自己免疫性膵炎および硬化性胆管炎における発症機序と進展に関する免疫学的研究

研究課題名（英文）

Pathogenetic mechanisms of autoimmune pancreatitis and sclerosing cholangitis

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

研究成果の概要（和文）：

基礎的・臨床的検討により、自己免疫性膵炎（AIP）、硬化性胆管炎（SC-AIP）患者やモデル動物においては、共通に存在する炭酸脱水酵素（CA-II）、ラクトフェリン（LF）、膵分泌性トリプシン阻害物質（PSTI）に対する免疫応答が存在した。病変部の病態形成にはTh1、Th2 が関与するものTh17の関与は低く、また制御性T細胞（Treg）、特にICOS陽性Treg細胞の誘導がIgG4陽性細胞の浸潤に関与することが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

Our study clarified that the patients with IgG4-related autoimmune pancreatitis (AIP), and sclerosing cholangitis (SC) and animal experimental models showed autoimmune responses against carbonic anhydrase II (CA-II), lactoferrin and pancreatic secretory trypsin inhibitor (PSTI). Both Th1 and Th2, but not Th17 immune cells are involved in the development of these lesions. Moreover, regulatory T cells (Tregs), especially ICOS<sup>+</sup> Tregs are involved in IgG4 production in patients with IgG4-related AIP and SC.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：ライフサイエンス

科研費の分科・細目：消化器内科学

キーワード：自己免疫性膵炎、IgG4、硬化性胆管炎、動物モデル

## 1. 研究開始当初の背景

自己免疫性膵炎（AIP）はT細胞やIgG4陽性形質細胞の膵管周囲への著しい浸潤と特異な線維化（storiform fibrosis）

が特徴であり、わが国より発信された国際的にも認められつつある新しい疾患概念である（Okazaki K, et al. Gut 2002, J Gastroenterol 2006）。本症では、高

IgG/IgG4 血症や自己抗体を認めることより、IgG4 関連性自己免疫疾患としても注目されている。時に硬化性胆管炎 (SC-AIP)、硬化性唾液腺炎などを合併することより全身疾患である可能性も指摘されている。中でも閉塞性黄疸を来たす SC-AIP は AIP の 70% に認められ、予後不良の原発性硬化性胆管炎 (PSC) との異同が臨床的な問題となっている。一般に PSC ではステロイドが奏功しないものの、SC-AIP ではステロイドが著効することより、病態は異なると考えられるが、詳細は不明である。近年、ナイーブ T 細胞から、TGF $\beta$  存在下で制御性 T 細胞 (Treg) が誘導されること、更に TGF- $\beta$  と IL-6 存在下で Th17 細胞が誘導されることが明らかにされ、Treg の破綻や Th17 細胞の関与が自己免疫疾患の発症に重要であることが注目されているが、AIP や PSC における Treg や Th17 の関与は不明である。申請者らはすでに、AIP 発症機序の解明の一助として、膵 cDNA を組み込んだ蛋白発現ベクターと患者血清を用いて膵、胆管、唾液腺など広く外分泌腺に分布する carbonic anhydrase (CA)-II、lactoferrin、pancreas secretory trypsin inhibitor (PSTI) に対する自己抗体を高率に認めることを報告した (Okazaki K, Am J Gastroenterol:2000, Gastroenterology:2000、Gut:2003、Pancreas:2006)。またこれら蛋白を免疫した新生仔期胸腺摘出マウスやヌードマウスによる自己免疫性膵炎モデル動物を作成し、これらが疾患関連抗原である可能性を報告した (Uchida K, Okazaki K, et al. Lab Invest; 2002)。また、AIP 患者では末梢血中の活性化 CD4 および CD8 陽性 T 細胞が増加し、Th1 型 CD4 陽性 T 細胞が effector 細胞として関与する可能性を報告した (Okazaki K, Uchida K, et al. Gastroenterology:2000、Lab Invest; 2002、J Pancreas:2005)。さらに、AIP 患者では末梢血中ナイーブ制御性 T 細胞 (FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>RA<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>) の有意な低下を認めることが自己免疫異常の発症に関係する一方で、メモリー制御性 T 細胞 (FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>RA<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>) は有意に増加し、血中 IgG4 値と相関のあることを報告した (Okazaki K, et al. Pancreas:2007)。

## 2. 研究の目的

本研究では、AIP と他の慢性膵炎、お

よび SC-AIP と PSC における病態の違いを免疫学的観点と線維化機序からの観点より検討し、AIP の発症と進展課程を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 臨床的検討

同意の得られた自験 AIP 症例 54 例 (うち AIP-SC 合併 38 例) を対象とし、アルコール性慢性膵炎 30 例、特発性慢性膵炎 30 例、PSC 20 例、健常人 30 名を対照とする。各疾患患者および健常人の血中 IgG4、抗 CA-II、抗ラクトフェリン、抗 PSTI などの自己抗体、TGF- $\beta$ 、IL-6、IL-10、IL-17 などのサイトカインの測定とともに、末梢血中の Treg、Th17 細胞、IL-10 産生細胞、TGF- $\beta$  産生細胞、IgG4 陽性 B 細胞・形質細胞をフローサイトメトリーにより解析する。また、各患者で採取した膵および肝生検組織を用いて、Treg については抗 FoxP3 抗体、抗 CD4 抗体による免疫組織化学法により解析し、各疾患における病態の違いを明らかにする。

### (2) 基礎的検討

基礎的検討として、申請者らの開発した胸腺摘除膵炎マウス、poly-IC 免疫 MRL/lpr 膵炎マウス、WB/Kob ラットなどの膵・胆管炎動物モデルを用いて、臨床的検討に準じて、血中各種自己抗体の測定とともに、末梢血中の末梢血中の Treg、Th17、IL-10 産生細胞、TGF- $\beta$  産生細胞、IgG2b (ヒトにおける IgG4 に相当) 陽性 B 細胞・形質細胞をフローサイトメトリーにより解析する。また、それぞれの動物で得られた膵および肝組織を用いて、抗 FoxP3 抗体を用いて Treg を免疫組織学的に解析し、臨床的解析と比較検討する。

## 4. 研究成果

(1) 自己免疫性膵炎のヒトおよび動物組織の免疫学的・分子生物学的解析  
平成 20 年度にて作成したモデルマウスや WB/Kob ラットの膵・胆管・肝組織における Th1・Th2 バランスを IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-5、のプライマーを用いて real time PCR にて検討した。Treg と IL-10 は CD4、CD25、FoxP3 に対する抗体による免疫染色にて検討した。病変部では Th1、Th2 とともに発現していたが、ICOS 陽性 FoxP3 陽性 Treg の浸潤を認めたことより、末梢組織では IL-10 産生 Treg が病態形成に関与する可能性が示唆された。

(2) ヒトおよび自己免疫性膵炎動物モデル(胸腺摘出マウス、poly-IC 投与マウス、AIP 自然発症 WB/Kob ラット)の病理組織学的・免疫学的検討。

ヒト、胸腺摘出マウス、poly-IC 投与自己免疫性マウスの膵・胆管では明らかな FoxP3 陽性細胞 (Treg) の浸潤も認めるとともに、IL-10 の発現増強を認めた。

(3) 膵炎自然発症 WB/Kob ラットにおける制御性 T 細胞、免疫担当細胞の解析と骨髄由来幹細胞の移入による発症阻止実験を行った。

WB/Kob ラット・では膵炎だけでなく、胆・唾液腺炎などの外分泌腺炎を自然発症することが病理組織学で確認でき、さらに Treg と IL-10、IL-17、TGF- $\beta$  産生細胞などの免疫担当細胞をフローサイトメトリーと共焦点レーザー顕微鏡を用いて経時的に検討した。また、WB/Kob ラットを用いたモデルでは同系ラットの骨髄由来幹細胞を移入することにより、膵炎、胆管炎などの発症が抑制でき、Treg の減少が病因に関与すると思われる。

以上より、Treg の増加、IL-10 発現増強が自己免疫性膵炎の病態に関与することが示唆された。

#### 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 20 件)

1. Tomiyama T, Uchida K, Matsushita M, Ikeura T, Fukui T, Takaoka M, Nishio A, Okazaki K. Comparison of steroid pulse therapy and conventional oral steroid therapy as initial treatment for autoimmune pancreatitis. *J Gastroenterol.* 2011; 46:696-704 (査読有)
2. Okazaki K, Uchida K, Koyabu M, Miyoshi H, Takaoka M. Recent advances in the concept and diagnosis of autoimmune pancreatitis and IgG4-related disease. *J Gastroenterol.* 2011;46(3):277-88. (査読有)
3. Nishio A, Asada M, Uchida K, Fukui T, Chiba T, Okazaki K. The Role of Innate Immunity in the Pathogenesis of Experimental Autoimmune Pancreatitis in Mice. *Pancreas.* *Pancreas.* 2011;40(1):95-102. (査読有)
4. Sugumar A, Levy MJ, Kamisawa T, J M Webster G, Kim MH, Enders F, Amin Z, Baron TH, Chapman MH, Church NI, Clain JE, Egawa N, Johnson GJ, Okazaki K, Pearson RK, Pereira SP, Petersen BT, Read S, Sah RP, Sandanayake NS, Takahashi N, Topazian MD, Uchida K, Vege SS, Chari ST. Endoscopic retrograde pancreatography criteria to diagnose autoimmune pancreatitis: an international multicentre study. *Gut.* 2011;60(5):666-70. (査読有)
5. Asada M, Nishio A, Akamatsu T, Tanaka J, Saga K, Kido M, Watanabe N, Uchida K, Fukui T, Okazaki K, Chiba T. Analysis of humoral immune response in experimental autoimmune pancreatitis in mice. *Pancreas.* 2010 Mar;39(2):224-31. (査読有)
6. Koyabu M, Uchida K, Fukata N, Kusuda T, Ikeura T, Sakaguchi Y, Yoshida K, Shimatani M, Fukui T, Matsushita M, Uemura Y, Kaibori M, Takaoka M, Nishio A, Okazaki K. Primary sclerosing cholangitis with elevated serum IgG4 levels and/or infiltration of abundant IgG4-positive plasma cells. *J Gastroenterol.* 2010;45(1):122-9. (査読有)
7. Koyabu M, Uchida K, Miyoshi H, Sakaguchi Y, Fukui T, Ikeda H, Takaoka M, Hirohara J, Nishio A, Uemura Y, Uemoto S, Okazaki K. Analysis of regulatory T cells and IgG4-positive plasma cells among patients of IgG4-related sclerosing cholangitis and autoimmune liver diseases. *J Gastroenterol.* 2010;45(7):732-41 (査読有)
8. Okazaki K, Kawa S, Kamisawa T, Shimosegawa T, Tanaka M; Research Committee for Intractable Pancreatic Disease and Japan Pancreas Society. Japanese consensus guidelines for management of autoimmune pancreatitis: I. Concept and diagnosis of autoimmune pancreatitis. *J Gastroenterol.* 2010;45(3):249-65. (査読有)
9. Kawa S, Okazaki K, Kamisawa T, Shimosegawa T, Tanaka M; Working members of Research Committee for Intractable Pancreatic Disease and

- Japan Pancreas Society. Japanese consensus guidelines for management of autoimmune pancreatitis: II. Extrapancreatic lesions, differential diagnosis. *J Gastroenterol.* 2010;45(4):355-69. (査読有)
10. Matsushita M, Shimatani M, Takaoka M, Okazaki K. Effective endoscope for endoscopic retrograde cholangiopancreatography in patients with Roux-en-Y anastomosis: a single-, double-, or "short" double-balloon enteroscope? *Dig Dis Sci.* 2010;55(3):874-5; (査読有)
  11. Kamisawa T, Okazaki K, Kawa S, Shimosegawa T, Tanaka M; Research Committee for Intractable Pancreatic Disease and Japan Pancreas Society. Japanese consensus guidelines for management of autoimmune pancreatitis: III. Treatment and prognosis of AIP. *J Gastroenterol.* 2010;45(5):471-7. (査読有)
  12. Chari ST, Kloppel G, Zhang L, Notohara K, Lerch MM, Shimosegawa T; Okazaki K, et al. Histopathologic and clinical subtypes of autoimmune pancreatitis: the Honolulu consensus document. *Pancreas.* 2010;39(5):549-54. (査読有)
  13. Okazaki K, Uchida K, Fukui T, Takaoka M, Nishio A. Autoimmune pancreatitis - a new evolving pancreatic disease? *Langenbecks Arch Surg.* 2010; 395 (8) : 989-1000. (査読有)
  14. Kusuda T, Uchida K, Satoi S, Koyabu M, Fukata N, Miyoshi H, Ikeura T, Sakaguchi Y, Yoshida K, Fukui T, Shimatani M, Matsushita M, Takaoka M, Nishio A, Uemura Y, Kwon AH, Okazaki K. Idiopathic duct-centric pancreatitis (IDCP) with immunological studies. *Intern Med.* 2010; 49(23):2569-75. (査読有)
  15. Okazaki K, Uchida K, Miyoshi H, Ikeura T, Takaoka M, Nishio A. Recent Concepts of Autoimmune Pancreatitis and IgG4-Related Disease. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2010 Dec 18. [Epub ahead of print] (査読有)
  16. Uchida K, Yazumi S, Nishio A, Kusuda T, Koyabu M, Fukata M, Miyoshi H, Sakaguchi Y, Fukui T, Matsushita M, Takaoka M, Okazaki K. Long-term outcome of autoimmune pancreatitis. *J Gastroenterol.* 2009;44(7):726-32. (査読有)
  17. Kamisawa T, Shimosegawa T, Okazaki K, Nishino T, Watanabe H, Kanno A, Okumura F, Nishikawa T, Kobayashi K, Ichiya T, Takatori H, Yamakita K, Kubota K, Hamano H, Okamura K, Hirano K, Ito T, Ko S, Omata M. Standard steroid therapy for autoimmune pancreatitis. *Gut.* 2009; 58(11):1504-7. (査読有)
  18. Matsushita M, Fukui T, Uchida K, Nishio A, Okazaki K. Atypical retroperitoneal fibrosis associated with biliary stricture: IgG4-related sclerosing disease? *Scand J Gastroenterol.* 2009;44(9):1146-7. (査読有)
  19. Yoshida K, Yang GX, Zhang W, Tsuda M, Tsuneyama K, Moritoki Y, Ansari AA, Okazaki K. Deletion of interleukin-12p40 suppresses autoimmune cholangitis in dominant negative transforming growth factor beta receptor type II mice. *Hepatology.* 2009;50(5):1494-500. (査読有)
  20. Okazaki K, Kawa S, Kamisawa T, Ito T, Inui K, Irie H, Irisawa A, Kubo K, Notohara K, Hasebe O, Fujinaga Y, Ohara H, Tanaka S, Nishino T, Nishimori I, Nishiyama T, Suda K, Shiratori K, Shimosegawa T, Tanaka M. Japanese clinical guidelines for autoimmune pancreatitis. *Pancreas.* 2009;38(8):849-66. (査読有)
- [学会発表] (計 19 件)
1. Okazaki K. Autoimmune Pancreatitis-recent concept and the Japanese experience. Annual meeting of Gastroenterological Association of Thailand. Pattaya. 2010/11/17
  2. K Uchida, T Kusuda, K Okazaki, et al. Analysis of ICOS and IL-10 positive regulatory T cells in patients with autoimmune pancreatitis. American Pancreatic Association Meeting 2010/11/6, Chicago.
  3. K. Uchida, M. Koyabu, T. Kusuda, H. K. Okazaki, et al. Relationship between T cells and IgG4-positive plasma cells in the involved. International congress of Immunology

- 2010 2010/10/8, Kobe
4. Kazushige Uchida, Takeo Kusuda, Masanori Koyabu, Kazuichi Okazaki, et al. Involvement of ICOS and IL-10 positive regulatory T cells in the development of autoimmune pancreatitis. Joint meeting of the International Association of Pancreatology and the Japan Pancreas Society 2010/7/1 Fukuoka
  5. Koyabu, M, Uchida, K, Okazaki, K et al. Possible role of regulatory T cells in producing IgG4 in the involved organs with autoimmune pancreatitis. DDW2010. 2010/5/6 New Orleans.
  6. 内田一茂, 岡崎和一. 自験例よりみた自己免疫性膵炎の治療法とその予後. 第52回日本消化器病学会大会 横浜 2010年10月12日
  7. 楠田武生, 内田一茂, 岡崎和一 自己免疫性膵炎をめぐる新たな展開 自己免疫性膵炎 (AIP-LPSP) と好中球病変 (IDCP) の免疫学的相違に関する検討 第52回日本消化器病学会大会 横浜市 2010年10月12日
  8. Uchid K, Miyosi H, Okazaki K, et al. Analysis of Regulatory T cells in Patients with Autoimmune pancreatitis. 40th Anniversary Meeting of American Pancreatic Association and Japan Pancreatic Society. 2009/11/05. Honolulu
  9. Y Sakaguchi, T Kusuda, M K Okazaki. An animal model for acute, chronic, and severe pancreatitis with the analyses of regeneration mechanisms. 40th Anniversary Meeting of American Pancreatic Association (APA) and Japan Pancreatic Society (JPS). 2009/11/05. Honolulu
  10. Okazaki K. How Do We Diagnose AIP? 40th Anniversary Meeting of APA and JPS. 2009/11/05. Honolulu
  11. Okazaki K. Subtypes of AIP (LPSP AND IDCP). 40th Anniversary Meeting of APA and JPS. 2009/11/05. Honolulu
  12. Okazaki K. ANATOMY of a FRIENDSHIP Gunter Kloppel & the Verona Pancreatic Team. 2009/09/09. Verona
  13. Uchida K, Miyoshi H, Okazaki K. et al. Regulatory T cells in patients with autoimmune pancreatitis. European Pancreatic Club Meeting 2009/10/1, Szeged, Hungary
  14. Uchida K, Miyoshi H, Okazaki K. et al. Analysis of CD4+CD25high regulatory T cells in patients with autoimmune pancreatitis. International Pancreatic Research Forum. 2009/01/12, Tokyo
  15. 内田一茂, 楠田武生, 岡崎和一. 自己免疫性膵炎における制御性T細胞に関する検討. 第51回日本消化器病学会大会、京都、2009年11月12日
  16. 内田一茂, 小薮雅紀, 楠田武夫, 三好秀明, 坂口雄沢, 西尾彰功, 岡崎和一. 自己免疫性膵炎における制御性 T 細胞と IgG4 に関する検討. 日本消化器免疫学会、松山、2009年9月10日
- [図書] (計2件)
1. 岡崎 和一, 内田 一茂, 福井 寿朗. 永井書店 見て診て学ぶ 膵腫瘍の画像診断、2009, 391
  2. 岡崎和一, 川 茂幸, 神澤輝実 診断と治療社 新版 自己免疫性膵炎—病態から診断・治療まで—, 2009, 216
6. 研究組織
- (1) 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
  - (2) 研究分担者  
松崎 恒一 (MATSUZAKI KOICHI)  
関西医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：70278638  
  
内田 一茂 (UCHIDA KAZUSHIGE)  
関西医科大学・医学部・講師  
研究者番号：40411516
- (3) 連携研究者 なし