

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 5 月 10 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16975

研究課題名(和文)芳香族炭化水素受容体からみた自己免疫性膵炎の発症メカニズムの解明

研究課題名(英文) Administration of indigo naturalis inhibits the development of autoimmune pancreatitis through IL-22-mediated signaling pathways

研究代表者

鎌田 研 (Kamata, Ken)

近畿大学・医学部・医学部講師

研究者番号：70548495

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：芳香族炭化水素受容体(AhR)は、リガンドで活性化される転写因子で、造血系細胞および非造血系細胞に発現している。本研究では、IFN- γ とIL-33を産生する形質細胞様樹状細胞(pDC)の活性化によって引き起こされる実験的自己免疫性膵炎(AIP)の発症をAhR活性化が抑制するかどうかを検討することを試みた。インドール-3-ピルビン酸(IPA)およびインジゴ・ナチュラリス(IN)のAhR活性化は、実験的AIPの発症を抑制することが示された。また、膵島細胞によるIL-22の産生促進が認められた。さらに、プレドニゾロンにより寛解が得られた後のAIP患者において血清IL-22濃度の上昇がみられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

「AhR-IL-22経路による膵臓腺房構造の恒常性の維持」は自己免疫性膵炎に対する抑制効果を持つことが明らかとなった。本研究の成果により、基礎的にはAhRの活性化が自己免疫性膵炎の発症に果たす役割を明らかにすることができた。また、臨床的には「青黛によるAhRの活性化」を用いた自己免疫性膵炎の新規治療法の開発につながる可能性が示唆された。このように、実験的自己免疫性膵炎における申請者自らの成果に基づいて計画された本研究により、自己免疫性膵炎の病態生理の解明とその臨床応用の双方につながるという点で学術的意義や社会的意義の高い研究成果を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：Aryl hydrocarbon receptor (AhR) is a ligand-activated transcription factor expressed in hematopoietic and non-hematopoietic cells. In this study, we tried to examine whether AhR activation suppresses development of experimental autoimmune pancreatitis (AIP) caused by activation of plasmacytoid dendritic cells (pDCs) producing IFN- γ and IL-33. Experimental AIP was induced in MRL/MpJ mice by repeated injection of polyinosinic-polycytidylic acid (poly(I:C)). Activation of AhR by indole-3-pyruvic acid (IPA) and indigo naturalis (IN) in the diet inhibited development of experimental AIP, which effects were independent of activation of pDCs producing IFN- γ and IL-33. Sensing of IPA and IN by AhRs led to a robust production of IL-22 by pancreatic islet cells. Blockade of IL-22 signaling pathways completely canceled beneficial effect of AhR ligands on experimental AIP. Serum concentrations of IL-22 were elevated in patients with type 1 AIP after induction of remission by prednisolone.

研究分野：消化器病

キーワード：自己免疫性膵炎

1. 研究開始当初の背景

腸内細菌に対する免疫反応が様々な疾患の発症に関わることが明らかになった。膵臓疾患においても例外ではなく、慢性膵炎や膵癌の発症に腸内細菌に対する免疫反応が関与することが明らかになりつつある。しかしながら、「自己免疫性膵炎の発症に関わる腸内細菌叢」については明らかになっていない。最近、申請者らは腸内細菌に対する免疫反応が自己免疫性膵炎の発症に及ぼす効果について解析し、以下の事実を見出した。1) 自己免疫性膵炎の発症に伴い、腸内細菌叢が変化する。2) 腸内細菌叢の変化は形質細胞様樹状細胞 (plasmacytoid dendritic cells, pDCs)の活性化を促進する。3) 活性化された pDCs が I 型 IFN・IL-33 を産生し、慢性炎症と線維化が膵臓に誘導される。4) 活動期と寛解期における自己免疫性膵炎患者の腸内細菌叢は異なる。申請者らによる以上の結果から、腸内細菌叢の変化が pDCs の I 型 IFN・IL-33 経路を活性化し、自己免疫性膵炎の発症を促進することが明らかになった。しかしながら、自己免疫性膵炎の発症を促進あるいは抑制する腸内細菌の同定はされていない。また、腸内細菌叢の変化は細菌由来代謝産物の構成を変動させることが予測されるが、「自己免疫性膵炎と腸内細菌由来代謝産物」の関係は不明である。

AhR は腸内細菌由来代謝産物や環境因子 (ダイオキシン・タバコの煙など) を認識する転写因子であり、免疫システムの恒常性の維持に重要な役割を果たしている。AhR の活性化が自己免疫性膵炎の発症に及ぼす効果は明らかになっていない。腸内細菌叢の変化が自己免疫性膵炎の発症を促進するという申請者らの成果を踏まえ、**「腸内細菌叢の変化に伴う細菌代謝産物の構成の変化」**が AhR の活性化を介して、自己免疫性膵炎の発症に影響を及ぼすことが考えられる。

2. 研究の目的

申請者らは**「腸内細菌叢の変化に伴う細菌由来代謝産物の Profile 変化」**が AhR の活性化を介して、自己免疫性膵炎の発症を制御するのではないかと想定した。この仮説を検証した結果、以下の事実を見出した。1) AhR リガンドである 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzodioxin (TCDD)の投与あるいは Indole-3- pyruvic acid (IPA)の給餌により、自己免疫性膵炎の発症は抑制される。2) AhR リガンドの投与に伴う自己免疫性膵炎の発症は pDCs の活性化に依存しない。3) AhR リガンドの投与により、IL-22 の発現が膵臓内で著明に増加する。このように、AhR の活性化が自己免疫性膵炎の発症を抑制することを申請者らは見出したが、AhR の活性化による自己免疫性膵炎の発症抑制メカニズムは解明されていない。また、自己免疫性膵炎の発症に関わる AhR リガンドについては同定されていない。そこで、本研究では**「AhR による自己免疫性膵炎の発症抑制メカニズムの解明」と「自己免疫性膵炎の発症を制御する AhR 活性化因子の同定」**を目指すこととした。申請者らは自己免疫性膵炎の発症メカニズムについて、**「腸内細菌に対する免疫反応」**という独自の視点から解明を試みてきた。申請者らは腸内細菌叢の変化が**「pDCs における I 型 IFN・IL-33 経路」**を活性化し、自己免疫性膵炎の発症を促進することを見出した。本研究は、先行研究をさらに発展させるために計画されたものであり、自己免疫性膵炎の発症メカニズムに関わる**「腸内細菌叢の変化・細菌由来代謝産物の変化・AhR の活性化」**を解明することを目標とした。

3. 研究の方法

AhR 活性化因子・腸内細菌由来代謝産物が自己免疫性膵炎の発症に及ぼす効果を明らかにするために、自己免疫性膵炎モデルマウスと臨床検体を用いた研究を展開した。自己免疫性膵炎は MRL/MpJ マウスに Poly (I:C)を繰り返し、投与することにより誘導した。研究期間内に以下のことを明らかにした。IL-22 の産生細胞を免疫染色により同定した。さらに、IL-22 中和抗体の投与が AhR の活性化による自己免疫性膵炎の抑制を阻害するかどうかを検討した。ステロイド投与前後における自己免疫性膵炎患者の血液検体を採取し、血清 IL-22 濃度を測定し、AhR の活性化を介して、自己免疫性膵炎の発症を制御する可能性を明らかにした。

AhR リガンドは Indigo naturalis (IN), IPA および TCDD の 3 種類を用いた。臨床検体の評価に関して、慢性アルコール性膵炎患者 12 名、AIP 患者 21 名、健常対照者 8 名の血液検体を用いた。

4. 研究成果

申請者は「腸内細菌叢の乱れを感知して、活性化される形質細胞様樹状細胞(plasmacytoid dendritic cells. pDCs)」を自己免疫性膵炎の病的細胞と同定した (Kamata et al., Int Immunol 2019;31:795-809, Clin Exp Immunol 2020;202:308-20, 図 1A 参照)。pDCs は IFN- α ・IL-33 を産生し、サイトカイン依存性に膵炎の発症を誘導した AhR リガンドは腸内細菌によるトリプトファン代謝

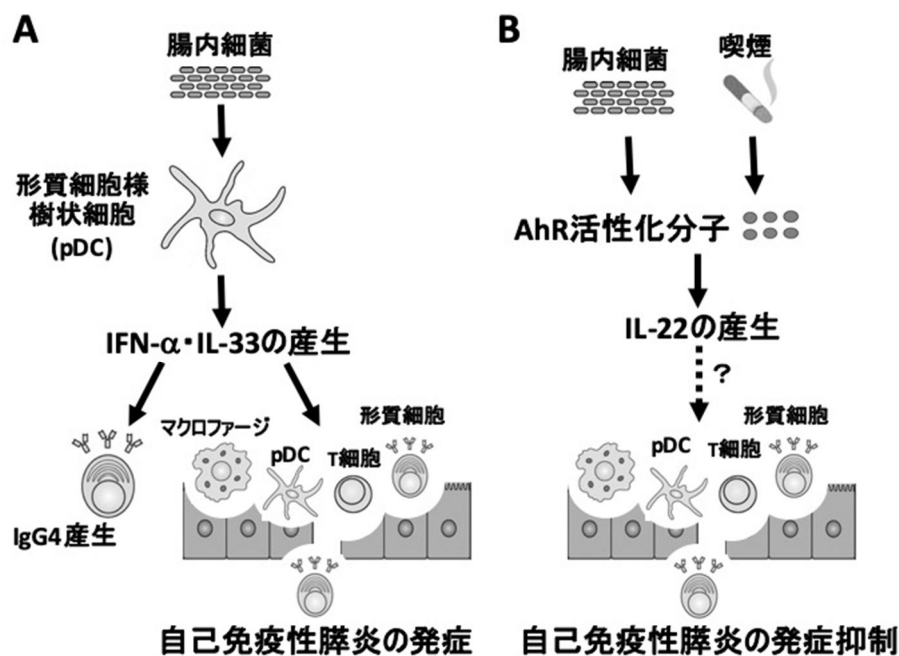


図1;自己免疫性膵炎の発症機序

種類の AhR リガンドが自己免疫性膵炎の発症を抑制することを見出した (図 1B 参照)。興味深いことに、AhR の活性化は膵島 α 細胞の産生する IL-22 依存性かつ pDCs 非依存性に自己免疫性膵炎の発症を抑制した。また、AhR の活性化により産生される IL-22 は膵臓腺房構造の恒常性の維持に関わり、炎症を抑制することも判明した。以下の結果(主に IN を AhR リガンドとして用いた実験結果を示す)に関して現在論文投稿準備中である。

(1) IN による AhR の活性化は、実験的 AIP の発症を抑制する

Poly (I:C)の注射を繰り返すと、重度の AIP を発症したが、IN を併用したマウスでは、AIP の発症が顕著に抑制された。実験的 AIP の発症は、pDC の活性化に依存しているが、今回の実験では予想外に、膵臓 pDC の割合と数は、Poly (I:C)単独で処理したマウスと Poly (I:C)と IN で共処理したマウスとで同等であった。一方、CD11b、CD11c、CD3 陽性細胞の割合および数は、Poly (I:C)と IN を併用したマウスの膵臓では、Poly (I:C)単独で処理したマウスと比較して著しく減少していた。このように、IN による AhR の活性化は、pDC 非依存的に実験的 AIP の発症を抑制することが明らかとなった。

(2) IN による実験的 AIP の抑制は、IL-22 の産生亢進と関連する

膵臓 pDC の割合と数に有意な変化がなかったことと同様に、IFN- α と IL-33 の発現は、Poly (I:C) 単独投与マウスと Poly (I:C)と IN の両方投与したマウスとで同等であった。一方、IL-13 の発現は、Poly (I:C)単独で投与したマウスの方が、はるかに高かった。また、Poly (I:C)と IN を両方投与したマウスでは、Poly (I:C)単独で投与したマウスに比べて、IL-17 の膵臓での発現が有意に高かった。さらに、Poly (I:C)と IN を両方投与したマウスでは、IL-22 の膵臓での発現が顕著であった。IL-10 に関しては両グループ間で同等であった。

Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) は、IL-22 を介するシグナル伝達経路の重要な転写因子である。Poly (I:C)および IN で共処理したマウスにおける IL-22 産生の増強と一致して、STAT3 の核転座は、これらのマウスの膵臓において顕著に見られた。アミラーゼを発現し、STAT3 の核内移行を示す acinar 細胞の数は、Poly (I:C)と IN を共投与したマウスの膵臓において、顕著に増加した。このように、IN による AhR の活性化は、実験的 AIP の発症を抑制し、その効果は IL-22 を介したシグナル伝達経路の増大を伴っていた。

(3) AhR の活性化による実験的 AIP の抑制は IL-22 に依存する

IN を介した AhR 活性化によって誘導された IL-22 が、実験的 AIP の抑制に関与しているかどうかを検証するために、IL-22 を介したシグナル伝達経路の活性化を、抗 IL-22Ab の投与によ

により合成されることから、腸内細菌叢の変化は AhR リガンドの合成量変化を介して、自己免疫性膵炎の発症を制御する可能性が考えられる。そこで、申請者は AhR の活性化が実験的自己免疫性膵炎の発症に及ぼす効果を検証した。その結果、青黛を含む 3

って中和した。実験的 AIP に対する IN の炎症抑制効果は、抗 IL-22 Ab で処理したマウスでは失われた。フローサイトメトリーによる分析により、抗 IL-22 Ab で処理したマウスでは CD3、CD11b、および CD11c 陽性細胞の膵臓への著明蓄積が確認された。このように、AhR 活性化が IL-22 依存的に実験的 AIP の発生を抑制することが示唆された。

(4) IN または IPA による AhR の活性化により、IL-22 による膵臓腺房細胞の恒常性が維持される

AIP の進行は、腺房細胞から導管様細胞への変化 (ADM) によって特徴付けられる。ADM は、amylase-Sox9 陽性細胞または amylase-cytokeratin 陽性細胞の出現にて定義される。ADM を示す細胞の数は、コントロール抗体・Poly (I:C)・IN or IPA で処理したマウスと比較して、抗 IL-22 Ab・Poly (I:C)・IN or IPA で処理したマウスの膵臓ではるかに高かった。

(5) IN または IPA による AhR 活性化にตอบสนองして、膵臓細胞は IL-22 を産生する

IL-22 は、T ヘルパー 2 型 (TH2) 細胞、TH17 細胞、自然免疫系リンパ球 2 型 (ILC2) 細胞、ILC3 細胞など様々な免疫細胞によって産生される。IL-22 陽性細胞は、Poly (I:C) で処理した場合と Poly (I:C) + IPA で処理した場合においても、TH2 細胞、TH17 細胞、ILC2 細胞、ILC3 細胞は同程度であった。一方、免疫染色においては、IL-22 の発現は、膵ランゲルハンス島の細胞にて発現が増強していることが判明した。

(6) AIP 患者において、プレドニゾンによる寛解導入後、血清中の IL-22 濃度が上昇する

AIP 患者における IL-22 の臨床的な関連性を検討した。血清中 IL-22 濃度は、AIP の患者と比較して CP の患者で高かった。血清中の IL-22 濃度は、寛解導入に成功した AIP 患者で顕著に増加した。AIP 患者における IL-22 血清濃度は、IgG または IgG4 血清濃度と相関は認められなかった。IFN-と IL-33 の血清濃度に関しても同様に相関は認められなかった。これらのデータは、IL-22 が AIP 患者の寛解導入後に増加することを示唆しており、AhR の活性化によって誘導される IL-22 が AIP 患者において膵を保護する役割を果たしている可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
---------	---------