

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 7日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590878

研究課題名（和文）アルコール性膵炎発症における自然免疫の関与と喫煙の影響の解明

研究課題名（英文）Role of innate immunity and influence of smoking in the Pathogenesis of alcoholic 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

研究成果の概要（和文）：アルコール性膵炎の発症機序を解明するためにマウス膵炎モデルを解析した。エタノール投与に加えてリポポリサッカライドを負荷することで膵炎が発症したが、発症には自然免疫に加えて獲得免疫の関与が必須であった。喫煙は膵炎の程度を増悪させた。内因性抗酸化物質の誘導により膵炎の軽減が認められ、抗酸化治療が有効な治療法となる可能性を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：To clarify the pathogenesis of alcoholic pancreatitis, we created a murine model induced by administration of ethanol and lipopolysaccharide and analyzed the role of innate and acquired immunity in the disease. Participation of acquired immunity was indispensable for the development of ethanol-induced pancreatitis. Smoking aggravated the disease. Induction of endogenous antioxidants ameliorated pancreatitis, suggesting the usefulness of antioxidant therapy for the treatment of alcoholic pancreatitis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：慢性膵炎、アルコール、エンドトキシン、自然免疫、toll-like receptor、サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

慢性膵炎は、急性膵炎様の発作を繰り返しながら膵組織の破壊・脱落が非可逆性に進行する疾患で、長期にわたる経過により実質の荒廃による内・外分泌不全と膵全体におよぶ高度な線維化をきたし、悪性腫瘍の合併や糖尿病の慢性合併症、感染により死亡率は高い。慢性膵炎の成因としてアル

コール性が半数以上を占め、アルコールの消費量と慢性膵炎の発症頻度には相関がみられる。わが国のアルコール消費量は欧米諸国と比べると少ないが、日本人の約半数はアルコール代謝能力が低い人種の特徴を有しており、その消費量は相対的にかなり多いと考えられる。アルコール性慢性膵炎患者は年々増加しているが、大酒家におい

ても慢性膵炎を発症するものは数%~10%程度であり、飲酒のみでその発症機序を説明することは困難である。

近年、慢性のアルコール摂取により腸管壁の透過性が亢進し、エンドトキシン血症が生じることが明らかにされ、アルコール性膵炎の引き金となる可能性が指摘されている。エンドトキシンの主体であるリポポリサッカライド(LPS)値が健常人に比べ飲酒者で有意に高いことが報告されており、動物実験でもアルコールを長期間投与したラットにLPSを投与すると膵炎が発症する。LPSは自然免疫の受容体である toll-like receptor (TLR) 4のリガンドであり、アルコール摂取により膵炎発症の閾値が低下した状態に、自然免疫を介した二次刺激が加わり膵炎が発症する可能性が推測される。しかし、ウイルス感染や細菌由来のDNA刺激などによるTLRを介した自然免疫系の活性化が膵炎発症を促進させるのか、自然免疫系に加え獲得免疫系が膵炎発症にどのように関与するか、については十分に検討されていない。

疫学的検討では、飲酒と喫煙がそれぞれ独立した慢性膵炎の危険因子とされており、喫煙の程度と膵炎発症が相関することも知られている。しかし、アルコール性膵炎発症における喫煙の影響の検討は疫学的研究にとどまり、動物実験レベルで膵炎発症に及ぼす喫煙の影響を膵における自然免疫の活性化の観点から詳細に検討した報告はない。

アルコール摂取により膵組織は酸化ストレスに曝されるため、アルコール性膵炎に対して抗酸化物質による治療が試みられてきた。チオレドキシシン(TRX)は酸化還元反応制御作用を示す内因性蛋白で、抗酸化作用に加えて炎症局所への好中球やリンパ球浸潤の抑制作用も有する。これまで我々は、マウス重症膵炎および慢性膵炎モデルにおいて、TRX投与による膵炎改善効果を明らかにした。アルコール性膵炎は長期経過をたどるため、TRXや熱ストレス蛋白(HSP)のような内因性の抗酸化、抗炎症物質の産生を誘導できれば、膵炎治療につながる可能性がある。

2. 研究の目的

マウスモデルを用いてアルコール性膵炎の病態解析を行い、膵炎発症における自然免疫、獲得免疫の関与を検討した。さらに、喫煙が膵炎発症に及ぼす影響を検討するとともに、膵炎マウスに内因性抗膵炎物質の誘導を試みて臨床応用の可能性を検討した。

3. 研究の方法

(1) 我々が作製したアルコールとLPS投与により膵炎を発症するマウスモデルを用いて膵炎発症における自然免疫と獲得免疫の関与について検討した。8週齢の野生型

C57BL/6 マウスにアルコールを自由飲水させながら、各種TLRリガンド(poly I:C、LPS、ペプチドグリカン)およびリン酸緩衝生理食塩水(PBS)を週2回投与して膵炎を発症させた。マウスを経時的に脱血死させて血清膵酵素測定を行い、組織学的な膵炎の程度を重症度スコアで評価した。膵浸潤炎症細胞の状態について、CD4、CD8、B220、GR-1、CD11b、CD11cに対する抗体を使用して免疫組織学的に検討を行った。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-1 β 、IL-6、TNF- α 、IL-10など)産生をマルチビーズサスペンションアレイ法で測定した。SCIDマウスにアルコールとLPSを投与し、T細胞およびB細胞が欠如した状態での膵炎発症について検討した。さらSCIDマウスに正常マウス由来の脾細胞、CD4およびCD8T細胞を移入して免疫系を再構築したのち、エタノールとLPSを投与して膵炎発症に及ぼす獲得免疫系の関与について検討した。さらに、インターロイキン10(IL-10)欠損マウスにアルコールを摂取させ、IL-10欠損が膵炎発生に及ぼす影響についても検討した。

(2) アルコール膵炎マウスにタバコ煙による刺激を負荷して、膵炎の発症とその重症度の変化を解析し、アルコール性膵炎発症に及ぼす喫煙の影響を検討した。野生型マウスにアルコール単独投与ないしアルコールとLPSの投与を行い、タバコ煙発生装置により発生させたタバコ煙による1時間の喫煙刺激を週5日間連続して4週間行い、膵炎の発症およびその程度について検討を行った。

(3) TRXによるアルコール性膵炎の改善効果を検討するとともに、内因性TRXおよびHSP誘導剤である geranylgeranylacetone (GGA)の治療効果について検討した。野生型マウスにエタノールとLPSを投与し、LPS投与毎にリコンビナントTRX(5mg/kg)を腹腔内投与し、4週間後の膵炎の程度を重症度スコアで評価した。内因性TRXおよびHSP誘導による治療効果を検討するために、野生型マウスにエタノールとLPSを投与し、初回LPS投与前日よりGGAを連日50-500mg/kg経口投与した。4週間後の膵炎の程度を重症度スコアで評価し、膵組織における内因性TRXおよびHSPの誘導をウエスタンブロットで検討した。

4. 研究成果

(1) 野生型マウスに20%エタノールを自由飲水させ、LPSを週2回腹腔内投与することにより膵炎が発症し、LPS投与回数の増加に伴い膵炎の程度が増強した。LPS(TLR4リガンド)に加えて、エタノール投与と併行してTLR2リガンド(ペプチドグリカン)やTLR3リガンド(poly I:C)投与を行ったが膵炎は発症せず、アルコール性膵炎発症におけるTLR4刺激の重要性が示された。膵の免疫組織

学的検討では膵腺房間質を含めて全体に Gr-1 陽性好中球浸潤が著明で、膵管周囲を中心に CD4T 細胞、CD8T 細胞、B220 陽性 B 細胞の浸潤も認められた。血清サイトカインの解析結果では、エタノール/LPS 併用投与群では、LPS 単独投与群と比べ、炎症性サイトカインである IL-1 β 、TNF- α がより増加していたが、抗炎症性サイトカイン IL-10 の増加は LPS 単独投与群に比べ軽度であった。膵炎発症抑制における IL-10 の役割を検討するため IL-10 欠損マウスにエタノールを投与したが膵炎の発症はみられず、LPS 投与により引き起こされる炎症性サイトカインの増加と抗炎症性サイトカインの不均衡状態の程度が膵炎発症に関与している可能性が推測された。さらに、T 細胞、B 細胞を欠損した SCID マウスにエタノール/LPS 投与を行ったが、野生型マウスとは異なり膵炎は発症せず、アルコール性膵炎発症に自然免疫系の刺激に加えて獲得免疫の活性化が重要と考えられた。以上の結果より自然免疫の過剰刺激がサイトカインの不均衡をもたらし、獲得免疫の活性化を介して膵炎発症に至る可能性が示された。

(2) SCIDマウスに正常マウス脾臓細胞、CD4T 細胞分画、CD8T細胞分画を各々移入後、エタノール/LPS投与を行い膵炎の発症における獲得免疫の関与について検討した結果、正常マウス脾臓細胞を移入したSCIDマウスで膵炎の程度が最も強く、次いでCD4T細胞移入マウス、CD8T細胞移入マウスの順であった。以上の結果より、本膵炎モデルマウスにおいて膵炎発症には獲得免疫系の存在が必須であることに加えて、CD4T細胞とCD8T細胞の両者が膵炎発症に関与していることが示された。

(3) 膵炎動物実験モデルに喫煙刺激を負荷した実験では、組織学的スコアでは有意差は見られなかったもののコントロール群と比較して膵炎の増強が認められ、喫煙がアルコール性膵炎を増悪させることが示唆された。

(4) 膵炎を誘導する際にTRXを連日投与したマウスでは膵炎の軽減が認められた。TRXとHSP70を誘導するgeranylgeranylacetoneを経口投与したマウスでも膵炎の軽減がみられ、膵組織でTRXとHSP70の誘導が確認された。以上よりアルコール性膵炎では抗酸化治療が有効な治療法となりうることを示された。

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)

- ① Uchida K, Kusuda T, Nishio A (15 名、14 番目). Regulatory T cells in type 1 autoimmune pancreatitis. *Int J*

- Rheumatol. 2012;2012:795026. 査読有
- ② Nakajima A, Fukui T, Nishio A (12 名、10 番目). Attenuation of indomethacin-induced gastric mucosal injury by prophylactic administration of sake yeast-derived thioredoxin. *J Gastroenterol*. 2012 (in press) 査読有
- ③ Hoshino S, Kurishima A, Nishio A (15 名、7 番目). Amelioration of 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in mice by immunoregulatory dendritic cells. *J Gastroenterol*. 2011;46:1368-81. 査読有
- ④ Okazaki K, Uchida K, Nishio A (6 名、6 番目). Recent Concepts of Autoimmune Pancreatitis and IgG4-Related Disease. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2011;41:126-38. 査読有
- ⑤ Tomiyama T, Uchida K, Nishio A (8 名、7 番目). 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
- ⑥ Fukui T, Kishimoto M, Nishio A (12 名、10 番目). The specific linker phosphorylation of Smad2/3 indicates epithelial stem cells in stomach; particularly increasing in mucosae of Helicobacter-associated gastritis. *J Gastroenterol*. 2011;46:456-68. 査読有
- ⑦ Nishio A, Asada M, Uchida K (6 名、1 番目). The role of innate immunity in the pathogenesis of experimental autoimmune pancreatitis in mice. *Pancreas*. 2011;40:95-102. 査読有
- ⑧ Kusuda T, Uchida K, Nishio A (17 名、14 番目). Idiopathic duct-centric pancreatitis (IDCP) with immunological studies. *Intern Med*. 2010;49:2569-75. 査読有
- ⑨ Okazaki K, Uchida K, Nishio A (5 名、5 番目). Autoimmune pancreatitis—a new evolving pancreatic disease? *Langenbecks Arch Surg*. 2010;395:989-1000. 査読有
- ⑩ Koyabu M, Uchida K, Nishio A (12 名、9 番目). Analysis of regulatory T cells and IgG4-positive plasma cells among patients of IgG4-related sclerosing cholangitis and autoimmune

liver diseases. J Gastroenterol. 2010;45:732-41. 査読有

- ⑪ Koyabu M, Uchida K, Nishio A (15名、14番目). Primary sclerosing cholangitis with elevated serum IgG4 levels and/or infiltration of abundant IgG4-positive plasma cells. J Gastroenterol. 2010;45:122-9. 査読有
- ⑫ Matsushita M, Fukui T, Nishio A (5名、4番目). Atypical retroperitoneal fibrosis associated with biliary stricture: IgG4-related sclerosing disease? Scand J Gastroenterol. 2009;44:1146-7. 査読有

〔学会発表〕(計12件)

- ① Akiyoshi Nishio. The role of innate immunity in the pathogenesis of alcoholic pancreatitis in mice. 42nd Annual Meeting of the American Pancreatic Association 2011年11月5日 米国 シカゴ
- ② Shinji Nakayama. The participation of innate and acquired immunity of alcoholic chronic pancreatitis. 6th International Symposium on Alcoholic Liver and Pancreatic Diseases and Cirrhosis 2011年10月21日 福岡
- ③ Takeo Kusuda. Involvement of ICOS and IL-10 positive regulatory T cells in the development of IgG4-related autoimmune pancreatitis. 112th Annual Meeting of the American Gastroenterological Association 2011年5月9日 米国 シカゴ
- ④ Shinji Nakayama. The participation of innate and acquired immunity of alcoholic chronic pancreatitis. 112th Annual Meeting of the American Gastroenterological Association 2011年度5月8日 米国 シカゴ
- ⑤ Akiyoshi Nishio. Cytokine imbalance induces autoimmune pancreatitis in mice. Joint Conference of the International Association of Pancreatology & the Indian Pancreas Club 2011年2月11日 インド コチン
- ⑥ Akiyoshi Nishio. The role of innate immunity in the pathogenesis of experimental autoimmune pancreatitis in mice. 2010 American Pancreatic Association Meeting 2010年11月5日 米国 ボストン
- ⑦ Masao Yamashina. Analysis of extrapancreatic lesions associated with murine autoimmune pancreatitis.

18th United European Gastroenterology Week 2010年10月25日 スペイン バルセロナ

- ⑧ Kazushige Uchida. 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年7月13日 福岡
- ⑨ Masao Yamashina. Characterization of cholangitis associated with experimental autoimmune pancreatitis in mice. 111th Annual Meeting of the American Gastroenterological Association 2010年5月4日 米国 ニューオーリンズ
- ⑩ Akiyoshi Nishio. Characterization of cholangitis associated with experimental autoimmune pancreatitis in mice. United European Gastroenterology Week/World Congress Gastroenterology Gastro 2009年11月24日 英国 ロンドン
- ⑪ 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
- ⑫ 内田一茂. 自己免疫性膵炎における制御性T細胞とIgG4に関する研究. 第46回日本消化器免疫学会総会 2009年7月23日 松山

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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし