

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 25 年 2 月 18 日現在

機関番号：34417  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2009～2011  
 課題番号：21790689  
 研究課題名（和文） 自己免疫性膵炎モデルにおける全身性硬化病変の免疫学的研究  
 研究課題名（英文） Immunological Study of Autoimmune Extrapancreatic Exocrinopathy In Autoimmune Pancreatitis Animal Model  
 研究代表者 坂口雄沢（SAKAGUCHI YUTAKU）  
 関西医科大学 医学部 助教  
 研究者番号：60340692

研究成果の概要（和文）：WBN/Kob ラットにおける多臓器障害病変は Th1/Th2 および Treg の活性化やこれらが産生する IL-4、IL-10 によって IgG2b へのクラススイッチが促進されると考えられ、WBN/Kob の病態形成および進展に関与していることが示唆された。  
 研究成果の概要（英文）：The activation of Th1/Th2 and regulatory T cell, produced IL-4, IL-10 that promoting the class switch to IgG2b. It suggested the involvement with the morbidity and aggravation in WBN/Kob rats.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	800,000	240,000	1040,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,200,000	660,000	2,860,000

研究分野：

科研費の分科・細目：医歯薬学 内科系臨床医学 消化器内科学

キーワード：①自己免疫性膵炎②制御性 T 細胞③全身性硬化病変 ④Th-17 ⑤WBN/Kob

1. 研究開始当初の背景

自己免疫性膵炎は高γグロブリン血症、高 IgG 血症や自己抗体の存在、ステロイド療法が有効など、自己免疫機序の関与を示唆する所見を伴う膵炎と定義されている。形態学的にはびまん性膵腫大や膵管狭細像を示す症例が多数を占め、膵癌や胆管癌などの腫瘍性病変との鑑別が極めて重要である。しばしば、膵外病変としての硬化性胆管炎、Sjogren 症候群類似の唾液腺炎、後腹膜線維症、甲状腺炎、腎炎などが合併し、一連の病変として考えられつつある。主要血液学的所見として、高γグロブリン血症、高 IgG 血症を認めることが多い。特に IgG のサブクラスである IgG4 の高値が本症に特徴的であることなど、その疾患概念は広く認識されつつあり膵炎、涙腺炎、唾液腺炎、甲状腺炎、間質性肺炎、間質

性腎炎、後腹膜線維症など様々な臓器の単核球や形質細胞を特徴とする自己免疫性症候群を systematic IgG4-related plasmacytic syndrome (SIPS) として統一的に解釈する考え方がある。  
 申請者らは WBN/Kob ラットは自己免疫機序の破綻に伴う多臓器障害性の自己免疫疾患モデルであることを見出した。興味深い点としてこのラットにおける全身性病変に関して Treg の関与も示唆され、このモデルは自己免疫性膵炎のみならず、自己免疫性膵炎の膵外病変とされている諸臓器の炎症性疾患（慢性甲状腺炎、腎炎、硬化性胆管炎等）を含めた全身性硬化性疾患の成因・機序の解明に寄与するものと考えられる。

## 2. 研究の目的

自己免疫性膵炎について解析が進む中、他臓器 IgG4 関連疾患についても臓器障害が全身にわたることより、多分野にわたってその機序や診断基準について議論が行われており、研究も進められている。その中で今回申請者の研究により、あらたな臓器障害の可能性と動物モデルの確立が可能となり、今後の研究の幅が広がり、機序の解明にも有効と考える。またヒト (IgG4 関連疾患)、疾患モデルラット (IgG2b 関連疾患) のいずれも Ig の増加が認められることは免疫応答における調節異常を推測させるものであり、またヘルパーT細胞サブセット (Th1、Th2、炎症誘導性 Th17) や制御性 T 細胞 (Treg) の解析は自己免疫性膵炎、IgG4 関連疾患の病因解明に寄与し、将来的に診断基準や治療方針にも結びつくことが考えられ本研究の意義は大きいと考えられこの点を鑑みて本研究課題を申請した。

## 3. 研究の方法

- ①ラットを2ヶ月令より雄性、雌性3匹ずつ一ヶ月間隔でELISAキットを用いて血清学的検査を行い、高IgG2b血症や肝機能・腎機能・甲状腺機能を測定する。
- ②膵臓、肝臓、腎臓、甲状腺、その他の組織を採取しHE染色を行い病理組織学的に障害の有無と程度を検討する。炎症細胞浸潤がみられれば、蛍光標識抗IgG2b抗体・抗CD4/CD8抗体、抗B220抗体を用いて免疫組織染色を行い、浸潤している細胞の種類を同定する。
- ③同時に臓器内における炎症細胞の発現マーカー (IgG2b, CD4, CD8, B220, Foxp3, icos) 細胞内サイトカイン (IL-4, IL-12, IL-10, TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ ) を蛍光多重染色にて同定確認する。
- ④末梢血中およびリンパ系器官におけるヘルパーT細胞サブセット (Th1、Th2、炎症誘導性 Th17) や制御性 T 細胞 (Treg) の頻度を解析する。Th1、Th2、炎症誘導性 Th17 の解析は抗 CD4 抗体による膜表面染色後、細胞内 IL-2、IFN- $\gamma$  の染色により Th1 を、細胞内 IL-4、IL-10 の染色により Th2 を、また細胞内 IL-17 の染色により Th17 を検出する。Treg は抗 CD4 抗体による膜表面染色後、細胞内 Foxp3 の染色により同定する。また Treg、Th17 にそれぞれ特有なマスターレギュレーターである Foxp3、ROR- $\gamma$ t の発現をリアルタイム RT-PCR により確認する。

## 4. 研究成果

- ①WBN/Kob ラットを2ヶ月令より雄性、雌性一ヶ月間隔でELISAを用いて血清学的検査を行ったところ、2ヶ月齢より高IgG2b血症、6ヶ月齢から甲状腺機能障害を認め、10ヶ月齢より肝機能障害・腎機能障害が出現した。
- ②膵臓、肝臓、腎臓、甲状腺の組織を採取し

HE染色を行ったところ、いずれの臓器においてもリンパ球を中心とした炎症細胞浸潤を認め、膵臓腺房細胞変性・肝門脈域線維化・腎間質線維化・甲状腺濾胞の破壊を病理組織学的に認めた。それぞれの障害臓器においては抗IgG2b抗体沈着を認め、病期によってCD8優位(Th1)からCD4優位(Th2)へと変遷していた。また後期病期においては抗B220抗体陽性B細胞浸潤も目立った。

③同時に臓器内における炎症細胞の発現マーカー (IgG2b, CD4, CD8, B220, Foxp3, icos) 細胞内サイトカイン (IL-4, IL-12, IL-10, TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ ) を蛍光多重染色にて同定確認したところ、Th1からTh2へ炎症バランスが変化しておりTregの発現も亢進していた。さらにIL-10とIgG2bの産生に正の相関が認められた。

以上よりWBN/Kobラットにおける多臓器障害病変はTh1/Th2およびTregの活性化やこれらが産生するIL-4、IL-10によってIgG2bへのクラススイッチが促進されると考えられ、WBN/Kobの病態形成および進展に関与してい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9件)

- ① Attenuation of indomethacin-induced gastric mucosal injury by prophylactic administration of sake yeast-derived thioredoxin. *J Gastroenterol.* 査読有 2012 Sep;47(9):978-87. Nakajima A, Fukui T, Takahashi Y, Kishimoto M, Yamashina M, Nakayama S, Sakaguchi Y, Yoshida K, Uchida K, Nishio A, Yodoi J, Okazaki K
- ② The similarity of Type 1 autoimmune pancreatitis to pancreatic ductal adenocarcinoma with significant IgG4-positive plasma cell infiltration. *J Gastroenterol.* 査読有 2012 Oct 5. Fukui Y, Uchida K, Sumimoto K, Kusuda T, Miyoshi H, Koyabu M, Ikeura T, Sakaguchi Y, Shimatani M, Fukui T, Matsushita M, Takaoka M, Nishio A, Shikata N, Sakaida N, Uemura Y, Satoi S, Kwon AH, Okazaki K.
- ③ Dilatation of the Bile and Pancreatic Ducts due to Compression by an Unruptured Abdominal Aortic Aneurysm (AAA): A Case Ameliorated by an Endovascular Stent Grafting. *Intern Med.* 査読有 2012;51(19):2749-52. Fukui T, Suzuki R, Sakaguchi Y, Shibatani N, Hachimine D, Uchida K, Nishio A, Seki T, Okazaki K.
- ④ Regulatory T cells in type 1 autoimmune pancreatitis. *Int J Rheumatol.* 査読有

2012;2012:795026. Uchida K, Kusuda T, Koyabu M, Miyoshi H, Fukata N, Sumimoto K, Fukui Y, Sakaguchi Y, Ikeura T, Shimatani M, Fukui T, Matsushita M, Takaoka M, Nishio A, Okazaki K.

⑤ The specific linker phosphorylation of Smad2/3 indicates epithelial stem cells in stomach; particularly increasing in mucosae of Helicobacter-associated gastritis. J Gastroenterol. 査読有 2011 Apr;46(4):456-68. Fukui T, Kishimoto M, Nakajima A, Yamashina M, Nakayama S, Kusuda T, Sakaguchi Y, Yoshida K, Uchida K, Nishio A, Matsuzaki K, Okazaki K.

⑥ Analysis of regulatory T cells and IgG4-positive plasma cells among patients of IgG4-related sclerosing cholangitis and autoimmune liver diseases. J Gastroenterol. 査読有 2010 Jul;45(7)

:732-41. Koyabu M, Uchida K, Miyoshi H, Sakaguchi Y, Fukui T, Ikeda H, Takaoka M, Hirohara J, Nishio A, Uemura Y, Uemoto S, Okazaki K.

⑦ Primary sclerosing cholangitis with elevated serum IgG4 levels and/or infiltration of abundant IgG4-positive plasma cells. J Gastroenterol. 査読有 2010;45(1):122-9. 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.

⑧ Idiopathic duct-centric pancreatitis (IDCP) with immunological studies. Intern Med. 査読有 2010;49(23):2569-75. 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.

⑨ Long-term outcome of autoimmune pancreatitis. J Gastroenterol. 査読有 Uchida K, Yazumi S, Nishio A, Kusuda T, Koyabu M, Fukata M, Miyoshi H, Sakaguchi Y, Fukui T, Matsushita M, Takaoka M, Okazaki K. 2009;44(7):726-32.

[学会発表] (計2件)

① Y Sakaguchi, T Kusuda, M Koyabu, M Fukata, H Miyoshi, T Fukui, K Uchida, M Matsushita, M Takaoka, A Nishio, K Okazaki AN ANIMAL MODEL FOR ACUTE, CHRONIC, AND SEVERE PANCREATITIS WITH THE ANALYSES OF REGENERATION MECHANISMS. 40th Anniversary Joint Meeting of the American Pancreatic Association & Japan Pancreas Society

2009/11/07 Honolulu, USA  
② 坂口雄沢、深田憲将、三好秀明、楠田武生、福井寿朗、内田一茂、西尾彰功、岡崎和一 WBN/Kob ラットの慢性膵炎・膵外病変における自己免疫性機序の関与及び制御性T細胞の免疫応答 第95回日本消化器病学会総会 2009/05/08 北海道 京王プラザホテル札幌

○出願状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：なし

○取得状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等  
なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

坂口雄沢 (SAKAGUCHI YUTAKU)  
関西医科大学 医学部 助教  
研究者番号：60340692