

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2011～2015

課題番号：23590522

研究課題名(和文) 自己免疫性膵炎の発症機序と、細菌が誘導する自然免疫賦活の関与の検討

研究課題名(英文) Study of the pathogenesis of autoimmune pancreatitis and, the relation to activation of innate immunity induced by bacteria

研究代表者

春田 郁子 (HARUTA, Ikuko)

東京女子医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80221513

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：自己免疫性膵炎(AIP)の病因に、細菌関連物質が関与するというモデルを樹立した。C57BL/6マウス腹腔内にEscherichia coli投与で、膵にAIP様炎症と高 γ -globulin血症、各種自己抗体の産生を来す。血清中でヒトIgG4に相当するマウスIgG1が上昇した。E. coli外膜のライセイトを二次元電気泳動し、E. coli投与マウスの血清のみと反応したスポットをTOF/MSで解析し、FliC蛋白を同定した。AIP患者血清はE. coli-FliC蛋白と高反応性を示したことから、AIPの新たな診断マーカーになり得る可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We previously established a mouse model of AIP using chronic exposure to a commensal bacteria, Escherichia coli, leading to pancreatic inflammation, and elevation in IgG and IgG1 in serum and detection of anti-lactoferrin and anticarbonic anhydrase-II. The outer membrane fractions of E. coli were subjected to two-dimensional gel electrophoresis followed by immunoblotting against sera from the AIP model. One representative immunoreactive spot was determined using TOF/MS and Mascot search as FliC. Sera from patients with AIP had a significantly higher antibody titer. Therefore, we are underway to clarify the possibility of a new diagnostic value of anti FliC-Ab titer.

研究分野：免疫学、消化器内科学

キーワード：自己免疫性膵炎 IgG4関連疾患 自然免疫 FliC 自己免疫疾患 制御性T細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 自己免疫性膵炎 (autoimmune Pancreatitis: AIP)の動物モデルのなかで、微生物の分子パターンとの関連性については、MRL/Mp マウスへの poly I:C 投与による spontaneous な膵炎発症の促進 (Pancreas. 2010;39:224-231)、IL-10^{-/-}マウスへの poly I:C、lipopolysaccharide (LPS) 投与による膵炎の誘導 (Pancreas. 2011;40:95-102) が挙げられる。さらに、AIP 患者の B 細胞の IgG4 産生を各種 TLR や nucleotide oligomerization domain (NOD)-2 のリガンド刺激が増強する結果が報告されている (Arthritis Rheum. 2012;64:914-924)。しかし、微生物感染による自然免疫賦活が AIP を誘導する機構は、不明である。

(2) 我々は *Escherichia coli* の反復投与により、AIP と極めて類似した膵病変や自己抗体を産生するモデルマウスを樹立している。AIP 患者の発症、重症度との関係は不明である。

(3) AIP は、IgG4 関連疾患 (IgG4-RD) の膵病変であるという考え方が定着しつつあった。

2. 研究の目的

(1) 我々の樹立した AIP モデルである *E. coli* 長期投与マウス膵臓の炎症を細胞レベルで詳細に解析し、自己免疫、獲得免疫の誘導の内容について解明する。

(2) 膵臓外病変を調べ IgG4 関連疾患のモデルになり得るか明らかにする。

(3) *E. coli* ないし AIP モデルマウスの膵臓ライセイトから AIP モデルマウスの血清中に誘導される抗体と反応する成分を検出し、AIP 発症の病原因子ないし自己の標的抗原を明らかにする。

(4) AIP モデルマウスの病原因子に対する抗体価への変動を AIP 患者で調べ、診断への応用を目指す。

3. 研究の方法

(1) C57BL/6 マウスに *E. coli* を反復投与し膵臓、唾液腺、涙腺、腎臓などの浸潤細胞の種類、線維化などを免疫組織学的ないし組織学的に検索する。

(2) AIP モデルマウスの血中の各種自己抗体、各種サイトカイン、イムノグロブリンのクラス、サブクラスの誘導を Elisa 法にて明らかにする。

(3) AIP モデルマウスの脾細胞ないし CD4 陽性細胞を RAG2^{-/-}マウスないし TCRβδ^{-/-}マウスに移入し、膵臓、唾液腺、涙腺、腎臓の炎症像や浸潤細胞の種類を調べる。

(4) AIP マウスモデルの病原因子を特定するために、*E. coli* の外膜画分を二次元電気泳動にて分離した後、ウェスタン・ブロッティング法にて AIP マウス血清を反応させる。検出されたスポットを切り出し、MALDI TOF/MS および Mascot search にて同定する。AIP マウス血清と反応した大腸菌蛋白のリコンビナント蛋白を発現させ精製する。そのリコンビナント蛋白を C57BL/6 マウスの腹腔内へ投与し、AIP 様所見の再現性を検討する。さらに AIP モデルマウスの膵臓のライセイトと AIP マウス血清と反応させ、自己の標的抗原の同定を目指す。

(5) *E. coli* の AIP 誘導ドメインを分子生物学的手法により、FliC の全長と各種ドメインのリコンビナント蛋白を作成し、AIP 誘導能を調べることで FliC と自然免疫系との相互作用を明らかにする。

(6) (4)より得られた病原因子 FliC に対する AIP 患者の抗体価を Elisa 法にて測定する。比較として AIP 以外の膵疾患、脾臓疾患 free コントロールを用いる。

4. 研究成果

IgG4-RD の膵病変である AIP のモデルを作成し検討を行った。C57BL/9 マウス腹腔内に *E.*

coli を投与すると AIP 様の、膵管周囲を中心として高度の線維化を伴う限局性の炎症高 IgG 血症、ヒト IgG4 に相当するマウス IgG1 の上昇、抗 lactoferrin 抗体、抗 carbonic anhydrase-II 抗体の産生などを来し、マウス血清で AIP で高頻度に見られる高 IgE 血症も観察された。*E. coli* 投与マウスをドナーとして脾細胞を naive RAG2^{-/-}マウスに移入すると RAG2^{-/-}マウスの膵臓に AIP 様炎症が生じ、浸潤細胞は CD3 陽性ドナー由来細胞であった。この *E. coli* 反復投与マウスの脾細胞から分離した CD4⁺T 細胞を TCRβδ^{-/-}マウスに移入するとレシピエントマウスに AIP 様の膵病変を来した。*E. coli* 投与マウスは AIP と同じく、膵組織で CD4⁺Foxp3⁺T 細胞の染色性が増し、病態に Treg の関与が示唆された。膵の炎症部は高度の線維化を来しコラーゲン、ファイブロネクチン、TGFβ などの染色性が増した。さらに *E. coli* 投与マウスで IgG4-RD で炎症を来することが報告されている唾液腺・涙腺・腎臓などに高頻度に炎症が生じた。また、AIP の原因となり得る *E. coli* の病原因子の特定に成功した。*E. coli* 外膜のライセイトを二次元電気泳動し、これをトランスファーして *E. coli* 又は PBS 投与マウスの血清と反応させ、*E. coli* 投与マウス血清を用いた western blot より *E. coli* 投与マウスの血清のみと反応した spots を切り出して TOF/MS および Mascot search で解析し *E. coli* の FliC との反応性を見出した。この FliC のリコンビナント蛋白(rFliC)を作成し前述と同様の投与実験を行い、AIP 様の膵病変(図 1) および唾液腺の炎症、自己抗体産生の誘導に成功した。さらに FliC の wild type と hyperviable domain 部のリコンビナント蛋白を作成し、マウスに前述と同様の投与実験を行い、AIP 様の膵組織所見と抗体産生を検討中である。また AIP 患者血清は rFliC に対して高反応性を示し、新たな診断システムの開発の可能性を得た。以上により AIP ないし

IgG4 関連疾患が常在菌の感染により誘導される可能性が強く示唆された。

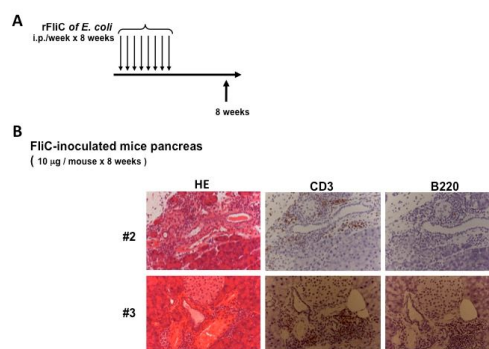


図1 FliC反復投与による膵病変 (H&E 染色) A; *E. coli* 死菌ないしリコンビナント rFliC 蛋白を 8 週連続投与し、8 週後にマウスを犠牲死させ、各種免疫応答や炎症反応について解析した。

B; FliC 投与マウスの脾組織像。H&E 染色、抗 CD3 抗体および B220 抗体を用いた代表的な免疫組織染色像を 2 匹のマウスについて示した。

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 10 件)

YANAGISAWA Naoko, HARUTA Ikuko, SHIMIZU Kyoko, FURUKAWA Toru, HIGUCHI Tomoaki, SHIBATA Noriyuki, SHIRATORI Keiko, YAGI Junji, Identification of commensal flora-associated antigen as a pathogenetic factor of autoimmune pancreatitis, *Pancreatology*, 査読有, 14, 2014, 100-106 ISSN: 14243903/14243911

春田郁子、清水京子、古川徹、柳沢直子、八木淳二、白鳥敬子、自己免疫性膵炎と共生細菌、膵臓、査読有、29、2014、59-66 ISSN:09130071

HARUTA Ikuko, SHIMIZU Kyoko,

YANAGISAWA Naoko, SHIRATORI Keiko, YAGI Junji, Commensal flora, is it an unwelcomed companion as a triggering factor of autoimmune pancreatitis?, *Frontiers in Physiology*, 査読有, 3(Article 77), 2012, 1-8 DOI: 10.3389/fphys.2012.00077.

ABE Yoshihiro, HARUTA Ikuko, YANAGISAWA Naoko, YAGI Junji, Mouse monoclonal antibody specific for outer membrane protein A of Escherichia coli, *Monoclonal antibodies in immunodiagnosis and immunotherapy*, 査読有, 32(1), 2013, 32-35 DOI: 10.1089/mab.2012.0069

HARUTA Ikuko, KIKUCHI Ken, NAKAMURA Minoru, HIROTA Katsuhiko, KATO Hidehito, MIYAKAWA Hiroshi, SHIBATA Noriyuki, MIYAKE Yoichiro, HASHIMOTO Etsuko, SHIRATORI Keiko, YAGI Junji, Involvement of commensal bacteria may lead to dysregulated inflammatory and autoimmune responses in a mouse model for chronic nonsuppurative cholangitis, *Journal of clinical immunology*, 査読有, 32(5), 2012, 1026-1037 DOI: 10.1007/s10875-012-9712-1.

YANAGISAWA Naoko, HARUTA Ikuko, KIKUCHI Ken, SHIBATA Noriyuki, YAGI Junji, Are dysregulated inflammatory responses to commensal bacteria involved in the pathogenesis of hepatobiliary-pancreatic autoimmune disease? An analysis using mice models of primary biliary cirrhosis and autoimmune pancreatitis, *ISRN Gastroenterology*, 査読有, Article ID 513514, 2011, 1-8 DOI: 10.5402/2011/513514

〔学会発表〕(計22件)

春田郁子 他、The role of bacterial component in the progression of non-alcohol fatty liver disease, 第88回日本細菌学会総会、2015年3月23日～25日、「長良川国際会議場 (岐阜県・岐阜市)」

春田郁子 他、マウスモデルを用いたNAFLD/NASH病態と腸内細菌叢の関連の検討、第40回日本肝臓学会東部会、2014年11月27日～28日、「京王プラザホテル(東京都・新宿区)」

HARUTA Ikuko 他、Commensal flora as a pathogenic factor of autoimmune pancreatitis and associated diseases, 5th Asian-Pacific Topic Conference, 2014年10月22日、「神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市)」

HARUTA Ikuko 他, Analysis of a commensal bacteria triggered autoimmune pancreatitis mouse model, International symposium on IgG4-RD & associated conditions, 2014年2月16日～20日「Honolulu(USA)」

HARUTA Ikuko 他, Analysis of the cellular phenotype in mouse model of commensal bacteria triggered autoimmune pancreatitis, Annual meeting of the Japanese society for immunology 2013, 2013年12月11日～13日「幕張メッセ (千葉県・千葉市)」

HARUTA Ikuko 他, Commensal flora as possible pathogens of autoimmune pancreatitis, American Pancreatic Association/International Association of Pancreatology 2012 Join Meeting, 2012年10月31日～11月3日「Florida (USA)」

HARUTA Ikuko 他, Commensal bacteria may be involved in the pathogenesis of

autoimmune pancreatitis, 2012 Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, 2012年12月5日～7日「神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)」

HARUTA Ikuko 他, Is the dysregulation of homeostatic inflammation involved in the pathogenesis of innate-immune mediated hepato-biliary-pancreatic autoimmune disease?: Analysis using mice models of primary biliary cirrhosis and autoimmune pancreatitis, XIII International congress of bacteriology and applied microbiology, 2011年9月10日「札幌コンベンションセンター、札幌市産業振興センター(北海道・札幌市)」

春田郁子 他、細菌が誘導する自然免疫賦活の自己免疫性膵炎及び原発性胆汁清肝硬変への発症機構への関与の検討、第97回日本消化器病学会総会、2011年5月13日「京王プラザホテル(東京都・新宿区)」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

春田 郁子 (HARUTA, Ikuko)
東京女子医科大学・医学部・准教授
研究者番号：80221513

(2) 研究分担者

八木 淳二 (YAGI, Junji)
東京女子医科大学・医学部・教授
研究者番号：70182300