

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591017

研究課題名(和文)自己免疫性膵炎の発症機序とIgG4産生制御に関する免疫学的研究

研究課題名(英文)An immunological study of pathogenesis in autoimmune pancreatitis

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円、(間接経費) 1,140,000円

研究成果の概要(和文)：(1)制御性T細胞(Treg)浸潤は、自己免疫性膵炎だけでなく、膵癌や閉塞性膵炎でもIgG4陽性形質細胞との相関が認められ、IgG4産生制御への関与が明らかになった。(2)制御性B細胞(Breg)にはCD19+CD24hiCD38hi BregsとCD19+CD24hiCD27hi Bregsの2亜型が存在し、コントロールに比してAIPでは前者の増加と後者の低下を認め、前者はIgG4産生に後者は発症に関わる可能性が考えられた。(3)TLR3刺激したMRLマウスでは、膵炎、胆管炎、唾液腺炎などの発症を認め、自然免疫系の異常反応がAIP発症に関わる可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：(1)In pancreas cancer and obstructive pancreatitis type 1 AIP, infiltration of memory regulatory T cells (Tregs) and IgG4-positive cells were positively correlated, which suggested that increased memory-Tregs may be an inhibitory immune response against inflammation, although decreased naive Tregs may be pathogenic. (2) We identified two subtypes of regulatory B cells (Bregs), CD19+CD24highCD38high Bregs and CD19+CD24highCD27+ Bregs in type 1 AIP. The increased CD19+CD24highCD38high Bregs may suppress the disease activity of type 1 AIP, whereas the decreased CD19+CD24highCD27+ Bregs might be involved in the development of type 1 AIP. (3) In animal models, activation of TLR3 (polyinosinic:polycytidylic acid) can induce immune-mediated cholangitis, pancreatitis and sialadenitis similar to human autoimmune pancreatitis.

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：IgG4関連疾患 自己免疫性膵炎 IgG4 制御性T細胞 制御性B細胞 自然免疫

1. 研究開始当初の背景

AIP はわが国より発信された新しい疾患概念であり、高 IgG4 血症や IgG4 陽性形質細胞の膵管周囲への著しい浸潤と線維化 (storiform fibrosis) が特徴である (Okazaki K, et al. *Gut* 2002, *J Gastroenterol* 2009)。しばしば硬化性胆管炎、硬化性唾液腺炎、後腹膜線維症などを合併することより、近年全身性 IgG4 関連疾患としても注目されているが、発症機序や病態における IgG4 の意義は不明である。申請者らは従来から AIP 発症機序の解明の一助として以下の点を明らかにしてきた。すなわち、(1)疾患関連抗原の探索において、膵 cDNA 組込み蛋白発現ベクターと患者血清を用い膵、胆管、唾液腺など本疾患で障害される臓器に広く分布する carbonic anhydrase (CA)-II、lactoferrin、pancreas secretory trypsin inhibitor (PSTI)を同定し (Okazaki K, et al; *Gastroenterology*:2000, *Gut*:2003, *Pancreas*:2006)、これらを標的抗原としたモデル動物を作成した (Uchida K, Okazaki K, et al. *Lab Invest*:2002)。 (2)病変部の Th1/Th2/Th17 免疫バランスにおいて、Th17 細胞の関与は低いものの、病変初期では Th1 優位で CD4 陽性 Th1 細胞が effector 細胞となり、慢性期では Th2 優位となることを報告した (Okazaki K et al, *Gastroenterology*:2000, *Lab Invest*:2002, *Pancreas*:2005)。 (3)発症機序に関して、FoxP3⁺CD4⁺RA⁺CD25^{high} ナイーブ制御性 T 細胞 (naïve Treg) の減少が関与する一方、 (4)IgG4 産生亢進において、末梢抗原にて誘導される FoxP3⁺CD4⁺RA⁺CD25^{high} メモリー制御性 T 細胞 (inducible memory Treg) の有意な増加と、抗原特異性は不明なものの IL-10 を介する IgG4 産生亢進の可能性を提唱した (図) (Okazaki K et al. *Pancreas* 2008, *J Gastroenterol* 2010, *Clin Immunol Review*:in press)。しかし、各種疾患関連抗原とメモリー Treg を誘導する ICOS 分子発現との関連性は不明である。

一方、Treg のみならず自然免疫系細胞 (Mo, M ϕ , 樹状細胞 (DC)) による IL-10 分泌機構も注目されているが (*J Immuno*, 2006; 177:7551)、本症における自然免疫系の関与は殆ど検討されていない。特に、病変部に特徴的な IgG4⁺ 細胞浸潤については、抑制性機能を有する CD163⁺ M2-細胞、PIR-B⁺ 細胞 (mice) (Okazaki K et al. *J Autoimmun.* 2010, 34:380), ILT-2⁺ /ILT-3⁺ 細胞 (human) (*Gastroenterology*, 2010, 139:530) の発症機序や病態における意義は不明である。

2. 研究の目的

本研究では AIP の発症機序と IgG4 産生制御における機序を明らかにすることを目的

に、(1) 抗原特異的メモリー Treg とその誘導因子である ICOS 分子発現との関連、(2) 自然免疫担当細胞と TLRs の発現、制御性 B 細胞と IgG4 産生能について、臨床例および動物モデルを用いた免疫・分子生物学的解析を行う。

(1) 臨床的検討として、各疾患患者および健康人の血中 IgG4 測定、抗 CA-、抗ラクトフェリン (LF)、抗 PSTI 自己抗体を測定する。末梢血中の CD68⁺ CD163⁻ M1-Mo、CD68⁻ CD163⁺ M2-Mo、ICOS⁺ Treg、IL-10 産生細胞、IgG4⁺ B 細胞/形質細胞およびマウス PIR-B⁺ Mo に相当する ILT-2⁺ /ILT-3⁺ Mo をフローサイトメトリーにより解析する。抗原特異的メモリー Treg の解析は、各種抗原 (CA-、LF, PSTI, LPS, poly I:C) で刺激後、IL-10 産生 Treg を誘導する ICOS 分子との関連性について検討する。CD68⁺ CD163⁻、CD68⁻ CD163⁺ 細胞を分離培養後、LPS (細菌因子)、polyinosinic:polycytidylic acid (polyI:C) (RNA ウィルス因子)、cpG-DNA (DNA ウィルス因子) で刺激して、培養液中の IgG4 とともに CXCL4, TGF- β , TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17, IL-23 などのケモカイン・サイトカインを ELISA にて測定する。膵・胆管・肝組織を用いて各種リガンドに対応する TLRs (TLR-3(poly I:C), TLR-4(LPS), TLR-9(cpG-DNA)) の発現を免疫組織化学的に検討する。Treg については抗 FoxP3 抗体、抗 CD4 抗体による免疫組織化学と IL-10 発現を解析し、各疾患における病態の違いを明らかにする。(2) 基礎的検討として、申請者らの開発した胸腺摘除マウス (*Lab Invest*:2002)、poly I:C 免疫 MRL/lpr 膵炎マウス (*Pancreas* 2009) などの自己免疫性膵炎動物モデルを用いて、臨床的検討に準じて解析する。すなわち、血中各種自己抗体、TGF- β 、IL-6、IL-10 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- β 産生細胞、IgG2b (ヒト IgG4 に相当) 陽性形質細胞をフローサイトメトリーにより解析する。分離 CD68⁺ CD163⁻ M1-Mo、CD68⁻ CD163⁺ M2-Mo、PIR-B⁺ Mo に対しては、LPS, polyI:C, cpG-DNA で刺激して培養後、培養液中の IgG2b や CXCL4, TGF- β , TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17, IL-23 などのケモカイン・サイトカインを ELISA にて測定する。臨床的検討に準じて、膵・胆管・肝組織を用いて FoxP3⁺ Treg, CD68⁺ CD163⁻ M1-M ϕ , CD68⁻ CD163⁺ M2-M ϕ , PIR-B⁺ M ϕ における各 TLRs の発現とサイトカイン発現について免疫組織化学的、分子生物学的に探索し、臨床的解析と比較検討する。

3. 研究の方法

本研究では、(1) 臨床的検討として、AIP、各疾患患者および健康人の血中 IgG4、自己抗

体を ELISA 法にて測定、 $CD68^+CD163^-$ M1-Mo, $CD68^-CD163^+$ M2-Mo, $ILT-2^+/ILT-3^+$ Mo, $ICOS^+$ Treg, IL-10 産生細胞、 $IgG4^+$ 形質細胞をフローサイトメトリーにて解析、LPS, poly I:C, cpG-DNA 刺激による分離単球 ($M1 / M2$ -Mo, $ILT-2^+/ILT-3^+$ Mo) の $IgG4$ 産生能を ELISA で測定、膵・胆管・肝組織を用いて $FoxP3^+$ Treg, M1-M ϕ , M2-M ϕ , $ILT-2^+/ILT-3^+$ M ϕ の各細胞における TLRs の発現とサイトカイン発現を免疫組織化学的、分子生物学的に検索する。(2) 基礎的検討として、疾患関連抗原に特異的な自己免疫性膵炎モデルマウスや poly I:C 免疫膵炎モデルマウスを作成し、末梢血、膵・胆管・肝組織を用いて、臨床的検討に準じ免疫組織化学的、分子生物学的に検索する。

4. 研究成果

(1) 自己免疫性膵炎だけでなく、膵癌やその周辺の閉塞性膵炎部位において、 $IgG4$ 陽性形質細胞の浸潤部位では、IL-10 を分泌する $ICOS$ 分子陽性 Treg の浸潤と相関を認め、 $IgG4$ 産生制御に関与することを明らかにした。

(2) さらに、Breg との関連に関して、IL-10 を産生する $CD19^+CD24^{hi}CD38^{hi}$ Bregs と $CD19^+CD24^{hi}CD27^{hi}$ Bregs の 2 亜型の存在を確認した。

(3) AIP 患者群ではコントロール群に比して、 $CD19^+CD24^{hi}CD38^{hi}$ Bregs の増加と $CD19^+CD24^{hi}CD27^{hi}$ Bregs の低下を認めたことより、前者は $IgG4$ 産生に後者は疾患発症に関わる可能性が考えられた。

(4) さらに自然免疫系については、poly:IC を MRL マウスに投与して、TLR 3 を賦活して、膵炎、胆管炎、唾液腺炎などの発症を認め、自然免疫系の異常反応が自己免疫性膵炎発症に関わる可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 18 件)

- Sumimoto K, Uchida K, Kusuda T, Mitsuyama T, Sakaguchi Y, Fukui T, Matsushita M, Takaoka M, Nishio A, Okazaki K. The role of $CD19(+)$ $CD24(\text{high})CD38(\text{high})$ and $CD19(+)$ $CD24(\text{high})CD27(+)$ regulatory B cells in patients with type 1 autoimmune pancreatitis. *Pancreatology*. 2014;14(3):193-200. doi: 10.1016/j.pan.2014.02.004.
- Okazaki K, Tomiyama T, Mitsuyama T, Sumimoto K, Uchida K. Diagnosis and classification of autoimmune pancreatitis. *Autoimmun Rev*. 2014;13(4-5):451-458. doi: 10.1016/j.autrev.2014.01.010.
- Okazaki K, Uchida K, Sumimoto K, Mitsuyama T, Ikeura T, Takaoka M. Autoimmune pancreatitis: pathogenesis, latest developments and clinical guidance. *Ther Adv Chronic Dis*. 2014;5(3):104-111. Review. doi: 10.1177/2040622314527120
- Okazaki K, Uchida K, Koyabu M, Miyoshi H, Ikeura T, Takaoka M. "IgG4 Cholangiopathy - current concept, diagnosis and pathogenesis" *J Hepatol*. 2014 : S0168-8278(14)00272-4. doi: 10.1016/j.jhep.2014.04.016.
- Okazaki K. Current concept, diagnosis and pathogenesis of autoimmune pancreatitis as IgG4-related disease. *Minerva Med*. 2014;105(2):109-19.
- Okazaki K, Sumimoto K, Mitsuyama T, Uchida K. Abnormal immunity in IgG4-related autoimmune pancreatitis. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi*. 2014;37(1):11-8
- Koyabu M, Uchida K, Sakaguchi Y, Fukata N, Kusuda T, Miyoshi H, Yoshida K, Sumimoto K, Mitsuyama T, Fukui T, Nishio A, Okazaki K. Possible Involvement of Foxp3(+) Regulatory T Cells in the Development of Immune-Mediated Pancreatitis in MRL/Mp Mice Treated with Polyinosinic:Polycytidylic Acid. *Int J Rheumatol*. 2013;2013:367325. doi: 10.1155/2013/367325.
- Sumimoto K, Uchida K, Mitsuyama T, Fukui Y, Kusuda T, Miyoshi H, Tomiyama T, Fukata N, Koyabu M, Sakaguchi Y, Ikeura T, Shimatani M, Fukui T, Matsushita M, Takaoka M, Nishio A, Okazaki K. A proposal of a diagnostic algorithm with validation of International Consensus Diagnostic Criteria for autoimmune pancreatitis in a Japanese cohort. *Pancreatology*. 2013;13(3):230-7. doi: 10.1016/j.pan.2013.02.010.
- Okazaki K, Uchida K, Ikeura T, Takaoka M. Current concept and diagnosis of IgG4-related disease in the hepato-bilio-pancreatic system. *J Gastroenterol*. 2013;48(3):303-14. doi: 10.1007/s00535-012-0744-3
- 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. The similarity of Type 1 autoimmune pancreatitis to pancreatic ductal adenocarcinoma with significant IgG4-positive plasma cell infiltration. *J Gastroenterol*. 2013; 48(6):751-61. doi: 10.1007/s00535-012-0677-x.
- 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. The similarity of Type 1 autoimmune pancreatitis to pancreatic ductal

- adenocarcinoma with significant IgG4-positive plasma cell infiltration. *J Gastroenterol.* 2013; 48(6):751-61. doi: 10.1007/s00535-012-0677-x.
12. 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. Regulatory T cells in type 1 autoimmune pancreatitis. *Int J Rheumatol.* 2012;2012:795026.
 13. Ikeura T, Takaoka M, Uchida K, Shimatani M, Miyoshi H, Kusuda T, Kurishima A, Fukui Y, Sumimoto K, Sato S, Ohe C, Uemura Y, Kwon AH, Okazaki K. Autoimmune pancreatitis with histologically proven lymphoplasmacytic sclerosing pancreatitis with granulocytic epithelial lesions. *Intern Med.* 2012;51(7):733-7
 14. Umehara H, Okazaki K, Masaki Y, Kawano M, Yamamoto M, Sacki T, Matsui S, Yoshino T, Nakamura S, Kawa S, Hamano H, Kamisawa T, Shimosegawa T, Shimatsu A, Nakamura S, Ito T, Notohara K, Sumida T, Tanaka Y, Mimori T, Chiba T, Mishima M, Hibi T, Tsubouchi H, Inui K, Ohara H. Comprehensive diagnostic criteria for IgG4-related disease (IgG4-RD), 2011. *Mod Rheumatol.* 2012;22(1):21-30
 15. 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. Regulatory T cells in type 1 autoimmune pancreatitis. *Int J Rheumatol.* 2012;2012:795026.
 16. Yamashina M, Nishio A, Nakayama S, Okazaki T, Uchida K, Fukui T, Okazaki K. Comparative Study on Experimental Autoimmune Pancreatitis and Its Extrapancreatic Involvement in Mice. *Pancreas.* 2012;41(8):1255-62.
 17. Uchida K, Masamune A, Shimosegawa T, Okazaki K. Prevalence of IgG4-Related Disease in Japan Based on Nationwide Survey in 2009. *Int J Rheumatol.* 2012;2012:358371.
 18. Kusuda T, Uchida K, Miyoshi H, Koyabu M, Sato S, Takaoka M, Shikata N, Uemura Y, Okazaki K. Involvement of inducible costimulator- and interleukin 10-positive regulatory T cells in the development of igg4-related autoimmune pancreatitis. *Pancreas.* 2011;40(7):1120-30.
- [学会発表](計 14 件)
1. 内田一茂, 岡崎和一 IgG4 関連胆膵疾患における ICOS 陽性制御性 T 細胞による IgG4 産生機序に関する検討 第 40 回日本臨床免疫学会 東京 2012/09/27-29
 2. 内田一茂, 岡崎和一, 正宗 淳, 下瀬川 徹 IgG4 関連疾患における性差について 第 8 回消化器病における性差医学・医療研究会 京都 2012/08/04
 3. 内田一茂, 西尾彰功, 岡崎和一 IgG4 関連肝胆膵疾患における制御性 T 細胞に関する検討 第 49 回日本消化器免疫学会 鹿児島 2012/07/5-6
 4. 内田一茂, 池浦 司, 岡崎和一 自験例よりみた自己免疫性膵炎の長期予後 第 39 回日本膵臓学会大会 山形 2012/06/28-29
 5. 山科雅央, 西尾彰功, 岡崎 敬, 中山新士, 福井寿朗, 内田一茂, 岡崎和一 自己免疫性膵炎マウスにおける膵外病変の検討 第 39 回日本膵臓学会大会 山形 2012/06/28-29
 6. 住本貴美, 内田一茂, 福井由理, 三好秀明, 坂口雄沢, 池浦 司, 島谷昌明, 高岡 亮, 岡崎和一 当科における自己免疫性膵炎の診断能に関する検討 第 39 回日本膵臓学会大会 山形 2012/06/28-29
 7. 富山 尚, 内田一茂, 岡崎和一 1 型自己免疫性膵炎 (type 1 AIP) に対する初期治療としてのステロイドパルス療法の検討 第 29 回日本胆膵病態・生理研究会 京都 2012/06/23
 8. 楠田武生, 内田一茂, 岡崎和一 IgG4 関連疾患としての自己免疫性膵炎 (AIP type 1; LPSP) と好中球病変 (AIP type 2; IDCP) における免疫学的相違に関する検討 第 29 回日本胆膵病態・生理研究会 京都 2012/06/23
 9. 山科雅央, 西尾彰功, 岡崎 敬, 中山新士, 福井寿朗, 内田一茂, 岡崎和一 自己免疫性膵炎発症マウスにおける膵外病変の検討 第 29 回日本胆膵病態・生理研究会 京都 2012/06/23
 10. Sumimoto , Uchida K, Fukui K, Kusuda , Hideaki Miyoshi, Norimasa Fukata, Masanori Koyabu, Yutaku Sakaguchi, Tsukasa Ikeura, Masaaki Shimatani, Toshiro Fukui, Mitsunobu Matsushita, Makoto Takaoka, Akiyoshi Nishio, Okazaki K. Comparison of International Consensus Diagnostic Criteria and Major Diagnostic Criteria for Autoimmune Pancreatitis. DDW2012 San Diego, California, USA 2012/05/20
 11. Kazushige Uchida, Kazuichi Okazaki. Recent Advances in Autoimmune Pancreatitis. 第 98 回日本消化器病学会総会 東京 2012/04/19-21
 12. 池浦司, 高岡亮, 内田一茂, 島谷昌明, 三好秀明, 楠田武生, 岡崎和一 疼痛症状のある慢性膵炎患者に対する成分栄養剤(エレンタール®)の有用性 第 98 回日

本 消化器病学会 総会 東京
2012/04/19-21

13. 富山 尚、内田一茂、岡崎和一 自己免疫性膵炎 におけるステロイドパルス療法 の有用性 第98回日本消化器病学会総会 東京 2012/04/19-21
14. 内田一茂、楠田武生、小藪雅紀、三好秀明、住本貴美、福井由理、池浦 司、島谷昌明、高岡 亮、岡崎和一 IgG4関連胆・膵病変におけるIgG4産生機序と制御性T細胞の意義 第109回日本内科学会講演会 京都 2012/04/12-15

〔図書〕(計 2 件)

1. Okazaki K, Uchida K. Japanese Experience Chap 22. IV. World-wide experience with AIP and IgG4-related sclerosing cholangitis. Eds. Levy MJ, Chari ST. Autoimmune (IgG4-related) pancreatitis and cholangitis. p237-248, 2013 Springer (NY)
2. Okazaki K. Autoimmune pancreatitis. Chap 10. Part II. Radiology. Eds Umehara H, Okazaki K, Stone J, Kawa S, Kawano M. IgG4-related disease. Pp61-68 2012 Springer (Tokyo)

〔産業財産権〕

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：

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
特になし

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

西尾 彰功 (NISHIO, Akiyoshi)
関西医科大学・医学部・准教授
研究者番号：50362463

(3) 研究分担者

内田 一茂 (UCHIDA, Kazushige)
関西医科大学・医学部・講師
研究者番号：40411516