

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 16 日現在

機関番号：34419

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15370

研究課題名(和文)腸内細菌叢からみたIgG4関連疾患の発症機序の解明

研究課題名(英文)Elucidation of immuno-pathogenesis of IgG4-related disease by focusing on innate immune responses to intestinal microflora

研究代表者

渡邊 智裕 (WATANABE, Tomohiro)

近畿大学・医学部・准教授

研究者番号：40444468

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：IgG4関連型自己免疫性膵炎の発症に関わる自然免疫反応について、解析を進めた。マウスの自己免疫性膵炎モデル及びヒトIgG4関連型自己免疫性膵炎の血液細胞・膵臓組織標本を用いて検討を行った。その結果、マウスの自己免疫性膵炎及びヒトIgG4関連型自己免疫性膵炎の双方において、形質細胞様樹状細胞(plasmacytoid dendritic cells, pDCs)の活性化が重要な役割を果たすことを見出した。pDCsは腸内細菌を認識することにより活性化され、IFN-alphaとIL-33を産生することにより、自己免疫性膵炎を誘導していることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：We tried to elucidate innate immune responses involved in the development of IgG4-related autoimmune pancreatitis (AIP). To this end, we utilized samples obtained from murine experimental models of AIP and human IgG4-related AIP. In both human and animal studies, we found that AIP-related innate immune responses are characterized by activation of plasmacytoid dendritic cells (pDCs). The development of AIP depends upon both IFN-alpha and IL-33 produced by pDCs. Taken together, these data suggest that activation of pDCs upon sensing of intestinal microflora induces IgG4-related AIP through the production of IFN-alpha and IL-33.

研究分野：消化器免疫学

キーワード：IgG4関連疾患 自己免疫性膵炎 形質細胞様樹状細胞

1. 研究開始当初の背景

IgG4 関連疾患は血清 IgG4 値の上昇と IgG4 陽性形質細胞の罹患臓器への浸潤を特色とする本邦より提唱された新規疾患概念である。従来、自己免疫性膵炎、胆管炎、唾液腺炎などと診断されていた疾患の多くが全身性の IgG4 関連疾患の臓器特異的な表現型であることが明らかになり、IgG4 関連疾患は国内外から大きな注目を浴びている。

このように、大きな関心が寄せられている IgG4 関連疾患であるが、その病態生理はほとんど解明されていない。本疾患は IgG4 産生反応の亢進と IgG4 陽性細胞の臓器浸潤を特色としているが、IgG4 産生反応の上昇を誘導する免疫環境については明らかになっていない。

本疾患に関する従来の研究は獲得免疫反応である IgG4 の産生に焦点を絞ったものが大半であった。最近、腸内細菌に対する自然免疫反応が全身性の抗体産生反応に関わることが判明している。そこで、本研究では IgG4 関連疾患の発症機序について、自然免疫反応に重点を置いて、解析を行った。

2. 研究の目的

本研究では、IgG4 関連疾患の発症に関わる自然免疫反応について、解析を進め、本疾患の病態生理の解明を目指す。さらに、病態生理の理解に基づいた IgG4 関連疾患の新規治療法の開発を目指す。本研究の成果は基礎的には IgG4 関連疾患の病態生理の解明につながり、臨床的には病態生理の理解に基づいた新規治療法の開発につながる可能性があると考えられる。

3. 研究の方法

IgG4 関連疾患の発症機序について、腸内細菌に対する自然免疫反応という視点から解析を進め、病態生理の理解に基づいた新規治療法を開発するために、以下の実験を実施した。

- (1) MRL/MpJ マウスに poly (I:C) 100 µg を反復投与することにより、マウスの自己免疫性膵炎モデルを作成した。
- (2) 上記モデルの膵臓より分離した免疫細胞について、Flow-cytometric analysis を行い、増加あるいは減少している免疫細胞の種類について検討した。
- (3) 上記モデルの膵臓より分離した免疫細胞が産生するサイトカインについて、検討した。
- (4) 形質細胞様樹状細胞 (plasmacytoid dendritic cells, pDCs) の除去抗体 (120G8 Ab) の投与による pDCs の除去がマウスの自己免疫性膵炎の発症に及ぼす効果について、検討した。
- (5) I 型 IFN 受容体抗体 (IFNAR Ab) の投与

による I 型 IFN 経路の阻害がマウスの自己免疫性膵炎の発症に及ぼす効果について検討した。

- (6) 自己免疫性マウスモデルにおける線維化を SMA 染色、Sirius Red 染色、Hydroxyproline の測定を行うことにより定量的に評価した。
- (7) IL-33 受容体抗体 (ST2 Ab) の投与により、自己免疫性膵炎マウスモデルの線維化が抑制されるかどうか検討した。
- (8) 抗生剤投与による腸管の清浄化が自己免疫性膵炎の発症に及ぼす効果を検討した。
- (9) ヒト IgG4 関連型自己免疫性膵炎、慢性膵炎、健康人の血清中の IFN-alpha 及び IL-33 濃度を比較検討した。
- (10) ヒト IgG4 関連型自己免疫性膵炎患者の末梢血より分離した pDCs が B 細胞を IgG4 産生型形質細胞へと分化させるかどうか検討した。
- (11) ヒト IgG4 関連型自己免疫性膵炎、慢性膵炎、膵臓癌の摘出標本を用いて、IFN-alpha 及び IL-33 を産生する pDCs の局在を検討した。

4. 研究成果

(1) 自己免疫性膵炎モデルでの成果

MRL/MpJ マウスに poly (I:C) を反復投与することにより、膵臓に線維化と炎症細胞浸潤を伴う自己免疫性膵炎を誘導することができた。このモデルを用いて、以下の事実を見出した。

マウスの自己免疫性膵炎モデルでは無処置マウスと比べて、膵臓に pDCs が多数浸潤していることが判明した。

自己免疫性膵炎モデルにおいて、膵臓に浸潤している pDCs は IFN-alpha を大量に産生することが判明した。

120G8 抗体投与による pDCs の除去あるいは IFNAR 抗体投与による I 型 IFN 経路の中和により、自己免疫性膵炎の発症が著明に抑制された。a, b, c の結果より、マウスの自己免疫性膵炎の発症に pDCs の活性化と IFN-alpha の産生が病的な役割を果たすことが明らかになった。

マウスの自己免疫性膵炎モデルの線維化の評価を SMA 染色、Sirius Red 染色、Hydroxyproline の測定を行うことにより定量的に評価した。120G8 抗体投与による pDCs の除去あるいは IFNAR 抗体投与による I 型 IFN 経路の中和により、自己免疫性膵炎の線維化が抑制されることが明らかになった。

自己免疫性膵炎モデルにおいて、膵臓に浸潤している pDCs は IL-33 を大量に産生することが判明した。興味深いことに、pDCs による IL-33 の産生は I 型 IFN

経路の中和により、抑制されることが明らかになった。

IL-33 受容体抗体 (ST2 Ab) の投与により、自己免疫性マウスモデルの炎症及び線維化が抑制され、その効果は膵臓に浸潤する pDCs の減少を伴っていた。d, e, f の結果により、pDCs が IFN-alpha/IL-33 を産生し、自己免疫性膵炎の発症に重要な役割を果たしていることが明らかになった。抗生剤投与による腸管の清浄化により、自己免疫性膵炎の発症が著明に抑制され、その効果は pDCs の減少を伴っていた。

上記のマウス自己免疫性膵炎モデルを用いた検討により、腸内細菌を認識して活性化される pDCs が IFN-alpha 及び IL-33 を産生することにより、自己免疫性膵炎の発症に寄与していることが明らかになった。

(2) ヒト IgG4 関連型自己免疫性膵炎のサンプルを用いた研究成果

ヒト IgG4 関連型自己免疫性膵炎、慢性膵炎、健常人、膵癌の標本を用いて検討を行い、以下の事実を見出した。

ヒト IgG4 関連型自己免疫性膵炎、慢性膵炎、健常人の血清中の IFN-alpha 及び IL-33 濃度を比較検討し、IgG4 関連型自己免疫性膵炎において、血清中の IFN-alpha 濃度が著明に高いことを確認した。

ヒト IgG4 関連型自己免疫性膵炎患者の末梢血より分離した pDCs と健常人の B 細胞を用いた共培養系を構築した。この共培養系を用いて、IgG4 関連型自己免疫性膵炎患者由来の末梢血 pDCs が B 細胞を IgG4 産生型形質細胞へと分化させることを見出した。

ヒト IgG4 関連型自己免疫性膵炎、慢性膵炎、膵臓癌の摘出標本を用いて、IFN-alpha 及び IL-33 を産生する pDCs の局在を検討した。その結果、IFN-alpha 及び IL-33 を産生する pDCs が IgG4 関連型自己免疫性膵炎の膵臓組織に数多く局在することを見出した。

上記のヒト IgG4 関連型自己免疫性膵炎のサンプルを用いた検討により、IFN-alpha・IL-33 を産生する pDCs が IgG4 関連疾患患者の膵臓に局在し、病態と関わっていることが明らかになった。

(3) 研究成果のまとめ

マウス自己免疫性膵炎モデル及びヒト IgG4 関連型自己免疫性膵炎の双方において、IFN-alpha・IL-33 を産生する pDCs が病態に

密接に関わることが明らかになった。pDCs における IFN-alpha-IL-33 経路が本疾患の発症に関わる自然免疫経路として同定された。

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 5 件)

1. Watanabe T, Yamashita K, Arai Y, Minaga K, Kamata K, Nagai T, Komeda Y, Takenaka M, Hagiwara S, Ida H, Sakurai T, Nishida N, Strober W, Kudo M. Chronic fibro-inflammatory responses in autoimmune pancreatitis depend on IFN- and IL-33 produced by plasmacytoid dendritic cells. *Journal of Immunology* (in press) 査読有。
doi: 10.4049/jimmunol.1700060.
2. Watanabe T, Kudo M, Strober W. Immunopathogenesis of pancreatitis. *Mucosal Immunology* 10:283-98, 2017. 査読有。doi: 10.1038/mi.2016.101.
3. Watanabe T, Yamashita K, Kudo M. IgG4-related disease and innate immunity. *Current Topics of Microbiology and Immunology*. 401:115-28, 2017. 査読なし。
doi: 10.1007/82_2016_42.
4. Watanabe T, Sadakane Y, Yamaga N, Sakurai T, Ezoe H, Kudo M, Chiba T, Strober W. Nucleotide-binding oligomerization domain 1 acts in concert with the cholecystokinin receptor agonist, cerulein, to induce IL-33-dependent chronic pancreatitis. *Mucosal Immunology* 9:1234-49, 2016. 査読有。
doi: 10.1038/mi.2015.144.
5. Arai Y, Yamashita K, Kuriyama K,

Shiokawa M, Kodama Y, Sakurai T, Mizugishi K, Uchida K, Kadowaki N, Takaori-Kondo A, Kudo M, Okazaki K, Strober W, Chiba T, Watanabe T. Plasmacytoid dendritic cell activation and IFN- production are prominent features of murine autoimmune pancreatitis and human IgG4-related autoimmune pancreatitis. Plasmacytoid dendritic cell activation and IFN- production are prominent features of murine autoimmune pancreatitis and human IgG4-related autoimmune pancreatitis. Journal of Immunology 195:3033-44, 2015. 査読有。 doi: 10.4049/jimmunol.1500971.

〔学会発表〕(計 3 件)

1. Plasmacytoid dendritic cells producing both IFN-alpha and IL-33 mediate chronic fibro-inflammatory responses in IgG4-related disease. ポスター発表。 Watanabe T, Kudo M. 3rd International Symposium on IgG4-RD & Fibrosis, 2017/02/15, Maui (米国)。
2. 形質細胞様樹状細胞が産生する IL-33 が IgG4 関連疾患の病態に果たす役割 (ワークショップ)。口頭。 渡邊智裕、工藤正俊。24th JDDW, 神戸コンベンションセンター(神戸市) 2016/11/05、国内。
3. 自己免疫性膵炎の発症に関わる腸内細菌叢の解析(ワークショップ)。口頭。 渡邊智裕、工藤正俊。第 53 回日本消化器免疫学会総会、

ホテルニューオータニ大阪 (大阪市) 2016/7/14、国内。

〔図書〕(計 0 件)

〔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

6. 研究組織
(1)研究代表者
渡邊 智裕(WATANABE, Tomohiro)
近畿大学・医学部・准教授
研究者番号：40444468

(2)研究分担者
特になし

(3)連携研究者
特になし