

## 令和3年度 学内研究助成金 研究報告書

研究種目	<input checked="" type="checkbox"/> 奨励研究助成金	<input type="checkbox"/> 研究成果刊行助成金
	<input type="checkbox"/> 21世紀研究開発奨励金 (共同研究助成金)	<input type="checkbox"/> 国際共同研究推進助成金
研究課題名	腸内細菌 <i>Akkermansia muciniphila</i> を用いた慢性膵炎・膵癌のプロバイオティクス療法の開発	
研究者所属・氏名	研究代表者： 医学部 消化器内科 三長 孝輔 共同研究者：	

### 1. 研究目的・内容

慢性膵炎は飲酒過剰を背景に発症する膵臓の慢性炎症性疾患であり、膵内・外分泌機能が障害される結果、糖尿病や治療抵抗性の下痢・疼痛が出現する。さらに、慢性膵炎は膵癌発症の最大の危険因子である。このように生活の質や生命予後に関わる慢性膵炎であるが、その病態生理は十分に解明されていないため、病態生理の理解に基づいた根治療法は開発されていない。最近、申請者らのグループは膵炎の発症に伴う腸管バリアの破綻が腸内細菌の膵臓への移行を促進し、実験的慢性膵炎の発症を促進することを見出した。申請者らのグループは膵臓へ移行した腸内細菌が膵腺房細胞に発現する自然免疫反応受容体 Nucleotide-binding oligomerization domain 1 (NOD1)を活性化し、I型 IFN・IL-33 の産生を介して慢性膵炎の発症を誘導することを明らかにした。申請者らはこの知見をもとに、次世代シーケンス解析により慢性膵炎の発症を制御する腸内細菌の同定を試みた。その結果、申請者らは *Akkermansia muciniphila* (*A. muciniphila*) の腸管定着が膵臓における I型 IFN・IL-33 経路の活性化を抑制し、慢性膵炎の発症を抑制することを明らかにした。申請者らによるこれらの成果は慢性膵炎の新たな治療法の開発につながるだけでなく、予後不良な膵癌の新たな予防法の開発につながる可能性がある。本研究では *A. muciniphila* に対する免疫反応を応用した慢性膵炎・膵癌のプロバイオティクス療法」の開発を目的とした。

### 2. 研究経過及び成果

*A. muciniphila* が活性化する免疫反応を解明するために、Reporter Gene Assay により、*A. muciniphila* が TLR2 または TLR4 を効率良く活性化することを見出した。次に、TLR2・TLR4 の単独欠損マウス及び 2 重欠損マウスを作成し、*A. muciniphila* が膵炎発症抑制のために活性化する自然免疫受容体の同定を行った。最初に TLR2・TLR4 二重欠損マウスを作成し、TLR2・TLR4 二重欠損マウスに、少量のセルレインと NOD1 リガンドである FK156 の腹腔内反復投与を行う群と、少量のセルレインと FK156 の腹腔内反復投与に加えて膵酵素および *A. muciniphila* 投与を同時に行う群の 2 群を作成し、膵炎発症抑制効果を検討した。二重欠損マウスでは、膵酵素および死菌を投与しても膵炎病理スコアに差はなく、膵臓内に浸潤するマクロファージ、樹状細胞、I 型 IFN・IL-33 濃度にも差はなく、膵酵素および死菌投与による膵炎発症抑制効果は認められなかった。次に、TLR2 単独欠損マウス、TLR4 単独欠損マウスを用いて、同様の実験を行った。TLR2 単独欠損マウス、TLR4 単独欠損マウスともに、膵酵素・死菌の同時投与により、膵炎の病理スコアに改善が認められ、炎症惹起性サイトカイン I 型 IFN・IL-33 の膵臓での発現が低下していた。これらの実験結果から、TLR2 および TLR4 の両方の自然免疫受容体が慢性膵炎発症抑制に重要であることが示唆された。さらに我々は、*A. muciniphila* が膵炎抑制のために活性化する自然免疫担当細胞を、骨髄キメラマウスを作成し検討した。TLR2・TLR4 二重欠損マウスと wild type マウスを用いて骨髄移植を行い、TLR2・TLR4 二重欠損マウスの骨髄を放射線照射した wild type マウスに移植した骨髄キメラマウス(TLR2<sup>-/-</sup>TLR4<sup>-/-</sup>→TLR2<sup>+/+</sup>TLR4<sup>+/+</sup>マウス)、および wild type マウスの骨髄を放射線照射した TLR2・TLR4 二重欠損マウスに移植した骨髄キメラマウス(TLR2<sup>+/+</sup>TLR4<sup>+/+</sup>→TLR2<sup>-/-</sup>TLR4<sup>-/-</sup>マウス)を作成し、それぞれのマウスに、膵酵素および *A. muciniphila* の投与を行い、膵炎発症抑制効果を検討した。その結果、TLR2<sup>+/+</sup>TLR4<sup>+/+</sup>→TLR2<sup>-/-</sup>TLR4<sup>-/-</sup>マウスでは、TLR2<sup>-/-</sup>TLR4<sup>-/-</sup>→TLR2<sup>+/+</sup>TLR4<sup>+/+</sup>マウスに比べて病理学的スコア、炎症サイトカインの測定結果から、慢性膵炎の発症が著明に抑制されていた。これらの結果から、膵腺房細胞より血球系細胞が慢性膵炎の抑制に強く関与していることが示唆された。特に膵内に浸潤するマクロファージや樹状細胞が慢性膵炎抑制に関与していることが明らかとなったため、wild type マウスから FACS ソーティングで抽出したマクロファージおよび樹状細胞を *A. muciniphila* 死菌で刺激し、本菌が慢性膵炎抑制に働く細胞内シグナル伝達経路を RNA シークエンスによる網羅的な解析を行い同定を目指している。

### 3. 本研究と関連した今後の研究計画

既報により *A. muciniphila* の細胞外膜成分である Amuc 1100 は TLR2 を活性化し、腸管バリア機能を増強することが知られている。Amuc 1100 が、上記の実験で RNA シークエンスにより同定した細胞内シグナル伝達経路を介して、慢性膵炎の発症を抑制するかどうかを検討し、Amuc 1100 の慢性膵炎抑制の新規プロバイオティクスとしての可能性について研究を展開したい。また、慢性膵炎における *A. muciniphila* の炎症抑制作用を踏まえ、研究対象疾患を膵癌にまで広げ、Kras 変異マウスを用いた膵癌モデルマウスに *A. muciniphila* あるいは Amuc 1100 を投与し、膵癌の発症が抑制されるかを検討し、その効果が TLR 経路を介する免疫反応に依存するかどうかを明らかにしたい。さらに、Amuc 1100 の投与が膵臓・腸管において誘導する免疫反応を網羅的に解析し、Amuc 1100 の慢性膵炎・膵癌に対するプロバイオティクスとしての可能性を追求したい。

### 4. 成果の発表等

発表機関名	種類(著書・雑誌・口頭)	発表年月日(予定を含む)
消化器病学サイエンス	著書	2021年3月