

# 腸内細菌に対する免疫反応からみた喫煙関連膵臓疾患の発症機序の解明 －喫煙習慣が自己免疫性膵炎の発症に及ぼす効果の解明－

近畿大学医学部附属病院 消化器内科

鎌 田 研

## I 要 旨

膵臓の慢性炎症性疾患は慢性膵炎及び自己免疫性膵炎に大別される。慢性膵炎の発症には喫煙が関与することが判明しているが、喫煙習慣が自己免疫性膵炎の発症に及ぼす効果は明らかになっていない。そこで、本研究では喫煙習慣が自己免疫性膵炎の発症に及ぼす効果を解明した。当施設に通院している自己免疫性膵炎患者の腸内細菌叢について、16SrRNA を標的とする次世代シーケンス法により解析した。また、タバコの煙の中にはダイオキシンの一種である 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzodioxin (TCDD) が含まれていることから、TCDD の投与が自己免疫性膵炎の発症に及ぼす効果を解析した。自己免疫性膵炎患者の腸内細菌叢について、ステロイド治療前後の便検体を用いて、解析した結果、治療前後で増減を示す腸内細菌が同定された。さらに、TCDD の投与はマウス自己免疫性膵炎の発症を抑制したが、その効果は IL-22 の産生増強を伴っていた。このように、自己免疫性膵炎モデルでは TCDD 投与によるタバコ由来成分の暴露は疾患の発症を抑制した。これらの結果は喫煙の中断や禁煙が自己免疫性膵炎の発症に関与することを示唆している。

## II 目 的

膵臓の慢性炎症性疾患は慢性膵炎と自己免疫性膵炎に大別される。アルコールの過剰摂取を背景に発症する慢性膵炎では喫煙習慣が発症を

促進することが明らかになっている。しかしながら、喫煙習慣が自己免疫性膵炎の発症に及ぼす効果については明らかになっていない。自己免疫性膵炎は全身性の IgG4 関連疾患が膵臓に生じたものであることが最近、判明した。IgG4 関連疾患は IgG4 陽性細胞の罹患臓器への浸潤、血清 IgG4 値の上昇、多臓器病変を特色とする新規疾患概念である。本邦の内科医により、提唱された本疾患の病態生理の解明には世界的な注目が集まっている。そこで、本研究では自己免疫性膵炎の発症機序について、喫煙が発症に及ぼす効果を腸内細菌に対する免疫反応という視点から解明を試みた。

## III 方 法

- (1) 当施設において、自己免疫性膵炎と診断された患者 4 人のステロイド治療前後における腸内細菌叢について、16SrRNA を標的とする次世代シーケンス法により、解析した。
- (2) MRL/MpJ マウスに poly (I:C) 100  $\mu$ g を繰り返して、腹腔内投与することにより、自己免疫性膵炎を誘導した。
- (3) 喫煙により、Aryl hydrocarbon receptor (AhR) が活性化されることが知られている。2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzodioxin (TCDD) は AhR を刺激することから、poly (I:C) 100  $\mu$ g と TCDD 0.5  $\mu$ g を同時投与することにより、TCDD の投与がマウスの自己免疫性膵炎の発症に及ぼす効果を検討した。
- (4) 膵臓における各種サイトカインの発現を

ELISA により検討した。

- (5) 脾臓への制御性 T 細胞 (regulatory T cell, Treg) の浸潤については、Foxp3 の免疫染色により評価した。

#### IV 結 果

- (1) 表 1 にステロイド治療前後における腸内細菌叢の変化を示す。代表的な細菌について、抽出し表示した。Ruminococcus 属はステロイド治療に伴い、その割合が優位に増加を示した。その一方で、Klebsiella 属はステロイド治療により減少を示した。統計解析で有意差を示した細菌は二種のみであり、今後も症例の集積が必要であると考えられた。
- (2) 表 2 に自己免疫性脾炎モデルにおける脾臓におけるサイトカイン反応の定量結果を示す。TCDD の同時投与により、自己免疫性脾炎の発症は著明に抑制されることが昨年度において、示された。その機序の一端にサイトカイン

ン反応が関与することが明らかになった。我々は自己免疫性脾炎の発症に形質細胞様樹状細胞 (plasmacytoid dendritic cells, pDCs) の産生する IFN-alpha と IL-33 が関与することを報告してきた<sup>1),2)</sup>。しかしながら、TCDD の投与は IFN-alpha と IL-33 の産生を抑制しなかった。pDCs の脾臓における割合も両群で変化なく、TCDD の投与は pDCs における IFN-alpha-IL-33 経路非依存性に炎症反応を抑制していることが明らかになった。

- (3) TCDD の投与により、線維化関連サイトカインである IL-13 の産生は抑制された。実際に TCDD の投与により、Sirius Red 陽性の線維化領域は抑制される傾向を認めた。
- (4) TCDD の投与により、IL-22 の産生が脾臓で優位に増加していたが、Treg が主たる産生源である IL-10 については増加を認めなかった。実際に、Treg の脾臓への浸潤を Foxp3 染色で評価したが、TCDD の投与で増加せず、むしろ減少していた。

表 1 ステロイド治療前後における腸内細菌叢の変化

	治療前 (%)	治療後 (%)
Akkermansia	0.120±0.120	1.050±1.050
Dorea	2.260±0.534	1.000±0.402
Ruminococcus	1.340±0.799	5.050±1.411*
Klebsiella	4.440±1.976	0.025±0.025*
Fusobacterium	5.520±4.751	0.625±0.404
Bacteroides	31.56±1.465	30.13±4.829
Lactobacillus	0.220±0.1960	2.600±2.534
Bifidobacterium	2.380±0.751	3.425±1.714

データは平均値±標準誤差で表示した。\* P<0.05。

表 2 膵臓におけるサイトカインの発現

Cytokine (pg/mL)	Control	TCDD	Poly (I:C)	TCDD+Poly (I:C)
IFN-alpha	23.0±4.8	31.8±10.2	89.3±19.4	62.1±10.1
IL-33	480.8±68.5	836.3±61.6	2342±216.2	1808±226.1
IL-17	22.3±5.4	99.6±10.6	54.4±10.1	117.3±12.7**
IL-13	49.1±4.7	64.8±8.2	194.2±24.8	92.1±12.2**
IL-10	804.0±111.2	963.3±125.3	615.0±110.6	1079±197.6
IL-22	13.1±3.1	27.6±6.4	17.9±3.8	54.3±8.8**

データは平均値±標準誤差で表示した。\*\*Poly (I:C)群と比較し、P<0.01。

## V 考 察

腸内細菌に対する免疫反応が様々な疾患の発症に関わることが明らかになった。膵臓疾患においても例外ではなく、慢性膵炎や膵癌の発症に腸内細菌に対する免疫反応が関与することが明らかになりつつある。しかしながら、自己免疫性膵炎の発症に関わる腸内細菌叢については明らかになっていない。最近、我々は抗生剤投与による腸管の正常化が自己免疫性膵炎の発症を抑制すること、さらに自己免疫性膵炎を発症したマウスではビフィズ菌の定着が増加することを見出した<sup>4)</sup>。このように、我々は自己免疫性膵炎の発症に腸内細菌に対する免疫反応が関与することを証明しているが、ヒトの自己免疫性膵炎における腸内細菌叢の変化は解析されていない。本研究ではステロイド投与前後における腸内細菌叢の変化を解析した。4人の自己免疫性膵炎患者の便検体を用いた次世代シーケンス解析により、ステロイド治療の前後で変

化する腸内細菌が同定された。*Klebsiella* 属はステロイド治療に減少し、逆に*Ruminococcus* 属は治療後に増加していた。マウスの自己免疫性膵炎モデルで病的な役割を果たすと予測したビフィズス菌属については、ヒトの検体では再現されなかった。また、解析症例が少ないため、今後ともさらなる症例の集積が必要である。TCDDによるAhRの活性化は自己免疫性膵炎の発症を抑制した。興味深いことに、その効果はpDCsにおけるIFN-alpha-IL-33経路の活性化には依存しないことが示唆された。さらに、Tregの膵臓への浸潤やIL-10の産生増加も認めなかった。このことから、pDCs及びTregの活性化はTCDDによる自己免疫性膵炎の発症には有意な役割を果たしていないと考えられる。

## VI 結 語

TCDD を投与されたマウスの膵臓では IL-22 産生の有意な増加を認めた。IL-22 には炎症惹起性及び炎症抑制性の双方の機能があり、現時点では TCDD 投与による自己免疫性膵炎の発症抑制が IL-22 の産生によるものかどうかは断定できない。しかしながら、IL-22 が AhR の活性化により誘導されることから、IL-22 の免疫制御作用・組織修復作用が TCDD による自己免疫性膵炎の発症抑制に関与する可能性が考えられる。

### 参考文献

- 1) Arai Y, Yamashita K, Kuriyama K, et al. Plasmacytoid Dendritic Cell Activation and IFN-  $\alpha$  Production Are Prominent Features of Murine Autoimmune Pancreatitis and Human IgG4-Related Autoimmune Pancreatitis. *J Immunol.* 2015 Oct 1;195 (7) :3033-44.
- 2) Watanabe T, Yamashita K, Arai Y, et al. Chronic Fibro-Inflammatory Responses in Autoimmune Pancreatitis Depend on IFN-  $\alpha$  and IL-33 Produced by Plasmacytoid Dendritic Cells. *J Immunol.* 2017 May 15;198(10):3886-3896.
- 3) Gutiérrez-Vázquez C, Quintana FJ. Regulation of the Immune Response by the Aryl Hydrocarbon Receptor. *Immunity.* 2018 Jan 16;48 (1) :19-33.
- 4) Kamata K, Watanabe T, Minaga K, et al. Intestinal dysbiosis mediates experimental autoimmune pancreatitis via activation of plasmacytoid dendritic cells. *Int Immunol* 2019 [in-press].