

論文の内容の要旨

1 申請者

防衛医科大学校 伊東 傑

2 論文題目

自己免疫性膵炎モデルにおける腸内細菌叢と自然免疫反応の役割についての研究

3 論文の内容の要旨（博士：2,000字程度）

（1）目的

自己免疫性膵炎(AIP)は本邦から提唱された慢性膵炎であり、現在は IgG4 関連疾患の膵病変と考えられているが、その病態は不明な点が多い。近年、AIP の病態解明に関して様々な報告がなされており、遺伝因子に加え、環境因子による自然免疫・獲得免疫の異常化が発症に関与していると推測されている。中でも獲得免疫への橋渡しとなる抗原提示細胞（マクロファージ・樹状細胞）や上皮細胞による自然免疫反応が着目されている。自然免疫反応の誘導には、Toll-like receptor(TLR)や NOD-like receptor(NLR)などのパターン認識受容体が重要であり、腸内細菌はパターン認識受容体の最大の刺激因子であることから、腸内細菌叢に対する免疫反応が AIP の病態に関与している可能性がある。また膵炎の発症機序で着目されている免疫細胞の一つに腹腔マクロファージがあり、自然免疫細胞や炎症性 T 細胞の分化を制御する上で重要な役割を担っている。そこで、AIP モデルマウスにおける腸内細菌叢の変化やプロバイオティクス投与が病態に与える影響、腹腔マクロファージによる自然免疫反応の病態への関与について検討することを目的とした。

（2）対象並びに方法

本研究ではマウスの腹腔内に大腸菌死菌体を反復投与することで作製できる AIP モデルマウスを用いて AIP の病態について検討した。膵臓の炎症については組織学的所見、RT-PCR を用いた膵臓組織の炎症性サイトカイン mRNA 発現で評価し、腸内細菌叢の変化を検討するために、盲腸便を採取し、次世代シーケンサーを用いて遺伝学的解析を行い、その多様性と相対豊富度について比較検討した。また腸内細菌叢と病態との関連を調べるために、AIP モデルマウスに抗菌薬を投与して腸内細菌を除去することによる膵炎の活動性の変化について評価をした。

プロバイオティクスによる抗炎症作用について検討するため、モデルマウス作製時に大腸菌投与と並行して乳酸菌である *Lactobacillus gasseri* (LG) の死菌体を経口または腹腔内投与し、膵炎の活動性を評価した。またその作用機序として腹腔マクロファージに着目し、*in vitro* で腹腔マクロファージにおける大腸菌刺激および LG 投与による抗炎症作用を検討し、また TLR を刺激する細菌の菌体成分をリガンドとして、TLR 別の刺激効果について炎症性サイトカイン mRNA 発現を用いて比較検討した。

(3) 成績

加熱処理することで死菌体とした大腸菌株を反復投与することで、膵臓に炎症を認め、膵臓組織の炎症性サイトカイン mRNA 発現は増加しており、既報の通り AIP モデルマウスを作製できた。このモデルマウスでは、通常マウスと異なる腸内細菌叢を呈しており、多様性が低下していた。また LEfSe 解析では科レベルにおいて *Lactobacillaceae* や *Clostridiaceae*, *Ruminococcaceae* が有意に減少していた。また、モデルマウスに抗菌薬入りの水溶液を与えることで、膵臓の炎症は抑制された。

モデルマウスに乳酸菌である LG を経口投与したが、膵臓の炎症に変化は認めなかった。しかし、LG を腹腔内に投与することで、膵臓の炎症は抑制された。また腸内細菌叢の変化を認め、モデルマウスで認めた多様性の低下がみられなかった。

マウスから回収した腹腔マクロファージを大腸菌で刺激すると、モデルマウスの膵臓と同様に炎症性サイトカインの発現は増加し、LG の添加により炎症性サイトカインの発現増加は抑制された。さらに、細菌の菌体構成成分で刺激される各種 TLR の ligand を添加すると、TLR7 の ligand 添加時に、炎症性サイトカインの発現が有意に抑制された。

(4) 考察

モデルマウスでは腸内細菌叢の多様性が低下し、通常マウスと異なる細菌叢を呈しており、抗菌薬の投与により膵臓の炎症が抑制されたことから、このモデルの病態に腸内細菌叢が関与していると考えられた。

モデルマウスで有意に減少した *Lactobacillaceae* 科の LG を腹腔内に投与すると膵炎は抑制され、dysbiosis がみられなかった。また腹腔マクロファージにおいても、大腸菌刺激による炎症が LG 添加により抑制されたことから、細菌に対する宿主の免疫反応が病態に関与しており、その主座として腹腔マクロファージの関与が考えられた。

モデルマウスの膵炎に腸内細菌叢が関与しており、乳酸菌である LG の投与により膵炎が抑制されたことは、LG が AIP 治療あるいは予防に有用なプロバイオティクスである可能性を示しており、その作用機序を解明することは今後の AIP の病態改善に寄与すると考える。

(5) 結論

AIP モデルマウスでは、腸内細菌叢が変化し多様性が低下しており、抗菌薬の投与により膵炎が抑制されたことから、モデルマウスの病態に腸内細菌叢の関与が考えられた。また乳酸菌である LG の腹腔内投与により膵炎が抑制されたことから、細菌に対する宿主の免疫反応が病態に関与しており、その主座として腹腔マクロファージの関与が考えられた。さらに、細菌と腹腔マクロファージの接点として TLR7 の関与が示唆された。

4 キーワード（5個程度）

「自己免疫性膵炎」, 「自然免疫反応」, 「腸内細菌叢」, 「*Lactobacillus gasseri*」,
「腹腔マクロファージ」