HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ERCP後膵炎におけるIL-6アンプ活性化および炎症制御機構に関する研究［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	古川, 龍太郎
Description	配架番号：2713
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14977号
Issue Date	2022-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/85856
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	FURUKAWA_Ryutaro_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（医　学）　氏名　古　川　龍　太　郎

学 位 論 文 題 名

ERCP 後膵炎における IL-6 アンプ活性化および
炎症制御機構に関する研究
（Study on the mechanism of IL-6 amplifier activation and inflammation control in post-ERCP pancreatitis）

【背景と目的】

急性膵炎は、膵臓の急性炎症で、入院が必要となる頻度も高く、重症化すると致命的となる疾患である。アルコールと胆石が 2 大原因であるが、内視鏡的胆管膵管造影（Endoscopic Retrograde Cholangiopancreatography：ERCP）が原因となる場合もあり、ERCP 後膵炎（Post-ERCP Pancreatitis：PEP）と呼ばれる。PEP は、ERCP の偶発症で最も頻度が高く重症化すると致命的となるため、最も注意すべき偶発症である。しかし、ERCP を含む急性膵炎に対する治療薬・予防法で確立されたものはなく、様々な研究が行われている。ゲノムワイド関連解析 (Genome wide association study：GWAS)の発展により、一塩基多型（single nucleotide polymorphism：SNP）と疾患の関わりが次第に解明されてきている。これまで、慢性膵炎に関連する遺伝子/SNP として 13 種類、急性膵炎に関連する遺伝子として 6 種類（全て慢性膵炎関連遺伝子に含まれる）の報告があるが、PEP と関連した遺伝子/SNP の報告はない。膵臓細胞を含む非免疫細胞を nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF-κB) 経路を活性化する TNFα や IL-17 などと JAK- signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)経路を活性化する interleukin-6（IL-6）で同時に刺激することで相乗的に NF-κB 経路が活性化され、IL-6 やケモカイン、増殖因子などの炎症性関連因子群の発現が局所にて上昇する。このようなポジティブフィードバック機構を我々は、2008 年に発見して IL-6 アンプと呼んでいる。その後の研究から、IL-6 アンプは、多くのヒト慢性炎症性疾患と関連していることがわかっているが、膵臓の急性膵炎との関連を調べた報告はない。そこで本研究では、PEP と関連する遺伝子/SNP を明らかにし、その遺伝子と IL-6 アンプを含めた炎症制御機構について解析することを目的とした。

【対象と方法】

研究対象は、北大病院消化器内科にて ERCP を受けた患者とし、膵炎を発症した群（PEP 群）と膵炎を発症しなかった群（非 PEP 群）に分けた。対象者からは、血液および膵組織（膵切除を受けた場合）を採取した。まず、既報の慢性膵炎関連遺伝子 13 種類が IL-6 アンプに関連しているかを確認するため、ヒト神経膠腫細胞株 H4 細胞で siRNA を用いた関連遺伝子ノックダウン実験を行い、サイトカイン刺激後の IL-6 の mRNA 発現を quantitative real-time Polymerase Chain Reaction (qPCR)で測定した。次に患者検体から DNA を抽出し、PCR で IL-6 アンプとの関連がみられた遺伝子/SNP の保有頻度を調べた。PEP 群と非 PEP 群で保有頻度に差がでた遺伝子/SNP に対して、免疫組織染色を行い遺伝子の発現を確認した。また、その遺伝子が NF-κB 経路のどこで機能しているのか、short hairpin ribonucleic acid（sh-RNA）を用いて非免疫細胞である BC1 細胞株にて、ノックダウン実験を行い、サイトカイン刺激前後に共焦点レーザー顕微鏡を用いて NFkB タンパク質の局在について観察を行った。さらに、Imiquimod を用いてマウスの皮膚炎を誘発し、標的遺伝

子に対する siRNA を用いて炎症が抑制されるかを評価した。
【結果】
本研究に登録された症例は、PEP 群 24 例、非 PEP 群 85 例であり、年齢、性別、PEP リスク因子にて比較した。その結果、「複数回の膵管へのガイドワイヤー挿入」が、PEP 群において有意に多かった。傾向スコアマッチングを行なって解析すると、各群 20 例がマッチし、有意差のある項目はなくなった。慢性膵炎関連遺伝子である 13 種類の遺伝子に対してノックダウン実験を行うと、*CASR*、*PRSS1*、*GGT1*、*ABO*、*CTRB1* 遺伝子のノックダウンで IL-6 mRNA 発現が有意に抑制され、これらの遺伝子は、IL-6 アンプを正に制御する可能性があることが示唆された。次に、患者検体を用いて DNA シークエンスを行い SNP の保有率を調べると、PEP 患者では Gamma-Glutamyltransferase 1（GGT1） SNP rs5751901 のリスクアリル（C）を有する割合が非 PEP 患者と比較して有意に高かった。傾向スコアマッチングで抽出された群間においても、PEP 群でリスクアリル（C）を有する割合が有意に高く、GGT1 SNP rs5751901 が PEP の発症に関与している可能性高いことがわかった。そこで GGT1 SNP rs5751901 の有無が GGT1 の発現に与える影響をデータベースで調べると、SNP を有することで GGT1の発現が増加することがわかった。実際に、免疫組織染色ではリスクアレル（C）を有する膵組織において GGT1 陽性細胞の割合が多く、SNP によって膵臓にて GGT1 の発現が増すことが示唆された。次に shRNA を用いたノックダウン実験にて、GGT1 が NF-κB p65 の核移行に及ぼす影響を調べた。その結果、GGT1 をノックダウンした細胞でサイトカイン刺激依存性の p65 核移行が抑制され、GGT1 は細胞質内で p65 の核移行までのイベントに関与していることが考えられた。GGT1 のマウスの皮膚炎に対する影響を調べたところ、GGT1 の siRNA を塗布したマウスで、Imiquimod 依存性の耳介の肥厚が抑制され、NF-κB 経路に作用して炎症誘導に関与すること示唆された。
【考察】
本研究では、急性膵炎のカテゴリーに含まれる ERCP 後膵炎（PEP）について、IL-6 アンプとの関連や遺伝的リスク因子について検証し、有意な結果が得られた。siRNA を用いたノックダウン実験によって IL-6 アンプと関連することが、さらに、DNA シークエンスを用いることで、GGT1 SNP rs5751901 が PEP 発症に関連している可能性を示した。さらに、その GGT1 SNP が、非免疫細胞内で GGT1 の発現量を増やすことで炎症反応を惹起している可能性を示し、また、その炎症制御機構の一端を p65 の核移行を解析することで示した。GGT は、グルタチオンの代謝に重要な酵素で酸化ストレスと深い関係があり、炎症に関与している可能性がある。そして GGT 分子は、GGT1 遺伝子にコードされており、膵臓での GGT1 分子の発現は SNP rs5751901 の影響を受けることが示唆された。すなわち、SNP rs5751901 は、膵臓での GGT の発現に影響を与えることで炎症に関与しており、これらの報告は本研究の結果を支持するものである。
【結論】
GGT1 SNP rs5751901 は、GGT1 分子の膵臓での発現を亢進し、NF-κB 経路の活性化を介して炎症誘導に影響を与え、PEP の発症に促進的に関与している。