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［全文の要約］
Author(s)	古川, 龍太郎
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号：2713 他
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/2115/86058
Type	doctoral thesis
File Information	FURUKAWA_Ryutaro_summary.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文（要約）

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）

2022 年 3 月

北海道大学

古川　龍太郎

Ryutaro Furukawa

学位論文（要約）

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）

2022 年 3 月

北海道大学

古川　龍太郎

Ryutaro Furukawa

【背景と目的】

急性膵炎は、膵臓におきた急性の炎症で、入院が必要となる頻度が高く、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 大原因であり全体の約 60%を占めるが、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 の偶発症の中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。そのリスク因子としては、PEP の既往、女性、再発性膵炎の既往、乳糖機能不全の疑い、若年、慢性膵炎なし、血清ビリルビン正常、挿管困難、複数回の膵管へのガイドワイヤー挿入、膵管造影、膵管口切開、内視鏡的乳頭大口径バルーン拡張が報告されているが、遺伝的素因に関する報告はない。PEP の予防には膵管ステントの留置や NSAIDs(Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs)の挿肛が有効と報告されているが、PEP 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 SNP の近傍遺伝子として 13 種類（Serine protease inhibitor, Kazal type I (*SPINK1*), Chymotrypsin C (*CTRC*), Calcium-sensing receptor (*CASR*), Serine Protease 1 (*PRSS1*), Claudin 2 (*CLDN2*), Carboxypeptidase A1(*CPA1*), Gamma-Glutamyltransferase 1(*GGT1*), Carboxyl Ester Lipase (*CEL*), Fucosyltransferase 2 (*FUT2*), Alpha1-3-N-Acetylgalactosaminyltransferase And Alpha 1-3-Galactosyltransferase (*ABO*), Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (*CFTR*), Microrchidia 4 (*MORC4*), Chymotrypsinogen B 1-2 (*CTRB1-2*)）、急性膵炎に関連する遺伝子として 6 種類（*SPINK1, CTRC, PRSS1, CLDN2, MORC4, GGT1*）（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 SNP や遺伝子の報告はない。また、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 TNF-α 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、当研究室では 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、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 SNP や遺伝子を明らかにし、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し、PEP 発症の病態の一端を明らかにすることを目的とした。

【対象と方法】

研究対象は、2019 年 10 月 29 日から 2021 年 9 月 24 日までの間に北海道大学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、先の qPCR で IL-6 アンプとの関連がみられた遺伝子の 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 SNP について、データベースを用いて膵臓における遺伝子発現に対する影響を調べた。さらに、免疫組織染色を行い膵臓における遺伝子の発現を組織学的に確認した。また、その遺伝子が NF-κB 経路のどこで機能しているのかを確認するために、非免疫細胞であるマウス血管内皮細胞株 BC1 細胞で short hairpin ribonucleic acid（sh-RNA）を用いて *GGT1* のノックダウンを行い、共焦点レーザー顕微鏡を使用してサイトカイン刺激前後で NF-κB 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、*GGT1* の 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いという結果であった（*P*=0.02）。背景を揃えるため傾向スコアマッチングを行うと、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、対象患者の末梢血液から抽出した DNA を用いてシークエンスを行い SNP の保有率を調べると、PEP 患者では *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（*P*<0.001）。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かった（*P*<0.001）。以上から、*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 の有無が膵臓において *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 によって膵臓での *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。次に、マウスの皮膚炎に対する *GGT1* の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、*GGT1* は生体内においても 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。*GGT1* がコードしている GGT は膜結合型の酵素で、抗酸化物質であるグルタチオンの代謝に重要な役割を果たしている。さらに、グルタチオンの代謝物の一部は最終的に活性酸素種となる。このように GGT は酸化ストレスと深い関係があり、動脈硬化や心不全など様々な疾患に関与していることが知られている。本研究では、*GGT1* SNP rs5751901 が膵臓での GGT の発現に影響を与えることで膵炎発症に関与している可能性を示すことができ、将来的に PEP の新たなリスク因子や急性膵炎の治療および予防のターゲットとなり得ると考える。

【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。