

## 自己免疫性膵炎発症に関連するIgG4型抗体の認識する 自己抗原の検索、ならびに特異的診断システムの開発

所属 信州大学医学部 内科学第二教室  
研究者 川 茂幸

### 分担研究者

- |                        |        |
|------------------------|--------|
| (1) 信州大学医学部第二解剖学教室     | 中山耕造   |
| (2) エーザイ(株)筑波研究所診断薬研究室 | 下水流 保範 |
| (3) 国立長野病院消化器内科        | 滋野 俊   |

### 要旨

自己免疫性膵炎発症に関連する IgG4 型抗体の認識する自己抗原の検索、ならびに特異的診断システムの開発を目的とした。診断システムの客観的評価に必要な多数症例の臨床像の詳細を明らかにし、患者血清中より特異バンドの検索を試み、測定系確立のための基礎的検討を行った。

### 1. 研究目的

自己免疫性膵炎は膵管の不整狭細、膵腫大、閉塞性黄疸、血清 IgG 高値、リンパ球浸潤を伴う著明な線維化、ステロイドに対する良好な反応性によって特徴づけられる特異な慢性膵炎である。本疾患は(1)ステロイドが著効する(2)膵癌との鑑別困難例を認める、の2点より迅速かつ正確な診断が臨床的に求められている。われわれは本疾患の患者血清で IgG4、IgG4 型免疫複合体が特異的に増加することを報告した。(New Engl J Med, 344:732-8,2001)。従って、本疾患における IgG4 の測定ならびに、IgG4 抗体が認識する自己抗原を同定することにより特異的な診断システムを確立できると考えられる。本疾患の臨床像、臨床経過、膵管像や Gallium scintigraphy など膵画像の詳細については不明な点が多く、検討することが必要である。膵外病変の合併が報告されており、全身性疾患 multifocal diopathic fibrosclerosis (MIF)との関連が注目されている。特定の HLA 抗原との関連を証明することができれば、特定の抗原に対する免疫応答の存在を確信できさらに、本研究の意義をより明確にすることができる。上記の諸点を明らかにする目的で、本研究は自己免疫性膵炎の(1)臨床的検討、(2)基礎的検討の両面から仕事を進め、(1)臨床的検討については(a)本疾患の臨床像の詳細を明らかにする(川 茂幸、滋野 俊)、(b)後腹膜線維症など膵外病変の詳細を明らかにする(川 茂幸)、(c)免疫遺伝学的背景(HLA 抗原との関連)を明らかにする(川 茂幸)の3点について検討した。(2)基礎的検討については(a)IgG4 型自己抗体が認識する自己抗原の解析(中山耕造)、(b)測定系確立のための基礎的検討(下水流保範)を行った。

### 2. 研究方法

A. 臨床的検討 1993年から2002年までの間に信州大学医学部第二内科、ならびに関連施設で診断・診療された自己免疫性膵炎症例44例について以下の臨床的検討を行った。

(a) 本疾患の臨床像の詳細を明らかにする

(1) 臨床所見、(2)画像所見特に膵管像と Gallium scintigraphy 所見

(b) 後腹膜線維症など膵外病変の検討

(c) 免疫遺伝学的背景(HLA 抗原との関連)の検討

B. 基礎的検討 正常膵組織、患者血清を用いて以下の基礎的検討を行った。

(a) IgG4 型自己抗体が認識する自己抗原の解析

(b) 測定系確立のための基礎的検討

本研究はヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成 13 年 3 月 29 日 文部科学省・経済産業省告示第 1 号）を遵守して行い、上記の点については信州大学医学部医倫理委員会の承認を得た。

### 3. 研究成果

#### (a) 本疾患の臨床像の詳細を明らかにする

##### (1) 臨床所見

年齢は  $61.3 \pm 10.3$  (32-75) で男：女=34：7 (男性 82.9%) であり、高齢者男性に好発する傾向を認めた。初発症状では閉塞性黄疸を 68%に認め、急性膵炎様の高度の腹痛を呈する症例はほとんどなく、心窩部不快感を 78%に認めた。膵内胆管の狭窄・閉塞を示す胆道系酵素の上昇を 80%に、ビリルビンの上昇を約 54%に認めた。膵酵素の上昇を 34-75%に認めたが、高度の異常は認められなかった。CA19-9 の上昇は 58%に認められ胆汁鬱滞に起因すると考えられた。膵機能検査では HbA1c の上昇を 50%に、Bentiromide test の低下を 79%に認めた。血清 $\gamma$ グロブリン、IgG の陽性率は 59.1%と 70.5%であった。IgG 正常例は 13 例 (29.5%) で、そのうち 9 例が IgG4 が陽性であり、IgG4 の陽性率は 90.9%であった。各種自己抗体の陽性率を比較すると抗核抗体の陽性率は 38.6%であり、いずれかの自己抗体が陽性であったとした場合は 79.5%以上となるが、個々の既存の自己抗体の陽性率は 10~30%程度であった。本疾患ではシェーグレン症候群の合併が報告されているが SS-A、SS-B 抗体の陽性者は認められなかった。44 例の経過を検討すると、ステロイド投与例は 37 例、非投与例は 7 例であった。再燃例は 9 例で全例ステロイド投与例であり、時期は初発時から 3~72 ヶ月 (平均 26 ヶ月)、再燃時のプレドニゾロン投与量は平均 4.7mg/dl であった。全例初発時 IgG4 高値例であった。再燃の形態は膵を中心に再燃する場合 (4 例) と、膵腫大を認めず胆管病変を中心に再燃する場合 (5 例) があった。初発時の免疫複合体 (CIC) の値が、膵を中心に再燃する例で有為が高く、初発時 CIC 値が膵病変再燃の予測因子と考えられた。44 例中 6 例で膵石の合併を認め、4 例が経過中に新たに発生した。4 例中、3 例が再燃例であり、再燃例で経過中に膵石を発生した症例は 3/9 (33.3%) であった。膵石を認めた 6 例全例が初発時に IgG4、CIC 高値例であった。

##### (2) 画像所見特に膵管像と Gallium scintigraphy 所見

膵管像では全例に径 3mm 以下の不整狭細像を主膵管に認めた。膵全体に認めるものを 48%、頭部に限局 26%、頭部と尾部に限局 15%、体部と尾部 11%であった。主膵管の限局性変化を認める症例 2 例で、2 ヶ月、6 ヶ月の経過でび漫性的変化に進展した。膵内胆管の狭窄はほぼ全例に認められ、一部の症例で内視鏡的ドレナージを施行した。67%の症例でステロイド治療後に主膵管の狭細像が 70%以上に改善した。膵胆管の狭細像はステロイド治療により軽快し、内視鏡的ドレナージを施行例で 1 ヶ月以内にドレナージを抜去可能であった。経過観察中に硬化性胆管炎を発症した例ではステロイド治療によりすみやかに胆管像の軽快を認めた。

62%の症例で膵臓にガリウムの集積を認め、ステロイド治療により消失した。IgG ならびに IgG4 が取り込み群で有為の高かった。58%の症例で肺門部に集積を認め、そのうち 11/14 例が膵に、3/14 例が膵と唾液腺にも集積を認めた。肺門部の集積は膵の集積と同様、ステロイド治療により消失した。膵の集積と同様、IgG ならびに IgG4 が取り込み群で有為の高かった。

#### (b) 後腹膜線維症など膵外病変の詳細を明らかにする

自己免疫性膵炎患者 3 例に経過中、後腹膜線維症による水腎症を認めた。これらの症例で自己免疫性膵炎ならびに後腹膜線維症が発症した時点の IgG4 の値は高値であった。膵臓、後腹膜両組織とも IgG4 陽性の形質細胞の著明な浸潤を認めた。以上の 3 例より自己免疫性膵炎では後腹膜線維症を合併し、両者の病態に IgG4 の関与が考えられた。

#### (c) 免疫遺伝学的背景 (HLA 抗原との関連) を明らかにする

自己免疫性膵炎患者と健常人の間では、HLA-class I 抗原について有意差を認めなかった。Class II 抗原では DR4, DQ4 抗原が自己免疫性膵炎患者で頻度が有為の高かった (73% vs 44%,  $P=0.01$ , 58% vs 26%,  $P=0.001$ )。また、DR4, DQ4 subtype では DRB1\*0405 と DQB1\*0401 allele の頻度が自己免疫性膵炎患者で有為の高かった (58% vs 21%,  $P=0.000026$ , 58% vs 21%,  $P=0.000017$ )。自己免疫性膵炎患者では慢性石灰化膵炎患者に対しても DRB1\*0405 と DQB1\*0401 の頻度が有為の高かった。DRB1\*0405 と DQB1\*0401 は日本人では 100%連鎖不平衡の関係にあり、どちらの

抗原が自己免疫性膵炎と関連しているか特定できない。また自己免疫性肝炎では DRB1\*0405-DQB1\*0401 haplotype と B54 との相関が報告されているが、自己免疫性膵炎では有為な相関を認めなかった。従って本疾患は自己免疫性肝炎とは免疫遺伝学的背景が異なっていると考えられた。

## B. 基礎的検討

### (d) IgG4 型自己抗体が認識する自己抗原の解析

膵臓の全蛋白質を SDS-電気泳動し、複数の自己免疫性膵炎の患者血清と、複数の正常人血清を用いてウエスタンブローディングした。患者血清と正常人血清の両方で検出される、数本のバンドが認められた。これらの共通なバンドとは別に、患者血清に特有の 23kDa のバンドを認めた。なお、この 23kDa のバンドのすぐ上に、患者血清と正常人血清共に反応する 25kDa のバンドが検出された。23kDa のバンドは、検定した全ての自己免疫性膵炎患者の血清で検出されるが、用いた全ての正常人の血清には反応しない。シェーグレン症候群等の自己免疫性疾患の対応抗原として報告されている carbonic anhydrase の分子量が、患者血清によって検出される 23kDa の蛋白質と近いと、精製した carbonic anhydrase を用いてウエスタンブローディング及び抗体吸収実験によりその異同を調べた。その結果、患者血清と正常人血清共に反応する 25kDa のバンドが carbonic anhydrase そのものであり、患者血清によって特異的に検出される 23kDa の蛋白質は carbonic anhydrase とは異なっていると結論した。これらの結果から、23kDa の蛋白質が自己免疫性膵炎の対応抗原として有力な候補であると考えられ、この抗原の精製を試みた。抗原の分画及び精製については、膵臓をホモジュネートにし、遠心操作により可溶性画分と不溶性画分に分離したところ、患者血清によって特異的に検出される 23kDa の蛋白質は不溶性の画分に存在した。この不溶性画分を 8 M 尿素で可溶化し、DEAE カラムクロマトグラフィーを行い、NaCl の濃度勾配により分画した。患者血清を用いたウエスタンブローディングにより、175mM NaCl で溶出されるフラクションに目的の蛋白質を認めた。このフラクションを用いて二次元電気泳動を行い、ウエスタンブローディングをおこなったところ、分子量 23kDa、等電点 7.5 付近に患者血清とのみ反応するスポットが認められた。同様に、このフラクションを二次元電気泳動して銀染色を行ったところ、分子量 23kDa、等電点 7.5 付近に多数のスポットが認められたため、さらに CM セルロースカラム等により精製を進め、電気泳動後、スポットを切り出し、TOF-MAS により蛋白質の同定をおこなった。その結果、数種類の蛋白質が同定された。現在、精製蛋白質を用いたウエスタンブローディングや免疫沈降法をおこない、患者血清との反応性を検討している。

### (e) 測定系確立のための基礎的検討

#### (1) Ru 標識抗ヒト IgG4 モノクローナル抗体 (Ru 標識 IgG4 抗体) の作製

特異的自己抗体測定系の間接法に使用する Ru 標識 IgG4 抗体を作製し、免疫学的な評価は、総 IgG4 測定系で行った。総 IgG4 測定系を用いて試験した Ru 標識 IgG4 抗体 (濃度: 0.2 μg/ml) による非特異反応 (試薬ブランク) は、非常に低い ECLIA カウント値を示し、特異的自己抗体測定系で使用できる可能性が得られた。

#### (2) 総 IgG4 測定系の確立

総 IgG4 測定系として、定量性を有した 1Step ECLIA 法を確立した。本測定法は、広い測定範囲 (0.005mg/dl~5mg/dl: 1000 倍) を有しかつ短時間測定 (9 分) が可能であった。本測定法を用いて健常人 10 例、糖尿病 131 例、自己免疫性膵炎 21 例の血清について IgG4 濃度を測定した結果、健常人、糖尿病、自己免疫性膵炎血清における平均 IgG4 濃度と SD は、それぞれ  $39.7 \pm 29.3597$ 、 $44.1 \pm 50.0203$ 、 $1661.1 \pm 2711.043$  であった。健常人の平均値  $\pm 2SD$  (98.4194) をカットオフ値とした場合、自己免疫性膵炎では、全例がカットオフ値以上であり、川らの臨床成績とほぼ一致した結果であった。これに対し糖尿病は、比較的高い陽性率 (13.0%) を示し、しかもその全例が I 型ではなく II 型の糖尿病であった。また自己免疫性膵炎は、健常人および糖尿病のいずれに対しても明らかに有意な定量値を示した (Fisher の PLSD 検定)。

## 4. 考察、まとめ

### A. 臨床的検討

自己免疫性膵炎の臨床像を検討した結果、高齢者男性に好発し、閉塞性黄疸を初発とすることより膵癌との鑑別が重要と考えられた。本疾患では既存の自己抗体の陽性率は低く、特定の抗原に対する自

己抗体が存在すると考えられる。各血清マーカーの陽性率を比較すると、IgG4 の診断能が最も優れていた。また膵癌を対象とした場合の IgG4 の特異度も良好であった。経過を検討すると、膵頭部を含む広範囲な病変を有した活動性の高い症例に再燃が認められた。そして、初発時の免疫複合体 (CIC) の値が、膵を中心に再燃する例で有為が高く、予測因子と考えられ、臨床的には緩解状態でも活動性が完全には抑えられていないと考えられた。本疾患の画像所見は病態に応じて多様に変化することが明かとなった。本疾患では活動期に膵ならびに肺門部に Ga-67 が集積し、血清 IgG4 値の上昇と相関を認めたことより、ガリウムシンチグラフィが本疾患と膵癌を鑑別する有用な方法と考えられた。また、後腹膜線維症合併例の検討より本疾患は multifocal idiopathic fibrosclerosis (MIF) に包括される概念と考えられ、IgG4 がその病態に関与していると考えられた。本疾患では DRB1\*0405-DQB1\*0401 haplotype の頻度が有為が高く、これらの抗原で呈示される特定の抗原ペプチドに対する免疫応答が発症の引き金になっていると考えられた。自己免疫性膵炎では特定の抗原に対する自己抗体が存在すると考えられ、今後さらに研究を進めていく必要があると考えられた。

#### B.基礎的検討

自己免疫性膵炎の患者血清に反応する、23kDa,等電点約 7.5 の蛋白質を検出した。この蛋白質は、シェーグレン症候群等の自己免疫性の病原抗原として報告されている carbonic anhydrase とは異なっていた。なお本研究では、carbonic anhydrase は患者血清、正常血清共に反応する、25kDa の分子として検出された。この患者血清に特異的に反応する 23kDa 蛋白質を部分的に精製し、電気泳動後、スポットを切り出し、TOF-MAS を用いて数種類の蛋白質を同定した。今後、精製蛋白質を用いたウエスタンブローディングや免疫沈降法をおこない、患者血清との反応性を検討している。

特異的自己抗体測定系の特異性のコントロールになり得ると思われる総 IgG4 測定系 (1 Step Sandwich Type ECLIA) を確立した。今後、「自己免疫性膵炎の起因抗原の解明」と「特異的自己抗体測定系の開発」に注力する。

#### 5. 研究発表

Saegusa H, Momose M, Kawa S, Hamano H, Ochi Y, Takayama M, Kiyosawa K, & Kadoya M. Hilar and Pancreatic Gallium-67 Accumulation is Characteristic Feature of Autoimmune Pancreatitis. *Pancreas* (in press)

Hamano, H. Kawa, S. Ochi, Y. Unno, H. Shiba, N. Wajiki, M., Nakazawa, K. Shimojo, H. & Kiyosawa, K. Sclerosing pancreatitis complicated with hydronephrosis caused by retroperitoneal fibrosis. *Lancet*. 359:1403-1404(2002)

kawa, S. Ota, M. Yoshizawa, K. Horiuchi, A. Hamano, H. Ochi, Y. Nakayama, K. Tokutake, Y. Katsuyama, Y. Saito, S. Hasebe, O. & Kiyosawa, K. HLA DRB1\*0405-DQB1\*0401 haplotype is associated with autoimmune pancreatitis in the Japanese population. *Gastroenterology*. 122:1264-1269(2002)

Horiuchi, A. Kawa, S. Hamano, H. Hayashi, Y. & Kiyosawa, K. Does a lack of reactivity to a-fodrin indicate the existence of primary autoimmune pancreatitis. *Am J Gastroenterol*. 97:1275-1277(2002)

Horiuchi A, Kawa S, Hamano, H. Hayama, M. Ota, H. & Kiyosawa, K. ERCP features in 27 patients with autoimmune pancreatitis. *Gastrointest Endosc*. 55:494-499(2002)

Horiuchi A, Kawa S, Hamano H, Ochi Y, Kiyosawa K. Sclerosing pancreato-cholangitis responsive to corticosteroid therapy: report of 2 case reports and review. *Gastrointest Endosc*. 53:518-522(2001)

Akahane, C. Takei, Y. Horiuchi, A. Kawa, S. Nishimura, K. & Ikeda, S. A primary Sjogren's syndrome patient presenting marked swelling of multiple exocrine glands and sclerosing pancreatitis. *Internal Medicine* 41:749-753(2002)

川 茂幸、浜野英明、海野 洋、三枝久能、越知泰英、堀内 朗 膵管狭細型膵炎における免疫学的検討—IgG4 の関与を中心として—、胆と膵、22: 603-608 (2001).

浜野英明、川 茂幸、越知泰英、海野 洋、三枝久能、高山真理、堀内 朗、清澤研道 自己免疫性膵炎をめぐる最近の話題—免疫生化学検査— 肝胆膵 43:225-231(2001).

浜野英明、川 茂幸、越知秦英、清澤研道. 病因・病態生理、A 臨床面よりの検討、d 自己免疫現象よりみた検討. 48-55 頁、土岐文武、岡崎和一 編、自己免疫性膵炎—概念と病態 up-to-date —、診断と治療社 (2001).

堀内 朗、川 茂幸 合併症・随伴疾患 B 胆管病変 (3)、—硬化性胆管炎を合併した自己免疫性膵炎—. 109-114 頁. 土岐文武、岡崎和一 編、自己免疫性膵炎—概念と病態 up-to-date —、診断と治療社 (2001).

浜野英明、川 茂幸、越知秦英、清澤研道. 症例呈示 (4)、—IgG4 関連膵炎 (IgG4 関連膵胆管炎) の再燃症例の呈示. 143-150 頁、土岐文武、岡崎和一 編、自己免疫性膵炎—概念と病態 up-to-date —、診断と治療社 (2001).

川 茂幸、自己免疫性膵炎. 信州医学雑誌 50:233-240(2002)

川 茂幸、浜野英明. 自己免疫性膵炎診断基準の解説 2. 血清学的診断. 膵臓 17:607-610(2002)

## 6. 知的所有権の取得状況

- 1) 特許取得 なし
- 2) 実用新案特許 なし
- 3) その他 なし