

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業
IgG4 関連疾患に関する調査研究
分担研究報告書

接着制御分子破綻による自己免疫発症の機構

研究分担者 木梨達雄 関西医科大学附属生命医学研究所 教授

研究要旨：接着制御因子 RAPL, その会合分子 Mst1 は免疫細胞の接着・移動を制御分子を欠損したマウスは加齢とともに血清 IgG 値や自己抗体産生亢進など自己免疫症状やリンパ増殖性病態を呈する。最近、ヒト MST1 遺伝子変異が見出され、免疫不全と自己免疫症状を呈する複雑な病態であることが報告された。我々はこれらの原因とヒト IgG4 関連疾患における関与を解析した。その結果、Mst1 欠損マウスは胸腺細胞の接着障害によって胸腺選択が障害され、また、制御性 T 細胞産生と機能にも異常があることが判明した。ヒト自己免疫性膵炎・IgG4 関連疾患患者では、膵外病変もつ患者群でヒト MST1 遺伝子プロモーター領域にある CpG クラスターのメチル化が有意に亢進しており、MST1 の発現低下が IgG4 関連疾患の病態に関連していることが示唆された。

共同研究者

植田祥啓 関西医科大学附属生命医学研究所
富山尚 関西医科大学第3内科
安田鐘樹 関西医科大学泌尿器科
片貝智哉 関西医科大学附属生命医学研究所
近藤直幸 関西医科大学附属生命医学研究所

A. 研究目的

接着制御分子 RAPL およびその会合分子 Mst1 は免疫細胞の接着や体内動態を制御しているが、これらの遺伝子欠損マウスは加齢とともに血清 IgG 値亢進、自己抗体陽性、膵臓、肺、肝臓、唾液腺などにリンパ球浸潤、おこり、自己免疫様症状を呈する(参考文献 1)。これらの病態はヒト難治性 IgG4 関連全身疾患との類似性をもつことから、その病因を探るとともに、IgG4 疾患における接着制御分子の異常の有無を明らかにする。RAPL, Mst1 ともにプロモーター領域は CpG に富み、腫瘍性疾患で DNA メチル化による発現低下が報告されている(参考文献 2、3)。そこで IgG4 関連疾患において Mst1, RAPL 遺伝子の DNA メチル化と発現を検討する。

B. 研究方法

接着制御分子 Mst1 欠損マウス、OVA 特異的 OT-II, Foxp3-GFP マウス、および RIPmOVA トランスジェニックマウスを用いて胸腺正、負の選択を調べ、さらに胸腺組織スライスを用いて胸腺細胞の組織内動態を 2 光子顕微鏡によって解析する。またリンパ節スライスを用いて OT-II;Foxp3-GFP;Mst1-/- の制御性 T 細胞の抗原特異的抑制機能と抗原提示細胞への影響を調べる。また IgG4 関連疾患における Mst1, RAPL 遺伝子の sodium bisulfite 法によるメチル化マッピングを行う。

(倫理面への配慮)

マウスは SPF 環境において飼育し、適切な動物愛護の配慮のもとに実験を行う。本実験の遺伝子組換え動物実験計画は、関西医科大学動物実験委員会の承認を得ている。

承認番号：09-100、課題番号「接着分子インテグリンを介する細胞接着の分子機構」研究代表者 木梨達雄

患者検体を用いた DNA 解析は文書による説明、同意を得たうえで行う。解析データについては匿名化、連結可能匿名化を行い、個人情報として特定できないようにする。本解析は、関西医科大学医学倫理委員会の承認を得ている。

承認番号 関医倫第 0903 号 課題名

「IgG4 関連疾患・自己免疫性膵炎における疾患関連遺伝子の解析」

主任研究者 岡崎和一 内科学第三講座・教授

分担研究者 木梨達雄

C. 研究結果

組織特異的自己抗原による負の選択として OT-II/RIPmOVA の系を用いた結果、Mst1 欠損マウスでは負の選択が障害されていたことから、胸腺組織を用いた 2 光子レーザー顕微鏡による胸腺細胞動態解析を行った。RIPmOVA マウス由来胸腺組織では OT-II 胸腺細胞と Aire 陽性髄質胸腺上皮細胞 (mTEC) との抗原依存的接着が LFA-1/ICAM-1 を介して起こるが、Mst1 欠損胸腺細胞では mTEC との接着が低下していた。Mst1 欠損マウスでは胸腺での制御性 T 細胞 (Treg) の発生が低下していたが、末梢では Treg (CD4+Foxp3+) の数は回復していた。Rag2^{-/-}への T 細胞移入による大腸炎モデルを用いて Treg の機能を検討した。その結果 Mst1 欠損 Treg では大腸炎発症を抑制できず、激しい大腸炎を惹起した。また、OT-II を用いて抗原特異的抑制を検討した結果、Mst1 欠損によって抗原非特異的抑制は正常であるが、OVA によるナイーブ T 細胞の抑制が障害されていた。リンパ節スライスを用いて、OVA 抗原提示樹状細胞と OT-II:Foxp3⁺ Treg および OT-II naive T

細胞の相互作用をライブイメージングによって解析した結果、Mst1 欠損 Treg は樹状細胞への接着が著しく障害されていた。

IgG4 関連自己免疫性膵炎患者 (20 名) の末梢血と健常人 (10 名) を単離し、RAPL, MST1 遺伝子プロモータ領域の CpG メチル化を bisulfite mapping のよって調べた。その結果、RAPL については有意差はなかった。Mst1 については膵外病変 (唾液腺炎、後腹膜線維症、肺病変、縦隔リンパ節腫大など) を持つ患者で有意にメチル化が亢進していた。現在、Mst1 蛋白質のレベルを解析中である。

D. 考察

Mst1 による LFA-1・ICAM-1 を介した胸腺細胞の接着、移動は胸腺髄質の移動や mTEC に提示されている自己抗原の認識に重要であることがあることが明らかになった。また、制御性 T 細胞の発生が低下し、末梢組織では回復しているが、抗原特異的抑制機能が障害されていることが判明した。これらの障害は抗原提示細胞との接着不全であることが、イメージング解析から明らかになったが、これらの接着は LFA-1 を介しておこっており、おそらく Mst1 欠損による LFA-1/ICAM-1 を介する接着障害が根本にあると予想される。

ヒト IgG4 関連疾患において膵外病変を持つ患者において Mst1 のメチル化が有意に高いことから、多臓器にわたる IgG4 関連疾患の自己免疫症状に Mst1 のメチル化による発現低下が関与していることが予想される。今後、症例を増やすとともに、タンパク質レベルの解析を行う。(論文準備中)。

E. 結論

Mst1 は胸腺細胞の LFA-1/ICAM-1 を介する接着を制御することによって組織特異的抗原に対する自己寛容形成や制御性 T 細胞の機能に重要であることがあきらかになった。また、脾外病変をもつ IgG4 関連疾患の病態に MST1 遺伝子のメチル化が関与していることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Ueda Y., Katagiri K., Tomiyama T., Yasuda K., Habiro K., Katakai T., Ikehara S., Matsumoto M., Kinashi T. Mst1 regulates integrin-dependent thymocyte trafficking and antigen-recognition in the thymus. *Nat Commun.* 2012 Oct 2;3:1098. doi: 10.1038/ncomms2105.
2. Sekine K., Kawauchi T., Kubo K., Honda T., Herz J., Hattori M., Kinashi T., and Nakajima K. Reelin controls neuronal migration and positioning by promoting neuronal adhesion to extracellular matrix via the inside-out activation of integrin alpha5beta1. *Neuron.* 76:353-69:2012
3. Fujii Y., Shiota M, Ohkawa Y., Baba A., Wanibuchi H., Kinashi T., Kurosaki T., Baba Y., Surf4 modulates STIM1-dependent calcium entry, *Biochem Biophys Res Commun.* 422:615-20:2012
4. Harada Y., Tanaka Y., Terasawa M., Pieczyk M., Habiro K., Katakai T., Hanawa-Suetsugu K., Kukimoto-Niino M., Nishizaki T., Shirouzu M., Duan

X., Uruno T., Nishikimi A., Sanematsu F., Yokoyama S., Stein J.V., Kinashi T., and Fukui Y.. DOCK8 is a Cdc42 activator critical for interstitial dendritic cell migration during immune responses. *Blood* 119:4451-61: 2012

5. Hnanawa-Suetsugu K., Kukimoto-Niino M., Mishima-Tsumagari C., Akasaka R., Ohsawa N., Sekine S., Ito T., Tochio N., Koshiba S., Kigawa T., Terada T., Shirouzu M, Nishikimi A., Uruno T., Katakai T., kinashi T., Kohda D., Tukui Y., and Yokoyama S., Structural basis for mutual relief of the Rac guanine nucleotide exchange factor DOCK2 and its partner ELM01 from their autoinhibited forms. *Proc Natl Acad Sci USA.* 109:3305-10:2012
6. 木梨達雄 インテグリン制御によるリンパ球動態、感染 炎症 免疫、Vol. 42:20-31、2012

2. 学会発表

1. TOMIYAMA Takashi, Roles of Mst1 in antigen-specific suppressor function of regulatory T cells. 第41回日本免疫学会学術集会 2012年12月5日-7日 神戸
2. 木梨達雄 免疫細胞の組織内動態制御：イメージング手法による接着制御とその破綻の解析 第二回癌・免疫若手セミナー 2012年9月21日 関西医科大学枚方病院 13階講堂
3. 木梨達雄、片貝智哉、植田祥啓、羽廣克嘉 関西医科大学附属生命医学研

研究所分子遺伝学部門 免疫細胞の
組織内移動と停止の制御：イメージン
グ手法による接着制御の解析 バイ
オイメージング学会 2012年8月
28日 京都国際会館

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

IgG4 関連疾患 胸郭内病変自験例の検討

研究分担者 三嶋 理晃 京都大学大学院医学研究科呼吸器内科 教授

研究要旨：京都大学病院呼吸器内科および免疫膠原病内科で診断した IgG4 関連疾患 16 例中 5 例（31%）に胸郭内病変を認めた。胸郭内病変は中高年の男性に多く、胸部 CT では肺門縦隔リンパ節腫大の頻度が高かった。非喫煙者においても閉塞性障害を認める症例が存在した。5 例中 3 例がステロイド内服治療に反応し、2 例は経過観察にて安定していた。胸郭内病変のない症例と比較して罹患臓器数が多いことが確認された。

共同研究者

半田知宏^{1,2}、池添浩平¹、渡辺創¹、相原 顕作¹、谷澤公伸¹、久保武³、陳和夫⁴、三森経世⁵

¹ 京都大学医学部附属病院呼吸器内科

² 京都大学医学部附属病院リハビリテーション部

³ 京都大学医学部附属病院放射線診断部

⁴ 京都大学医学部附属病院呼吸管理睡眠制御学講座

⁵ 京都大学医学部附属病院免疫・膠原病内科

A. 研究目的

IgG4 関連疾患において、胸郭内病変を有する症例の特徴を明らかにする。

B. 研究方法

2012 年 3 月までに京都大学附属病院呼吸器内科、免疫膠原病内科で IgG4 関連疾患と診断された 16 症例を対象に、胸郭内病変の疫学と臨床、画像的特徴について検討した。

（倫理面への配慮）

研究目的の臨床情報の利用につき患者本人より同意を得た。

C. 研究結果

結果を表 1 に示す。胸郭内病変は 16 例中 5 例（31%）に認められ、男性 3 例、胸郭内病変の発症年齢は中央値 66 歳（53–79 歳）で、1 例が IgG4 関連疾患診断から 10 年後であった他は IgG4 関連疾患の診断に先行または同時に認めた。4 例が非喫煙者で、呼吸器症状は全例認めなかった。末梢血好酸球の上昇は 4 例中 2 例で認めた（8.9–15.8%）。KL-6 は 2 例で測定し、237, 505 IU/L と 1 例で境界値であった。血清 IgG4 は中央値 918 mg/dL（349–1460 mg/dL）であり、胸郭内病変を有さない症例（中央値 655 mg/dL（309–2890 mg/dL））と比較して統計的有意差を認めなかった。肺機能検査を施行した 3 例で拘束性障害は認めなかった一方、2 例で閉塞性肺機能障害を認め、1 例は非喫煙者であった。胸部 HRCT では、肺門縦隔リンパ節腫大（BHL）スリガラス陰影、結節影、網状陰影、小葉間隔壁肥厚、気管支血管束肥厚が認められた。5 例中 3 例で全身ステロイド治療（PSL 30–36mg/日）が行われ、1 例が寛解、2 例で胸郭内病変の改善を認めた。2 例は経過観察にて不変であった。また、罹患臓器数は胸郭病変ありでは 3 臓器（2–6）、胸郭病変なしで 2 臓器（1–4）と有意差を認めたが（Man-Whitney U 検定 $p < 0.05$ ）、胸隔外病変数には差を認めなかった。

表 1 胸郭内病変を有する 5 症例の特徴
数値は中央値（範囲）または症例数（割合）

性別	男性 3 例（60%）
IgG4 関連疾患診断年齢	73 歳（53-80 歳）
肺病変発症年齢	66 歳（53-79 歳）
喫煙歴	非喫煙者 4 例、現喫煙者 1 例
アレルギー歴	2 例（40%）
呼吸器症状あり	0 例（0%）
末梢血 好酸球上昇	2 / 4 例（50%）
血中 IgG4 (mg/dl)	918（349-1460）
KL-6 (IU/L)	237, 505
肺機能検査	
%VC (%)	104.8（96.5-105.4）
FEV1/FVC (%)	60.4（58.3-92.1）
%DLCO (%)	67.5（55.9-75.0）
全身ステロイド治療	3 例（60%）
予後	治療例は全例改善。経過観察例は安定。

D. 考察

既報によると、IgG4 関連疾患における胸郭内病変の頻度は 14-54% (1, 2) で中高年の男性に多く、胸部画像所見は多彩であるが、肺門リンパ節腫大の頻度が 40-90% と高い(2, 3)。気道病変によって閉塞性障害を呈する症例も報告されている(4, 5)。一般に全身ステロイド治療に対する反応性はよい(3)。一方で、その危険因子や長期経過、間質性肺炎との因果関係、難治症例の病態、KL-6 などのバイオマーカーの意義など、不明な点も多い。今回の検討では、胸郭内病変の疫学や画像所見、治療反応性、予後については既報に合致する結果が得られた。

また、胸郭内病変を有する症例では全罹患臓器数が多いという結果が認められたが、血清 IgG4 値は他の症例と差を認めなかった。引き続き肺病変の後方視研究に症例を登録していく予定である。

E. 結論

IgG4 関連疾患の胸郭内病変は、多彩な肺機能検査、画像所見を呈する治療反応性良好な疾患である。

F. 参考文献

- 1 Zen Y, Nakanuma Y. IgG4-related disease: a cross-sectional study of 114 cases. *Am J Surg Pathol* 2010;34:1812-9.
- 2 Fujinaga Y, Kadoya M, Kawa S, et al. Characteristic findings in images of extra-pancreatic lesions associated with autoimmune pancreatitis. *Eur J Radiol.* 2010;76:228-38.
- 3 Ryu JH, Sekiguchi H, Yi ES. Pulmonary manifestations of IgG4-related sclerosing disease. *Eur Respir J* 2011.
- 4 Ito M, Yasuo M, Yamamoto H, et al. Central airway stenosis in a patient with autoimmune pancreatitis. *Eur Respir J* 2009;33:680-3.
- 5 Yamamoto H, Yasuo M, Ito M, et al. Clinical features of central airway involvement in autoimmune pancreatitis. *Eur Respir J* 2011;38:1-4.

G. 研究発表

1. 論文発表

半田知宏、三嶋理晃：AIP 関連疾患の再認識 肺病変-間質性肺炎。肝胆膵 2012;64:91-95.

2. 学会発表

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当なし

IgG4 関連疾患のバイオマーカー探索

研究分担者 坪内 博仁 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科
消化器疾患・生活習慣病学 教授

研究要旨：自己免疫性膵炎（AIP）を含む IgG4 関連全身疾患は、高 IgG4 血症と病変組織中の著明な IgG4 陽性形質細胞浸潤を特徴とする疾患である。これまでプロテオミクスを用い、IgG4 関連全身疾患、特に AIP の新しい診断マーカーを探索してきた。

プロテオミクスを用い、健常者とステロイド使用のない AIP 患者群、また AIP 患者の治療前後の比較で、有意に変化するピーク蛋白を認めた。また、二次元電気泳動法によるプロテオミクスでも治療により増減する多数の蛋白が認められ、そのうち 3 つの蛋白（Apolipoprotein E、Transthyretin、amyloid-P component）が同定された。また、AIP 治療前後でのフラクタルカインの発現について検討を行い、治療前後で変化を認め、活動性評価や治療効果予測に有用である可能性が示唆された。

A. 研究目的

自己免疫性膵炎（AIP）を含む IgG4 関連全身疾患は、高 IgG4 血症と病変腺組織中の著明な IgG4 陽性形質細胞浸潤を特徴とする疾患である。血清 IgG4 は IgG4 関連疾患の活動性指標として有用であるが、臓器特異性がない。膵病変の評価には、侵襲性の高い内視鏡下の造影検査などが必要であり、AIP の簡便な診断法の確立が望まれる。

本研究の目的は、プロテオミクスを用い、IgG4 関連疾患、特に AIP の新しい診断マーカーを同定することである。また、AIP 治療前後でのフラクタルカインの変化について検討し治療評価マーカーとしての有用性を検討する。

B. 研究方法

①AIP 患者（ステロイド治療前、治療後を含む）、アルコール性膵炎患者、特発性膵炎患者、膵臓癌患者および健常者の血清を用いた。ClinProtビーズにより試料を調整し、MALDI-TOF/MS にて解析した。また、ProteoMiner Kit の前処置を行った後、二次元電気泳動による解析を行った。

②プロテインアレイ（ProtoArray Human Protein Microarray）を用いた免疫応答バイオマーカープロファイリングにより AIP 患者血清中の自己抗体を探索し、ELISA により抗体価を測定した。

③AIP 治療前後、健常人におけるフラクタルカイン測定した。

なお、本研究は関西医科大学内科学第三講座（内田一茂講師、岡崎和一教授）、信州大学健康安全センター（川 茂幸教授）との共同研究であり、関西医科大学附属病院、信州大学健康安全センターおよび鹿児島大学附属病院で取得した患者サンプルを使用した。

（倫理面への配慮）

a. 個人の人権の擁護:1) 研究内容について十分な説明を行い、研究への参加は任意であること、研究に参加しない場合でも、従来通り診療を受けることができることを示す。2) 参加者のデータは、厳重な秘密保持のもとに管理され、本研究のデータが参加者に不利益を及ぼすことはないと考えられる。

- b. 個人情報の管理:1) ID 番号、氏名、住所、電話番号などの個人を特定できる情報を除いたものを作製し、新たな番号を付与し、本研究にはこの番号のみを用い、個人が特定できる名前などを用いない。2) 対象者由来の血液サンプルは個人が同定できる情報を消去して、番号を付与する。
- c. 対象者に理解を求め同意を得る方法: 担当医より、研究内容について説明を行ない、書面による同意を得る。
- d. 研究等によって生じる個人への不利益: 静脈穿刺は侵襲性はほとんどなく、被験者に不当な危険が生じることはほとんどない。個人のプライバシーに関わる点については上記のように十分な配慮を行い、対象者の不利益が生じないようにする。

C. 研究結果

- ①治療前後の AIP 患者血清を比較した結果、2660m/z、2861m/z、3239m/z、5900m/z のピーク蛋白で、治療後の有意なピーク強度低下が認められた。また、これらの治療前ピーク強度は治療前の IgG4 値とよく相関していた。MS/MS イオンサーチ法により 2660m/z、2861m/z のピーク蛋白は fibrinogen alpha chain と同定された。しかしこの 2 つのピーク蛋白はアルコール性膵炎で特に上昇しており、AIP に特異的ではなかった。3239m/z、5900m/z のピーク蛋白については同定に至っていないが、5900m/z のピーク強度は他の膵炎と比較し AIP で特に上昇していた。また、ClinProt 疎水性ビーズ (C8) を用いた解析では、3224m/z など治療後有意にピーク強度が低下するピーク蛋白に加え、治療後にピーク強度が有意に上昇する 2953m/z などのピーク蛋白も認められたが、まだ同定には至っていない。

治療前後の AIP 患者血清を用いた二次元電気泳動による解析では、治療後に変化する蛋白のうち、3 つの蛋白 (apolipoprotein E、

transthyretin、serum amyloid-P component) が同定された。ELISA による測定では apolipoprotein E と transthyretin が治療後に上昇し、serum amyloid-P component は治療後に低下していた。しかしながら、健常者、特発性膵炎患者、膵臓癌患者との比較では、疾患特異性は認められなかった。

- ②プロテインアレイで示された自己抗体のうち、抗 EXOC3 抗体、抗 APIP 抗体、抗 WDR1 抗体が健常者と比較して AIP 患者で高い傾向にあったが、特発性膵炎患者、膵臓癌患者でも上昇しており、疾患特異性は認められなかった。
- ③健常人 (N=16)、AIP (N=10) について、フラクタルカイン測定を行い、健常人 FKN 1.09 ± 0.19 (0.73 - 1.56) ng/mL、AIP 治療前 FKN 0.91 ± 0.19 (0.58 - 1.24) ng/mL、治療後 FKN 1.15 ± 0.40 (0.68 - 2.07) ng/mL と AIP 治療前は健常人よりも定値で治療により健常人レベルと同等であった。

D. 考察

ClinProt システムと MALDI-TOF/MS を用いたプロテオミクスで、AIP 治療後にピーク強度が変化するピーク蛋白が複数認められた。治療後にピーク強度が低下する 2 つのピーク蛋白は fibrinogen alpha chain と同定された。この 2 つのピーク蛋白に疾患特異性は認められなかったが、IgG4 値とよい相関を示しており、疾患活動性や病態との関連を解析していく。また、他のピーク蛋白についても同定作業を続ける。

二次元電気泳動法による解析で、AIP 治療後に変化する 3 つの蛋白が同定されたが、疾患特異性は認められなかった。今後他の蛋白スポットの同定を行っていく一方、疾患活動性や病態との関連を検討していく。

また、フラクタルカインについても症例数を増やし検討を継続していく。さらに当科で経験した診断確定に難渋し、長期間の経過の間に全身に IgG4 陽性形質細胞浸潤を来し、治療を行った。

このような症例の経時的なサイトカイン、ケモカインなどの変化についても検討を予定している。

E. 結論

プロテオミクス解析により、AIP 治療で変化する複数の蛋白が認められ、活動性評価や治療効果予測に有用である可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Ohara H, Okazaki K, Tsubouchi H, Inui K, Kawa S, Kamisawa T, Tazuma S, Uchida K, Hirano K, Yoshida H, Nishino T, Ko SB, Mizuno N, Hamano H, Kanno A, Notohara K, Hasebe O, Nakazawa T, Nakanuma Y, Takikawa H.

Clinical diagnostic criteria of IgG4-related sclerosing cholangitis 2012.

J Hepatobiliary Pancreat Sci 19(5):536-42:2012.

2. 学会発表

前田仁美、坪内直子、豊倉恵理子、那須雄一郎、沼田政嗣、船川慶太、藤田浩、井戸章雄、坪内博仁；「診断に苦慮し、複数臓器に病変を形成した IgG4 関連疾患の一例」

第 100 回日本消化器病学会九州支部例会、鹿児島市、20121103

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業
IgG4 関連疾患に関する調査研究
分担研究報告書

IgG4 関連疾患の病理診断における免疫染色基準の妥当性—連続する 40 病変の検討

研究分担者 能登原憲司 倉敷中央病院病理検査科 主任部長

研究要旨：本邦の IgG4 関連疾患 (IgG4-RD) 包括診断基準 2011 (本邦基準) や病理診断の Consensus Document (CD) にある免疫染色基準の妥当性を検討する目的で、当院のルーチンで免疫染色を行った連続する 40 病変を検討した。IgG4 陽性細胞 (IgG4⁺) の多い 3 箇所について、IgG4⁺数と IgG 陽性細胞 (IgG⁺) 数をカウントし、IgG4⁺数については平均を、IgG4⁺/IgG⁺比についてはそれぞれの合計の比を代表する数値とした。40 病変のうち IgG4-RD は 7 病変 (リンパ節 3, 口唇腺 2, 後腹膜 2) で、後腹膜線維症の 2 例は IgG4⁺/IgG⁺比が 30%以下と低かったが、それ以外は本邦基準, CD の両者を満たした。33 例の非 IgG4-RD ではリンパ節が 14 病変と最も多く、IgG4⁺数と IgG4⁺/IgG⁺比の両者を満たすものは本邦基準で 8 病変, CD で 6 病変あり、後者の内訳は Castleman 病 3, granulomatosis with polyangiitis 2, 胸管嚢胞 1 であった。免疫染色のみでは診断できない IgG4-RD や、過剰診断となる非 IgG4-RD 例が存在することが明らかとなった。

A. 研究目的

IgG4 関連疾患 (IgG4-RD) の病理診断を行う際に、組織学的所見と共に免疫染色の結果が重要である。そのため、本邦の IgG4-RD 包括診断基準 2011 (本邦基準)^{1,2)}では IgG4 陽性形質細胞 (IgG4⁺) 数 >10/HFP かつ IgG4⁺/IgG 陽性細胞 (IgG⁺) 比 ≥40% が、病理診断の Consensus Document (CD)³⁾では臓器ごとに異なる IgG4⁺数かつ IgG4⁺/IgG⁺比 ≥40% が診断の際の基準として掲げられている。これら基準の妥当性を検討する目的で、連続する症例を用いて IgG4⁺数、IgG4⁺/IgG⁺比を検討した。

B. 研究方法

当院のルーチンで IgG4 および IgG の免疫染色を行った連続する 40 病変を用いた。臨床的あるいは病理学的に IgG4-RD を疑った症例のほか、形質細胞の浸潤・増加をきたした原因不明の病変がこの中に含まれる。それぞれの病変の中で IgG4⁺の多い 3 箇所について、IgG4⁺数と IgG⁺数をカウントし、IgG4⁺数については平均を、IgG4⁺/IgG⁺比についてはそれぞれの合計の比を代表する数

値とした。

(倫理面への配慮)

この研究は倉敷中央病院病理検査科で、個人情報保護に配慮を払いながら行われた。この研究は診断目的で過去に得られた検査データを用いる後向き研究で、研究対象者に与える不利益、危険性は最小限であり、また被験者の権利を脅かす危険性も低い。倫理面の問題はないと考える。

C. 研究結果

40 病変のうち IgG4-RD は 7 例 (リンパ節 3, 口唇腺 2, 後腹膜 2) であった。そのうち、後腹膜線維症の 2 例 (開腹生検) は IgG4⁺数 34, 46 と比較的少なく、IgG4⁺/IgG⁺比はいずれも 30%以下と低値であった (図 1)。それ以外の病変は本邦基準, CD の両者を満たしていた。33 例の非 IgG4-RD ではリンパ節が 14 病変と最も多く、その他は様々な臓器であった。IgG4⁺数については本邦基準 (>10/hpf) を 27 病変が、CD を 12 病変が満たしていた。なかでもリンパ節 14 病変における IgG4⁺数は平均 81.7, 中央値 51.4 と多かった。

IgG4⁺/IgG⁺ 比 > 40% は 9 病変が満たしていた。IgG4⁺ 数と IgG4⁺/IgG⁺ 比の両者を満たすものは本邦基準で 8 病変、国際コンセンサスで 6 病変あった。後者の内訳は Castleman 病 3, granulomatosis with polyangiitis (GPA) 2, 胸管嚢胞 1 で、前者ではこれに加えて反応性リンパ節腫大 1, 皮膚リンパ組織過形成 1 が含まれていた。GPA の 2 病変はいずれも、IgG4⁺ 数 > 300/hpf, IgG4⁺/IgG⁺ 比 > 100% と IgG4-RD と遜色ない結果であった (図 2)。

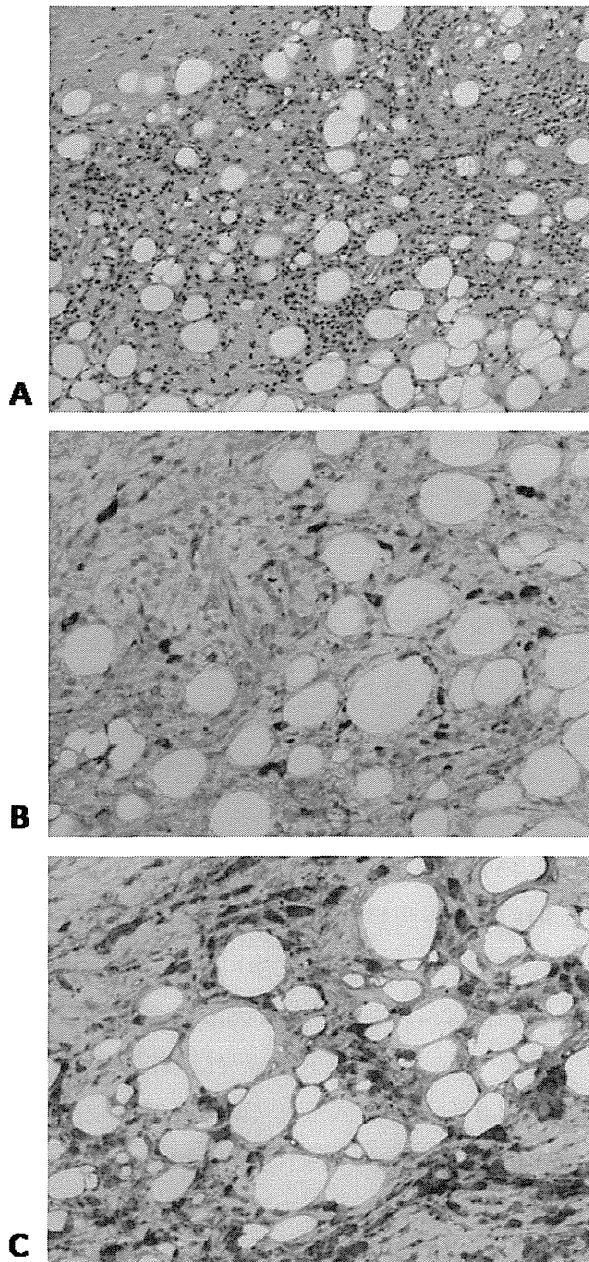


図1. 後腹膜線維症. A. 花冠状線維化. このような所見はごく一部にみられるのみであった. B. IgG4 免疫染色. 陽性細胞を認めるが、決して多くはない. C. 同一部位のIgG免疫染色. IgG4/IgG陽性細胞比は低い.

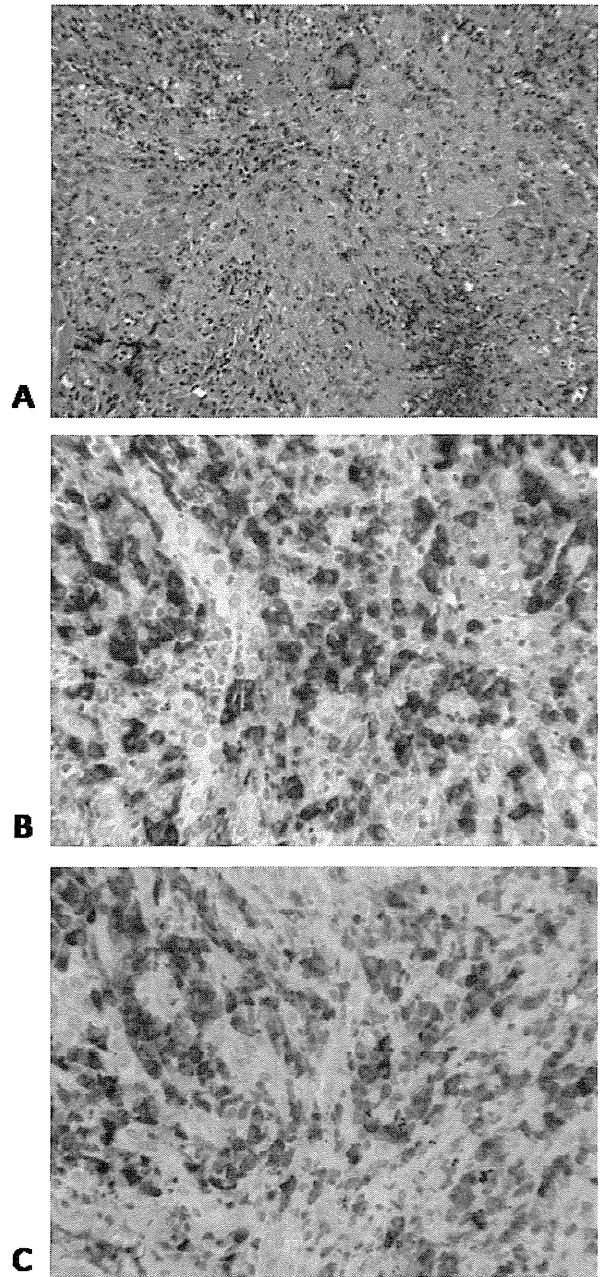


図2. Granulomatosis with polyangiitis. A. 中心に壊死を伴う肉芽腫性病変. 多核巨細胞も散見される. B. IgG4免疫染色にて、極めて多数の陽性細胞を認める. C. 同一部位のIgG免疫染色. IgG4/IgG陽性細胞比も極めて高い.

D. 考察

IgG4-RD の病理診断においては IgG4 の免疫染色が重要な位置を占めるが、その評価方法には定まったものがなかった。免疫染色を IgG4⁺ 数のみで評価する方法があるが、著明な形質細胞浸潤をきたした炎症巣においては IgG4⁺ も一定の割合で存在するため、IgG4⁺ の絶対数も増加して偽陽性例が増える危険性がある。たとえば脾臓において

は、2型自己免疫性膵炎⁴⁾や膿瘍⁵⁾においてもIgG4⁺数の増加が報告されている。また、IgG4⁺/IgG⁺比のみで評価すると、形質細胞数が少ない症例では必ずしも正確に評価できない可能性がある。このことから、本邦基準やCDでは、IgG4⁺数およびIgG4⁺/IgG⁺比の両者を必須とする基準が設けられている。

これら基準の妥当性を評価する目的で、連続する40病変の免疫染色の結果を検討した。IgG4-RDであるにもかかわらず、後腹膜線維症2病変はIgG4⁺数、IgG4⁺/IgG⁺比が低値となった。CDでは後腹膜線維症のIgG4⁺数の基準を>30/hpfと低く設定しているため³⁾、IgG4⁺数については問題にならなかったが、IgG4⁺/IgG⁺比については本邦基準、CDの≥40%を満たさず、偽陰性となった。これは、後腹膜線維症では炎症の消退性変化が目立つことと関連があるように思われ、IgG4-RDの炎症が消退していくといずれの臓器でも同様のことが起こりえる可能性がある。

一方、偽陽性となった病変には、従来から報告されてきたCastleman病⁶⁾やGPA⁷⁾が含まれていた。なかでもGPAはIgG4⁺数、IgG4⁺/IgG⁺比ともに著明な高値を示していたが、組織像を確認すればIgG4-RDとの鑑別は容易である。一方、リンパ節のIgG4-RDは特異的な組織所見を欠くため、Castleman病との鑑別はより困難である。

CDでは、IgG4-RDの病理診断を免疫染色のみに基づいて行ってはならないこと、花筈状線維化や閉塞性静脈炎のような組織像が診断の上で重要であることが強調されている³⁾。今回の検討でも免疫染色のみでIgG4-RDを診断することの危険性が明らかとなった。さらに、IgG4関連リンパ節症とCastleman病のような組織像からも鑑別が困難なケースでは、臨床像も含めた検討が診断の際に求められる。

E. 結論

IgG4⁺数、IgG4⁺/IgG⁺比はIgG4-RD以外でも増大し、免疫染色のみでIgG4-RDを診断することは危

険である。また、後腹膜線維症のように、IgG4-RDでありながらこれらの基準を満たさない事例もあり、IgG4-RDの診断基準を考える上で今後の課題となる。

F. 参考文献

1. Umehara H, Okazaki K, Masaki Y, et al: Comprehensive diagnostic criteria for IgG4-related disease (IgG4-RD), 2011. *Mod Rheumatol* 2012; 22: 21-30.
2. IgG4 関連全身硬化性疾患の診断法の確立と治療方法の開発に関する研究班・新規疾患、IgG4 関連多臓器リンパ増殖性疾患 (IgG4+MOLPS) の確立のための研究班; IgG4 関連疾患包括診断基準 2011. *日本内科学会雑誌* 2012; 101: 795-804.
3. Deshpande V, Zen Y, Chan JK, Yi EE, Sato Y, Yoshino T, Klöppel G, Heathcote JG, Khosroshahi A, Ferry JA, Aalberse RC, Bloch DB, Brugge WR, Bateman AC, Carruthers MN, Chari ST, Cheuk W, Cornell LD, Fernandez-Del Castillo C, Forcione DG, Hamilos DL, Kamisawa T, Kasashima S, Kawa S, Kawano M, Lauwers GY, Masaki Y, Nakanuma Y, Notohara K, Okazaki K, Ryu JK, Saeki T, Sahani DV, Smyrk TC, Stone JR, Takahira M, Webster GJ, Yamamoto M, Zamboni G, Umehara H, Stone JH. Consensus statement on the pathology of IgG4-related disease. *Mod Pathol* 2012; 25: 1181-1192.
4. Zhang L, Notohara K, Levy MJ, Chari ST, Smyrk TC. IgG4-positive plasma cell infiltration in the diagnosis of autoimmune pancreatitis. *Mod Pathol* 2007; 20: 23-8.
5. Suda K, Takase M, Fukumura Y, Kashiwagi S. Pathology of autoimmune pancreatitis and tumor-forming pancreatitis. *J Gastroenterol* 2007; 42 (suppl 18): 22-7.
6. Sato Y, Kojima M, Takata K, et al. Multicentric Castleman's disease with abundant IgG4-positive cells: a clinical and pathological analysis of six cases. *J Clin Pathol* 2010; 63: 1084-9.
7. Chang SY, Keogh K, Lewis JE, et al. Increased IgG4-positive plasma cells in granulomatosis with polyangiitis: a diagnostic pitfall of IgG4-related disease. *Int J Rheumatol* 2012; 2012: 121702.

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Deshpande V, Zen Y, Chan JK, Yi EE, Sato Y, Yoshino T, Klöppel G, Heathcote JG, Khosroshahi A, Ferry JA, Aalberse RC, Bloch DB, Brugge WR, Bateman AC, Carruthers MN, Chari ST, Cheuk W, Cornell LD, Fernandez-Del Castillo C, Forcione DG, Hamilos DL, Kamisawa T, Kasashima S, Kawa S, Kawano M, Lauwers GY, Masaki Y, Nakanuma Y, Notohara K, Okazaki K, Ryu JK, Saeki T, Sahani DV, Smyrk TC, Stone JR, Takahira M, Webster GJ, Yamamoto M, Zamboni G, Umehara H, Stone JH. Consensus statement on the pathology of IgG4-related disease. Mod Pathol 2012; 25: 1181-1192.
2. 能登原憲司. 自己免疫性膵炎と膵外病変 (IgG4 関連疾患) の病理像. 林紀夫他編, Annual Review 2013 消化器, 中外医学社, 2013, Page229-237.
3. 能登原憲司. 胆道膵臓の線維化 研究の進歩 1型AIPの線維化と2型AIPの線維化の異同. 肝胆膵 65 卷 2 号 Page337-342.

4. 能登原憲司. 自己免疫性膵炎における最近の知見 新しい診断基準の中での自己免疫性膵炎(1型・2型)の病理診断. 最新医学 67卷8号 Page1857-1863.
5. 能登原憲司. IgG4関連疾患の診断 1型自己免疫性膵炎における線維化病変の特徴. 最新医学 67卷4号 Page965-970.

2. 学会発表

1. 能登原憲司. IgG4 関連疾患の病理診断：消化器領域疾患の診断基準と包括的診断基準における考え方. 第 99 回日本消化器病学会総会, 鹿児島, 2013 年 3 月.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む.)

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

厚生労働科学研究費補助金難治性疾患等克服研究事業
IgG4 関連疾患に関する調査研究
分担研究報告書

トランスクリプトーム解析による IgG4 関連疾患の病因病態解析

研究分担者	梅原久範	金沢医科大学医学部血液免疫内科	教授
研究協力者	正木康史	金沢医科大学医学部血液免疫内科	准教授
研究協力者	河南崇典	金沢医科大学医学部血液免疫内科	講師
研究協力者	中島章夫	金沢医科大学医学部血液免疫内科	助教
研究協力者	三木美由貴	金沢医科大学医学部血液免疫内科	助教
研究協力者	岩男悠	金沢医科大学医学部血液免疫内科	助教
研究協力者	中村拓路	金沢医科大学医学部血液免疫内科	助教
研究協力者	石垣靖人	金沢医科大学総合医学研究所	准教授

研究要旨

IgG4 関連疾患(IgG4-RD)の病態関連遺伝子群検索のために、患者および健常者の末梢血単核球における mRNA 量を網羅的に解析した。典型的 IgG4-RD 患者 2 人と健常人 4 人の末梢血単核球の DNA マイクロアレイにより、治療前後で発現量が 3 倍以上変化のあった遺伝子を 30 個、患者群および健常人群で 3 倍以上の差を認めた遺伝子 21 個抽出できた。その中から Charcot-Leyden crystal protein (CLC)、defensin alpha (DEFA)、interleukin 8 receptor (IL8R)、membrane-spanning 4-domains subfamily A member 3 (MS4A3)を選択し、症例数を増やしリアルタイム PCR を行った。患者群では、DEFA および MS4A3 の発現が有意に低く、治療前後では治療前で有意に低かった。CLC、IL8R は患者群で発現が有意に低かったが、治療前後において有意差はなかった。本結果から、IgG4 関連疾患の病態には CLC 発現低下に伴う制御性 T 細胞機能の低下、自然免疫能の低下およびアトピー素因などが関連している可能性が示唆された。

A. 研究目的

IgG4 関連疾患は、血清 IgG4 高値と IgG4 陽性形質細胞の腫瘍形成あるいは組織浸潤を特徴とする新たな疾患単位である。臨床的には、全身の炎症病態に加え、罹患臓器固有の障害を示す。IgG4 関連疾患の大きな特徴は、IgG4 陽性形質細胞浸潤が、涙腺、唾液腺、膵臓、胆管、肺、腎臓、前立腺、甲状腺、下垂体、リンパ節、大動脈など多臓器で認められることである。多くの症例は複数の病変が併発し全身性疾患として発症するが、まれに単一病変の報告もあり、症例ごとに病変分布は異なる。

IgG4 関連疾患は近年報告された新たな疾患概念であり、臨床的解析はこれまで精力的に行われてきた。しかし、その原因や病態解析はまだ十分ではない。これまでの報告では、末梢血・局所病変において CD4+CD25+制御性 T 細胞 (Tregs) が増加していること、しばしば高 IgE 血症を伴うこと、Th2 優位な免疫異常が認められることなどが報告されている。今回、我々は IgG4 関連疾患患者の末梢血単核球における mRNA 量を網羅的に解析することにより、IgG4 関連疾患の病態を解明することを目的とし、病態関連遺伝子群検索を行った。

B. 研究方法

1) DNA microarray を用いた網羅的遺伝子発現解析
本研究は、厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業 IgG4 関連疾患研究班 (梅原班;平成 22 年～24 年)における「診断研究: IgG4 関連多臓器リンパ増殖症候群, キャッスルマン病その他の多クローン性高 γ グロブリン血症の鑑別診断のための多施設共同前方視的臨床研究」および「治療研究: IgG4 関連多臓器リンパ増殖症候群のステロイド治療指針を決定するための第 II 相多施設共同前方視的治療研究」に登録された症例の中から、IgG4 関連疾患包括診断基準を満たした典型的な IgG4 関連疾患患者 2 人と、基礎疾患のない健常人男性 4 人(54-61 歳, 年齢中央値 59 歳)の末梢血を使用し、DNA microarray による網羅的遺伝子発現解析を行い、治療前後で発現量が 3 倍以上変化のあった遺伝子を 30 個、患者群および健常人群で 3 倍以上の差を認めた遺伝子 21 個を抽出し病態関連候補遺伝子とした。

2) Real time PCR によるバリデーション
患者群として、前記の研究班に登録された症例の中から、典型的 IgG4 関連疾患患者 15 人を選定

した。健常人コントロール群には、IgG4 関連疾患の症状がなく、基礎疾患のない 13 人を選んだ。患者、健常人から同意を得た上で、前述した方法を使い、末梢血単核球中の RNA 抽出を行った。年齢中央値は患者 60 歳(38-79 歳)、健常人コントロール 61 歳(54-68 歳)であった。なお、前記の多施設共同研究は各施設の倫理委員会承認済みである。

3) バリデーション

Sensiscript® RT kit (Qiagen, USA)を用いて、末梢血単核球から抽出した RNA を逆転写し、cDNA 合成を行った。続いて、real time PCR は TaqMan® Gene Expression Assays(Applied Biosystems, USA)、THUNDERBIRD Probe qPCR Mix(Toyobo, Japan)を使用し、ABI Prism 7700 Sequence Detector(Applied Biosystems, USA)で解析を行った。評価は β -actin を使用した検量線を作成し、相対定量での評価とした。2 群間(健常人コントロール群-患者群間)の比較には Mann-Whitney の U 検定、患者群の治療前後比較には t 検定を使用して統計学的解析を行った。

C. 研究結果

1) DNA マイクロアレイ分析

病態に関連する遺伝子として、患者 2 人の治療前後で 3 倍以上の発現量増加あるいは減少を認めた遺伝子から、K-means clustering を用いて、治療後に 3 倍以上の発現量増加を認めた病態関連遺伝子を 30 個抽出した。また病態に関係なく、患者 2 人の治療前後 4 検体と健常人 4 人の間で 3 倍以上の発現量増加あるいは減少を認めた遺伝子を 21 個抽出した。

2) リアルタイム PCR によるバリデーション

DNA マイクロアレイ分析により抽出した遺伝子群から、Charcot-Leyden crystal protein (CLC)、interleukin 8 receptor alpha (IL8RA)、interleukin 8 receptor beta (IL8RB)、membrane-spanning 4-domains subfamily A member 3 (MS4A3)、defensin alpha 3 (DEFA3)、defensin alpha 4 (DEFA4) においてリアルタイム PCR によるバリデーションを行った。その結果、CLC は、患者治療前末梢血単核球において、健常人と比較し有意な低下を認め、治療前後では発現に差を認めなかった。DEFA3、DEFA4 は、患者治療前末梢血単核球において健常人と比較し発現の有意な低下を認め、ステロイド治療により有意な増加を認めた。IL8RA、IL8RB は、健常人と比較し発現の有意な低下を認め、ステロイド治療前後では発現に有意差を認めなかった。MS4A3 は、健常人と比較し発現が有意な低下を認め、治療後に増加を認めた。

D. 考察

今回、CLC と MS4A3 を選択してバリデーションを行った理由は、IgG4 関連疾患ではしばしば高 IgE 血症を伴うため、臨床的に I 型アレルギーとの関連が報告されている CLC と、ヒトアトピー表現型との関連が報告されている MS4A3 を選択した。また患者治療前後で抽出された遺伝子において、複数の好中球顆粒内殺菌活性物質の発現が治療前に低下していた。そのため好中球顆粒内殺菌活性物質の中から DEFA3、DEFA4 のバリデーションを行った。さらにその好中球に関連し、好中球の遊走と活性化を主な作用とする IL-8 の受容体である IL8RA、IL-8RB についてもバリデーションを行った。

今回の検討では、好中球殺菌能をはじめ自然免疫関連遺伝子の発現が低下している可能性が示唆された。IgG4 関連疾患の原因、病態については未だ不明な点が多いが、自然免疫関連のこれらの因子は樹状細胞や T 細胞を細菌が侵入した部位に走化させる作用をもち、自然免疫と獲得免疫の橋渡しとしての機能も行っている。そのため IgG4 関連疾患患者では、自然免疫から獲得免疫への移行が障害され、その病態に関与している可能性が考えられた。

E. 結論

本研究により、IgG4 関連疾患の病態には CLC 発現低下に伴う制御性 T 細胞機能の低下、自然免疫能の低下およびアトピー素因などが関連している可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Umehara, H., K. Okazaki, Y. Masaki, M. Kawano, M. Yamamoto, T. Saeki, S. Matsui, T. Yoshino, S. Nakamura, S. Kawa, H. Hamano, T. Kamisawa, T. Shimosegawa, A. Shimatsu, S. Nakamura, T. Ito, K. Notohara, T. Sumida, Y. Tanaka, T. Mimori, T. Chiba, M. Mishima, T. Hibi, H. Tsubouchi, K. Inui, H. Ohara and A. J. I. team "Comprehensive Diagnostic Criteria (CDC criteria) for IgG4-related disease (IgG4-RD), 2011." *Mod. Rheum.* 22(1): 21-30.2012
2. Umehara, H., K. Okazaki, Y. Masaki, M. Kawano, M. Yamamoto, T. Saeki, S. Matsui, T. Sumida, T. Mimori, Y. Tanaka, K. Tsubota, T. Yoshino, S. Kawa, R. Suzuki, T. Takegami, N. Tomosugi, N. Kurose, Y. Ishigaki, A. Azumi, M. Kojima, S. Nakamura, D. Inoue and L. a. W. M. J. G. t. the

Research Program for Intractable Disease by Ministry of Health "A Novel Clinical Entity, IgG4-Related Disease (IgG4RD) - General Concept and Details-." Mod Rheum 22(1): 1-14.2012

3. Umehara, H. "A new clinical entity: IgG4-related disease (IgG4-RD) discovered in the 21st century." Intern Med 51(8): 821-822. 2012.
4. Ito K, Yamada K, Mizushima I, Aizu M, Fujii H, Mizutomi K, Matsumura M, Hayashi K, Yamagishi M, Umehara H, Yamaguchi Y, Nagata M, and Kawano M. Henoch-Schonlein purpura nephritis in a patient with IgG4-related disease: A possible association. Clin Nephrol, Epub ahead of print in press 2012
5. Mizushima, I., K. Yamada, H. Fujii, D. Inoue, H. Umehara, M. Yamagishi, Y. Yamaguchi, M. Nagata, M. Matsumura and M. Kawano "Clinical and histological changes associated with corticosteroid therapy in IgG4-related tubulointerstitial nephritis." Mod Rheumatol DOI 10.1007/s10165-011-0589-2.2012
6. Stone JH, Khosroshahi A, Deshpande V, Chan JK, Heathcote JG, Aalberse R, et al. Recommendations for the nomenclature of IgG4-related disease and its individual organ system manifestations. Arthritis Rheum. 2012 Oct;64(10):3061-7. doi: 10.1002/art.34593.
7. Okazaki K, Umehara H. Are Classification Criteria for IgG4-RD Now Possible? The Concept of IgG4-Related Disease and Proposal of Comprehensive Diagnostic Criteria in Japan. Int J Rheumatol. 2012;2012:357071. doi: 10.1155/2012/357071.
8. Deshpande V, Zen Y, Chan JK, Yi EE, Sato Y, Yoshino T, et al. Consensus statement on the pathology of IgG4-related disease. Mod Pathol. 2012;25(9):1181-92.doi:10.1038/modpathol.2012.72.
9. Masaki Y, Kurose N, Yamamoto M, Takahashi H, Saeki T, Azumi A et al. Cutoff Values of Serum IgG4 and Histopathological IgG4+ Plasma Cells for Diagnosis of Patients with IgG4-Related Disease. Int J Rheumatol. 2012;2012:580814. doi: 10.1155/2012/580814.
10. Kawano M, Mizushima I, Yamaguchi Y, Imai N, Nakashima H, Nishi S, Hisano S, Yamanaka N,

Yamamoto M, Takahashi H, Umehara H, Saito T, Saeki T. Immunohistochemical Characteristics of IgG4-Related Tubulointerstitial Nephritis: Detailed Analysis of 20 Japanese Cases. Int J Rheumatol. Epub ahead of print in press 2012

2. 学会発表

1. 正木康史, 黒瀬 望, 佐伯敬子, 松井祥子, 川野充弘, 坪井洋人, 折口智樹, 住田孝之, 梅原久範: IgG4 関連疾患診断のための血清・組織 IgG4 の検討, 第 56 回日本リウマチ学会総会・学術集会/第 21 回国際リウマチシンポジウム, (東京, ' 12. 04) .
2. 松井祥子, 源誠二郎, 川野充弘, 佐伯敬子, 正木康史, 坪井洋人, 西山 進, 藤川敬太, 宮下賜一郎, 折口知樹, 川端大介, 梅原久範: IgG4 関連呼吸器疾患の多施設共同後方視調査, 第 56 回日本リウマチ学会総会・学術集会/第 21 回国際リウマチシンポジウム, (東京, ' 12. 04) ,
3. 正木康史, 梅原久範: IgG4 関連疾患の診断基準, 第 52 回日本リンパ網内系学会総会, (福島, ' 12. 06) , 日里網会誌, 52:61, 2012.
4. 第 46 回日本内科学会近畿支部生涯教育講演会 (2012 年 6 月大阪)。梅原久範。教育講演「IgG4 関連疾患 - その概念、診断、治療」
5. 第 21 回日本シェーグレン学会 (2012 年 9 月京都)。梅原久範。特別講演「IgG4 関連疾患」
6. 中島章夫, 石垣靖人, 河南崇典, 正木康史, 佐藤智美, 中村拓路, 岩男 悠, 三木美由貴, 坂井知之, 藤田義正, 田中真生, 福島俊洋, 岡崎俊朗, 竹上 勉, 梅原久範: IgG4 関連疾患患者末梢血単核球におけるトランスクリプトーム解析, 第 21 回日本シェーグレン症候群学会, (京都, ' 12. 09) .
7. 柴田伸亮, 高橋依子, 柴田奈央子, 岩男 悠, 正木康史, 梅原久範, 佐々木洋, 北川和子: I g G 4 関連疾患における眼乾燥所見, 第 66 回日本臨床眼科学会, (京都, ' 12. 10)

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業

IgG4 関連疾患に関する調査研究

分担研究報告書

IgG4 関連疾患における IgG4 クラススイッチ亢進と線維化の分子メカニズムの解析

研究分担者 住田孝之 筑波大学医学医療系内科

(膠原病・リウマチ・アレルギー) 教授

研究協力者 坪井洋人 筑波大学医学医療系内科

(膠原病・リウマチ・アレルギー) 講師

研究要旨

IgG4 関連疾患 (IgG4-RD) は血清 IgG4 の上昇と病変組織への IgG4 陽性形質細胞の浸潤を特徴とする慢性疾患である。近年注目されている疾患であり、臨床像については解析が進んでいるが、病因・病態に関する基礎的研究は不十分である。最近になり、本症患者末梢血中および病変局所における Th2 細胞および制御性 T 細胞 (Treg 細胞) の増加、それらの細胞が産生するサイトカインの上昇が報告され、IgG4 クラススイッチとの関連が注目されている。本研究では、本症における IgG4 クラススイッチ亢進と線維化の分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。IgG4-RD、シェーグレン症候群 (SS)、健康人 (HC) の 3 群間で、IgG4 特異的クラススイッチ関連分子 (IL-4、IL-13、IL-10、TGF β 、GATA3、Foxp3) および IgG4 非特異的クラススイッチ関連分子 (CD40、CD154、BAFF、APRIL、IRF4、AID) の発現を末梢血単核球 (PBMC) と口唇唾液腺 (LSG) において、定量 PCR で比較した。その結果、IgG4-RD の LSG では、SS・HC と比較して、IL-10、TGF β 、AID の発現が有意に上昇していた ($P < 0.05$)。さらに、IgG4-RD の病態に関与する分子をより網羅的に解析するため、DNA マイクロアレイにより、IgG4-RD と SS の LSG における遺伝子発現を比較した。クラスタリングでは、IgG4-RD と SS は異なる遺伝子発現パターンを呈していた。IgG4-RD で相対的に発現が増加した発現変動遺伝子は 580 遺伝子、減少した遺伝子は 280 遺伝子同定された (False discovery rate < 0.05)。GO アノテーションによる機能解析では、IgG4-RD で発現増加した遺伝子は T 細胞活性化、ケモタキシス、免疫反応に関連していた。IgG4-RD で発現が増加した発現変動遺伝子のうち、Treg を含む T 細胞、B 細胞、樹状細胞のケモタキシスや線維化に関与する CCL18 を抽出し、定量 PCR による validation を行ったところ、IgG4-RD の LSG では、SS・HC と比較して、CCL18 の発現は有意に高値であった ($P < 0.05$)。IgG4-RD の LSG において、IL-10、AID は IgG4 クラススイッチ亢進、TGF β は線維化、CCL18 は Treg および B 細胞の遊走と線維化に関与する可能性が示唆された。

共同研究者

阿部啓子、中井雄治

(東京大学大学院農学生命科学研究科)

中村誠司、森山雅文、田中昭彦

(九州大学大学院歯学研究院)

吉原俊雄

(東京女子医科大学医学部耳鼻咽喉科学)

A. 研究目的

IgG4 関連疾患 (IgG4-RD) は、血清 IgG4 の上昇と病変組織への IgG4 陽性形質細胞の浸潤を特徴とする慢性疾患である。近年注目されている病態であり、ミクリツ病・自己免疫性膵炎をはじめとして、硬化性胆管炎、間質性腎炎、後腹膜線維症、間質性肺炎、炎症性偽腫瘍 (肺、眼窩、肝な

ど)、偽リンパ腫(乳腺など)、前立腺炎、下垂体炎、大動脈炎、リンパ節腫脹、甲状腺炎等の多彩な病変が報告されている。各領域で診断基準や治療ガイドラインの策定がすすみ、臨床的には疾患の理解が広まりつつある。その一方で、病因・病態に関しては、IgG4 上昇や IgG4 陽性形質細胞の意義、IgG4 クラススイッチ亢進の分子メカニズムを含めて不明な点が多く、十分な解析はなされていない。

最近になり、本症患者末梢血中および病変局所における Th2 細胞および制御性 T 細胞 (Treg 細胞) の増加、それらの細胞が産生するサイトカインの上昇が報告され、IgG4 クラススイッチとの関連が注目されている。

本研究では、本症における IgG4 クラススイッチ亢進と線維化の分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1. IgG4-RD、シェーグレン症候群、健常人の口唇唾液腺および末梢血単核球を用いた定量 PCR による解析

IgG4-RD (N=6)、シェーグレン症候群 (SS) (N=6)、健常人 (HC) (N=8) の末梢血単核球 (PBMC)、および IgG4-RD (N=11)、SS (N=13)、HC (N=3) の口唇唾液腺 (LSG) より RNA を抽出した。IgG4-RD の症例は、全例 IgG4 関連疾患包括診断基準 (2011 年) の definite を満たし、SS の症例は全例厚生省改訂診断基準 (1999 年) を満たしていた。IgG4 特異的クラススイッチ関連分子として、Th2 サイトカイン (IL-4、IL-13)、Treg サイトカイン (IL-10、TGF β)、および転写因子 (GATA3、Foxp3) の発現を、非特異的クラススイッチ関連分子として、CD40/CD154、BAFF、APRIL、IRF4、AID の発現を定量 PCR で比較した。

2. IgG4-RD と SS の LSG を用いた DNA マイクロアレイによる遺伝子発現比較

IgG4-RD の病態に関与する分子をより網羅的に解析するため、IgG4-RD (N=3)、SS (N=3) の LSG より抽出した RNA を用いて DNA マイクロアレイを行った。GeneChip

は Affymetrix 社の GeneChip[®] Human Genome U133 Plus 2.0 Array を用いた。得られたデータは RMA アルゴリズムを用いて正規化を行い、IgG4-RD と SS の遺伝子発現パターンを pvclust method によるクラスタリングで比較した。さらに Rank products 法を用いて、IgG4-RD で相対的に発現増加、または減少した遺伝子 (発現変動遺伝子) を抽出した (False discovery rate<0.05) (X・Y 染色体上の遺伝子を除く)。Gene Ontology (GO) アノテーションを用いて発現変動遺伝子の機能解析を行った (Web tool DAVID)。抽出した発現変動遺伝子 (CCL18) に関して、IgG4-RD (N=8)、SS (N=11)、健常人 (HC) (N=3) の LSG (DNA マイクロアレイに用いたサンプルとは別サンプル) を用いて、定量 PCR による validation を行った。

C. 研究結果

1. IgG4-RD、SS、HC の LSG および PBMC を用いた定量 PCR による解析

1) サイトカイン (IL-4、IL-13、IL-10、TGF β) PBMC では、IgG4-RD、SS、HC の間で、サイトカイン産生に有意差は認められなかった。一方、IgG4-RD の LSG では、SS・HC と比較して、IL-10・TGF β の産生が有意に高値であった (P<0.05、Mann-Whitney's U-test) (図 1)。また IgG4-RD の LSG では、IL-4 の産生は HC と比較して有意に高値であった (P<0.05、Mann-Whitney's U-test) (図 1) (Tsuboi H, et al. Arthritis Res Ther 14: R171, 2012)。

2) 転写因子 (GATA3、Foxp3)

PBMC では、IgG4-RD、SS、HC の間で、GATA3、Foxp3 の発現に有意差は認められなかった。IgG4-RD の LSG では、HC と比較して、Foxp3 の発現は有意に高値であった (P<0.05、Mann-Whitney's U-test) (図 1)。また IgG4-RD の LSG では、SS と比較して、GATA3 の発現は有意に低値であった (P<0.05、Mann-Whitney's U-test) (図 1) (Tsuboi H, et al. Arthritis Res Ther 14: R171, 2012)。

3) IgG4 非特異的クラススイッチ関連分子 (CD40、CD154、BAFF、APRIL、IRF4、AID) IgG4-RD の PBMC では、SS と比較して、CD40、CD154 の発現は有意に低値であった ($P < 0.05$ 、Mann-Whitney's U-test) (図 2)。IgG4-RD の LSG では、HC と比較して、BAFF の発現は有意に高値であった ($P < 0.05$ 、Mann-Whitney's U-test) (図 2)。また IgG4-RD の PBMC では、HC と比較して、APRIL の発現は有意に低値であった ($P < 0.05$ 、Mann-Whitney's U-test) (図 2)。さらに IgG4-RD の LSG では、SS・HC と比較して、AID の発現は有意に高値であった ($P < 0.05$ 、Mann-Whitney's U-test) (図 2) (Tsuboi H, et al. Arthritis Res Ther 14: R171, 2012)。

2. IgG4-RD と SS の LSG を用いた DNA マイクロアレイによる遺伝子発現比較

1) サンプル間クラスタリング

pvclust methodによるクラスタリングでは、IgG4-RD と SS は異なる遺伝子発現パターンを呈していた (図 3)。

2) 発現変動遺伝子の抽出

IgG4-RD で相対的に発現が増加した発現変動遺伝子は 580 遺伝子 (表 1)、減少した遺伝子は 280 遺伝子 (表 2) 抽出された (Rank products 法、False discovery rate <0.05 、X・Y 染色体上の遺伝子は除く)。

3) GO アノテーションを用いた発現変動遺伝子の機能解析

GO アノテーションによる機能分類解析では、IgG4-RD で発現が増加した発現変動遺伝子は、mitosis、T cell differentiation、positive regulation of T cell activation、activation of immune response、adaptive immune response、chemotaxis、inflammatory response に有意に濃縮されていた (False discovery rate-corrected p-value $<E-07$)。

4) 定量 PCR による validation

IgG4-RD で発現が増加した発現変動遺伝子のうち、T 細胞、B 細胞、樹状細胞のケモタキシスや線維化に関与する CCL18 (表 1、上位 10 位) を抽出した。定量

PCR による validation の結果、IgG4-RD の LSG では、SS・HC と比較して、CCL18 の発現は有意に高値であった ($P < 0.05$ 、Mann-Whitney's U-test) (図 4)。

D. 考察

本研究では IgG4-RD、SS、HC の 3 群間で、IgG4 特異的クラススイッチ関連分子および IgG4 非特異的クラススイッチ関連分子の発現を PBMC と LSG において比較した。IgG4-RD において、SS・HC と比較して共に有意に発現が変化していた分子に注目した。その結果、IgG4 特異的クラススイッチ関連分子では、IgG4-RD の LSG において、Treg サイトカイン (IL-10、TGF β) の発現が有意に上昇していた。IgG4-RD の LSG では、IL-10 の強発現が IgG4 や IgE へのクラススイッチ亢進に寄与し、さらに TGF β の強発現は組織の線維化に関与する可能性が示唆された。一方、IgG4 非特異的クラススイッチ関連分子では、IgG4-RD の LSG において、AID の発現が有意に上昇していた。AID は非特異的なガンマグロブリンのクラススイッチに必須の分子であり、LSG における AID の強発現は、IL-10 とともに IgG4 特異的なクラススイッチ亢進にも寄与する可能性が考えられた。Treg サイトカインや AID が LSG 局所で強発現していたことから、IgG4-RD における IgG4 のクラススイッチ亢進は、障害臓器局所で生じている可能性が示唆された。

さらに、IgG4-RD の病態に関与する分子をより網羅的に解析するため、DNA マイクロアレイにより、IgG4-RD と SS の LSG における遺伝子発現を比較した。クラスタリングでは、IgG4-RD と SS は異なる遺伝子発現パターンを呈していた。IgG4-RD で発現が増加した発現変動遺伝子から CCL18 を抽出し、定量 PCR による validation を行ったところ、IgG4-RD の LSG では、SS・HC と比較して、CCL18 の発現は有意に高値であった。CCL18 は単球、マクロファージ、樹状細胞から産生され、Treg を含む T 細胞、B 細胞、樹状細胞のケモタキシスや、線維芽細胞からの膠原線維産生を誘導することが報告されている。したがって、CCL18 は、IgG4-RD の障害臓器局所において、Treg や B 細胞の