

遊走、および線維化に関与する可能性が示唆された。

E. 結論

IgG4-RD の LSG における遺伝子発現のパターンは SS とは異なっていた。IgG4-RD の LSG では、SS および HC と比較して、IL-10、TGF β 、AID、CCL18 の発現が有意に上昇していた。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。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Furukawa H, Kawasaki A, Oka S, Shimada K, Masui T, Ikenaka T, Hashimoto A, Okazaki Y, Takaoka H, Futami H, Komiya A, Kondo Y, Ito S, Hayashi T, Matsumoto I, Kusaoi M, Takasaki Y, Nagai T, Hirohata S, Setoguchi K, Suda A, Nagaoka S, Kono H, Okamoto A, Chiba N, Suematsu E, Fukui N, Hashimoto H, Sumida T, Ono M, Tsuchiya N, Tohma S: Association of a Single Nucleotide Polymorphism in the SH2D1A Intronic Region with Systemic Lupus Erythematosus. Lupus (in press)
2. Ito S, Ogishima H, Kondo Y, Sugihara M, Hayashi T, Chino Y, Goto D, Matsumoto I, Sumida T: Early diagnosis and treatment of steroid-induced diabetes mellitus in patients with rheumatoid arthritis and other connective tissue diseases. Mod Rheumatol (in press).
3. Shimane K, Kochi Y, Suzuki A, Okada Y, Tomonori I, Horita T, Saito K, Okamoto A, Nishimoto N, Myouzen K, Hirakata M, Sumida T, Takasaki Y, Yamada R, Kamatani N, Nakamura Y, Kubo M, Yamamoto K: An association analysis of HLA-DRB1 with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis in a Japanese population: effects of *09:01 allele on disease phenotypes. Rheumatology (in press).
4. Umeda N, Matsumoto I, Ito I, Kawasaki A, Tanaka Y, Inoue A, Tanaka Y, Tsuboi H, Suzuki T, Hayashi T, Ito S, Tsuchiya N, Sumida T: Anti-citrullinated glucose-6-phosphate isomerase

peptide antibodies in patients with rheumatoid arthritis are associated with HLA-DRB1 shared epitope alleles and disease activity. Clin Exp Immunol (in press).

5. Anami A, Fukushima K, Takasaki Y, Sumida T, Waguri M, Murashima A, Wake N: The predictive value of SS-A antibody titration in pregnant women with fetal congenital heart block. Mod Rheumatol (in press).
6. Ishiguro N, Yamamoto K, Katayama K, Kondo M, Sumida T, Mimori T, Soen S, Nagai K, Yamaguchi T, Hara M, Igaratimod-Clinical Study Group: Concomitant iguratimod therapy in patients with active rheumatoid arthritis despite stable doses of methotrexate: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Mod Rheumatol (in press).
7. Suzuki T, Horikoshi M, Sugihara M, Hirota T, Ogishima H, Umeda N, Kondo Y, Tsuboi H, Hayashi T, Chino Y, Matsumoto I, Sumida T: Therapeutic efficacy of tocilizumab in patients with rheumatoid arthritis refractory to anti-tumor necrosis factor inhibitors: One year follow-up by low-field extremity MRI. Mod Rheumatol (in press).
8. Iizuka M, Tsuboi H, Matsuo N, Kondo Y, Asashima H, Matsui M, Matsumoto I, Sumida T: The crucial roles of IFN- γ in the development of M3 muscarinic acetylcholine receptor induced Sjogren's syndrome-like sialadenitis. Mod Rheumatol (in press).
9. Sumida T, Tsuboi H, Iizuka M, Asashima H, Matsumoto I: Anti-M3 muscarinic acetylcholine receptor antibodies in patients with Sjogren's syndrome. Mod Rheumatol (in press).
10. Tsuboi H, Hagiwara S, Asashima H, Umehara H, Kawakami A, Nakamura H, Sano H, Tsubota K, Ogawa Y, Takamura E, Saito I, Inoue H, Nakamura S, Moriyama M, Takeuchi T, Tanaka Y, Hirata S, Mimori T, Matsumoto I, Sumida T: Validation of different sets of criteria for the diagnosis of Sjogren's syndrome in Japanese patients. Mod Rheumatol (in press).
11. Yamaguchi T, Ito S, Takano Y, Umeda N,

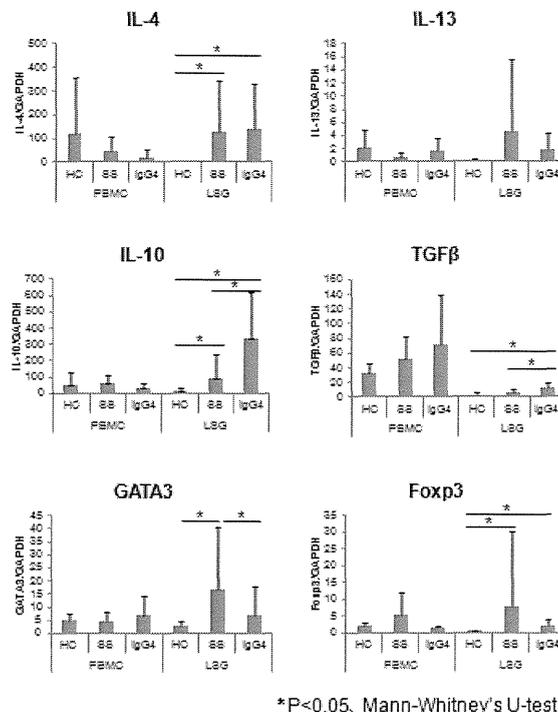
- Goto M, Horikoshi M, Hayashi T, Goto D, Matsumoto I, Sumida T: A case of a disseminated sporotrichosis patient treated with prednisolone, immunosuppressants, and tocilizumab under the diagnosis of rheumatoid arthritis. Intern Med;51(15):2035-9, 2012.
12. Tsuboi H, Nakamura Y, Iizuka M, Matsuo N, Matsumoto I, Sumida T: Generation and functional analysis of monoclonal antibodies against the second extracellular loop of human M3 muscarinic acetylcholine receptor. Mod Rheumatol; 22(2): 264-271, 2012.
 13. Tanaka Y, Matsumoto I, Iwanami K, Inoue A, Umeda N, Tanaka Y, Sugihara M, Hayashi T, Ito S, Sumida T: Six-transmembrane epithelial antigen of prostate4 (STEAP4) is expressed on monocytes/neutrophils, and is regulated by TNF antagonist in patients with rheumatoid arthritis. Clin Exp Rheumatol;30(1):99-102, 2012.
 14. Kondo Y, Iizuka M, Wakamatsu E, Yao Z, Tahara M, Tsuboi H, Sugihara M, Hayashi T, Yoh K, Takahiashi S, Matsumoto I, Sumida T: Overexpression of T-bet gene regulates murine autoimmune arthritis. Arthritis Rheum; 64: 162-172, 2012.
 15. Hasebe N, Kawasaki A, Ito I, Kawamoto M, Hasegawa M, Fujimoto M, Furukawa H, Tohma S, Sumida T, Takehara K, Sato S, Kawaguchi Y, Tsuchiya N: Association of UBE2L3 polymorphisms with diffuse cutaneous systemic sclerosis in a Japanese population. Ann Rheum Dis; 71(7): 1259-60, 2012 .
 16. Kawasaki A, Furukawa H, Kondo Y, Ito S, Hayashi T, Kusaoi M, Matsumoto I, Tohma S, Takasaki Y, Hashimoto H, Sumida T, Tsuchiya N: Association of PHRF1-IRF7 region polymorphism with clinical manifestations of systemic lupus erythematosus in a Japanese population. Lupus; 21(8): 890-5, 2012.
 17. Okada Y, Shimane K, Kochi Y, Tahira T, Suzuki A, Higasa K, Takahashi A, Horita T, Atsumi T, Ishii T, Okamoto A, Fujio K, Hirakata M, Amano H, Kondo Y, Ito S, Takada K, Mimori A, Saito K, Kamachi M, Kawaguchi Y, Ikari K, Mohammed W O, Matsuda K, Terao C, Ohmura K, Myouzen K, Hosono N, Tsunoda T, Nishimoto N, Mimori T, Matsuda F, Tanaka Y, Sumida T, Yamanaka H, Takasaki Y, Koike T, Horiuchi T, Hayashi K, Kubo M, Kamatani N, Yamada R, Nakamura Y, Yamamoto K: A genome-wide association study identified AFF1 as a susceptibility locus for systemic lupus erythematosus in Japanese. PLoS Genet;8(1): e1002455, 2012.
 18. Umehara H, Okazaki K, Masaki Y, Kawano M, Yamamoto M, Saeki T, Matsui S, Sumida T, Mimori T, Tanaka Y, Tsubota Y, Toshino T, Kawa S, Suzuki R, Takegami T, Tomosugi N, Kurose N, Ishigaki Y, Azumi A, Kojima M, Nakamura S, Inoue D: A novel clinical entity, IgG4-related disease (IgG4RD): general concept and details. Mod Rheumatol; 22(1): 1-14, 2012.
 19. Umehara H, Okazaki K, Masaki Y, Kawano M, Yamamoto M, Saeki T, Matsui S, Yoshino T, Nakamura S, Kawa S, Hamano H, Kamisawa T, Shimosegawa T, Shimatsu A, Nakamura S, Ito T, Notohara K, Sumida T, Tanaka Y, Mimori T, Chiba T, Mishima M, Hibi T, Tsubouchi H, Inui K, Ohara H: Comprehensive Diagnostic Criteria (CDC criteria) for IgG4-related disease (IgG4-RD), 2011. Mod Rheumatol;22:21-30, 2012.
 20. Tanaka Y, Matsumoto I, Iwanami K, Inoue A, Minami R, Umeda N, Kanamori A, Ochiai N, Miyazawa K, Sugihara M, Hayashi T, Goto D, Ito S, Sumida T: Six-transmembrane epithelial antigen of prostate4 (STEAP4) is TNFalpha-induced protein that regulates IL-6, IL-8, and cell proliferation in synovium from patients with rheumatoid arthritis. Mod Rheumatol; 22:128-136, 2012.
 21. Sakai R, Komano Y, Tanaka M, Nanki T, Koike R, Nagasawa H, Amano K, Nakajima A, Atsumi T, Koike T, Ihata A, Ishigatubo Y, Saito K, Tanaka Y, Ito S, Sumida T, Tohma S, Tamura N, Fujii T, Sugihara T, Kawakami A, Hagino N, Ueki Y, Hashiramoto A, Nagasaka K, Miyasaka N, Harigai M, for the REAL Study Group: Time-dependent increased risk for serious infection from continuous use of TNF antagonists during three years in rheumatoid

- arthritis patients. *Arthritis Care Res*;64(8):1125-1134, 2012.
22. Sakai R, Tanaka M, Nanki T, Watanabe K, Yamazaki H, Koike R, Nagasawa H, Amano K, Saito K, Tanaka Y, Ito S, Sumida T, Ihata A, Ishigatsubo Y, Atsumi T, Koike T, Nakajima A, Tamura N, Fujii T, Dobashi H, Tohma S, Sugihara T, Ueki Y, Hashiramoto A, Kawakami A, Hagino N, Miyasaka N, Harigai M, for the REAL Study Group: Drug retention rates and relevant risk factors for drug discontinuation due to adverse events in rheumatoid arthritis patients receiving anti-cytokine therapy with different target molecules. *Ann Rheum Dis* ; 71(11): 1820-1826, 2012.
23. Hashizume M, Yoshida H, Tanaka K, Suzuki M, Matsumoto I, Sumida T, Mihira M: Interleukine-6 regulates anti-arthritic effect of methotrexate via the reduction of SLC19A1 expression in mouse arthritis model. *Arthritis Res. Ther*;14(2):R96, 2012.
24. Tsuboi H, Matsuo N, Iizuka M, Tsuzuki S, Kondo Y, Tanaka A, Moriyama M, Matsumoto I, Nakamura S, Sumida T: Analysis of IgG4 class switch-related molecules in IgG4-related disease. *Arthritis Res Ther*;14(4):R171, 2012.
25. Inoue A, Matsumoto I, Tanaka Y, Umeda N, Tanaka Y, Mihara M, Takahashi S, Sumida T: TIARP (TNFAIP9) deficiency leads to arthritis via IL-6 overproduction with enhanced NF- κ B, STAT3 signaling and dysregulated apoptosis of macrophages. *Arthritis Rheum*;64(12):3877-85, 2012.
26. Sumida T, Iizuka M, Asashima H, Tsuboi H, Matsumoto I: Pathogenic role of anti-M3muscarinic acetylcholine receptor immune response in Sjogren's syndrome. *Presse Med*;41(9 Pt 2):e461-6, 2012.
27. Horikoshi M, Goto D, Seiji Segawa, Yohei Yoshiga, Keiichi Iwanami, Asuka Inoue, Yuki Tanaka, Matsumoto I, Sumida T: Activation of invariant NKT cells with glycolipid ligand α -galactosylceramide ameliorates glucose-6-phosphate isomerase peptide-induced arthritis. *PLoS One*;7(12):e51215, 2012.

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

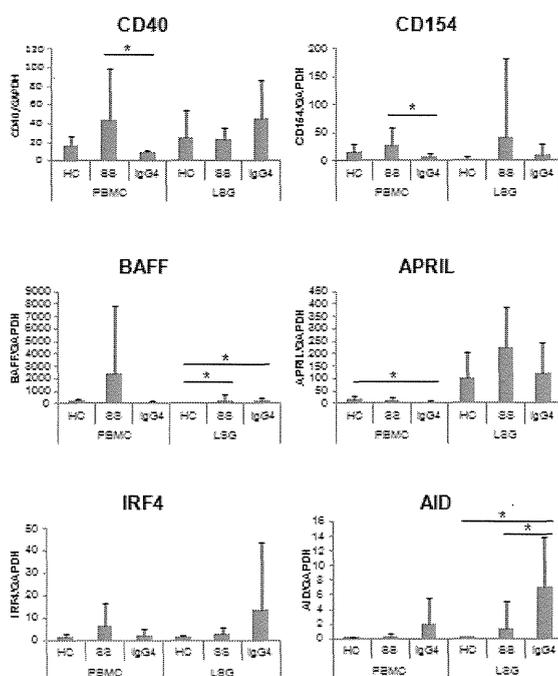
1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

図1 LSGおよびPBMCを用いた定量PCR(サイトカイン、転写因子)



*P<0.05, Mann-Whitney's U-test

図2 LSGおよびPBMCを用いた定量PCR (IgG4非特異的クラススイッチ関連分子)



*P<0.05, Mann-Whitney's U-test

図3 DNAマイクロアレイによるサンプル間クラスタリング(pvclust method)

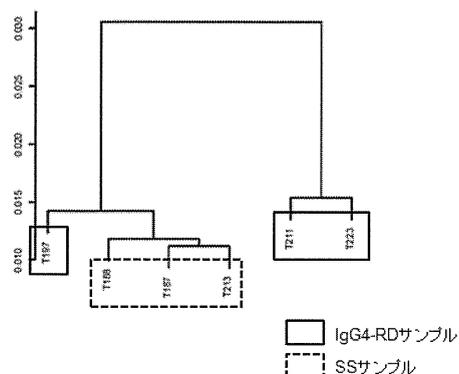
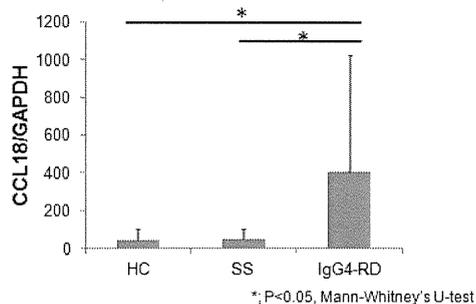


表1 IgG4-RDで発現が増加した発現変動遺伝子(580遺伝子) 上位20遺伝子

| Rank | Gene Symbol | Description | FDR | Fold Change (Log ₂) |
|------|-------------|--|------|---------------------------------|
| 1 | SFP1 | secreted phosphoprotein 1 | 0 | 4.82 |
| 2 | CR1 | complement component (3b/4b) receptor 1 (40kDa blood group) | 0 | 4.20 |
| 3 | TIMD4 | T-cell immunoglobulin and mucin domain containing 4 | 0 | 3.59 |
| 4 | RGS13 | regulator of G-protein signaling 13 | 0 | 3.61 |
| 5 | CR2 | complement component (3b/Epstein Barr virus) receptor 2 | 0 | 3.71 |
| 6 | IGHE | immunoglobulin heavy constant epsilon | 0 | 3.65 |
| 7 | CD72 | CD72 molecule | 0 | 3.45 |
| 8 | CXCL13 | chemokine (C-X-C motif) ligand 13 | 0 | 3.43 |
| 9 | LYVE1 | lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1 | 0.00 | 3.40 |
| 10 | CCL18 | chemokine (C-C motif) ligand 18 (pulmonary and activation-regulated) | 0.00 | 3.37 |
| 11 | AICDA | activation-induced cytidine deaminase | 0.00 | 3.17 |
| 12 | MMP12 | matrix metalloproteinase 12 (macrophage elastase) | 0.00 | 3.25 |
| 13 | TDP2A | topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa | 0.00 | 3.13 |
| 14 | VNN2 | vanin 2 | 0.00 | 3.23 |
| 15 | RRM2 | ribonucleoside reductase M2 | 0.00 | 3.11 |
| 16 | FAH72A | family with sequence similarity 72, member A | 0.00 | 2.93 |
| 17 | CH3L1 | chitinase 3-like 1 (cartilage glycoprotein-39) | 0.00 | 3.51 |
| 18 | CPM | carboxypeptidase M | 0.00 | 3.10 |
| 19 | LOC235563 | hypothetical LOC235563 | 0.00 | 2.87 |
| 20 | MS4A1 | membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 1 | 0.00 | 2.88 |

図4 定量PCRによるvalidation



□ 唇唾液腺(LSG)(bulk)
 HC: N=3
 SS: N=11
 IgG4-RD: N=8
 (DNAマイクロアレイに用いたサンプルとは別サンプル)

表2 IgG4-RDで発現が減少した発現変動遺伝子(280遺伝子) 上位20遺伝子

| Rank | Gene Symbol | Description | FDR | Fold Change (Log ₂) |
|------|--------------|---|------|---------------------------------|
| 1 | SMR3B | submaxillary gland androgen regulated protein 3B | 0 | -6.01 |
| 2 | S100P | S100 calcium binding protein P | 0 | -4.01 |
| 3 | C4orf35 | chromosome 4 open reading frame 35 | 0.00 | -3.25 |
| 4 | CDC15 | coiled-coil domain containing 15 | 0.00 | -3.07 |
| 5 | STAT1 | statenin | 0.00 | -3.00 |
| 6 | DNASE2B | deoxyribonuclease II beta | 0.00 | -3.25 |
| 7 | KLK12 | kallikrein-related peptidase 12 | 0.00 | -2.95 |
| 8 | IFI5 | interferon, alpha-inducible protein 5 | 0.00 | -2.71 |
| 9 | ARG2 | arginase, type II | 0.00 | -2.50 |
| 10 | SPINK5 | serine peptidase inhibitor, Kazal type 6 | 0.00 | -2.68 |
| 11 | PROL1 | proline rich, lacrimal 1 | 0.00 | -2.96 |
| 12 | C5orf27 | chromosome 5 open reading frame 27 | 0.00 | -2.04 |
| 13 | DPP4 | dipeptidyl-peptidase 4 | 0.01 | -2.23 |
| 14 | CEACAM5 | carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 5 | 0.00 | -2.01 |
| 15 | GRBP1L1 | GC-rich promoter binding protein 1-like 1 | 0.01 | -2.30 |
| 16 | IGHD | immunoglobulin heavy constant delta | 0.01 | -2.42 |
| 17 | LOC100510224 | hypothetical LOC100510224 | 0.00 | -1.94 |
| 18 | GNAS | GNAS complex locus | 0.01 | -2.24 |
| 19 | MUC19 | mucin 19, oligomeric | 0.01 | -2.38 |
| 20 | DLX1 | delta-like 1 homolog (Drosophila) | 0.01 | -2.69 |

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 関連疾患および全身性自己免疫疾患における IgG4 型抗核抗体の検索

研究分担者 三森 経世 京都大学大学院医学研究科内科学講座臨床免疫学 教授
研究協力者 吉藤 元 京都大学大学院医学研究科内科学講座臨床免疫学 助教
 杞山 和弘 京都大学大学院医学研究科内科学講座臨床免疫学 大学院生

研究要旨： IgG4 関連疾患 (IgG4RD) 血清 IgG4 の自己抗体活性を検討するため、間接蛍光抗体法により抗核抗体 (ANA) の IgG サブクラスを測定した。その結果、IgG4RD 患者の 60% で通常の ANA が陽性 (カットオフ値 1:40 倍以上) であり、その IgG サブクラスを検討したところ、IgG2 が主体であり、IgG4 は全例で陰性だった。各膠原病の ANA では IgG1/2/3 が検出されたが、IgG4 型 ANA はほぼすべて陰性だった。しかし、SS 患者の 1 例に IgG4 で辺縁型の ANA を認めた。IgG4RD 患者血清は IgG4 高濃度にもかかわらず、ANA のような自己抗体には IgG4 は使われていないことが判明した。

A. 研究目的

IgG4 関連疾患 (IgG4-related disease: IgG4RD) は、涙腺・唾液腺・膵・後腹膜・腎・肺などを侵し、血清 IgG4 が高濃度、病変部 IgG4 陽性形質細胞が高比率であることを特徴とする新しい疾患概念であるが、IgG4 が病態にどのように関与しているか、解析ははまだ不十分である。IgG4RD は、アレルギー性疾患の合併が多いことと血清 IgE 高値となる例が多いことからアレルギー疾患であるという見方がある一方、自己免疫性膵炎 (autoimmune pancreatitis: AIP) で自己抗体がみられることとステロイド剤が奏功することから自己免疫疾患であるという見方がある。「IgG4RD の血清 IgG4 は自己抗体活性を持つのか？」という仮説を検討するために、今回、一般的な自己抗体スクリーニング法である間接蛍光抗体法による抗核抗体 (ANA) テストを改良した Subclass-based ANA test を用いて、IgG4RD および各膠原病における IgG4 型 ANA を検索した。

B. 研究方法

IgG4RD 20 例 (厚労省 IgG4 関連疾患研究班

診断基準による診断確定例)、全身性エリテマトーデス (SLE) 8 例、原発性シェーグレン症候群 (SS) 8 例、強皮症 (SSc) 4 例、多発性筋炎 (PM) 7 例の保存血清を用い、ANA の IgG サブクラスを Subclass-based ANA test で測定した。

HEp-2 細胞基質と FITC 標識ヤギ抗ヒト IgG 抗体を用いた ANA 測定キット (フルオロ HEPANA テスト、MBL) により IgG 型 ANA を測定し、それに加えて IgG サブクラス別の ANA を、いずれも FITC 標識マウスモノクローナル抗体である抗ヒト IgG1 抗体 (Abcam, 50473)、抗ヒト IgG2 抗体 (Alpha Diagnostic Intl, 10122)、抗ヒト IgG3 抗体 (Alpha Diagnostic Intl, 10123)、抗ヒト IgG4 抗体 (Abcam, 99821) を用いて測定した。血清は希釈せず原血清を用い、蛍光顕微鏡で観察し判定した。

(倫理面への配慮)

本研究には京都大学・医の倫理委員会の承認 (E458) を得て採取した患者保存血清を用いた。

C. 研究結果

まず、IgG4RD の自己抗体陽性率を知るために、京大病院・免疫・膠原病内科で診療した IgG4RD 20 例の ANA および特異的自己抗体について検討した。ANA (40 倍以上) を 12 例 (60%) に認め、ANA パターンは主として Homo + Spe 型または Speckled 型で、titer は 40~320 倍だった。特異的自己抗体は抗 SS-A 抗体を 2 例 (10%) に認めた。

次に IgG4RD にみられる ANA が IgG4 サブクラスであるかどうかを検証するため、ANA 80 倍以上の IgG4RD 患者 5 例の血清を Subclass-based ANA test で解析した。代表例 2 例の蛍光顕微鏡画像 (図 1) と、ANA 80 倍以上である IgG4 RD 5 例の各 IgG サブクラス陽性率 (図 2) を示す。IgG4RD の ANA は IgG1 または IgG2 が陽性だったが、全例において IgG3・IgG4 は陰性だった。アッセイに用いた抗ヒト IgG4 抗体が work することを確認するため、ある IgG4RD 例の頸部リンパ節生検標本 (IgG4/IgG 陽性形質細胞比: 0.69) を同一抗体で直接染色したところ、IgG4 を検出した。

コントロールとして SLE、SSc、SS、PM などの膠原病の ANA にどのサブクラスが使われているかを Subclass-based ANA test で調べた。ANA titer の高い例 (2560~5120 倍) や種々の ANA パターンの例 (Discrete speckled など) も対象に含めて、解析を行った。疾患別の各 IgG サブクラス陽性率 (図 2) を示す。すべての疾患で IgG2 が最も高率に陽性で、IgG1・IgG3 も陽性だったが、IgG4 はほぼ全例で陰性だった。しかし、SS の 1 例に辺縁型を呈する IgG4 型 ANA を認めた (図 3)。

SLE、SSc、SS、PM で IgG4 型 ANA が検出されなかった理由として、ANA に使われる各 IgG サブクラスの比率が、血清中の各 IgG サブクラス濃度の比率を反映している可能性が考えられた。それを確かめるために、今回検討した全例の血清 IgG4/IgG 比を算出したところ、SLE、SSc、SS、PM の血清 IgG4/IgG 比は健常人と同

等の 5%未満だった。IgG4RD の血清 IgG4/IgG 比は 34%と高値だった。

D. 考察

今回の検討で IgG4RD および SLE、SSc、SS、PM の ANA には IgG1/2/3 が用いられ、IgG4 サブクラスは含まれていなかった。各疾患の血清 IgG4/IgG 比の検討結果により、SLE、SSc、SS、PM で IgG4 型 ANA をほとんど認めなかった理由として、血清 IgG4/IgG 比がそのまま反映されている可能性が考えられた。一方、IgG4RD 患者は血清 IgG4/IgG 比が大きいにも関わらず、ANA に IgG4 は含まれていない。IgG4RD では、ANA の IgG4/IgG 比は血清 IgG4/IgG 比と一致しない。未知の機序により IgG4 が ANA に使用されにくくなっている可能性が考えられた。

膠原病でみられる自己抗体の IgG サブクラスに関する文献のほとんどで、IgG4 が少ないと報告されている¹⁻⁴⁾。我々の検討では IgG2 が最多だったが、過去の報告では IgG1 が最多とするものが多い。しかし、各サブクラスを検出するモノクローナル抗体間でアフィニティが等しくないため、本研究および過去の報告で用いたアッセイ系でサブクラス別自己抗体の多寡を正確に比べることはできない。ただ IgG4 がきわめて少ないということは繰り返し報告されており確かであろう。

IgG4RD の一型である AIP では、抗 carbonic anhydrase-II 抗体、抗 pancreatic secretory trypsin inhibitor 抗体 (抗 PSTI 抗体) などの抗膵細胞蛋白抗体がみられる。Asada らは抗 PSTI 抗体のサブクラスを検討し、IgG4 ではなく IgG1 であることを示した⁵⁾。彼らは抗 PSTI 抗体価が血清 IgG4 値と相関することも示した。血清 IgG4 値は IgG4RD の活動性と相関することが知られているから、抗 PSTI 抗体は IgG4RD 活動性と相関することを意味し、病態に関与していることを示唆する。にもかかわらず抗 PSTI 抗体が IgG4 ではないということは矛盾である。もしも IgG4 に自己抗体になりにくい性質があ

ると仮定すれば説明可能である。

近年いくつかの IgG4 型自己抗体の報告がある。特発性膜性腎症で認められる抗ホスホリパーゼ A2 受容体抗体が IgG4 サブクラス主体であることが証明されている⁶⁾。肉芽腫症性多発血管炎 (GPA) などの ANCA 関連血管炎で見られる ANCA は、IgG4 の割合が有意に大きいという報告が多数ある⁷⁻⁹⁾。また、関節リウマチ (RA) の抗 CCP 抗体も IgG1・IgG4 が優位とする報告がある¹⁰⁾。ただし、これらの IgG4 型自己抗体は疾患の病態においてあまり重要でないかもしれない。IgG4 はヘテロダイマー (bispecific antibody) を作り、ヘテロダイマーになると抗体のアビディティが低下するため、IgG4 が regulatory な役割を果たしている可能性も考えられる。

今回の検討では各膠原病の ANA に IgG4 がほとんど含まれていなかったが、SS の 1 例では IgG4 型 ANA を認めた。この例の保存血清中 IgG4 を retrospective に測定したところ 228 mg/dL と高値だった。79 歳発症の男性例で、口唇病理像は SS に合致していたが、IgG4 染色はされていない。抗 SS-A 抗体陽性で、NSIP 型の軽症間質性肺炎を合併し、サクソンテスト陰性 (4.4 g/min) だったが、シルマーテスト陽性 (右 7mm、左 5mm) で点眼薬による治療を要したことにより SS と診断した。本例で IgG4 型 ANA を認めたことは、本例の IgG4 異常高値と関連があるかもしれない。

E. 結論

IgG4RD 患者は血清 IgG4 が高濃度にもかかわらず、IgG4RD 患者の ANA には IgG4 が使われていないことを示した。疾患や自己抗体の種

類によって IgG4 の割合は異なる。このように IgG4 に偏向性があることは、IgG4 が何らかの生理学的あるいは病理学的な機能を有している可能性を示唆する。IgG4 の役割についてさらなる検討を要する。

参考文献

- 1) Zouali M, Immunology 1984;51:595-600.
- 2) Eisenberg RA, J Clin Invest 1985;75:1270-7.
- 3) Maran R, J Autoimmun 1993;6:379-87.
- 4) Vazquez-Abad D, Clin Immunol Immunopathol 1997;84:65-72.
- 5) Asada M, Pancreas 2006;33:20-6.
- 6) Beck LH Jr, NEJM. 2009;361:11-21.
- 7) Brouwer E, Clin Exp Immunol 1991;83:379-86.
- 8) Mellbye OJ, Clin Immunol Immunopathol 1994;70:32-9.
- 9) Liu LJ, Nephrology 2008;13:629-35.
- 10) Engelmann R, Rheumatology (Oxford) 2008;47:1489-92.

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

図 1. IgG4RD 代表例 2 例の蛍光顕微鏡画像 (Subclass-based ANA test)

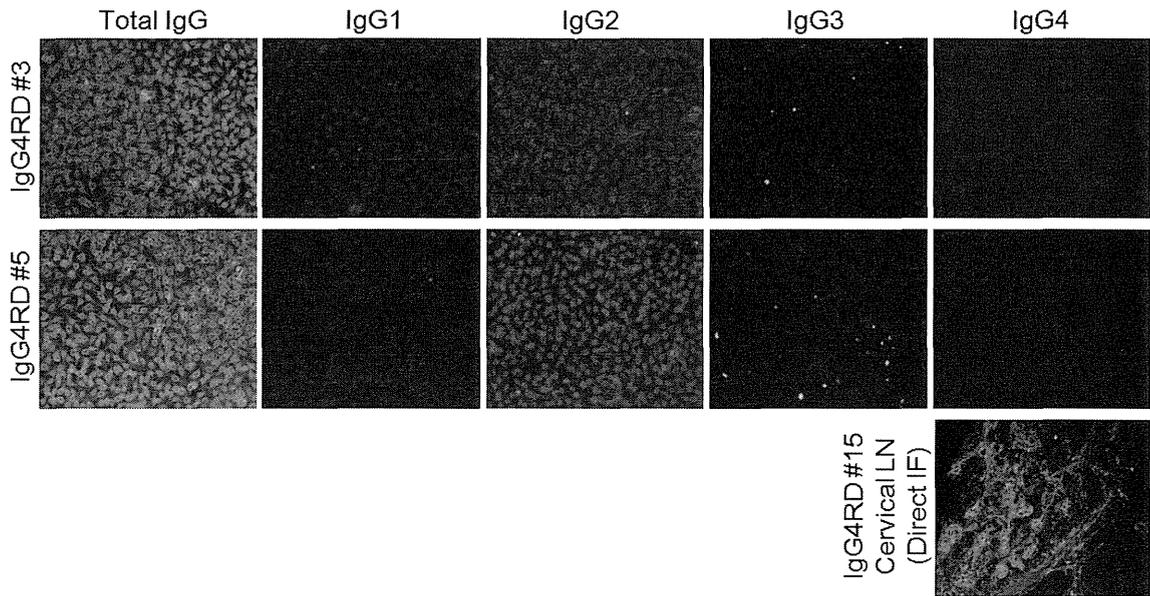


図 2. 各疾患の ANA における各 IgG サブクラス陽性率

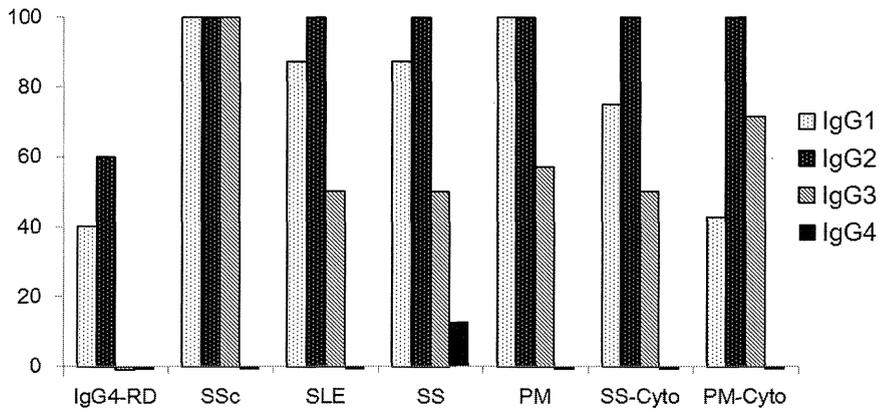
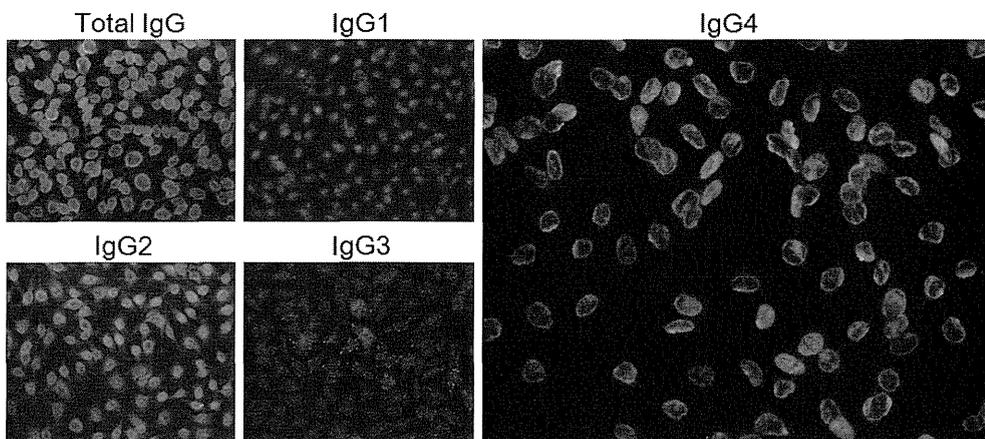


図 3. IgG4 型 ANA がみられた SS 例の蛍光顕微鏡画像



IgG4 関連疾患による涙腺の線維化病変の検討

研究分担者 坪田一男 慶應義塾大学医学部眼科 教授

研究要旨：両側涙腺腫脹をきたした4症例の涙腺組織について主に蛍光免疫組織学的解析と電子顕微鏡をもちいた超微形態の解析を含む病理組織学的解析を行う。涙腺病変部位に集積する線維芽細胞および上皮の特徴を解析し Ig G4 関連疾患に特異的な特殊な線維芽細胞の浸潤の有無および間質の線維化およびコラーゲンの特徴を検討する。今後はさらに症例数を増やし、分子レベルでの Ig G4 関連疾患の線維化発症機序の解明や新規診断・治療法の開発を目指す。

A. 研究目的

IgG4 関連疾患の症例において、眼科領域では涙腺の病変が高頻度に認められる。本疾患の発症機構解明や病態解析には外分泌腺を代表する涙腺組織の炎症および病的な線維化のメカニズムを解明することにより全身的な病態解明につながる可能性もある。本研究では、IgG4 関連疾患症例の病変部発症や病態機構の解明を目指し、涙腺組織解析を行いその病態を追究することを目的とする。

B. 研究方法

涙腺腫脹をきたした患者の診断目的にて生検を施行した涙腺組織で IgG4 関連疾患の診断を得た症例について、診断後不要な涙腺組織検体について患者に対し説明と同意のもと病理学的手法で解析を行った。剖検検体の正常涙腺組織およびシェーグレン症候群と比較検討した。HE 染色、マロリー染色に加えて、蛍光イメージングを用いた免疫組織化学的解析と電子顕微鏡を用いた超微形態を解析した。

(倫理面への配慮)

人涙腺結膜の組織解析には、慶應義塾大学医学部倫理委員会の承認を得ている。(承認番号 20090277) 課題名「ドライアイにおける涙腺、角結膜および涙液、血液の病態の解析」

C. 研究結果

IgG4 関連疾患症例における涙腺腫脹は高度であった。涙腺組織には炎症細胞浸潤と典型的な花筈状線維化を認めた。

免疫組織学的解析により、間質にはコラーゲン特異的分子シャペロンであり、活性化線維芽細胞の指標である HSP47 陽性線維芽細胞の集積を認めた。

電子顕微鏡による超微形態の観察では間質には異常な周期のコラーゲン線維が密に増加していた。さらに強拡大では、細胞質内小器官に変化が認められた。涙腺上皮基底膜は屈曲蛇行し、涙腺上皮基底膜は正常に比して肥厚が認められた。

D. 考察

正常涙腺に比して間質には高度な線維化ともに太い異常な周期のコラーゲン線維が過剰に蓄積していた。IgG4 関連疾患涙腺間質に生じる線維芽細胞は特殊な線維芽細胞であることが考えられた。線維化、間質のコラーゲン線維の解析、涙腺上皮細胞内小器官や細線維の変化をきたすメカニズムの解明のために今後のさらなる検討が必要である。正常検体および他疾患との比較検討が必要である。

E. 結論

Ig G4 関連疾患涙腺組織を解析し、間質の高度な線維化に加えて、異常な周期のコラーゲン線維の集積、上皮内細線維の方向性の異常、涙腺上皮の基底膜の屈曲蛇行、細胞内小器官の病的変化等を認めた。今後症例数をさらに増やして、組織学的検討に加えて機能的な検討が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Tsubota K, Kawashima M, Inaba T, Dogru M, Matsumoto Y, Ishida R, Kaido M, Kojima T, Uchino M, Uchino Y, Ogawa Y, Nakamura S, Higuchi A, Shinmura K, Watanabe M, Kawakita T. The anti-aging approach for the treatment of dry eye. *Cornea*. 2012 Nov;31(11):S3-S8.
2. Uchino Y, Kawakita T, Miyazawa M, Ishii T, Onouchi H, Yasuda K, Ogawa Y, Shimmura S, Ishii N, Tsubota K. Oxidative stress induced inflammation initiates functional decline of tear production. *PLoS One*. 2012 Oct;7(10):e45805.
3. Kamoi M, Ogawa Y, Nakamura S, Dogru M, Nagai T, Obata H, Ito M, Kaido M, Kawakita T, Okada Y, Kawakami Y, Shimmura S, Tsubota K. Accumulation of secretory vesicles lacrimal gland epithelia is related to non-Sjögren's type dry eye in visual display terminal users. *PLoS One*. 2012 Sep;7(9):e43688.
4. Yaguchi S, Ogawa Y, Shimmura S, Hatou S, Nakamura S, Inaba T, Imada T, Ozawa Y, Kawakami Y, Ishida S, Tsubota K. Presence and physiologic function of the Renin-Angiotensin System in mouse lacrimal gland. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012 Aug;53(9):5416-5425.
5. Kojima T, Wakamastu TH, Dogru M, Ogawa Y,

Igarashi A, Ibrahim OM, Inaba T, Shimizu T, Noda S, Obata H, Nakamura S, Wakamatsu A, Shirasawa T, Shimazaki J, Negishi K, Tsubota K. Age-related dysfunction of the lacrimal gland and oxidative stress: evidence from the Cu,Zn-superoxide dismutase-1 (Sod1) knockout mice. *Am J Pathol*. 2012 May;180(5):1879-1896.

6. Tatematsu Y, Ogawa Y, Shimmura S, Dogru M, Yaguchi S, Nagai T, Yamazaki K, Kameyama K, Okamoto S, Kawakami Y, Tsubota K: Mucosal microvilli in dry eye patients with chronic GVHD, *Bone Marrow Transplant* 2012, Mar;47(3):416-425.
7. Uchino M, Ogawa Y, Uchino Y, Mori T, Okamoto S, Tsubota K. Comparison of stem cell sources in the severity of dry eye after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Br J Ophthalmol*. 2012 Jan;96(1):34-37.

2. 学会発表

[国際学会]

1. 2012 Cornea Society/Eye Bank Association of America Fall Educational Symposium, Chicago, USA. 2012/11/09
2. Kim, SK, Ogawa Y, Dana R, Jain S, Khan S, Modak J, Ban Y, Oshima C, Perez V, Riemens A, Rosenblatt M, Tsubota K. International chronic ocular graft-vs-host disease (GVHD) consensus group: Validation study for the proposed diagnostic criteria (Part II). 2012 Cornea Society/Eye Bank Association of America Fall Educational Symposium, Chicago, USA. 2012/11/09

[国内学会]

1. 平成 24 年度 厚生労働科学研究費 難治性疾患等克服研究事業 自己免疫疾患に関する調査研究班 班会議 東京 2012/12/14

2. 小川葉子, 坪田一男. シェーグレン症候群様病態を示すマウスモデルの加齢的解析. 平成24年度 厚生労働科学研究費 難治性疾患等克服研究事業 自己免疫疾患に関する調査研究班 班会議 東京 2012/12/14
 3. 第21回日本シェーグレン症候群学会学術集会 京都 2012/9/7-8
 4. 坪井洋人, 萩原晋也, 浅島弘充, 松本功, 住田孝之, 梅原久範, 川上純, 一瀬邦弘, 佐野統, 坪田一男, 小川葉子, 高村悦子, 斉藤一郎, 井上裕子, 中村誠司, 森山雅史, 竹内勤, 田中良哉, 平田新太郎, 三森経世. シンポジウム2 シェーグレン症候群の診断基準を考える 2-1 日本人シェーグレン症候群患者の診断における3つの診断基準の比較. 第21回日本シェーグレン症候群学会学術集会 京都 2012/9/7
 5. 稲葉隆明, 久恒智博, 佐々木恭正, 小川葉子, 竹内勉, 御子柴克彦, 坪田一男. 慢性的分泌生涯による涙腺のシェーグレン症候群様病態変化. 第21回日本シェーグレン症候群学会学術集会 京都 2012/9/7
 6. 小川葉子, 榛村重人, 森川暁, 馬渕洋, 谷口智憲, 谷口紗織, 稲葉隆明, 岡本真一郎, 河上裕, 岡野栄之, 松崎有未, 坪田一男. 自己免疫疾患様反応を示す眼慢性 GVHD マウスモデルのT細胞と間葉系幹細胞の相互作用. 第21回日本シェーグレン症候群学会学術集会 京都 2012/9/7
- 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 関連疾患の臨床病理学的解析

研究分担者 吉野 正 岡山大学大学院病理学 教授
研究協力者 佐藤康晴 岡山大学大学院病理学 講師

研究要旨：これまで原因不明とされてきた反応性リンパ節病変である PTGC の一部が IgG4 関連疾患であることが判明した。この PTGC 型 IgG4 関連リンパ節症は顎下リンパ節に好発し、経過観察中に他臓器 IgG4 関連疾患を発症することが多いことが判明した。皮膚 IgG4 関連疾患は顎顔面領域（とくに耳介周囲、頬部）に好発し、約半数例に IgG4 関連リンパ節症を発症していた。

A. 研究目的

リンパ節および皮膚における IgG4 関連疾患の臨床病理学的特徴を明らかにする。

B. 研究方法

我々の研究室で IgG4 関連疾患と診断されたリンパ節および皮膚病変を対象として、その臨床および病理学的特徴について検索を行った。

本研究の遂行に当たり、岡山大学倫理委員会で承認を得ている。

C. 研究結果

PTGC 型 IgG4 関連リンパ節症は顎下リンパ節に好発し、経過観察中に他臓器 IgG4 関連疾患を発症することが多かった。皮膚 IgG4 関連疾患は顎顔面領域（とくに耳介周囲、頬部）に好発し、約半数例に IgG4 関連リンパ節症を発症していた。

D. 考察

リンパ節 PTGC はこれまで原因不明のリンパ節反応性病変として扱われてきたが、日本人の顎下リンパ節における PTGC の多くは IgG4 関連疾患であった。皮膚病変も同様に、これまで偽リンパ腫あるいは反応性リンパ組織増生とされてきた病変の多くは、皮膚 IgG4

関連疾患であったと考えられる。

E. 結論

PTGC 型 IgG4 関連リンパ節症と皮膚 IgG4 関連疾患は非常に均一な臨床病態を示すことが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. **Sato Y**, Inoue D, Asano N, Takata K, Asaoku H, aeda Y, Morito T, Okumura H, Ishizawa S, Matsui S, Miyazono T, Takeuchi T, Kuroda N, Orita Y, Takagawa K, Kojima M, **Yoshino T**. Association between IgG4-related disease and progressively transformed germinal centers of lymph node. *Mod Pathol*. 25(7): 956-967, 2012.

2. **Sato Y**, Takeuchi M, Takata K, Ohno K, Iwaki N, Orita Y, Goto N, Hida A, Iwamoto T, Asano N, Ito T, Hanakawa H, Yanai H, **Yoshino T**. Clinicopathologic analysis of IgG4-related skin disease. *Mod Pathol*. 2012 Nov 23. doi: 10.1038/modpathol.2012.196. [Epub ahead of print]

2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況
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

患者血清中におけるバイオマーカー探索の試み

研究分担者 友杉直久 金沢医科大学・総合医学研究所 教授

研究要旨：IgG4 関連疾患における機構解明と疾患マーカーの同定を目指して、マイクロアレイやプロテオミクス手法による遺伝子発現解析を行ってきた。今回新たなマーカー探索を目指して血清中の低分子 RNA の網羅的解析手法の確立を試みたので報告する。材料としては健常人血清中から抽出した低分子 RNA 分画を用い、ライブラリを作成して次世代シーケンサーで網羅的に配列解析を行った。この手法はバイオマーカー探索に有効であり新たな発症機序の解明に寄与することが期待される。

A. 研究目的

近年、様々な低分子の機能性 RNA が注目を集めている。とりわけ、約 22 ヌクレオチドのマイクロRNA (miRNA) は細胞の高次機能発現の調節に重要な役割を果たすとともに、疾患との関連が指摘されはじめており、その役割が注目されている。従来の miRNA の発現解析では、主として細胞内の miRNA が対象とされてきた。最近になって、細胞外に分泌されるタイプの miRNA (分泌型 miRNA) に注目が集まるようになってきた。

たとえば、がん患者では分泌型 miRNA のプロファイリングに大きな変化がみられ、その違いががんの新たなマーカーとして診断や治療に応用できることが明らかになりつつある。一方、臨床においては、疾患のバイオマーカーとして血液がもっとも汎用的に用いられてきたが、その多くは病因とは直接関係しない、いわば「サロゲートマーカー」だった。これに対して機能性 miRNA は、他の遺伝子の発現調節に関わり、細胞内のシグナル伝達に直接関わることより、病因と直接関連するバイオマーカーとなる可能性を秘めている。今回、次世代シーケンサシステムを用い、血清サンプルからの低分子 RNA の網羅的解析を実施し、その有効性を検証した。

B. 研究方法

miRNA の調製 ヒト血清 2 ml より市販のキットを用い、small RNA を精製した。得られた small RNA サンプルを吸光度計により定量したところ、12ng/ul で 20ul、総量にして 240ng であった。この全量を用い、Ion Total RNA-Seq kit でプロトコールに従いライブラリを作成した。得られたライブラリをリアルタイム PCR により定量し、テンプレート調製に用いた。ライブラリをテンプレート自動調製機器 OneTouch にかけてシーケンス用サンプルを調製した。得られたサンプルは、Life Technologies社シーケンス Ion PGM システムを用い、35bp 相当のシーケンスを行った。

(倫理面への配慮)

研究班における取り決めに従って、倫理面にも配慮して研究を行った。

C. 研究結果

今回のランで得られたシーケンスリード長の分布を調べると 20bp 付近に高いピークが観察され、miRNA が正しく読まれていることが確認された。得られたリードをヒトゲノムにマップしたところ、約 38 万タグのリードがマッピングされた。今回の解析では 449 種類の既知 miRNA を検出することができた。すでに同じサ

ンプルを DNA マイクロアレイにより予備的に解析していたが、両者に共通のオーバーラップした miRNA 配列も見出せたことから、次世代シーケンサーとマイクロアレイ解析にはある程度の互換性があると考えられる。

D. 考察

臨床的には、血清中の miRNA の網羅的な解析は、患者の日々の状態を示すバイオマーカーの探索手法として有用だと考えられる。患者の状況は、病歴や治療方法や体調によって日々刻々と変化するので、個人の体質に関わる固定した DNA 配列の違いだけでなく、一人の患者の変化を miRNA 量で経時的にモニターすることが有効と考えられるからである。技術的には、次世代シーケンサーを用いた miRNA の解析が可能であり、従来のアレイに比べ、miRNA の配列と同時に発現数に関する情報が格段に多く、今後の miRNA の解析の主流になるものと思われる。今後、IgG4 関連疾患の解析に応用したい。

E. 結論

従来見出されたタンパク質等のマーカーは病因と関連性のないサロゲートマーカーも多かったが、miRNA マーカーは 病因や治療法開発への発展性も今後十分に期待される。手法としてはマイクロアレイ解析よりも次世代シーケンサー型の解析の方が優れていると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表
該当なし
2. 学会発表
該当なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

該当なし

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

IgG4 関連甲状腺疾患の病態と治療開発に関する研究

研究分担者 赤水尚史 和歌山県立医科大学 内科学第一講座 教授

研究要旨：近年注目されている全身疾患である IgG4 関連疾患(IgG4-RD)においては、各臓器の病態解析や臨床像の評価方法や治療法の開発が大きな課題となっている。当研究は、IgG4-RD の臓器症状の一つとして甲状腺における IgG4 関連甲状腺疾患を提唱し、臨床的並びに基礎的に研究を行うものである。臨床的には、IgG4 関連甲状腺疾患として橋本病、リーデル甲状腺炎、バセドウ病、バセドウ病眼症、それ以外の甲状腺疾患を評価対象と考え、IgG4-RD との関連を検討する。基礎的研究においては甲状腺の免疫機構に着目し、IgG4 関連甲状腺疾患における IgG4 の分子活性や免疫サイトカイン動態を始めとした病態を解明する。将来的には、適切な臨床的診断を行い、迅速かつ正確な治療を行うために IgG4 関連甲状腺疾患ガイドライン作成を目標とする。

研究協力者

稲葉秀文、竹島 健

所属

和歌山県立医科大学 内科学第一講座

A. 研究目的

IgG4 関連疾患(IgG4-RD)は、全身臓器においてリンパ球・IgG4 陽性形質細胞の浸潤や繊維化を中心とする臓器障害と血清 IgG4 の高値を特徴とする。2002 年に自己免疫性膵炎の患者において血清 IgG4 値が高値を示すという本邦の報告を端緒に涙腺、唾液腺、甲状腺、肺、腎臓、後腹膜、尿管、前立腺等の各臓器障害と血清 IgG4 値異常が報告されている。自己免疫性膵炎の頻度は約 5000 人中 1 人とされているが、今後検査技術の向上や血清 IgG4 値測定が昨年保険収載されたことより発見率が上昇するものと考えられる。

一方、甲状腺は甲状腺濾胞上皮細胞が甲状腺ホルモンを産生し全身代謝を司る臓器である。自己免疫性甲状腺疾患は、橋本病とバセドウ病が代表的である。自己免疫性甲状腺疾患は、最も患者数の多い自己免疫疾患であり、人口の約一割が罹患する。橋本病においては、Th1 作用が甲状腺濾胞上皮細胞を障害し甲状腺機能低下症が惹起される。

バセドウ病は、TSH(甲状腺刺激ホルモン)受容体に対する抗体(TRAbs)が TSH 受容体を刺激することにより、甲状腺機能亢進症がもたらされる疾患である。

IgG4-RD と甲状腺との関わりについては、激しい炎症所見と他臓器への浸潤を特徴とする Riedel 甲状腺炎が IgG4-RD の一部であるとされてきた。それに加え、2010 年には Kakudo らにより橋本病の繊維化亜型の 10-30%が IgG4-RD の可能性があることが病理学的に提唱された。我々は彼らと協力しその仮説を臨床的ならびに分子生物学的に検討し、Riedel 甲状腺炎、橋本病に加えて、バセドウ病やバセドウ病眼症やそれ以外の甲状腺疾患において IgG4 関連甲状腺疾患の可能性を考え研究を行う。

B. 研究方法

1. Riedel 甲状腺炎、橋本病に加えて、バセドウ病やバセドウ病眼症やそれ以外の甲状腺疾患において血清 IgG4 値を測定し、高 IgG4 血症を呈する群の頻度、家族歴、喫煙歴、臨床所見、甲状腺エコー所見等を評価する。特に Riedel 甲状腺炎に関しては症例数が限られているため、その疑い例も含めて医中誌、学会

発表、出版書籍、Pubmed を検索し症例を検討し関係施設と協力し組織標本の検討も行う。なお当計画は本学倫理委員会の承認（当学倫理委員会承認 1082 号）を経てヘルシンキ宣言に則り研究を行う。

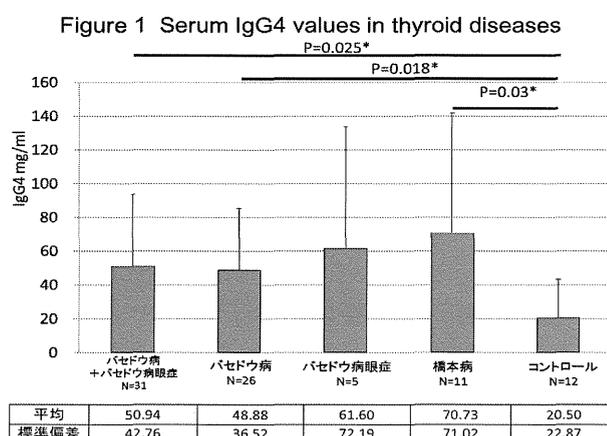
2. IgG4-RD では Th1<Th2 の偏位が特徴的とされ、制御性 T 細胞 (Treg) の産生が亢進するとともに過剰産生された TGF- β が組織の繊維化を促進し、同じく過剰産生された IL-10 が B 細胞から形質細胞への転化を促進するとともに IgG4 の産生を促す。自己免疫性甲状腺疾患の一部にて Th2 作用が亢進する状態が認められるが血清 IgG4 値との関連や病態における意義は不明である。よって我々は自己免疫性甲状腺疾患（橋本病、バセドウ病）やバセドウ眼症に加えて Riedel 甲状腺炎やそれ以外の甲状腺疾患において血清 IgG4 濃度や Th1, Th2, Th17, Treg に関するサイトカインの測定、血清 IgG 濃度、血清 IgE 濃度、甲状腺超音波検査、眼科的検査等を行い、IgG4 の臨床的意義を明らかにする。なお当計画は本学倫理委員会の承認（当学倫理委員会承認 1082 号）を得ている。
3. IgG4 の Fab 部位の変異や他の IgG サブタイプとの相互作用が IgG4-RD において臓器機能に阻害的役割を果たしていることが報告されている。そこで我々はバセドウ病における TRAb のサブクラスに関する検討を計画した。すなわち、TRAb のサブクラス IgG4 の Fab 部位や他の IgG との相互作用にて 1) TSH 結合抑制、2) TSH 受容体に対する活性化抑制、あるいは 3) 甲状腺細胞増殖抑制に関わるのではないかという仮説を立てた。研究方法としては、放射性物質にて標識した IgG の各サブタイプ分子を用いて免疫沈降ならびにウエスタンブロットを行い相互の結合作用を観察し、ラット甲状腺細胞を用いそれぞれの IgG 添加時の cAMP や細胞増殖能を測定する。さらに TSAb アッセイ等により活性化部位の解析を行う。

また TRAb 内にて阻害型 TRAb 活性を有する部位を同定し、変異 IgG4 ペプチドを合成し添加した際に甲状腺細胞への影響の変化を観察し治療応用の可能性を探求する。

4. 遺伝因子に関しては、自己免疫性膵炎において日本人では HLA-DRB1*0405 の関与が示唆されているが、IgG 4 関連疾患においては更に人種間における発症頻度の相違や特定の HLA の関与につき発展的解析が必要とされている。我々は自己免疫性甲状腺疾患に関して HLA-DR との関連に関する研究を行ってきたが、今回 IgG4 関連甲状腺疾患における HLA-DR タイピングを行い、可能であれば HLA-class I と他の Class II 分子にも対象を広げ臨床的データを収集し疾患との関連を検討する。
5. 将来的には IgG4RD モデルマウスの開発とその甲状腺病変に関する検討、橋本病の自然発症モデル動物について血清 IgG4 濃度の検討等を予定している。

C. 研究結果

まず当科を受診した甲状腺疾患患者 59 名において前向きかつ網羅的に血清 IgG4 値を測定した (Figure 1)。



その結果、橋本病群 (70.73+71.02 mg/dl)、バセドウ病群 (48.88+36.52 mg/dl) はコントロール群 (20.50+22.87mg/dl) に比して有意に血清 IgG4 濃度が高値を示し (P=0.03, P=0.018,

respectively)、バセドウ病とバセドウ病眼症を合わせた群においても(50.94±42.76 mg/dl)コントロール群に比して血清 IgG4 値が有意に高値を示した(P=0.025)。この中では橋本病群が最も高値を示した。今後も測定対象者数を加えていく方針である。

Riedel 甲状腺炎に関しては 2012 年 2 月より医中誌、学会抄録集、出版書籍、Pubmed、を Riedel あるいは Riedel' s のキーワードにて検索し、98 件がヒットした。そのうち、重複を除き Riedel 甲状腺炎との関連があると思われる 26 件につき検討した。その内訳は以下の通りである。

症例報告 19 件

- Riedel 甲状腺炎 14 例
- 亜急性甲状腺炎 7 例
- MALToma 1 例
- 橋本病線維亜型 1 例
- 診断変更 2 例
- 悪性リンパ腫 1 例
- 甲状腺乳頭癌 1 例

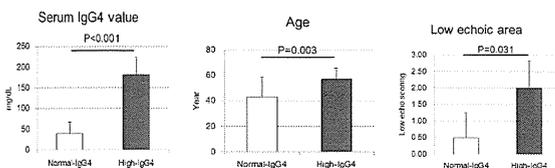
レビュー 7 件

以上 26 件の筆頭著者（不在の場合は、その他担当者）に対し、臨床研究への協力を紙面で要請し現在臨床データ、血清 IgG4 値、組織標本につき解析を進めている。

次に、109 名のバセドウ病患者につき血清 IgG4 値測定及び関連項目に対する評価を行った結果を (Table 1) に示す。

Table 1. Comparison of clinical characteristics and serum IgG4 value in patients with GD.

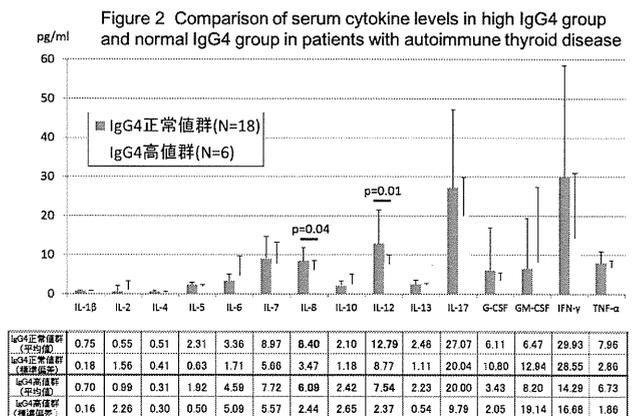
| | Normal-IgG4 (N=102, 93.6%) | | High-IgG4 (N=7, 6.4%) | | P values |
|---|-------------------------------|-------|--------------------------|--------|--------------------|
| | AVG. | SD. | AVG. | SD. | |
| Gender (male/female) | 14/88 | | 1/6 | | 0.967 ^A |
| Presence of Graves' ophthalmopathy | 26/102 | | 2/7 | | 0.852 ^A |
| Familial history of AITD | 28/102 | | 1/7 | | 0.445 ^A |
| Own smoking history | 31/102 | | 2/7 | | 0.919 ^A |
| Age (Year) | 43.4 | 15.4 | 57.4 | 8.5 | 0.003 |
| Thyroid size in ultrasound (mm ²) | 962.7 | 788.9 | 1150.7 | 340.1 | 0.456 |
| Degree of low echogenicity (0, 1, 2, 3) | 0.50 | 0.76 | 2.00 | 0.82 | 0.031 |
| Increase of color doppler flow (0, 1, 2, 3) | 1.33 | 0.88 | 1.25 | 1.26 | 0.816 |
| Serum IgG4 (mg/dL) | 39.6 | 27.6 | 182.1 | 42.3 | <0.001 |
| Serum IgG (mg/dL) | 1227.0 | 237.8 | 1421.0 | 391.7 | 0.334 |
| TSH (mIU/L) | 0.67 | 3.19 | 7.69 | 17.58 | 0.315 |
| FT3 (pg/mL) | 9.05 | 7.40 | 8.54 | 10.56 | 0.904 |
| FT4 (ng/dL) | 2.42 | 1.59 | 1.86 | 1.57 | 0.392 |
| TRAb (IU/L) | 16.1 | 27.5 | 176.7 | 443.8 | 0.370 |
| TgAb (IU/mL) | 387.6 | 852.3 | 1182.1 | 1666.0 | 0.347 |
| TPOAb (IU/mL) | 211.7 | 213.1 | 181.7 | 249.1 | 0.805 |



この結果、109 名のバセドウ病患者のうち 7 名にて高 IgG4 血症 (135mg/dl 以上) を認めた。さらに、高 IgG4 血症を認める群と正常 IgG4 値群 (135mg/dl 未満、102 名) に分類し検討を行った。その結果、高 IgG4 血症を認める群では有意に高年齢、甲状腺エコー上の低エコー領域の増加を認めた (上図 P=0.003, P=0.031, respectively)。また、高 IgG4 血症を認める群では TRAb、TgAb、TPOAb のいずれも高値を示した。

今後この結果を踏まえて、バセドウ病だけでなく橋本病等の他の甲状腺疾患における臨床的解析を進めるとともに、全身検索において IgG4 関連疾患との関係を解析する方針である。

次に橋本病とバセドウ病を合わせた自己免疫性甲状腺疾患における血清 IgG4 値と血中サイトカインとの関連を解析した (Figure 2)。



まず自己免疫性甲状腺疾患患者 24 名を血清 IgG4 高値群 (>=108mg/dl、6 名) と正常値群 (18 名) に分け IL-1β, IL2, IL4, IL5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, G-CSF, GM-CSF, IFN-γ, TNF-α の各血清濃度を測定した。この結果、IL-8 値と IL-12 値が IgG4 高値群 (IL-8: 6.09±2.44 pg/dl, IL12: 7.54±2.37 pg/dl) は IgG4 正常値群 (IL-8: 8.40±3.47 pg/dl, IL12: 12.79±8.77 pg/dl) に比して有意に減少していた (P=0.04, P=0.01, respectively)。また血清 IL-10 濃度が IgG4 高値群 (2.42±2.65 pg/dl) において IgG4 正常値群 (2.10±1.18 pg/dl) に比し

て増加していた。その他のサイトカイン濃度に関しては有意差を認めなかった。今後さらに症例数を集積し IgG4 のカットオフ値も 135mg/dl に設定し再度検討を行う。

D. 考察

自己免疫性甲状腺疾患である橋本病やバセドウ病がコントロール群に比して平均血清 IgG4 値が高値を示したことは、自己免疫と IgG4 との関連が示唆された。更に組織のリンパ球浸潤や繊維化の特徴を有する橋本病群において最も平均血清 IgG4 値を示したことは興味深く、今後甲状腺疾患と IgG4-RD との関連を考える上で重要と思われた。今後より詳細に血中 IgG4 値と甲状腺機能、甲状腺自己抗体値との相関を検討する必要がある。

バセドウ病において一定の割合で高 IgG4 血症を示す群を認め、高年齢や甲状腺エコー上の低エコー領域の増加との関連を TgAb や TPOAb の増加とともに認めたことは橋本病との合併や甲状腺における繊維化との関連が示唆された。

サイトカインの解析において、自己免疫性甲状腺疾患の一部が IgG4 関連甲状腺疾患である可能性が示唆された。また、IgG4 高値群での IL-12 の分泌低下は Th1 細胞への分化抑制と Th2 細胞への分化促進が示唆された。同群における IL-10 の分泌増加は Treg 活性亢進を示唆しており、IgG4-RD と同様に Th2 並びに Treg 優位であると考えられた。

E. 結論

今回の研究では自己免疫性甲状腺疾患にて高血清 IgG4 値を示すことが示唆された。またバセドウ病の一部が IgG4-RD との関わりを持つ可能性が考えられた。自己免疫性甲状腺疾患におけるサイトカイン解析においては、IgG4-RD との共通点が認められた。

F. 期待される効果、研究の発展性

以上のアプローチは免疫サイトカイン分泌、内分泌学的動態、遺伝因子との関連につき網羅的に行うものであり、総合的な知見の集積により IgG4 関連甲状腺疾患の全体像がより明らかになるものと思われる。特に血中 IgG4 とサイトカイン濃度の研究については倫理委員会の承認を受け本学での研究から、全国規模での研究調査を行うことが決定した。それらの研究結果を総合し IgG4 関連甲状腺疾患に関する診断ガイドライン確立を目標とする。さらに今回の同様の方法にて将来的には甲状腺癌や他の悪性腫瘍と IgG4 との関連の検討を予定している。

将来的には研究対象を全身に拡大し、IgG4-RD の抗原同定やモデルマウスの開発を通して効果的な治療法を検討する。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kawano K, Hattori Y, Iwakura H, Akamizu T, Maitani Y: Adrenal tumor volume in a genetically engineered mouse model of neuroblastoma determined by magnetic resonance imaging. *Exp Ther Med* 4(1): 61-64, 2012
- 2) Hotta M, Ohwada R, Akamizu T, Shibasaki T, Kangawa K: Therapeutic potential of ghrelin in restricting-type anorexia nervosa. *Methods Enzymol* 514: 381-98, 2012
- 3) Ariyasu H, Yamada G, Iwakura H, Akamizu T, Kangawa K, Nakao K: Transgenic mice overexpressing ghrelin or ghrelin analog. *Methods Enzymol* 514: 371-7, 2012
- 4) Akamizu T, Satoh T, Isozaki O, Suzuki A, Wakino S, Iburi T, Tsuboi K, Monden T, Kouki T, Otani H, Teramukai S, Uehara R, Nakamura Y, Nagai M, Mori M; Japan Thyroid Association: Diagnostic criteria,

- clinical features, and incidence of thyroid storm based on nationwide surveys. *Thyroid* 22(7): 661-79, 2012
- 5) Ihara Y, Kanda Y, Seo M, Watanabe Y, Akamizu T, Tanaka Y: Growth stimulating antibody, as another predisposing factor of Graves' disease (GD): analysis using monoclonal TSH receptor antibodies derived from patients with GD. *Endocr J* 59(7): 571-7, 2012
- 6) Akamizu T, Satoh T, Isozaki O, Suzuki A, Wakino S, Iburi T, Tsuboi K, Monden T, Kouki T, Otani H, Teramukai S, Uehara R, Nakamura Y, Nagai M, Mori M: Diagnostic criteria and clinico-epidemiological features of thyroid storm based on a nationwide survey. *Thyroid* 22(7):661-79. 2012
- 7) Akamizu T, Kangawa K: The physiological significance and potential clinical applications of ghrelin. *Eur J Intern Med* 23(3): 197-202, 2012
2. 学会発表
- 1) Kazuo Chin, Kimihiko Murase, Yoshiro Toyama, Yuka Harada, Tsuneto Akashiba, Koichiro Tastumi, Yuichi Inoue, Makoto Satoh, Shigeru Sakurai, Hiroki Sakakibara, Toshiaki Shiomi, Hiroshi Kimura, Soichiro Miyazaki, Toru Tsuda, Kazuhisa Bessho, Kazuya Yoshida, Kenji Ueshima, Takashi Akamizu, Hiroshi Kadotani, Yuma Hoshino, Toru Oga : The comparison of the effect of two Chinese herbal medicines (Bofu-tsusho-san and Dai-saiko-to) on metabolic disorders in obstructive sleep apnea patients with sustained obesity and hypertension. The 17th Congress of the APSR December 14-16, 2012 Hong Kong
- 2) Takashi Akamizu, Tetsurou Satoh, Osamu Isozaki, Atsushi Suzuki, Shu Wakino, Tadao Iburi, Kumiko Tsuboi, Tsuyoshi Monden, Tsuyoshi Kouki, Naotetsu Kanamoto, Hajime Otani, Satoshi Teramukai, Masatomo Mori : Novel Diagnostic Criteria and Clinico-Epidemiological Features of Thyroid Storm Based on a Japanese Nationwide Survey. Takashi Akamizu, Tetsurou Satoh, Osamu Isozaki, Atsushi Suzuki, Shu Wakino, Tadao Iburi, Kumiko Tsuboi, Tsuyoshi Monden, Tsuyoshi Kouki, Naotetsu Kanamoto, Hajime Otani, Satoshi Teramukai, Masatomo Mori : Novel Diagnostic Criteria and Clinico-Epidemiological Features of Thyroid Storm Based on a Japanese Nationwide Survey. ENDO 2012: The 94th Annual Meeting & Expo June 23-26, 2012 Houston, USA
- 3) T. Akamizu, N. Sakura, Y. Shigematsu, G. Tajima, A. Ohtake, H. Hosoda, H. Iwakura, H. Ariyasu, K. Kangawa : Plasma ghrelin levels appeared to be elevated in patients with medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency and glutaric aciduria type II: Evidence for that acyl-CoA is the substrate for ghrelin acylation. 15th International & 14th European Congress of Endocrinology (ICE/ECE 2012) May 5-9, 2012 Florence, Italy
- 4) 竹島 健、原田沙耶、浦木進丞、古川安志、太田敬之、稲葉秀文、石橋達也、高木伴幸、若崎久生、古田浩人、西 理宏、佐々木秀行、赤水尚史 : Pheochromocytoma Multisystem Crisis を来した褐色細胞腫の1例. 第22回臨床内分泌代謝Update. 大宮ソニックシティ. 2013年1月18-19日 さいたま市
- 5) 船橋友美、竹島 健、若崎久生、西 理宏、玉川えり、山岡博之、宮本和佳、古川安志、稲葉秀文、佐々木秀行、赤水尚史 : チアマゾール使

- 用中にぶどう膜炎を来たした HTLV-1 陽性 Basedow 病の一例. 第 55 回日本甲状腺学会学術集会 2012 年 11 月 29 日 - 12 月 1 日 福岡市
- 6) 竹島 健、原田沙耶、船橋友美、玉川えり、山岡博之、宮本和佳、古川安志、稲葉秀文、若崎久生、西 理宏、赤水尚史：バセドウ病治療経過中に褐色細胞腫クリーゼを来たした 1 例. 第 55 回日本甲状腺学会学術集会 2012 年 11 月 29 日 - 12 月 1 日 福岡市
- 7) 稲葉秀文、竹島 健、古川安志、船橋友美、玉川えり、山岡博之、宮本和佳、太田敬之、若崎久生、西 理宏、赤水尚史：妊娠に伴う甲状腺中毒症に関する検討. 第 55 回日本甲状腺学会学術集会 2012 年 11 月 29 日 - 12 月 1 日 福岡市
- 8) 宮本和佳、船橋友美、玉川えり、竹島 健、早川隆洋、山岡博之、古川安志、稲葉秀文、西 理宏、佐々木秀行、赤水尚史：橋本病と木村病に外眼筋腫大と眼瞼腫脹を合併し高 IgG4 血症を呈した一例. 第 55 回日本甲状腺学会学術集会 2012 年 11 月 29 日 - 12 月 1 日 福岡市
- 9) 古川安志、松野正平、玉川えり、竹島 健、宮本和佳、稲葉秀文、若崎久生、古田浩人、西 理宏、佐々木秀行、赤水尚史：甲状腺眼症の合併が疑われた多中心性キャスルマン病の一例. 第 55 回日本甲状腺学会学術集会 2012 年 11 月 29 日 - 12 月 1 日 福岡市
- 10) 赤水尚史：シンポジウム 2 バセドウ病外科治療の変遷「特別発言」. 第 45 回日本甲状腺外科学会学術集会 2012 年 10 月 4 - 5 日 横浜市
- 11) 石橋達也、稲葉秀文、田中宏典、古川安志、太田敬之、若崎久生、古田浩人、西 理宏、佐々木秀行、赤水尚史：多発性嚢胞腎の経過中に DIHS を来たし、続いて 1 型糖尿病と橋本病を発症した一例. 第 85 回日本内分泌学会学術総会 2012 年 4 月 19 - 21 日 名古屋市
- 12) 有安宏之、岩倉 浩、寒川賢治、中尾一和、赤水尚史：全身性強皮症患者における消化管障害に対するグレリンの臨床効果に関するクロスオーバー試験. 第 85 回日本内分泌学会学術総会 2012 年 4 月 19 - 21 日 名古屋市
- 13) 稲葉秀文、赤水尚史、Leslie J De Groot：シンポジウム 2 自己免疫機序と内分泌代謝疾患「バセドウ病の免疫学的成因解析と新規治療法開発」. 第 85 回日本内分泌学会学術総会 2012 年 4 月 19 - 21 日 名古屋市
- 14) 有安宏之、岩倉 浩、村山敏典、湯川尚一郎、吉村健一、横出正之、三森経世、中尾一和、寒川賢治、赤水尚史：全身性強皮症患者における消化管障害に対するグレリンの臨床効果に関するクロスオーバー試験. 第 109 回日本内科学会講演会 2012 年 4 月 13 - 15 日 京都市
- H. 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
特記すべき事項なし。