

炎 49 例について年齢、性別、血液・生化学検査値、肝生検病理組織および治療経過について retrospective に検討を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は鹿児島大学倫理審査委員会における承認を得て行われた。

C. 研究結果

1. 当科において経験した IgG4-RD 11 例に関する検討

- (1) 平均年齢 65.6 ± 8.3 歳、男性 6 例、血清 IgG 2744 ± 1127 mg/dL、血清 IgG4 805 ± 486 mg/dL であった。平均罹患臓器数は 4.1 で、自己免疫性膵炎（確診例）10 例、涙腺・顎下・唾液腺病変 8 例、肺病変（縦隔・肺門部リンパ節含む）8 例、胆管炎 7 例、後腹膜線維症 3 例、多発リンパ節炎 5 例、腎病変 2 例、肝病変 2 例であった。
- (2) 膵 EUS-FNA が実施された 5 例中 1 例（20%）で、また小唾液腺生検が実施された 7 例中 5 例（71.4%）で病理診断が得られた。
- (3) 今回検討を行った IgG4-RD 11 症例において、肝病変が 2 例（18%）で認められた。
- (3-1) 肝生検で診断された 50 歳代女性（症例 10）は多発リンパ節炎と肺病変を合併していたが、膵炎はみられなかった。血清 ALT 値は基準値内であったが、肝組織では門脈領域にリンパ球浸潤を認め、IgG4/IgG 陽性細胞比 40%以上かつ IgG4 陽性形質細胞 10 個/HPF を超え、肝組織において IgG4-RD 包括診断基準を満たした。
- (3-2) 唾液腺や肺・膵・腎病変を有した 60 歳代男性（症例 11）は ALT 38 IU/L と ALT 値の軽度上昇を認め、FDP-PET 検査で肝内に異常集積を認めた。肝組織では門脈領域にリンパ球を主体とした炎症細胞浸潤を認め、IgG4 陽性形質細胞を 10 個/HPF 以上認めた。（本症例では併せて IgG4/IgG1 陽性細胞比を評価し 40%以上であった。）

2. 当科において経験した自己免疫性肝炎

49 症例に関する検討

2007 年 4 月～2012 年 12 月にかけて、当科において経験した自己免疫性肝炎 49 症例（免疫抑制剤による治療未施行例）について retrospective に検討を行った。

- (1) 平均年齢 58.2 ± 13.9 歳、男性 4 例、ALT 値の平均は 232 ± 274 IU/L、血清 IgG 2564 ± 1083 mg/dL、抗核抗体陽性率は 95.9%であった。
- (2) 血清 IgG4 値と血清 IgG 値の間に統計学的な相関関係はみられなかった。
- (3) 今回検討した自己免疫性肝炎 49 例中、血清 IgG4 高値 (≥ 135 mg/dL) は 3 例であった。血清 IgG4 高値群 (n=3) と正常群 (n=46) の 2 群間において生化学検査値における有意差はみられなかった。また、ステロイド導入後早期における治療反応性についても有意差は見られなかった。
- (4) 血清 IgG 正常の 1 例に IgG4/IgG > 5% の症例を認めた。IgG4 高値 (≥ 135 mg/dL) の 3 例と併せた 4 例について肝組織学的評価を改めて行ったところ、1 例（症例 3）で形質細胞主体の炎症細胞浸潤を認め、IgG4 陽性形質細胞を 10 個/HPF 以上認めた。（本症例においても併せて IgG4/IgG1 陽性細胞比を評価し 40%以上であった。）
- ・症例 2：プレドニゾロン (PSL) 2.5mg/日まで減量した時点で自己免疫性肝炎が再燃し、現在、PSL+AZA の併用療法を行っている。
- ・症例 3：PSL 10mg/日まで減量したが、自己免疫性肝炎が再燃し PSL 20mg/日まで増量、その後、ALT 値は改善し、12.5mg/日まで漸減中である。

D. 考察

今回、IgG4-RD と診断された 11 例中 2 例に肝病変が認められた。AIP において、60～70%の頻度で肝障害を合併する事が知られているが、AIP における肝細胞障害はステロイド治療によりその組織所見が改善する事が報告されている。

今回、肝病変を認めた 2 例において、1 例は軽度の ALT 上昇を認めたがステロイド治療導入前に自然経過で ALT 値の改善

を認めており、もう 1 例においても ALT 値は基準値内と、組織における IgG4 陽性形質細胞の肝障害に寄与する明らかな影響は見いだせなかった。

また、自己免疫性肝炎 49 例の検討では、3 例(6%)に血清 IgG4 高値(≥ 135 mg/dL)の症例を認めた。自己免疫性肝炎症例において、IgG4-RD の診断基準を満たす症例は IgG4 関連自己免疫性肝炎 (IgG4-associated AIH) と呼ばれるが、その頻度は 3.3%~35%と組織診断の基準によって大きくバラついており、病態に及ぼす影響など、その詳細は未だ不明である。本研究において、血清 IgG4 高値の AIH は 3 例/49 例(6%)であり、組織学的にも IgG4 関連自己免疫性肝炎の診断基準を満たす症例は 1 例/49 例(2%)のみであった。血清 IgG4 高値 (≥ 135 mg/dL) 群 (n=3) と正常 (<135 mg/dL) 群 (n=46) の比較では、ALT、ALP、 γ GTP、T-Bil などの値に有意差はみられなかった。ステロイド導入後早期における治療反応性についても有意差は見られなかったが、血清 IgG4 高値 (≥ 135 mg/dL) の 3 例中 2 例においてステロイド漸減中に AIH 再燃と思われる血清 ALT 値の上昇が見られた。一般に IgG4 関連疾患においてはステロイド治療に対する効果が高いといわれているが、本研究の結果からは、AIH において血清 IgG4 高値の症例ではステロイド減量に際し注意を要すると考えられた。

E. 結論

IgG4-RD 11 例中 2 例に肝病変を認めた。また、retrospective な検討において、自己免疫性肝炎と診断されていた 49 例中、3 例に血清 IgG4 高値例を認め、うち 1 例については肝組織所見においても IgG4-RD の診断基準を満たすものであった。血清 IgG4 高値の自己免疫性肝炎 3 例中 2 例においてステロイド減量中に AIH の再燃を認めており、IgG4 高値の自己免疫性肝炎症例における治療反応性やステロイドの適正量については更なる検討が必要と考えられた。また、肝病変を有する IgG4-RD における血清トランスアミラーゼ値は低値であり、IgG4 陽性形質細胞の

肝障害や長期予後への寄与についても更なる検討が必要と考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

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

ゲノム解析の手法を用いた疾患関連遺伝子の探索

研究分担者 松田 文彦 京都大学大学院医学研究科附属ゲノム医学センター・教授

研究要旨

IgG4関連疾患の網羅的オミックス解析のため、患者検体の集積を継続した。DNA検体は758例まで蓄積し、ゲノム網羅的なSNPタイピングを行う症例を増やして698例まで行った。自己免疫性膵炎97例、ミクリッツ病95検体についてエクソーム解析を実施した。HLA領域および非HLA領域に関連領域および候補領域を同定した。オミックス解析にてAIPの遺伝子および代謝物発現プロファイルを同定した。

A. 研究目的

難病の原因解明や診断・治療法の確立には、ゲノム解析だけではなく、生体内の分子の統合解析が必須である。本課題では本邦から提唱された概念であるIgG4関連疾患を対象に、ゲノム、代謝物、転写物の網羅的解析を組み合わせた、極めて独創性の高い統合オミックス解析を実施し、疾患関連遺伝子群を同定するとともに、疾患の予知、診断、予後予測に加え、治療法の開発や創薬のためのバイオマーカーを探索し、これらの情報を統合して新たな治療戦略を提示することを目的とする。

B. 研究方法

本課題では、IgG4関連疾患(自己免疫性膵炎、ミクリッツ病など)を対象疾患とし、以下に示す研究を実施した。併せて、質量分析計による網羅的代謝物測定系の開発を進め、患者血漿を用いた解析から、関連する代謝物の探索を試みた。

これまで集積したDNA検体をさらに増加させるために収集を続け、他の研究分担者や研究協力者との連携により、758例のDNA検体を収集した。内訳は、自己免疫性膵炎(AIP) 431例、唾液腺炎/涙腺炎(ミクリッツ病)184例、腎炎40例、その他のIgG4関連疾患38例(重複含む)であった。残りの135例については、詳細な臨床情報を収集中である。

網羅的オミックス解析のために経時的に検体を収集を継続し、このうちAIP26例については、時系列に沿った検体を得ている(治療介入直前、介入30、180、360、720日後)。各採血時点での画像所見、検査値も収集するとともに、随時症例を増やす予定である。

ゲノム網羅的なSNPタイピングを、Illumina社製のHumanOmni5MExome, HumanOmni2.5MExomeを用いて行い、これまでに698例まで増加させた。定法に則ったクオリティコントロールを通過した955,113個のSNPについて、一般地域住民のDNA検体(なごはま0次コホート研究) 1,849例のタイピング情報を対照に関連解析を行った。

AIP 97例、ミクリッツ病95検体についてエ

クソーム解析を実施し、標的遺伝子領域の97.8%を10×以上の被覆率でカバーする高品質のデータを得た。疾患と関連する遺伝的変異の解析を行った。

遺伝子発現解析は、Agilent社の発現アレイ(SurePrint G3 Human GE)を用いて行った。

血漿中の網羅的代謝物測定

GC-MSを用い、血漿中の代謝物の解析条件最適化を行った。血漿中からの代謝物抽出工程の効率化やトリメチルシリル誘導体化反応条件の最適化などを進め、測定系の精度・再現性等の向上を行った。また、GC-MSデータ中の未同定ピークの解析作業を進め、最終的に135個の代謝物とピークを対応付けた。これらの代謝物由来のピークを抽出・定量する解析方法を構築し、患者群のGC-MS測定と代謝物定量解析を実施した。

対照群

京都大学医学研究科が滋賀県長浜市で行っている「なごはま0次コホート事業」の参加者のうち、300名から新たに収集したゲノムDNA、末梢血RNA、血漿、血清検体を対照群として解析に利用した。いずれの解析にても疾患群と同様の手法で測定されたデータである。

(倫理面への配慮)

全ての研究は、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に則って実施した。対象者には研究の主旨について十分に説明し、書面にて同意を得た。収集した検体は二重に匿名化するとともに、個人情報やゲノム情報、臨床情報が漏洩することが決してないように十分配慮した上で研究に使用した。共同研究者からは、匿名化された状態で検体提供を受けた。

C. 研究結果

<ゲノムワイド関連解析>

構造化を補正した関連解析において、ゲノムワイド有意水準($p < 5.2 \times 10^{-8}$)を満たすSNPが、全例を対象とした解析で染色体1番と6番に同定された(図1)。

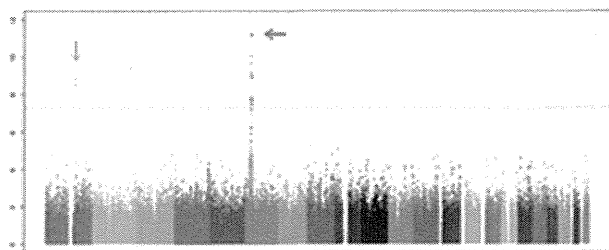


図1 IgG4のGWAS

これまでのIgG4関連疾患に関する遺伝子解析研究では、HLA-DRB1領域に有意な関連が報告されている。本研究でも染色体6番のHLA領域に強い関連を認め、この関連はAIP、ミクリッツ病のいずれを対象とした病型別解析でも再現された。HLA領域の関連がDRB1領域以外にある可能性を検討するため、HLA-DRB1上で最も関連が強いSNPで調整したゲノムワイド関連解析を行ったところ、HLA-A領域に新たな関連座位を認めた($p=6.2 \times 10^{-11}$)。さらに、HLA-DRB1、HLA-Aの両方のSNPで調整すると、最も低いp値を示すものはHLA Class I領域のSNP($p=1.0 \times 10^{-6}$)であり、さらなる関連領域の存在が示唆された。これらのことから、IgG4関連疾患の疾患感受性においてHLA-DRB1領域のみならずHLA-A領域も関連することが示された。

<エクソーム解析>

検出されたアミノ酸変化を伴う遺伝的変異について、176例の対照群のエクソーム解析結果と比較したところ、ゲノムワイド有意水準は満たさないものの、HLA class II領域に強い関連が認められた($p=7.3 \times 10^{-7}$)。この領域は、AIPとより強く関連したものの($p=2.7 \times 10^{-6}$)、ミクリッツ病とも関連を示しており($p=9.1 \times 10^{-5}$)、両病態共通の疾患関連遺伝子座位であることが明らかになった。

次に、低頻度変異の集積による病態発症の可能性を探索するため、遺伝子単位で変異の蓄積を解析した。多重検定補正後も、HLA領域はIgG4関連疾患と有意な関連を示した($p=8.0 \times 10^{-7}$)。一方、AIPに限った解析では、4p15.31領域に有意な関連を認めた($p=3.0 \times 10^{-7}$)。この結果は、AIPとミクリッツ病がIgG4関連疾患として統合されているにもかかわらず、遺伝的背景が異なる可能性だけでなく、過去のゲノムワイド関連解析では検出・解析が困難であった低頻度変異が、これらの病態の違いに関与している可能性が示唆された。

<遺伝子発現解析>

6例のAIP初発例でステロイドによる治療介入前の末梢血RNAを用いて、遺伝子発現情報を、研究室内で既存の健常者群300例のデータを対照に比較解析を行った。全42,546プローブ中、755プローブにおいて有意な発現上昇(全身性エリテマトーデス関連遺伝子等)、1,255プローブにおいて有意な発現抑制(Neuroactive ligand-receptor interaction関連遺伝子等)が見

られた($p < 1.2 \times 10^{-6}$)。

<代謝物解析>

AIP 25例のステロイド治療前の採血で得られた血漿検体と健常者対照群302例の血漿検体において135種の血中代謝物濃度を比較検定(Student's t検定)を行った。複数の代謝物について統計学的に有意な差がみとめられた($p < 1.0 \times 10^{-4}$)。

さらに、治療介入開始前、および開始後30日の血漿検体(11症例22検体)を用いて、代謝物濃度の変動評価解析を行った。その結果、ほぼ全ての症例において、開始後30日で尿酸濃度の減少が認められ、ステロイド投与の影響によるものと考えられた。

D. 考察

IgG4関連疾患は、免疫グロブリンのIgG4サブセットが上昇する。そのため、抗原認識とその後のB細胞活性化および抗体産生に重要な役割を果たすHLA-ClassIIの重要性が想定されており、これまでの遺伝的解析でもHLA-DRB1との関連が示されていた。本研究により、IgG4関連疾患にはHLA-ClassIIに加えHLA-ClassIの領域が関与していること、および非HLA領域の関与が示された。これはIgG4関連疾患の病態が複数の要因によって制御されていることを示唆している。また、IgG4関連疾患で各疾患に特異的なrare variantが存在する可能性は、IgG4産生を始めとした共通の病型の方で、異なった遺伝的背景によって疾患病態が規定されている可能性を示すものである。

E. 結論

患者検体の網羅的オミックス解析を実施し、IgG4関連疾患のあらたな疾患関連遺伝子領域を複数同定した他、IgG4関連疾患内での遺伝的背景の相違を明らかにした。これらの結果は、疾患の発症や病勢のメカニズムに迫るものであり、病態解明において大きな手がかりとなることが期待される。

F. 研究発表

【論文発表】

- Okada, Y., Wu, D., Trynka, G., Raj, T., Terao, C., Ikari, K., Kochi, Y., Ohmura, K., Suzuki, A., Yoshida, S., Graham, R. R., Manoharan, A., Ortmann, W., Bhangale, T., Denny, J. C., Carroll, R. J., Eyler, A. E., Greenberg, J. D., Kremer, J. M., Pappas, D. A., Jiang, L., Yin, J., Ye, L., Su, D. F., Yang, J., Xie, G., Keystone, E., Westra, H. J., Esko, T., Metspalu, A., Zhou, X., Gupta, N., Mirel, D., Stahl, E. A., Diogo, D., Cui, J., Liao, K., Guo, M. H., Myouzen, K., Kawaguchi, T., Coenen, M. J. H., van Riel, P. L. C. M., van de Laar, M. A. F. J., Guchelaar, H. J., Huizinga, T. W. J., Dieude, P., Mariette, X., Bridges Jr, S. L., Zhernakova, A., Toes, R. E. M., Tak, P. P., Miceli-Richard, C., Bang, S. Y., Lee, H. S.,

- Martin, J., Gonzalez-Gay, M. A., Rodriguez-Rodriguez L., Rantapaa-Dahlqvist, S., Arlestig, L., Choi, H. K., Kamatani, Y., Galan, P., Lathrop, M., the RACI consortium, the GARNET consortium, Eyre, S., Bowes, J., Barton, A., de Vries, N., Moreland, L. W., Criswell, L. A., Karlson, E. W., Taniguchi, A., Yamada, R., Kubo, M., Liu, J. S., Bae, S. C., Worthington, J., Padyukov, L., Klareskog, L., Gregersen, P. K., Raychaudhuri, S., Stranger, B. E., De Jager, P. L., Franke, L., Visscher, P. M., Brown, M. A., Yamanaka, H., Mimori, T., Takahashi, A., Xu, H., Behrens, T. W., Siminovitsh, K. A., Momohara, S., Matsuda, F., Yamamoto, K. and Plenge, R. M. (2014) Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery. *Nature* **506**, 376-381.
2. Tanaka, K., Terao, C., Ohmura, K., Takahashi, M., Nakashima, R., Imura, Y., Yoshifuji, H., Yukawa, N., Usui, T., Fujii, T., Mimori, T. and Matsuda, F. (2014) Significant association between *CYP3A5* polymorphism and blood concentration of tacrolimus in patients with connective tissue diseases. *J. Hum. Genet.* **59**, 107-109.
 3. Yamakawa, N., Fujimoto, M., Kawabata, D., Terao, C., Nishikori, M., Nakashima, R., Imura, Y., Yukawa, N., Yoshifuji, H., Ohmura, K., Fujii, T., Kitano, T., Kondo, T., Yurugi, K., Miura, Y., Maekawa, T., Saji, S., Takaori-Kondo, A., Matsuda, F., Haga, H. and Mimori, T. (2014) A clinical, pathological and genetic characterization of methotrexate-associated lymphoproliferative disorders. *J. Rheumatol.* **41**, 293-299.
 4. Terao, C., Bayoumi, N., McKenzie, C. A., Zelenika, D., Muro, S., Mishima, M.; The Nagahama Cohort Research Group, Connell, J. M., Vickers, M. A., Lathrop, G. M., Farrall, M., Matsuda, F. and Keavney, B. D. (2013) Quantitative variation in plasma angiotensin-I converting enzyme activity shows allelic heterogeneity in the ABO blood group locus. *Ann. Hum. Genet.* **77**, 465-471.
 5. Terao, C., Yoshifuji, H., Ohmura, K., Murakami, K., Kawabata, D., Yurugi, K., Tazaki, J., Kinoshita, H., Kimura, A., Akizuki, M., Kawaguchi, Y., Yamanaka, H., Miura, Y., Maekawa, T., Saji, H., Mimori, T. and Matsuda, F. (2013) Association of Takayasu arteritis with HLA-B*67:01 and two amino acids in HLA-B protein. *Rheumatol. (Oxford)*. **52**, 1769-1774.
 6. Terao, C., Yoshifuji, H., Kimura, A., Matsumura, T., Ohmura, K., Takahashi, M., Shimizu, M., Kawaguchi, T., Chen, Z., Naruse, T. K., Sato-Otsubo, A., Ebana, Y., Maejima, Y., Kinoshita, H., Murakami, K., Kawabata, D., Wada, Y., Narita, I., Tazaki, J., Kawaguchi, Y., Yamanaka, H., Yurugi, K., Miura, Y., Maekawa, T., Ogawa, S., Komuro, K., Nagai, R., Yamada, R., Tabara, Y., Isobe, M., Mimori, T. and Matsuda, F. (2013) Two susceptibility loci to Takayasu arteritis reveal a synergistic role of the IL12B and HLA-B regions in a Japanese population. *Am. J. Hum. Genet.* **93**, 289-297.
 7. Plenge, R. M., Greenberg, J. D., Mangravite, L. M., Derry, J. M., Stahl, E. A., Coenen, M. J., Barton, A., Padyukov, L., Klareskog, L., Gregersen, P. K., Mariette, X., Moreland, L. W., Bridges, S. L. Jr, de Vries, N. Huizinga, T. W. Guchelaar, H. J., International Rheumatoid Arthritis Consortium (INTERACT), Friend, S. H. and Stolovitzky, G. (2013) Crowdsourcing genetic prediction of clinical utility in the Rheumatoid Arthritis Responder Challenge. *Nat. Genet.* **45**, 468-469.
- 【学会発表】
1. Matsuda, F. Genomic analysis of immune-related diseases using GWAS and WES. The Second Kyoto Symposium on Bioinformatics for Next Generation Sequencing with Applications in Human Genetics, (Kyoto, Japan), March 14, 2014.
 2. Matsuda, F. Genome-wide association studies in IgG4-RD. Second International Symposium on IgG4 and Related Diseases, (Honolulu, USA), February 18, 2014.
 3. Yoshifuji, H., Terao, C., Murakami, K., Kawabata, D., Ohmura, K., Fujii, T., Kawaguchi, Y., Yamanaka, H. and Mimori, T. Association between HLA-B's amino acid variation and disease-susceptibility to Takayasu arteritis. American College of Rheumatology 2013, (San Diego, USA), October 27, 2013.
 4. 寺尾 知可史, 吉藤 元, 木村 彰方, 松村 貴由, 大村 浩一郎, 成瀬 妙子, 佐藤 愛子, 前島 康浩, 和田 庸子, 成田 一衛, 川口 鎮司, 山中 寿, 前川 平, 小川 誠司, 小室 一成, 永井 良三, 田原 康玄, 磯部 光章, 三森 経世, 松田 文彦
IL12Bは高安動脈炎の新規疾患感受性遺伝子でありHLA-B*52:01と相互作用を示す 第41回日本臨床免疫学会、海峡メッセ下関（下関）2013年11月28日
- 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

IgG4 関連硬化性胆管炎の診断における胆管生検の意義についての検討

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：IgG4 関連硬化性胆管炎（IgG4-SC）は臨床的に胆管癌や原発性硬化性胆管炎との鑑別が問題になり、そのため胆管生検による診断が試みられることがある。そこで、①連続する胆管生検 85 検体を用いた癌の診断能と、②臨床的に IgG4-SC と診断された症例の胆管生検 37 検体を用いた IgG4-SC の診断能と診断を困難にしている原因について検討した。①では、臨床的悪性病変 59 検体のうち、癌陽性は 31 検体、境界は 14 検体、癌陰性は 14 検体で、良性病変 26 検体のうち境界は 1 検体、その他はすべて癌陰性と判定された。陽性ならびに境界を“陽性”とすると、癌診断における感度は 78.2%，特異度は 96.1%であった。②では癌と診断された症例はなかったが、IgG4-SC の診断は 4 例で確診，2 例で疑いにとどまった。診断困難であった理由として、1) 限られた検体量，とくに胆管深部から採取される組織が少ないこと，2) IgG4-SC ではないとされる上皮中心性の炎症がみられること，3) アーチファクトにより診断が困難になること，4) 免疫染色の非特異反応，が挙げられた。IgG4-SC における胆管生検は，癌を除外する上ではきわめて有用な検査であるが，IgG4-SC を診断する上で有用であった症例は 2 割弱にすぎない。今後はその精度を上げるための努力が求められる。

共同研究者

内藤格，中沢貴宏，大原弘隆（名古屋市立大学大学院医学研究科）

れたすべての胆管生検を検討した。胆管生検の診断は陽性(癌の確診ならびに疑い)，境界，陰性に分類した。臨床経過は切除標本の病理診断，ならびに生検後の臨床経過から判断した。転移性腫瘍，悪性リンパ腫，診断未確定で経過観察中の症例は検討から除いた。

A. 研究目的

IgG4 関連硬化性胆管炎（IgG4-related sclerosing cholangitis；IgG4-SC）は高齢男性に好発し，胆管の不整狭細をきたす疾患で，臨床的に胆管癌との鑑別が困難である。多くは 1 型自己免疫性膵炎を合併するが，合併しない症例もあり，後者では特に癌との鑑別が難しい。そのため診断目的に胆管生検が施行されることがある。そこで，胆管生検による癌および IgG4-SC の診断能，診断困難である原因を明らかにする目的で，胆管生検の再検討を行った。

2) IgG4-SC の診断能

臨床的に IgG4-SC と考えられる 37 検体の胆管生検を対象とし，IgG4-SC の診断が可能であるか，さらに困難な場合はその理由を評価した。診断は IgG4-SC 臨床診断基準 2012 にある組織学的基準に基づいて行い，1) 高度のリンパ球・形質細胞の浸潤と線維化，2) IgG4 陽性細胞>10/強拡大視野，3) 花筈状線維化，4) 閉塞性静脈炎，のうち 3 つ以上を満たすものを確診とした。

B. 研究方法

1) 癌の診断能

倉敷中央病院で 2009 年 8 月以降に行わ

（倫理面への配慮）

この研究は倉敷中央病院病理検査科で，

個人情報の保護に配慮を払いながらすべて匿名で行われた。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

1) 癌の診断能

合計 85 検体が検討対象となった。臨床的悪性病変 59 検体のうち、陽性は 31 検体、境界は 14 検体、陰性は 14 検体で、良性病変 26 検体のうち境界は 1 検体、その他はすべて陰性であった。陽性ならびに境界を“陽性”として検討すると、感度は 78.2%、特異度は 96.1%であった。

2) IgG4-SC の診断能

37 検体のうち、癌と診断されたものや境界例は 1 例もなかった。4 検体 (10.8%) で IgG4-SC の診断が確定しえた (図 1)。いずれの症例とも、高度のリンパ球・形質細胞の浸潤と線維化、IgG4 陽性細胞 >10/強拡大 1 視野、花筈状線維化が認められ、閉塞性静脈炎の同定できた検体はなかった。2 例 (5.4%) では上皮周囲に細胞浸潤が乏しいにもかかわらず、壁の深部にリンパ球、形質細胞の強い浸潤があり、IgG4-SC を否定できない所見と考えられた。それ以外の検体はほとんど正常か、軽度の上皮中心性の炎症が認められるのみであった。

診断が困難であった理由としては、検体が小さいこと、胆管壁の表層のみが採取され、特徴的所見のみられる深部組織が採取しにくいことがまず挙げられる。興味深いことに、IgG4-SC ではまれとされる上皮中心性の炎症所見がしばしば認められ、5 例では上皮内に好中球浸潤をきたし (図 2)、IgG4-SC 以外の胆管炎、たとえば化膿性炎症、PSC などを疑わせる像であった。アーチファクトによる変化も診断を困難にする要因で、上皮の消失や、深部にある病変部と思われる組織の挫滅 (図 3) が組織診断を困難としていた。形質細胞が挫滅されて同定困難となるケースも存在し、形質細胞の核が破砕すると好中球の核のように

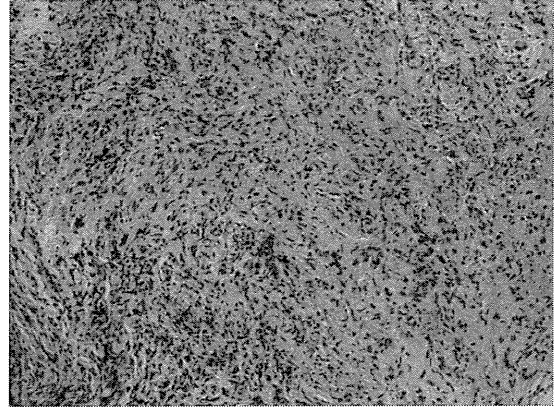


図 1. 生検による IgG4-SC 診断確定例。リンパ球、形質細胞の浸潤を伴う花筈状線維化が認められる (HE 染色)。

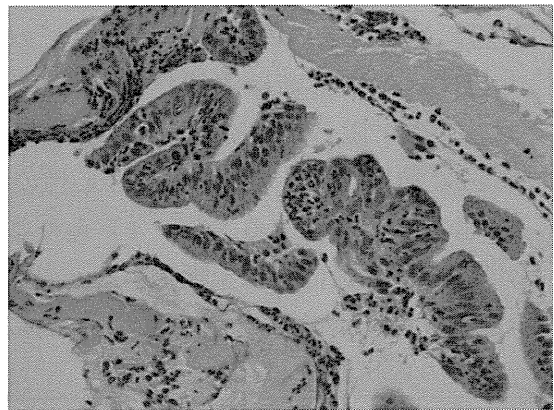


図 2. 上皮内に好中球浸潤をきたした胆管生検。臨床的には IgG4-SC であった (HE 染色)。

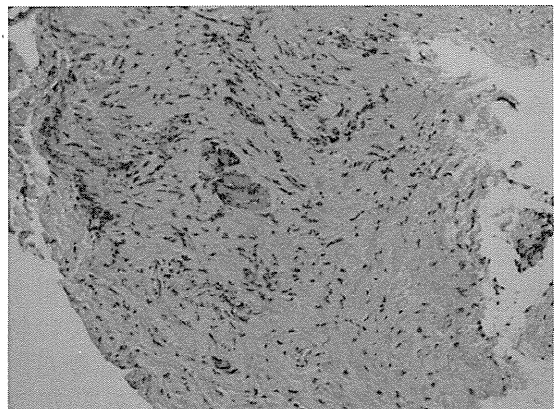


図 3. アーチファクトにより IgG4-SC の診断が困難であった症例。中心部の組織が挫滅している (HE 染色)。

みえて、化膿性炎症や原発性硬化性胆管炎 (primary sclerosing cholangitis ;PSC) と誤認されてしまう可能性があった。線維化の評価もアーチファクトのため困難で、正常な間質と病的な線維化の区別がつきにくく、また IgG4-SC の特徴である花筈状線維化も認識することが困難であった。最後に、生検標本の免疫染色はしばしば背景の非特異反応が強く、評価が困難であることも要因に挙げられる。

D. 考察

胆管生検の癌診断能は、感度 76.2%、特異度 96.1%で、“陽性”に含められた 1 検体も実際には境界と診断されていた。このことから癌との鑑別の上で、胆管生検はきわめて有用性の高い検査法であるといえる。癌症例を癌と診断できなかった検体を再検討したが、サンプリング・エラーと考えられるものであった。

一方、IgG4-SC から採取された 37 検体のなかに、癌と診断されたものや境界例は 1 例もなかった。IgG4-SC の確診例は 4 検体、可能性を否定できないものは 2 検体のみで、胆管生検による IgG4-SC の診断は困難であった。その理由として、1) 限られた検体量、とくに胆管深部から採取される組織が少ないこと、2) 上皮中心性の炎症がみられること、3) アーチファクトにより診断が困難になること、4) 免疫染色の非特異反応、が挙げられた。2) の上皮中心性の炎症は胆管狭窄に伴う二次的な炎症が原因と考えられ、IgG4-SC の切除標本においても認められることがある。たとえこのような所見が胆管生検で得られたとしても、病理医は IgG4-SC を否定できないことを認識しておく必要がある。このことは化膿性炎症や PSC との鑑別を考える上で特に重要である。

胆管生検の IgG4-SC そのものの診断能は必ずしも高くはないが、それでも胆管生検の存在意義はあると考えられる。癌を除外する上で極めて有用であることに加え、ごく一部の IgG4-SC 症例ではあるが組織学的確診に至る症例があることも事実である。今回の検討で形質細胞がアーチファクトのため同定困難であった検体があっ

たが、このような場合には CD38 の免疫染色で形質細胞を同定することで診断能の向上が期待できる。また免疫染色の非特異反応は、一次抗体の希釈濃度、抗原賦活法の工夫により改善が期待できる。このような努力により、胆管生検による IgG4-SC 診断能はさらに向上することが期待される。

最後に、今後 PSC との鑑別を厳密に行うためには、PSC の生検材料での検討も必要になるであろう。残念ながら PSC で胆管生検が行われることは皆無で、また炎症の消退している移植時摘出肝や剖検組織では活動性の PSC 病変を大型胆管でみることはまれと考えられ、生検例によるデータの蓄積が望まれる。限られた自験例に基づく経験では、びらん形成や上皮周囲への密な細胞浸潤が PSC の活動性炎症の特徴と思われる。また PSC との鑑別の際には、肝生検も考慮される必要がある。

E. 結論

IgG4-SC における胆管生検は、癌を除外する上ではきわめて有用な検査である。IgG4-SC を診断する上で有用であった症例は 2 割弱にすぎないが、その理由として深部の組織が採取しにくいこと、アーチファクト、免疫染色の困難性があげられる。

F. 研究発表

1. 論文発表
1. Urata T, Naito Y, Izumi Y, Takekuma Y, Yokomizo H, Nagamine M, Fukuda S, Notohara K, Hifumi M. Localized type 1 autoimmune pancreatitis superimposed upon preexisting intraductal papillary mucinous neoplasms. *World J Gastroenterol.* 19(47): 9127-9132, 2013.
2. Notohara K. Pancreas. In: Umehara H, Okazaki K, Stone JH, Kawa S, Kawano M (Eds). *IgG4-related disease.* Springer Japan. Tokyo. 2013. 139-145.
3. Matsui S, Notohara K, Waseda Y. Pathological findings of

- IgG4-related lung disease. In: Umehara H, Okazaki K, Stone JH, Kawa S, Kawano M (Eds). IgG4-related disease. Springer Japan. Tokyo. 2013. 163-167.
4. Notohara K. Retroperitoneal fibrosis and arterial lesions. In: Umehara H, Okazaki K, Stone JH, Kawa S, Kawano M (Eds). IgG4-related disease. Springer Japan. Tokyo. 2013. 181-186.
 5. Notohara K, Zhang L. Histology of autoimmune pancreatitis. The Pancreapedia: Exocrine Pancreas Knowledge Base, DOI: 10.3998/panc.2013.12
 6. Miyabe K, Notohara K, Nakazawa T, Hayashi K, Naitoh I, Okumura F, Shimizu S, Yoshida M, Yamashita H, Takahashi S, Ohara H, Joh T. Histological evaluation of obliterative phlebitis for the diagnosis of autoimmune pancreatitis. J Gastroenterol 2013 May 4. [Epub ahead of print]
 7. Ohara H, Nakazawa T, Kawa S, Kamisawa T, Shimosegawa T, Uchida K, Hirano K, Nishino T, Hamano H, Kanno A, Notohara K, Hasebe O, Muraki T, Ishida E, Naitoh I, Okazaki K. Establishment of a serum IgG4 cut-off value for the differential diagnosis of IgG4-related sclerosing cholangitis: a Japanese cohort. J Gastroenterol Hepatol 28(7): 1247-1251, 2013.
 8. Watanabe T, Maruyama M, Ito T, Fujinaga Y, Ozaki Y, Maruyama M, Kodama R, Muraki T, Hamano H, Arakura N, Kadoya M, Suzuki S, Komatsu M, Shimojo H, Notohara K, Uchida M, Kawa S. Clinical features of a new disease concept, IgG4-related thyroiditis. Scand J Rheumatol. 42(4): 325-330, 2013.
 9. Naitoh I, Nakazawa T, Notohara K, Miyabe K, Hayashi K, Shimizu S, Kondo H, Yoshida M, Yamashita H, Umemura S, Ohara H, Joh T. Intraductal papillary mucinous neoplasm associated with autoimmune pancreatitis. Pancreas. 42(3): 552-554, 2013.
 10. 能登原憲司. IgG4関連腎臓病に関連する他臓器病変. 腹部病変② (後腹膜, 腹部大動脈, 前立腺). 齊藤喬雄, 西慎一(編): IgG4関連腎臓病のすべて. 南江堂. 東京. 2014年. 124-128頁.
 11. 能登原憲司. PSC・IgG4-SCの病理診断. IgG4-SCの病理診断 -PSCとの鑑別診断. 肝胆膵 68(1): 19-26, 2014.
 12. 能登原憲司. IgG4関連疾患の病理. リウマチ科 50(6): 661-668, 2013.
 13. 能登原憲司. 悪性腫瘍とIgG4. 悪性腫瘍に随伴するIgG4関連病態. 膵癌とIgG4関連病態. 肝胆膵 67(3): 425-431, 2013.
 14. 能登原憲司, 宮部勝之, 中沢貴宏, 大原弘隆. 自己免疫性膵炎の病理像. 閉塞性静脈炎の特徴と診断上のピットフォール. 胆と膵 34(9): 693-697, 2013.
 15. 能登原憲司, 福嶋敬宜. 非腫瘍性膵疾患. 中沼安二, 坂元亨宇, 福嶋敬宜(編): キーワードとアルゴリズムで捉える肝胆膵の実践病理診断. 文光堂. 東京. 2013年. 65-94頁.
 16. 能登原憲司. 胆膵共通疾患とトピックス. 胆膵の硬化性病変. 自己免疫性膵炎を中心に. 病理と臨床 31(4): 369-375, 2013.
2. 学会発表
 1. Notohara K. Clinical validation of international consensus diagnostic criteria & algorithm for autoimmune pancreatitis. Overlapping & specific histological features between type 1 & type 2 AIP. Joint Meeting of the International Association of Pancreatology & the Korean Pancreatobiliary Association 2013. Seoul, Korea.

2013年9月6日.

2. Notohara K. IgG4-related diseases. Pathological features of type 1 autoimmune pancreatitis: diagnostic findings of storiform fibrosis and obliterative phlebitis. 12th International Symposium on Sjogren's syndrome. 京都. 2013年10月11日.
3. 能登原憲司. 診断基準からみた1型自己免疫性膵炎の病理診断のピットフォーラム. 第44回日本膵臓学会大会. 仙台. 2013年7月25日.
4. 能登原憲司. IgG4関連疾患の病理—消化器領域を中心に. 第37回備後肝胆膵研究会. 福山. 2013年6月20日.
5. 内野かおり, 能登原憲司, 藤澤真義, 和仁洋治, 松川昭博. 1型自己免疫性膵炎におけるマクロファージの分布の検討. 第102回日本病理学会総会. 札幌. 2013年6月7日.
6. 能登原憲司. IgG4関連疾患. IgG4関連疾患の病理. 第57回日本リウマチ学会総会・学術集会. 京都. 2013年4月18日.
7. 能登原憲司. IgG4関連疾患の病理—自己免疫性膵炎を中心に. 第5回Kyoto Pancreatobiliary Meeting. 京都. 2013年4月13日.

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

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 関連疾患とシェーグレン症候群の口唇唾液腺における DNA マイクロアレイによる遺伝子発現比較

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。我々の先行研究においても、IgG4-RD の口唇唾液腺 (LSG) では、シェーグレン症候群 (SS) ・健常人 (HC) と比較して、IL-10、TGF β 、AID の mRNA 発現が有意に上昇していた ($P < 0.05$)。今年度は 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 (N=5、全例女性) と SS (N=5、全例女性) 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 は SS と異なるクラスターを形成した。IgG4-RD で発現増加した遺伝子は 1351 個、減少した遺伝子は 1431 個抽出された (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、細胞増殖、細胞外基質形成、組織形成に関連していた。さらに、DNA マイクロアレイに用いた症例とは別の IgG4-RD (N=9)、SS (N=10)、HC (N=4) の LSG を用いて、定量 PCR によるバリデーションを行った。定量 PCR では IgG4-RD において、lactotransferrin (LTF) と EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1 (EFEMP1) は SS と比較し、CCL18 は SS および HC と比較して有意に高発現していた ($P < 0.05$)。以上より、IgG4-RD と SS の LSG では遺伝子発現のパターンは異なることが示された。

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。我々の先行研究においても、IgG4-RDの口唇唾液腺(LSG)では、シェーグレン症候群(SS)・健常人(HC)と比較して、IL-10、TGF β 、AIDのmRNA発現が有意に上昇していた($P < 0.05$)。

今年度は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とSSのLSGにおける遺伝子発現をDNAマイクロアレイで比較した。

B. 研究方法

1. 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

厚生省研究班で提唱されたIgG4-RDの包括診断基準(2011年)を満たすIgG4-RD(N=5、全例女性)、厚生省改訂診断基準(1999年)とアメリカリウマチ学会分類基準(2012年)を満たすSS(N=5、全例女性)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。IgG4-RDのLSGの病理組織所見は、全例IgG4-RDの病理学的特徴に合致していた。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)。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)。

2. 定量PCRによるバリデーション

1のDNAマイクロアレイに用いた症例とは別のIgG4-RD(N=9)(IgG4-RDの包括診断基準(2011年)を満たす)、SS(N=10)(厚生省改訂診断基準(1999年)とアメリカリウマチ学会分類基準(2012年)を満たす)、HC(N=4)のLSGを用いて、定量PCRによるバリデーションを行った。定量PCRのinternal controlとして、GAPDHを用いた。

C. 研究結果

1. 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) IgG4-RDとSSの臨床像および病理組織学的所見

IgG4-RDの5例は、全例高IgG4血症(135mg/dl以上)を呈し、LSGではIgG4陽性形質細胞の浸潤(IgG4陽性形質細胞/IgG陽性形質細胞 $> 40\%$)を認めた。IgG4-RDの5例、SSの5例は全例女性であり、いずれもステロイド・免疫抑制薬・生物学的製剤の投与を受けていなかった。IgG4-RDの平均年齢は 58.6 ± 2.3 歳、SSの平均年齢は 33.0 ± 8.4 歳であり、IgG4-RDの平均年齢はSSと比較して有意に高齢であった($P < 0.05$)。SSの5例中、3例は一次性SS、他の2例は二次性SSであった(表1)。

2) 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。IgG4-RDのうち、1例(T197)のみはSS患者のクラスターに含まれた(図1)。

3) 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1351遺伝子、減少した遺伝子は1431遺伝子抽出された(Rank

products 法、false discovery rate < 0.05) (図 1)。

4) 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、wound healing, skeletal system development, muscle organ development, heart development, angiogenesis, axonogenesis, muscle contraction, extracellular matrix organization, actin cytoskeleton organization, cell migration, cell-matrix adhesion, enzyme linked receptor protein signaling pathway, regulation of cell adhesion, regulation of cell proliferation, and translational elongation に有意に濃縮されていた (false discovery rate-corrected p-value < E-03)。

2. 定量 PCR によるバリデーション

IgG4-RD で発現が増加していた上位 120 の発現変動遺伝子のうち、より上位で、発現レベルが高く、サンプル間のばらつきが少なく、免疫・炎症、線維化、ケモタキシス、細胞増殖に関連する 10 遺伝子をバリデーションの候補遺伝子として選択した (lactotransferrin (LTF、rank 2)、collectin sub-family member 12 (COLEC12、rank 23)、decorin (DCN、rank 5)、lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1 (LYVE1、rank 13)、EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1 (EFEMP1、rank 25)、fibronectin 1 (FN1、rank 28)、chemokine (C-X-C motif) ligand 12 (CXCL12、rank 7)、chemokine (C-X-C motif) ligand 14 (CXCL14、rank 11)、chemokine (C-C motif) ligand 18 (CCL18、rank 67)、retinoic acid receptor responder 1 (RARRES1、rank 18))。

上記の 10 遺伝子のうち、CCL18、LTF、EFEMP1 の 3 遺伝子のみが、SS と比較して IgG4-RD の LSG で有意に高発現していた

($P < 0.05$) (図 2)。さらに IgG4-RD の LSG において、CCL18 は HC と比較しても有意に高発現していた ($P < 0.05$) (図 2)。

D. 考察

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 で発現増加した遺伝子は 1351 個、減少した遺伝子は 1431 個抽出された。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、細胞増殖、細胞外基質形成、組織形成に関連していた。定量 PCR によるバリデーションでは、IgG4-RD の LSG において、LTF と EFEMP1 は SS と比較し、CCL18 は SS および HC と比較して有意に高発現していた。ケモカインである CCL18、樹状細胞の成熟を誘導する LTF、線維化・細胞外基質増殖に関与する EFEMP1 は、IgG4-RD の病態形成に寄与する可能性が示唆された。

E. 結論

DNA マイクロアレイの結果から、IgG4-RD と SS の LSG では遺伝子発現のパターンは異なることが示された。

F. 研究発表

- 論文発表
 - Sumida T, Tsuboi H, Iizuka M, Hirota T, Asashima H, Matsumoto I. The role of M3 muscarinic acetylcholine receptor reactive T cells in Sjögren's syndrome: A Critical Review. J Autoimmunity (in press)
 - Tsuboi H, Asashima H, Takai C, Hagiwara S, Hagiya C, Yokosawa M, Hirota T, 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, Yoshifuji H, Ohta A, Matsumoto I, Sumida T. Primary and secondary surveys on epidemiology of Sjogren's syndrome in Japan. Mod Rheumatol (in press)
 - Hagiya C, Tsuboi H, Yokosawa M,

Hagiwara S, Takai C, Hirota T, Asashima H, Miki H, Umeda N, Horikoshi M, Kondo Y, Sugihara M, Ogishima H, Suzuki T, Hiraoka T, Kaji Y, Matsumoto I, Ohshika T, Sumida T. Clinicopathological features of IgG4-related disease complicated with orbital involvements. Mod Rheumatol (in press)

4. Yokosawa M, Tsuboi H, Nasu K, Hagiya C, Hagiwara S, Ogishima H, Hirota T, Horikoshi M, Kondo Y, Sugihara M, Suzuki T, Minami M, Bukawa H, Matsumoto I, Sumida T. Usefulness of MR imaging of the parotid glands in patients with Sjögren's syndrome. Rheumatology (Oxford) (in press)

5. 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 Sjögren's syndrome in Japanese patients. Mod Rheumatol (in press)

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

表1 DNAマイクロアレイに用いたIgG4関連疾患とシェーグレン症候群患者の臨床像と病理組織学的所見

症例	検体番号	年齢 (歳)	性別	血清IgG4 (mg/dl)	IgG4/IgG in LSG (%)	Greenspan grading	治療
IgG4-RD 1	T197	57	女性	543	80	n. d	None
IgG4-RD 2	T222	61	女性	492	67	n. d	None
IgG4-RD 3	T226	56	女性	499	79	n. d	None
IgG4-RD 4	T243	56	女性	562	83	n. d	None
IgG4-RD 5	T257	61	女性	512	83	n. d	None
SS 1 (一次性)	T187	22	女性	n. d	n. d	Grade 3	None
SS 2 (一次性)	T188	37	女性	n. d	n. d	Grade 3	None
SS 3 (二次性)	T213	43	女性	n. d	n. d	Grade 3	None
SS 4 (二次性)	T228	27	女性	n. d	n. d	Grade 3	None
SS 5 (一次性)	T258	36	女性	n. d	n. d	Grade 3	None

IgG4-RD ; IgG4関連疾患, SS ; シェーグレン症候群, IgG4/IgG in LSG ; 口唇唾液腺におけるIgG4陽性形質細胞/IgG陽性形質細胞比, n. d ; not determined

図1 DNAマイクロアレイ サンプル間クラスタリング (pvclust method) と 発現変動遺伝子の抽出

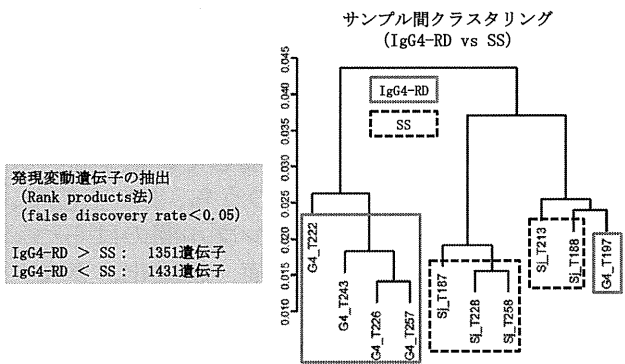
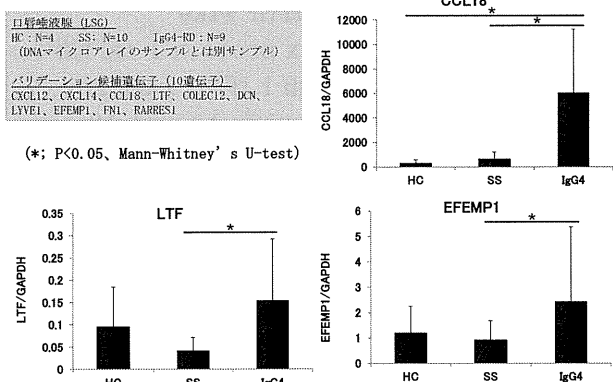


図2 定量PCRによるバリデーション CCL18、LTF、EFEMP1



IgG4 関連疾患病理組織における BAFF・APRIL 発現の検討

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 京都大学医学部附属病院免疫・膠原病内科 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

研究要旨：我々はこれまでの報告で IgG4 関連疾患 (IgG4RD) の血清 BAFF・APRIL が高値であることを報告した。今回、IgG4RD における BAFF・APRIL の役割を検討するために、患者リンパ節標本に BAFF, APRIL, その受容体に対する免疫染色を行った。IgG4RD 患者リンパ節において、B 細胞は濾胞内に分布し、CD138 陽性形質細胞および IgG4 陽性細胞は主に濾胞外に分布していた。BAFF は濾胞内で、APRIL は濾胞外で強く染色され、それぞれの部位の T 細胞か Mφ が産生している可能性が示唆された。

A. 研究目的

IgG4 関連疾患 (IgG4-related disease: IgG4RD) は、涙腺・唾液腺・脾・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。

BAFF (B cell activating factor) と APRIL (a proliferation-inducing ligand) は B 細胞のホメオスタシスにおいて重要なサイトカインである。我々のグループ (三森、川端、吉藤、杞山) は、これまで IgG4-RD における BAFF・APRIL の役割を検討してきた。IgG4-RD 患者 (N=18) と健常者 (N=10) の血清 BAFF・APRIL を ELISA で測定し、IgG4-RD 患者の血清 BAFF 値・APRIL 値は健常者と比べてそれぞれ有意に高値であることを示した¹⁾。また、ステロイド治療により血清 BAFF 値は健常者レベルまで低下し、BAFF は疾患活動性を反映している可能性が示唆される一方、治療後の血清 APRIL 値は上昇する傾向にあり、APRIL は病態に対する防御因子として機能する可能性が示唆

された¹⁾。

今回、BAFF, APRIL が IgG4 関連疾患の病変部において B 細胞や形質細胞にどのように影響するのかを検討するため、IgG4 関連疾患病理組織における BAFF, APRIL, その受容体である BAFF-R (BAFF receptor), TACI (transmembrane activator and calcium-modulator and cytophilin ligand interactor), BCMA (B cell maturation antigen) の発現を免疫染色により解析した。

来年度 (H26 年度) に二重免疫染色の手法により各細胞 (B 細胞、形質細胞) と細胞表面受容体 (BAFF-R, TACI, BCMA) の共発現の状態を解析する予定として、本年度 (H25 年度) は、条件設定のため、単一免疫染色により解析した。

B. 研究方法

IgG4RD 患者 (65 歳男性、耳下腺・顎下腺・頸部リンパ節腫大、血清 IgG4: 1050 mg/dL) の右頸部リンパ節標本に、rabbit

anti-human BAFF (Anaspec), APRIL (PromoCell), BAFF-R (PromoCell), TACI (PromoCell), BCMA (Acris, AP00250PU-N) ポリクローナル抗体と、mouse anti-human CD20 (eBioscience, 14-0202-82), CD138 (eBioscience, 14-1389-82), IgG4 (Abcam, ab99820), CD3 (eBioscience, 14-0038-82), CD68 KP-1 (abcam, ab955) モノクローナル抗体を用いて免疫染色を施した。二次抗体としてビオチン化 goat anti-rabbit または goat anti-mouse 抗体を用い、avidin-HRP と 3,3'-diaminobenzidine (DAB) で発色させた。

(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標本を用いた。

C. 研究結果

図1に IgG4RD 患者リンパ節の免疫染色像を示す。HE 染色にて、リンパ節の基本構築は保持され、反応性とみられる濾胞過形成を認めた。線維化は目立たなかった。観察される IgG 陽性細胞の 80% が IgG4 陽性であり、IgG4 陽性細胞を 1 強拡大視野あたり 100 個以上認めた。

CD20 染色 (B 細胞) では、濾胞内部および辺縁帯に陽性細胞を認めた。CD138 染色 (形質細胞) では、辺縁帯および濾胞外に陽性細胞を認めた。IgG4 染色では、濾胞外に陽性細胞を認めた。

CD3 染色 (T 細胞) および CD68 染色 (マクロファージ) では主に濾胞外に、一部は濾胞の中心に陽性細胞を認めた (not shown)。

BAFF 染色では、濾胞内部に陽性細胞を認めた。APRIL 染色では、濾胞外優位に陽性細胞を認めた。

BAFF-R 染色では、辺縁帯優位に陽性細胞

を認めた。TACI 染色では、濾胞外に陽性細胞を認めた。BCMA 染色では、全体が淡く染まり、バックグランドも強く、陽性細胞の判別は困難であった。

D. 考察

より幼若な B 細胞が濾胞の中心～辺縁帯に、分化した形質細胞は辺縁帯～濾胞外に分布しており、IgG4 陽性細胞は主に濾胞外に分布していた。BAFF は濾胞内部に強く染まり、濾胞中心の T 細胞または Mφ が産生している可能性が示唆された。APRIL は濾胞外部に強く染まり、濾胞外部の T 細胞または Mφ が産生している可能性が示唆された。

BAFF, APRIL の受容体であるが、BAFF-R は辺縁帯が染まり、TACI は濾胞外が染色されたことから、より幼若な B 細胞の段階で BAFF-R を強く発現し、形質細胞に分化すると濾胞外に出て TACI を強く発現するようになる可能性が考えられた。B 細胞の成熟段階によって BAFF・APRIL 受容体の発現量が増える可能性が示唆された。

我々は、IgG4 関連疾患の病態において、B 細胞が初期にはリンパ節濾胞の内部で BAFF-R を高発現し、BAFF 依存性に IgG4 へクラススイッチ後に辺縁帯へ移動し TACI を発現し、さらに BAFF・APRIL の作用を受けて、IgG4 を産生する形質細胞へと分化し濾胞外に出るという仮説を立てた。

この仮説を検証するために、次年度は二重免疫染色の手法により各細胞 (B 細胞、形質細胞) と細胞表面受容体 (BAFF-R, TACI, BCMA) の共発現の状態を、リンパ節生検を行った IgG4RD 複数症例の標本を用いて解析する予定である。

E. 結論

IgG4RD 患者リンパ節において、B 細胞は

濾胞内に分布し、CD138 陽性形質細胞および IgG4 陽性細胞は主に濾胞外に分布していた。BAFF は濾胞内で、APRIL は濾胞外で強く染色され、それぞれの部位の T 細胞か Mφ が産生している可能性が示唆された。二重免疫染色などによる、さらなる検討を要する。

参考文献

- 1) Kiyama K, et al: Arthritis Res Ther. 14(2):R86, 2012.

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kiyama K, Yoshifuji H, Kando T, Hosono H, Kitagori K, Nakashima R, Imura Y, Yukawa N, Ohmura K, Fujii T, Kawabata D, Mimori T: Article title: Screening for IgG4-type anti-nuclear antibodies in IgG4-related disease. *Arthritis Res Ther* in submitted.
- 2) Yamakawa N, Fujimoto M, Kawabata D, Terao C, Nishikori M, Nakashima R, Imura Y, Yukawa N, Yoshifuji H, Ohmura K, Fujii T, Kitano T, Kondo T, Yurugi K, Miura Y, Maekawa T, Saji H, Takaori-Kondo A, Matsuda F, Haga H, Mimori T: A clinical, pathological, and genetic characterization of methotrexate-associated lymphoproliferative disorders. *J Rheumatol*. 41(2):293-9, 2014.
- 3) Kawabata H, Kadowaki N, Nishikori M,

Kitawaki T, Kondo T, Ishikawa T, Yoshifuji H, Yamakawa N, Imura Y, Mimori T, Matsumura Y, Miyachi Y, Matsubara T, Yanagita M, Haga H, Takaori-Kondo A: Clinical Features and Treatment of Multicentric Castleman's Disease : A Retrospective Study of 21 Japanese Patients at a Single Institute. *J Clin Exp Hematop*. 53(1):69-77, 2013.

2. 学会発表

- 1) Yoshifuji H, Kiyama K, Hosono Y, Kawabata D, Nakashima R, Imura Y, Yukawa N, Ohmura K, Fujii T, Mimori T: Subclass-based analysis of antinuclear antibody in IgG4-related disease and systemic autoimmune diseases. International Symposium on IgG4-RD & Associated Conditions, Honolulu, Feb 16-19, 2014.
- 2) Yoshifuji H, Kiyama K, Hosono Y, Kawabata D, Nakashima R, Imura Y, Yukawa N, Ohmura K, Fujii T, Mimori T: Screening of IgG4-type anti-nuclear antibodies in IgG4-related disease and systemic autoimmune diseases. 12nd International Symposium on Sjogeren's Syndrome, Kyoto, Sept 12, 2013.

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

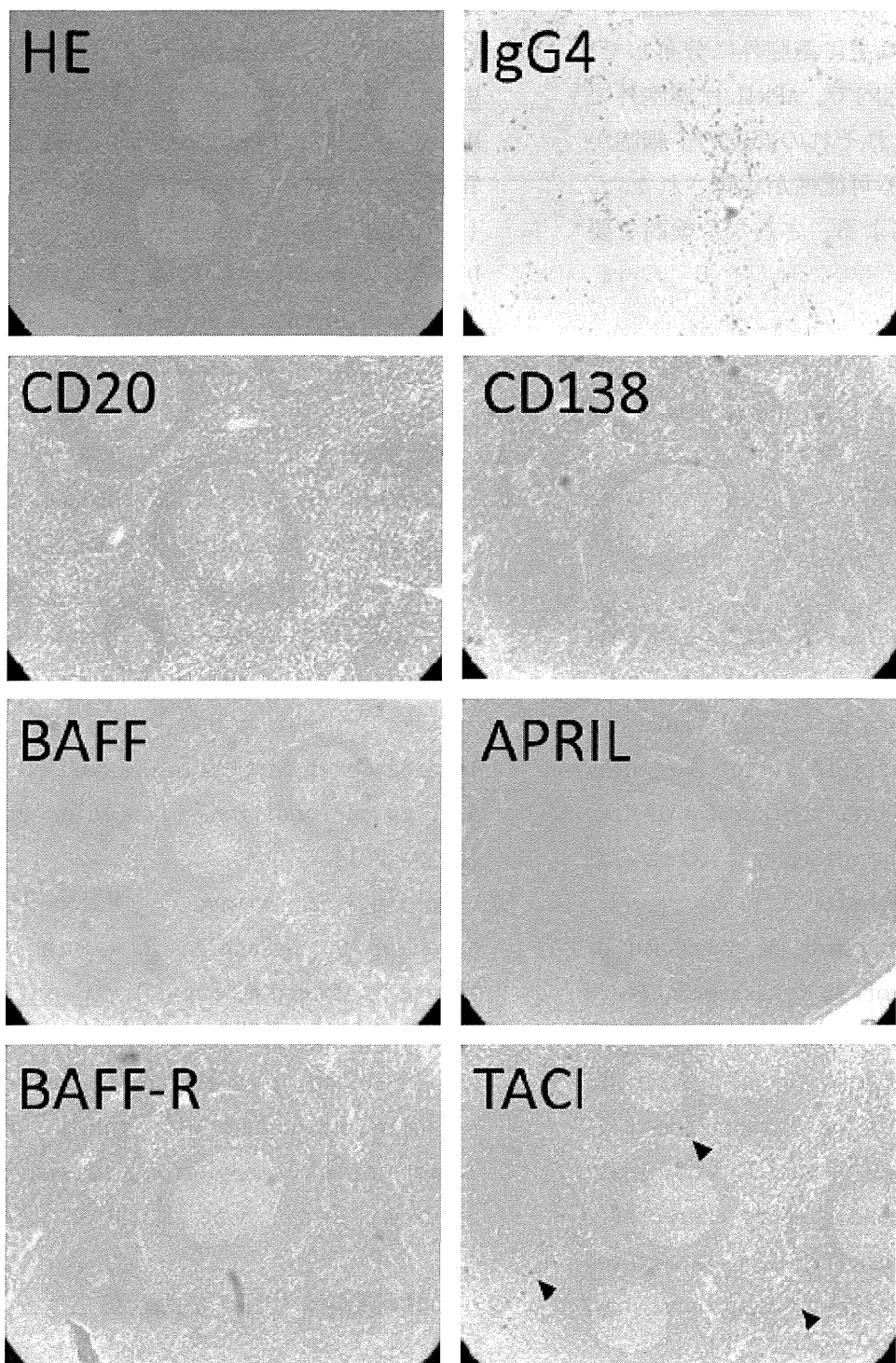


図 1. IgG4RD 患者リンパ節の免疫染色

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 関連疾患による涙腺の免疫応答と線維化病変の検討

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用いた超微形態の解析を含む病理組織学的解析を行った。本年度は涙腺病変部位に集積する線維芽細胞および上皮の特徴および免疫担当細胞の関連性について解析し Ig G4 関連疾患における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した。今後はさらに症例数を増やし、コントロールと比較をして分子レベルでの Ig G4 関連疾患の線維化発症機序の解明や新規診断法・治療法の開発を目指す。本年度はこれまでの Ig G4 涙腺における免疫応答と線維化病変の検討をまとめて Tear Film Ocular Surface 2013 の国際学会で発表した。現在論文にまとめて投稿準備中である。

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免疫応答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 関連疾患症例の免疫応答と線維化の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し、新規診断法や治療法の開発を目指すことを目的とする。

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」

研究班全体の IgG4 関連疾患における疾患関連遺伝子の解析については(承認番号 20120222)課題名「IgG4 関連疾患における疾患関連遺伝子の解析」

C. 研究結果

昨年度の結果を踏まえ今年度は免疫担当細胞および上皮細胞と線維芽細胞との関連を追究した。涙腺組織にはT細胞、B細胞に加えて形質細胞を主体とした炎症細胞浸潤と線維芽細胞の増殖および IgG4 関連疾患に典型的な花筵状線維化を認めた。

免疫組織学的解析により、間質には α -SMA 陽性線維芽細胞および 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る所見が複数の症例に認められた。さらに強拡大では、涙腺上皮筋上皮細胞の細胞質細線維に病的変化が認められた。

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。Ig G4 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症例数を増やして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B細胞、形質細胞優位、でT細胞の浸潤も認めた。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、コントロールと比較した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. Ogawa Y, Tsubota K. Review Article. Dry eye disease and inflammation. *Inflamm Regen*. 2013 Nov; 33 (5): 238-48.
2. Hirayama M, Ogawa M, Oshima M, Sekine Y, Ishida K, Yamashita K, Ikeda K, Shimmura S, Kawakita T,

Tsubota K, Tsuji T. Functional lacrimal gland regeneration by transplantation of a bioengineered organ germ *Nat Commun* 2013 4; 249

3. Kawai M, Ogawa Y, Shimmura S, Ohta S, Suzuki T, Kawamura N, Kuwana M, Kawakami Y, Tsubota K. Expression and localization of aging markers in lacrimal gland of chronic graft-versus-host disease. *Sci Rep* 2013 Aug; 3: 2455
4. Yaguchi S, Ogawa Y, Shimmura S, Kawakita T, Hatou S, Satofuka S, Nakamura S, Imada T, Miyashita H, Yoshida S, Yaguchi T, Ozawa Y, Mori T, Okamoto S, Kawakami Y, Ishida S, Tsubota K. Angiotensin II type 1 receptor antagonist attenuates lacrimal gland, lung, and liver fibrosis in a murine model of chronic graft-versus-host disease. *PLoS ONE*. 2013 Jan; 8(6): e64724.
5. 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 Sjögren's syndrome in Japanese patients. *Mod Rheumatol*. 2013 Mar;23(2):219-25.
6. 小川葉子、坪田一男. 涙腺生検病理診断 シェーグレン症候群の診断と治療 マニュアル 改定第2版 住田孝之、