

A. 研究目的

自己免疫性膵炎(AIP)は高齢者、男性に好発し、膵腫大、膵管の不整狭細像を呈する特異な膵炎である。血清 IgG4 の上昇と病変組織への IgG4 陽性形質細胞浸潤が特徴的で、特異な自己免疫学的機序が背景に存在すると考えられる。¹⁻⁵⁾しかし、その病態については充分には解明されていない。

AIP には硬化性胆管炎、涙腺・唾液腺炎、後腹膜線維症など様々な膵外病変が合併し、それぞれの病変組織にも膵病変同様 IgG4 陽性形質細胞浸潤を認め、背景に同様の病態が存在すると考えられる。^{6),7)}従って最近では、膵病変ならびにこれら膵外病変を包括した全身性疾患、IgG4 関連疾患 (IgG4-related disease)、が新たな疾患概念として提唱された。^{8),9)}AIP は IgG4 関連疾患の膵病変と認識されるようになった。IgG4 関連疾患は全身諸臓器に分布し、その詳細な病変範囲については現在精力的に検討が進められている。

われわれはAIPで甲状腺機能低下症が合併することを報告し、甲状腺病変もIgG4 関連疾患に包括される可能性を示唆した。¹⁰⁾しかし、甲状腺病変が IgG4 関連疾患に包括されることを証明するためには、多数例の IgG4 関連疾患集団において、1) 甲状腺機能低下例を有意に多く認める、2) 機能低下例が様々な活動性マーカーの異常と相関を認める、3) 機能低下例で甲状腺の腫大を認める、4) 機能低下例でステロイド治療に反応して機能改善と認める、5) 病変組織に IgG4 陽性形質細胞浸潤を豊富に認める、などの点を確認することが必要である。

本研究では IgG4 関連疾患症例を対象に、上記の1) から4) について検討を行った。(平成24年度)

IgG4 関連硬化性胆管炎 (IgG4-related sclerosing cholangitis; IgG4SC) は中沢らにより、胆管像の狭窄部位により分類され、下部胆管病変(1型)は膵癌、肝門部肝内胆管病変は胆管癌、PSC との鑑別が重要とされている。^{11) 12)}肝門部と肝内胆管病変については IgG4SC とすることにコンセンサスが得られていて、ICDC の膵外病変としての胆管病変として認められている。¹³⁾しかし下部胆管病変の発生機序については胆管壁自身の炎症性変化よりも膵頭部腫大による圧排狭窄が主体であって、IgG4SC とみなすべきではないという意見もある。¹⁴⁾また、ICDC の膵外病変としての胆管病変として認められていない。一方では IDUS で下部胆管にも胆管壁肥厚を認め、組織学的に IgG4 陽性形質細胞浸潤を認めることから下部胆管狭窄病変も IgG4-SC に含めるべきであるという意見もある。¹⁵⁾従って、下部胆管病変が IgG4SC に含有されるかについては一定のコンセンサスは得られていない。

臨床的に PSL 治療後に下部胆管狭窄に後遺的变化が残る症例が存在する。このような症例については胆管そのものの炎症が関与している可能性が考えられ、より積極的な治療が必要かもしれない。したがってAIPに認められる下部胆管狭窄病変が膵頭部腫大による二次的变化か、胆管壁自身の炎症による一時的変化であるか、病変成立機序について明らかにすることは臨床的に意義があるように思われる。本研究では上

記を明らかにするためにAIPの胆管像、IDUS所見、CT画像、胆管組織所見を検証した。(平成25年度)

AIPの病態・発症機序の詳細については充分には解明されていないが、遺伝的要因と環境要因が関わっていると考えられている。これまで我々は当研究機関で診断されたAIP患者さんについて、50万個のSNPsを用いたGWAS (genome wide association study) を行い、疾患発症に関わる遺伝子を提唱してきた(表1)。今回、AIPで涙腺・唾液腺炎を発症する患者さんは活動性が高い病態を示すことから、涙腺・唾液腺病変合併を発症する遺伝的要因をGWASでタイプした両群間のデータを基に解析した。さらに関連する候補遺伝子内に設定したSNPsについてTaqMan genotypingを行い、GWASで得られた結果の検証を行った。(平成25年度)

B. 研究方法

1) 対象：1992年から2011年の期間に、信州大学医学部附属病院にて診療されたIgG4関連疾患114例(男89例、女25例、年齢中央値69歳)、内訳はAIP92例(男72例、女20例、年齢中央値66歳)、ミクリツ病15例(男11例、女4例、年齢中央値70歳)、IgG4関連硬化性胆管炎7例(男6例、女1例、年齢中央値69歳)である。

2) 検討項目

血液検査：甲状腺関連検査として free T3, free T4, thyroid stimulating hormone (TSH), anti-thyroglobulin (anti-TG) antibody, and anti-thyroid peroxidase (anti-TPO) antibody を測定

した。甲状腺機能低下症は $TSH > 4 \text{ mIU/L}$ とし、 $\text{free T4} < 1 \text{ ng/dL}$ を顕性甲状腺機能低下症、 $\text{free T4} \geq 1 \text{ ng/dL}$ を潜在性甲状腺機能低下症とした。自己免疫性膵炎の活動性マーカーとして IgG、IgG4、C3、C4、可溶性 IL2 receptor (sIL2-R)、免疫複合体 (CIC)、 $\cdot 2\text{MG}$ を検討した。

画像検査：甲状腺の容量は、甲状腺のCT横断画像により面積を算出し、それぞれ2.5mmの厚さとして、それらの面積を加算し、容量を算出した。正常コントロールとして、60歳以上の健常人24名を対象とした。

(平成24年度)

1992年から2011までに信州大学医学部附属病院で診断されたAIP症例のうちRetrospectiveにERCでの胆管評価が可能であった73例(男性54例、女性19例、年齢65:range 38-84)を対象とした。

画像所見について以下の項目についてretrospectiveに検討した。

- (1) ERCで胆管狭窄の評価
- (2) CTにより膵頭部腫大の評価 (Haaga criteria)
- (3) ERPによる膵頭部膵管の評価 (不整狭細像)
- (4) IDUSによる胆管壁肥厚の評価、Kikuchi, Naitohらの報告¹⁶⁾を参考に内側低エコーが $\geq 0.8\text{mm}$ を壁肥厚ありと定義した。
- (5) 胆管組織のIgG4染色

(平成25年度)

Affimetrix社製SNPチップ、GeneChip Human Mapping 500k Array Set (500,568 SNPs) を用いて、自己免

疫性膵炎 115 検体について GWAS を行った検体の中から、涙腺・唾液腺病変合併患者さん 50 人、非合併患者さん 53 人について、両群間でアリル頻度の相違 ($p < 0.0001$) を示す SNPs を選出した。それらの SNPs が位置する遺伝子を涙腺・唾液腺病変合併に関わる候補遺伝子とした。更に、この遺伝子の中に新たに SNPs を設定し、GWAS で得られたように両群間でアリル頻度に統計学的有意差が認められるか検証した。新たな SNP タイピングは TaqMan probe (Life technology) を用いて行った。両群の有意差は χ^2 検定を用いて行った。
(平成 25 年度)

(倫理面への配慮)

本研究は、信州大学医学部倫理委員会の承認を受けた (承認番号 1804)。

(平成 24 年度)

本研究は信州大学医学部倫理委員会の承認を受けた (承認番号 1805)

(平成 25 年度)

自己免疫性膵炎の免疫遺伝学的背景の検討」については、信州大学医学部倫理委員会の承認を受けた (平成 20 年 3 月 25 日、23 年 2 月 8 日承認、承認番号 12)。

(平成 25 年度)

C. 研究結果

1) 甲状腺機能低下例の頻度

22 例 (19%) に甲状腺機能低下例を認め、顕性、潜在性機能低下例はそれぞれ 11 例であった。甲状腺機能低下例においても男性比率が高く、機能正常例との間で有意差を認めなかった。甲状腺機能低下例

の半数で anti-TG、anti-TPO 抗体を認めたが、半数ではいずれも陰性であった。

2) 活動性マーカーとの関連について

甲状腺機能低下例では機能正常例と比較して IgG、IgG4、CIC、 \cdot 2MG が有意に高く、C3 が有意に低かった。従って、機能低下例は IgG4 関連疾患の活動性の高い病態を反映していると考えられた。

3) ステロイド治療との関連について

甲状腺機能低下 10 例についてステロイド治療前後の評価が可能であった。TSH は 5.50 mIU/L (25-75% range: 5.06-11.8 mIU/L) から 3.11 mIU/L (25-75% range: 2.34-5.79 mIU/L) と有意に低下した ($p=0.005$)。また free T4 は 1.04 ng/dl (25-75% range: 0.95-1.18 ng/dl) から 1.18 ng/dl (25-75% range: 1.02-1.32 ng/dl) へと有意に上昇した ($p=0.047$)。

4) 甲状腺容量と機能低下症との関連について

顕性甲状腺機能低下例の甲状腺容量は 15.0 cm³ (25-75% range: 11.1-19.4 cm³) であり、健常人の 9.6 cm³ (25-75% range: 7.2-10.5 cm³) ($p=0.002$)、甲状腺機能正常例の 9.7 cm³ (25-75% range: 8.0-11.7 cm³) ($p=0.005$)、潜在性甲状腺機能低下例の 8.1 cm³ (25-75% range: 5.0-11.2 cm³) ($p=0.003$) と比較して有意に増大していた。(平成 24 年度)

(1) 診断時の ERC で 73 例中 59 例 (81%) に下部胆管狭窄を認めた。

(2) 下部胆管狭窄を認めた 59 例中 53 例 (90%) に CT で膵頭部に腫大を認めた。また下部胆管に狭窄を認めない 14 例では 4 例 (29%) に膵頭部に腫大を認めた。

(3) 下部胆管狭窄を認めた 59 例中 56 例(95%)に ERP で膵頭部膵管に異常所見を認めた。また下部胆管に狭窄を認めない 14 例では 3 例(21%)に ERP で膵頭部膵管に異常所見を認めた。

以上の(2)(3)より下部胆管狭窄は膵頭部腫大と有意に関連していた。

(4) 下部胆管狭窄を有した 59 例中 22 例で IDUS による胆管の評価が可能であった。22 例中 21 例(95%)に下部胆管壁肥厚を認めた。また中部胆管にも 22 例中 17 例(77%)に胆管壁肥厚を認めた(図 1)。膵頭部腫大を有する例では有しない例に比較して、下部胆管壁肥厚が中部胆管壁肥厚より有意に厚かった。

(5) 下部胆管生検が施行された 40 例中 14 例で IgG4 陽性形質細胞の浸潤を認め、IgG4-SC の可能性が示唆された。

以上の(4)(5)より下部胆管狭窄の成立機序として、胆管自身の炎症性変化も関与し、膵頭部腫大が下部胆管壁肥厚に影響を及ぼしていると考えられた。

(6) 4 例で ERC で下部胆管から中部胆管に連続性の狭窄もしくは硬化性変化を認めた。

(7) 2 例で、下部胆管狭窄を呈しているにもかかわらず、膵頭部腫大ならびに膵頭部主膵管狭窄を認めなかった。以上の(6)(7)の所見は下部胆管狭窄が膵頭部腫大と独立して生じうることを示していた。

(平成 25 年度)

涙腺・唾液腺病変合併患者さん 50 人、非合併患者さん 53 人の GeneChip Human Mapping 500k Array Set を用いた GWAS で、 $p < 0.0001$ でアリルの頻度差を

示した SNP s から推定された合併症に関連する候補遺伝子は、表 2 に示すように 10 種類認められた。この内

KLF(Kruppel-like factor 7; 2q33.3)、*LOC101928923* (uncharacterized LOC1928923; 6q25.3) と *MPPED2*

(Metallophosphor esterase domain - containing protein 2; 11p14.1) の 3 遺伝子についてそれぞれ GWAS には含まれていない新たな SNPs を追加して検査した。

涙腺・唾液腺病変合併と非合併について、*KLF* 遺伝子、*LOC101928923* 遺伝子、*MPPED2* 遺伝子内の SNP s の相関解析を行ったところ、GWAS および TaqMan 両解析で両群間において同 SNP が有意な相関を示した(表 3, 4, 5)。*KLF* 遺伝子内の rs2284932 と *MPPED2* 遺伝子内の

rs514644 は、それぞれ minor allele が涙腺・唾液腺病変合併に正の相関を示し、minor allele 保有が合併症を起こしやすい事が推測される。また、*LOC101928923* 遺伝子内の rs4379306 は、minor allele (T) が負の相関を示したことから、minor allele は合併症に対して防御的に機能していると推定される。(平成 25 年度)

D. 考察

今回の検討から IgG4 関連疾患において甲状腺機能低下症の頻度が 19%であった。これは一般人集団の甲状腺機能低下症頻度に比較して優位に多いと考えられる。以前の報告でも AIP を含む IgG4 関連疾患における甲状腺機能低下例の頻度は 14-28%で、IgG4 関連疾患には甲状腺機能低下例が有意に多く存在する

ことが考えられる。^{10),17)} また、甲状腺機能低下例では、IgG4 関連疾患の活動性に関連する種々のマーカーが異常値を示し、活動性の高い病態と考えられ、IgG4 関連疾患の病態と甲状腺機能低下症は関連していると考えられる。ステロイド治療により TSH が有意に低下し、free T4 が有意に上昇することも IgG4 関連疾患の特徴的所見であり、甲状腺病変が本疾患に包括されることを支持している。さらに、顕性甲状腺機能低下例では健常人、甲状腺機能正常群、潜在性甲状腺機能低下群と比較して、甲状腺容量が有意に大きく、IgG4 関連疾患の特徴である臓器腫大に適合している。以上より、甲状腺病変が IgG4 関連疾患に包括されると考えられ、IgG4 関連甲状腺炎と呼称される新たな疾患概念の提唱を支持する。

IgG4 関連甲状腺炎が橋本病やリーデル甲状腺炎とは異なる、独立した病態である。男性優位、甲状腺関連自己抗体が半数で陰性、ステロイドに対する良好な反応性、顕著な goiter を認めないなどが、橋本病との違いを支持する。ただ、過去に橋本病と診断された症例中に IgG4 関連甲状腺炎が包括されていた可能性は否定できない。¹⁸⁾ 一方、リーデル甲状腺炎が IgG4 関連疾患に包括されるという報告があるが、¹⁹⁾ 今回の検討からは、リーデル甲状腺炎の特徴的所見である周辺組織に浸潤する顕著な線維化、を示す甲状腺病変は認めなかった。

(平成 24 年度)

今回の研究では、AIP で下部胆管狭窄を合併した症例の 90%に CT で膵頭部腫大を認め、また 95%に膵頭部膵管の狭窄所

見を認めた。以上より下部胆管狭窄には膵頭部の炎症性腫大による胆管圧排が強く影響していると考えられた。平野らは膵頭部腫大が膵内胆管狭窄の要因となっている根拠として、膵頭部腫大のある群がない群に比べて有意に胆管狭窄が多いこと、を挙げている。¹⁴⁾ 今回の検討でも膵頭部腫大群のある群ではない群と比較して有意に膵内胆管狭窄所見を認めた。さらに膵頭部腫大群には膵頭部主膵管狭窄を有意に多く認めた。膵頭部腫大により膵管の圧排狭窄が存在する状況であれば、当然膵内胆管の圧排狭窄が存在することが予想され、膵頭部腫大が膵内胆管狭窄の大きな要因となっていることは明らかである。

一方、IDUS で中部胆管に下部胆管と同様に壁肥厚を認めることや下部胆管からの生検で IgG4 陽性形質細胞浸潤を認めたことから胆管自身の壁肥厚・硬化性変化も下部胆管狭窄の要因として考えられた。中沢らは AIP に伴う硬化性胆管炎を 4 つのタイプに分類し、膵内胆管狭窄をきたすタイプを type1 と分類している。従って、膵内胆管狭窄は概念的に硬化性胆管炎と見なしている。¹²⁾ 内藤らはさらに膵内胆管狭窄病変部位は、IDUS では胆管壁の肥厚を認め、狭窄の主要な要因は胆管壁の炎症性肥厚であると結論している。¹⁵⁾

以上より、AIP における下部胆管狭窄の成立機序として、膵頭部の炎症性腫大によるしめつけ狭窄が要因と考えられるが、胆管自身の炎症性の壁肥厚・硬化性変化も関与していると考えられる。

下部胆管狭窄の主要な要因が膵頭部腫大か下部胆管壁肥厚のいずれかを特

定することは難しい。欧米では下部胆管狭窄病変が IgG4SC に包括されていないので、膵頭部腫大による二次的変化と考えられていると思われる。今回の検討より、膵頭部腫大例では下部胆管壁肥厚が有意に厚かったことより、膵頭部腫大が下部胆管壁肥厚に影響していると考えられる。

今回、中部胆管から下部胆管に連続性に狭窄性変化を認める 4 症例を認めた。また膵頭部腫大や膵頭部主膵管狭窄を認めず、下部胆管狭窄を呈した症例を 2 例認めた。このような症例は胆管自身の硬化性変化が主要な要因ではないかと考えられ、膵頭部腫大の影響を受けない下部胆管狭窄症例も存在する。

従って、下部胆管狭窄が膵頭部腫大による圧排狭窄か、胆管壁自身の炎症性肥厚によるものかについては、両方が関与していると考えられるが、どちらが優位かについては、個々の症例については胆管自身の変化が優位な場合と膵臓からの圧排変化が優位な場合がそれぞれ存在していると考えられる (図 2)。

AIP に認められる膵内胆管狭窄を硬化性胆管炎に包括すべきか否かについては、組織所見より、硬化性胆管炎に包括すべきと、考えられる。ただし、一般的に PSC と鑑別すべき硬化性胆管病変としては膵外胆管狭窄であり、膵内胆管狭窄病変は PSC の鑑別すべき病態には含める必要はないのではないかとと思われる。

(平成 25 年度)

転写因子である Kruppel-like factor family (*KLF1*~*KLF17*) は、本来細胞の分化や成長に重要な役割を果たしている。今回涙腺・唾液腺病変合併症と相関を示

した *KLF7* 遺伝子は広範囲にわたるヒト組織中に発現しており、特に神経新生制御に重要な機能を果たしているとの報告があるが、タイプ 2 糖尿病発症に関わるとの報告もある。また、この遺伝子の発現は脂肪細胞生成に抑制的に機能しているとの報告があり、脂肪細胞機能と関わりをもつタイプ 2 糖尿病の感受性に大きく影響していると示唆された。この遺伝子が涙腺・唾液腺合併症に関わるかについての機能的解析が、今後必要である。

涙腺・唾液腺合併症に負の相関を示した *LOC101928923* 遺伝子は、いまだ機能不明であるが、non-coding RNA 遺伝子として多くの生体内作用に影響を及ぼしている。

(平成 25 年度)

E. 結論

IgG4 関連疾患では甲状腺機能低下症が 19% と多く認められ、IgG4 関連疾患活動性マーカーと有意な相関を示し、ステロイド治療に良好に反応し、甲状腺容量が大きい、ことから IgG4 関連甲状腺炎という病態が存在すると考えられる。IgG4 関連甲状腺炎は臨床的には橋本病やリーデル甲状腺炎とは異なる独立した病態である。

(平成 24 年度)

自己免疫性膵炎の下部胆管狭窄には胆管自身の炎症性変化が関与していることより IgG4SC に含まれる。しかし、個々の症例については胆管自身の変化が優位な場合と膵臓からの圧排変化が優位な場合がそれぞれ存在していると考えられる。²⁰⁾

(平成 25 年度)

GWAS において $P < 0.0001$ 以下で有意な相関を示した SNP から、*KLF7* 遺伝子、*LOC101928923* 遺伝子と *MPPED2* 遺伝子が、涙腺・唾液腺合併症発症に関連性を示す候補遺伝子として示唆された。今後症例を増やした解析および絞り込まれてこれらの遺伝子の組織内での発現状況を含めた機能解析が必要である。

(平成 25 年度)

[参考文献]

1. Yoshida K, Toki F, Takeuchi T, Watanabe S, Shiratori K, Hayashi N: Chronic pancreatitis caused by an autoimmune abnormality, proposal of the concept of autoimmune pancreatitis. *Dig Dis Sci* 1995;40: 1561-1568.
2. Hamano H, Kawa S, Horiuchi A, Unno H, Furuya N, Akamatsu T, Fukushima M, Nikaido T, Nakayama K, Usuda N, Kiyosawa K: High serum IgG4 concentrations in patients with sclerosing pancreatitis. *New Engl J Med* 2001;344:732-738.
3. Kawa S, Hamano H, Kiyosawa K. Pancreatitis. In: Rose NR, MacKay IR, editors. *The autoimmune diseases*. 4th ed. St Louis: Academic Press; 2006. P779-86
4. Kawa S, Fujinaga Y, Ota M, Hamano H, Bahram S. Autoimmune Pancreatitis and Diagnostic Criteria. *Current Immunology Reviews* 2011;7:144-61.
5. Hamano H, Kawa S, Ochi Y, Unno H, Shiba N, Wajiki M et al. Hydronephrosis associated with retroperitoneal fibrosis and sclerosing pancreatitis. *Lancet* 2002;359:1403-4.
6. Hamano H, Arakura N, Muraki T, Ozaki Y, Kiyosawa K, Kawa S. Prevalence and distribution of extrapancreatic lesions complicating autoimmune pancreatitis. *J Gastroenterol* 2006;41:1197-205.
7. Fujinaga Y, Kadoya M, Kawa S, Hamano H, Ueda K, Momose M et al. Characteristic findings in images of extra-pancreatic lesions associated with autoimmune pancreatitis. *Eur J Radiol* 2009;76:228-38.
8. Kawa S, Sugai S. History of autoimmune pancreatitis and Mikulicz's disease. *Current Immunology Review* 2011;7:137-43.
9. Stone JH, Zen Y, Deshpande V. IgG4-related disease. *N Engl J Med* 2012;366:539-51.
10. Komatsu K, Hamano H, Ochi Y, Takayama M, Muraki T, Yoshizawa K et al. High prevalence of hypothyroidism in patients with autoimmune pancreatitis. *Dig Dis Sci* 2005;50: 1052-7.
11. Nakazawa T, Ohara H, Sano H, et al. Cholangiography can discriminate sclerosing cholangitis with autoimmune pancreatitis from primary sclerosing cholangitis. *Gastrointestinal endoscopy* 2004;60:937-44.
12. Nakazawa T, Ohara H, Sano H, et al. Schematic classification of sclerosing cholangitis with autoimmune pancreatitis by cholangiography. *Pancreas* 2006;32:229.
13. Shimosegawa T, Chari ST, Frulloni L, et al. International consensus diagnostic criteria for autoimmune pancreatitis: guidelines of the International Association of Pancreatology. *Pancreas* 2011;40:352-8.
14. Hirano K, Tada M, Isayama H, et al. Endoscopic evaluation of factors contributing to intrapancreatic biliary stricture in autoimmune pancreatitis. *Gastrointestinal endoscopy* 2010;71:85-90.
15. Naitoh I, Nakazawa T, Ohara H, et al. Endoscopic transpapillary intraductal ultrasonography and biopsy in the diagnosis of IgG4-related sclerosing cholangitis. *Journal of gastroenterology* 2009;44:1147-55.
16. Kikuchi Y, Tsuyuguchi T, Saisho H. Evaluation of normal bile duct and cholangitis by intraductal ultrasonography. *Abdominal imaging*

2008;33:452-6.

17. Sah RP, Chari ST. Clinical hypothyroidism in autoimmune pancreatitis. *Pancreas* 2010;39:1114-6.
18. Li Y, Bai Y, Liu Z, Ozaki T, Taniguchi E, Mori I et al. Immunohistochemistry of IgG4 can help subclassify Hashimoto's autoimmune thyroiditis. *Pathol Int* 2009;59: 636-41.
19. Dahlgren M, Khosroshahi A, Nielsen GP, Deshpande V, Stone JH. Riedel's thyroiditis and multifocal fibrosclerosis are part of the IgG4-related systemic disease spectrum. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2010;62:1312-8.
20. Watanabe T, Maruyama M, Ito T, Maruyama M, Muraki T, Hamano H, Hasebe O, Kawa S, Mechanisms of Lower Bile Duct Stricture in Autoimmune Pancreatitis. *Pancreas* 2014;43:255-260.

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Maruyama M, Arakura N, Ozaki Y, Watanabe T, Ito T, Yoneda S, Maruyama M, Muraki T, Hamano H, Matsumoto A, Kawa S. Risk factors for pancreatic stone formation in autoimmune pancreatitis over a long-term course. *J Gastroenterol.* 2012;47:553-60
- 2) Sugiyama Y, Fujinaga Y, Kadoya M, Ueda K, Kurozumi M, Hamano H, Kawa S. Characteristic magnetic resonance features of focal autoimmune pancreatitis useful for differentiation from pancreatic cancer. *Jpn J Radiol.* 2012;30:296-309
- 3) 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 for IgG4-related disease (IgG4-RD), 2011. *Mod Rheumatol.* 2012;22:21-30.

- 4) Kawa S, Ito T, Watanabe T, Maruyama M, Hamano H, Maruyama M, Muraki T, Arakura N. The Utility of Serum IgG4 Concentrations as a Biomarker. *International Journal of Rheumatology.* 2012 198314. Epub 2012
- 5) 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 May 18. doi: 10.1038/modpathol.2012.72.
- 6) 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.* 2012;19:536-42.
- 7) Stone JH, Khosroshahi A, Deshpande

- V, Chan JK, Heathcote JG, Aalberse R, Azumi A, Bloch DB, Brugge WR, Carruthers MN, Cheuk W, Cornell L, Castillo CF, Ferry JA, Forcione D, Klöppel G, Hamilos DL, Kamisawa T, Kasashima S, Kawa S, Kawano M, Masaki Y, Notohara K, Okazaki K, Ryu JK, Saeki T, Sahani D, Sato Y, Smyrk T, Stone JR, Takahira M, Umehara H, Webster G, Yamamoto M, Yi E, Yoshino T, Zamboni G, Zen Y, Chari S. IgG4-Related disease: recommendations for the nomenclature of this condition and its individual organ system manifestations. *Arthritis Rheum.* 2012 Jun 26. doi: 10.1002/art.34593.
- 8) Uehara T, Ikeda S, Hamano H, Kawa S, Moteki H, Matsuda K, Kaneko Y, Hara E. A Case of Mikulicz's Disease Complicated by Malignant Lymphoma: A Postmortem Histopathological Finding. *Intern Med.* 2012;51:419-23.
- 9) Hart PA, Kamisawa T, Brugge WR, Chung JB, Culver EL, Czako L, Frulloni L, Go VL, Gress TM, Kim MH, Kawa S, Lee KT, Lerch MM, Liao WC, Löhr M, Okazaki K, Ryu JK, Schleinitz N, Shimizu K, Shimosegawa T, Soetikno R, Webster G, Yadav D, Zen Y, Chari ST. Long-term outcomes of autoimmune pancreatitis: a multicentre, international analysis. *Gut.* 2012 Dec 11. [Epub ahead of print]
- 10) 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.* 2013;42:325-30.
- 11) Watanabe T, Maruyama M, Ito T, Kanai K, Oguchi T, Muraki T, Hamano H, Arakura N, Ota M, Kawa S. Two siblings with type 1 autoimmune pancreatitis. *Int Med* 2013;52:895-899.
- 12) Watanabe T, Maruyama M, Ito T, Maruyama M, Muraki T, Hamano H, Hasebe O, Kawa S. Mechanisms of Lower Bile Duct Stricture in Autoimmune Pancreatitis. *Pancreas* 2014;43:255-260.
2. 学会発表
- 1) Ito T, Kanai K, Oguchi T, Maruyama M, Watanabe T, Muraki T, Hamano H, Arakura N, Kawa S. Autoimmune Pancreatitis Has Close Association With Allergen Specific IgE Antibodies. APDW2012 2012. Dec 8th Bangkok
- 2) Maruyama M, Kanai K, Oguchi T, Watanabe T, Ito T, Ozaki Y, Muraki T, Hamano H, Arakura N, Matsumoto A, Kawa S. Autoimmune Pancreatitis Can Transform Into Chronic Pancreatitis APDW2012 2012. Dec 8th Bangkok
- 3) Watanabe T, Maruyama M, Ito T, Kanai K, Oguchi T, Muraki T, Hamano H, Arakura N, Kawa S. Clinical characteristics of IgG4 related sclerosing cholangitis (IgG4-SC) without pancreatic lesion APDW2012 2012. Dec 5th Bangkok
- 4) 伊藤哲也、村木崇、川茂幸、「自己免疫性膵炎の免疫遺伝学的背景」シンポジウム6 ゲノムワイド検索を消化器疾患、第98 会日本消化器病学会総会、(東京)、2012.4.20
- 5) 丸山真弘、渡邊貴之、川茂幸、「自己免疫性膵炎は慢性膵炎に移行しうるか」シンポジウム8 慢性膵炎は治療介入により改善するか?、第43 回日

本膵臓学会大会、(山形)、2012. 6. 29

2. 実用新案登録

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

3. その他

(予定を含む。)

該当なし

1. 特許取得

該当なし

表1 GWASでAIP疾患感受性を示したSNPsと候補遺伝子

| dbSNP | Chromo. | Position | Candidate Gene |
|------------|---------|-------------|----------------|
| rs1408548 | 1 | 156,362,353 | KIRREL |
| rs4565074 | 4 | 10,885,982 | CLNK |
| rs595805 | 6 | 5,987,127 | F13A1 |
| rs9275572 | 6 | 32,786,977 | HLA-DQB1 |
| rs2201301 | 6 | 92,851,559 | EPHA7 |
| rs7026505 | 9 | 36,987,896 | PAX5 |
| rs2048777 | 12 | 129,505,861 | RIMBP2 |
| rs9575316 | 13 | 82,970,117 | SLITRK1 |
| rs2125152 | 16 | 19,982,084 | GPR139 |
| rs9303403 | 17 | 54,574,082 | FAM33A |
| rs12611038 | 19 | 7,677,742 | FCER2 |
| rs12972995 | 19 | 35,433,463 | ZNF536 |
| rs2425210 | 20 | 34,326,497 | C20orf4 |

表2 GWASで有意なアリル頻度の相違を示した代表的なSNPs

| Significant SNP | Chrom. location | P | OR | Candidate Gene |
|-----------------|-----------------|------------|------|----------------|
| rs2284932 | 2q33.3 | <0.000003 | 4.35 | KLF7 |
| rs2407212 | 5q23.2 | <0.00009 | 6.20 | SNCAIP |
| rs4735508 | 8q22.1 | <0.0001 | 8.42 | MATN2 |
| rs514644 | 11p14.1 | <0.00005 | 3.06 | MPPED2 |
| rs12636874 | 3q12.2 | <0.00002 | 3.61 | ABI3BP |
| rs4379306 | 6q25.3 | <0.0000009 | 0.21 | LOC101928923 |
| rs524762 | 6q13 | <0.00002 | 0.31 | COL12A1 |
| rs1536067 | 9p22.2 | <0.00003 | 0.24 | SH3GL2 |
| rs4878053 | 9q21.33 | <0.00001 | 0.29 | FLJ45537 |
| rs7170215 | 15q25.3 | <0.00008 | 0.27 | NTRK3 |

表3 *KLF7*遺伝子内SNPsの相関解析

GWA解析

| dbSNP rs | Chrom. Location | Allele | Minor Allele | MAF | Call Rate | P | OR |
|------------|-----------------|--------|--------------|-------|-----------|----------|------|
| rs1263597 | 207655130 | [C/G] | G | 0.368 | 0.991 | 0.0360 | 1.81 |
| rs2287505 | 207655331 | [A/C] | A | 0.108 | 1.000 | 0.0272 | 2.74 |
| rs10195536 | 207715065 | [A/T] | A | 0.083 | 0.982 | 0.0155 | 3.79 |
| rs2284932 | 207720754 | [C/T] | C | 0.306 | 1.000 | 2.05E-06 | 4.35 |

TaqMan解析

| dbSNP rs | Chrom. Location | Allele | Minor Allele | MAF | P | OR |
|-----------|-----------------|--------|--------------|-------|----------|------|
| rs1263615 | 207667483 | [G/A] | G | 0.347 | 0.758 | 1.10 |
| rs768090 | 207711824 | [A/T] | A | 0.211 | 0.910 | 1.80 |
| rs2284932 | 207720754 | [C/T] | C | 0.256 | 6.21E-04 | 2.98 |
| rs2284928 | 207732213 | [G/T] | G | 0.183 | 0.0387 | 2.16 |

表4 *LOC101928923*遺伝子内SNPsの相関解析

GWA解析

| dbSNP rs | Chrom. Location | Allele | Minor Allele | MAF | Call Rate | P | OR |
|-----------|-----------------|--------|--------------|-------|-----------|----------|------|
| rs9371942 | 156276214 | [A/G] | G | 0.243 | 1.000 | 3.89E-06 | 0.20 |
| rs4379306 | 156276633 | [A/T] | T | 0.236 | 0.991 | 8.86E-06 | 0.21 |
| rs9371408 | 156307788 | [A/G] | A | 0.220 | 0.982 | 2.94E-05 | 0.22 |
| rs9384400 | 156323446 | [A/T] | T | 0.231 | 0.973 | 1.40E-05 | 0.22 |

TaMan解析

| dbSNP rs | Chrom. Location | Allele | Minor Allele | MAF | P | OR |
|-----------|-----------------|--------|--------------|-------|----------|------|
| rs4379306 | 156276633 | [A/T] | T | 0.235 | 1.67E-04 | 0.30 |
| rs9397861 | 156279496 | [A/G] | G | 0.265 | 1.50E-04 | 0.31 |
| rs4428513 | 156288830 | [C/T] | C | 0.081 | 5.47E-01 | 1.34 |

表5 *MPPED2*遺伝子内SNPsの相関解析

GWA解析

| dbSNP rs | Chrom. Location | Allele | Minor Allele | MAF | Call Rate | P | OR |
|----------|-----------------|--------|--------------|-------|-----------|----------|------|
| rs514644 | 30408757 | [C/T] | C | 0.482 | 0.991 | 5.37E-05 | 3.06 |
| rs537944 | 30434891 | [A/G] | A | 0.482 | 0.991 | 5.17E-05 | 3.07 |
| rs521436 | 30449780 | [A/T] | A | 0.468 | 1.000 | 9.94E-05 | 2.92 |

TaqMan解析

| dbSNP rs | Chrom. Location | Allele | Minor Allele | MAF | P | OR |
|------------|-----------------|--------|--------------|-------|----------|------|
| rs10835665 | 30406319 | [A/G] | A | 0.226 | 0.033 | 1.98 |
| rs514644 | 30408757 | [C/T] | C | 0.483 | 2.35E-04 | 2.65 |
| rs808182 | 30411818 | [A/G] | A | 0.256 | 0.030 | 1.59 |
| rs11031087 | 30415467 | [T/A] | T | 0.060 | 0.921 | 0.95 |
| rs11031093 | 30424076 | [A/G] | A | 0.060 | 0.156 | 2.18 |

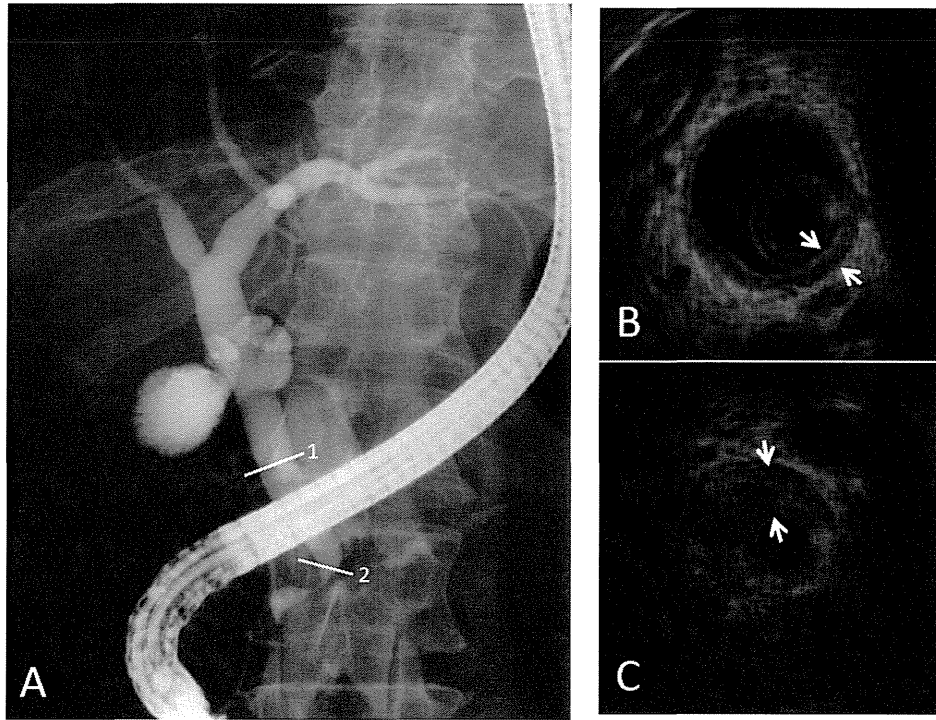


図 1 : IgG4SC の IDUS 所見。A. 胆管造影所見、1 非狭窄部、2 狭窄部。B は 1 の非狭窄部の IDUS 所見で壁肥厚を認める。C は 2 の狭窄部の IDUS 所見で著明な壁肥厚を認める。

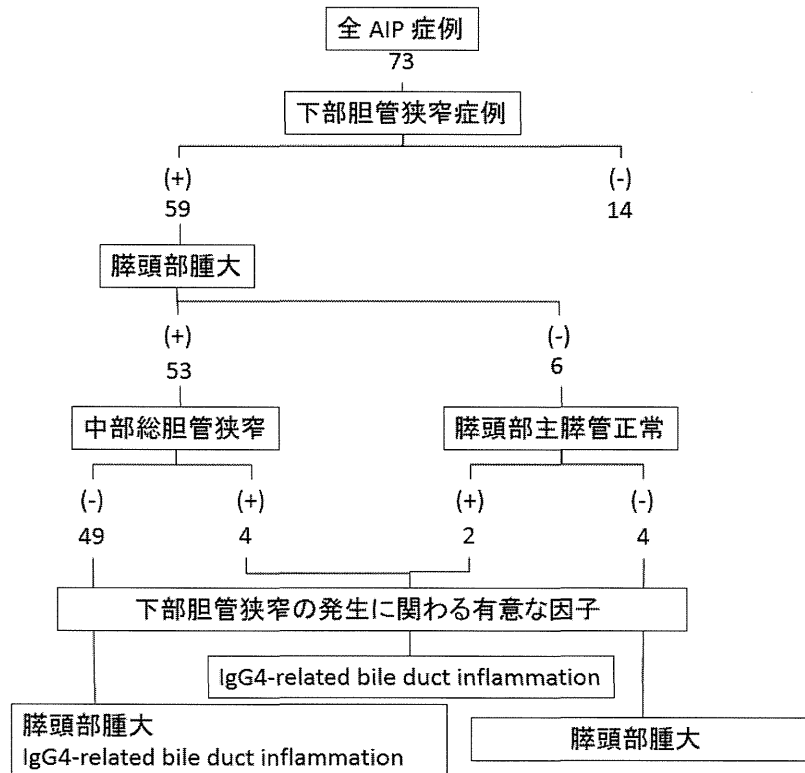


図 2 : 自己免疫性膵炎に伴う下部胆管狭窄の発生に関わる因子。

IgG4 関連涙腺・唾液腺炎 (IgG4-DS) の病態形成における自然免疫の関与

研究分担者 中村誠司 九州大学院歯学研究院口腔顎顔面病態学講座 教授

研究要旨：IgG4 関連涙腺・唾液腺炎 (IgG4-DS) は、Th2 優位な疾患であり、重度の線維化を特徴とする。しかし、IgG4-DS における Th2 優位や線維化のメカニズムについてはいまだ不明である。そこで本研究では、自然免疫担当細胞（マクロファージや樹状細胞）に注目し、その発現と局在について検討した。その結果、形質細胞様樹状細胞が産生する IL-33 が Th2 優位に関与しており、M2 マクロファージが産生する IL-10 や CCL18 が重度の線維化に関与していることが示唆された。

A. 研究目的

IgG4 関連涙腺・唾液腺炎 (IgG4-DS) は、病理組織学的には著明な IgG4 陽性形質細胞の浸潤と重度の線維化を特徴とする。われわれの研究グループでは、IgG4-DS 患者の唾液腺のヘルパー T (Th) 細胞に注目し、IgG4-DS が Th2 優位の疾患であり、この Th2 が IgG4 産生に深く関与していることを明らかにしてきた。しかし、IgG4-DS における Th2 優位や線維化のメカニズムについてはいまだ不明である。そこで本研究では、自然免疫担当細胞（マクロファージや樹状細胞）に注目し、その発現と局在について検討した。

B. 研究方法

2008 年から 2013 年までに当科を受診した IgG4-DS 患者 10 例、健常者 10 例を対象とした。これらの患者の顎下腺を用いて、Th2 サイトカイン (IL-4)、マクロファージ (M1+M2 型：CD68、M2 型：CD163)、樹状細胞 (形質細胞様樹状細胞 (pDC)：CD123、骨髄由来樹状細胞：CD11c、濾胞性樹状細胞：CD21)、IL-33、IL-10、CCL18 について real-time PCR 法および免疫組織化学染色によりその発現を検討した。また、線維化の評価は膠原線維を選択的に染色するマッソントリクローム染色を行い、Keyence 社 BZ-II 解析ソフトを用いて強拡大視野全体における陽性領域の割合の平均を算出した。

(倫理面への配慮)

本研究は生体材料を使用するため、主治医が説明文書を使用して患者に説明し、患

者及び家族から書面で同意書を得る。解析結果の論文などでの公表に際しては、患者の個人を識別できる情報は公表しない。個人情報保護のため、検体は符号により匿名化し、符号を結びつける対応表および個人情報情報は実験責任者が厳重に保管する。

C. 研究結果

まず、Th2 優位の関連について検討を行ったところ、IgG4-DS は SS よりも IL-33 および ST2 の mRNA 量が有意に亢進しており、免疫組織化学染色では SS は導管上皮とその周囲にわずかに発現を認める程度であったが、IgG4-DS は eGC とその周囲に強い発現を認め、さらに IL-33/ST2 シグナルで産生が促進される IL-4 も同部位に強い発現を認めた。これらの結果から、IgG4-DS における IL-33 産生細胞は上皮細胞以外の可能性が考えられたため、IL-33 産生能を有する DC およびマクロファージについても検索を行った。その結果、Th2 分化に関わる pDC が GC とその周囲に強い発現を認め、発現部位が IL-33 と一致していた。

次に、重度の線維化のメカニズムについて検討を行ったところ、IgG4-DS 患者は健常者と比較して、IL-4、IL-10、CD68、CD163、CCL18 の mRNA 発現が有意に亢進していた。免疫組織化学染色では、健常者は散在性に CD68 の発現を認めたが、CD163 の発現はほとんど認めなかった。一方、IgG4-DS 患者は CD68、CD163 とも強い発現を認め、CD163 陽性細胞数および M2/M1+M2 比は健常者より有意に高かった。また、Th2 サイトカイ

ン(IL-4)や線維化に関与する分子(IL-10、CCL18)は、健常者ではほとんど発現を認めなかったが、IgG4-DS患者では顎下腺全体に発現を認めた。特に、IL-4とIL-10は濾胞内に発現を認め、CD68とCD163は濾胞周囲に発現を認めた。IL-10とCCL18はIgG4-DSの線維化周囲に認め、二重免疫染色ではCCL18とIL-10はCD163と局在がほぼ一致していた。また、IgG4-DS患者の線維化スコアは健常者と比較して有意に高く、CD163陽性細胞(M2マクロファージ)数と正の相関を示した。

D. 考察

IgG4-DSでは、pDCが産生するIL-33がTh2優位に関与しており、M2マクロファージが産生するIL-10やCCL18が重度の線維化に関与していることが示唆され、自然免疫がIgG4-DSの発症に深く関与していることが考えられた。

E. 結論

IgG4関連疾患は本邦から発信された新しい疾患概念であり、現在では世界的にも注目され、各罹患臓器における臨床研究が進んでいるが、発症や病態進展のメカニズムなどの基礎研究については報告が少ない。また、IgG4関連疾患の治療としては、一般にステロイドが用いられ著効する症例が多いが、再燃することも稀ではない。Yamamotoらはステロイド治療を行ったIgG4-DS患者41例の長期経過を診ているが、一旦は症状が消失しても11例(26.8%)で再発を認めたことを報告している。さらに、ステロイドの長期投与の副作用として、糖尿病や骨粗鬆症などがあり、ステロイドの適応基準についても今後検討が必要とされる。一方で、ステロイドに代わる治療法の開発として、免疫抑制剤やリツキシマブ(抗ヒトCD20ヒト・マウスキメラ抗体)による治験が行われているが、適応は難治症例に限られており、その作用機序については不明である。以上のことから、IgG4関連疾患の治療法の確立には免疫学的アプローチによる病因解明が不可欠であり、今後のさらなる研究により疾患特異的な分子が同定されれば、ステロイドに代わる

有効な標的分子治療の確立に繋がるであろう。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Moriyama M, Tanaka A, Maehara T, Furukawa S, Nakashima H, Nakamura S. T helper subsets in Sjögren's syndrome and IgG4-related dacryoadenitis and sialoadenitis: A critical review. J Autoimmun in press, 2013.
- 2) Moriyama M, Nakamura S. "IgG4-related disease" Umehara H, Stone J, et al : <Imaging> Salivary glands in Mikulicz's disease, p85-92, 2014, Springer
- 3) Moriyama M, Tanaka A, Maehara T, Ohyama Y, Shimizu M, Nakashima H Hayashida J-N, Shinozaki S, Kubo Y, Furukawa S, Kikuta T, Nakamura S. Clinical characteristics of Mikulicz's disease as an IgG4-related disease. Clin Oral Invest. in press, 2013.
- 4) 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. 2012;23;14:R171.
- 5) Maehara T, Moriyama M, Nakashima H, Miyake K, Hayashida JN, Tanaka A, Shinozaki S, Kubo Y, Nakamura S. Interleukin-21 contributes to germinal centre formation and immunoglobulin G4 production in IgG4-related dacryoadenitis and sialoadenitis, so-called Mikulicz's disease. Ann Rheum Dis. 2012;71:2011-20.

2. 学会発表

- 1) M Moriyama, S Furukawa, A Tanaka, T Maehara, JN Hayashida, K Ohya, M Ohta, S Nakamura. IL-33 contributes to Th2 cytokine production in IgG4-related dacryoadenitis and sialoadenitis (IgG4-DS). 12th International Symposium on Sjögren's Syndrome. Kyoto, 2013. 10. 11
- 2) S Furukawa, M Moriyama, A Tanaka, T Maehara, H Tsuboi, JN Hayashida, K Ohya, M Ohta, T Sumida, S Nakamura. Polarized M2 macrophages promote fibrosis of glandular tissue in IgG4-related dacryoadenitis and sialoadenitis (IgG4-DS). 12th International Symposium on Sjögren's Syndrome. Kyoto, 2013. 10. 11
- 3) M Ohta, A Tanaka, M Moriyama, S Kawano, T Maehara, K Ohya, S Furukawa, T Kiyoshima, M Shimizu, Y Arinobu, JN Hayashida, S Nakamura. A case of malignant lymphoma initially suspected IgG4-related dacryoadenitis and sialoadenitis (IgG4-DS). 12th International Symposium on Sjögren's Syndrome. Kyoto, 2013. 10. 11
- 4) T Maehara, M Moriyama, A Tanaka, JN Hayashida, S Furukawa, K Ohya, M Ohta, S Nakamura. IL-21 contributes to germinal center formation and IgG4 production in IgG4-related dacryoadenitis and sialoadenitis (IgG4-DS). 12th International Symposium on Sjögren's Syndrome. Kyoto, 2013. 10. 11
- 5) M Shimizu, M Moriyama, K Okamura, T Kawazu, T Chikui, Y Ohya, K Abe, S Nakamura, K Yoshiura. Imaging diagnosis for IgG4-related dacryoadenitis and sialoadenitis (IgG4-DS). 12th International Symposium on Sjögren's Syndrome. Kyoto, 2013. 10. 11
- 6) S Nakamura, M Moriyama, et al. Helper T subsets involved in the pathogenesis of localized autoimmune damage in Sjögren's syndrome. 2th International Symposium on Sjögren's Syndrome. Kyoto, 2013. 10. 11
- 7) T Maehara, M Moriyama, JN Hayashida, A Tanaka, S Shinozaki, Y Kubo, S Nakamura. Interleukin-21 contributes to germinal center formation and immunoglobulin G4 production in Mikulicz's disease. 10th Asian Congress on Oral and Maxillofacial Surgery. Bali, 2012. 12. 16
- 8) 中村誠司、森山雅文、他. IgG4 関連疾患の病態形成における T 細胞サブセットの関与. 第 57 回 日本リウマチ学会総会・学術集会、京都、2013. 4. 20
- 9) 森山雅文、川野真太郎、古川祥子、田中昭彦、前原 隆、林田淳之將、大山恵子、太田美穂、中村誠司. IgG4 関連涙腺・唾液腺炎 (IgG4-DS) の診断における口唇腺および顎下腺部分生検の有用性. 第 22 回日本シェーグレン症候群学会学術集会. 大阪、2013. 9. 14
- 10) 古川祥子、森山雅文、田中昭彦、前原隆、坪井洋人、林田淳之將、大山恵子、太田美穂、住田孝之、中村誠司. IgG4 関連涙腺・唾液腺炎 (IgG4-DS) の病態形成における M2 マクロファージの関与. 第 22 回日本シェーグレン症候群学会学術集会. 大阪、2013. 9. 14
- 11) 山内昌樹、田中昭彦、森山雅文、川野真太郎、林田 淳之將、前原隆、古川祥子、太田美穂、中村誠司. IgG4 関連涙腺・唾液腺炎 (いわゆる Mikulicz 病) が疑われた悪性リンパ腫の 1 例. 第 58 回日本口腔外科学会総会・学術大会. 福岡、2013. 10. 12
- 12) 古川祥子、森山雅文、川野真太郎、田中昭彦、前原隆、林田淳之將、大山恵子、大山順子、森悦秀、中村誠司. Küttner 腫瘍と IgG4 関連涙腺・唾液腺炎 (いわゆる Mikulicz 病). 第 58 回日本口腔外科学会総会・学術大会. 福

岡、2013.10.12

- 13) 森山雅文、田中昭彦、前原隆、古川祥子、中村誠司. IgG4 関連疾患の病態形成における Th 細胞の関与 ～最近のトピックス「発症と自然免疫」も含めて～. 第 34 回 福岡臨床免疫研究会、福岡、2014.2.8
- 14) 前原隆、森山雅文、田中昭彦、林田淳之將篠崎昌一、久保慶朗、古川祥子、中村誠司. ミクリツ病の病態形成および IgG4 産生における IL-21 の関与. 第 21 回日本シェーグレン症候群学会、京都、2012.9.8
- 15) 森山雅文、前原隆、林田淳之將、田中昭彦、久保慶朗、中村誠司. IgG4 関連ミクリツ病の病態形成におけるサイトカインの関与. 第 6 回 IgG4 研究会、金沢、2012.3.3

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
なし

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 役職 教授 |
| 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 |
| | 福原貴太郎 | 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 |

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。我々はマウスモデルを用いてこれらの原因を探るとともに、ヒト IgG4 関連疾患における RAPL, Mst1 遺伝子のメチル化の関与を解析した。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 細胞機能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、健常者および慢性関節リウマチ患者と比較して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。

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。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、その病因をマウスモデルを用いて胸腺細胞の選択、制御性 T 細胞の異常を探る。また、IgG4 関連疾患における RAPL, Mst1 の異常の有無を明らかにする。RAPL, Mst1 遺伝子とともにプロモーター領域が CpG に富み、DNA メチル化される可能性がある。IgG4 関連疾患において Mst1, RAPL 遺伝子の DNA メチル化を検討する。

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。

(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)、慢性関節リウマチ患者 (20 名)、健常人 (10 名) を末梢血から DNA 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、Mst1 遺伝子について膵外病変 (唾液腺炎、後腹膜線維症、肺病変、縦隔リンパ節腫大など) を持つ患者群で健常者および慢性関節リウマチ患者に比較して有意

にメチル化が亢進していた。

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 Aire 陽性胸腺上皮細胞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も判明した。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、リンパ節の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示唆された。興味深いことに、慢性関節リウマチではメチル化の亢進は見られなかったことから、IgG4 関連疾患の病因・病態と直接関連する可能性もある。

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 細胞の抑制機能に重要であることがあきらかになった。また、膵外病変をもつ IgG4 関連疾患において MST1 遺伝子のメチル化が亢進していることから、エピジェネティックな要因による MST1 遺伝子の発現異常が IgG4 関連疾患に関係していることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tomiyama T, Ueda Y, Katakai T, Kondo N, Okazaki K, Kinashi T. Antigen-specific suppression and

- immunological synapse formation by regulatory T cells require the mst1 kinase. *PLoS one*. 8(9):e73874. 2013
2. Yamamoto-Taguchi N, Satou Y, Miyazato P, Ohshima K, Nakagawa M, Katagiri K, Kinashi T, Matsuoka M, HTLV-1 bZIP Factor Induces Inflammation through Labile Foxp3 Expression. *PLoS Pathog*. 9(9):e1003630. 2013
 3. Katakai T, Habiro K, Kinashi T. Dendritic Cells Regulate High-Speed Interstitial T Cell Migration in the Lymph Node via LFA-1/ICAM-1. *J Immunol* 191(3):1188-99. 2013
 4. Chung C, Kim T, Kim M, Kim M, Song H, Kim TS, Seo E, Lee SH, Kim H, Kim SK, Yoo G, Lee DH, Hwang DS, Kinashi T, Kim JM, Lim DS. Hippo –Foxa2 signaling pathway plays a role in peripheral lung maturation and surfactant homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 100:19:7732-37.2013
 5. 植田祥啓、木梨達雄 Mst1による胸腺細胞のインテグリン接着制御と選択機構 *医学のあゆみ* Vol. 247, No6, 565-566 2013
 6. 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*. 2;3:1098. 2012
 7. 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
 8. 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. Kinashi T., Kondo N., Single-Molecule Analysis of LFA-1/ICAM-1 Binding in Lymphocyte. Biophysical Society 58th Annual Meeting. the Moscone Center, San Francisco USA. 15th - 19th Feb, 2014.
 2. Kondo N., Ueda Y., Katakai T., Kinashi T., Live-imaging analysis of LFA-1/ICAM-1 and roles of Mst1 in immunological synapse formation using primary T lymphocytes第42回日本免疫学会学術集会 幕張メッセ 2013年12月11日-13日
 3. Ozawa M., Katakai T., Ueda Y., Lee S.I., Kinashi T., Crucial roles of Mst1 for antigen recognition during T cell-APC interactions. 第42回日本免疫学会学術集会 幕張メッセ 2013年12月11日-13日
 4. Kinashi T., Katakai T., Ueda Y., Kondo N., Regulation of Lymphocyte “Stop and Go” via LFA-1 and ICAM-1: Lymphocyte Trafficking Analysis using Live Imaging Techniques 第51回日本生物物理学会年会 京都国際会館 2013年10月29日
 5. Tomiyama T., Ueda Y., Katakai T., Habiro K., Kinashi T., 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 神戸国際会議場
 6. 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
 7. 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

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

なし