

## IgG4 関連疾患の胸郭内病変ならびに FDG-PET に関する検討

研究分担者 三嶋 理晃

京都大学大学院医学研究科・京都大学附属病院呼吸器内科 教授

研究要旨：研究 1 では、IgG4 関連疾患の胸郭内病変の特徴に関する検討を行った。胸郭内病変は中高年の男性に多く、胸部 CT では肺門縦隔リンパ節腫大の頻度が高かった。非喫煙者においても閉塞性障害を認める症例が存在した。5 例中 3 例がステロイド内服治療に反応し、2 例は経過観察にて安定していた。研究 2 では IgG4 関連疾患における FDG-PET の定量化を行い、その指標である total legion glycolysis (TLG) が活動性評価の新たな指標となりうる事、また TLG が血中 sIL-2R と相関する事を示した。

### A. 研究目的

研究①IgG4 関連疾患の胸郭内病変の特徴を明らかにする。

研究②IgG4 関連疾患において、<sup>18</sup>F-FDG-PET 取り込みを定量化し、治療による変化、血液マーカーとの関連を検討する。

### B. 研究方法

研究①京都大学で IgG4 関連疾患と診断された 16 症例を対象に、胸郭内病変の疫学と臨床、画像的特徴について検討した。

研究②京都大学で PET-CT を施行された IgG4 関連疾患 18 例を対象とした。FDG-PET 画像をワークステーションに読み込み、Metabolic Tumor Volume (病変の容積。MTV と略)、Total Lesion Glycolysis (MTV xSUVave で算出される病変容積内の SUV の総和。TLG と略)の各々を PET 指標として算出した。

(倫理面への配慮)

本研究は京都大学医の倫理委員会の承認を得て行った (承認番号 E2015)。

### C. 研究結果

研究① 胸郭内病変は 16 例中 5 例(31%)に認められ、男性 3 例、4 例が非喫煙者で、呼吸器症状は全例認めなかった。肺機能検査を施行した 3 例で拘束性障害は認めなかった一方、2 例で閉塞性肺機能障害を認め、1 例は非喫煙者であった。胸部 HRCT では、肺門縦隔リンパ節腫大 (BHL) スリガラス陰影、結節影、網状陰影、小葉間隔壁肥厚、気管支血管束肥厚が認められた。5 例中 3 例で全身ステロイド治療 (PSL 30-36mg/日) が行われ、1 例が寛解、2 例で胸郭内病変の改善を認めた。2 例は経過観察にて不変であった。

研究② FDG-PET で検出された病変部位は、肺門縦隔リンパ節(13 例)、後腹膜(6 例)、前立腺(5 例)が高頻度であった。軽度の肺病変 2 例、膵臓病変 1 例を除く全ての病変に取り込みを認めた。

MTV は  $220.3 \pm 270.7$  ml (median: 144.1 ml)、TLG は  $726.4 \pm 1094.2$  g (median: 450.1 g)であった。

TLG と各種血清マーカーとの相関をみた (Spearman's rank correlation test)。CRP、LDH との間に有意な相関はみられな

かった。一方、TLGとsIL-2R ( $\rho = 0.627$ 、 $p = 0.029$ )、IgG4値 ( $\rho = 0.605$ 、 $p = 0.012$ )との間には有意な相関を認めた。

FDG-PETの経時的な比較は6例で可能であった。ステロイド治療例では3例全例でTLGの低下が認められた。一方、無治療例では2例でTLGの上昇が認められ、1例では低下が認められた。

#### D. 考察

研究① 既報によると、IgG4関連疾患における胸郭内病変の頻度は14-54%で中高年の男性に多く、胸部画像所見は多彩であるが、肺門リンパ節腫大の頻度が40-90%と高い。気道病変によって閉塞性障害を呈する症例も報告されている。一般に全身ステロイド治療に対する反応性はよい。今回の対象症例は少数ではあるが、既報と同様の特徴が確認された。

研究② 本研究の結果、FDG-PETはIgG4関連疾患の罹患臓器検出において高い感度を有する事が確認された。TLGは血中IgG4と相関を認めない一方で、sIL-2Rと相関を認めた。これまでIgG4関連疾患におけるTLGの報告はなく、sIL-2Rの検討も限られているが、これらの指標はIgG4関連疾患の活動性の指標であると考えられた。

#### E. 結論

IgG4関連疾患の胸郭内病変は、多彩な肺機能検査、画像所見を呈する治療反応性良好な疾患である。FDG-PETから得られるTLGなどの指標は、IgG4関連疾患の活動性評価におけるあらたな指標となりうる事が示された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. 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. 22:21-30, 2012.
2. 半田知宏、三嶋理晃 : AIP 関連疾患の再認識 肺病変-間質性肺炎. 肝胆膵 64:91-95, 2012.

##### 2. 学会発表

1. Handa T, Nakatsuka Y, Nakamoto Y, Yoshihujii H, Tanizawa K, Ikezoe K, Sokai K, Nobashi T, Kubo T, Hirai T, Chin K, Togashi K, Mimori T, Mishima M. Evaluation of 18F-fluorodeoxyglucose uptake by positron emission tomography in IgG4 related disease. International symposium on IgG4-RD & Associated Conditions, Honolulu, USA, 2014. 2. 16
2. Matsui S, Yamamoto H, Minamoto S, Waseda Y, Mishima M, Kubo K. Proposal for diagnostic criteria for IgG4-related respiratory disease. International symposium on IgG4-RD & Associated Conditions, Honolulu, USA, 2014. 2. 17

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

##### 1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

なし

## IgG4 関連疾患のバイオマーカー探索

### IgG4 関連疾患における肝病変：自己免疫性肝炎例の解析

研究分担者 坪内 博仁 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 教授

研究分担者 井戸 章雄 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 教授

研究要旨：IgG4 関連疾患 (IgG4-RD) は、高 IgG4 血症と病変組織中の著明な IgG4 陽性形質細胞浸潤を特徴とする疾患である。診断困難症例や治療抵抗例などが存在し、臨床上問題点も多い。そこで、我々は、①プロテオミクスを用い、IgG4 関連全身疾患、特に AIP の新しい診断マーカーを探索し、AIP 治療前後でのフラクタルカインの発現について検討を行い、治療前後で変化を認め、活動性評価や治療効果予測に有用である可能性が示唆された。②当科において経験した IgG4-RD 11 例について検討した。また、当科において自己免疫性肝炎 (AIH) と診断された 49 例について血清 IgG4 値等について retrospective に検討を行った。IgG4-RD 11 例中 2 例 (18%) に肝病変 (IgG4 陽性形質細胞) を認めたが、血清トランスアミラーゼ値はこれら 2 例においては比較的 low 値であった。自己免疫性肝炎 49 例中 3 例 (6%) で血清 IgG4 高値 ( $\geq 135$  mg/dL) の症例を認めた。うち 1 例は肝組織所見でも IgG4-RD の診断基準をみたし、IgG4 関連自己免疫性肝炎であると考えられた。血液生化学検査値や治療導入後早期の治療反応性については IgG4 高値群と正常群の 2 群間において有意差は見られなかったが、血清 IgG4 高値の 3 例中 2 例においてステロイド減量中に自己免疫性肝炎の再燃がみられた。IgG4 陽性形質細胞の肝障害に寄与する影響など未だ不明な点が多く、治療反応性や長期経過におけるステロイドの適正量などについては更なる検討が必要と考えられた。

#### A. 研究目的

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

本研究の目的は、プロテオミクスを用い、IgG4 関連疾患 (IgG4-RD)、特に AIP の新しい診断マーカーを同定することである。また、AIP 治療前後でのフラクタルカイン

の変化について検討し治療評価マーカーとしての有用性を検討する。

また、以前より自己免疫性膵炎 (AIP) 例において多彩な病理組織所見を示す肝病変が存在することが知られており、また近年では自己免疫性肝炎 (AIH) においても IgG4 高値例を認めることが報告されているが、IgG4 関連疾患における肝病変の詳細については未だ不明である。

今回、当科において経験した IgG4-RD 症例 (11 例) を解析するとともに、自己免疫性肝炎 49 例における血清 IgG4 および肝組織における IgG4 陽性形質細胞につ

いて検討した。

## B. 研究方法

### 1. バイオマーカー探索

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

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

③AIP 治療前後，健常人におけるフラクタルカイン測定した。

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

### 2. IgG4 関連疾患における肝病変

①当科において経験した IgG4-RD 11 例について年齢，性別，血清 IgG 値，血清 IgG4 値，罹患臓器数，膵病変の有無，胆管病変の有無について検討を行った。また，膵病変を有する症例における膵 EUS-FNA の正診率についても検討を行った。

②2007 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 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。

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

b. 個人情報の管理:1) ID 番号，氏名，住所，電話番号などの個人を特定できる情報を除いたものを作製し，新たな番号を付与し，本研究にはこの番号のみを用い，個人が特定できる名前などを用いない。2) 対象者由来の血液サンプルは個人が同定できる情報を消去して，番号を付与する。

c. 対象者に理解を求め同意を得る方法: 担当医より，研究内容について説明を行ない，書面による同意を得る。

d. 研究等によって生じる個人への不利益: 静脈穿刺は侵襲性はほとんどなく，被験者に不当な危険が生じることはほとんどない。個人のプライバシーに関わる点については上記のように十分な配慮を行い，対象者の不利益が生じないようにする。

## C. 研究結果

### 1. バイオマーカー探索

①治療前後の AIP 患者血清を比較した結果，2660m/z，2861m/z，3239m/z，5900m/z のピーク蛋白で，治療後の有意なピーク強度低下が認められた。また，これらの治療前ピーク強度は治療前の IgG4 値とよく相

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

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

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

②プロテインアレイで示された自己抗体のうち、抗 EXOC3 抗体、抗 APIP 抗体、抗 WDR1 抗体が健常者と比較して AIP 患者で高い傾向にあったが、特発性膵炎患者、膵臓癌患者でも上昇しており、疾患特異性は認められなかった。

③健常人 (N=16)、AIP (N=10) について、フラクタルカイン測定を行い、健常人 FKN  $1.09 \pm 0.19$  (0.73 - 1.56) ng/mL、AIP 治療前 FKN  $0.91 \pm 0.19$  (0.58 - 1.24) ng/mL、治療後 FKN  $1.15 \pm 0.40$

(0.68 - 2.07) ng/mL と AIP 治療前は健常人よりも定値で治療により健常人レベルと同等であった。

## 2. IgG4 関連疾患における肝病変

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  $65.6 \pm 8.3$  歳、男性 6 例、血清 IgG  $2744 \pm 1127$  mg/dL、血清 IgG4  $805 \pm 486$  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  $58.2 \pm 13.9$  歳, 男性 4 例, ALT 値の平均は  $232 \pm 274$  IU/L, 血清 IgG  $2564 \pm 1083$  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 ( $\geq 135$  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 ( $\geq 135$  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

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

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

また, フラクタルカインについても症例数を増やし検討を継続していく。さらに当科で経験した診断確定に難渋し, 長期間の経過の間に全身に IgG4 陽性形質細胞浸潤を来し, 治療を行った。このような症例の経時的なサイトカイン, ケモカインなどの変化についても検討を予定している。

IgG4 関連疾患における肝病変の解析では, 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 ( $\geq 135$  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 ( $\geq 135$  mg/dL) 群 (n=3) と正常 ( $< 135$  mg/dL) 群 (n=46) の比較では、ALT, ALP,  $\gamma$ 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 ( $\geq 135$  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

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

唆された。

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. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Ohara H, Okazaki K, Tsubouchi H, Inui K, Kawa S, Kamisawa T, Tazuma S, Uchida K, Hirano K, Yoshida H, Nishino T, Ko SB, Mizuno N, Hamano H, Kanno A, Notohara K, Hasebe O, Nakazawa T, Nakanuma Y, Takikawa H. :Clinical diagnostic criteria of IgG4-related sclerosing cholangitis 2012. J Hepatobiliary Pancreat Sci19(5):536-42:2012.

##### 2. 学会発表

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

第 100 回日本消化器病学会九州支部例会,  
鹿児島市, 20121103

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  
該当なし

## 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関連疾患の疾患感受性遺伝子同定のため、758例のDNA検体を収集した。698例でゲノム網羅的なSNPタイピングを行い、自己免疫性膵炎(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た。HLA領域に複数の独立した関連を見出した他、非HLA領域に関連候補領域を同定した。未治療のAIP検体を用いた遺伝子発現解析及び代謝物解析によって、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。

#### 健常者対照群の網羅的ゲノム・オミックス情報の取得

疾患解析には、比較対象とする良質の対照群検体から得られる生命分子情報が不可欠である。そこで、京都大学医学研究科が滋賀県長浜市で行っている「ながはま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。ゲノムDNAについては、ゲノム網羅的な一塩基多型(SNP)解析を行うとともに(HumanOmni5MExome, Illumina社製)、エクソーム解析も実施した。RNAの発現量はAgilent社のアレイ(SurePrint G3 Human GE)を用いて解析した。また、血漿中の低分子代謝物の網羅的解析をガスクロマトグラフィー質量分析法(GC-MS法)で行った。得られたデータは、本事業での関連解析に利用した他、遺伝子変異データベースを構築し(厚生労働省難治性疾患克服研究事業「難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業の成果を基にした原因遺伝子変異データベースの構築」班長: 京都大学医学研究科 松田文彦)、データベースを一般公開することで広く研究者コミュニ

ニティに提供した。

#### IgG4関連疾患

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。

このうち26例については、網羅的オミックス解析のために経時的に検体を収集している(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。

これまでに698例でゲノム網羅的なSNPタイピングを、Illumina社製のHumanOmni5MExome, HumanOmni2.5MExomeを用いて行った。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(ながはま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。遺伝子上の非同義置換を抽出する解析パイプラインを構築し、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、健常者対照群および患者群のGC-MS測定と代謝物定量解析を実施した。

#### (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い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)(論文投稿準備中)。

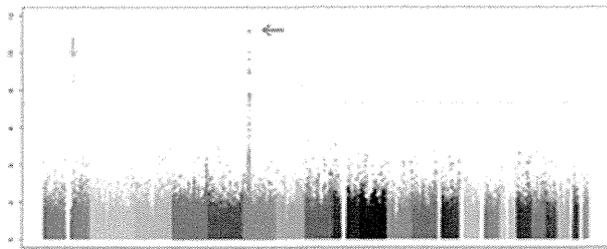


図1 IgG4のGWAS

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( $p = 1.0 \times 10^{-9}$ )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( $p = 3.0 \times 10^{-7}$ )。

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。

今後は既に収集しているAIP 334検体を用いて、同定された候補遺伝子領域のターゲットシーケンスを行い、これらの関連について再現性を検証する予定である。また、現在収集している遺伝子発現等のオミックス情報を基に、今回関連が示唆されたアミノ酸置換を伴う変異が、遺伝子の機能に及ぼす影響について精査していく予定である。

#### <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、遺伝子発現情報を解析した。健常者群300例を対照に比較解析を行った結果、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( $p < 1.2 \times 10^{-6}$ )。今後は介入前の検体を最大数まで増やし、結果の再現性検証を行うとともに、介入前、介入後の遺伝子発現量測定を進めた後、時系列解析を行い、これら遺伝子の予後予測マーカーとしての有用性について検討する予定である。

#### <GC-MSによる親水性低分子代謝物解析>

AIP 25例のステロイド治療前の採血で得られた血漿検体、健常者対照群302例の血漿検体を対象に、135種の血中代謝物濃度を測定した。2群間で比較検定(Student's t検定)を行った結果、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( $p < 1.0 \times 10^{-4}$ ) (論文投稿準備中)。これらの代謝物は、診断のためのバイオマーカー候補であると同時に、治療ターゲット、疾患プロセスの解明など幅広い応用が期待できる。

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。今後、更に検体数、測定代謝物の種類を増やすとともに、再発などの予後情報とも照合することで、各代謝物の予後予測マーカーとしての可能性を探る予定である。

### D. 考察

IgG4関連疾患は、免疫グロブリンのアイソタイプのうち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。今回、大規模な検体を用いたGWASにより、IgG4関連疾患にはHLA-ClassIIに加えHLA-

Class I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関連疾患がこれまで遺伝的解析が進んでいる他の自己免疫性疾患と共通の発症基盤を有していることも示唆している。本研究で示されたように、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的一方で、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

患者検体の網羅的ゲノム解析やエクソーム解析、メタボローム解析を実施し、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. 健康危険情報

なし

## G. 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-RodriguezL., 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., Siminovitch, 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Terao, C., Yoshifuji, H., Kimura, A., Matsumura, T., Ohmura, K., Takahashi, M., Shimizu, M., Kawaguchi, T., Chen, Z., Naruse, T. K., Sato-Otsubo, A., Eban, 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.
- 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.

8. Cui, J., Stahl, E. A., Saevarsdottir, S., Miceli, C., Diogo, D., Trynka, G., Raj, T., Mirkov, M. U., Canhao, H., Ikari, K., Terao, C., Okada, Y., Wedrén, S., Askling, J., Yamanaka, H., Momohara, S., Taniguchi, A., Ohmura, K., Matsuda, F., Mimori, T., Gupta, N., Kuchroo, M., Morgan, A. W., Isaacs, J. D., Wilson, A. G., Hyrich, K. L., Herenius, M., Doorenspleet, M. E., Tak, P. P., Crusius, J. B., van der Horst-Bruinsma, I. E., Wolbink, G. J., van Riel, P. L., van de Laar, M., Guchelaar, H. J., Shadick, N. A., Allaart, C. F., Huizinga, T. W., Toes, R. E., Kimberly, R. P., Bridges, S. L. Jr., Criswell, L. A., Moreland, L. W., Fonseca, J. E., de Vries, N., Stranger, B. E., De Jager, P. L., Raychaudhuri, S., Weinblatt, M. E., Gregersen, P. K., Mariette, X., Barton, A., Padyukov, L., Coenen, M. J., Karlson, E. W. and Plenge, R. M. (2013) Genome-wide association study and gene expression analysis identifies CD84 as a predictor of response to etanercept therapy in rheumatoid arthritis. *PLoS Genet.* **9**, e1003394.
9. Terao, C., Ohmura, K., Kawaguchi, Y., Nishimoto, T., Kawasaki, A., Takehara, K., Furukawa, H., Kochi, Y., Ota, Y., Ikari, K., Sato, S., Tohma, S., Yamada, R., Yamamoto, K., Kubo, M., Yamanaka, H., Kuwana, M., Tsuchiya, N., Matsuda, F. and Mimori, T. (2013) *PLD4* as a novel susceptibility gene for systemic sclerosis in a Japanese population. *Arthritis Rheum.* **65**, 472-480.
10. Myouzen, K., Kochi, Y., Okada, Y., Terao, C., Suzuki, A., Ikari, K., Tsunoda, T., Takahashi, A., Kubo, M., Taniguchi, A., Matsuda, F., Ohmura, K., Momohara, S., Mimori, T., Yamanaka, H., Kamatani, N., Yamada R., Nakamura, Y. and Yamamoto, K. (2012) Functional variants in *NFKBIE* and *RTKN2* involved in activation of the NF- $\kappa$ B pathway are associated with rheumatoid arthritis in Japanese. *PLoS Genet.* **8**, e1002949.
11. Terao, C., Ohmura, K., Ikari, K., Kochi, Y., Maruya, E., Katayama, M., Yurugi, K., Shimada, K., Murasawa, A., Honjo, S., Takasugi, K., Matsuo, K., Tajima, K., Suzuki, A., Yamamoto, K., Momohara, S., Yamanaka, H., Yamada, R., Saji, H., Matsuda, F. and Mimori, T. (2012) ACPA-negative RA consists of two genetically distinct subsets based on RF positivity in Japanese. *PLoS One* **7**, e40067.

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

#### 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

【学会発表】

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

H24-25 年度 総合分担研究報告書

### IgG4 関連疾患の病理診断についての検討

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

IgG4 関連硬化性胆管炎 (IgG4-SC) の診断における胆管生検の意義を検討するため、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必要である。

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)

IgG4 関連疾患 (IgG4-RD) の病理診断を行う際に、組織学的所見と共に免疫染色の結果が重要である。そのため、本邦の IgG4-RD 包括診断基準 2011 (本邦基準) では IgG4 陽性形質細胞 (IgG4<sup>+</sup>) 数 > 10/HFP かつ IgG4<sup>+</sup>/IgG 陽性細胞 (IgG<sup>+</sup>) 比  $\geq$  40% が、病理診断の consensus document (CD)

#### A. 研究目的

では臓器ごとに異なる IgG4<sup>+</sup>数かつ IgG4<sup>+</sup>/IgG<sup>+</sup>比 $\geq$ 40%が診断の際の基準として掲げられている。これら基準の妥当性を検討する目的で、連続する症例を用いて IgG4<sup>+</sup>数、IgG4<sup>+</sup>/IgG<sup>+</sup>比を検討した。

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。

## B. 研究方法

### 1) 免疫染色基準の妥当性の検討

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

### 2) 胆管生検の検討

癌の診断能を明らかにする目的で、倉敷中央病院で 2009 年 8 月以降に行わ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。

次に、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<sup>+</sup>数 $>$ 10/hpf、

3) 花筵状線維化、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。

### (倫理面への配慮)

この研究は倉敷中央病院病理検査科で、個人情報保護に配慮を払いながら行われた。この研究は診断目的で過去に得られた検査データを用いる後向き研究で、研究

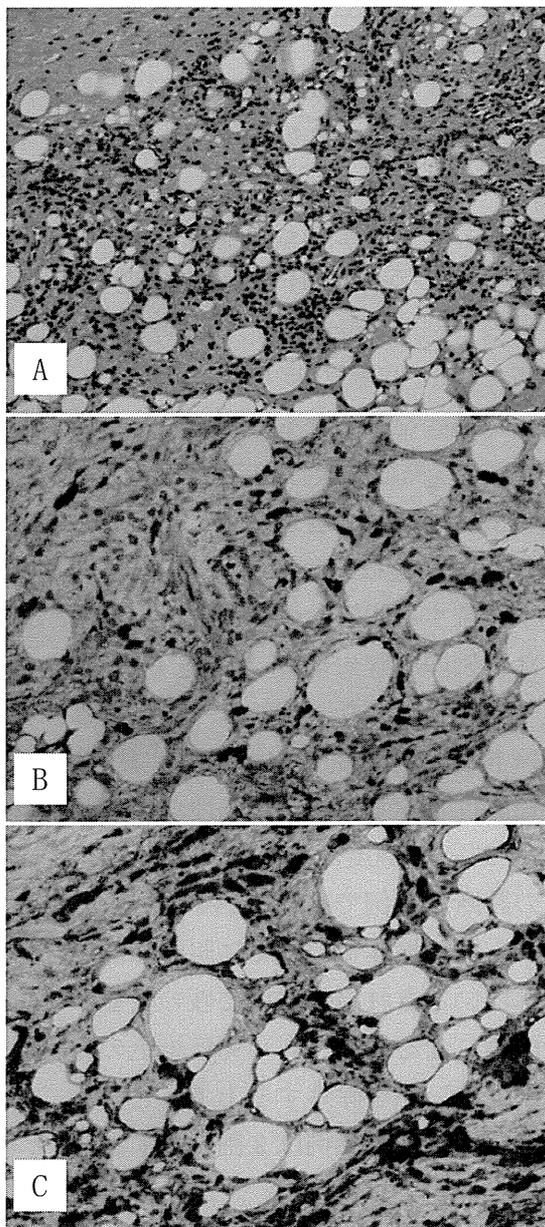


図 1. 後腹膜線維症. A. 花筵状線維化. このような所見はごく一部にみられるのみであった. B. IgG4 免疫染色. 陽性細胞を認めるが、決して多くはない. C. 同一部位の IgG 免疫染色. IgG4/IgG 陽性細胞比は低い.

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) 免疫染色基準の妥当性の検討

40病変のうち IgG4-RD は7例 (リンパ節3, 口唇腺2, 後腹膜2) であった. そのうち, 後腹膜線維症の2例 (開腹生検) は IgG4<sup>+</sup>数 34, 46 と比較的少なく, IgG4<sup>+</sup>/IgG<sup>+</sup>比はいずれも 30%以下と低値であった (図1). それ以外の病変は本邦基準, CDの両者を満たしていた. 33例の非 IgG4-RD ではリンパ節が14病変と最も多く, その他は様々な臓器であった. IgG4<sup>+</sup>数については本邦基準 (>10/hpf) を27病変が, CDを12病変が満たしていた. なかでもリンパ節14病変における IgG4<sup>+</sup>数は平均 81.7, 中央値 51.4 と多かった. IgG4<sup>+</sup>/IgG<sup>+</sup>比 >40% は9病変が満たしていた. IgG4<sup>+</sup>数と IgG4<sup>+</sup>/IgG<sup>+</sup>比の両者を満たすものは本邦基準で8病変, 国際コンセンサスで6病変あった. 後者の内訳は Castleman病3, 多発血管炎性肉芽腫症 (granulomatosis with polyangiitis; GPA) 2, 胸管嚢胞1で, 前者ではこれに加えて反応性リンパ節腫大1, 皮膚リンパ組織過形成1が含まれていた. GPAの2病変はいずれも, IgG4<sup>+</sup>数 >300/hpf, IgG4<sup>+</sup>/IgG<sup>+</sup>比 >100% と IgG4-RD と遜色ない結果であった (図2).

#### 2) 胆管生検の検討

癌の診断能の検討は, 連続する85検体が対象となった. 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.

IgG4-SCの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3). 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/hpf, 花筈状線維化が認めら

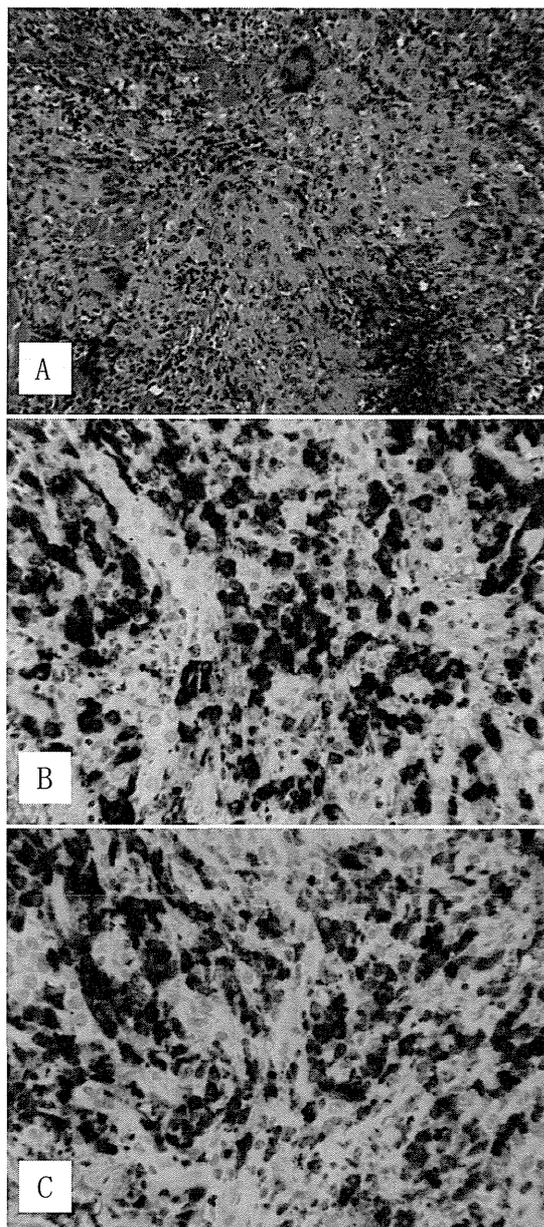


図2. Granulomatosis with polyangiitis. A. 中心に壊死を伴う肉芽腫性病変. 多核巨細胞も散見される. B. IgG4免疫染色にて, 極めて多数の陽性細胞を認める. C. 同一部位のIgG免疫染色. IgG4/IgG陽性細胞比も極めて高い.

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。

IgG4-SC の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 4)、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 5) 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みえて、化膿性炎症や 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付きにくく、また IgG4-SC の特徴である花筵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

##### 1) 免疫染色基準の妥当性の検討

IgG4-RD の病理診断においては IgG4 の免疫染色が重要な位置を占めるが、その評価方法には定まったものがなかった。免疫染色を IgG4<sup>+</sup>数のみで評価する方法があるが、著明な形質細胞浸潤をきたした炎症巣においては IgG4<sup>+</sup>も一定の割合で存在するため、IgG4<sup>+</sup>の絶対数も増加して偽陽性例が増える危険性がある。たとえば膵臓においては、2 型自己免疫性膵炎や膿瘍においても IgG4<sup>+</sup>数の増加が報告されている。また、IgG4<sup>+</sup>/IgG<sup>+</sup>比のみで評価すると、形質細胞数が少ない症例では必ずしも正確に評価できない可能性がある。このことから、本邦基準や CD では、IgG4<sup>+</sup>数および IgG4<sup>+</sup>/IgG<sup>+</sup>比の両者を必須とする基準が設けられている。

これら基準の妥当性を評価する目的で、連続する 40 病変の免疫染色の結果を検討した。IgG4-RD であるにもかかわらず

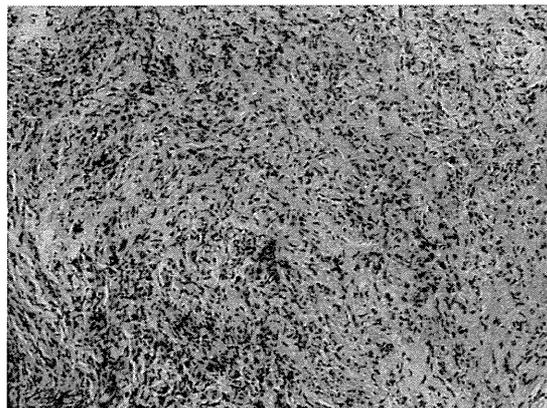


図 3. 生検による IgG4-SC 診断確定例。リンパ球、形質細胞の浸潤を伴う花筵状線維化が認められる (HE 染色)。

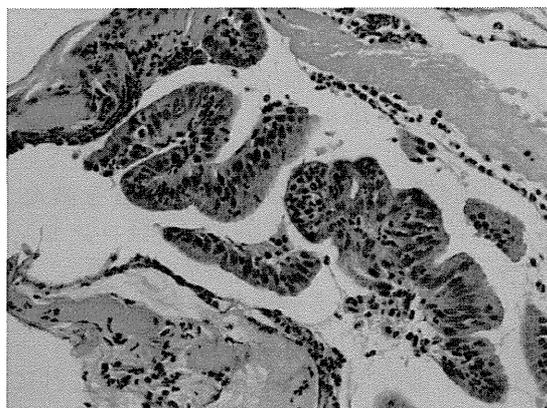


図 4. 上皮内に好中球浸潤をきたした胆管生検。臨床的には IgG4-SC であった (HE 染色)。

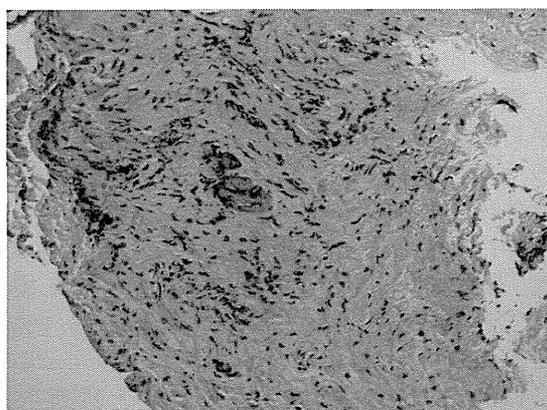


図 5. アーチファクトにより IgG4-SC の診断が困難であった症例。中心部の組織が挫滅している (HE 染色)。

ず、後腹膜線維症2病変はIgG4<sup>+</sup>数、IgG4<sup>+</sup>/IgG<sup>+</sup>比が低値となった。CDでは後腹膜線維症のIgG4<sup>+</sup>数の基準を>30/hpfと低く設定しているため、IgG4<sup>+</sup>数については問題にはならなかったが、IgG4<sup>+</sup>/IgG<sup>+</sup>比については本邦基準、CDの $\geq 40\%$ を満たさず、偽陰性となった。これは、後腹膜線維症では炎症の消退性変化が目立つことと関連があるように思われ、IgG4-RDの炎症が消退していくといずれの臓器でも同様のことが起こりえる可能性がある。

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

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

## 2) 胆管生検の検討

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<sup>+</sup>数、IgG4<sup>+</sup>/IgG<sup>+</sup>比はIgG4-RD以外でも増大し、免疫染色のみでIgG4-RDを診断することは危険である。また、後腹膜線維症のように、IgG4-RDでありながらこれらの基準を満たさない事例もあり、IgG4-RD

の診断基準を考える上で今後の課題となる。

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. 健康危険情報 なし

#### G. 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. Kanno A, Ishida K, Hamada S, Fujishima F, Unno J, Kume K, Kikuta K, Hirota M, Masamune A, Satoh K, Notohara K, Shimosegawa T. Diagnosis of autoimmune pancreatitis by EUS-FNA by using a 22-gauge needle based on the International Consensus Diagnostic Criteria. *Gastrointest Endosc* 76(3): 594-602, 2012.

11. 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. Recommendations for the nomenclature of IgG4-related disease and its individual organ system manifestations. *Arthritis Rheum* 64(10): 3061-3067, 2012.
12. Ohara H, Okazaki K, Tsubouchi H, Inui K, Kawa S, Kamisawa T, Tazuma S, Uchida K, Hirano K, Yoshida H, Nishino T, Ko SB, Mizuno N, Hamano H, Kanno A, Notohara K, Hasebe O, Nakazawa T, Nakanuma Y, Takikawa H. Clinical diagnostic criteria of IgG4-related sclerosing cholangitis 2012. *J Hepatobiliary pancreat Sci* 19(5): 536-542, 2012.
13. 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* 25(9): 1181-1192, 2012.
14. 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.
15. 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.
16. 能登原憲司. IgG4関連疾患の病理. *リウマチ科* 50(6): 661-668, 2013.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. 能登原憲司. 自己免疫性膵炎と膵外病変 (IgG4 関連疾患) の病理像. 林紀夫他編, *Annual Review 2013 消化器*. 中外医学社. 東京. 2013年. 229-237頁.
22. 能登原憲司. 胆道膵臓の線維化 研究の進歩 1型AIPの線維化と2型AIPの線維化の異同. *肝胆膵* 65(2): 337-342, 2012.
23. 能登原憲司. 自己免疫性膵炎における最近の知見 新しい診断基準の中での自己免疫性膵炎(1型・2型)の病理診断. *最新医学* 67(8): 1857-1863, 2012.
24. 能登原憲司. IgG4 関連疾患の診断 1型自己免疫性膵炎における線維化病変の特徴. *最新医学* 67(4): 965-970, 2012.
2. 学会発表
  1. Notohara K. Clinical validation of international consensus diagnostic