

DNA マイクロアレイによる IgG4 関連疾患の口唇唾液腺における遺伝子発現解析

担当責任者 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¹、中井雄治^{2,3}、飯塚麻菜¹、浅島弘充¹、高橋広行¹、廣田智哉¹、近藤裕也¹、
古川祥子⁴、田中昭彦⁴、森山雅文⁴、松本功¹、吉原俊雄⁵、中村誠司⁴、阿部啓子²
1：筑波大学医学医療系内科（膠原病・リウマチ・アレルギー）
2：東京大学大学院 農学生命科学研究科 3：弘前大学 食料科学研究所
4：九州大学大学院歯学研究院 口腔顎顔面病態学講座 顎顔面腫瘍制御学分野
5：東京女子医科大学医学部 耳鼻咽喉科学教室

研究要旨

我々は IgG4 関連疾患（IgG4-RD）の口唇唾液腺（LSG）において、健常人（HC）やシェーグレン症候群（SS）と比較して、IL-10、TGF β 、AID が高発現し、IgG4 クラススイッチ亢進や線維化に関与する可能性を示してきた。本研究では IgG4-RD の病態に関与する分子を網羅的に解析することを目的とした。IgG4-RD 包括診断基準（2011 年）で definite を満たす IgG4-RD（N=5、全例女性）、SS（N=5、全例女性）、HC（N=3、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い、IgG4-RD、SS、HC の遺伝子発現パターンを主成分分析で比較した。IgG4-RD と SS のペアワイズの比較を行い、IgG4-RD で相対的に発現増加、減少した遺伝子（発現変動遺伝子）（rank products 法、false discovery rate<0.05）を抽出した。DNA マイクロアレイとは別の IgG4-RD（N=9）、SS（N=10）、HC（N=4）の LSG より抽出した RNA を用いて、IgG4-RD で発現が増加していた発現変動遺伝子に関して定量 PCR による validation を行った。IgG4-RD の LSG における mRNA の発現増加が確認された CCL18 に関して、免疫蛍光二重染色（CCL18、CD68、CD20）で LSG におけるタンパクレベルでの発現解析と発現細胞の同定、IgG4-RD（N=2）、SS（N=1）、HC（N=1）における発現比較を行った。主成分分析では、IgG4-RD、SS、HC は互いに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 1771 プローブセット（1321 遺伝子）、減少した遺伝子は 1785 プローブセット（1320 遺伝子）抽出された（false discovery rate<0.05）。発現変動遺伝子の中から、rank 上位、発現量高値、ばらつきが少ない、機能（ケモカイン、免疫・炎症関連）の条件から 5 個の validation 候補遺伝子（CXCL12、CXCL14、CCL18、LTF、COLEC12）を抽出した。定量 PCR では、IgG4-RD において、LTF 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）。IgG4-RD の LSG では、多数の CD68 陽性マクロファージ、一部の CD20 陽性 B 細胞が CCL18 を産生していた。一方で、SS では CCL18 産生細胞はほとんど認めず、HC ではマクロファージ、B 細胞の浸潤は認めなかった。以上の結果から、IgG4-RD の病変局所で主にマクロファージが産生した CCL18 は、T 細胞、B 細胞の病変局所へのケモタキシス、線維化誘導を介して、IgG4-RD の病態形成に寄与する可能性が示唆された。本研究の DNA マイクロアレイでは、IgG4-RD の LSG における遺伝子発現のパターンは、SS とは異なっていた。IgG4-RD の LSG では CCL18、LTF が高発現し、病態形成に関与する可能性が示唆された。

A. 研究目的

我々は IgG4 関連疾患（IgG4-RD）の口唇唾液腺（LSG）において、健常人（HC）やシェーグレン症候群（SS）と比較して、IL-10、TGF β 、AID が高発現し、IgG4 クラススイッチ亢進や線維化に関与する可能性を示してきた（Tsuboi H et al. Arthritis Res Ther 2012, 14:R171）。本研究では IgG4-RD の病態に関与する分子を網羅的に解析することを目的とした。

B. 研究方法

1) IgG4-RD 包括診断基準（2011 年）で definite を満たす IgG4-RD（N=5、全例女性）、SS（N=5、全例女性）、HC（N=3、全例女性）の LSG（表 1）より抽出した RNA を用いて DNA マイクロアレイを行い、IgG4-RD、SS、HC の遺伝子発現パターンを主成分

分析で比較した。

2) IgG4-RD と SS のペアワイズの比較を行い、IgG4-RD で相対的に発現増加、減少した遺伝子（発現変動遺伝子）（rank products 法、false discovery rate<0.05）を抽出した。

3) DNA マイクロアレイとは別の IgG4-RD（N=9）、SS（N=10）、HC（N=4）の LSG より抽出した RNA を用いて、IgG4-RD で発現が増加していた発現変動遺伝子に関して定量 PCR による validation を行った。

4) 上記 3) で IgG4-RD の LSG における mRNA の発現増加が確認された CCL18 に関して、免疫蛍光二重染色（CCL18、CD68、CD20）で LSG におけるタンパクレベルでの発現解析と発現細胞の同定、IgG4-RD（N=2）、SS（N=1）、HC（N=1）における発現比較を行った。

(倫理面への配慮)

本研究内容に関しては、筑波大学附属病院臨床研究倫理審査委員会の承認を得ている。また、研究にご協力頂く患者さん、健康人ボランティアからは文書での同意を得ている。

C. 研究結果

- 1) 主成分分析では、IgG4-RD、SS、HC は互いに異なるクラスターを形成した (図 1)。
- 2) IgG4-RD で発現増加した遺伝子は 1771 プローブセット (1321 遺伝子)、減少した遺伝子は 1785 プローブセット (1320 遺伝子) 抽出された (false discovery rate<0.05) (表 2)。
- 3) 発現変動遺伝子の中から、rank 上位、発現量高値、ばらつきが少ない、機能 (ケモカイン、免疫・炎症関連) の条件から 5 個の validation 候補遺伝子 (CXCL12、CXCL14、CCL18、LTF、COLEC12) を抽出した (表 2)。定量 PCR では、IgG4-RD において、LTF 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 ($P<0.05$) (図 2)。
- 4) IgG4-RD の LSG では、多数の CD68 陽性マクロファージ、一部の CD20 陽性 B 細胞が CCL18 を産生していた。一方で、SS では CCL18 産生細胞はほとんど認めず、HC ではマクロファージ、B 細胞の浸潤は認めなかった。CCL18 を産生する CD68 陽性マクロファージの細胞数は、HC、SS と比較して、IgG4-RD では有意に増加していた ($P<0.05$) (図 3)。

D. 考察

Lactotransferrin (LTF) はミルク中に含まれる鉄結合タンパクで、抗細菌・抗ウイルス活性、抗ガン活性、創傷治癒、線維芽細胞増殖、骨形成等の幅広い生理的機能を有し、樹状細胞の成熟を誘導するとの報告もある。CCL18 は LPS、IL-10 等の刺激により、マクロファージ、樹状細胞から産生され、T 細胞、B 細胞のケモタキシス、線維芽細胞からのコラーゲン産生を誘導する。

IgG4-RD の LSG で高発現した LTF は線維芽細胞増殖、樹状細胞の成熟を介して、主にマクロファージが産生した CCL18 は、T 細胞、B 細胞の病変局所へのケモタキシス、線維化誘導を介して、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 マイクロアレイでは、IgG4-RD の LSG における遺伝子発現のパターンは、SS とは異なっていた。IgG4-RD の LSG では CCL18、LTF が高発現し、病態形成に関与する可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takahashi, H., Tsuboi, H., Ogishima, H., Yokosawa, M., Takahashi, H., Yagishita, M., Abe, S., Hagiwara, S., Asashima, H., Hirota, T., Umeda, N., Kondo, Y., Suzuki, T., Matsumoto, I., and Sumida, T. FDG-PET/CT can reveal subclinical prostatitis in a patient with IgG4-related disease. *Rheumatol.* (in press).
- 2) Furukawa, S., Moriyama, M., Tanaka, A., Maehara, T., Tsuboi, H., Iizuka, M., Hayashida, J-N, Ohta, M., Saeki, T., Notohara, K., Sumida, T., and Nakamura, S. Polarized M2 macrophage contributes to fibrosis in IgG4-related dacryoadenitis and sialadenitis, so-called Mikulicz' s disease. *Clini. Immunol.* (in press)
- 3) Funakubo, Y., Mimura, T., Tsuboi, H., Noma, H., Miyoshi, F., Yamamoto, K., and Sumida, T. Nationwide epidemiological survey of 169 patients with adult Still' s disease in Japan. *Mod. Rheumatol.* Nov 10:1-8, 2014. [Epub ahead of print]
- 4) Ebe, H., Tsuboi, H., Hagiya, C., Takahashi, H., Yokosawa, M., Hagiwara, S., Hirota, T., Kurashima, Y., Takai, C., Miki, H., Asashima, H., Umeda, N., Kondo, Y., Ogishima, H., Suzuki, T., Chino, Y., Matsumoto, I., and Sumida, T. Clinical features of patients with IgG4-related disease complicated with perivascular lesions. *Mod. Rheumatol.* 25(1):105-9, 2015.
- 5) Tsuboi, H., Nakai, Y., Iizuka, M., Asashima, H., Hagiya, C., Tsuzuki, S., Hirota, T., Miki, H., Hagiwara, S., Kondo, Y., Tanaka, A., Moriyama, M., Matsumoto, I., Nakamura, S., Yoshihara, T., Abe, K., and Sumida, T. DNA microarray analysis of labial salivary glands in IgG4-related disease. Comparison with Sjögren' s syndrome. *Arthritis Rheum.* 66(10):2892-9, 2014.
- 6) 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., Osika, T., and Sumida, T. Clinicopathological features of IgG4-related disease complicated with orbital involvements. *Mod. Rheumatol.* 24:471-476, 2014.

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

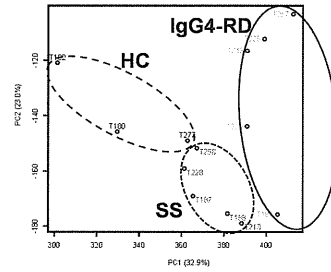
表1 DNAマイクロアレイに用いた口唇唾液腺の患者背景と病理組織学的所見

症例	サンプル番号	年齢(歳)	性別	血清IgG4 (mg/dl)	抗SS-A/B抗体(倍)	IgG4/IgG in LSG (%)	Greenspan grading	治療
IgG4-RD 1	T197	57	Female	543	-/-	80	n.d	None
IgG4-RD 2	T222	61	Female	492		67	n.d	None
IgG4-RD 3	T226	56	Female	499	-/-	79	n.d	None
IgG4-RD 4	T243	56	Female	562		83	n.d	None
IgG4-RD 5	T257	61	Female	512	-/-	83	n.d	None
SS 1	T187	22	Female	n.d	64/-	n.d	Grade 3	None
SS 2	T188	37	Female	n.d	64/32	n.d	Grade 3	None
SS 3	T213	43	Female	n.d	16/16	n.d	Grade 3	None
SS 4	T228	27	Female	n.d	64/-	n.d	Grade 3	None
SS 5	T258	36	Female	n.d	2/-	n.d	Grade 3	None
HC 1	T180	65	Female	n.d	-/-	n.d	n.d	None
HC 2	T182	38	Female	n.d	-/-	n.d	n.d	None
HC 3	T277	23	Female	n.d	-/-	n.d	n.d	None

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

図1 IgG4-RD, SS, HCのLSGにおける遺伝子発現比較

主成分分析(PCA; principal component analysis)



IgG4-RD; IgG4関連疾患, SS; シェーグレン症候群, HC; 健康人, PC; principal component

表2 IgG4関連疾患で発現増加した発現変動遺伝子 1321遺伝子 上位1~72遺伝子

Rank	Gene Symbol	FDR	Fold Change	Rank	Gene Symbol	FDR	Fold Change	Rank	Gene Symbol	FDR	Fold Change
1	SCGB2A2	0	4.76	25	MFAP5	0	2.38	49	EMP1	0	1.77
2	LTF	0	3.51	26	---	0	2.04	50	RNASE1	0	1.85
3	SERPINA3	0	3.69	27	FN1	0	2.02	51	CLEC9B // EXOSC7	0	1.83
4	ADH1B	0	2.95	28	COLEC12	0	1.94	52	COCH	0	1.69
5	DCN	0	2.76	29	EBF1	0	2.07	53	COL1A2	0	1.89
6	LEPR	0	2.87	30	PRRX1	0	2.13	54	SFRP4	0.00	1.85
7	CXCL12	0	2.69	31	MRC1	0	1.98	55	ADIRF	0.00	1.88
8	CFD	0	2.72	32	LUM	0	1.97	56	S100A2	0.00	1.80
9	SFRP2	0	2.90	33	HBB	0	2.83	57	CXCR7	0.00	1.90
10	CXCL14	0	2.46	34	LGR5	0	2.05	58	MYH2	0.00	2.25
11	FABP4	0	2.59	35	CPA3	0	2.01	59	DPYSL2	0.00	1.68
12	LYVE1	0	2.38	36	LHFP	0	1.92	60	ENPP2	0.00	1.79
13	PCOLCE2	0	2.32	37	FSLM1	0	2.00	61	CFH // CFHR1	0.00	1.64
14	LCN2	0	2.58	38	PDGFRA	0	1.85	62	CD109	0.00	1.81
15	HLA-DQB4	0	2.76	39	COL6A3	0	1.93	63	TGF2	0.00	1.67
16	SCGB1D2	0	3.18	40	SPP1	0	1.77	64	CAV1	0.00	1.66
17	FCER1A	0	2.19	41	COL14A1	0	1.87	65	ABCA6	0.00	1.55
18	RARRES1	0	2.45	42	---	0	1.94	66	ABNBP	0.00	1.64
19	PDK4	0	2.31	43	ADIPOQ	0	2.11	67	PLS3	0.00	1.61
20	MGP	0	2.42	44	ANGPTL1	0	1.85	68	PMP22	0.00	1.73
21	EFEMP1	0	2.12	45	THBS4	0	2.06	69	CYP11B1	0.00	1.47
22	ABCA8	0	2.24	46	CDC80	0	1.89	70	SEMA3C	0.00	1.60
23	GAS1	0	2.11	47	SCARA5	0	1.85	71	CCL18	0.00	1.62
24	FBN1	0	2.23	48	S100A4	0	1.93	72	GNMB	0.00	1.75

グレイ; Validation候補遺伝子(5個), FDR; false discovery rate

図2 定量PCRによるValidation

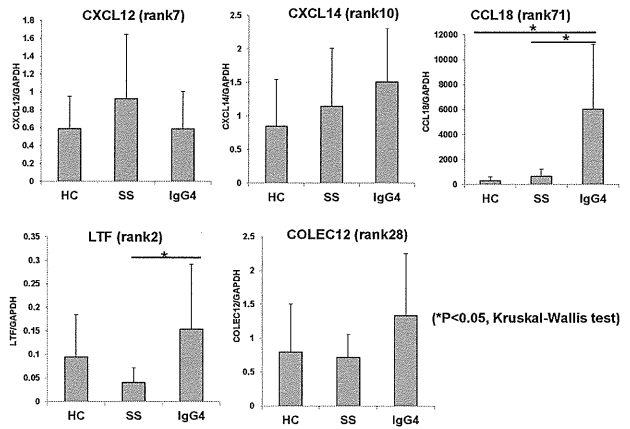
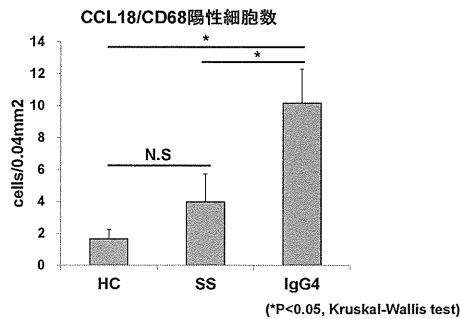


図3 口唇唾液腺におけるCCL18産生CD68陽性マクロファージ



健康人(HC)(N=1)、シェーグレン症候群(SS)(N=1)、IgG4関連疾患(IgG4-RD)(N=2)の口唇唾液腺(各3視野)において、CCL18、CD68がmergeした細胞数(cells/0.04mm²)をカウントした。

IgG4 関連疾患患者に於けるリンパ球フェノタイプと病態形成との関連に関する研究

担当責任者	田中 良哉	産業医科大学医学部第一内科学講座	教授
研究協力者	中山田 真吾	産業医科大学医学部第一内科学講座	講師
	平田 信太郎	産業医科大学医学部第一内科学講座	講師
	久保 智史	産業医科大学医学部第一内科学講座	助教

研究要旨

IgG4 関連疾患 (IgG4-RD) の発症過程では、T 細胞および B 細胞の活性化による過剰な IgG4 産生を介した多臓器障害が生ずるが、これらのリンパ球サブセットの分化と病態形成との関連性は不詳である。本研究では、T 細胞、B 細胞サブセットのバランス異常を介して IgG4 産生細胞への分化の偏向を誘導する過程を解明することを目的としている。本年度は、健常人 (8 例)、Umehara 基準で診断した IgG4-RD 患者 (8 例)、原発性シェーグレン症候群患者 (4 名) より末梢血を採取し、NIH/FOCIS による Human Immunology Project に基づき 8 カラーフローサイトメトリーで解析した。その結果、IgG4RD では CD19+B 細胞に於ける plasmablast の割合が特徴的に高いこと、末梢血に於ける濾胞性ヘルパー T 細胞 (Tfh) を含むエフェクター T 細胞の割合が高く、血清 IgG4 値、及び、抗体産生性 plasmablast 数と統計的に相関性を認めた。以上、これらの末梢血リンパ球サブセットの異常が IgG4-RD の免疫病態へ関与することが示唆された。

A. 研究目的

IgG4 関連疾患 (IgG4-RD) の発症過程では、T 細胞および B 細胞の活性化による過剰な IgG4 産生を介した多臓器障害が生ずるが、これらのリンパ球サブセットの分化と病態形成との関連性は不詳である。本研究では、T 細胞、B 細胞サブセットのバランス異常を介して IgG4 産生細胞への分化の偏向を誘導する過程を解明する。さらに、ステロイド抵抗例、再発例、分子標的治療前後でリンパ球フェノタイプの異常を解析し、疾患活動性や治療抵抗性に関わる細胞群を明らかにし、病態に応じたテイルーメイド治療の創出を最終目的とする。

B. 究方法

健常人 (8 例)、Umehara 基準で診断した IgG4-RD 患者 (8 例)、原発性シェーグレン症候群患者 (pSS; 4 名) より末梢血を採取し、NIH/FOCIS による Human Immunology Project Consortium (HIPC) に基づく、8 カラーフローサイトメトリー (FACSVerse) 解析を実施し、T 細胞、B 細胞のケモカイン受容体による細分画を試み、リンパ球フェノタイプと患者背景、血清 IgG、IgG4、CRP などの臨床的パラメータとの関連性を検討した。

(倫理面への配慮)

臨床検体を使用する場合には、所属機関の倫理委員会、或は、IRB で承認を得た研究に限定し、患者からインフォームドコンセントを得た上で、倫理委員会の規約を遵守し、所属機関の現有設備を用いて行う。患者の個人情報が入所機関外に漏洩せぬよう、試料や解析データは万全の安全システムをもって厳重に管理し、人権擁護に努めると共に、患者は、経済的負担を始め如何なる不利益や危険性も被らない

事を明確にする。

C. 研究結果

①IgG4-RD 患者背景 (平均±SD) は、年齢 56 ± 20 歳、罹病期間 16 ± 19 ヶ月、血清 IgG4 628 ± 549 mg/dl、CRP 1.27 ± 2.58 mg/dl で、全例で血清 IgG4 が上昇し、肺、腎、後腹膜、唾液腺などの臓器病変が存在した。②健常人、IgG4-RD、pSS 患者末梢血での古典的ヘルパー T 細胞サブセット (Th1, Th2, Th17)、B 細胞サブセット、樹状細胞サブセットの割合については、3 疾患の間で特徴的な差異を認めなかった。③一方、IgG4-RD 患者末梢血では、CD3+CD4+CCR7-CD45RA+ エフェクター T 細胞、CD3+CD4+CXCR5+ICOS+濾胞性ヘルパー T 細胞 (Tfh)、CD19+CD27+CD20-CD38+抗体産生性 plasmablast の割合が、健常人や pSS に比し有意に高かった。④IgG4-RD 患者末梢血の CD3+CD4+CCR7-CD45RA+ エフェクター T 細胞の割合は、末梢血に於ける IgG4 陽性細胞/IgG 陽性細胞比と有意に相関した。⑤クラスター統計解析により CD3+CD4+CCR7-CD45RA+ エフェクター T 細胞と CD19+CD27+CD20-CD38+抗体産生性 plasmablast の割合が相関性を示し、さらにこれらは血清 IgG、IgG4 値とも有意に正相関した。

D. 考察

IgG4-RD の病態は、Th2 細胞や B 細胞を起点とする IgG4 産生性 plasmablast の関与が想定されてきたが、その詳細は不明であった。今回の検討により、IgG4-RD 患者末梢血では、エフェクター T 細胞や Tfh 細胞、抗体産生性 plasmablast の割合が増加しており、これらの細胞群が相互に作用しながら、組織に於ける IgG4 産生性細胞の集積に関与することが示唆

された。もつとも末梢血は病態の一角を示すに過ぎず、リンパ組織等の病態組織でのこれらのリンパ球の解析が必要である。しかし、Tfh細胞/plasmablastの機能的連関を媒介する細胞内外のシグナル伝達異常が特定されることで、例えば、CTLA4-Ig アバタセプト等を用いた T 細胞標的治療の応用を始め、そのシグナル制御による新規治療法の開発が期待される。現在、これらの細胞集団と臨床病態、治療前後での変化との関連性を検討中である。

E. 結論

IgG4-RD では、末梢血に於ける Tfh 細胞を含むエフェクター T 細胞の割合が高く、血清 IgG4 値、及び、抗体産生性 plasmablast 数と統計的に相関性を認めた。また、CD19+B 細胞に於ける plasmablast の割合が特徴的に高かった。以上、これらの末梢血リンパ球サブセットの異常が IgG4-RD の免疫病態へ関与す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) Iwata S, Nakayamada S, Fukuyo S, Kubo S, Yunoue N, Wang S-P, Yoshikawa M, Saito K, Tanaka Y. Activation of Syk in peripheral blood B cells in patients with rheumatoid arthritis: A potential target for abatacept therapy. *Arthritis Rheum* [Epub ahead of print]
- 2) Iwata S, Yamaoka K, Niino H, Jabbarzadeh-Tabrizi S, Wang S-P, Kondo M, Yoshikawa M, Akashi K, Tanaka Y. Increased Syk phosphorylation leads to overexpression of TRAF6 in peripheral B cells of patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* (in press)
- 3) Kondo M, Yamaoka K, Sakata K, Sonomoto K, Lin L, Nakano K, Tanaka Y. IL-6/STAT3 signaling pathway contributes to chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Arthritis Rheum* [Epub ahead of print]
- 4) Tanaka Y, Hirata S, Kubo S, Fukuyo S, Hanami K, Sawamukai N, Nakano K, Nakayamada S, Yamaoka K, Sawamura F, Saito K. Discontinuation of adalimumab after achieving remission in patients with established rheumatoid arthritis: 1-year outcome of the HONOR study. *Ann Rheum Dis* [Epub ahead of print]
- 5) Ishizaki J, Saito K, Nawata M, Mizuno Y, Tokunaga M, Sawamukai N, Tamura M, Hirata S,

Yamaoka K, Hasegawa H, Tanaka Y. Low complements and high titer of anti-Sm antibody as predictors of histopathologically proven silent lupus nephritis without abnormal urinalysis in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* [Epub ahead of print]

- 6) Tanaka Y, Martin Mola E. IL-6 targeting compared to TNF targeting in rheumatoid arthritis: studies of olokizumab, sarilumab and sirukumab. *Ann Rheum Dis* (2014) 73, 1595-1597
- 7) Kubo S, Yamaoka K, Kondo M, Yamagata K, Zhao J, Iwata S, Tanaka Y. The JAK inhibitor tofacitinib reduces the T cell stimulatory capacity of human monocyte-derived dendritic cells. *Ann Rheum Dis* (2014) 73, 2192-2198
- 8) Wang S-P, Iwata S, Nakayamada S, Sakata K, Yamaoka K, Tanaka Y. Tofacitinib, a Jak inhibitor, inhibits human B cell activation in vitro. *Ann Rheum Dis* (2014) 73, 2213-2215

2. 学会発表

- 1) S Hirata, S Nakayamada, S Kubo, N Yunoue, M Yoshikawa, K Nakano, K Yamaoka, K Saito, Y Tanaka. Characteristic phenotype of peripheral blood lymphocytes in patients with IgG4-related disease, comparing to primary Sjögren syndrome and healthy donors. 2014 American College of Rheumatology Annual Meeting, Boston, USA, 平成 26 年 11 月 14-19 日
- 2) 平田信太郎、中山田真吾、久保智史、湯之上直樹、好川真以子、齋藤和義、田中良哉. IgG4 関連疾患患者における末梢血免疫細胞サブセットの解析：原発性シェーグレン症候群患者および健康人との比較検討。第 23 回日本シェーグレン症候群学会，長崎，平成 26 年 9 月 12-13 日
- 3) 鳥本桂一、岡田洋右、新生忠司、黒住 旭、成澤 学、山本 直、森 博子、田中良哉. Basedow 病型 IgG4 甲状腺炎の臨床的特徴に関する検討。第 14 回日本内分泌九州地方会，佐賀，平成 26 年 8 月 23 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

IgG4 関連疾患の病態形成におけるマスト細胞の関与に関する研究

担当責任者 吉野 正 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 病理学（教授）
研究協力者 佐藤 康晴 岡山大学大学院保健学研究科 病態情報科学（准教授）

研究要旨

IgG4 関連疾患の病変部において Th2 および Treg サイトカインの発現が亢進している事が知られており、病態形成機序に重要な役割を果たしていると考えられている。これらサイトカインが、リンパ球や形質細胞の浸潤、IgG4 産生、線維化、好酸球浸潤、高 IgE 血症などの特徴的な所見を形成していると推測されている。従来は T 細胞自体がこれらのサイトカインを産生していると考えられていたが、近年様々な細胞がサイトカインを産生する候補として挙げられている。我々の研究において、これらサイトカインがマスト細胞によって産生されている可能性が示唆された。

A. 研究目的

IgG4 関連疾患の病変部では IL4 や IL13 といった Th2 系サイトカインと IL-10 や TGFbeta といった Treg 系サイトカインが upregulation していることが知られている。これらサイトカインは T 細胞が産生されていると考えられているが、T 細胞のみが産生するとするには説明がつかない現象が多くある。さらには、現時点において T 細胞がこれらサイトカインを産生していると明らかにした報告は見受けられない。そこでサイトカイン産生細胞を同定する目的で解析を行った。

B. 研究方法

IgG4 関連顎下腺炎を対象とし、そのコントロール群として唾石症および口腔癌等で廓清された正常顎下腺をもちいた。これらのサンプルを免疫染色、パラフィン材料から RNA を抽出し RT-PCR にて既述の Th2 および Treg 系サイトカインの定量をおこなった。（倫理面への配慮）

今回の研究で用いたサンプルは、すべて病理検査用に採取され診断後の残余検体をもちいた。加えて岡山大学倫理審査委員会にて審査、承認後に研究を開始した。

C. 研究結果

IgG4 関連顎下腺炎においては、IL4, IL10, IL13 および TGFbeta の各種サイトカイン陽性細胞がコントロール群に比して統計学的に有意に増加していた。また、RT-PCR による各種サイトカインの mRNA の定量においても有意差をもってコントロール群よりも高い傾向にあった。

免疫蛍光二重染色において、いずれのサイトカイン陽性細胞も c-kit に陽性を示しており、マスト細胞が産生していると考えられた。

今回の研究では意義は明らかにすることは出来なかったが、IgG4 関連顎下腺炎において、これまでの報告と同様に統計学的に有意に Treg 細胞の増加が認められた。

D. 考察

マスト細胞は従来 1 型アレルギーに関与することで有名であり、IgE と結合する事でヒスタミンを放出する事がよく知られているが、近年では各種のサイトカインを産生する役割も広く知られるようになり、幅広い免疫反応の経路で重要な役割を果たしていると考えられている。我々の検討では IgG4 関連疾患の病態形成機序において重要と考えられる IL4, IL-10, IL-13, TGFβ1 といった Th2/Treg サイトカインの産生をマスト細胞が行っている可能性が示唆された。主に IgG4 関連疾患の罹患者にアレルギー疾患の多い事や高 IgE 血症が多い事がこれまで知られており、これらのアレルギー反応や高 IgE 血症がマスト細胞の Th2/Treg サイトカイン産生を亢進させる原因となる可能性が考えられる。興味深い事に IgG4 関連疾患で IgE の免疫染色を行うとマスト細胞の細胞膜のみでなく細胞質にも陽性に見えるような強陽性細胞が多く見られる事が分かり、これはコントロール群では全く見られない現象であった。これは IgG4 関連疾患においてマスト細胞が IgE を介する過剰な刺激を受けている可能性を示唆する結果と考えられる。IgG4 関連疾患とアレルギー反応の関連性については現在 controversial な状態であるが、少なくとも今回の結果ではマスト細胞がこれらのアレルギー反応とサイトカイン産生を繋ぐ役割を果たしている可能性が示唆される。

E. 結論

今回の研究において、IgG4 関連疾患の病態形成に重要とされているサイトカイン産生にマスト細胞が関与している可能性が示唆された。今後は T 細胞とマスト細胞の関連性やアレルギーを引き起こす抗原の関与、T 細胞自体のサイトカイン産生について検討する必要があると考える。

F. 健康危険情報

特記すべきものなし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takeuchi M, Sato Y, Ohno K, Tanaka S, Takata K, Gion Y, Orita Y, Ito T, Tachibana T, Yoshino T. T helper 2 and regulatory T cell cytokine production by mast cells: A key factor in the pathogenesis of IgG4-related disease. Mod Pathol 2014; 27(8): 1126-1136.
- 2) Takeuchi M, Ohno K, Takata K, Gion Y, Tachibana T, Orita Y, Yoshino T, Sato Y. Interleukin 13-positive mast cells are increased in immunoglobulin G4-related sialadenitis. Sci Rep 2015; 5: 7696.
- 3) Takeuchi M, Sato Y, Yasui H, Ozawa H, Ohno K, Takata K, Gion Y, Orita Y, Tachibana T, Itoh T, Asano N, Nakamura S, Swerdlow SH, Yoshino T. Epstein-Barr virus-infected cells in IgG4-related lymphadenopathy with comparison to extranodal IgG4-related disease. Am J Surg Pathol. 2014; 38(7): 946-955.

2. 学会発表

- 1) 佐藤康晴、吉野 正. IgG4 関連疾患 vs リンパ増殖性疾患. 第 103 回日本病理学会総会コンパニオンミーティング. 平成 26 年 4 月 24 日～26 日. 於・広島
- 2) 竹内真衣、佐藤康晴、吉野 正. IgG4 関連疾患：病態形成メカニズム解明へのアプローチ. 第 103 回日本病理学会総会コンパニオンミーティング. 平成 26 年 4 月 24 日～26 日. 於・広島
- 3) 大野京太郎、佐藤康晴、吉野 正. IgG4 関連疾患は発がんリスクになり得るか？ 第 103 回日本病理学会総会コンパニオンミーティング. 平成 26 年 4 月 24 日～26 日. 於・広島
- 4) 竹内真衣、佐藤康晴、安井 寛、小沢広明、大野京太郎、高田尚良、浅野直子、中村栄男、吉野 正. IgG4 関連疾患における Epstein-Barr virus (EBV) の再活性化についての検討. 第 103 回日本病理学会総会. 平成 26 年 4 月 24 日～26 日. 於・広島
- 5) 明井孝弘、佐藤康晴、大野京太郎、竹内真衣、吉野 正. IgG4 関連疾患リンパ節症におけるサイトカイン陽性細胞の分布. 第 103 回日本病理学会総会. 平成 26 年 4 月 24 日～26 日. 於・広島

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

特記すべきものなし

2. 実用新案登録

特記すべきものなし

3. その他

特記すべきものなし

結膜 MALT リンパ腫における IgG4 陽性細胞に関する研究

担当責任者 後藤 浩 東京医科大学医学部医学科眼科学分野 主任教授

研究要旨

結膜に発生したリンパ増殖性疾患における IgG4 陽性細胞の浸潤の有無について検討した。対象は結膜粘膜関連リンパ組織(MALT)リンパ腫 54 例、反応性リンパ組織過形成(RLH)8 例、濾胞性リンパ腫 3 例で、MALT リンパ腫 2 例、RLH 2 例で IgG4(+)/IgG(+)細胞比が 40%以上を示した。また、MALT リンパ腫 5 例において IgG4(+)/IgG(+)細胞比が 10%-40%と上昇していた。

結膜のリンパ増殖性疾患、なかでも MALT リンパ腫と IgG4 関連眼疾患の鑑別は慎重に行う必要がある。

A. 研究目的

IgG4 関連眼疾患は、涙腺のみならず様々な眼組織に発症することが知られている。しかし、結膜における IgG4 関連疾患の報告は極めて少ない。結膜を主座としたリンパ増殖性疾患における IgG4 陽性細胞の浸潤の有無について検討した。

B. 研究方法

対象は 2005 年から 2014 年に東京医大眼科で切除生検術を行い、確定診断に至ったリンパ増殖性疾患 65 例で、その内訳は結膜粘膜関連リンパ組織(MALT)リンパ腫 54 例、反応性リンパ組織過形成(RLH)8 例、濾胞性リンパ腫 3 例である。各症例のパラフィン包埋切片を用いて IgG4(+)/IgG(+)細胞比を検討し、可能であった症例については血清 IgG4 値の測定を行った。

(倫理面への配慮)

今回の研究内容自体は通常の診療業務範囲内で得られたデータの後ろ向き解析ではあるが、研究の施行に関しては全例、受診時に包括同意書を取得している。

C. 研究結果

病理組織学的には、MALT リンパ腫 2 例、RLH 2 例において、200 倍 1 視野以上で IgG4(+)/IgG(+)細胞比が 40%以上であった。また、MALT リンパ腫 5 例において IgG4 関連疾患包括診断基準は満たさないものの、IgG4(+)/IgG(+)細胞比が 10%-40%と上昇していた。血清 IgG4 値は測定した 32 例中 2 例で 152mg/dl、296mg/dl と高値を示したが、他の症例は正常範囲内であった。血清 IgG4 高値の 2 例はいずれも MALT リンパ腫であり、IgG4(+)/IgG(+)細胞比は 1%と 80%であった。

D. 考察

最近、本邦で実施された多施設調査研究 (Japanese Study Group: Jpn J Ophthalmol 57: 573-579, 2013)によれば、眼窩におけるリンパ増殖

性疾患 1,014 症例のうち、最も多くを占めていたのは MALT リンパ腫 404 例(39.8%)で、IgG4 関連眼疾患は 219 例(21.6%)であった。また、IgG4 陽性細胞の浸潤が包括診断基準を満たしている MALT リンパ腫も 44 例(4.3%)存在することが明らかにされた。新しく作成された IgG4 関連眼疾患の診断基準 (Goto H, Takahira M, Azumi A; Japanese Study Group for IgG4-Related Ophthalmic Disease. Jpn J Ophthalmol 59:1-7, 2015.)にも、IgG4 関連眼疾患と MALT リンパ腫との鑑別については注意喚起が促されているが、治療法が根本的に異なる 2 つの病態の混在については、厳密な鑑別診断が求められる。

今回、ごく少数例ではあるが、結膜に発生した MALT リンパ腫の中にも、多数の IgG4 陽性細胞の浸潤を認める症例が存在することが明らかとなった。結膜のリンパ増殖性疾患では眼窩や涙腺組織の場合と異なり、採取可能な組織の量に限りがあるため、サザンブロッティングによる免疫グロブリン遺伝子再構成の確認やフローサイトメトリーなどによる検索が十分に実施できないこともあるが、IgG4 陽性細胞の浸潤のみを根拠に(IgG4 関連眼疾患と)診断することの危険性について認識しておくことが重要であり、臨床経過も合せた経過観察の必要性があると考えられる。

E. 結論

結膜リンパ増殖性疾患では IgG4 陽性細胞の浸潤がみられることがあり、特に MALT リンパ腫と IgG4 関連眼疾患の異同については慎重に判断する必要がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Goto H, Takahira M, Azumi A; Japanese Study Group for IgG4-Related Ophthalmic Disease. Diagnostic criteria for IgG4 related

ophthalmic disease. Jpn J Ophthalmol
59:1-7, 2015.

2. 学会発表

- 1) 上田俊一郎, 後藤 浩, 木村圭介, 馬詰和比古, 柴田元子. 長尾俊孝結膜リンパ増殖性疾患における IgG4 陽性細胞の有無. 第 32 回日本眼腫瘍学会, 浜松市プレスタワー. 2014 年 7 月 11 日.
- 2) 後藤 浩, 上田俊一郎, 小竹 聡, 松林 純, 長尾俊孝, 関 文治. 15 年間にわたり眼内腫瘍と診断されていた IgG4 関連眼疾患. 第 32 回日本眼腫瘍学会, 浜松市プレスタワー. 2014 年 7 月 11 日.
- 3) 後藤 浩, 馬詰和比古, 上田俊一郎: 長期経過の後に重篤な眼症状を呈した IgG4 関連眼疾患の 2 症例. 第 29 回日本眼窩疾患シンポジウム, 浜松市プレスタワー. 2014 年 7 月 12 日.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし

IgG4 関連腎臓病における間質線維化に関する研究

担当責任者 川野 充弘 金沢大学附属病院リウマチ・膠原病内科 講師
研究協力者 原 怜史 金沢大学附属病院リウマチ・膠原病内科 医員

研究要旨

IgG4 関連腎臓病 (IgG4-related kidney disease: IgG4-RKD) は組織学的に、IgG4 陽性形質細胞浸潤による尿細管間質性腎炎を特徴とするが、病期が進行した場合、浸潤したリンパ球形質細胞を取り囲む形状の Bird' s-eye pattern fibrosis (storiform fibrosis) と称される特異な間質線維化を呈する。その線維形成には病変の分布と質が重要な因子と考えられるが、通常行われる腎生検ではサンプル量に限界があり十分な解析ができなかったため、我々は IgG4-RKD の剖検例を用いて間質線維化の特徴的分布と組成を明らかにした。病変は同一症例の同一腎の中で stage が heterogeneous に混在する。病変は主に皮質と動脈周囲に分布しており、特に中型血管（弓状動脈や小葉間動脈、静脈）周囲の分布は剖検例で初めて確認した特徴である。特徴的な細胞外基質成分として、動脈周囲及び神経周囲病変では collagen type I を含んでおり、一方皮質領域では collagen type IV がみられた。Bird' s-eye pattern fibrosis は皮質領域のみに観察される病変で、collagen type IV を有し、一方 collagen type I が殆ど含まれないことが特徴的であった。これらの結果から、IgG4-RKD に特徴的な間質線維化は線維性 collagen のみならず間質型 collagen を豊富に含む sclerosing fibrosis であるといえる。線維の質が皮質と動脈周囲とは異なっていることから、線維形成過程が解剖学的分布によって異なる可能性があり、今後のさらなる解析を要する。

A. 研究目的

IgG4 関連腎臓病 (IgG4-related kidney disease: IgG4-RKD) は組織学的に、IgG4 陽性形質細胞浸潤による尿細管間質性腎炎を特徴とするが、病期が進行するに従い、浸潤したリンパ球形質細胞を取り囲む形状の Bird' s-eye pattern fibrosis (storiform fibrosis) と称される間質線維化を呈する。この線維化は他の尿細管間質性腎炎による線維化にはみられない特異な病理所見であるが、その病態は明らかではない。この線維形成には病変の分布と質が重要な因子と考えられるが、通常行われる腎生検ではサンプル量に限界があり十分な解析ができなかった。今回我々は IgG4-RKD の剖検例を用いて間質線維化の特徴的分布と組成を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

IgG4-RKD の剖検症例 5 例 (金沢大学附属病院、長岡赤十字病院、長岡中央病院、虎ノ門病院、岡山大学附属病院の各 1 例ずつ) を用いた。通常の組織染色 (HE、PAS、PAM、マッソントリクローム、EVG 染色) に加えて IgG4、CD138、collagens (type I, III, IV, V and VI)、fibronectin (FN)、alpha-smooth muscle actin (α -SMA) の免疫染色を施行した。IgG4-RKD の病変を進展度 (stage A-D) および局在 (被膜下、皮質、血管周囲、神経周囲、髄質) によって分類し、バーチャルスライドの同期機能を用いて進展度/局在によって特徴的な成分を検討した。

(倫理面への配慮)

個人情報保護の観点から、患者情報・臨床情報は匿名化し、厳重に管理した。

C. 研究結果

臨床的特徴としては全例男性で、平均年齢 76.6 歳 (70-82 歳) であった。診断から死亡までの期間は平均 63.2 ヶ月 (1-108 ヶ月)。診断時の血清 IgG4 値は平均 1,284 mg/dL (319-1,750) と全例で上昇していた。低補体血症は 5 例中 4 例 (80%) にみられた。腎外病変は全例でみられ、多くみられた臓器として脾 3 例、唾液腺 4 例であった。2 例にはステロイド維持治療 (プレドニゾン 5mg/日) が行われており、別の 2 例は担癌のため抗癌剤治療を受けていた。死因は敗血症、突然死、非閉塞性腸管虚血症、癌死 (肺癌、mucinous cyst adenocarcinoma of the appendix) であった。

病理学的特徴として、5 例中 4 例が IgG4-RKD 診断基準を満たし (IgG4 陽性形質細胞数 78 ± 14 /hpf, IgG4/CD138 比 $82 \pm 11\%$)、残る 1 例は長期のステロイド治療が施行されていた。5 例中 2 例に Stage C (Bird' s-eye pattern fibrosis) を認め、閉塞性静脈炎はみられなかった。全例に中型動脈 (弓状動脈や小葉間動脈) や静脈周囲にリンパ球形質細胞浸潤または線維化を認めた。どの症例も同一腎の中に様々な stage が混在し、heterogeneous な分布を呈していた。免疫組織学的解析の結果、Stage B 及び D では collagen type III, VI と FN が局在に関係なく共通して存在した。特徴的な細胞外基質成分として、血管周囲及び神経周囲病変では collagen type I を含んでおり、一方皮質領域では collagen type IV がみられた。Stage C (Bird' s-eye pattern fibrosis) は皮質領域のみに

観察され、collagen type IV を有し、一方 collagen type I が殆ど含まれないことが特徴的であった。 α -SMA 陽性細胞は Stage A において最も多く、stage が進展するほど減少した。

D. 考察

IgG4-RKD に特異な Bird' s-eye pattern fibrosis の特徴として、線維成分のみならず基質成分に富んだ sclerosing fibrosis であることが電顕を含めた検討で指摘されている (Yamaguchi Y, et al. Hum Pathol 2012). 本研究における Bird' s-eye pattern fibrosis の免疫組織学的検討において collagen VI のみならず collagen type IV が確認されたことはこれを支持するものであり、collagen type I の存在が一般的である他の尿細管間質性腎炎と異なる病態を示唆している。一方で、剖検腎で初めて明らかになった中型血管 (小葉間動脈・弓状動脈・静脈) 周囲の病変には Bird' s-eye pattern fibrosis は確認されなかったことから、線維形成過程が血管周囲と皮質とで異なる可能性があり、今後の検討を要する。

E. 結論

中型血管 (小葉間動脈・弓状動脈・静脈) 周囲の病変は IgG4-RKD 剖検腎で初めて明らかになった特徴である。IgG4-RKD に特徴的な間質線維化は線維性 collagen のみならず間質型 collagen を豊富に含む sclerosing fibrosis である。線維の質が皮質と動脈周囲とでは異なっていることから、線維形成過程が解剖学的分布によって異なる可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

本内容を英文医学誌へ投稿準備中

2. 学会発表

- 1) Satoshi Hara, Michio Nagata, Ichiro Mizushima, Mitsuhiro Kawano, Takako Saeki, Yoshifumi Ubara, Nobuya Ohara, Yasuharu Sato, Kazunori Yamada, Hitoshi Nakashima, Shinichi Nishi, Yutaka Yamaguchi, Satoshi Hisano, Nobuaki Yamanaka, and Takao Saito. Components and distribution of interstitial fibrosis in IgG4-related kidney disease; an autopsy series of 5 cases. International Symposium on IgG4-Related Disease and Associated Conditions. Hawaii. Feb 16-19, 2014.

- 2) 水島伊知郎, 川野充弘, 佐伯敬子, 乳原善文, 大原信哉, 佐藤康晴, 山田和徳, 中島 衡, 西 慎一, 山口 裕, 久野 敏, 山中宣昭, 長田道夫, 斉藤喬雄. 剖検腎における IgG4 関連腎臓病の病理組織学的解析. 第 57 回日本腎臓学会・学術総会. 横浜. 2014 年 7 月 4-6 日.
- 3) Ichiro Mizushima, Mitsuhiro Kawano, Takako Saeki, Yoshifumi Ubara, Nobuya Ohara, Yasuharu Sato, Kazunori Yamada, Hitoshi Nakashima, Shinichi Nishi, Yutaka Yamaguchi, Satoshi Hisano, Nobuaki Yamanaka, Michio Nagata, and Takao Saito. Histopathological analysis of IgG4-related kidney disease: hints from an autopsy series of 5 cases. ASN. Atlanta. Nov 5-10, 2013.

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

自己免疫性膵炎における自然免疫の役割に関する研究

担当責任者 岡崎 和一 関西医科大学内科学第三講座 教授

研究要旨：

IgG4 関連疾患の膵病変である 1 型自己免疫性膵炎についての病態は未だ不明である。その病態解明を目的として 1 型自己免疫性膵炎と自然免疫の関わりについて検討した。

A. 研究目的

自己免疫性膵炎は、現在 Ig4 の関与し組織学的には lymphoplasmacytic sclerosing pancreatitis (LPSP) を特徴とする 1 型と好中球上皮病変 (granulocytic epithelial lesion: GEL) を伴う idiopathic duct-centric chronic pancreatitis (IDCP) を組織学的特徴とする IgG4 の関与しない 2 型に分類されている。このうち 1 型自己免疫性膵炎は、IgG4 関連疾患の膵病変とされているが、その病態については未だ不明な点が多い。今回我々は、1 型自己免疫性膵炎における TLR とその陽性細胞について検討した。

B. 研究方法

当院にて切除された腫瘍形成性膵炎 19 例の切除膵を対象とした。その内訳は、LPSP9 例（女性 5 例、男性 4 例平均年齢 65 歳）、アルコール性膵炎 10 例（全例男性、平均年齢 54 歳）であった。また 3 例の膵神経内分泌腫瘍 (NET) の非腫瘍部をコントロールとした。これらの切除膵に対して TLR 1 から 11 までをそれぞれ免疫染色し、その陽性細胞がどのような細胞であるか CD68、CD163、CD123、CD20 について蛍光二重免疫染色を用いて検討した。

（倫理面への配慮）

本研究は関西医科大学倫理委員会の審査を受け、個人情報一切わからないよう行った。

C. 研究結果

1 型自己免疫性膵炎では、TLR7 (8.815 ± 1.755)、TLR8 (3.852 ± 1.489)、TLR10 (3.852 ± 0.921) 陽性細胞が多く認められた。単核球に対する TLR7 陽性細胞の比率は、1 型自己免疫性膵炎では (0.053 ± 0.012) とアルコール性膵炎 (0.007 ± 0.004 ; $p < 0.001$)、NET 非腫瘍部 (0.000 ± 0.000 ; $p < 0.01$) に比較して有意に高かった。TLR8、TLR10 では 3 群間に差はなかった。浸潤細胞については、CD163-陽性細胞は、1 型自己免疫性膵炎 (37.9 ± 5.7) がアルコール性膵炎 (16.2 ± 2.7) より有意に多かった ($p < 0.01$)。また CD68 陽性細胞も 1 型自己免疫性膵炎 (35.2 ± 4.0) が、アルコール性膵炎 (18.9 ± 3.1) より有意に多かった ($p < 0.01$)。CD123 陽性細胞 (2.3 ± 0.4 、 2.1 ± 0.5) と CD20 陽性細胞 (117.9

± 15.7 、 87.6 ± 19.4) は、1 型自己免疫性膵炎とアルコール性膵炎では差がなかった。次に TLR7 を表出している細胞について検討すると、CD68 陽性細胞 (0.734 ± 0.021) は、CD123 (0.034 ± 0.006 ; $p < 0.001$)、CD20 (0.029 ± 0.010 ; $p < 0.001$) 陽性細胞より有意に多かった。CD163 陽性細胞 (0.789 ± 0.031) も CD123、CD20 陽性細胞より有意に多かった ($p < 0.001$)。

D. 考察

TLR7 陽性細胞は、マクロファージ特に M2 マクロファージが有意に多いことがわかった。M2 マクロファージは、炎症抑制作用、Th 2 型免疫反応、線維化に関わっていることが知られており、1 型自己免疫性膵炎においても TLR7 を介した M2 マクロファージがこれらに関わっている可能性が示唆された。

E. 結論

1 型自己免疫性膵炎において、TLR7 陽性 M2 マクロファージが病態生理に深く関わっている可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Okazaki K, Yanagawa M, Mitsuyama T, Uchida K. Recent Advances in the Concept and Pathogenesis of IgG4-Related Disease in the Hepato-Bilio-Pancreatic System. Gut Liver. 2014 Sep;8(5):462-470.
- 2) Okazaki K, Uchida K, Koyabu M, Miyoshi H, Ikeura T, Takaoka M. IgG4 cholangiopathy - current concept, diagnosis, and pathogenesis. J Hepatol. 2014 Sep;61(3):690-5. doi: 10.1016/j.jhep.2014.04.016
- 3) Fukui Y, Uchida K, Sakaguchi Y, Fukui T, Nishio A, Shikata N, Sakaida N, Uemura Y, Satoi S, Okazaki K. Possible involvement of Toll-like receptor 7 in the development of type 1 autoimmune pancreatitis. J Gastroenterol. 2014 Jul 9. [Epub ahead of print]

- 4) Sumimoto K, Uchida K, Kusuda T, Mitsuyama T, Sakaguchi Y, Fukui T, Matsushita M, Takaoka M, Nishio A, Okazaki K. The role of CD19+ CD24high CD38high and CD19+ CD24high CD27+ regulatory B cells in patients with type 1 autoimmune pancreatitis. *Pancreatology*. 2014 May-Jun;14(3):193-200. doi: 10.1016/j.pan.2014.02.004
- 5) Okazaki K, Uchida K, Sumimoto K, Mitsuyama T, Ikeura T, Takaoka M. Autoimmune pancreatitis: pathogenesis, latest developments and clinical guidance. *Ther Adv Chronic Dis*. 2014 May;5(3):104-11. doi: 10.1177/2040622314527120.
- 6) Okazaki K, Tomiyama T, Mitsuyama T, Sumimoto K, Uchida K. Diagnosis and classification of autoimmune pancreatitis. *Autoimmun Rev*. 2014 April-May;13(4-5):451-458. doi: 10.1016/j.autrev.2014.01.010.
2. 学会発表
- 1) Kimi Sumimoto, Kazushige Uchida, Toshiyuki Mitsuyama, Yuri Fukui, Takeo Kusuda, Hideaki Miyoshi, Norimasa Fukata, Masanori Koyabu, Yutaku Sakaguchi, Tsukasa Ikeura, Masaaki Shimatani, Toshiro Fukui, Mitsunobu Matsushita, Makoto Takaoka, Akiyoshi Nishio, Kazuichi Okazaki. Regulatory B Cells in Type 1 Autoimmune Pancreatitis. DDW2014 • Chicago, IL, USA 2014/05
- 2) Ikeura T, Takaoka M, Uchida K, Shimatani M, Miyoshi H, Fukui Y, Sumimoto K, Okazaki K. Which has a higher risk for developing pancreatic cancer, autoimmune pancreatitis or ordinary chronic pancreatitis? The 4th International Forum at the 100th General Meeting of the Japanese Society of Gastroenterology. Tokyo. 2014/04
- 3) Kimi Sumimoto, Kazushige Uchida, Toshiyuki Mitsuyama, Yuri Fukui, Takeo Kusuda, Hideaki Miyoshi, Norimasa Fukata, Masanori Koyabu, Yutaku Sakaguchi, Tsukasa Ikeura, Masaaki Shimatani, Toshiro Fukui, Mitsunobu Matsushita, Makoto Takaoka, Akiyoshi Nishio, and Kazuichi Okazaki. Comparison of IgG4-positive Plasma Cell Infiltration Between Type 1 Autoimmune Pancreatitis and Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Based On Comprehensive diagnostic criteria for IgG4-related disease (IgG4-RD), 2011. The 2nd International Symposium on IgG4-RD and Associated Conditions. Honolulu, HA, USA. 2014/02
- 4) Kazushige Uchida, Yuri Fukui, Toshiyuki Mitsuyama, Kimi Sumimoto, Tsukasa Ikeura, Yutaku Sakaguchi, Masaaki Shimatani, Toshiro Fukui, Mitsunobu Matsushita, Makoto Takaoka, Akiyoshi Nishio, Kazuichi Okazaki. Comparison of IgG4-positive Plasma Cell Infiltration Between Type 1 Autoimmune Pancreatitis and Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Based On Comprehensive diagnostic criteria for IgG4-related disease (IgG4-RD), 2011. The 2nd International Symposium on IgG4-RD and Associated Conditions. Honolulu, HA, USA. 2014/02
- 5) 岡崎和一. 消化器領域におけるIgG4関連疾患. 第115回日本消化器病学会 第109回日本消化器内視鏡学会 北海道支部例会, 札幌、2014/09
- 6) 内田一茂、住本貴美、岡崎和一. 自己免疫性膵炎の各種診断基準の評価に基づく診断アルゴリズムの提案. 第100回日本消化器病学会総会、東京、2014/04
- 7) 内田一茂、住本貴美、光山俊行、塩見圭佑、池浦司、島谷昌明、高岡亮、岡崎和一. 当院における1型自己免疫性膵炎の診断アルゴリズムと各種診断基準についての検討. 第111回日本内科学会講演会。東京、2014/04
- 8) 松原揚典、内田一茂、南川健、住本貴美、光山俊行、池浦司、島谷昌明、高岡亮、岡崎和一 アザチオプリンにて加療したIgG4関連硬化性胆管炎の1例 第203回日本内科学会近畿地方会、大阪 2014/03
- 9) 堀谷俊介、内田一茂、光山俊行、住本貴美、三好秀明、池浦司、島谷昌明、高岡亮、関寿人、岡崎和一 多臓器に病変を認め胆管病変が急速に進行したIgG4関連疾患の1例、第203回日本内科学会近畿地方会 大阪、2014/03
- 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

IgG4 関連疾患の病因病態解明と新規治療法確立に関する研究

担当責任者 渡邊 智裕 京都大学医学部附属病院消化器内科・AK Project 特定准教授

研究要旨

IgG4 関連疾患は多彩な罹患臓器の分布と IgG4 陽性形質細胞の浸潤を特色とする新規疾患概念である。膵臓は IgG4 関連疾患の標的臓器の一つであり、従来、自己免疫性膵炎と考えられていた疾患が IgG4 関連疾患の膵臓における表現型であることが確認されている。本研究においては、マウスの自己免疫性膵炎モデルを用い、実験的な自己免疫性膵炎の発症に関わる自然免疫反応の解明を試みた。その結果、形質細胞性樹状細胞の組織浸潤と I 型 IFN の産生が自己免疫性膵炎の発症に関与することが明らかになった。

A. 研究目的

IgG4 関連疾患は IgG4 陽性細胞が全身の様々な臓器に浸潤し、多彩な症状を発現することが知られている。膵臓は本疾患の主要な標的臓器であり、従来、自己免疫性膵炎と考えられていた膵臓病変が IgG4 関連疾患の膵臓発現型である。そこで、我々は自己免疫性膵炎のモデル動物を用いて、自己免疫性膵炎の発症に関与する自然免疫反応について解析を行った。

B. 研究方法

MRL マウスに Poly (I:C) を投与することにより、ヒト自己免疫性膵炎に類似する膵炎病変をマウスに誘導した。マウスの膵臓抽出液、血清を用いて、産生される cytokine や chemokine を同定した。また、マウスの膵臓組織に浸潤する免疫細胞を Flow cytometry で解析した。

（倫理面への配慮）

本年度の研究は自己免疫性膵炎モデル動物を用いて研究を行った。動物実験に関しては、京都大学動物実験委員会より、承認を得ている。

C. 研究結果

Poly (I:C) を投与することにより、マウスにヒト自己免疫性膵炎に類似する膵炎病変を誘導することが可能であった。膵炎が誘導されたマウスの膵臓組織では I 型 IFN 及びその関連分子 (CXCL9, CXCL10, CXCL11) の発現が亢進していた。また、自己免疫性膵炎が誘導されたマウスの膵臓組織では形質細胞様樹状細胞 (plasmacytoid dendritic cells, PDC) が多数浸潤していることが確認された。I 型 IFN 受容体に対する抗体を投与することにより、自己免疫性膵炎の発症が抑制された。

D. 考察

PDC は I 型 IFN の主要な産生細胞であると考えられている。I 型 IFN 経路の活性化とともに、PDC の浸潤が自己免疫性膵炎を発症したマウスに認められたことから、自己免疫性膵炎の発症には PDC によ

る I 型 IFN の産生が関与する可能性が示唆された。

E. 結論

形質細胞性樹状細胞の組織浸潤と I 型 IFN の産生が自己免疫性膵炎の発症に関わる可能性が考えられた。

F. 健康危険情報

該当するものなし

G. 研究発表

1. 論文発表

Watanabe T, Asano N, Meng G, Yamashita K, Arai Y, Sakurai T, Kudo M, Fuss IJ, Kitani A, Shimosegawa T, Chiba T, Strober W. NOD2 down-regulates colonic inflammation by IRF4-mediated inhibition of K63-linked polyubiquitination of RICK and TRAF6. *Mucosal Immunol.* 2014;7:1312-1325.

2. 学会発表

1) Arai Y, Yamashita K, Watanabe T, Takaori-Kondo A, Chiba T. Plasmacytoid dendritic cells activated by neutrophil extracellular traps contribute to the pathogenesis of IgG4-related disease. 2nd International Symposium on IgG4-related disease & Associated Conditions (Honolulu, United States) 2014. 2. 16.

2) 新井康之, 渡邊智裕, 山下浩平, 高折晃史, 千葉勉. Neutrophil extracellular traps による Plasmacytoid dendritic cell の活性化と IgG4 関連疾患. 第 51 回日本消化器免疫学会総会 (京都) 2014. 7. 10.

3) 新井康之, 山下浩平, 渡邊智裕, 高折晃史. IgG4 関連疾患における好中球細胞外トラップと形質細胞様樹状細胞の関与. 第 76 回日本血液学会学術集会 (大阪) 2014. 11. 2.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

該当するものなし

2. 実用新案登録

該当するものなし

3. その他

該当するものなし

IgG4 関連疾患における IgG の役割に関する研究

担当責任者 千葉 勉 京都大学大学院医学研究科消化器内科学 教授
研究協力者 児玉 裕三 京都大学大学院医学研究科消化器内科学 助教

研究要旨

IgG4 関連疾患は、血清 IgG4 高値と各種臓器への IgG4 陽性細胞浸潤を特徴とする全身疾患である。本疾患には自己免疫機序の関与が示唆されているが、その病態は不明である。本研究では、IgG4 関連疾患の患者血清より IgG あるいは IgG4 抽出し、新生児マウスに皮下注射することによりその病的意義について検討した。その結果、患者 IgG あるいは IgG4 は、マウスにおいて IgG4 関連疾患と同様の病変を誘導した。これらより、IgG4 関連疾患の IgG あるいは IgG4 は、自己抗体としての病原性をもつ可能性が考えられた。

A. 研究目的

IgG4 関連疾患は血清 IgG4 高値と様々な臓器における種々の程度の IgG4 陽性細胞浸潤・線維化を特徴とする全身疾患である。これまでの検討により本疾患への自己免疫機序の関与が示唆されているが、その病態メカニズムや発症機序の詳細は不明である。また、本疾患の特徴である IgG4 の病的意義についても未だ明らかにされていない。本研究では、IgG4 関連疾患の病態形成における IgG および IgG4 を含む各サブクラスの役割を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

本研究では天疱瘡の病態モデルを参考にして研究を行った。IgG4 関連疾患患者 10 人の血清より IgG と各 IgG サブクラスを抽出し、新生児マウスに皮下注射後 12 時間で全身の各臓器について解析を行った。コントロールとして IgG4 関連疾患患者と年齢・性をマッチさせたコントロール 10 人の血清より IgG および各 IgG サブクラスを抽出し、同様の実験を行った。

（倫理面への配慮）

本研究は、臨床材料を利用した基礎的研究であり、臨床研究に関する倫理指針に沿って京都大学医の倫理委員会の承認を得たうえで行っている。

C. 研究結果

IgG4 関連疾患の患者より抽出した IgG を皮下注射したマウスの脾臓には、IgG4 関連疾患の一つある自己免疫性脾炎の病理像と合致するような病変を認めた。このような変化は患者 IgG4 の皮下注射によっても誘導された。一方、コントロールより抽出した IgG あるいは IgG4 では、このような変化は認めなかった。

D. 考察

これらの結果は、IgG4 関連疾患の病態には抗原・抗体反応が重要な役割を果たしていると考えられる。

E. 結論

IgG4 関連疾患患者の IgG4 を含めた IgG は、病原

性をもっている可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nishikawa Y, Tsuji Y, Isoda H, Kodama Y, Chiba T: Perfusion in the tissue surrounding pancreatic cancer and the patient's prognosis. Biomed Res Int 2015 in press.
2. Ikeda A, Aoki N, Kido M, Iwamoto S, Nishiura H, Maruoka R, Chiba T, Watanabe N: Progression of autoimmune hepatitis is mediated by IL-18-producing dendritic cells and hepatic CXCL9 expression in mice. Hepatology 60:224-236:2014.

2. 学会発表

1. Masahiro Shiokawa, Tsutomu Chiba: Risk of cancer in patients with autoimmune pancreatitis International symposium on IgG4-RD & Associated Conditions • Poster Sheraton Waikiki, Hawaii Feb. 16 2014
2. Masahiro Shiokawa, Tsutomu Chiba: Undifferentiated IgG4-positive cholangitis; primary sclerosing cholangitis or IgG4-Related sclerosing cholangitis? International symposium on IgG4-RD & Associated Conditions • Poster Sheraton Waikiki, Hawaii Feb. 16 2014
3. Tsutomu Chiba: Cancer & IgG4-RD: Is there a real relationship? International symposium on IgG4-RD & Associated Conditions • International symposium Sheraton Waikiki, Hawaii Feb. 17 2014
4. 塩川雅広、上田樹、西川義浩、山内雄揮、栗山勝利、佐久間洋二郎、大田悠司、丸野貴久、澤

井勇悟、辻喜久、宇座徳光、児玉裕三、千葉 勉.
自己免疫性膵炎患者の IgG の病原性. 第 51 回
日本消化器免疫学会総会 2014 年 7 月 京都

5. 塩川雅広、上田樹、西川義浩、山内雄揮、栗山
勝利、佐久間洋二郎、大田悠司、丸野貴久、澤
井勇悟、辻喜久、宇座徳光、児玉裕三、千葉 勉.
自己免疫性膵炎と特発性血小板減少性紫斑病の
関係. 第 51 回 日本消化器免疫学会総会. 2014
年 7 月 京都
6. 新井康之、渡邊智裕、山下浩平、高折晃史、千
葉 勉. Neutrophil extracellular traps に
よる Plasmacytoid dendritic cell の活性化と
IgG4 関連疾患. 第 51 回 日本消化器免疫学会総
会. 2014 年 7 月 京都

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

モデルマウスを用いた IgG4 関連疾患における APRIL の役割に関する研究

担当責任者 川野 充弘 金沢大学附属病院リウマチ・膠原病内科 講師

研究協力者 山田 和徳 金沢大学大学院医薬保健学総合研究科先進的地域医療研究講座 特任准教授

研究要旨：

我々は、これまでに Lat Y136F knock-in マウスは膵臓、腎臓、唾液腺においてヒト IgG4 関連疾患のモデル動物となることを示した。今回、Lat Y136F knock-in マウスの肺病変を解析した。Lat Y136F knock-in マウスは 4 週齢より IgG1（ヒトの IgG4 に対応）陽性細胞浸潤および線維化を認めた。Lat Y136F knock-in マウスの気管支肺洗浄液中のサイトカインを解析した結果、Lat Y136F knock-in マウスは野生種と比較して、有意に Th2 サイトカインの増加を認めた。また、ステロイド投与により Lat Y136F knock-in マウスの肺病変はコントロールと比較して軽度であった。以上より Lat Y136F knock-in マウスは IgG4 関連肺疾患のモデル動物となりえること考えられた。次に、IgG4 関連疾患における APRIL の意義について検討した。我々は昨年度、Lat Y136F knock-in マウスに APRIL 阻止抗体を投与することで腎病変の進行が抑制されることを確認した。本年度は、各臓器における APRIL の役割の発現を確認した。4 週齢、10 週齢の Lat Y136F knock-in マウスの膵臓、腎臓、唾液腺、肺において炎症部位に一致して APRIL の発現を認めた。一方、Lat Y136F knock-in マウスの非炎症部や野生種においては、APRIL の発現はほとんど認めなかった。これらの結果から、APRIL は IgG4 関連疾患の病変形成に関与している分子であることが推測された。

A. 研究目的

我々は、昨年度 Lat Y136F knock-in マウスが Th2 優位の免疫反応を示し、マウス IgG1（ヒトの IgG4 に対応）の上昇および膵臓、腎臓、唾液腺において IgG4 関連疾患と類似する組織を示すことより、IgG4 関連疾患のモデルマウスであることを示した。本年度は、Lat Y136F knock-in マウスの肺を解析し、IgG4 関連肺疾患のモデル動物となり得るか検討することを目的とする。

また、IgG4 関連疾患においては病変組織における IgG4 陽性形質細胞浸潤を認めるが、その機序についてはよく知られていない。我々は、形質細胞の生存に関与する分子である A proliferation-inducing ligand (APRIL) に着目して研究を進めてきた。本年度は、Lat Y136F knock-in マウスの各臓器における APRIL の発現を検討することを目的とする。

B. 研究方法

(1) Lat Y136F knock-in マウスにおける肺病変の解析

Lat Y136F knock-in マウスの 4、6、10、20 週齢における肺組織を採取し、HE およびアザン染色を行った。Achoft score を用いて、線維化の評価を行った。また、4 週齢の Lat Y136F knock-in マウスにステロイドまたは生食を腹腔内投与し、6 週齢における肺病変を比較した。

(2) Lat Y136F knock-in マウスの気管支肺洗浄液中のサイトカインの解析

6-10 週齢の Lat Y136F knock-in マウスおよび野生種の気管支肺洗浄液を回収し、サイトカインについて比較検討した。

(3) Lat Y136F knock-in マウスにおける APRIL の役割の発現の検討

4 週齢および 10 週齢の Lat Y136F knock-in マウスおよび野生種に対して、抗マウス APRIL 抗体を用いて、APRIL の発現を検討した。

（倫理面への配慮）

遺伝子改変マウスをはじめとする実験動物を用いた研究であるので、以下の通り、動物実験・組換え DNA 実験に関する法規に基づいて学内に制定されている指針に基づき、それぞれに関する学内委員会よりの許可を受けている。

・遺伝子組換え実験計画承認番号；金大 6 第 1013 号、研究課題名；Th2 活性化マウスを用いた IgG4 関連疾患の病態の解明

・動物実験承認番号；AP-10174、研究課題名；Th2 活性化マウスを用いた IgG4 関連疾患の病態の解明

本研究にあたっては、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」（平成 13 年 3 月 29 日文科科学省、厚生労働省、経済産業省告示）および平成 13 年 3 月 29 日文科振 266 号文科科学省研究振興局長通知に定める細則に従い、金沢大学倫理審査委員会の規定および審査、決定、助言に従った研究計画に基づき研究を適切に実施した。

C. 研究結果

Lat Y136F knock-in マウスは 4 週齢より肺に炎症、線維化を認めた。病変部位において、IgG および IgG1（ヒトの IgG4 に対応）陽性細胞浸潤を認めた。4 週齢における Lat Y136F knock-in マウスおよび野生種の Achcroft score はそれぞれ、2 点、0 点であり、有意に Lat Y136F knock-in マウスで高かった。Lat

Y136F knock-in マウスは成長と共に増加し、6 週齢で 5 点であり、4 週齢と比較して有意に高値であった。

ステロイド投与実験において、Lat Y136F knock-in マウスの肺はコントロール群と比較して病変が軽度であった。

以上より、Lat Y136F knock-in マウスは肺においてもヒトの IgG4 関連疾患と類似した病変を呈し、モデルマウスとなりうると考えられた。

次に、4 週齢、10 週齢の Lat Y136F knock-in マウスの各臓器における APRIL の発現を確認した。Lat Y136F knock-in マウスは 4 週齢の時点で、炎症細胞浸潤を認める部位と一致して APRIL の発現を認めた。一方、Lat Y136F knock-in マウスの非炎症部や野生種においては、APRIL の発現はほとんど認めなかった。

D. 考察

IgG4 関連疾患の病因については未だよく知られていない。病因の解明において、動物モデルを用いた検討が重要と考えられる。我々は昨年度、Linker for activation of T cells (LAT) 遺伝子の 136 番目のチロシンをフェニルアラニンに置換した Lat Y136F knock-in マウスの脾臓、腎臓、唾液腺を解析し、ヒトの IgG4 関連疾患のモデル動物であることを示した。本年度は、Lat Y136F knock-in マウスの肺病変を解析し、IgG4 関連肺疾患のモデルとなるか検討した。

Lat Y136F knock-in マウスは肺においても、4 週齢より IgG1 (ヒトの IgG4 に対応) 陽性細胞浸潤を呈した点、ステロイド反応性を有する点、気管支肺胞洗浄液中の Th2 サイトカインの上昇を認める点から、ヒトの IgG4 関連疾患と類似した特徴を有し、モデルマウスとなりうると考えられた。

昨年度より、我々は IgG4 関連疾患における APRIL の意義について検討してきた。本年度は、脾臓、腎臓、唾液腺、肺における APRIL の発現について検討した。その結果、APRIL は、炎症細胞浸潤を認める部位に一致し、発現を認めた。野生種では、炎症反応浸潤を認めないことより、APRIL の発現はほとんど認めなかった。昨年度、我々はヒトの IgG4 関連腎臓病の腎組織において APRIL の発現亢進を認めること、ステロイド治療により APRIL の発現が低下すること、Lat Y136F knock-in マウスに APRIL 阻止抗体を投与することにより腎病変が有意に軽減することを示したが、これらの結果と今回の結果を合せると、APRIL は IgG4 関連疾患の病変形成に何らかの役割を果たしていると考えられた。

今後、APRIL が IgG4 関連疾患の治療ターゲットの一つになりうるかどうかについて、さらなる研究が必要と考えられた。

E. 結論

Lat Y136F knock-in マウスは肺病変においても IgG4 関連疾患のモデル動物となりうると考えられた。また、APRIL は IgG4 関連疾患における病変形成に関与していると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) Yuko Waseda, Shoko Matsui, Kazunori Yamada, Satoshi Watanabe, Kiyooki Ito, Ryo Matsunuma, Hazuki Takato, Yukari Ichikawa, Masahide Yasui, Mitsuhiro Kawano, Masahiko Zuka, Helmut Prosch, Christian Herold and Kazuo Kasahara. Evaluation of Lung Lesions in LAT^{Y136F} Mutant Mice ~Are They recognized as the models of IgG4 related lung disease?~. European Respiratory Society International Congress 2014, September 6-10, 2014, Munich, Germany.
- 2) 山田和徳、早稲田優子、塚正彦、渡辺知志、伊藤清亮、林龍二、川野充弘、松井祥子. IgG4 関連肺疾患モデルマウスの確立～Lat Y136F knock-in マウスの肺病変の解析～. 第 23 回日本シェーグレン症候群学会学術集会 2014 年 9 月 13 日 (長崎)

IgG4 関連疾患のモデル動物作成に関する研究

担当責任者 吉藤 元 京都大学大学院医学研究科内科学講座臨床免疫学 院内講師

研究要旨

【目的】 IgG4 関連疾患 (IgG4-related disease: IgG4-RD) は、血清 IgG4 濃度上昇と、病変局所への IgG4 陽性形質細胞浸潤を特徴とする原因不明のリンパ増殖性疾患である。IgG4-RD の病態解明のために重要臓器を患者から採取して調べることはしばしば困難であり、疾患動物モデルが必要である。今のところ十分な IgG4-RD 動物モデルがない理由の一つは、ヒトは IgG1~IgG4 を有するのに対し、マウスは IgG1~IgG3 を有するが IgG4 を持たないことがある。今回、ヒト IgG4 を保有する遺伝子改変マウスを考案した。すなわち、マウスの IgG1 サブクラス定常領域をヒト IgG4 サブクラス定常領域と置換されるが、抗体的可変領域 (VDJ 領域) の生理的遺伝子再構成機構は温存されるというモデルをデザインし、作成した。

【方法】 IgH 分子のマウス IgG1 定常領域の部分だけが相同組み換えを起こすターゲティングベクターをデザインし、pBluescript II SK ベクターに挿入した。ベクターを C57BL/6 (B6) 系統の ES 細胞にエレクトロポレーションで導入した。PCR 法とサザンブロッティング法で遺伝子ターゲティングを確認できた ES クローンは 8 つであった。白系の Balb/c 胚盤胞に ES クローンをインジェクションし、得た仔マウスのうち、毛色が黒色の仔キメラマウスを選別した。野生型 B6 と交配し F1 ヘテロマウスを得て、さらに Tg-Cre マウスとの交配により Neo を除去した。次に、ヘテロマウスの交配によるホモマウスの作成を試みた。

【結果】 上記工程により、ヒト IgG4 定常領域ノックイン・ヘテロマウスを得た。ホモマウスの作成を試み、数代にわたってヘテロマウス同士の交配を行い、得られた計 113 の仔マウスの Wild, Hetero, Homo 型を PCR 法により検討したところ、メンデル比 (WT : Het : Homo) = 31 : 56 : 26、性比 (M : F) = 56 : 57 であった。ホモマウスの外観に異常はなかった。

【考察】 メンデル比 (WT : Het : Homo) = 約 1 : 2 : 1 であったことから、本マウスの Homo マウスは胎生致死的ではないと考えられた。今回、マウスの IgG1 サブクラス定常領域をヒト IgG4 サブクラス定常領域とすりかえる遺伝子組み換えマウスを作成した。今後、IgG4 の mRNA および蛋白の発現を QT-PCR および ELISA で測定するなどの表現型の確認が必要である。その後、疾患モデル樹立へのステップに進む予定である。

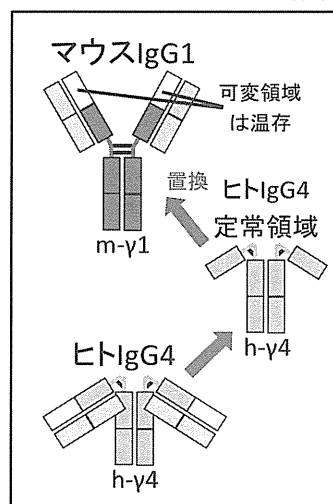
A. 研究目的

IgG4 関連疾患 (IgG4-related disease: IgG4-RD) は、血清 IgG4 濃度上昇と、病変局所への IgG4 陽性形質細胞浸潤を特徴とする原因不明のリンパ増殖性疾患である。ステロイドが有効だが易再燃性であり問題となる。IgG4-RD の病態解明による治療法の改良が課題であるが、そのために重要臓器を患者から採取して調べることはしばしば困難であり、疾患動物モデルが必要である。従来、Mst1 ノックアウトマウス (文献 1、肺・唾液腺・肝・脾・腎にリンパ球集簇)、Aly/Aly マウス (文献 2、膵炎・顎下腺炎・間質性肺炎、ただし低ガンマグロブリン血症を呈する)、LAT^{Y136F} ノックインマウス (文献 3、膵炎・間質性腎炎、Th2 優位) などが知られている。しかし、今のところ十分な IgG4-RD 動物モデルがないと考えられる理由の一つは、ヒトは IgG1~IgG4 を有するのに対し、マウスは IgG1~IgG3 を有するが IgG4 を持たないことがある。そこで我々は、ヒト IgG4 を保有する遺伝子改変マウスをデザインし、マウス作成を試みた。

B. 研究方法

マウスの IgG1 サブクラス定常領域をヒト IgG4 サブクラス定常領域と置換するが、抗体可変領域 (VDJ 領域) の生理的遺伝子再構成機構を温存するモデルを考案した (図 1)。

図1. モデルマウスの概要



(1) IgH 分子のマウス IgG1 定常領域の部分だけが相同組み換えを起こすターゲティングベクターを