

令和元年5月8日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K09212

研究課題名(和文) IgG4関連肺疾患の病変進展因子の検索と新規治療ターゲットの探求

研究課題名(英文) Search for progression factors and novel therapeutic targets in IgG4-related lung disease

研究代表者

松井 祥子 (Matsui, Shoko)

富山大学・保健管理センター・教授

研究者番号：40334726

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：IgG4関連疾患は、血清IgG4高値線維化と血清IgG4高値、病変組織へのIgG4陽性細胞浸潤および線維化を特徴とするの全身性疾患である。治療薬はステロイドであるが、再発が多い。我々は、IgG4関連肺疾患と類似の病態を形成するモデルマウスを確立したが、その肺病変において、自然免疫の関与とその制御について研究した。その結果、自然免疫の中でTLR-9がIgG4関連肺疾患の病態に関与している可能性を見だし、ステロイド以外の治療法の手がかりを得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

IgG4関連肺疾患発症および進展に関与する因子が同定されれば、病態の解明や診断や新規治療のターゲットとなり得ると考え、外界から刺激を受ける呼吸器の自然免疫に着目した。その結果、モデルマウスを用いて自然免疫の関与を確認したことから、新たな治療法の手がかりを得ることができ、今後の研究の発展が望めると考えられた。

研究成果の概要(英文)：IgG4-related disease (IgG4-RD) is a recently recognized systemic disease, characterized by tumefactive lesions with abundant IgG4-positive plasma cell infiltrates and elevated serum IgG4 concentrations. Although systemic corticosteroid therapy is effective, there is often recurrence of the lesion in IgG4-RD. We aimed to establish model mice of IgG4-RD and evaluated that the phenotypes of LatY136F knock-in mice form a pathological condition similar to IgG4-related lung disease. We also studied the involvement of innate immunity and its control in the lung lesions.

As a result, we found that innate immunity may be involved in the pathogenesis of IgG4-related lung disease and got clues for treatment other than glucocorticoids.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：IgG4関連肺疾患 自然免疫 モデルマウス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

IgG4 関連疾患は、血清 IgG4 高値、病変組織への IgG4 陽性細胞浸潤および線維化を特徴とする全身性疾患である。その病変局所では、Th2 優位のサイトカイン産生と、IL-10、TGF- β 等のサイトカイン産生が認められており、臨床的には喘息や鼻炎などアレルギー症状を伴う、好酸球増多や高 IgE 血症が認められる。

このように IgG4 関連疾患では共通の所見を認める一方で、臓器ごとに様々な病変を呈することが報告されている。肺病変では、気管支血管束周囲の炎症、偽腫瘍、間質性肺炎(主に非特異の間質性肺炎 NSIP パターン)、胸膜病変など多様な病態を呈することが知られている。しかしこのように多彩な病態を形成する要因は依然として不明であり、また臨床的にもステロイド漸減に伴う再発など治療に難渋する症例が多いため、本疾患の病態解明が必要である。

申請者らは IgG4 関連疾患の病態として、何らかの抗原刺激による宿主の Th2 反応と、その抗炎症性制御が働いた結果により IgG4 産生と線維化病変が生じる、という仮説をたてた。そして、T 細胞活性化リンカー (Linker for activation of T cell; LAT) の 136 番目のチロシンをフェニルアラニンに変異した Lat Y136F knock-in マウスが、Th2 優位の免疫反応を有し、血清 IgG1 (ヒト IgG4 に相当) の上昇を認め、肺、脾臓、腎臓、唾液腺において、ヒト IgG4 関連疾患と類似する組織像を示すことを確認し、新規の IgG4 関連肺疾患のモデル動物であることを報告した。

近年、自己免疫性疾患、アレルギー疾患や悪性腫瘍などにおいて Toll-like receptor (TLR) の関与が報告されている。IgG4 関連疾患においても、in vitro の系で自己免疫性膵炎患者の末梢血を TLR アゴニストで刺激することにより IgG4 産生が増加したことが報告された。

呼吸器は直接外界と接するため、アレルゲンや細菌、ウイルスに暴露されやすい臓器である。そこで、申請者らは IgG4 関連肺病変の形成に自然免疫が重要な役割を果たしているのではないかと仮説を立てた。

2. 研究の目的

Lat Y136F knock-in マウスを用いて、肺病変形成および進展に関与する因子の解明をめざし、1) TLR を介した自然免疫系、特に TLR 9 の関与の解明、及び 2) 自然免疫系を介した反応を制御するステロイド代替薬の探索を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Lat Y136F knock-in マウスの肺の病理学的検討

4週齢から20週齢のLat Y136F knock-inマウスの肺病変についてHE染色および線維化の評価スコアであるAchcroft scoreを用いて評価した。

さらにLat Y136F knock-inマウスの肺において、特に細菌やウイルス感染との関わりが深いTLR 9の発現について免疫組織学的評価を行った。

(2) ステロイド代替薬の探索

6週齢のLat Y136F knock-inマウスに生理食塩水またはTLR 9のアゴニストであるCpG-ODN 50ugまたはPBSを投与し、10週齢においてLat Y136F knock-inマウスの肺の組織学的検討を行った。

4. 研究成果

(1) Lat Y136F knock-in マウスの肺の病理学的検討

Lat Y136F knock-in マウスは、4 週齢より肺に炎症細胞浸潤および線維化を認めた（図 1A-C、図 2）。

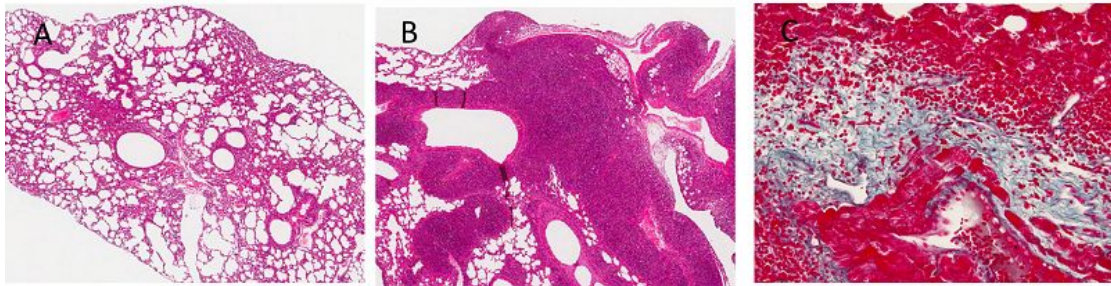


図 1 Lat Y136F knock-in マウスの肺組織

A : 4 週齢 (HE 染色、X40)、B : 6 週齢 (HE 染色、X40)、C : 6 週齢 (AZAN 染色、X40)

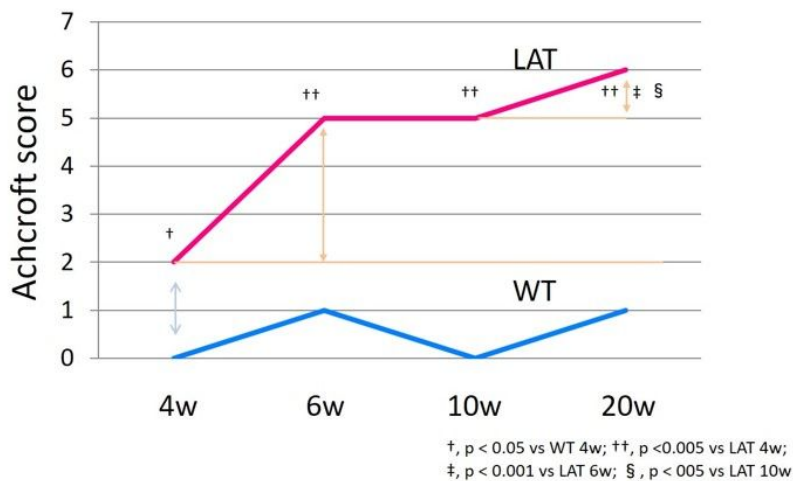


図 2 Lat Y136F knock-in マウスおよび野生種マウスの Achcroft score。

Lat Y136F knock-in マウスでは、4 週齢より線維化を認めた。

さらに、Lat Y136F knock-in マウスは IgG4 関連疾患に特徴的な閉塞性静脈炎も認めた（図 3A-B）。

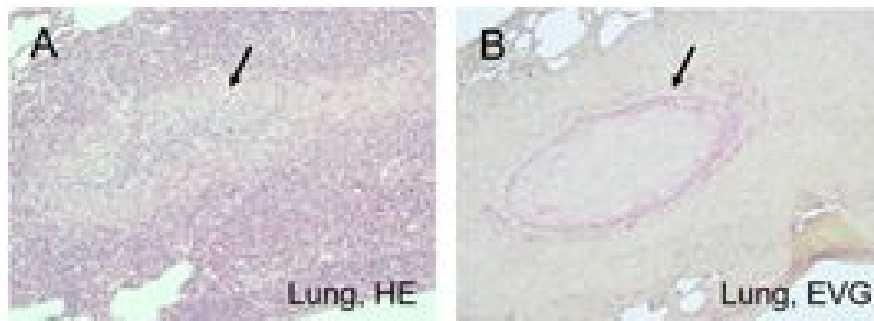


図 3 Lat Y136F knock-in マウスの肺組織

A : HE 染色 X100、B : EVG 染色 X100。閉塞性静脈炎を認めた（矢印）。

Lat Y136F knock-inマウスの10週齢の肺において、TLR 9の発現を検討したところ、TLR 9は炎症部位に一致して発現していることを確認した(図4A-B)。

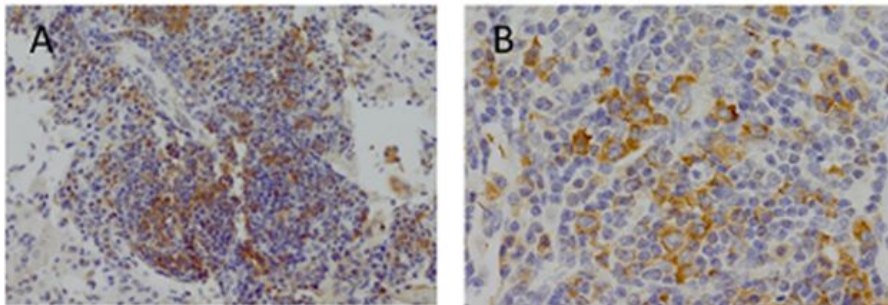


図4 Lat Y136F knock-inマウスの肺組織におけるTLR-9の発現
A : TLR9 染色 X40、 B : TLR9 染色 X200

(2) ステロイド代替薬の探索

我々は細菌やウイルスなどに共通した病原体を認識する TLR 9 の役割に着目した。IgG4 関連疾患の肺病変における TLR 9 の役割について検討するため、そのリガンドである CpG-ODN を投与し、Th1 への誘導を行い、病変部位の炎症程度の変化を経時的に検討した。

まず6週齢の野生型および Lat Y136F knock-in マウスにおいて、CpG-ODN 50 μ g/body + PBS、PBSのみを投与し、10週目に解剖して、その組織の解析を行った。

その結果、野生型マウスにおいては、CpG-ODN による組織の変化は認めなかった。また Lat Y136F knock-in マウスにおいては、CpG-ODN 投与において部分的にマクロファージの出現と滲出性変化病変を認める例があったが、全体的には PBS 投与例と炎症の程度に差は無かった(図5 A-B)。また CpG-ODN 投与では病変が軽減する例が若干数認められた(図6 A-B)。

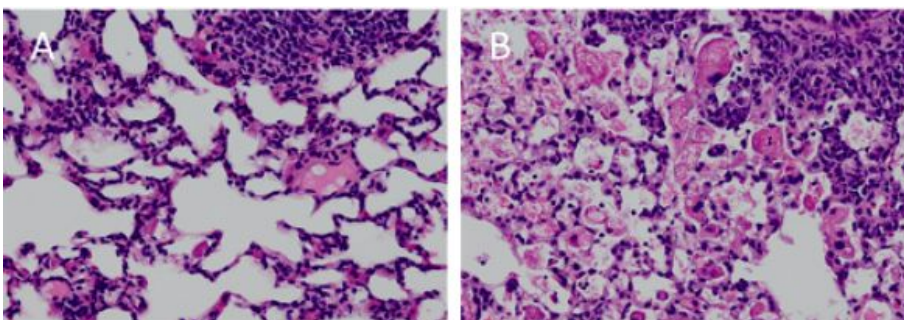


図5 Lat Y136F knock-in マウスの肺組織における CpG-ODN の効果
A : PBS 投与マウス、 B : CpG-ODN 投与マウス (X100、10週齢)

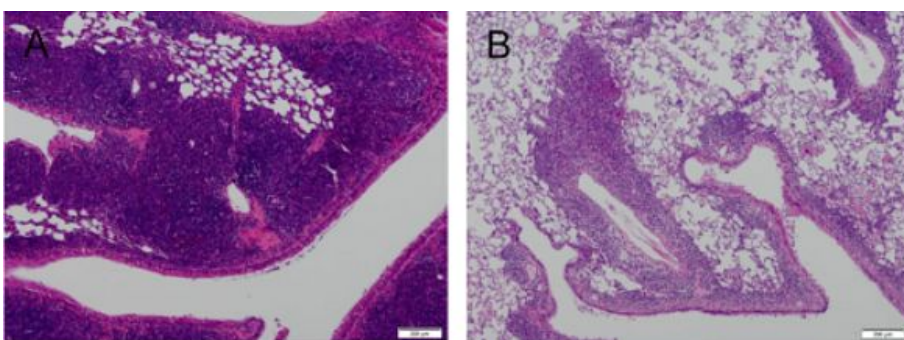


図6 Lat Y136F knock-in マウスの肺組織における CpG-ODN の効果
A : PBS 投与マウス、 B : CpG-ODN 投与マウス (X40、10週齢)

以上の結果より Lat Y136F knock-in マウスは4週齢からの炎症細胞浸潤、線維化に加え、閉塞性静脈炎も有することから、ヒトの IgG4 関連疾患のモデルとなることを確認した。さらに、病変部に一致して、TLR-9 の発現も認めており、IgG4 関連疾患モデルにおいて、TLR-9 が病変形成に関与していることが示された。

また、興味深いことに TLR-9 アゴニストである CpG-ODN を投与することにより、Lat Y136F knock-in マウスの肺病変が軽減する例を確認した。TLR9 リガンドである CpG は強い Th1 分化を誘導する免疫アジュバンドとしてアレルギー疾患への応用が期待されている。我々の検討において、IgG4 関連疾患の肺病変においても、CpG-ODN が新規治療薬の候補となる可能性について示唆された。今後、CpG-ODN 投与のタイミングや投与量などの条件設定をさらに詳細に行うことにより、TLR-9 アゴニストの治療応用の可能性についてさらに検討を進めていきたいと考えている。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

1)

〔学会発表〕(計 3 件)

- 1) Matsui S, Okazawa S, Tokui K, Kambara K, Imanishi S, Taka C, Yamada T, Inomata M, Miwa T, Hayashi R, Tobe K. Allergy in IgG4-related disease. AAAI/WAO Joint Congress 2018; 2018 Mar 2-5; Orlando.
- 2) Waseda Y, Matsui S, Yamada K, Mizuguchi K, Watanabe S, Ito K, Zuka M, Malissen M, Kawano M, Ishizuka T. Evaluation of Lung Lesions in LAT^{Y136F} Mutant Mice. ATS 2018 International Conference; 2018 May 18-23; San Diego.
- 3) 早稲田優子, 松井祥子, 渡辺知志, 佐藤譲之, 杉山光寿, 中嶋康貴, 三ツ井美穂, 島田昭和, 園田智明, 山口牧子, 本定千知, 門脇麻衣子, 重見博子, 梅田幸寛, 森川美羽, 安斎正樹, 石塚全. Lat Y136F knock-in マウス (IgG4 関連肺疾患モデルマウス) の肺病変の解析. 第58 回日本呼吸器学会学術講演会; 2018 Apr 27-29; 大阪.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年:
国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

川野 充弘 (KAWANO, Mitsuhiro)

金沢大学・大学病院・講師

研究者番号： 20361983

山田 和徳 (YAMADA, Kazunori)

金沢大学・医薬保健学総合研究科・特任准教授

研究者番号： 90397224

林 龍二 (HAYASHI, Ryuji)

富山大学・大学病院・講師

研究者番号： 60345585

伊藤 清亮 (Itoh, Kiyooki)

金沢大学・大学病院・医員

研究者番号： 10467110

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。