

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10818

研究課題名(和文) ヒト唾液腺上皮に着目したIgG4関連疾患における線維化メカニズムの解明

研究課題名(英文) Investigation of the mechanism of fibrosis in IgG4-related disease

研究代表者

高野 賢一 (Takano, Kenichi)

札幌医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70404689

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：IgG4関連疾患(IgG4RD)および正常由来のHSGFsにおける遺伝子発現をマイクロアレイ法にて解析したところ、IgG4RD由来HSGFsにおいて線維化に關与するIL-6、IL-18、TSLP、MMP1の有意な発現上昇が認められ、免疫組織染色、RT-PCR、Westernblot法でも確認できた。EILSA法にてIgG4RD由来HSGFsではIL-6濃度の有意な上昇を認めた。炎症性サイトカイン処置によりIL-6の著明な産生誘導を認めた。NF- κ B阻害剤を用いた検討から、IL-6の産生誘導はHSGFs内のNF- κ BおよびWISP1を介していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In GeneChip analysis, mRNAs of IL-6, IL-18, TSLP and MMP1 were highly expressed in the fibroblasts from SMG tissue of patients with IgG4-RD than in normal. The expression and secretion of IL-6 was greatly higher in IgG4-RD SMG fibroblasts than in normal. The expression and the secretion of IL-6 was upregulated by treatment with IL-1, TNF or TNF/TGF-. NF- κ B inhibitor curcumin prevented the secretion and the expression of IL-6 induced by IL-1 or TNF/TGF- in the IgG4-RD SMG fibroblasts. Wnt1-inducible signaling protein 1 (WISP1) was also increased in the IgG4-RD SMG fibroblasts than in the normal. Curcumin also prevented WISP1 expression induced by IL-1 or TNF/TGF- in the normal. Treatment with IL-6 or WISP1 increased G2/M phase of the SMG fibroblasts in the normal. Expression of TSLP and IL-33 was increased in the IgG4-RD SMG fibroblasts than in the normal.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：唾液腺 IgG4関連疾患 線維化 繊維芽細胞 IL-6

1. 研究開始当初の背景

IgG4 関連涙腺・唾液腺炎 (IgG4-DS, いわゆるミクリッツ病) の臨床的特徴は、持続する涙腺・唾液腺の腫脹および腺分泌障害を認める疾患であり、ときに自己免疫性膵炎などの他臓器合併症を伴う。組織学的には IgG4 陽性形質細胞浸潤に加え、storiform fibrosis pattern などと呼ばれる特徴的な線維化を来す。これまでの世界的な研究でも、高度な「線維化」がなぜ進むのかほとんど分かっていない。しかし興味深いことに、同じ患者から採取された小唾液腺 (口唇腺) と大唾液腺 (顎下腺) を比較すると、小唾液腺ではほとんど線維化が認められない。一方で病変局所においては、Th2 サイトカイン (IL-4, IL-13) に加え、制御性 T 細胞 (Treg) 産生サイトカイン (IL-10, TGF- β) の発現増加が報告され、線維化に関わると考えられているが、詳細なメカニズムに関しては不明である。線維化のメカニズムを解明することは、多臓器病変を来す IgG4 関連疾患の罹患臓器不全の進行予防や新治療法の開発に極めて重要である。

2. 研究の目的

ヒト顎下腺組織由来の線維芽細胞 (Human submandibular gland fibroblasts :HSGFs) (図1) を用いて、線維化に関わる因子と病態への関与を明らかにする目的で検討を行い、ステロイド抵抗性や再燃例の増加といった臨床的問題を解決する可能性のある抗線維化という新しいアプローチによる治療法開発に繋げていく。

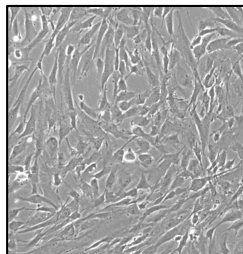


図1 培養線維芽細胞 (Human submandibular gland fibroblasts :HSGFs)

3. 研究の方法

IgG4RD の確定診断目的に当科にて顎下腺摘出を行った顎下腺組織、対照として頸部郭清などで顎下腺摘出を行った正常顎下腺である。方法は、顎下腺組織から得られた線維芽細胞を分離培養し、DNA マイクロアレイ法、免疫染色法、RT-PCR 法、Western blot 法、ELISA 法、細胞周期解析法を用いて解析した。

4. 研究成果

IgG4RD および正常由来の HSGFs における遺伝子発現をマイクロアレイ法にて解析したところ、IgG4RD 由来 HSGFs において線維化に関与する分子として、IL-6, IL-18, TSLP, MMP1 の有意な発現上昇が認められた。免疫組織染色を行うと、IgG4RD 由来顎下腺組織では IL-6, IL-18,

TSLP, MMP1 の高発現を認めた (図2)。

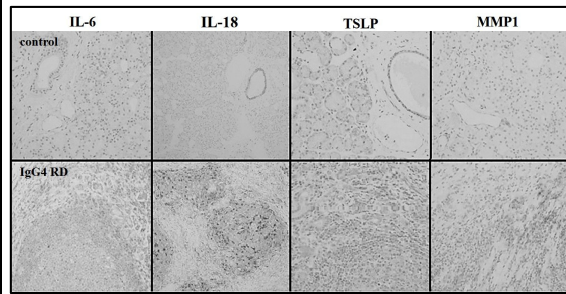


図2 正常および IgG4RD 患者由来の顎下腺組織に対する免疫組織化学染色

IgG4RD 由来 HSGFs では RT-PCR および Western blot 法にて IL-6 の発現上昇を認め、培養上清を EILSA 法にて解析すると IgG4RD 由来 HSGFs では正常コントロールに比べて、IL-6 濃度の有意な上昇を認めた (図3)。

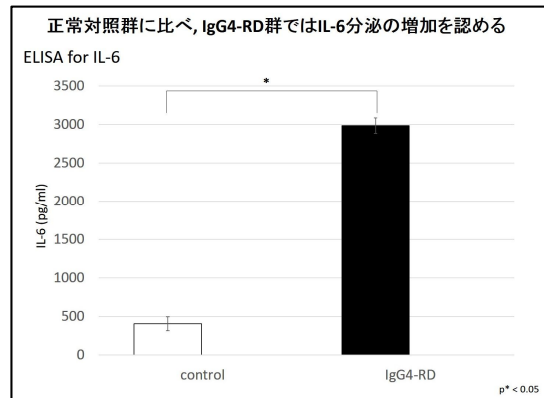


図3 HSGFs における培養上清中の IL-6 に対する ELISA 法による解析

さらに HSGFs に TNF α , IL-1 β , IFN γ の各炎症性サイトカインを処置すると、ELISA 法にて IL-6 の著明な産生誘導を認めた。

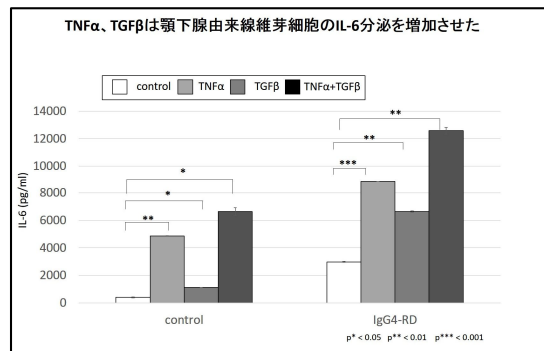


図4 炎症性サイトカイン処置後の HSGFs における培養上清中の IL-6 (ELISA 法)

NF- κ B 阻害作用 curcumin を用いた検討から、IL-6 の産生誘導は HSGFs 内の NF- κ B を介していることが示唆された (図 5)。

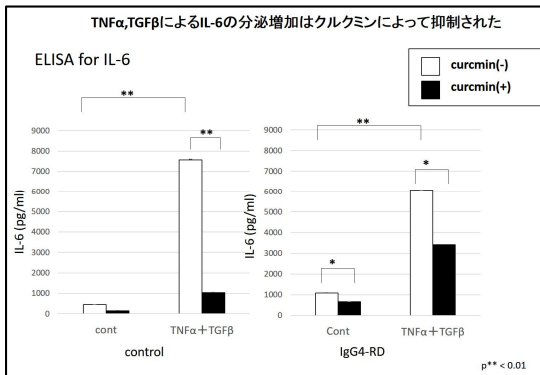


図 5 Curcumin 処置後の HSGFs における培養上清中の IL-6 (ELISA 法)

さらに、肺線維症に関与するとされる Wnt1-inducible signaling protein 1 (WISP1) の発現上昇も認められており、curcumin 処置により IL-1 や TNF/TGF により誘導される WISP1 の発現が抑制された。IL-6 または WISP1 の処置は細胞周期の G2/M 期の増加を正常 HSGFs において誘導した (図 6)。TSLP, IL-33 に関しても同様の結果が得られている。

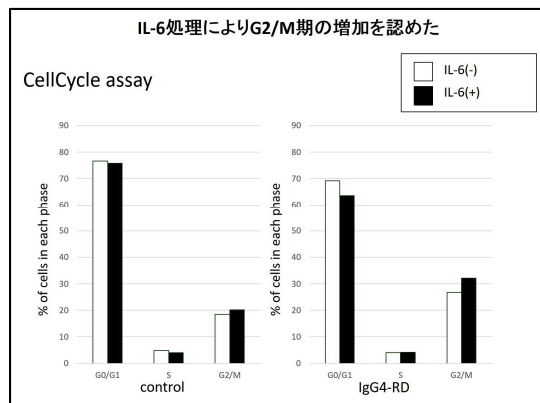


図 6 IL-6 処置をした HSGFs における細胞周期解析

IgG4RD における線維化は組織障害をもたらし、唾液分泌能や治療による改善率にも影響することがわかっている。今回の検討から、IgG4RD 顎下腺局所において線維芽細胞から NF- κ B, WISP1 を介して IL-6, IL-33, TSLP などの産生が誘導され、その結果さらなる線維芽細胞の集積、増殖によって線維化が促進されることが示唆された (図 7)。

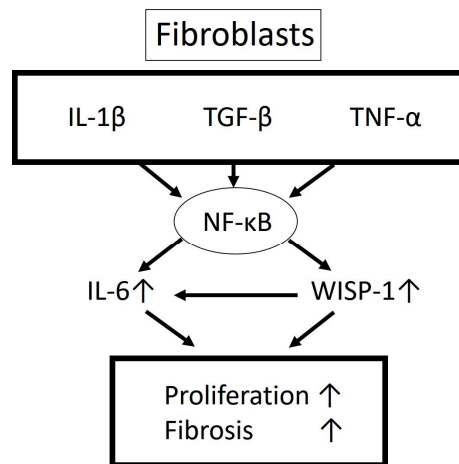


図 7 本研究から示唆された IgG4RD における線維化メカニズム

5. 主な発表論文等

(研究代表者, 研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計7件)

Takano K, Okuni T, Yamamoto K, Kamekura R, Yajima R, Yamamoto M, Takahashi H, Himi T. Potential utility of core needle biopsy in the diagnosis of IgG4-related dacryoadenitis and sialadenitis. Mod Rheumatol (in press)

Yamamoto M, Takano K, Kamekura R, Suzuki C, Ichimiya S, Himi T, Nakase H, Takahashi H. Stage classification of IgG4-related dacryoadenitis and sialadenitis by the serum cytokine environment. Mod Rheumatol (in press)

Takano K, Yajima R, Kamekura R, Yamamoto M, Takahashi H, Yama N, Hatakenaka M, Himi T. Clinical utility of 18 F-fluorodeoxyglucose/positron emission tomography in diagnosis of immunoglobulin G4-related sclerosing sialadenitis. Laryngoscope. 2018;128(5):1120-1125

Kamekura R, Takano K, Yamamoto M, Kawata K, Shigehara K, Jitsukawa S, Nagaya T, Ito F, Sato A, Ogasawara N, Tsubomatsu C, Takahashi H, Nakase H, Himi T, Ichimiya S. Cutting Edge: A Critical Role of Lesional T Follicular Helper Cells in the Pathogenesis of IgG4-Related Disease. J Immunol. 2017;199(8):2624-2629.

Takano K, Yamamoto M, Takahashi H, Himi T. Recent advances in knowledge regarding the head and neck manifestations of IgG4-related disease. Auris Nasus Larynx. 2017;44(1):7-17

Takano K, Yamamoto M, Ichimiya S, Takahashi H, Himi T. Assessing the usefulness of salivary gland biopsy for diagnosis of type-1 autoimmune pancreatitis. Mod Rheumatol. 2017;27(3):548-550

IgG4 関連疾患の発症・病態形成のメカニズム. 高野 賢一. アレルギーの臨床 36 巻 13 号 Page1236-1240

[学会発表](計4件)

IgG4 関連疾患における線維化関連因子の検討(2016年日本口腔・咽頭科学会). 高野 賢一, 矢島 諒人, 亀倉 隆太, 坪松 ちえ子, 氷見 徹夫

IgG4 関連疾患における PET/CT 検査の有用性とピットフォール. (2017年日本耳鼻咽喉科学会). 高野 賢一, 矢島 諒

人, 亀倉 隆太, 氷見 徹夫

IgG4 関連涙腺・唾液腺の病変部位における IgG4 産生機構の解明(2017年日本病理学会). :伊藤 史恵, 亀倉 隆太, 川田 耕司, 高野 賢一, 氷見 徹夫, 一宮 慎吾

IgG4 関連疾患における唾液腺の線維化メカニズムの解析(2018年日本アレルギー学会). 矢島 諒人, 高野 賢一, 氷見 徹夫, 小島 隆

[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:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高野 賢一 (Kenichi Takano)
札幌医科大学・耳鼻咽喉科・准教授
研究者番号: 70404689

(2) 研究分担者

矢島 諒人 (Ryoto Yajima)
札幌医科大学・耳鼻咽喉科・研究員
研究者番号: 90722455

垣内 晃人 (Akito Kakiuchi)
札幌医科大学・耳鼻咽喉科・研究員
研究者番号: 60722436

(3) 連携研究者

()
研究者番号:

(4) 研究協力者

()