

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：32203

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K20610

研究課題名(和文) IgG4関連疾患の新規診断法を目指した疾患特異的miRNAの同定

研究課題名(英文) Identify of disease-specific miRNA for a novel diagnosis of IgG4-related disease

研究代表者

土田 修史(Tsuchida, Shuji)

獨協医科大学・医学部・助教

研究者番号：80644187

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：IgG4関連疾患患者の血液と唾液からエクソソームの分離およびRNA採取からmiRNAマイクロアレイ解析による発現変化を試みたが、現状の方法では明確な差は見いだせなかった。選定したIgG4関連疾患患者において、口腔顎顔面領域の症状や口唇腺生検の組織像の評価で、疾患の診断補助や病勢の評価、治療の効果判定が可能かどうかの検討した。63例中18例(29%)は口腔顎顔面の症状を呈しており、口唇腺生検を行った20例中19例(95%)ではIgG4陽性形質細胞が認められた。なお、その他疾患患者から採取された口唇腺の免疫染色では、ほとんどすべてで陰性であり、意義のある結果と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究においては、IgG4関連疾患に特異的なmiRNAが同定できれば、唾液および血液検査から疾患の早期診断につながった可能性があるが、血清からのエクソソームの抽出が出来ず、予想したようなmiRNAの同定には至らなかった。今後の研究で、IgG4関連疾患に特異的なmiRNAの同定と疾患の診断・診断補助や病勢の評価を可能にしたいと考える。

研究成果の概要(英文)：Attempts were made to separate exosomes from blood and saliva of patients with IgG4-related disease, and to change their expression by mi-RNA microarray analysis from RNA, but no clear difference could be found by the current method. In the selected patients with IgG4-related disease, we examined whether it is possible to assist diagnosis of this disease, evaluate disease status, and determine the effect of treatment by evaluating the symptoms of the oral and maxillofacial region and the histopathological examinations of labial minor salivary gland biopsy. Eighteen out of 63 patients (29%) had oral and maxillofacial symptoms, and IgG4 positive plasma cells were found in 19 of 20 (95%) who underwent a labial minor salivary gland biopsy. In addition, immunostaining of a labial minor salivary gland taken from patients with other diseases was negative in almost all cases, which was considered to be a significant meaning.

研究分野：口腔外科学

キーワード：IgG4関連疾患 血清IgG4値 口唇腺生検

## 1. 研究開始当初の背景

IgG4関連疾患 (IgG4-RD) は、リンパ球とIgG4陽性形質細胞の著しい浸潤と線維化により、同時性あるいは異時性に全身諸臓器の腫大や結節・肥厚性病変などを認める原因不明の疾患である。罹患臓器としては、膵臓、胆管、涙腺・唾液腺、中枢神経系、甲状腺、肺、肝臓、消化管、腎臓、前立腺、後腹膜、動脈、リンパ節、皮膚、乳腺などが知られている。本疾患は長年の間、その診断基準がなく、臓器がんや悪性リンパ腫などと誤診されることも少なくなかったが、近年になり、IgG4-RDの臨床診断基準が提唱された。すなわち、(1)臨床的に単一または複数臓器に特徴的なびまん性あるいは限局性腫大、腫瘤、結節、肥厚性病変を認めること。(2)血液学的に高IgG4血症 (135mg/dl以上) を認めること。(3)病理組織学的に以下の2つを認める。①組織所見：著明なリンパ球、形質細胞の浸潤と線維化を認める。②IgG4陽性形質細胞浸潤：IgG4/IgG陽性細胞比40%以上、かつIgG4陽性形質細胞が10/HPFを超える。上記のうち、(1)+(2)+(3)を満たすものを確定診断群 (definite)、(1)+(3)を満たすものを準確定診断群 (probable)、(1)+(2)のみを満たすものを疑診群 (possible) としている (日内会誌 101:795-804,2012)。しかしながら、「本診断基準の基本コンセプトは、鑑別に最も重要な悪性腫瘍を除外するために病理組織所見を重視する」と記載されており、病理所見が得られない場合は疑診群となる。すなわち、頭頸部領域のIgG4-RDの確定診断には、侵襲的な大唾液腺生検あるいは摘出が必要である。

われわれは、IgG4RDのより低侵襲な診断法の確立を目指し、すでにIgG4-RDの診断がついた6例の患者から口唇腺を採取し、IgG4の免疫組織化学染色を行った (第21回日本口腔粘膜学会総会・学術集会で発表)。その結果、IgG4-RD患者5例中2例(33%)の口唇腺で著明なIgG4陽性形質細胞を認めたが、4例ではIgG4陽性形質細胞が少数あるいは全く認められず、口唇腺におけるIgG4の染色はIgG4RDの確定診断には適さないことが明らかとなった。

## 2. 研究の目的

現在、IgG4関連疾患研究梅原班などが、DNAマイクロアレイやプロテインアレイなどを用い、IgG4-RDの原因遺伝子を探索中のようにあるが、依然、罹患臓器の病理組織学的所見に頼らざるをえないのが現状である。近年、タンパク質に翻訳されないRNA分子であるnon-coding RNAの一種として、マイクロRNA(miRNA)が発見された(Science294:853,2001)。miRNAはmRNAの3'非翻訳領域に結合し、主に標的mRNAの安定性やタンパクへの翻訳を阻害すると考えられている。さらに最近になり、miRNAの中には、エクソソームと呼ばれるナノサイズの顆粒に包埋され、血中あるいは唾液中でも極めて安定に存在する分泌型miRNAがあることが明らかになった(Cancer Sci. 2010; 101: 2087-92)。現在のところ、miRNAはがん、感染症、生活習慣病および難聴などの様々な疾患に関与することが知られており、上述の疾患に対する血液や唾液を利用した診断マーカーへの応用が試みられている(Front Genet. 2013; 4: 173)。そこで、本研究では、IgG4-RDに特異的な血中あるいは唾液中のマイクロRNA(miRNA)を同定し、低侵襲かつ簡便な確定診断法を確立することを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1)過去に診断のついたIgG4-RD患者6名と以降にIgG4-RDと診断された患者より血液と唾液を採取する。さらに、healthy volunteerも同様に血液と唾液を採取し、共に血清IgG4値の確認も行う。(2)採取した各血液と唾液を1mlずつプールしたものよりエクソソームを分離し、RNAを採取後、miRNAマイクロアレイを行う。(3)(2)で発現変化の見られたmiRNAの発現を定量性PCRにて再確認する。(4)(3)で再現性のあったmiRNAの発現を、各患者あるいは健常人ごとに定量性PCRで確認する。このとき、血清IgG4値とmiRNAの発現の相関性を検討する。(5)健常人およびIgG4-RD患者由来の末梢血単核球(PBMC)における同定したmiRNAの発現を検討する。(6)IgG4-RDの患者で特異的に発現変動しているmiRNAが、健常人由来PBMCのIgG4産生に与える影響の検討を行う。(7)IgG4-RDの患者で特異的に発現変動しているmiRNAが、IgG4-RD患者由来PBMCのIgG4産生に与える影響の検討を行う。(8)(6)(7)でIgG4産生に影響を与えたmiRNAに対する標的mRNAを検索する。

## 4. 研究成果

これまでにIgG4-RD患者において、口腔顎顔面領域の症状や口唇腺生検による組織像の評価で、IgG4-RDの診断の補助や病勢の評価、治療の効果判定が可能であるかの検討を行った。63例中45例(71%)は口腔顎顔面領域の症状はなく、18例(29%)はなにかしらの症状が認められた。18例は2つ以上の症状があり、15例には顎下腺腫脹が認められ、5例には口腔乾燥が認められ、4例は耳下腺腫脹が認められ、2例は摂食痛が認められた(Fig.1)。IgG4-RD患者の血清IgG4値は175から2790mg/dlであった。口腔顎顔面領域の症状・機能とIgG4陽性形質細胞比の関係について検討したところ、唾液腺腫脹とIgG4陽性形質細胞比、口腔乾燥とIgG4陽性形質細胞比、唾液腺機能とIgG4陽性形質細胞比には有意な差は認められなかった( $P>0.05$ )。また、血清IgG4値に関しても相関は認められなかった(Fig.2)。当院においてIgG4-RDと診断された患者のうち、口唇腺生検を行った20例中19例(95%)ではIgG4陽性形

質細胞が認められた。なお、粘液嚢胞やシェーグレン症候群患者から採取された口唇腺の免疫染色では、ほとんどすべてで陰性であったことからすると、意義のある結果と考えられた。これらの研究成果は「Oral and maxillofacial symptoms of patients with IgG4-related disease: the meaning of a labial minor salivary gland biopsy」として発表した。本研究ではまず、IgG4-RDの診断がついている患者の血液と唾液からエクソソームを分離し、RNAを採取後、miRNAマイクロアレイを行う予定であったが、当初予測していたIgG4-RD患者の血液と唾液からでは、エクソソームの分離、およびRNA採取からmiRNAマイクロアレイ解析による発現変化を確認することができなかった。これは、選定したIgG4-RD患者はすでに治療介入がなされていたため、採血結果および唾液流出量に関しては改善していた可能性があり、有意な差がでなかったと示唆された。その後、治療介入がされていないIgG4-RD患者の選定を始めていたが、患者選定は、当科初診の症例のみの対応は困難であった。そのため、当病院当該科と連携し症例を募ったが症例の選出は困難であった。また、IgG4-RD患者の血液と唾液からエクソソームの分離、およびRNA採取からmiRNAマイクロアレイ解析による発現変化を試みたが、現状の方法では明確な差は見いだせなかった。

Fig.1 IgG4-RD患者の口腔顎顔面症状

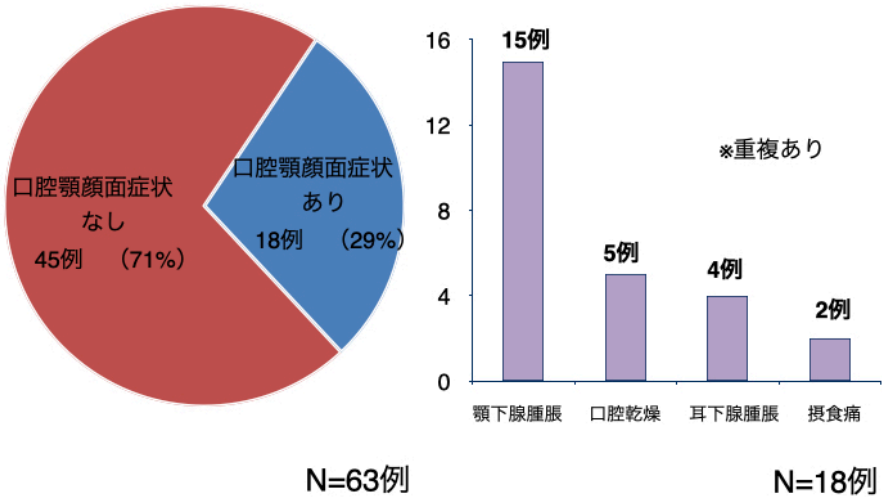
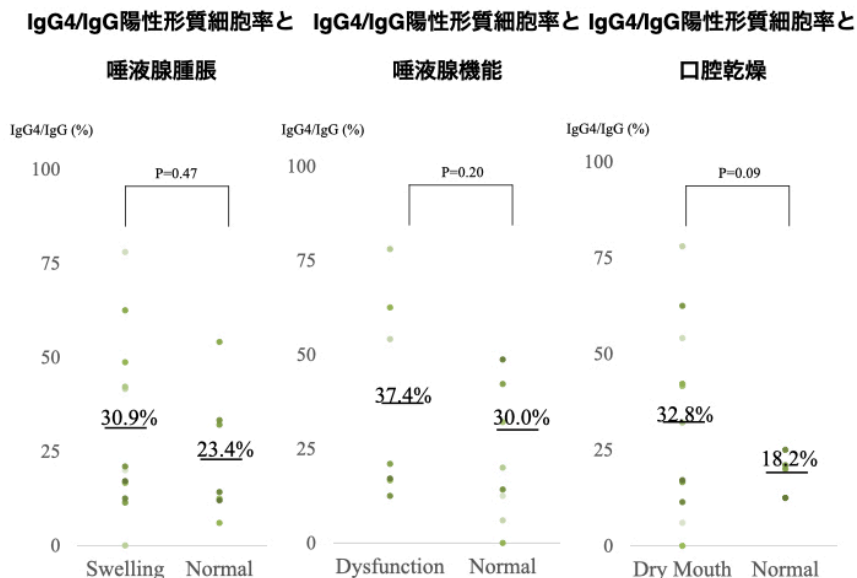


Fig.2 口腔顎顔面領域の症状・機能とIgG4陽性形質細胞比の関係



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 和久井崇大, 泉 さや香, 越路千佳子, 栗林伸行, 小宮山雄介, 土田修史, 木内 誠, 長谷川智則, 内田大亮, 川又 均	4. 巻 64
2. 論文標題 口腔扁平上皮癌頸部リンパ節転移の評価におけるFDGPET/造影CT の有用性と限界	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本口腔外科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 568-576
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.5794/jjoms.64.568">https://doi.org/10.5794/jjoms.64.568</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shuji Tsuchida, Takahiro Wakui, Maki Okubo, Daisuke Uchida, Hitoshi Kawamata,	4. 巻 30
2. 論文標題 Oral and maxillofacial symptoms of patients with IgG4-related disease: the meaning of a labial minor salivary gland biopsy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology	6. 最初と最後の頁 439-444
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajoms.2018.03.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 荻澤翔平, 志村美智子, 澤谷祐大, 上村亮太, 土田修史, 川又 均, 姫島皓大, 外木守雄
2. 発表標題 「Teacher Collins症候群の睡眠呼吸障害がSSROおよびおとがい形成術により改善した症例
3. 学会等名 第64回日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shuji Tsuchida, Atsuko Nagayama, Daisuke Uchida, Hitoshi Kawamata
2. 発表標題 CLINICAL FEATURE OF SJOGREN ' S SYNDROME IN OUR HOSPITAL COMPARISON OF THE JAPANESE CRITERIA WITH THE INTERNATIONALLY APPROVED CRITERIA EDITED BY AMERICAN COLLEGE OF RHEUMATOLOGY (ACR)
3. 学会等名 23rd International Conference On Oral & Maxillofacial Surgery 2017
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----