

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16211

研究課題名（和文）IgG4関連疾患における内分泌異常の病態解明と治療反応性予測

研究課題名（英文）Prediction of the parameters associated with endocrine disorders in IgG4-related disease

研究代表者

竹島 健（Ken, Takeshima）

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：40647517

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）：本研究では、IgG4関連疾患に対する治療前後の内分泌機能に関わるパラメーターの探索と病態解明を試みた。IgG4関連疾患患者を前向きに登録し、治療前後で末梢血単核細胞を採取し、フローサイトメトリーを用いたリンパ球解析を行った。病理組織学的検討では、IgG4関連膵疾患患者の細胞診検体を用いて、細胞（グルカゴン）、細胞（インスリン）の残存の程度と耐糖能異常、インスリン分泌能との関連を検討した。IgG4関連疾患モデルマウス作成のため、患者保存血清からの抗体精製を試みた。IgG4関連膵炎、甲状腺炎、下垂体炎を発症した患者毎に、モデルマウス作成に必要な抗体回収と動物実験条件検討を継続的に行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、これまで十分な検討が行われていない IgG4関連疾患に伴う内分泌異常（下垂体病変、甲状腺病変、膵内分泌異常）に着目した。自己免疫性膵炎患者のEUS-FNAサンプルを用いた検討では、細胞に比して細胞障害の程度が強く、膵島消失の程度が強いほどステロイド治療前後の耐糖能悪化と関連する可能性が示されており、今後、ステロイド治療の際の血糖増悪指標の一つとなる可能性が示唆された。今後、患者血清から精製したIgG抗体や内分泌臓器病変を伴うIgG4関連疾患モデル作成を試みることで、IgG4関連疾患に伴う内分泌病変の病態を明らかにすることができる点で意義がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, we tried to elucidate parameters associated with endocrine disorders in IgG4-related disease. Patients with IgG4-related disease were prospectively included to this study. Mononuclear cells were obtained from peripheral blood of the patients and analyzed by flow cytometry. Specimens from EUS-FNA in patients with autoimmune pancreatitis were pathologically analysed. Paraffin embedded sections were immunostained with anti-insulin and anti-glucagon antibodies. The association between islet counts, alpha/beta cell ratios and insulin secretory capacity were evaluated. To create IgG4-related disease mouse model, we purified IgG antibodies from serum of patients with IgG4-related disease and created experimental conditions.

研究分野：内分泌代謝学

キーワード：IgG4関連疾患 甲状腺 糖尿病 下垂体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

IgG4 関連疾患は、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全身諸臓器の腫大を認める原因不明のまれな疾患である (New Engl J Med 2016)。罹患臓器は膵臓、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、乳腺など多岐に亘る。自己免疫性膵炎や涙腺唾液腺炎 (ミクリッツ病) が典型的疾患であるが、近年、視床下部下垂体炎や IgG4 甲状腺炎など内分泌病変に関する報告も相次いでいる。治療の第一選択はステロイド治療であり、再燃・再発を来たす症例では長期ステロイド投与や免疫抑制剤併用が考慮されるが、未だ明確な治療法は確立していない。

これまで研究代表者は、厚生労働省 IgG4 関連疾患調査研究班 (内分泌神経領域) の研究協力者として臨床研究に携わり、血清 IgG4 高値の甲状腺疾患 (橋本病、バセドウ病) 患者における臨床的特徴 (低エコー拡大、高年齢) について報告を行った (Thyroid 2014, Endocr J 2015)。これらの検討過程で自己免疫性膵炎患者の多くが耐糖能異常を合併 (自験例 91%) し、一部の症例においてインスリン分泌能が維持・改善することを経験し、報告した (第 58 回糖尿病学会学術総会)。

しかし、自己免疫性膵炎に伴う耐糖能異常や視床下部下垂体炎、甲状腺疾患に伴う内分泌機能異常発症の病態は未だ不明であり、ステロイド治療に対する反応性や内分泌機能温存に関わるパラメーターについても十分なエビデンスがない。また、IgG4 関連疾患に合併した内分泌臓器病変を検討するためのモデル動物も得られていない。

2. 研究の目的

本研究では、IgG4 関連疾患に伴う内分泌異常 (下垂体病変、甲状腺病変、膵内分泌異常) に着目し、臨床検査データ、罹患臓器の病理組織学的検討、フローサイトメトリーを用いた末梢血単核球解析を用いて、ステロイド治療前後の内分泌機能の変化と機能温存に関わるパラメーターを探索すること、患者血清を用いて IgG4 関連疾患モデル作成を試みることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ステロイドに対する治療反応性および内分泌機能温存に関わるパラメーターの探索

a) フローサイトメトリーを用いた末梢血単核球プロファイル

IgG4-RD 患者の末梢血から Ficoll を用いて末梢血単核球 (PBMC) を単離し、フローサイトメトリー (FACS) を用いてリンパ球プロファイルを解析する。リンパ球プロファイルは、表面抗原マーカーを用いて、IgG4 産生に関わる形質細胞・形質芽細胞、これらの活性化に関わる濾胞性 T 細胞 (Tfh) およびサブセット、各臓器障害を来たす細胞障害性 T 細胞 (CTL) をカウントし、ステロイド治療前後の内分泌異常との関連を検討した。

b) 膵病理組織切片を用いた膵島細胞の検討

EUS-FNA を行った自己免疫性膵炎 (IgG4 関連膵炎) 患者のパラフィンブロックから未染切片を作成し、蛍光免疫染色を行った。一次抗体は、Polyclonal guinea pig anti-insulin, ready to use (IR002, Dako)、Glucagon Polyclonal Antibody (bs-3796R, Bioss)、2次抗体は Alexa Fluor 色素標識抗体を用い、それぞれ細胞 (インスリン陽性細胞)、細胞 (グルカゴン陽性細胞) として各細胞数、膵島および / 細胞数比を算出した。膵島数および構成細胞数・比率と耐糖能異常との関連を検討した。

(2) 患者血清 IgGs を用いた内分泌病変合併 IgG4 関連疾患モデルマウスの作成

IgG4 関連疾患患者の血清 IgGs を用いて唾液腺炎、膵炎が発症したとの報告があり、各臓器の対応抗原に対する IgG 抗体が臓器病変発症に関与する可能性も示唆されている (Gut 2016)。内分泌臓器病変を伴う IgG4 関連疾患モデルマウスはこれまで検討されておらず、病理組織学的に下垂体・甲状腺病変を確認できれば、膵病変と併せて内分泌異常の発症機序や内分泌機能温存に関わる因子を検討できると考え、以下の手法を行った。

a) 患者血清からの IgGs 精製

IgG4 関連疾患患者から全血採血を行い、遠心分離後、血清を採取した。Ab-Rapid pure EX を用いて患者血清から IgG を精製し、クマシー染色にて IgG 重鎖 (H 鎖)、軽鎖 (L 鎖) のバンド確認を行った。精製後の抗体は、蛋白定量 (Bradford 法) を行った上、抗体が正しく単離できているかを確認した。その後、透析膜に包埋し、PBS 液で一晩透析処理を行い、Amicon Ultra-4 にて 4500rpm、4、30 分以上遠心を行い、濃縮の上、凍結保存した。

b) マウスへの皮下投与と解剖

患者血清由来 IgGs を新生児マウスに 10~20mg/gBW を 200μL PBS に希釈した上で皮下投与し、12 時間後にイソフルレン麻酔後、全血採血にて安楽死させ、摘出臓器の組織学的評価を行う。IgG4 関連疾患の影響を受けやすい臓器病変および内分泌臓器として、膵、唾液腺、下垂体、甲状腺を採取する。各臓器はホルマリン固定を行い、パラフィンブロックを作成後、未染切片を作成し、HE 染色及び免疫染色にて病理組織学的に IgG4 関連疾患に特徴的な病理所見を呈するかを検討する。抗体の投与量、投与回数、投与期間は条件検討を行い、最も臓器病変の程度が強い条件を選択する。

4. 研究成果

(1) ステロイドに対する治療反応性および内分泌機能温存に関わるパラメーターの探索

a) フローサイトメトリーを用いた末梢血単核球プロファイル

末梢血から単核球が単離できた IgG4 関連疾患患者 4 名と健常者 1 名において、血球プロファイルを検討した。各患者の血清 IgG4 値を含む抗体測定値と臓器病変の内訳を表 1 に示す。

No.	sample	IgG4	IgG	Eos	IgE	臓器病変
1	HC	-	-	-	-	
2	RD#1	2420	4043	6380	3041	腎門部腫瘍、顎下腺炎、縦郭リンパ節
3	RD#2	539	1704	110	205	AIP、顎下腺炎s/o
4	RD#3	35	1591	30	103*	顎下腺炎(右>左)、右顎下腺摘出後
5	RD#4	597	2165	130	163	腎門部腫瘍、両側水腎症

表 1) IgG4 関連疾患患者 4 名 (RD#1-4) と健常者 1 名 (No.1) の臨床プロファイル

* 赤字は高値の検査値を示す。

** RD#3 は、顎下腺摘出術後のため血清 IgG4 値は正常化している。

5 症例のうち、ステロイド治療を行った RD#1,2,5 については、ステロイド治療前後の末梢血単核球の単離を行った。図 1 に RD#2 の患者でのステロイド治療前後におけるリンパ球プロファイルを示す。IgG4 抗体産生に関わるろ溶性 T 細胞 (Tfh) は、CD3+CD4+ でゲーティングしたうちの CXCR5+CD45RA- 細胞であり、図 1 の青い region of interest (ROI) で囲った領域の細胞となる。Tfh サブクラス (緑) は、Tfh17 (CCR6+/CXCR3-)、Tfh2 (CCR6-/CXCR3-)、Tfh1 (CCR6-/CXCR3+) の 3 種類に分けられ、更に活性化した Tfh (activated Tfh) は CCR7-PD1+ の Tfh で赤の ROI で示してある。ステロイド治療前後において、Tfh の総数は明らかに低下しているが、特に IgG4 抗体産生に関わる Tfh2 サブクラス減少の程度が強かった。これらの傾向は、activated Tfh においても同様で、activated Tfh2 の低下が最も顕著であった (図 2)。

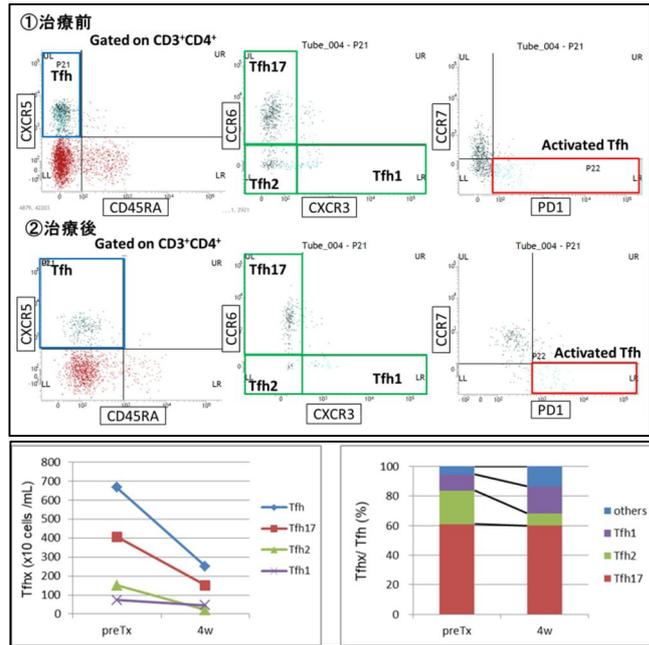


図 1) ステロイド治療前後のろ溶性 T 細胞比較
上段: ドットプロットで示した Tfh サブクラス
下段: Tfh サブクラスの数 (左) と割合 (右)

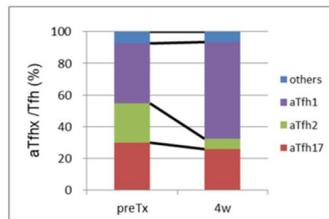
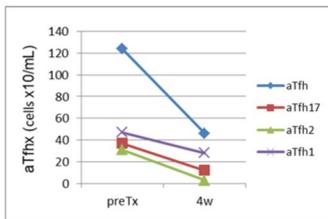


図 2) ステロイド治療前後の activated Tfh 比較
上段: ドットプロットで示した activated Tfh サブクラス
下段: activated Tfh サブクラスの数 (左) と割合 (右)

次に、組織障害に関わる細胞障害性 T 細胞 (CTL) について検討を行った。図 3 に RD#1, #4 患者のステロイド治療前後における CTL の割合をドットプロットで示す。CTL は CD4+ 細胞のうち CD62+CD27- 細胞として青い ROI で囲った領域であり、そのうち IgG4 関連疾患で病態形成に関与すると思われる CD4+SLAMF7+CTL の割合を算出すると、ステロイド治療により RD#1: 64% 43%、RD#4: 78% 53% と低下していることが分かる。

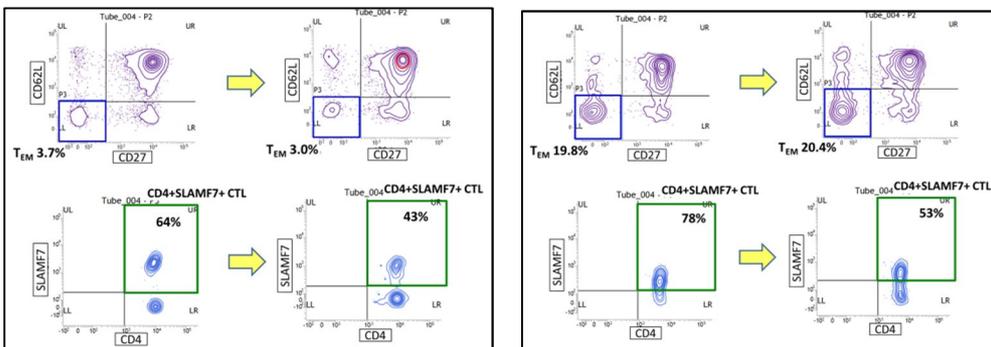


図 3) ステロイド治療前後における CTL 割合の推移 (左 RD#1、右 RD#4)

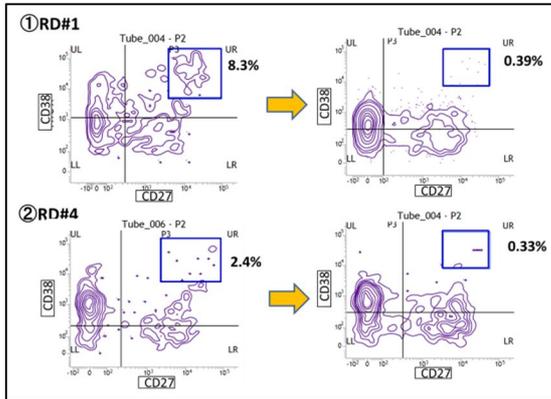


図4) ステロイド治療前後における plasmablast 割合の推移 (上段: RD#1、下段: RD#4)

更に、血清 IgG4 産生形質細胞の産生に関する形質芽細胞 (plasmablast) のステロイド治療前後での変化を検討した。Plasmablast は CD19+CD38^{high}CD27^{high} 細胞であり、図4の右上に現れる青い ROI の細胞集団である。ステロイド治療前後において、血清 IgG4 値が高値であった RD#1、#4 において、plasmablast の顕著な低下が示された。これらは、ステロイド治療による血清 IgG4 の低下に関係しており、ステロイド減量後の IgG4 上昇及び再発の指標となる可能性が示唆された。

以上から、IgG4 産生形質細胞の活性化に關与する Tfh、組織障害を来たす CTL、IgG4 産生の指標となりうる plasmablast が相互に關与し、血清 IgG4 上昇を伴う IgG4 関連疾患の病態形成に關与することが示唆された。

一方で、ステロイド治療を行わずに経過観察する症例があったり、他科にてすでにステロイド投与が行われていたり、診断からステロイド治療までの遅れにより治療介入後 f/u 採血に時間がかかり末梢血単核球が未だ得られていない場合などの理由により、すべての対象症例において検討が行えていない。そのため、現段階では内分泌異常との関連を十分示すには至っていないが、今後、継続的に症例サンプルを蓄積し耐糖能異常を含む内分泌異常の程度や治療反応性との関連を明らかにしていきたいと考えている。

b) 膵病理組織切片を用いた膵島細胞の検討

2009年3月~2017年6月に自己免疫性膵炎と診断された17名の患者のうち診断のためにEUS/FNAを行い、その残サンプルが得られた7名の患者のパラフィンブロックから未染切片を作成した。同切片の典型的なHE染色像を右に示す(図5)。細胞診検体は、顕著な炎症細胞浸潤と線維化のため腺房細胞は破壊され、少数の膵島が残存するのみとなっていた。また、細胞診検体であることから出血に伴う血球成分が多く認められた。

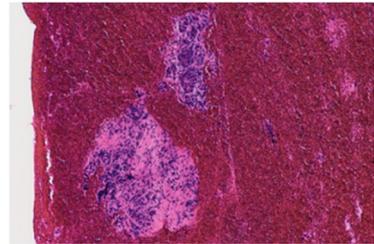


図5) HE染色像 (x10)

更に、膵島を構成する細胞評価のため、蛍光2重免疫染色を行った(図6)。細胞(インスリン、赤、右上)、細胞(グルカゴン、緑、左上)および核(DAPI、青、左下)の3色で示している。Merged image(右下)では、両細胞が蛍光2重染色により明瞭に区別されており、膵島の辺縁にグルカゴン陽性細胞、中心部に細胞が分布していた。

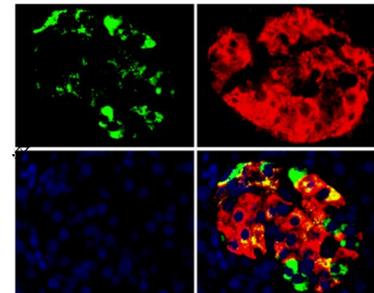
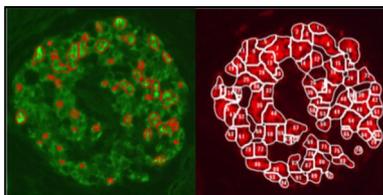


図6) 蛍光2重染色



細胞数は、BZ-II 解析アプリケーション(KEYENCE)を用いてセルカウントを行い、細胞/細胞数比を算出した(図7)。

図7) 細胞(緑)/細胞数(赤)カウント

各 FNA 検体ごとの膵島数 (islets counts per #) を算出すると、HE 染色像を反映して膵島 0.4 ~ 4 個/FNA 検体が残存するのみであった。各膵島細胞数と FNA 施行時の HbA1c(%), C-ペプチド (CPR) の関連をステロイド治療前後で検討すると、ステロイド治療前後ともに残存膵島数が多いほど HbA1c(%) は低値であり、インスリン分泌能を反映する CPR が高値であった(図8)。このことから、ステロイド治療前の膵の線維化と炎症細胞浸潤に伴う膵島破壊の程度が強いほど、インスリン分泌能は低下し、血糖が悪化することが示された。

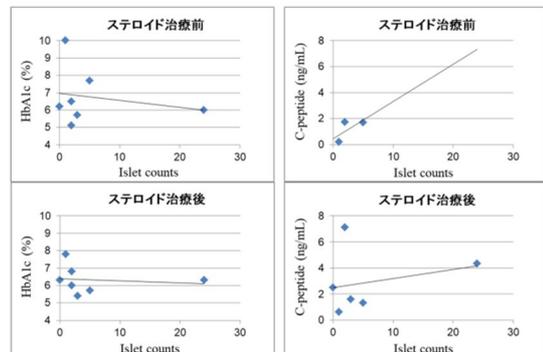


図8) 残存膵島数 vs. HbA1c/ CPR

次に、各膵島ごとに 細胞数 / 細胞数比を算出したところ、6 例中 2 例は 細胞を認めなかった (図 9)。このことから、 細胞は 細胞に比して細胞障害に弱く、よりアポトーシスに陥りやすいことが示唆された。また、細胞が残存した 4 例では 15% ~ 25% であり、従来ヒトでは膵島を構成する 細胞 20%、 細胞 70% (/ 細胞比 29%) とされることから、これらの膵島でも 細胞が細胞より多く障害されていることが示唆された。

更に、 / 細胞数比と HbA1c、CPR の関連をステロイド治療前後で検討すると、治療前後のいずれでも、 / 細胞数比が低いほど HbA1c が低値であり、CPR が高値であった (図 10)。このことは、血糖上昇に関わるグルカゴンが産生される 細胞がより障害され、細胞が相対的に残存している症例の方が、血糖コントロールが良好であり、分泌能が維持される可能性を示唆していると考えられた。なお、血糖コントロール悪化時の治療内容別で検討しても / 細胞数比との間に一定の関連は認められなかった。

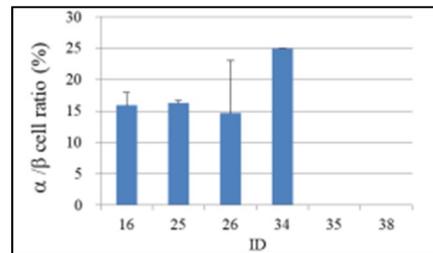


図 9) 膵島別の / 細胞数比
α/β細胞比 vs. HbA1c/ CPR

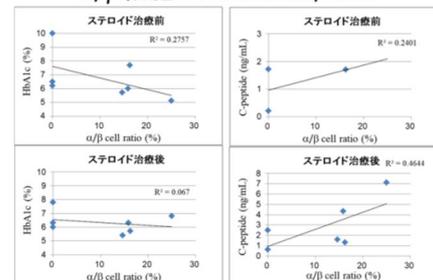


図 10) / 細胞数比と HbA1c/CPR

(2) 患者血清 IgGs を用いた内分泌病変合併 IgG4 関連疾患モデルマウスの作成

a) 患者血清からの IgGs 精製

Ab-Rapid pure EX を用いて患者血清から IgG を精製し、軽差 (L 鎖) のバンド確認を行った。図 1 1 (上段) は RD#10 の患者血清から IgG をカラム精製した際のクマシー染色像である。患者血清を buffer 希釈後にカラム精製して抽出した初回抽出抗体を E1、flow through を f/t、同様に f/t に残存する抗体を 2 回目に再精製した抽出抗体を E2、flow through を f/t として示している。当初、このカラムにて血清 IgG の 60% 程度の抗体回収率が見込める予定であったが、実際に抗体精製を行うと flow through への漏れ出しが多く、2 ~ 3 回の精製工程を経なければ十分な抗体抽出が行えないことが判明した。また、マニュアル通りの手動によるサンプル投与では回収率が 20% 程度に留まったため、ペリスタルティックポンプを用いて低流量 (0.30mL/分) でのサンプル投与を行ったところ、回収率を高めることが可能となった。現在、RD#10 まで順次抗体精製を行っているが、抗体量が十分とせず、残血清も追加して抗体精製量を増やしている。これまでに自己免疫性膵炎、唾液腺炎、甲状腺炎、下垂体炎に加え、後腹膜症・腎疾患を合併した症例も加えて蓄積が図れている。

クマシー染色にて IgG 重鎖 (H 鎖)

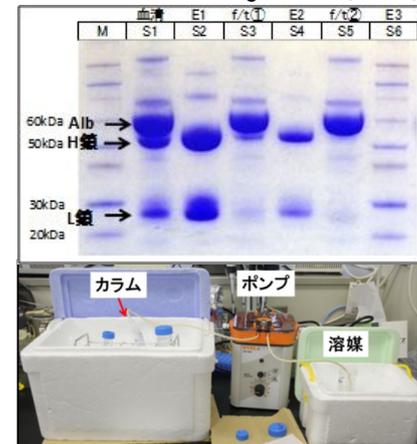


図 1 1) 患者血清からの IgG 精製
これまでに自己免疫性膵炎、唾液腺炎、甲状腺炎、下垂体炎に加え、後腹膜症・腎疾患を合併した症例も加えて蓄積が図れている。

b) 新生児マウスへの患者血清 IgGs 皮下投与実験

前述の抗体精製実験で予想外に抗体回収率が低かったため、1 回の Run で抗体が不足する可能性が出てきており、新生児マウスへの抗体投与は preliminary な検討に留めている。また、既報に基づき新生児マウスに PBS 200uL 皮下投与を行うと、体格に比して投与溶媒が多すぎ注射針穿刺部位からの漏れ出しが確認された。抗体液の投与量を減量するため、再濃縮もしくは 1 回投与量を 100uL 程度に減量して 1 日 2 回に投与回数を増やすなど、実験条件検討を継続的に行っている。まずは十分量の抗体量が確保できた症例の抗体溶液から新生児マウスへの投与を開始している。

< 引用文献 >

1. John H Stone et al. IgG4-related disease. N Engl J Med 366:539-551, 2012
2. Takeshima K et al. Thyroid 24:736-743, 2014. Elevated serum immunoglobulin G4 levels in patients with Graves' disease and their clinical implications.
3. Takeshima K et al. Distribution of serum immunoglobulin G4 levels in Hashimoto's thyroiditis and clinical features of Hashimoto's thyroiditis with elevated serum immunoglobulin G4 levels. Endocr J 62:711-717, 2015.
4. Takeshima K et al. Clinicopathological features of Riedel's thyroiditis associated with IgG4-related disease in Japan. Endocr J 62:725-731, 2015.
5. Shiokawa M et al. Pathogenicity of IgG in patients with IgG4-related disease. Gut 65:1322-1332, 2016.

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 Ken Takeshima, Hiroyuki Ariyasu, Hiroshi Iwakura, Shintaro Kawai, Shinsuke Uraki, Hidefumi Inaba, Machi Furuta, Kenji Warigaya, Shin-Ichi Murata, Takashi Akamizu	4. 巻 2018
2. 論文標題 Predominant Improvement of Alpha Cell Function After Steroid Therapy in a Patient With Autoimmune Pancreatitis: Case Report	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Diabetes Therapy	6. 最初と最後の頁 1385-1395
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s13300-018-0434-0.	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 Hidefumi Inaba, Hiroyuki Ariyasu, Ken Takeshima, Hiroshi Iwakura, Takashi Akamizu	4. 巻 66
2. 論文標題 Comprehensive Research on Thyroid Diseases Associated With Autoimmunity: Autoimmune Thyroid Diseases, Thyroid Diseases During Immune-Checkpoint Inhibitors Therapy, and immunoglobulin-G4-associated Thyroid Diseases	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Endocrine Journal	6. 最初と最後の頁 :843-852
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1507/endocrj.EJ19-0234	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 竹島 健
2. 発表標題 EUS-FNAで膵島消失を認め、ステロイド治療後の膵 細胞機能の改善が限定的であった自己免疫性膵炎の1例
3. 学会等名 第61回糖尿病学会学術総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<著書>

竹島 健、赤水 尚史. 「特集2. 甲状腺疾患とIgG4関連疾患」バセドウ病とIgG4甲状腺炎、IgG4関連疾患における甲状腺疾患 日本甲状腺学会雑誌 10(1):25-29, 2019.

竹島 健、赤水 尚史 他. 臨床医必読 最新I g G 4 関連疾患 改訂第2版
臓器別病変の診断と治療、4. 甲状腺疾患 診断と治療社 2:70-77, 2019.

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
--	---------------------------	-----------------------	----