

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究（B）
研究期間：2008～2009
課題番号：20790694
研究課題名（和文） プロテオミクスを用いた IgG4 関連疾患の疾患特異的自己抗原の同定と診断法の確立
研究課題名（英文） Identification of novel auto-antigen in IgG4-related disease by proteomic analysis and establishment of diagnostic methods
研究代表者
山本 元久 (YAMAMOTO MOTOHISA)
札幌医科大学・医学部・助教
研究者番号：80404599

研究成果の概要（和文）：全身性 IgG4 関連疾患の代表的な疾患であるミクリッツ病では、症例の約 25% に低補体血症を、約 50% に血中の免疫複合体が検出される。今回、ミクリッツ病 28 例の血清から、免疫沈降法により免疫複合体を抽出した。酸解離法により、構成している抗原および抗体の質量解析を実施し、ミクリッツ病に特異的にみられる 13.1kD の蛋白を発見した。血清中のこの蛋白に対する抗体の有無を確認することにより、全身性 IgG4 関連疾患の診断が容易になると考えられた。

研究成果の概要（英文）：Mikulicz's disease is a representative disorder of systemic IgG4-related disease. Interestingly, hypocomplementemia is observed in a quarter of the patients with Mikulicz's disease, and circulating immune complexes are detected in a half of them. We extracted immune complexes from the serum of Mikulicz's disease patients by immuno-precipitation. The antigens, which consisted of the immune complexes, were gotten by acid dissociation. Proteomic analysis revealed a 13.1 kD protein. We expect that the detection of this protein in the serum leads to more accurate diagnosis of systemic IgG4-related disease.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー内科学

キーワード：IgG4 関連疾患，ミクリッツ病，プロテオミクス，免疫沈降，自己抗原

## 1. 研究開始当初の背景

ミクリッツ病、自己免疫性膵炎、自己免疫性下垂体炎、リーデル甲状腺炎、間質性肺炎、間質性腎炎、後腹膜線維症など、IgG4

が病態に関与し、多種多様な病態を呈する IgG4 関連疾患 (systemic IgG4-related diseases) が世界的に注目を集めている。ミクリッツ病は、両側性、対称性に涙腺お

よび唾液腺腫脹を呈する疾患であり、原因は不明である。その腺分泌機能はステロイド反応性が良好である（腺分泌機能の可逆性）を特徴とするが、現在、原発性シェーグレン症候群と同一視され、積極的な治療がなされていないのが現状である。一方、自己免疫性膵炎は、膵のびまん性腫大を呈し、両疾患ともに、著明な高 IgG4 血症および、罹患組織に著明な IgG4 陽性形質細胞浸潤を呈することが判明している（*Yamamoto M, et al. Rheumatology 44: 227-234, 2005, Hamano H, et al. N Engl J Med. 344: 732-738, 2001*）。両疾患の合併例も存在することから、共通の病態基盤が存在する可能性が強く示唆される。また近年、今まで特発性間質性腎炎と診断されていた疾患のなかに、IgG4 関連の間質性腎炎が存在していたことも明らかになり（*Saeki T, et al. Intern Med. 46: 1635-1671, 2007*）、局所の病態概念から、IgG4 関連疾患が全身性の病態であることが明らかになりつつある。しかし、この病態の詳細については未だ解明されておらず、診断法および治療法も確立されていない。

## 2. 研究の目的

われわれは現在までに当科で経験した IgG4 関連疾患症例（40 例）を検討し、血清補体価（CH50）と血中免疫複合体濃度は強い負の相関を示すことを明らかにした。また Cornell らは、IgG4 関連間質性腎炎の組織を検討すると尿細管上皮に免疫複合体の沈着を認めたと報告しており（*Cornell LD, et al. Am J Surg Pathol. 31: 1586-1597, 2007*）、われわれも、糸球体腎炎を合併した IgG4 関連疾患症例の腎組織を蛍光抗体法で検討した結果、糸球体および尿細管上皮に補体および免疫グロブリンの沈着を確認した。以上のことから、IgG4 関連疾患は、何らかの抗原抗体反応が慢性的に惹起されている全身性の自己免疫疾患である可能性が示唆される。臨床的には、抗 DNA 抗体をはじめとした既知の疾患特異的自己抗体は検出されないことから、全身性エリテマトーデスとは異なる新しい免疫複合体病である可能性も孕んでいる。今回、日本シェーグレン症候群学会が定めた IgG4 関連ミクリッツ病の診断基準を満たす 28 例のミクリッツ病を対象に、その血液中に存在する免疫複合体を、プロテオミクス手技を利用して、疾患特異的自己抗原が存在するかどうか検討を行った。

## 3. 研究の方法

札幌医科大学附属病院第 1 内科通院中のミクリッツ病患者を対象とし、研究の主旨を説明し、同意の得られた患者より、ステ

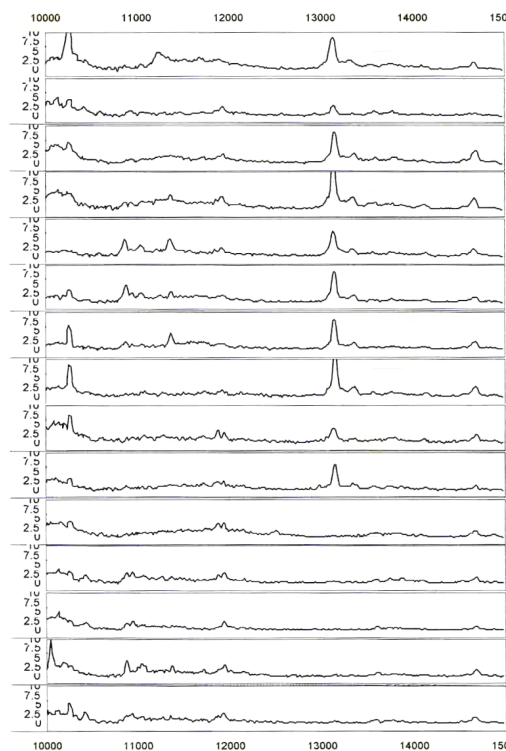
ロイド治療前の血液サンプル 28 症例を採取する。またコントロールには、健常ボランティア、他のリウマチ性疾患（シェーグレン症候群など）の患者からも同様に血液サンプルを採取する。

各血液中の免疫複合体を、プロテイン G を用い、免疫沈降法により沈殿させる。その後、elution buffer(Ph2/citrate)を用いて、免疫複合体(IgG および抗原)を溶出する。

上記方法により分離した免疫複合体を CIPHERGEN 社の Proteinchip system にて質量分析解析(SELDI TOF-MS 法による)する。強陰イオン交換 Chip を利用することにより、Ph2 でプラスにチャージした免疫複合体が効率よく濃縮され検出される。これにより得られたピークが、免疫複合体を構成していたタンパク質であり、自己抗原の候補となる。健常人および各疾患群で比較し、ミクリッツ病に特異的なタンパク質を検出する。

## 4. 研究成果

ミクリッツ病 28 例と原発性シェーグレン症候群 20 例の治療前血清に関して、上記の方法で免疫複合体を抽出し、プロテオミクス解析を行った結果、様々なピーク(自己抗原候補のタンパク質)が認められたが、検出されるピークの高さの累積(発現量)において、両疾患群で最も有意差を認めたのは 11.3kDa のタンパク質であった。



(上から 10 サンプルはミクリッツ病、下から 5 サンプルは原発性シェーグレン症候

群である。ミクリッツ病では 13.1kD に共通するピークを認める。)このタンパクは他のリウマチ性疾患でも確認されなかった。またこのピークはミクリッツ病症例の治療後では検出されなくなるため、このタンパク質が全身性 IgG4 関連疾患において、病態に関わる可能性が示唆された。この 13.1 kD タンパクは疾患特異性があるため、診断に有用である可能性が考えられた。

#### 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 10 件)

- ① Yamamoto M, et al, Mikulicz's disease and the extraglandular lesions. *Curr Immunol Rev*, 査読有, in press
- ② Yamamoto M, et al, Mikulicz's disease and the extraglandular lesions. *Curr Immunol Rev*, 査読有, in press
- ③ Takano K, Yamamoto M, Clinicopathogenic similarities between Mikulicz's disease and Küttner tumor, *Am J Otolaryngol*, 査読有, in press
- ④ 山本 元久, 他, 全身性 IgG4 関連疾患, 臨床病理, 査読無 (依頼原稿), in press
- ⑤ 高橋 裕樹, 山本 元久, 他, IgG4 関連ミクリッツ病とシェーグレン症候群, 臨床免疫・アレルギー科, 査読無 (依頼原稿), in press
- ⑤ Yamamoto M, et al, Proteomics analysis in 28 patients with systemic IgG4-related plasmacytic syndrome (SIPS), *Rheumatol Int*, 査読有, 30, 2010, 565-568
- ⑥ Yamamoto M, et al, The analysis of interleukin-6 in the patients with systemic IgG4-related plasmacytic syndrome (SIPS) – Expansion of SIPS to the territory of Castleman's disease, *Rheumatology (Oxford)*, 査読有, 48, 2009, 860-862
- ⑦ Takano K, Yamamoto M, et al, A case of reversible hyposmia associated with Mikulicz's disease, *Otolaryngol Head Neck Surg*, 査読有, 141, 2009, 430-431
- ⑧ Masaki Y, Dong L, Kurose N,

Kitagawa K, Morikawa Y, Yamamoto M, et al, roposal for a new clinical entity, IgG4-positive multi-organ lymphoproliferative syndrome: Analysis of 64 cases of IgG4-related disorders, *Ann Rheum Dis*, 査読有, 68, 2009, 1310-1315

- ⑨ 山本 元久, 他, 全身性 IgG4 関連疾患, 感染・炎症・免疫, 査読無 (依頼原稿), 39 巻, 2009, 44-47
  - ⑩ 山本 元久, 他, 全身性 IgG4 関連疾患, 検査と技術, 査読無 (依頼原稿), 37 巻, 2009, 610-616
- [学会発表] (計 11 件)
- ① 山本 元久, 他, IgG4 関連疾患って一体何?—膠原病内科医の立場より ミクリッツ病と IgG4 関連疾患. 第 4 回 IgG4 研究会 2010.3, 新潟長岡
  - ② 山本 元久, 他, ステロイド治療が及ぼす IgG4 関連ミクリッツ病の唾液腺分泌能における長期的予後に関する検討. 第 37 回日本臨床免疫学会総会 2009.11, 東京
  - ③ 山本 元久, 他, 当科で経験した systemic IgG4-related plasmacytic syndrome (SIPS) 55 例の臨床的特徴の解析. 第 59 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2009.10, 秋田
  - ④ Yamamoto M, et al, Serological and pathological analysis of 46 patients with Mikulicz's disease, The 10<sup>th</sup> International Symposium on Sjögren's syndrome 2009.10, Brest, France
  - ⑤ 山本 元久, 他, IgG4 関連ミクリッツ病におけるアレルギーおよび炎症反応関連遺伝子の発現解析. 第 18 回日本シェーグレン症候群学会 2009.9, 福岡
  - ⑥ 山本 元久, 他, IgG4 関連ミクリッツ病の再燃に関連する臨床的因子の検討. 第 53 回日本リウマチ学会総会・学術集会・第 18 回国際リウマチシンポジウム 2009.4, 東京
  - ⑦ 山本 元久, 他, 血清 IL-6 高値を呈した全身性 IgG4 関連疾患の 1 例. 第 3 回 IgG4 研究会 2009.3, 神戸舞子
  - ⑧ 山本 元久, 他, Mikulicz 病に合併した間質性腎炎の 1 例. 第 3 回北海道腎カン

ファレンス 2008.10, 札幌

- ⑨ 山本 元久, 他, プロテオミクスを用いた全身性 IgG4 関連疾患における免疫複合体の解析. 第 17 回日本シェーグレン症候群研究会 2008.9, 岐阜
- ⑩ 山本 元久, 他, Systemic IgG4-related plasmacytic syndrome (SIPS)—多領域に跨がる新しい疾患概念の確立に向けて. 第 17 回札幌臨床免疫・アレルギーの集い 2008.7, 札幌
- ⑪ 山本 元久, 他, 全身性 IgG4 関連疾患における血清補体価および免疫複合体の解析. 第 52 回日本リウマチ学会総会・学術集会・第 17 回国際リウマチシンポジウム 2008.4, 札幌

[図書] (計 2 件)

- ① 山本 元久, 他, 前田書店, IgG4 関連疾患への誘い, 2010, 69-77
- ② 高橋 裕樹, 山本 元久, 診断と治療社, シェーグレン症候群の診断と治療マニュアル, 2009, 172-184

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山本 元久 (YAMAMOTO MOTOHISA)  
札幌医科大学医学部助教  
研究者番号: 80404599

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし