

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H00553

研究課題名(和文) IgG4関連疾患の免疫学的特異性を基盤とした病因解明と疾患モデルマウスによる検証

研究課題名(英文) Immunologic specificity based pathogenesis of IgG4-related diseases and validation in mouse models of the disease

研究代表者

中村 誠司 (Nakamura, Seiji)

九州大学・歯学研究院・教授

研究者番号：60189040

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,200,000円

研究成果の概要(和文)：IgG4関連疾患は、全身の多臓器に腫瘍形成とそれによる機能障害を生じ、病変局所のT細胞、B細胞、マクロファージの浸潤と線維化を特徴とする特異な全身疾患であるが、有効な治療法がない。本研究では、特異なT細胞、B細胞、マクロファージのサブセットに着目し、1細胞レベルでの遺伝子発現解析を行い、さらにT・B細胞受容体のレパトア解析を行なった。その結果、特徴的なT細胞、B細胞のサブセットを明らかにした。また、Toll like receptor 7を発現したマクロファージに着目し、TLR7のアゴニストで刺激することで病態を再現できるマウスが作成可能かどうか検証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

IgG4関連疾患の罹患臓器に浸潤する全T細胞、B細胞、マクロファージを明らかにし、我々が作成したIgG4関連疾患のモデルマウスを用いて特異な細胞群にフォーカスして実際に病態が再現できれば、新たな治療標的薬の開発が可能となる。

研究成果の概要(英文)：IgG4-related diseases is a unique systemic disease characterized by mass formation and consequent dysfunction of multiple organs, as well as severe fibrosis with infiltrating T cells, B cells, and macrophages. Currently, no effective treatment is available. In this study, we focused on a subset of unique T cells, B cells, and macrophages and performed single-cell RNA sequencing as well as T-B receptor sequencing to obtain a comprehensive, unbiased view of tissue infiltrating cells. As a result, we identified characteristic T and B cell subsets. We also focused on macrophages expressing Toll-like receptor 7 and tested whether it is possible to generate mice that can reproduce the pathology by stimulating them with TLR7 agonist.

研究分野：臨床免疫学

キーワード：IgG4関連疾患 T細胞 B細胞 マクロファージ TLR7

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

## 1. 研究開始当初の背景

IgG4-RD は本邦から提唱された新しい疾患概念で、従前は Mikulicz 病や Küttner 腫瘍と呼ばれていた涙腺・唾液腺炎を始めとし、自己免疫性膵炎、後腹膜線維症、腎臓病、硬化性胆管炎、甲状腺炎などの多くの病変を生じ、高 IgG4 血症と病変局所の IgG4 陽性形質細胞の浸潤と線維化を特徴とする特異な全身疾患である。本邦では、2009 年に厚生労働省「難治性疾患克服研究事業」として2つの研究班が設置されたが、その後1つのオールジャパン体制に統合され、世界初の診断基準を作成するとともに病態解析と治療法の検討などに取り組んできた。

研究代表者の従来の研究により、IgG4-RD の病態形成には特異な T 細胞の浸潤・活性化とともに、IgG4 を産生する B 細胞の分化・増殖と特異な Mφ の浸潤・活性化という特徴が明らかとなった。しかし、それらの細胞群の相互の作用については未解決である。そのため、IgG4-RD の病因解明には、T 細胞、B 細胞、Mφ の3つの細胞群の役割や相互作用を明確にしなければならない。

## 2. 研究の目的

「IgG4-RD がなぜ発症するのか？」が本研究の学術的な問いであり、新規治療法の開発に繋げるために「病因を解明すること」が本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

上述の（1）IgG4-RD の病態形成に関わる特異な T 細胞、B 細胞、Mφ のサブセットの相互作用の解析、（2）T 細胞と B 細胞の各サブセットのクローナリティーの解析を行う。疾患モデルマウスの作製に関しては、既にヒトの Toll like receptor 7 (TLR7) を遺伝子導入したマウスで初期の病態形成を確認している[1]ので、（1）と（2）の結果をもとに（3）TLR を各種抗原で刺激することなどにより、病態を再現できる疾患モデルマウスの完成を目指す。

- a) IgG4-RD の罹患臓器より CD3<sup>+</sup>T 細胞および CD19<sup>+</sup>B 細胞を分離採取しシングルセル遺伝子発現解析を行う。T 細胞および B 細胞のサブセットを同定する。
- b) 上述の T 細胞レセプターおよび B 細胞レセプターのクローナリティー解析を行う。
- c) 多重蛍光免疫染色により、罹患臓器に浸潤する特異な T 細胞と B 細胞集団を同定する。
- d) TLR7 を発現したマクロファージに着目し、アゴニストで刺激することで線維化病態を再現できるマウスが作成可能かどうか検証する。

## 4. 研究成果

IgG4-RD の末梢血と罹患臓器における特異な T 細胞、B 細胞、マクロファージを同定するために1細胞レベルでの遺伝子発現解析を行い、さらに T 細胞受容体と B 細胞受容体のレパトア解析を行なった。その結果、濾胞性ヘルパー T (Tfh) 細胞のうち、免疫チェックポイント分子である LAG3 (Lymphocyte activation gene 3) を発現し IL10<sup>+</sup>Tfh 細胞[2]や CD4<sup>+</sup>GZMK<sup>+</sup>cytotoxic T 細胞[3]、CXCL13<sup>+</sup>PD1<sup>+</sup>CXCR5<sup>-</sup> Tph 細胞、細胞

傷害性 Tfh 細胞（論文投稿中）など特徴的な T 細胞が増加していることが明らかになった。また、B 細胞サブセットでは、免疫グロブリンのクラススイッチに重要である AID を発現した活性化 B 細胞が IL10 レセプターを特異に発現していることが明らかになった[2]。また、B 細胞においては、CD27<sup>-</sup>IgD<sup>-</sup> Double negative B 細胞も増加していることが明らかになった[4]。現在、これらのサブセットに関して、T 細胞受容体ならびに B 細胞受容体のレパトア解析を詳細に行なっているところである。また、Tol 1 like receptor 7 を発現したマクロファージに着目し、TLR7 のアゴニスト（R848）で刺激することで病態を再現できるマウスが作成可能かどうか検証した。その結果、TLR7/IRK4 を介したシグナルでマクロファージから IL1b、TGFb の産生が上昇することがわかった[5]。

- [1] Ishiguro N, Moriyama M, Furusho K, Furukawa S, Shibata T, Murakami Y, et al. Activated M2 Macrophages Contribute to the Pathogenesis of IgG4-Related Disease via Toll-like Receptor 7/Interleukin-33 Signaling. *Arthritis Rheumatol.* 2020;72:166-78.
- [2] Munemura R, Maehara T, Murakami Y, Koga R, Aoyagi R, Kaneko N, et al. Distinct disease-specific Tfh cell populations in two different fibrotic diseases: IgG4-related disease and Kimura's disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2022.
- [3] Perugino CA, Kaneko N, Maehara T, Mattoo H, Kers J, Allard-Chamard H, et al. CD4(+) and CD8(+) cytotoxic T lymphocytes may induce mesenchymal cell apoptosis in IgG(4)-related disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2021;147:368-82.
- [4] Maehara T, Koga R, Nakamura S. Immune dysregulation in immunoglobulin G4-related disease. *Jpn Dent Sci Rev.* 2023;59:1-7.
- [5] Chinju A, Moriyama M, Kakizoe-Ishiguro N, Chen H, Miyahara Y, Haque A, et al. CD163+ M2 Macrophages Promote Fibrosis in IgG4-Related Disease Via Toll-like Receptor 7/Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase 4/NF- $\kappa$ B Signaling. *Arthritis Rheumatol.* 2022;74:892-901.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kaneko Naoki, Moriyama Masafumi, Maehara Takashi, Chen Hu, Miyahara Yuka, Nakamura Seiji	4. 巻 2
2. 論文標題 Orchestration of Immune Cells Contributes to Fibrosis in IgG4-Related Disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Immuno	6. 最初と最後の頁 170 ~ 184
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/immuno2010013	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Chinju Akira, Moriyama Masafumi, Kakizoe Ishiguro Noriko, Chen Hu, Miyahara Yuka, Haque A. S. M. Rafiul, Furusho Katsuhiko, Sakamoto Mizuki, Kai Kazuki, Kibe Koton, Hatakeyama Furukawa Sachiko, Ito Ohta Miho, Maehara Takashi, Nakamura Seiji	4. 巻 in press
2. 論文標題 CD163+ M2 Macrophages Promote Fibrosis in IgG4-Related Disease Via Toll-like Receptor 7/Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase 4/NF- B Signaling	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Arthritis & Rheumatology	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/art.42043	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishikori Asami, Nishimura Midori Filiz, Nishimura Yoshito, Notohara Kenji, Satou Akira, Moriyama Masafumi, Nakamura Seiji, Sato Yasuharu	4. 巻 72
2. 論文標題 Investigation of IgG4 positive cells in idiopathic multicentric Castleman disease and validation of the 2020 exclusion criteria for IgG4 related disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pathology International	6. 最初と最後の頁 43 ~ 52
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pin.13185	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsumura-Kawashima Mayu, Ogata Kenichi, Moriyama Masafumi, Murakami Yuka, Kawado Tatsuya, Nakamura Seiji	4. 巻 12
2. 論文標題 Secreted factors from dental pulp stem cells improve Sjogren's syndrome via regulatory T cell-mediated immunosuppression	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stem Cell Research & Therapy	6. 最初と最後の頁 182
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13287-021-02236-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Perugino Cory A., Chinju Akira, Mochizuki Keita, Munemura Ryusuke, Sakamoto Mizuki, Moriyama Masafumi, Nakamura Seiji, Yosef Nir, Stone John H., Pillai Shiv	4. 巻 147
2. 論文標題 CD4+ and CD8+ cytotoxic T lymphocytes may induce mesenchymal cell apoptosis in IgG4-related disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Allergy and Clinical Immunology	6. 最初と最後の頁 368 ~ 382
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jaci.2020.05.022	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Munemura Ryusuke, Maehara Takashi, Yuka Murakami, Risako Koga, Ryuichi Aoyagi, Kaneko Naoki, John H Stone, Shiv Pillai, Nakamura Seiji.	4. 巻 in press
2. 論文標題 Distinct disease-specific Tfh cell populations in two different fibrotic diseases: IgG4-related disease and Kimura's disease.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Allergy and Clinical Immunology	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 森山 雅文、中村誠司
2. 発表標題 IgG4関連疾患の病因・病態と治療 「自然免疫からみたIgG4関連疾患の病因・病態」
3. 学会等名 日本シェーグレン症候群学会 (招待講演)
4. 発表年 2021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
研究分担者	前原 隆  (Maehara Takashi)  (10637333)	九州大学・歯学研究院・助教   (17102)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	新納 宏昭  (Niiro Hiroaki)  (20380636)	九州大学・医学研究院・教授    (17102)	
研究分担者	森山 雅文  (Moriyama Masafumi)  (20452774)	九州大学・大学病院・助教    (17102)	
研究分担者	柴田 琢磨  (Shibata Takuma)  (30554505)	東京大学・医科学研究所・助教    (12601)	
研究分担者	安河内 友世（川久保友世）  (Yasukouchi Tomoyo)  (70507813)	九州大学・歯学研究院・准教授    (17102)	
研究分担者	坪井 洋人  (Tsuboi Hiroto)  (80580505)	筑波大学・医学医療系・講師    (12102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関