

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17518

研究課題名（和文）内分泌機能異常を伴うIgG4関連疾患における小胞体ストレスの役割と治療法の検討

研究課題名（英文）The role of endoplasmic reticulum stress in endocrinopathy associated with IgG4 related disease

研究代表者

竹島 健（Takeshima, Ken）

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：40647517

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、IgG4関連疾患モデル動物の作成を試みると共に、IgG4関連疾患に伴う内分泌異常と小胞体ストレスの関連を明らかにしようと考えた。まず、IgG4関連疾患患者の血清由来IgGsを抽出し新生児マウスに投与し病理組織学的検討を行った。膵では腺房周囲間質にIgG4抗体の沈着を認めた。更に、IgG4対応抗原の一つであるLaminin511をBALB/Cマウスに免疫し、長期経過における耐糖能評価を行った。Laminin511投与群はコントロール群にしてIPGTTの血糖15分値が高値であったが、有意な差は認めなかった。小胞体ストレスマーカーの遺伝子発現は両群で差は認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、IgG4関連疾患モデルマウスの作成を試み、未だ検討が行われていないIgG4関連疾患に伴う内分泌異常と小胞体ストレスの関連性に着目した点で意義がある。本研究で患者血清由来IgGsおよびLaminin511を用いたIgG4関連疾患モデルマウスでは、十分な炎症細胞浸潤と小胞体ストレスの亢進が認められなかった。しかし、今後小胞体ストレス亢進を伴うモデルマウスを作成できれば、小胞体ストレスを減弱するKIRAが新たな治療選択となりうるため、将来的に新たな治療法への応用につながる可能性があり、この点において意義がある。

研究成果の概要（英文）：In this research, we attempted to develop an animal model of IgG4-related disease and to clarify the role of endoplasmic reticulum stress in endocrinopathy associated with IgG4 related disease.

We firstly injected serum IgGs from patients with IgG4-related disease to neonatal mice and evaluated pathological features of the pancreas; deposition of IgG4 antibodies at the interstitial area between pancreatic acinar cells.

We also immunized Laminin511, a potential corresponding antigen of IgG4 antibodies, with BALB/C mice and evaluated the glucose tolerance. IPGTT revealed that the serum glucose levels are higher in Laminin 511 group than in control group after 15 minutes of glucose stimulation, but not significantly. In addition, mRNA expressions associated with endoplasmic reticulum stress showed no differences between the groups.

研究分野：内分泌代謝学

キーワード：IgG4関連疾患 IgG4-RD

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疾患であり、厚生労働省が指定する難治性疾患の一つである。自己免疫性膵炎や涙腺・唾液腺炎などが典型的な病変であるが、視床下部下垂体炎、甲状腺炎、膵病変に起因した糖尿病などの内分泌異常も報告されている(N Engl J Med 2012)。治療の第一選択はステロイド治療であるが、副作用による耐糖能異常悪化も危惧されており新たな治療ターゲットの検討が必要と考えられる。

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 高値の自己免疫性甲状腺疾患(橋本病、バセドウ病)の臨床的特徴、後腹膜線維症など全身病変を伴うリーデル甲状腺炎の臨床像と免疫組織所見を検討しこれを報告した(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、一部の症例でインスリン分泌能が維持または改善することを報告した(第 58 回糖尿病学会学術総会)。また、ステロイド治療後に細胞に比して細胞機能(グルカゴン分泌)の顕著な回復を認めた自己免疫性膵炎の 1 例を経験し、これを報告した(Diabetes Ther 2018)。

近年、内分泌異常と小胞体ストレスの関連が注目されている。小胞体ストレスは、飢餓、低酸素、変異蛋白質、ウイルス感染などの負荷により、正しく折りたたまれなかった不良蛋白質が小胞体内に蓄積することで起こり、内分泌異常や自己免疫疾患への関与が報告されている。小胞体ストレスが蓄積すると、3つのストレスセンサー(IRE1、PERK、ATF6)がこれを感知し、

分子シャペロンの誘導による蛋白質の折りたたみ直し、プロテアソームでの不良蛋白質の分解、新規蛋白質の翻訳抑制がおこる。これらの応答機構を UPR (unfolded protein response) と呼び、UPR で対処しきれなくなると、細胞はアポトーシスを引き起こす。糖尿病では、膵細胞における小胞体ストレスの蓄積がアポトーシスを引き起こし、細胞機能障害を引き起こすことが報告されている(Science 2004)。更に、小胞体ストレス減弱作用をもつキナーゼ阻害薬(KIRA; kinase-inhibitory RNase attenuators)により、1型糖尿病モデルマウスで細胞アポトーシスが減少し、細胞機能が温存されることを、当研究室所属の森田らが初めて報告し注目されている(Cell Metabolism 2017)。

IgG4 関連疾患モデル動物の作成は未だ確立していないが、患者血清由来 IgGs を投与した新生児マウスにおいて膵実質および顎下腺への炎症細胞浸潤が報告された(Gut 2016)。更に、IgG4 抗体の対応抗原として、Laminin511 が同定され、Laminin511 免疫により膵腺房細胞の基底膜にヒト IgG4 に相当するマウス IgG1 の沈着が認められ、新たな IgG4 関連疾患モデルマウスとして着目されている(Sci Transl Med 2018)。

2. 研究の目的

本研究では、未だ確立していない IgG4 関連疾患モデル動物の作成を試み、IgG4 関連疾患に伴う内分泌異常と小胞体ストレスの関連性を明らかにすることを目的とする。糖代謝・内分泌異常の病態への関与が報告されている小胞体ストレスに着目し、IgG4 関連疾患に伴う内分泌異常の病態における役割を検討する点で独自性がある。

作成した IgG4 関連疾患モデル動物において小胞体ストレス亢進とこれに伴う内分泌異常の関連が示唆された場合、小胞体ストレスを減弱させるキナーゼ阻害薬 KIRA を用いて内分泌異常を改善させうるかを検討する。

3. 研究の方法

(1) 患者血清 IgGs を用いた IgG4 関連疾患モデルマウス(新生児)の作成

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、血清を採取する。Ab-Rapid pure EX を用いて血清 IgG を精製し、IgG1、IgG4 サブクラス分画を分離精製する。

マウスへの皮下投与と解剖

患者血清由来 IgGs を新生児マウスに皮下投与し、内分泌臓器病変を評価する。既報に基づき、投与後 12-24H でイソフルレン麻酔後、全血採血、頸椎脱臼にて安楽死させ、各臓器を摘出する。

IgG4-RD モデルの評価

内分泌臓器における炎症細胞浸潤を確認し、内分泌機能を評価する。

(2) Laminin511-8E を用いた IgG4 関連疾患モデルマウスの作成

BALB/C マウス(8週令)を用い Laminin511-8E および PBS とフロイントアジュバントのエマルジョンを作成後、皮下投与にて免疫を行う。それぞれ Laminin511 群、コントロール群とする。皮下投与と間隔は 2 週おき、4 週おきの 2 条件で検討し投与回数 3 回とする。1 回目はいずれも完全フロイントアジュバントを用い、2 回目以降は不完全フロイントアジュバントを用いた。

エマルジョン作成

SPG コネクタを用いて Laminin 511-8E (Laminin511 群)、PBS (コントロール群) とフロイントアジュバントとのエマルジョンを作成する。2.5mL シリンジに PBS 350-400uL、完全/不完全フ

ロイントアジュバント (CFA/ICFA) 350-400uL をそれぞれ分注し、SPG コネクタの両端に接続し 40 往復させる。PBS とアジュバントが良く混和したことを確認し、200uL ずつ 1mL シリンジに分注する。

マウスへの皮下投与と解剖

1)、2) で作成したエマルジョンをそれぞれコントロール群、Laminin511 投与群に皮下投与する。エマルジョンはそれぞれ 3 力所に 1/3 ずつ分けて皮下投与する。実験最終日に、イソフルレン麻酔後、全血採血、頸椎脱臼にて安楽死させ、各臓器を摘出する。

IgG4-RD モデルの評価

内分泌臓器における炎症細胞浸潤の有無、ブドウ糖負荷による耐糖能評価を行う。

(3) IgG4 関連疾患モデルマウスにおける耐糖能の検討 (IPGTT: 腹腔内ブドウ糖負荷試験)

IPGTT 施行の前日よりマウスの餌を除去し前夜から絶食とする。負荷試験施行日にマウス重量を測定の上、必要ブドウ糖液量 (2mg/gBw) を算出し 1mL シリンジに必要な量を分注する。固定具にマウスを入れ、尾静脈採血および経皮血糖測定 (血糖 0 分値) 測定を行う。ブドウ糖液を腹腔内投与し、15 分後、30 分後、45 分後、60 分後、120 分後で採血および血糖測定を行う。全血を遠心し血漿を 0.5mL tube に分注する。

(4) IgG4 関連疾患モデルマウスの内分泌臓器における小胞体ストレスの検討 (real time PCR)

内分泌臓器を採取し、RNA 用、蛋白用、組織切片作成用に分割し、それぞれ Trizol、凍結、ホルマリン固定としてサンプルを保存する。RNA 用のサンプルは、ホモジナイズ後クロロホルムを加えて攪拌し、遠心後上清を回収する。イソプロパノールと反応させた後、エタノールで洗浄後 dry up し、Rnase free water に溶かして濃度測定を行う。RNA 4ug を用いて RT 反応を行い cDNA を作成する。SYBR Green PCR MasterMix を用いて real time PCR を行い、小胞体ストレスマーカーの発現を評価する。

4. 研究成果

(1) 患者血清 IgGs を用いた IgG4 関連疾患モデルマウス (新生児) の作成

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、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。図 1 は患者血清から 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 回の精製工程を要した。

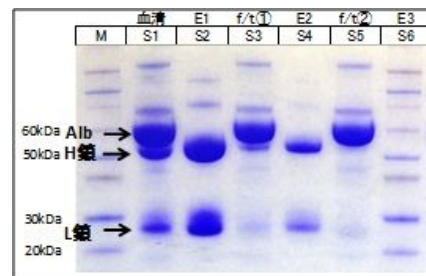


図 1. 患者血清からの IgG 精製

新生児マウスへの患者血清 IgGs 皮下投与

前述の抗体精製実験で想定より抗体回収率が低く、実験に用いる抗体不足が懸念されたため、新生児マウスへの抗体投与は preliminary な検討に留めた。条件検討の上、1 匹あたり患者血清由来 IgG 5mg を PBS 100uL に希釈し、3 力所に分けて皮下投与を行った。Ctrl 群には、正常ヒト血清由来 IgGs を等量投与した。

図 2 は、唾液腺・腎・甲状腺病変を併発した IgG4 関連疾患患者由来の血清 IgGs を投与した際の、膵、下垂体、甲状腺、顎下腺の HE 染色像である。炎症細胞浸潤は顕著でなく、線維化所見は認めない。

図 3 は、自己免疫性膵炎患者由来の血清 IgGs を皮下投与した際の膵切片の IgG4/CD138 免疫染色所見である。既報と同様に、膵腺房周囲の基底膜に沿って IgG4 抗体が沈着していることが分かる。一方、形質細胞のマーカーである CD138 陽性細胞は認めず、炎症細胞浸潤は顕著でなかった。

以上から、患者血清由来 IgGs には、膵腺房細胞基底膜もしくは間質に結合する IgG4 分画があり、同部の対応抗原が IgG4 関連疾患の免疫異常に関与することが示唆された。一方で、炎症細胞浸潤は顕著でなく IgG4 関連疾患を再現したモデルとしては十分ではなかった。また、膵病変の内分泌異常の評価として、新生児を用いるため長期的な耐糖能評価が困難であること、膵組織

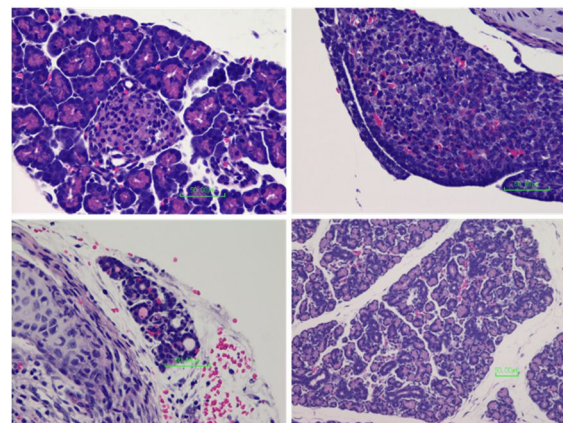


図 2. IgG4 関連臓器の HE 染色 (x40): 左上 (膵)、右上 (下垂体)、左下 (甲状腺)、右下 (顎下腺)

そのものが肉眼的に同定困難のため膵における小胞体ストレス評価が困難と考えられた。

本研究を遂行する過程で、膵腺房細胞基底膜に結合する IgG4 の対応抗原として Laminin511-8E が報告され、非新生児マウスにおいて膵病変を来す可能性が示唆されたため、ヒト血清 IgGs に変えて Laminin511-8E を免疫源としてモデルマウスを作成し、耐糖能を評価する方針とした。

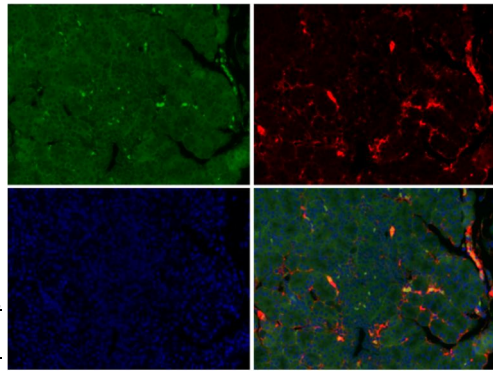


図3. 膵蛍光免疫染色(x40):左上(CD138)、右上(IgG4)、左下(DAPI)、右下(merge)

(2) Laminin511-8E を用いた IgG4 関連疾患モデルマウスの作成

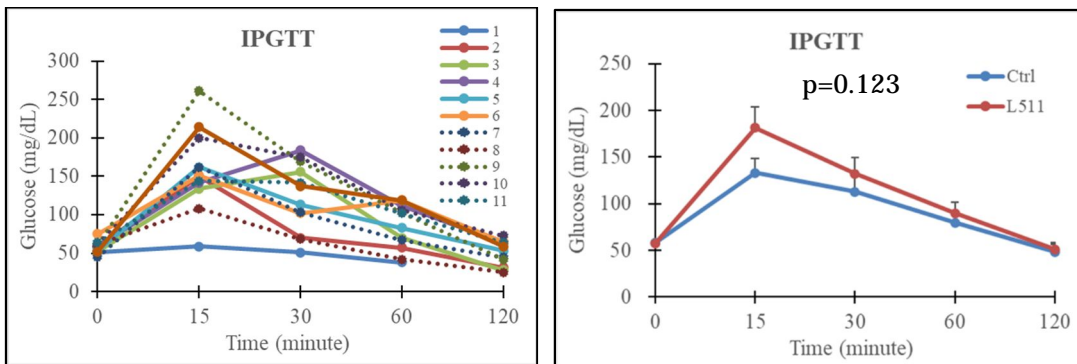
Laminin511-8E 投与方法については、4週おき×3回投与と2週おき×3回投与の2条件を検討した。2週おき投与では、エマルジョン投与量が多くマウスへの侵襲が多いためか原因不明で死亡する個体が出現した。そのため、既報と同様に4週おき×3回投与を採用した。HE染色では、患者血清由来 IgGs を用いた場合と同様に顕著な炎症細胞浸潤は認められなかったが、IgG4 対応抗原である Laminin511-8E を用いていることから bと同様に膵腺房細胞基底膜もしくは間質への結合が推定された。新生児マウスに比して長い時間経過で炎症が続いた場合、膵障害による耐糖能異常を来す可能性が期待されたため、IPGTT で耐糖能を評価する方針とした(以下)。

(3) IgG4 関連疾患モデルマウスにおける耐糖能の検討 (IPGTT: 腹腔内ブドウ糖負荷試験)

IgG4 関連疾患で最も頻度が多い自己免疫性膵炎では、高率に耐糖能異常を呈するため、Ctrl 群 vs. L511 群において、IPGTT を行い両群で比較検討した。マウス免疫は、4週間毎×3回行い、最後の免疫から1週間後に IPGTT を行った。以下に結果を示す(図4)。

負荷前の体重測定では、両群で有意な差を認めなかった(23.6g vs. 22.5g, p=0.515)。IPGTT では、負荷前血糖は両群でほぼ同程度で差がなく、負荷後15分で血糖は頂値を示した。負荷後15分血糖を比較すると、Ctrl 群に比して、L511 群の方が高い傾向を示したものの有意差を認めるほどではなかった(Ctrl vs. L511 = 133mg/dL vs. 181.5mg/dL, p=0.123)。L511 投与による免疫応答による炎症が耐糖能悪化に寄与した可能性はあるが、その程度は軽く顕著な差を認めるほどではなかったと推測された。

図4. 腹腔内ブドウ糖負荷試験 [Ctrl 群(n=6). vs. L511 群(n=6)]



付記) 左図: 個体間比較、右図: 平均値比較

(4) IgG4 関連疾患モデルマウスの内分泌臓器における小胞体ストレスの検討(real time PCR)

IgG4 関連疾患では自己免疫性膵炎の合併が最も多く、内分泌疾患と小胞体ストレスの関連において最も検討が行われている膵組織を代表的組織とし、小胞体ストレスの検討を行った。代表的なストレスセンサーとして IRE1、PERK、ATF6 が挙げられる(図5)。それぞれの下流で発現する遺伝子 XBP1、TXNIP、CHOP の遺伝子発現を確認した(図6)。

Ctrl 群 vs. L511 群の比較において、両群で有意な差は認められず、当初予測された L511 群における小胞体ストレスの過剰応答は認当初予測された L511 群の組織所見において炎症細胞

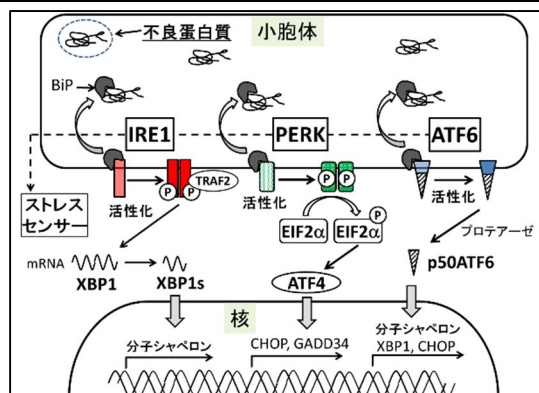
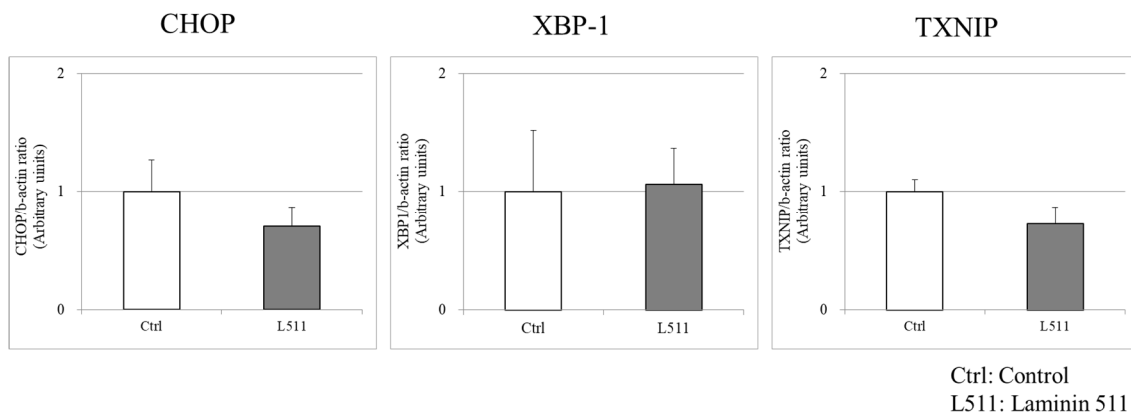


図5. 小胞体ストレスへの応答機構(UPR)

浸潤が顕著でない点と合致した。

以上から、既報に基づく L511 皮下投与では IgG4 関連疾患に伴う膵病変を十分再現できておらず、小胞体ストレス応答を適切に評価するのは困難と考えられた。今後、L511 の投与量を過剰量投与するか、より病態形成に強く関与する新規の IgG4 対応抗原を用いて、本来の IgG4 関連疾患に伴う膵病変に近い状態を再現することが、今後の KIRA 治療効果の検討における課題と考え

図 6. 小胞体ストレスマーカーの遺伝子発現 [Ctrl 群(n=6). vs. L511 群(n=6)]



られた。

< 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. Takeshima K et al. Predominant Improvement of Alpha Cell Function after Steroid Therapy in a Patient with Autoimmune Pancreatitis: Case Report. *Diabetes Ther* 9(3):1385-1395, 2018.
6. Ozcan U et al. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science*. 306(5695):457-461, 2004.
7. Morita S et al. Targeting ABL-IRE1 α Signaling Spares ER-Stressed Pancreatic β Cells to Reverse Autoimmune Diabetes. *Cell Metab* 4;25(4):883-897, 2017.
8. Shiokawa M et al. Pathogenicity of IgG in patients with IgG4-related disease. *Gut* 65:1322-1332, 2016.
9. Shiokawa M et al. Laminin 511 is a target antigen in autoimmune pancreatitis. *Sci Transl Med* 8;10(453), 2018.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Nobuyuki Nishi, Ken Takeshima, Shuhei Morita, Hiroshi Iwakura, Masahiro Nishi, Takaaki Matsuoka	4. 巻 2021
2. 論文標題 Nobuyuki Nishi, Ken Takeshima, Shuhei Morita, Hiroshi Iwakura, Masahiro Nishi, Takaaki Matsuoka	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Endocrinol Diabetes Metab Case Rep	6. 最初と最後の頁 21-0029
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1530/EDM-21-0029	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 Takeshima Ken, Li Yaqiong, Kakudo Kennichi, Hirokawa Mitsuyoshi, Nishihara Eijun, Shimatsu Akira, Takahashi Yutaka, Akamizu Takashi	4. 巻 68
2. 論文標題 Proposal of diagnostic criteria for IgG4-related thyroid disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Endocrine Journal	6. 最初と最後の頁 1~6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1507/endoerj.EJ20-0557	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 Morita Shuhei, Takeshima Ken, Ariyasu Hiroyuki, Furukawa Yasushi, Kishimoto Shohei, Tsuji Tomoya, Uraki Shinsuke, Mishima Hiroyuki, Kinoshita Akira, Takahashi Yuichi, Inaba Hideo, Iwakura Hiroshi, Furuta Hiroto, Nishi Masahiro, Doi Asako, Murata Shin-ichi, Yoshiura Koh-ichiro, Akamizu Takashi	4. 巻 20
2. 論文標題 Expression of unfolded protein response markers in the pheochromocytoma with Waardenburg syndrome: a case report	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Endocrine Disorders	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12902-020-00574-9	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0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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