

令和 6 年 6 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02901

研究課題名（和文）自己免疫性膵炎の抗原同定

研究課題名（英文）identification of autoantigens of autoimmune pancreatitis

研究代表者

塩川 雅広（Shiokawa, Masahiro）

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：50737880

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：IgG4関連疾患の膵病変である自己免疫性膵炎 autoimmune pancreatitis (AIP)において、その病因自己抗原がラミニン511であることを世界に先駆けて発見した（Sci Transl Med. 2018;10:453）。しかし、ラミニン511自己抗体は自己免疫性膵炎患者の約半数でしか陽性にならず、残りの自己抗体の同定が課題である。本研究にて、ラミニンに結合するタンパク質であるインテグリン  $\alpha 6 \beta 1$ に対する自己抗体がラミニン511自己抗体陰性例の約2割で陽性であり、他の研究から真の自己抗原であることが明らかになった。残り3割の自己抗体の同定が今後の課題である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

世界中でAIPを含めたIgG4関連疾患の病態と関連する自己抗原を同定しているグループは申請者のグループ以外には認めず、同研究は学術的独自性、重要性が非常に高い。今回新たに抗インテグリン  $\alpha 6 \beta 1$ 自己抗体が病因抗体として検証できたことは、学術的に独創的かつ創造性に富む研究と言える。また、本抗体は診断・病勢評価にも使用し、将来的には治療ターゲットにもなると考えられ、実臨床への応用も十分に期待でき、社会的意義も大きいと考えられる。

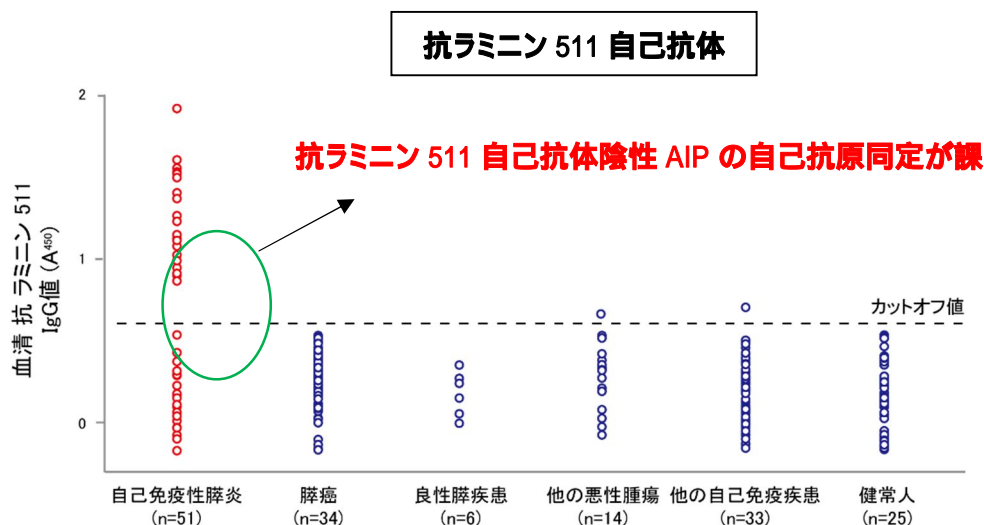
研究成果の概要（英文）：We were the first in the world to discover that the causative autoantigen in autoimmune pancreatitis (AIP), a pancreatic lesion of IgG4-related disease, is laminin 511 (Sci Transl Med. 2018;10:453). However, laminin 511 autoantibodies are only positive in about half of autoimmune pancreatitis patients, and the identification of the remaining autoantibodies remains a challenge. In this study, autoantibodies against integrin  $\alpha 6 \beta 1$ , a protein that binds to laminin, were positive in about 20% of laminin 511 autoantibody-negative cases, and other studies have revealed that they are true autoantigens. Identification of the remaining 30% of autoantibodies remains a future challenge.

研究分野：消化器内科学

キーワード：自己免疫性膵炎 自己抗体 自己抗原 IgG 4 関連疾患 IgG 4

## 1. 研究開始当初の背景

IgG4 関連疾患における多臓器病変は、以前はそれぞれの領域で観察されていた。2001 年、我が国で自己免疫性膵炎における血清 IgG4 高値が発見され、これらが一連の全身性疾患であることが明らかとなった。その後、2011 年に IgG4 関連疾患包括診断基準、2015 年に診断・治療に関する国際コンセンサスが策定され、その疾患概念が全世界に広く受け入れられると共に罹患患者数も世界的に増加している。一方、**IgG4 関連疾患は高 IgG/IgG4 値やステロイドへの反応性より自己免疫の関与が疑われてきたが、その病因は未だ不明であった。**また特異的な診断法・治療法もなく、2014 年に我が国の指定難病に指定された。このような中、**申請者らは、IgG4 関連疾患の膵病変である AIP において、その病因自己抗原がラミニン 511 であることを発見した (Sci Transl Med. 2018;10:453)** 申請者らは、1)AIP 患者の約 5 割に抗ラミニン 511 抗体が検出されたこと、2)抗体陽性例と陰性例で臨床像が異なること、3)治療により抗体の力価が減少すること、4)ラミニン 511 をマウスに免疫することにより AIP の病理診断基準を満たす膵病変が誘導されたことにより、ラミニン 511 が AIP の原因自己抗原であることを明らかにした (Sci Transl Med. 2018;10:453) しか、ラミニン 511 自己抗体は AIP の約半数でしか陽性にならず、**残りの自己抗原の同定が課題となっている(下図)。**



## 2. 研究の目的

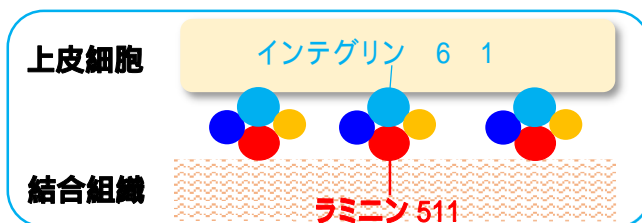
本研究の目的は、**ラミニン 511 以外の AIP の自己抗原を同定することである。**

## 3. 研究の方法

### A. AIPにおける新規自己抗原の同定

#### A-1 ラミニン結合蛋白質が自己抗原となっているか否かを明らかにする

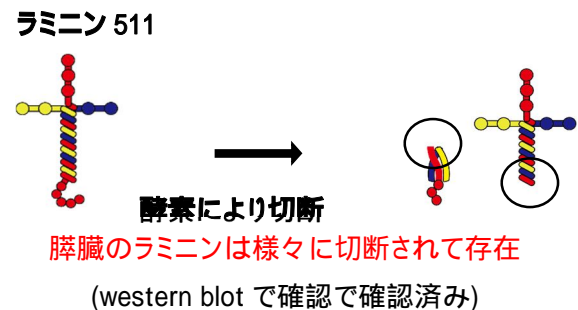
申請者らはプレ実験として、ラミニン 511 自己抗体陰性自己免疫性膵炎患者の中に、ラミニン 511 に生理的に結合する蛋白であるインテグリン 6 1(右図)に対する自己抗体を有する患者を見出している。生理的にラミニン



511 と結合する蛋白には、インテグリン 6 1 以外に、その他のインテグリンファミリー、ナイドジェン、パールカンやアグリン蛋白質などが存在し、これらの蛋白質が残りの自己抗原になっている可能性がある。実際、皮膚の自己免疫疾患である類天疱瘡では、皮膚の特定の junction を形成する蛋白群が自己抗原となっており、同様に AIP でもラミニン 511 を中心とした蛋白群が自己抗原になっているのではないかと仮説している。これらの蛋白質が自己抗原になっていないか、ELISA で検討する。

#### A-2 ラミニンアイソフォーム、もしくはラミニン断片が自己抗原となっているか否かを明らかにする

また、前述のように、申請者らは自己免疫性膀胱炎の病因自己抗原がラミニン 511 であることを発見し報告した。ラミニン 511 は 5 鎖 / 1 鎖 / 1 鎖の組み合わせによる三量体であり、膀胱に豊富に存在することが知られている。一方、ラミニンには、1- 5 の 5 種類の鎖、1- 3 の 3 種類の鎖、1- 3 の 3 種類の鎖の組み合わせにより 19 種類のアイソフォームが存在する。申請者らはこれまでに、IgG4 関連腎疾患においてラミニン 511 以外のラミニンアイソフォームに対する自己抗体を見出している。本研究では、これらのラミニンアイソフォームが AIP の残りの自己抗原となっている可能性について検討する。更に、ラミニンは、細胞外に存在する酵素により、異なる形態のラミニン断片となり、それに伴い機能が異なることが報告されており、抗原性も異なることが予想される(右図)。ラミニンが断片化されることによって自己抗原が生じていないか検討する。ラミニンを酵素で切断し、ELISA で血清との反応性を検証する。



#### A-3 A-1、A-2 で自己抗原が同定できなかった場合

申請者らは、自己抗原候補が細胞外マトリックスを中心に存在していることを先のマウスへの AIP 患者 IgG 投与実験にて発見している。このため、A-1、A-2 で同定できなかった場合には、膀胱の細胞外マトリックス蛋白を中心に網羅的に ELISA でスクリーニングを行い、自己抗原を同定する。最近、申請者らグループは独自にタンパク質を作成することに成功しており、本研究が可能である。(以前の研究では、候補タンパクは市販されているのみの蛋白だけであり、限界があった)

### B. マウスモデルを用いたのAIPの病態解明

#### B-1 患者 IgG のマウスへの投与による病的自己抗体の証明

「A. AIP における新規自己抗原の同定」と同時に、患者 IgG のマウスへの投与により、膀胱障害の有無について検討する。各自己抗体ごとに膀胱病変に差異がないかも検討する。コントロールには健常人の IgG を使用する。

## B-2 新規自己抗原を用いたモデルマウスの作成と解析

「A. 新規自己抗原の同定」で得られた自己抗原候補蛋白質をマウスへ免疫することにより、ヒト AIP の再現の有無について検討する。更に、各自己抗原ごとに、phenotype に差がないか、また、ヒトの病理像との関連も検索する。



## C. 自己抗体の病的作用機序を明らかにする

B-1.にて、申請者らは、自己抗体の病的作用を示してきた。その機序の一つが補体依存性でもあることも報告した (*Gut*. 2016;65:1322-1332)。しかし、そのほかにも、抗体が結合することによって、上皮に何らかの病的シグナル変化が生じている可能性がある。これらを解析するために、B-1、B-2のマウス脾臓を RNA シークエンスすることで、シグナル変化を同定する。

## D. 自己抗体測定によるAIPの新規診断法・病勢評価法の確立

AIP は、臓器腫大・高 IgG4 血症・組織所見によって診断されるが、その特徴である高 IgG4 血症も診断における特異度は約 70%と決して高くなく、実際脾臓と間違われて、不要な手術をされてしまう症例もいまだ存在する。国際的に通じる新たな診断法の確立が求められている。本研究では、**申請者らが同定した自己抗原・自己抗体を基に、汎用性のある新規診断法を開発することにより、病態に基づいた新たな診断基準の Gold standard の確立を目指す。**また、抗ラミニン自己抗体は病勢との相関が認められているが、新規自己抗体と病勢との相関も検証する。

## 4. 研究成果

### A. AIP における新規自己抗原の同定

#### A-1 ラミニン結合蛋白質が自己抗原となっているか否かを明らかにする

2021 年度の実験でインテグリン 6 1 が自己抗原であることは症例数を増やして確認した。AIP60 例中、ラミニン 511 抗体陽性例 32 例、インテグリン 6 1 抗体陽性例 5 例、両者とも陰性である 23 例であった。しかし、それ以外の結合蛋白インテグリン 3 1、ナイドジェン、パールカンやアグリン蛋白質は自己抗原ではなかった。

2022年度において「A-2ラミニン断片が自己抗原となっているか否かを明らかにする」を行ったが、ラミニン断片を各種膵酵素で切断し、ラミニン断片に対して自己抗体を有しているか、ELISAを行ったが、自己抗体は検出できなかった。また、ラミニンのアイソフォーム(ラミニン 521、421、411、332、211、111)も検証したが自己抗原であることを確認できなかった。

2023年度はラミニン 511 に結合するタンパクであるパールカンなど、インテグリン 6 1 以外のタンパクに自己抗原が存在しないかを検証した。しかし、インテグリン 6 1 以外には自己抗原は同定できなかった。

## A-2 ラミニンアイソフォーム、もしくはラミニン断片が自己抗原となっているか否かを明らかにする

ラミニン 511 は 5 鎖 / 1 鎖 / 1 鎖の組み合わせによる三量体であり、膵臓に豊富に存在することが知られている。一方、ラミニンには、1- 5 の 5 種類の 鎖、1- 3 の 3 種類の 鎖、1- 3 の 3 種類の 鎖の組み合わせにより 19 種類のアイソフォームが存在する。本年度、これらのラミニンアイソフォームが AIP の残りの自己抗原となっている可能性について検討した。AIP60 例で検討したが、ラミニンアイソフォームに対する自己抗体は認めなかった。

また、ラミニン断片を各種膵酵素で切断し、ラミニン断片に対して自己抗体を有しているか、ELISAを行ったが、自己抗体は検出できなかった。また、ラミニンのアイソフォーム（ラミニン521、421、411、332、211、111）も検証したが自己抗原であることを確認できなかった。

## B. マウスモデルを用いたAIPの病態解明

「新規自己抗原を用いたモデルマウスの作成と解析」

これまでの実験にて、インテグリン 6 1 が自己抗原であることが確認できている。同自己抗原候補蛋白質をマウスへ免疫することにより、ヒトAIPの再現の有無について検討した。その結果、インテグリン 6 1 を免疫すると膵臓に障害が生じた。数を7匹に増やしても検証しえた。これらからインテグリン 6 1 はAIPの自己抗原になっている可能性が高い。

インテグリン 6 1 が真の(primary)抗原であるかを検証するために、インテグリン 6 1 をアジュバントと共にマウスに免疫したところ、膵臓のみに腺房細胞が明らかに小さくなるという病変が誘導された。コントロールの卵白アルブミン免疫マウスの膵臓では、異常を認めなかった。ヒト AIP でも、同様の所見は認める。

また、インテグリン 6 1 を免疫したマウスでは、ラミニン 511 を免疫したマウスと比較し、繊維化や T 細胞などの炎症細胞浸潤が少ないが、腺房細胞が小さいといった特徴を有していた。

以上より、**インテグリン 6 1 が真の AIP のラミニン以外の自己抗原であることは検証できた。**

C. と D. に関しては A と B の研究が仮説通り進まなかったこともあり、研究が進まなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Masataka Yokode, Masahiro Shiokawa, Yuzo Kodama	4. 巻 25
2. 論文標題 Review of Diagnostic Biomarkers in Autoimmune Pancreatitis: Where Are We Now?	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Diagnostics (Basel) .	6. 最初と最後の頁 770
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/diagnostics11050770	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 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 1件）

1. 発表者名 Masahiro Shiokawa, Takeshi Kuwada, Sakiko Ota, Takeharu Nakamura, Hiroyuki Yoshida, Nobuyuki Kakiuchi, Saiko Marui, Yuko Sogabe, Toshihiro Morita, Tomoaki Matsumori, Atsushi Mima, Yoshihiro Nishikawa, Tatsuki Ueda, Norimitsu Uza, Kodama Yuzo, Tsutomu Chiba, Hiroshi Seno
2. 発表標題 Antigens and autoantibodies in IgG4-RD: Laminin-511, Galectin-3, Annexin-11, and others
3. 学会等名 The 4th International Symposium on IgG4-related diseases The 13th Annual Meeting of Japanese Association of IgG4-related diseases（招待講演）（国際学会）
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	桑田 威  (Kuwada Takeshi)  (10879084)	神戸大学・医学研究科・特別研究員（PD）    (14501)	

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