

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08471

研究課題名(和文) IgG4関連疾患におけるRNA-Seqを用いた遺伝子発現解析と新規治療標的の開発

研究課題名(英文) Gene expression analysis by RNA-Seq and development of novel therapeutic target in IgG4-related disease

研究代表者

坪井 洋人 (Tsuboi, Hiroto)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：80580505

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：IgG4関連疾患(IgG4-RD)の顎下腺と末梢血単核球(PBMC)、一次性シェーグレン症候群と健康人のPBMCからT/B細胞を分離し、遺伝子発現をRNA-Seqで比較した。主成分分析ではIgG4-RDの顎下腺と末梢血間でT/B細胞の遺伝子発現パターンは異なり、顎下腺で発現増加した遺伝子の中で、IL-21、EGR2を含む複数のサイトカイン、ケモカイン、転写因子が抽出された。パスウェイ解析では、IgG4-RDの顎下腺T細胞ではTh1、Th2、IL-17、wound healing、TLR、SLEシグナルが、顎下腺B細胞ではIL-8、IL-15、補体、線維化、SLEシグナルの亢進が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、RNA-SeqによりIgG4関連疾患(IgG4-RD)の唾液腺病変局所のT/B細胞で発現変動した遺伝子が抽出され、病態への寄与が示唆されるパスウェイが同定された。これらの遺伝子やパスウェイは、IgG4-RDの新規診断マーカーや治療標的となる可能性が期待される。また、現在開発が進行中のIgG4-RDの分子標的治療薬の好適症例の同定や、治療反応性予測にも貢献できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We conducted RNA sequencing to compare the gene expressions of T and B cells in submandibular glands (SMGs) and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in IgG4-related disease (IgG4-RD) or IgG4-RD versus primary Sjogren's syndrome (pSS) and healthy controls (HCs) in PBMCs. Principal component analysis (PCA) results showed the gene expression patterns of T and B cells derived from SMGs differed from those derived from PBMCs in IgG4-RD. The upregulated differentially expressed genes (DEGs) in SMGs of IgG4-RD included cytokines, chemokines, and transcription regulators such as IL-21 and EGR2. Ingenuity pathway analysis (IPA) for these DEGs clarified that Th1, Th2, IL-17, wound healing, Toll-like Receptor (TLR), and systemic lupus erythematosus (SLE) signaling for T cells, while IL-8, IL-15, complement, fibrosis, and SLE signaling for B cells were positively regulated in SMGs compared with PBMCs in IgG4-RD.

研究分野：膠原病内科学

キーワード：IgG4関連疾患 RNA-Seq 顎下腺 末梢血単核球 T細胞 B細胞

1. 研究開始当初の背景

IgG4 関連疾患 (IgG4-related disease; IgG4-RD) は、21 世紀になって確立された新規疾患概念で、血清 IgG4 の上昇、全身諸臓器への IgG4 陽性形質細胞の浸潤と花筵様と呼ばれる線維化を特徴とする疾患である [Mod Rheumatol 22:1-14,2012] [N Engl J Med 366:539-551, 2012]。主な罹患臓器だけでも、膵臓、胆管、唾液腺、涙腺、甲状腺、肺、肝臓、腎臓、前立腺、大動脈周囲、後腹膜、リンパ節など多彩であり、様々な診療科を受診する機会がある。IgG4-RD は、現在国の指定難病に認定されており、診断基準と重症度を満たした場合には、医療費助成の対象となる。指定難病の認定に伴って、近年疾患の認知度が上昇し、原因不明の腫瘍の精査の過程で、血清 IgG4 高値を指摘され、本疾患を疑われて膠原病内科を受診する患者が増加している。病変部位が多岐に渡る患者も多く、各病変の悪性腫瘍の鑑別を含めて多くの診療科との連携も重要である。初期治療としてグルココルチコイドは有効だが、近年長期観察例の増加に伴い、グルココルチコイド減量後の再燃は 20~50% [Sci Rep 8:10262, 2018] と比較的高いことも明らかになってきた。再燃を抑制する疾患特異的治療が確立されていないため、グルココルチコイドの長期投与や、再燃に伴う増量を余儀なくされることが多く [BMJ 369:m1067, 2020]、本疾患をめぐる最も重要な unmet medical need となっている。現在、IgG4-RD の病因病態の根本的な解明と、疾患特異的な治療標的細胞、治療標的分子の同定が求められている。

IgG4-RD の病因病態に関して、従来ヘルパー T 細胞の異常や IgG4 を産生する B 細胞、形質細胞の異常に着目した研究がなされてきたが、最近では自然免疫と獲得免疫のクロストークが注目されている [Tsuboi H, et al. Mod Rheumatol 30:7-16, 2020]。申請者は IgG4-RD の病変局所 (唾液腺) に浸潤した獲得免疫細胞として T 細胞、B 細胞に特異的な遺伝子発現のパターンはあるのか、末梢血と病変局所で差はあるのか、さらに IgG4-RD 同様に唾液腺に細胞浸潤を呈するものの病因病態が異なるシェーグレン症候群 (Sjögren's syndrome; SS) とどのような違いがあるのかを明らかにしたいと考えた。

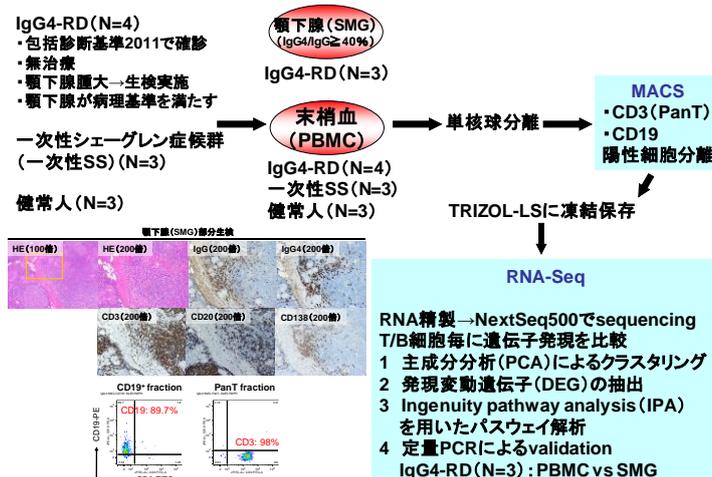
2. 研究の目的

本研究では、IgG4-RD の顎下腺 (submandibular gland; SMG)、末梢血単核球 (peripheral blood mononuclear cell; PBMC)、疾患コントロールとして SS、および健常人 (healthy control; HC) の PBMC より、獲得免疫細胞として T 細胞、B 細胞を分離し、RNA-Seq を用いて各細胞サブセットにおける遺伝子発現を疾患群間、および顎下腺と PBMC 間で網羅的に比較し、IgG4-RD の唾液腺に浸潤した獲得免疫細胞の遺伝子発現パターンを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

無治療の IgG4-RD 確診例 (N=4) から、組織学的基準を満たす顎下腺 (N=3) と PBMC (N=4) を採取した。また一次性 SS (N=3) と健常人 (N=3) から PBMC を採取した。顎下腺および PBMC から magnetic-activated cell sorting (MACS) で CD3 陽性 T 細胞、CD19 陽性 B 細胞を分離した。IgG4-RD、一次性 SS、健常人の PBMC 間、および IgG4-RD の顎下腺と PBMC の間で、T/B 細胞の遺伝子発現を RNA-Seq で比較し、以下の解析を行った (図 1)

図1 RNA-Seqを用いたT/B細胞特異的遺伝子発現解析



1) PBMC (IgG4-RD vs 一次性 SS vs 健常人)、および IgG4-RD (PBMC vs 顎下腺) に関して、主成分分析 (principal component analysis; PCA) によるクラスタリングを行った。

2) 上記 1) で遺伝子発現パターンに差異がみられた群間で、発現変動遺伝子 (differentially expressed genes; DEG) の抽出を行った。

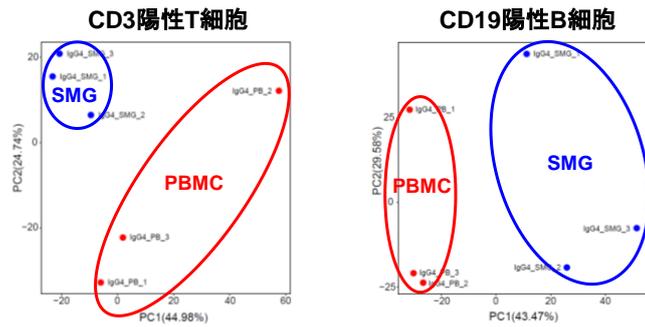
3) 上記 2) の DEG に関して、Ingenuity pathway analysis (IPA) を用いたパスウェイ解析を行った。

4) RNA-Seq とは別の IgG4-RD (N=3) の PBMC および顎下腺から CD3 陽性 T 細胞、CD19 陽性 B 細胞を MACS で分離し、上記 2) で同定された DEG に関して、定量 PCR による validation を行った。

4. 研究成果

1) 主成分分析によるクラスタリングでは、PBMCのT/B細胞の遺伝子発現パターンは、IgG4-RD、一次性SS、健常人の3群間で類似していた。一方でIgG4-RDの顎下腺とPBMC間でT/B細胞の遺伝子発現パターンは異なっていた(図2)。

図2 RNA-Seq 主成分分析によるクラスタリング IgG4-RD(N=3) PBMC vs 顎下腺



IgG4-RDのPBMCと顎下腺(SMG)では、CD3陽性T細胞、CD19陽性B細胞の遺伝子発現パターンはそれぞれ異なっていた

2) PBMCと比較し、顎下腺T細胞で発現増加したDEGは214個、減少したDEGは50個、顎下腺B細胞で発現増加したDEGは630個、減少したDEGは109個であった(図3)。顎下腺で発現増加したDEGの中で、IL-10、IL-21、EGR2を含む複数のサイトカイン、ケモカイン、転写因子が抽出された(図4、図5)。

図3 発現変動遺伝子(DEG)の抽出 IgG4-RD(N=3) PBMC vs 顎下腺

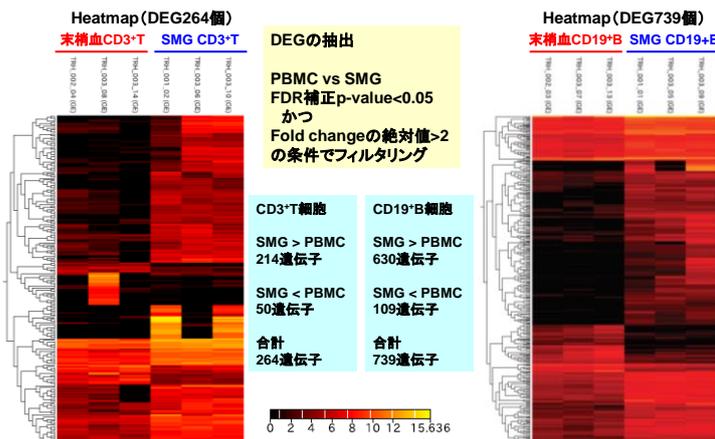
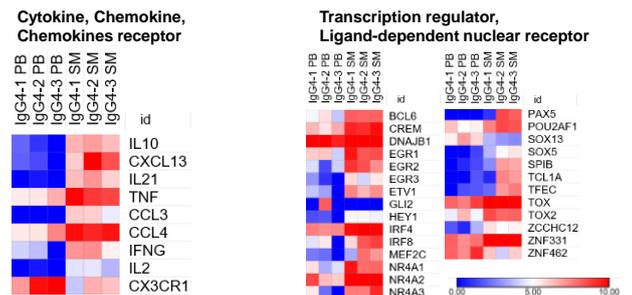


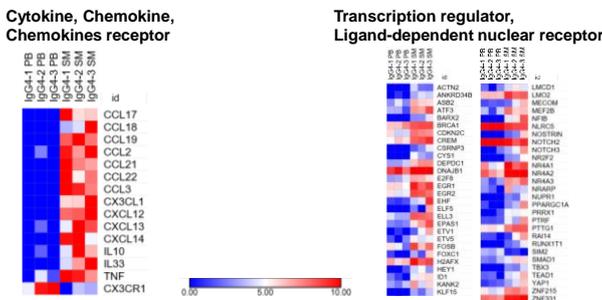
図4 DEGの抽出 CD3陽性T細胞 PBMC vs 顎下腺 サイトカイン、ケモカイン、ケモカイン受容体、転写関連因子



顎下腺(SMG)のCD3陽性T細胞で発現変動(vs PBMCのCD3陽性T細胞)

- Cytokines→IFN γ 、IL-10、IL-2、IL-21、TNF \uparrow
- Chemokines→CXCL13、CCL3、CCL4 \uparrow
- Chemokine receptors→CX3CR1(フラクタルカイン受容体) \downarrow
- Transcription regulators→BCL6、EGR1、EGR2、EGR3、IRF4、IRF8 \uparrow

図5 DEGの抽出 CD19陽性B細胞 PBMC vs 顎下腺 サイトカイン、ケモカイン、ケモカイン受容体、転写関連因子



顎下腺(SMG)のCD19陽性B細胞で発現変動(vs PBMCのCD19陽性B細胞)

- Cytokines→IL-10、IL-33、TNF \uparrow
- Chemokines→CCL2、3、17、18、19、21、22、CX3CL1、CXCL12、13、14 \uparrow
- Chemokine receptors→CX3CR1 \downarrow
- Transcription regulators→ATF3、EGR1、EGR2 \uparrow

3) Ingenuity Pathway Analysis (IPA) を用いたパスウェイ解析では、IgG4-RD の顎下腺 T 細胞では Th1、Th2、IL-17、wound healing、Toll-like Receptor (TLR)、全身性エリテマトーデス (SLE) シグナルの亢進が認められた (図 6)。顎下腺 B 細胞では IL-8、IL-15、補体、線維化、SLE シグナルの亢進が認められた (図 7)。

図6 DEGのIPAによるパスウェイ解析
Z-score of the top 25 ingenuity canonical pathways
CD3陽性T細胞 PBMC vs SMG

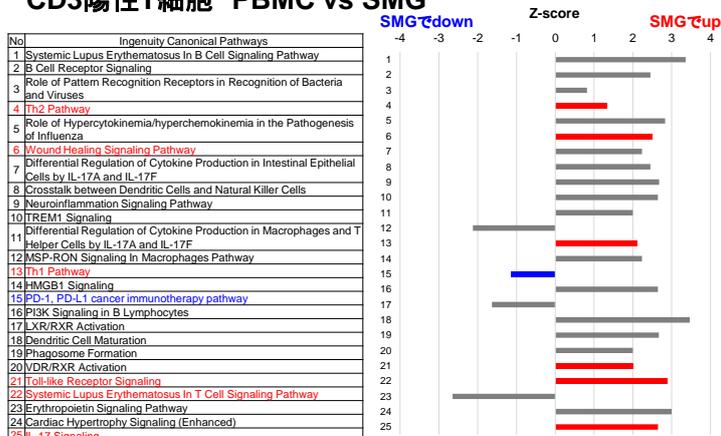
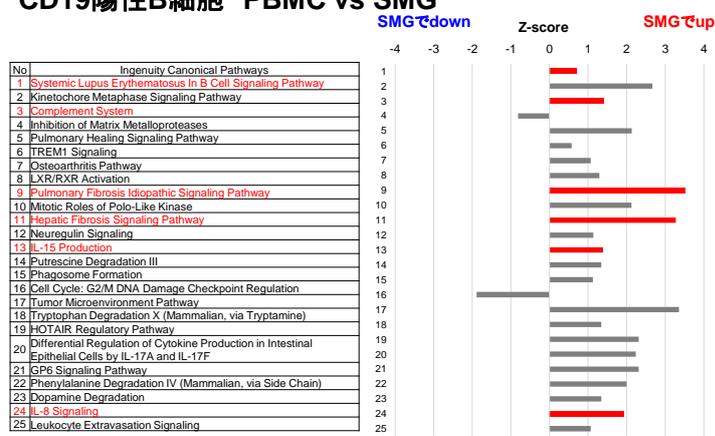


図7 DEGのIPAによるパスウェイ解析
Z-score of the top 25 ingenuity canonical pathways
CD19陽性B細胞 PBMC vs SMG

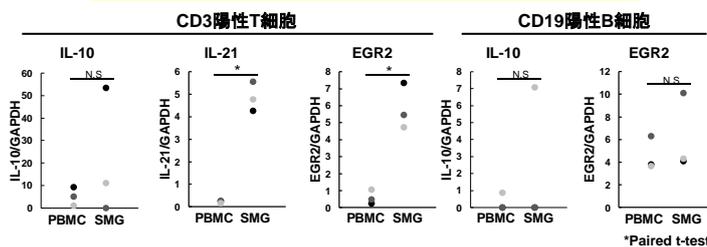


4) 定量 PCR による validation において、IgG4-RD の顎下腺 T 細胞では PBMC と比較して、IL-21、EGR2 の mRNA 発現は有意に増加していた (図 8)。

以上から、RNA-Seq により IgG4-RD の唾液腺病変局所の T/B 細胞で発現変動した遺伝子が抽出され、病態への寄与が示唆されるパスウェイが同定された。

図8 定量PCRによるvalidation
IgG4-RD (N=3) PBMC vs 顎下腺
IL-10、IL-21、EGR2

Validation候補遺伝子 (SMG > PBMC)
CD3陽性T細胞 → IL-10 (ランク4位)、IL-21 (ランク8位)、EGR2 (ランク18位)
CD19陽性B細胞 → IL-10 (ランク391位)、EGR2 (ランク53位)



SMGのCD3陽性T細胞において、PBMCと比較して、IL-21、EGR2の発現は有意に増加していたが、IL-10は有意な差は認めなかった

SMGのCD19陽性B細胞において、PBMCと比較して、IL-10、EGR2の発現は有意な差は認めなかった

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 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Iwamoto, Asashima H, Sugita T, Kawashima F, Sugita N, Rai A, Kuroda Y, Kawashima A, Tabuchi D, Akao S, Sato R, Nishiyama T, Toko H, Honda F, Ohyama A, Kitada A, Abe S, Miki H, Hagiwara S, Kondo Y, Tsuboi H, Matsumoto I	4. 巻 44
2. 論文標題 An overlapping case of IgG4-related disease and systemic lupus erythematosus treated with belimumab: a case-based review	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Rheumatology International	6. 最初と最後の頁 549-556
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00296-023-05510-3	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 坪井洋人、浅島弘充、東光裕史、本田文香、安部沙織、高橋広行、近藤裕也、松本功、住田孝之
2. 発表標題 RNA-Seqを用いたIgG4関連唾液腺炎病変局所のT/B細胞特異的発現変動遺伝子の同定とパスウェイ解析
3. 学会等名 第66回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hiroyuki Tsuboi, Fumika Honda, Hirofumi Toko, Ayako Kitada, Yuya Kondo, Takayuki Sumida, and Isao Matsumoto
2. 発表標題 New era of molecular targeted therapy for IgG4-related disease
3. 学会等名 Federation of Clinical Immunology Societies (FOCIS) 2022 Annual Meeting Member Society Symposium hosted by Japanese Society of Clinical Immunology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 坪井洋人、本田文香、安部沙織、高橋広行、近藤裕也、松本功、住田孝之
2. 発表標題 RNA-Seqを用いたIgG4関連疾患病変局所のT/B細胞特異的発現変動遺伝子の同定
3. 学会等名 第65回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田淵大貴、坪井洋人、杉田稔貴、西山泰平、寺崎真由、岡本翔太、寺崎俊彦、清水優、本田文香、柳下瑞希、藏田泉、大山綾子、安部沙織、長田侑、高橋広行、萩原晋也、近藤裕也、住田孝之、松本功
2. 発表標題 IgG4関連疾患におけるステロイド治療後の再燃例の検討
3. 学会等名 第65回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坪井洋人、浅島弘充、本田文香、東光裕史、安部沙織、北田彩子、三木春香、近藤裕也、住田孝之、松本功
2. 発表標題 RNA-Seqを用いたIgG4関連唾液腺炎病変局所と末梢血間のT/B細胞特異的遺伝子発現比較とパスウェイ解析
3. 学会等名 第67回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 坪井洋人、植松奈々、杉田稔貴、東光裕史、松本功	4. 発行年 2024年
2. 出版社 株式会社日本臨牀社	5. 総ページ数 7
3. 書名 特集：IgG4 関連疾患 診断と治療の最近の考え方 III. 各論(診断と治療) 診断、臨床病型分類	

〔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
---------	---------