

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23591015

研究課題名(和文)自己免疫性膵炎および全身合併症の免疫グロブリンの遺伝子解析

研究課題名(英文) Analysis of VH genes rearrangement and somatic hypermutation in autoimmune pancreatitis

研究代表者

中沢 貴宏 (nakazawa, takahiro)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70305522

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：手術標本よりDNAを抽出して免疫グロブリン重鎖超可変領域(CDR2)を解析した。1)自己免疫性膵炎3例、コントロールとしての閉塞性膵炎3例においてモノクローナルなVH遺伝子のrearrangementは1例も認めず、AIPに特徴的なVH familyやVH fragmentは認めなかったが、VH3 familyが比較的多く選択されていた。2)無体細胞変異クローン率は閉塞性膵炎が5.1%に対して自己免疫性膵炎では18%と高頻度(P=0.0053)に認められ、自己免疫性膵炎の発症に自己免疫現象が関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the immunoglobulin V heavy chain (VH) gene rearrangement and somatic hypermutation of lymphoid cells infiltrating in AIP (n=3), using obstructive pancreatitis (n=3) as non-autoimmune control. DNA was extracted from the affected inflammatory lesions. After PCR amplification of rearranged VH genes, the clones were subcloned. 100 recombinant clones were randomly picked-up in each case and sequenced. Monoclonal VH rearrangement was not detected in any cases examined. As compared with obstructive pancreatitis, there was no VH family or VH fragment specific to AIP. However, rates of unmutated VH fragments in AIP (25%) were higher than that in obstructive pancreatitis (5.1%) (P=0.0039). Conclusions: Some autoantibodies encoded by germline or less mutated VH genes may fail to be eliminated, and could play a role in the development of AIP.

研究分野：消化器

キーワード：自己免疫性膵炎

1. 研究開始当初の背景

自己免疫性膵炎および IgG4 関連の全身疾患はステロイド治療に良好に反応し経過は良好と報告されてきたが、実際はステロイドの持続的投与が必要な症例が多く種々の副作用が問題となっている。成因の解明およびその治療法の確立が急務である。発症には免疫的機序の関与が想定されているが、自己免疫の関与は明らかにされていない。一方ではアレルギーが発症に関与している可能性も報告されていた。

2. 研究の目的

本研究においてはまず、免疫グロブリン可変領域における遺伝子の体細胞変異を解析すること(重鎖および軽鎖遺伝子の hypersomatic mutation の頻度, usage の偏りの有無、用いられている V,D,J 断片の種類)により、自己免疫の関与の可能性を明らかにすること。

3. 研究の方法

外科的に切除されたまたは生検にて得られた組織標本で HE 染色および IgG4 染色にて IgG4 関連疾患と診断した以下の諸臓器の組織を用いる。自己免疫性膵炎は自己免疫性膵炎臨床診断基準 2006 (厚生労働省難治性膵疾患調査研究班・日本膵臓学会) により診断する。その他の IgG4 関連疾患と診断する基準としては病理学的に以下の特徴を有するものを用いた。すなわち、HE 染色ではリンパ球形質細胞の著しい浸潤と storiform 状、あるいは herringbone 状と呼ばれる特徴的な線維化、elastica van Gieson (EVG) 染色にて閉塞性静脈炎を、抗 IgG4 抗体(The Binding Site Ltd., Birmingham, UK, an automated immunohistochemical processor (HX system Discovery, Ventana)) により免疫染色を行い IgG4 陽性の形質細胞を 1 高視野あたり、10 個以上認めたとする。

従来の報告では末梢の B 細胞をコントロールとして用いてきたが、末梢の B 細胞の 70% は naive または unmuted であるため、非特異的な炎症をコントロールとするのが

良いと思われる。しかし、IgG4 関連疾患では臨床上、鑑別すべき疾患が決まっておりこれらとの異同が発症原因を推測するのに大切なため以下のような疾患をコントロールとした。

膵臓：自己免疫性膵炎と対象として通常の慢性膵炎を比較検討。

硬化性胆管炎：自己免疫性膵炎に合併する硬化性胆管炎と対象として原発性硬化性胆管炎を比較検討。

硬化性唾液腺炎：自己免疫性膵炎に合併する硬化性唾液腺炎と対象としてシェーグレン症候群を比較検討。

その他：肺、肝臓の IgG4 関連の炎症性偽腫瘍。後腹膜線維症など

(1) ホルマリンおよびパラフィン包埋した標本を proteinase K で digestion し、DNA を抽出する。

(2) 免疫グロブリン重鎖超可変領域 (CDR2) を semi-nested PCR にて増幅する (n>80)。VHgene の解析にもっともよく用いられている framework-2 (FR2A) と J region (LJH, VLJH) などを primer として用いる。

(3) アガロースゲルからモノクローナルバンドを切り出し、直接シーケンスを行う (DNA シークエンサー、アプライドバイオシステムズ、モデル 310)。さらに用いられている V、D、J 断片の種類をみるためにコロニー直接 PCR 法にて各症例 10 個以上のクローンの塩基配列を決定する。

(4) Immunoglobulin BLAST または V-bas などのデータベース (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>) により得られる germline 配列と得られた CDR2 可変領域配列を比較し、重鎖遺伝子の hypersomatic mutation の頻度、usage の偏りの有無、用いられている V、D、J 断片の種類を決定することにより自己免疫性疾患といえるか解析する。

自己免疫性膵炎の切除標本を用いて IgG、IgG4 の重鎖および軽鎖遺伝子の解析を行

う。 硬化性唾液腺炎、硬化性胆管炎、後腹膜線維症などの切除標本を用いて同様な解析を行う。 コントロールの疾患の切除標本を用いて同様な解析を行う。

さまざまな生検組織から IgG、IgG4 を抽出して免疫グロブリン遺伝子可変領域における体細胞変異の解析が生検診断に役だてることが可能か検討する。

4. 研究成果

(1) ホルマリン固定した手術標本より DNA を抽出して免疫グロブリン重鎖超可変領域 (CDR2) を semi-nested PCR にて増幅後に V、D、J 断片の種類をみるためにコロニー直接 PCR 法にて各症例 10 個以上のクローンの塩基配列を決定する手技が確立した。

(2) 自己免疫性膵炎 3 例、閉塞性膵炎 3 例の解析が終了した。

IgG4 関連疾患を証明するために IgG4, IgG 染色を施行した。

症例	IgG4-陽性細胞数 / IgG-陽性細胞数 (%)
自己免疫性膵炎	
1	69
2	79
3	71
慢性膵炎	
1	8.8
2	3.2
3	4.5

} p<0.001

モノクローナルな VH 遺伝子の rearrangement は 1 例も認めず、閉塞性膵炎と比較して AIP に特徴的な VH family や VH fragment は認めなかった。自己免疫性膵炎も慢性膵炎においても VH3 family が比較的

多く選択されていた。

自己免疫性膵炎 症例 1

VH	Total	U	M	U/Tota
VH1	3	2	1	0.67
VH2	0	0	0	-
VH3	41	9	32	0.22
VH4	19	3	16	0.16
VH5	2	0	2	0.00
VH6	0	0	0	-
VH7	0	0	0	-
VH3	41	9	32	0.22
non-VH3	24	5	19	0.21
Total	65	14	51	0.22

VH fragment の無体細胞変異クローン率の解析

1) 全体では無体細胞変異クローン率は閉塞性膵炎が 5.1% に対して自己免疫性膵炎は 18% と高頻度 (P=0.0053) に認めた。

以下 VH3family と nonVH3family にわけて解析した。

2) VH3family における無体細胞変異クローン率は閉塞性膵炎が 5.3% に対して自己免疫性膵炎は 18% と高頻度 (P=0.0050) に認めた。

3) nonVH3family における無体細胞変異クローン率は閉塞性膵炎が 4.8% に対して自己免疫性膵炎は 16% と高頻度 (P=0.0354) に認めた。

VH fragment の無体細胞変異クローン率が自己免疫性膵炎に高頻度に認められたことは、自己免疫性膵炎の発症に自己免疫現象が関与している可能性が示唆された。

(3) IgG4 関連硬化性胆管炎の VH family の解析

膵外胆管の手術標本は入手困難であったため、上述の自己免疫性膵炎の膵内胆管につい

て解析をしたが、臍組織と同様な結果であった。

(4) 原発性硬化性胆管炎の VH family の解析

肝移植を施行した手術標本は移植前の胆管炎、肝不全の状態では好中球が多く解析に適さなかった。肝生検の標本よりマイクロダイセクションなどを用いてリンパ球、形質細胞の抽出を試みたが、肝内に浸潤したリンパ球、形質細胞はごくわずかであり、十分な DNA 量が得られず解析は不可であった。

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 17 件)

1. Naitoh I, Nakazawa T, Hayashi K, 他 12 名 2 番目 Comparison of intraductal ultrasonography findings between primary sclerosing cholangitis and IgG4-related sclerosing cholangitis J Gastroenterol Hepatol. (in press) (査読有).
2. Khosroshahi A, Wallace ZS, Crowe JL, Akamizu T, Azumi A, Carruthers MN, Chari S, Della-Torre E, Frulloni L, Goto H, Hart P, Kamisawa T, Kawa S, Kawano M, Kim MH, Kodama Y, Kubota K, Lerch MM, Lohr M, Masaki Y, Matsui S, Mimori T, Nakamura S, Nakazawa T, 他 18 名, 24 番目. International Consensus Guidance Statement on the Treatment of IgG4-Related Disease Arthritis & Rheumatology. (in press) (査読有).
3. Nakazawa T, 他 9 名, 1 番目. Isolated intrapancreatic IgG4-related sclerosing cholangitis. World J Gastroenterol 2015 28; 21(4): 1049-1370, doi:10.3748/wjg.v21.i4.1334. (査読有).
4. Miyabe K, Notohara K, Nakazawa T, Hayashi K, 他 11 名 3 番目 Comparison study of the immunohistochemical stainings for the diagnosis of Type 1 autoimmune pancreatitis. J Gastroenterol 2015 50(4):455-466. doi: 10.1007/s00535-014-0980-9 (査読有)

5. Umemura S, Naitoh I, Nakazawa T, Hayashi K, 他 9 名, 3 番目. Autoimmune pancreatitis presenting a short narrowing of main pancreatic duct with subsequent progression to diffuse pancreatic enlargement over 24 months. JOP May15(3):261-265, 2014. doi: 10.6092/1590-8577/2393. (査読有).
6. Yamashita H, Naitoh I, Nakazawa T, Hayashi K, Miyabe K, Shimizu S, 他 9 名 3 番目. A comparison of the diagnostic efficacy in type 1 autoimmune pancreatitis based on biopsy specimens from various organs. Pancreatology 2014 14(3):186-192. doi: 10.1016/j.pan.2014.03.003 (査読有).
7. Nakazawa T, Naitoh I, Hayashi K, 他 4 名, 1 番目 Inflammatory bowel disease of primary sclerosing cholangitis: A distinct entity? World J Gastroenterol 2014 March 28; 20(12): 3245-3254. doi: 10.3748/wjg.v20.i12.3245. (査読有).
8. Miyabe K, Notohara K, Nakazawa T, Hayashi K, 他 8 名, 3 番目. Histological evaluation of obliterative phlebitis for the diagnosis of autoimmune pancreatitis. J Gastroenterol. 2014 49(4):715-726. doi: 10.1007/s00535-013-0818-x. (査読有).
9. Nakazawa T, Naitoh I, Hayashi K, 他 3 名, 1 番目. Diagnosis of IgG4-related sclerosing cholangitis. World Journal of Gastroenterology 2013 19(43):7661-7670. doi: 10.3748/wjg.v19.i43.7661. (査読有).
10. Ohara H, Nakazawa T, Kawa S, Kamisawa T, Shimosegawa T, Uchida K, Hirano K, Nishino T, Hamano H, Kanno A, Notohara K, Hasebe O, Muraki T, Ishida E, Naitoh I, 他 1 名, 2 番目. Establishment of a Serum IgG4 Cut-off Value for the Differential Diagnosis of IgG4-related Sclerosing Cholangitis- A Japanese Cohort. J Gastroenterol Hepatol. 2013 Jul;28(7):1247-51 doi: 10.1111/jgh.12248. (査読有).
11. Naitoh I, Nakazawa T, Hayashi K, 他 9 名, 2 番目. Clinical evaluation of International consensus diagnostic criteria for type 1 autoimmune

pancreatitis in comparison with Japanese diagnostic criteria 2011. *Pancreas* 2013 42(8):1238-1244. doi: 10.1097/MPA.0b013e318293e628. (査読有).

12. Naitoh I, Nakazawa T, Notohara K, Hayashi K, 他 8 名, 2 番目. Intraductal papillary mucinous neoplasm associated with autoimmune pancreatitis. *Pancreas*. 2013;42(3):552-554. doi: 10.1097/MPA.0b013e31826cc2fc. (査読有).

13. Naitoh I, Nakazawa T, Hayashi K, 他 6 名, 2 番目. A case of IgG4-related sclerosing cholangitis overlapped with primary biliary cirrhosis. *Intern Med*. 2012;51:1695-1659. PMID:22790128 (査読有).

14 Naitoh I, Nakazawa T, Hayashi K, 他 6 名, 2 番目. Clinical differences between mass-forming autoimmune pancreatitis and pancreatic cancer. *Scand J Gastroenterol* 2012;47:607-13. doi: 10.3109/00365521.2012.667147. (査読有).

15. Okumura F, Sakuma H, Nakazawa T, Hayashi K, 他 6 名, 3 番目. Analysis of VH gene rearrangement and somatic hypermutation in type 1 autoimmune pancreatitis. *Pathol Int*. 2012;62:318-23. doi: 10.1111/j.1440-1827.2012.02788.x. (査読有).

16. Ohara H, Okazaki K, Tsubouchi H, Inui K, Kawa S, Kamisawa T, Tazuma S, Uchida K, Hirano K, Yoshida H, Nishino T, Ko S, Mizuno N, Hamano H, Kanno A, Notohara K, Hasebe O, Nakazawa T, 他 2 名, 18 番目. Clinical diagnostic criteria of IgG4-related sclerosing cholangitis 2012. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*. 2012;19:536-42. DOI 10.1007/s00534-012-0521-y (査読有).

17. Shimizu S, Naitoh I, Nakazawa T, Hayashi K, Miyabe K, 他 6 名, 3 番目. A case of autoimmune pancreatitis showing narrowing of the main pancreatic duct after cessation of steroid therapy in the clinical course. *Intern Med*.

2012;51:2135-40. PMID:22892491

(査読有).

〔学会発表〕(計 8 件)

1. 内藤 格, 中沢貴宏, 他 1 名

原発性硬化性胆管炎と IgG4 関連硬化性胆管炎の鑑別診断と治療における問題点

第 50 回日本肝臓学会総会 2014 年 5 月 29 日 ホテルニューオータニ (東京)

2. 内藤 格, 山下宏章, 中沢貴宏

1 型自己免疫性膵炎診断における生検の有用性 全身 8 臓器からの生検組織での比較検討

第 100 回日本消化器病学会総会 2014 年 4 月 25 日 東京国際フォーラム (東京).

3. Nakazawa T, 他 15 名.

Establishment of a serum IgG4 cut-off value for the differential diagnosis of IgG4-related sclerosing cholangitis. *EUGW* 2013, Oct 15 2013 Berlin Germany

4. Nakazawa T, 他 2 名. Endoscopic biliary intraductal ultrasonography and biopsy from bile duct and duodenal papilla in the diagnosis of IgG4-related sclerosing cholangitis

第 86 回消化器内視鏡学会総会 2013 年 10 月 10 日 グランドプリンスホテル新高輪 (東京)

5. 中沢貴宏, 他 13 名.

IgG4 関連硬化性胆管炎における血清 IgG4 のカットオフ値の検討

第 49 回日本胆道学会学術集会 2013 年 9 月 20 日 ヒルトン東京ベイ (千葉)

6. 内藤 格, 中沢貴宏, 全 陽

IgG4 関連硬化性胆管炎診断における肝生検の有用性 -肝生検所見と胆管像の比較を中心に-

第 49 回日本肝臓学会総会 2013 年 6 月 6 日 京王プラザホテル (東京)

7. Takahiro Nakazawa, 他 10 名. MRCP

can discriminate primary sclerosing
cholangitis from immunoglobulin
G4-related sclerosing cholangitis and
cholangiocarcinoma
EUGW 2012, Oct 23 2012 Amsterdam
Netherland.

8 . 中沢貴宏、内藤 格、大原弘隆

胆管像分類に基づいた IgG4 関連硬化性胆
管炎診断基準の提唱

第48回日本胆道学会 2012年9月21日 京
王プラザホテル(東京)

〔図書〕(計 0 件)

〔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

中沢 貴宏(NAKAZAWA, Takahiro)

名古屋市立大学・大学院消化器・代謝内科
学・准教授

研究者番号：70305522

(2)研究分担者

大原 弘隆(OHARA Hirotaka)

名古屋市立大学・大学院地域医療教育学教授
研究者番号：80285212

稲垣 宏(INAGAKI Hiroshi)

名古屋市立大学・大学院臨床病理病態学・教
授

研究者番号：30232507

林 香月(HAYSHI Kaduki)

名古屋市立大学・大学院消化器・代謝内科
学・助教

研究者番号：00405200

内藤 格(NAITOH Itaru)

名古屋市立大学・大学院消化器・代謝内科
学・助教

研究者番号：302527750

(3)連携研究者

なし