

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：33902

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23792404

研究課題名(和文) IgG4関連多臓器リンパ増殖性疾患の分子病理学的検討

研究課題名(英文) Molecular pathological study of IgG4-MOLPS

## 研究代表者

佐久間 英規 (SAKUMA, Hidenori)

愛知学院大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号：60453065

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：IgG4関連多臓器リンパ増殖性疾患はステロイド反応性であり自己免疫の関与も示唆されている。この疾患が自己免疫の特徴をもつのか検討を行った。免疫グロブリン遺伝子クローン、体細胞変異率の検討では、特徴的なクローンは認めなかったが、体細胞変異率は自己免疫性疾患と同様な結果であった。しかし、自己免疫性疾患で特徴的な因子は確認できなかった。IgG4関連多臓器リンパ増殖性疾患は自己免疫性疾患との関連性を強く支持する結果は認めなかった。本検討より自己免疫性疾患の可能性は低いと考えられた。

研究成果の概要(英文)：IgG4-MOLPS is to suggest the involvement of a steroid-responsive autoimmune. This disease it was examined whether having the characteristics of autoimmune. Immunoglobulin gene clone, in the study of somatic mutation rate, but was not observed characteristic clone, the somatic mutation rate was the same results and autoimmune disease. However, the characteristic factor in autoimmune disease it could not be confirmed. IgG4-MOLPS from this study the possibility of recognized not autoimmune disease that strongly support an association between autoimmune disease was considered to be low.

研究分野：口腔内科学

キーワード：IgG4関連多臓器リンパ増殖性疾患 免疫グロブリン遺伝子 自己免疫性疾患

## 1. 研究開始当初の背景

IgG4 関連多臓器リンパ増殖性疾患 (IgG4+MOLPS) は近年、本邦より提唱された新しい疾患概念であり、血清学的に高 IgG4 血症、病理組織学的には IgG4 陽性形質細胞やリンパ球浸潤が唾液腺、涙腺、膵臓、胆管などで認められる。ミクリッツ病、キュットナー腫瘍、自己免疫性膵炎、硬化性胆管炎類似的の病変などが該当する。ミクリッツ病、キュットナー腫瘍は病理組織学的には慢性硬化性唾液腺炎様で、浸潤している形質細胞は IgG4 陽性である。自己免疫性膵炎は本邦で提唱された疾患概念で、臨床像は高齢男性に好発し約 70% の症例で膵頭部の腫大により膵内胆管は狭窄し閉塞性黄疸を呈するようになる。病理組織学的には、膵臓組織にリンパ球、形質細胞を主体とする著名な細胞浸潤と線維化を認める。浸潤している形質細胞は IgG4 陽性である。IgG4+MOLPS は、ステロイド治療が効果的であり第一選択になっている。自己免疫性膵炎のステロイド療法については、中野らが世界で最初にステロイド投与が有効であることを報告している。また自己免疫性膵炎に関しては、血清学的には高グロブリン血症、高 IgG4 血症と共に抗核抗体などの多彩な自己抗体の出現を認めるが、これらの自己抗体の認識する抗体系に対する免疫現象は病態や病態生理になんらかの関連性を有すると推定されているものの、疾患特異性をはじめ不明な点が多い。このような背景のもと、研究代表者はこれまで IgG4+MOLPS の 1 つであるキュットナー腫瘍及び自己免疫疾患であるシェーグレン症候群において免疫グロブリン遺伝子を中心に分子病理学的研究を行い IgG4+MOLPS の病態発症機序の解明に取り組んできた。IgG4+MOLPS であるキュットナー腫瘍、シェーグレン症候群、慢性唾液腺炎の 3 疾患群で、免疫グロブリン遺伝子可変領域 (CDR2, FWR3) の予備的解析を行った。

### IgG4 + MOLPS の問題点

ミクリッツ病 キュットナー腫瘍、自己免疫性膵炎、  
硬化性胆管炎、間質性肺炎など

↓

1. 本当に自己免疫が関与するのか？
2. IgG4 の役割は？
3. ステロイドの長期投与について

## 2. 研究の目的

IgG4+MOLPS の 1 つであるキュットナー腫瘍における免疫グロブリン遺伝子の予備的解析を行い、自己免疫性疾患のシェーグレン症候群と同様に体細胞変異率が非自己免疫疾患群と比較すると低率であることを見出

した。本研究はさらに免疫グロブリン遺伝子を分子病理学的に解析することによって IgG4+MOLPS が自己免疫の特徴を持つのかを明らかにすることが目的である。

研究項目は、(1) IgG4+MOLPS の選択される免疫グロブリン遺伝子クローンの比較、体細胞変異率の比較検討。(2) 自己免疫性疾患に特徴的な RF 因子を免疫グロブリン遺伝子可変領域で明らかにする。(3) 制御性 T 細胞の解析。上記の研究項目を行うことによって IgG4+MOLPS の疾患特徴を研究期間内で明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) IgG4+MOLPS のキュットナー腫瘍、自己免疫性膵炎の免疫グロブリン遺伝子再構成パターン解析

### 免疫組織化学染色の検討

IgG4+MOLPS (キュットナー腫瘍、自己免疫性膵炎) シェーグレン症候群、慢性唾液腺炎、慢性膵炎の症例を用いて、CD3、CD20、CD79a、CD27、IgG、IgG4 の各抗体で染色する。CD3、CD20、CD79a、CD27 の染色でリンパ球の分布を確認する。IgG、IgG4 では、IgG4/IgG4 比率の確認を行う。またリンパ球のメモリー細胞の分布を確認するため CD3/CD27 の 2 重免疫染色を行う予定である。

免疫グロブリン遺伝子可変領域の遺伝子配列の決定

上記パラフィン切片より、フェノール・クロロホルム法を用いて DNA 抽出し、CDR2、FWR3、CDR3 領域の解析を行えるようにプライマーを設計し、semi-nested PCR 法にて増幅し、精製産物を用いてサブクローニング、サイクルシーケンス PCR を行い DNA シークエンサー (ABI 3100) を用いて遺伝子配列を決定する。

レーザーマイクロディセクションを用いたパラフィン切片からの免疫グロブリン遺伝子可変領域の遺伝子配列の決定

上記疾患のパラフィン切片を用いて、IgG4 の免疫染色を行い、その陽性形質細胞と陰性形質細胞をそれぞれレーザーマイクロディセクションシステムを用いて採取する。1 症例あたり採取回数は 500 回以上行う。フェノール・クロロホルム法を用いて DNA 抽出し、CDR2、FWR3、CDR3 領域の解析を行えるようにプライマーを設計し、semi-nested PCR 法にて増幅し、精製産物を用いてサブクローニング、最終的にサイクルシーケンス PCR を行い DNA シークエンサー (ABI 3100) を用いて遺伝子配列を決定する。

免疫グロブリン遺伝子可変領域の解析

決定した遺伝子配列は、

NCBI Immunoglobulin BLAST のデータベースより得られる germline 配列と得られた可変領域配列 (CDR2、FWR3、CDR3 領域) を比較する。この比較により選択させるクローンが明らかになる。選択されたクローンから、自己

免疫性疾患で高頻度に選択されるクローンがないか確認する。上記疾患群で高頻度に選択されたクローンに共通性がないかも確認する。

#### (2)免疫グロブリン遺伝子の体細胞変異解析

CDR2、FWR3領域の体細胞変異率を上記疾患群で比較検討をおこない、自己免疫疾患のパターンかを確認する。

\*体細胞変異率は2%を基準として、2%以下を体細胞変異率陰性とし、上記疾患で比較検討する。

#### (3)自己免疫性疾患に認められる免疫グロブリン遺伝子のCDR3領域のRAファクターを認めるかの解析

シーケンスで明らかになった遺伝子配列を Immunogloblin BLAST で解析し、RF 因子の有無を確認する。

#### (4)制御性 T 細胞の検討

IgG4+MOLPS の B 細胞でおこっている IgM 及び IgD から IgG4 へのクラススイッチに関与している IL13 及び Treg、IL10、IL17、IL18、Th1、Th2、ケモカインでは CCR4 及び転写因子の FOXP3 の発現解析を行う。免疫組織化学的手法と分子病理学的手法を用いて研究を行う。免疫組織学手法は、IL10、IL13、IL17、IL18 などのインターロイキン、ケモカインである CCR4、転写因子の FOXP3 の発現の検討を行う。またそれぞれの症例のパラフィン切片より RNA 抽出し、Real-time PCR 法を用いて定量的に解析を行う。

### 4. 研究成果

(1) IgG4+MOLPS のキョットナー腫瘍、自己免疫性膵炎の免疫組織化学染色では、IgG4+MOLPS 疾患の IgG4/IgG 比率が約7割以上であった。シェーグレン症候群、慢性唾液腺炎、慢性膵炎では約2割以下であった。過去に報告された結果と矛盾しなかった。

(2) IgG4+MOLPS のキョットナー腫瘍、自己免疫性膵炎の免疫グロブリン遺伝子再構成パターン解析では、キョットナー腫瘍、自己免疫性膵炎では、特徴的なクローンは認めなく、VH3 family が中心であった。この結果はシェーグレン症候群、慢性唾液腺炎、慢性膵炎と同様な結果であった。

(3) レーザーマイクロダイゼクションを用いたパラフィン切片からの免疫グロブリン遺伝子可変領域の遺伝子配列の決定及び免疫グロブリン遺伝子可変領域の解析では、解析可能な DNA 量が確保できなく解析を行うことが出来なかった。今後の研究で解析できるように方法を検討していきたい。

(4) 免疫グロブリン遺伝子の体細胞変異解析では、IgG4+MOLPS のキョットナー腫瘍、自己免疫性膵炎では体細胞変異を認めないクローンが約3割から4割認められた。慢性唾液腺炎、慢性膵炎と比較すると有意な差をもって体細胞変異を認めないクローンが選択される結果となった。この結果は自己免疫性疾患であるシェーグレン症候群と同様な結果であった。体細胞変異率の検討では自己免疫性疾患と同様な傾向を認めた。

(5) 自己免疫性疾患に認められる免疫グロブリン遺伝子 CDR3 領域の RA 因子の有無を検討したが、IgG4+MOLPS のキョットナー腫瘍、自己免疫性膵炎、自己免疫性疾患のシェーグレン症候群、慢性炎症疾患の慢性唾液腺炎、慢性膵炎で RA 因子を確認することはできなかった。

(6) 制御性 T 細胞の検討では、当初予定していた検討が技術的に難しく予測した結果を得ることはできなかった。今後の研究で解析できるように方法を検討していきたい。

本検討から IgG4+MOLPS は自己免疫性疾患との関連性を強く支持する結果は認めなかった。

### 引用文献

- Hamano H, Kawa S, Horiuchi A et al. High serum IgG4 concentrations in patients with sclerosing pancreatitis. *N Engl J Med.* 344:732-738.2001.
- Yamamoto M, Harada S, Ohara M et al. Clinical and pathological difference between Mikulicz's disease and Sjogren's syndrome. *Rheumatology(Oxford).* 44:227-234.2005.
- Kitagawa S, Zen Y, Harada K et al. Abundant IgG4-positive plasma cell infiltration characterizes chronic sclerosing sialadenitis. *Am J Surg Pathol.*29:783-791.2005.
- H Sakuma, F Okumura, S Miyabe, M Sugiura, T Joh, K Shimozato, H Inagaki. Analysis of VH Gene Rearrangement and Somatic Hypermutation in Sjogren's Syndrome and IgG4-Related Sclerosing Sialadenitis. *Scandinavian Journal of Immunology.*72:44-49.2010.

### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

- Okumura F, Sakuma H, Nakazawa T, Hayashi K, Naitoh I, Miyabe K, Yoshida M, Yamashita H, Ohara H, Inagaki H, Joh T. Analysis of VH gene rearrangement and somatic hypermutation in type 1

autoimmune pancreatitis. *Pathology international*. 62:318-323.2012.  
(査読有)  
DOI:10.1111/j.1440-1827.2012.02788.x

〔学会発表〕(計4件)

佐久間英規、大岩伊知郎、下郷和雄。IgG4関連疾患における免疫グロブリン遺伝子CDR3領域に関する検討、第24回日本口腔内科学会学術大会、平成26年9月19日、福岡。

佐久間英規、宮部悟、大岩伊知郎、下郷和雄。慢性硬化性唾液腺炎における免疫グロブリン遺伝子V領域に関する検討、第23回日本口腔内科学会学術大会、平成25年9月13日、東京。

佐久間英規、宮部悟、深野英夫、杉浦正幸、下郷和雄。IgG4関連多臓器リンパ増殖性疾患における分子病理学的検討、第57回日本口腔外科学会学術大会、平成24年10月19日、横浜。

佐久間英規、奥村文浩、稲垣宏。自己免疫性膵炎における免疫グロブリン遺伝子重鎖可変領域解析、第51回リンパ網内系学会総会、平成23年7月2日、福岡。

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐久間 英規 (SAKUMA, Hidenori)  
愛知学院大学・歯学部・非常勤講師  
研究者番号：60453065