

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：33303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791010

研究課題名(和文) IgG4関連疾患患者血清中の疾患特異的に変動するタンパク質群の網羅解析

研究課題名(英文) Proteomics analysis in IgG4-related disease

研究代表者

河南 崇典 (KAWANAMI, Takafumi)

金沢医科大学・医学部・講師

研究者番号：20350762

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関連疾患治療前後および健康人の血清を用い、疾患で特異的に変動するタンパク質群を、プロテオミクスの手法を用い網羅的に解析し、IgG4関連疾患の病因病態に関連するタンパク質の同定を行った。患者・健康人間、また、治療前後において、有意差($p < 0.05$)を持って発現変動を示すスポットが得られた。このうち1.2倍～3倍などの差があるスポットを選択し、質量分析によるタンパク質同定を行った。その結果、炎症系因子の増加、免疫システム調節に関連する因子の変動が認められた。

研究成果の概要(英文)：We conducted a comprehensive analysis of proteins that change in a disease specific manner, using the serum of patients with IgG4-related disease before and after treatment, and that of healthy individuals, in order to identify proteins that are associated with the pathogenesis of IgG4-related disease. After protein removal as a pretreatment, two-dimensional electrophoresis of the serum was conducted and silver staining method was used. We also cut out the spots which changed before and after treatment and detection was performed by ESI-MS/MS. In addition, we identified proteins whose expression significantly changed before and after treatment, as well as those between healthy individuals and patients and confirmed the results with ELISA. From two IgG4-related disease cases, we extracted 38 proteins which significantly changed expression before and after treatment. We found the increase in inflammatory factors such as Alpha-1 antitrypsin, Leucin-rich alpha-2-glycoprotein in serum.

研究分野：膠原病学

キーワード：IgG4関連疾患 プロテオミクス クラススイッチ Alpha-1 antitrypsin LRA2G

1. 研究開始当初の背景

IgG4 関連疾患は、血清 IgG4 高値と病変組織への IgG4 陽性形質細胞の浸潤を特徴とするリンパ増殖性の疾患である。罹患臓器は多彩で、著明なリンパ球浸潤にも関わらず、導管などの組織は保たれており、ステロイド治療が極めて良いという新たな疾患で、リウマチ膠原病領域および自己免疫性膵炎をはじめ多領域で注目を浴びている疾患である。IgG4 関連疾患の臨床像については症例の蓄積とともに解析が進んでいるものの、本疾患の病因・病態に関する基礎的研究は不明な点が多く、不十分であった。

IgG4 関連疾患は、多臓器にリンパ球の浸潤や繊維化が生じ、臓器障害に至る疾患であるが、その浸潤リンパ球は IgG4 陽性形質細胞が主体をなしている点が特徴的である。本疾患では血清 IgA や IgM は正常であるにも関わらず、IgG4 は高く、また IgE も高値を示す傾向にあり、IgG4、IgE へのクラススイッチが亢進している可能性がある。しかし、なぜ IgG4 陽性細胞が多数組織に浸潤するのか、なぜ IgG4 クラススイッチが亢進しているのかについては未だ不明である。

本疾患は全身性の多臓器疾患であるが、病変局所の形質細胞と血中の IgG4 陽性形質細胞に体細胞高頻度変異が共通するクローンが検出されることから、病変部と末梢血間において IgG4 陽性クローンの移動が行われている可能性が報告されている。本疾患は病変の発生する臓器や頻度、時期などは異なるものの、その病因や病変部での制御機構、病態形成に関しては共通する可能性が高く、病変は全身性に分布するが、一つの疾患単位であると考えられる。IgG4 関連疾患の病態は、局所病変から臓器病変へ、さらに多臓器病変へと進展する多段階のステップがあり、その要因や病態を一つの遺伝子やタンパク質変化だけで説明することはできない。そこで、本研究では全身性の慢性炎症疾患という観点から、IgG4 関連疾患の治療前後および健常人における血清を用い、疾患で特異的に変動するタンパク質群をプロテオミクスの手法を用い網羅的に解析し、IgG4 関連疾患の病態解析に関連するタンパク質の同定を行うこととした。

2. 研究の目的

新しい疾患単位である全身性慢性炎症疾患の IgG4 関連疾患の病因・病態、またその機序を理解するため、疾患や治療により変動するタンパク質をプロテオミクスの手法を用い解析を行う。

3. 研究の方法

インフォームドコンセントを得た IgG4 関連疾患の治療前・治療後、および健常人の血清を実験に用いた。IgG4 関連疾患包括診断基準 (Comprehensive Diagnostic Criteria for IgG4-related disease (IgG4-RD), 2011)

を満たす血清 IgG4 値 135mg/dl 以上、組織における IgG4/IgG 比が 40%以上、かつキャスルマン病、Wegener 肉芽腫、サルコイドーシス、悪性リンパ腫、癌など既知の疾患を除外できるものを IgG4 関連疾患確定診断例(治療前)とし、ステロイド治療開始後 3 ヶ月のものを治療後検体(治療後)とし研究に用いた。本研究の対照については、性差、年齢差の影響を考慮し、IgG4 関連疾患で多くを占める 50~60 歳代男性とした。対照として健常人男性 4 人 (54-61 才、中央値 59 才) から同意を得た上で血清を採取し、健常人コントロール検体とした。

血清は除蛋白前処理のため、5.0 μ L の患者血清中に 10 倍量のアセトンを加え、 -20°C で静置し、遠心分離で上清を除去した。得られたペレットを 2 次元電気泳動 (pH3-10) により展開し、銀染色により呈色した。治療前後で変動したスポットを切り出し、ゲル内消化処理したタンパク質を、ESI-MS/MS (nano-Frontier-LD((株)日立ハイテクノロジーズ))にて検出を行った。得られたペプチド情報は、Swiss プロットデータベースを用い、MASCOT 検索を行い、タンパク質の同定を行った。

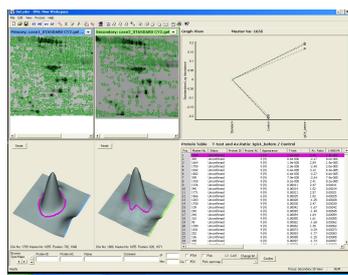
また、疾病特異的なバイオマーカータンパク質は極微量であるため、血清中の高存在量タンパク質の効率的除去と、高感度の検出系が必要となる。そこで前処理として抗体カラム、ビーズを用い、脱アルブミン処理および脱 IgG 処理を行い、高含有タンパク質の選択的除去分離および低分子量タンパク質の濃縮を行った。処理後の血清タンパク質について、「健常人 vs 治療前」および「治療前 vs 治療後」の比較を行うために、血清タンパク質を蛍光標識試薬 Cy2, Cy3, Cy5 で標識し、2 次元電気泳動による展開を行った。Cy 標識されたタンパク質のゲル画像は、Typhoon9400 によってスキャンを行い、Decyder software6.5 を使用したディファレンシャル解析を行った。治療前後、また、健常人と患者間で有意に発現が変動するタンパク質群を特定し、Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) を用いバリデーションを行った。

4. 研究成果

IgG4 関連疾患はステロイド治療が著効し、ステロイド投与後、IgG 値はすみやかに低下した。二次元電気泳動法を用いたプロテオーム解析には、ステロイド治療前の血清と、治療開始後 3 ヶ月のものを実験に用いた。治療前、治療後、健常人コントロールの血清中タンパク質を 2 次元電気泳動後、銀染色および Cy 染色を行った。各スポットをナンバリングし、治療前後、また、対照と患者で差異があるものについてスポットの回収を行った。IgG4 関連疾患の治療前、治療後の血清タンパク質を比較した結果、治療後に低下もしくは消失したスポットは 31 個であった。また、治療後に増加もしくは出現したスポットは

38 個であった。治療前後で差が認められたスポットを、質量分析装置を用いて解析した。重複を除き、タンパク質同定の信頼度が高い Score35 以上、検出できたペプチド数が 2 以上、Cover 率 1%以上のものの選別を行ったところ、IgG4 関連疾患症例で、治療後に低下もしくは消失したタンパク質は 38 個、治療後に増加もしくは出現したタンパク質は 52 個だった。また、健常人群に比べ、IgG4 関連疾患群で高い値を示したタンパク質は 19 個だった。

Decyder software 6.5を用いた2-DEスポットパターン解析



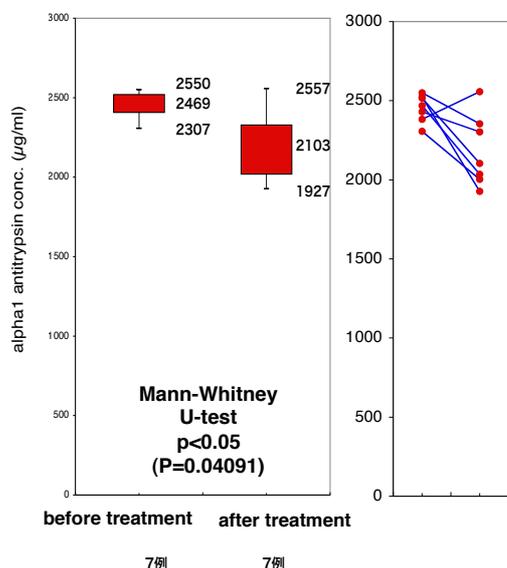
分子 (患者)
分母 (健常人)

Cy2のspotを内部標準として用い、Cy3やCy5の蛍光は、Cy2に対する数値化を行う。

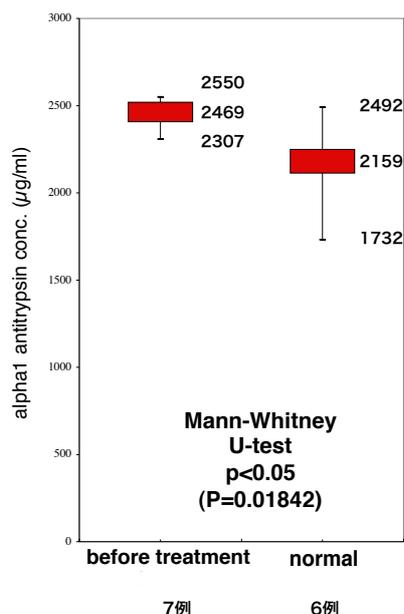
IgG4 関連疾患治療前の血清では、IgG1、IgG4、Ig lambda、Ig kappa の増加、Alpha-1 antitrypsin、Apolipoprotein-L1、Complement 4、Clq、Serum amyloid A protein precursor などの炎症性因子の増加、免疫システム調節に関連する Clusterin、Leucin-rich alpha-2- glycoprotein の増加がみられた。また、健常人と比しても異なるパターンが得られた。さらに抽出されたタンパク質群が、IgG4 関連疾患特異的に発現が変動しているかを検討するため、治療前後および健常人の検体を用い、Alpha-1 antitrypsin と Leucin-rich alpha-2- glycoprotein について ELISA を用い、その発現動態の検討を行った。

(1)Alpha-1 antitrypsin は、治療前後において、治療前で発現が有意に高く、患者健常人間においても患者群で発現が有意に高かった。

before treatment vs after treatment

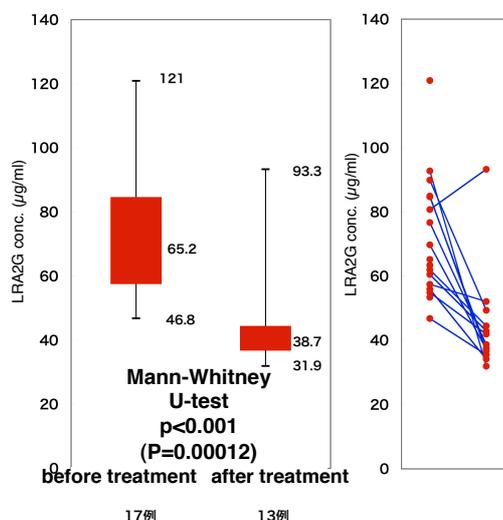


before treatment vs normal

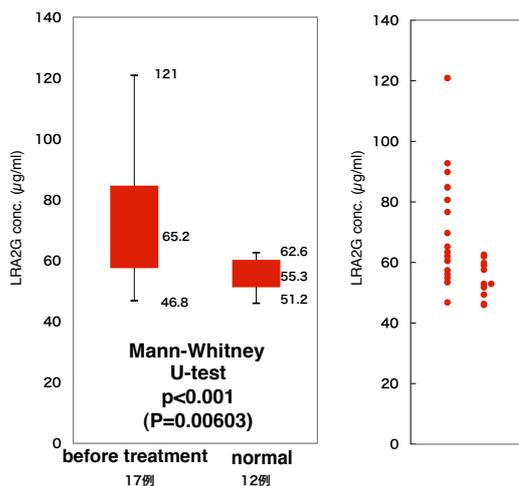


(2) Leucin-rich alpha-2- glycoprotein は、血液中に存在する糖タンパク質の一種で、好中球の分化マーカーになることや、腸上皮細胞などから発現することが知られているもののその機能についてはまだよく分かっていない。近年の報告で、関節リウマチ、クローン病、ベーチェット病などの炎症性自己免疫疾患において、疾患活動性と相関する炎症マーカー蛋白質として報告されている。今回、IgG4 関連疾患患者血清タンパク質のプロテオミクス解析にて、有意差をもって変動したタンパク質としてこの因子が抽出されたので、そのバイオマーカーとしての可能性を検討した。

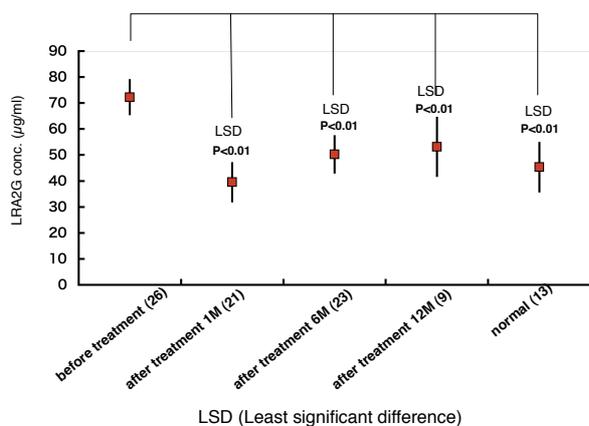
before treatment vs after treatment



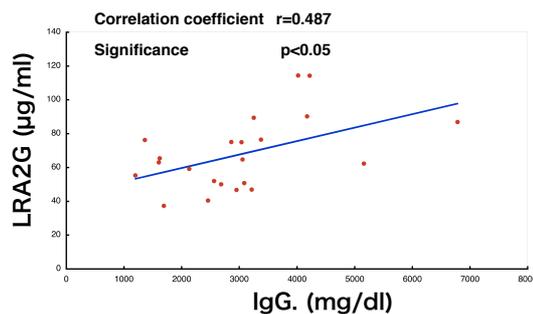
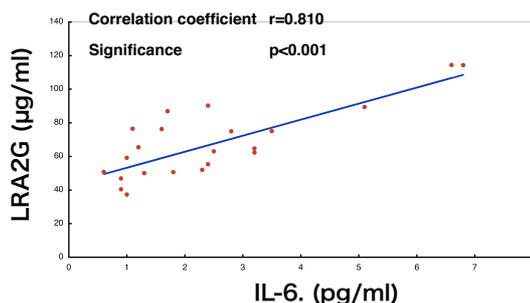
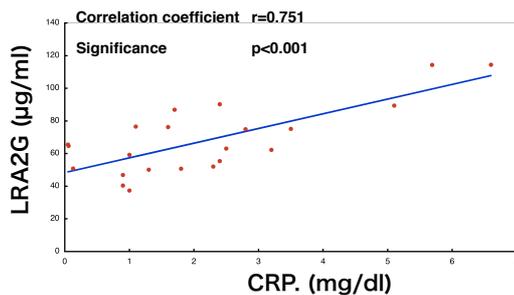
before treatment vs normal



Leucin-rich alpha-2- glycoprotein は、患者 vs 健常人間で、有意に患者群で高い値を示し、治療により、その値を有意に下げた。また、治療前、治療後 1M、6M、12M の値の変動を確認したところ、治療前に示した高い値は、治療後、健常人と同等の数値に抑えられ、その後、継続して同等の値を示しております。LRG は、病勢を反映する可能性が示唆された。



一般的に自己免疫疾患患者の疾患活動性をモニターする炎症マーカーとして、CRP がよく使用される。炎症マーカーとして CRP は臨床によく使用されるが、疾患活動性が認められても CRP が正常値を示すことも多々ある。治療を行う上で、疾患活動性とよりよく相関する血清マーカーが必要となる。Leucin-rich alpha-2- glycoprotein は、CRP、IL-6 値と相関し、また、IgG4 関連疾患の活動性の指標の一つである IgG 値との相関を示す結果が得られた。



今回の検討で、病態関連蛋白として抽出された Alpha-1 antitrypsin は、B 細胞の IgE、IgG4 産生細胞への分化誘導を増強させる機能を有することが報告されており、IgG4 関連疾患の病因に関わっている可能性がある。Alpha-1 antitrypsin は、生体内において、好中球の活性時に放出される好中球エラスターゼなどセリンプロテアーゼと複合体を形成し、そのタンパク質分解酵素の活性を阻害する相反物質としての生物活性を有する。一般的には活性中心にセリンを持つタンパク質分解酵素を阻害し、組織障害の拡大を防ぐ役割を担っている。造血幹細胞から分化した成熟 B 細胞は、サイトカインなどの外部刺激により、その表面に発現している IgM の構造を変化させて、抗原排除に適したクラスへの変化を行い、抗原との親和性を成熟させる。この Alpha-1 antitrypsin は、IL-4 と CD40 刺激による免疫グロブリン遺伝子再構成をより選択的に増強させ、B 細胞を、IgE、IgG4 産生細胞へ分化誘導させる機能がある。IgM 発現 B 細胞は T 細胞の発現する CD40L と TCR との相互作用

用によって活性化される。活性化した B 細胞において、CD40 や IL-4 受容体からのシグナルにより発現が誘導された AID(activation induced cytidine deaminase)によりクラススイッチが引き起こされる。Alpha-1 antitrypsin は IL-4 と CD40 刺激によるクラススイッチを亢進させ、IgE と IgG4 産生を選択的に誘導することが報告されている。IgG4 関連疾患では、Alpha-1 antitrypsin の機能が亢進することにより AID の転写が増強され、恒常的に IgG4 へのクラススイッチの誘導が亢進している病態なのかもしれない。また、IgG4 関連疾患は、Th2 優位のサイトカイン産生が亢進しており、制御性のサイトカインである IL-10 や TGF- β の発現が亢進していることが報告されている。IgG4 は Th2 サイトカインである IL-4 によって分化・誘導される。また、IL-10 が B 細胞の IgG1 の産生を抑制し、IgG4 の産生を増加させることが報告されている。IL-4 や IL-10 の増加により IgG4 や IgE の産生は亢進されるが、さらに Alpha-1 antitrypsin の発現亢進が加わり、より選択的に、より増強した IgG4 産生が誘導されている病態が考えられる。

また、今回の検討で、IgG4 関連疾患群において、Leucin-rich alpha-2- glycoprotein が有意に発現亢進し、治療により、その値を低下させることを見いだした。近年、Leucin-rich alpha-2- glycoprotein が、TGF- β の補助受容体エンドグリンに直接結合し、TGF- β シグナル伝達の調節に関与することが報告されている。IgG4 関連疾患は、Th2 サイトカイン優位で、IL-10 や、TGF- β といった制御性サイトカインの発現が亢進した免疫応答が生じていると考えられている。TGF- β シグナルの異常は、がん化以外にも、強皮症や、線維症疾患など様々な病態に関与する因子である。IgG4 関連疾患における Leucin-rich alpha-2- glycoprotein の発現亢進が、ただ、炎症の有無によるものなのか、また、IgG4 関連疾患の病変部の繊維化などに関連しているのかは現段階では、まだ不明である。Leucin-rich alpha-2- glycoprotein の TGF- β シグナルの活性化への関与は、今後の検討課題である。

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 7 件)

①. Nakajima A, Masaki Y, Nakamura T, Kawanami T, et al. (他 28 名、4 番目) Decreased Expression of Innate Immunity-Related Genes in Peripheral Blood Mononuclear Cells from Patients with IgG4-Related Disease. *PLoS ONE*, 10(5):e0126582, 2015, 査読有

②. Nakamura TS, Kurose N, Kawanami T, et al. (他 9 名、3 番目) CD14⁺ follicular dendritic cells in lymphoid follicles may play a role in the pathogenesis of IgG4-related disease. *Biomedical Res*, 36(2):143-153, 2015, 査読有

③. Masaki Y, Shimizu H, Sato T, Nakamura T, Nakajima A, Iwao H, Miki M, Sakai T, Kawanami T, et al. (他 3 名、9 番目) IgG4 related disease – Diagnostic methods and therapeutic strategies in Japan. *J Clin Exp Hematol.*, 54(2):95-101, 2014, 査読有

④. Umehara H, Nakajima A, Nakamura T, Kawanami T, et al. (他 3 名、4 番目) IgG4-related disease and its pathogenesis-cross-talk between innated and acquired immunity, *Int. Immunol.*, 26:585-595, 2014, 査読有

⑤. Masaki Y, Kawanami T, et al. (他 13 名、9 番目) Japanese variant of multicentric Castleman's disease associated with serositis and thrombocytopenia- a report of two cases: is TAFRO syndrome (Castleman-Kojima disease) a distinct clinicopathological entity? *J Clin Exp Hematop* 53(1):79-85, 2013, 査読有

⑥. Kawanami T, Iwao H, Masaki Y (他 14 名、1 番目) Skewed production of IL-6 and TGF β by cultured salivary gland epithelial cells from patients with Sjögren's syndrome, *PLoS ONE*, 7:e45689 1-5, 2012, 査読有

⑦. Masaki Y, Iwao H, Kawanami T, (他 28 名、25 番目) Cutoff values of serum IgG4 and histopathological IgG4⁺ plasma cells for diagnosis of patients with IgG4-related disease, *Int. J.Rheumatol.*, e580814, 1-5, 2012, 査読有

[学会発表] (計 7 件)

①. 河南崇典: IgG4 関連疾患患者の疾患特異的に変動する血清タンパク質・代謝物群の網羅解析, 第 8 回 IgG4 研究会, 福岡リーセントホテル(福岡県福岡市, '15.03.21).

②. 河南崇典: IgG4 関連疾患患者の疾患特異的に変動する血清タンパク質・代謝物群の網羅解析, 第 23 回日本シェーグレン症候群学会, ホテルニュー長崎(長崎県長崎市, '14.09.12).

③. Kawanami T: Proteomics analysis in IgG4-related disease, 12th International

Symposium on Sjögren's Syndrome, 京都ホテルオークラ(京都府京都市, '13.10.09).

④. 河南崇典: IgG4 関連疾患の疾患特異的に変動するタンパク質群の網羅解析, 第 22 回日本シェーグレン症候群学会学術集会, ブリーゼプラザ(大阪府大阪市, '13.09.13).

⑤. 河南崇典, : I gG4 関連疾患患者血清中の疾患特異的に変動するタンパク質群の網羅解析, 第 49 回金沢医科大学医学会学術集会, 金沢医科大学(石川県河北郡), '13.07.06).

⑥. 河南崇典: IgG4 関連疾患の疾患特異的に変動するタンパク質群の網羅解析, 第 34 回日本炎症・再生医学会, 国立京都国際会館(京都府京都市, '13.07.02).

⑦. 河南崇典: IgG4 関連疾患の疾患特異的に変動するタンパク質群の網羅解析, 第 57 回日本リウマチ学会総会・学術集会/第 22 回国際リウマチシンポジウム, 国立京都国際会館(京都府京都市, '13.04.18).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河南 崇典 (KAWANAMI, Takafumi)

金沢医科大学・医学部・講師

研究者番号: 20350762

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし