

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 6 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870087

研究課題名(和文)新規疾患「IgG4関連疾患」の病因・病態に迫る免疫遺伝学的アプローチ

研究課題名(英文)Immuno-genetic approaches for investigation of pathogenesis of new disease entity "IgG4-related disease"

研究代表者

坪井 洋人(Tsuboi, Hiroto)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：80580505

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：IgG4関連疾患(IgG4-RD)(N=5)、シェーグレン症候群(SS)(N=5)、健常人(HC)(N=3)の口唇唾液腺(LSG)より抽出したRNAを用いてDNAマイクロアレイで遺伝子発現を比較すると、3群は異なるクラスターを形成した。SSと比較しIgG4-RDで発現増加した遺伝子は1321、減少した遺伝子は1320抽出された。別のIgG4-RD、SS、HCのLSGを用いて定量PCRによるvalidationを行い、CCL18はSS・HCと比較してIgG4-RDで有意に高発現していた( $P<0.05$ )。免疫蛍光染色ではIgG4-RDのLSGにおいて、マクロファージがCCL18を産生していた。

研究成果の概要(英文)：The gene expressions in LSGs were compared between IgG4-RD (N=5), SS (N=5), and HC (N=3) by DNA microarray. Clustering by principal component analysis (PCA), and pairwise comparison between IgG4-RD and SS were performed. We conducted validation by qPCR for identified candidate genes among up-regulated DEGs in IgG4-RD using RNA isolated from LSGs of IgG4-RD (N=9), SS (N=10), and HC (N=4) other than patients examined by DNA microarray. The expression of CCL18 and expressing cells in LSGs were compared between IgG4-RD, SS, and HC by immunofluorescence (IF) staining. Gene expression patterns in IgG4-RD, SS, and HC were quite different in PCA. 1321 up-regulated DEGs and 1320 down-regulated DEGs in IgG4-RD compared with SS were identified in pairwise comparison. We validated significantly higher expression of CCL18 in LSGs of IgG4-RD than in SS and HC ( $P<0.05$ ) by qPCR. IF staining clarified that many CD68 positive macrophages expressed CCL18 in LSGs of IgG4-RD whereas not in SS and HC.

研究分野：臨床免疫学

キーワード：IgG4関連疾患 シェーグレン症候群 DNAマイクロアレイ 口唇唾液腺

### 1. 研究開始当初の背景

IgG4 関連疾患 (IgG4-RD) は、血清 IgG4 の上昇と種々の臓器への IgG4 陽性形質細胞の浸潤と線維化を特徴とする新規疾患である。近年日本から提唱された疾患概念であるが、現在世界的に高い注目を集めている。特に日本から IgG4 関連疾患包括診断基準 (2011 年) が発表され、臨床的には疾患の理解が進みつつある。一方、病因・病態に関しては、IgG4 上昇や IgG4 クラススイッチ亢進、線維化のメカニズムを含めて不明な点が多く、解析は不十分である。

### 2. 研究の目的

我々は IgG4-RD の口唇唾液腺 (LSG) において、健常人 (HC) やシェーグレン症候群 (SS) と比較して、IL-10、TGF $\beta$ 、AID が高発現し、IgG4 クラススイッチ亢進や線維化に關与する可能性を示してきた<sup>1)</sup>。本研究では IgG4-RD の病態に關与する分子を網羅的に解析することを目的とした。

### 3. 研究の方法

1) IgG4-RD 包括診断基準 (2011 年) で definite を満たす IgG4-RD (N=5、全例女性)、SS (N=5、全例女性)、HC (N=3、全例女性) の LSG より抽出した RNA を用いて DNA マイクロアレイを行い、IgG4-RD、SS、HC の遺伝子発現パターンを主成分分析で比較した。

2) IgG4-RD と SS のペアワイズの比較を行い、IgG4-RD で相対的に発現増加、減少した遺伝子 (発現変動遺伝子) (rank products 法、false discovery rate<0.05) を抽出した。

3) DNA マイクロアレイとは別の IgG4-RD (N=9)、SS (N=10)、HC (N=4) の LSG より抽出した RNA を用いて、IgG4-RD で発現が増加していた発現変動遺伝子に関して定量 PCR による validation を行った。

4) 上記 3) で IgG4-RD の LSG における mRNA の発現増加が確認された CCL18 に関して、免疫蛍光二重染色 (CCL18、CD68、CD20) で LSG におけるタンパクレベルでの発現解析と発現細胞の同定、IgG4-RD (N=2)、SS (N=1)、HC (N=1) における発現比較を行った。

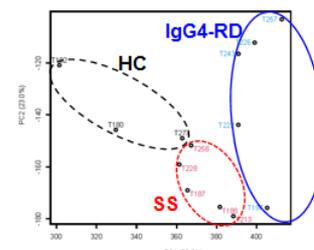
### 4. 研究成果

< 結果 >

1) 主成分分析では、IgG4-RD、SS、HC は互いに異なるクラスターを形成した (図 1)。

図1 IgG4-RD、SS、HCのLSGにおける遺伝子発現比較

主成分分析(PCA; principal component analysis)



IgG4-RD: IgG4関連疾患、SS:シェーグレン症候群、HC:健常人、PC: principal component

2) IgG4-RD で発現増加した遺伝子は 1771 プローブセット (1321 遺伝子)、減少した遺伝子は 1785 プローブセット (1320 遺伝子) 抽出された (false discovery rate<0.05) (表 1)。

表1 IgG4関連疾患で発現増加した発現変動遺伝子 1321遺伝子 上位1~72遺伝子

Rank	Gene Symbol	FDR	Rank	Gene Symbol	FDR	Rank	Gene Symbol	FDR
1	SCGB2A2	0.476	26	MFAP5	0.238	49	EMPI1	0.177
2	LTF	0.551	28	---	0.204	60	RNA39L1	0.185
3	SERPINA3	0.559	27	FN1	0.202	61	COLEC12	0.185
4	ADH1B	0.255	29	COLEC12	0.184	62	COCH	0.183
5	DCN	0.276	29	EBF1	0.207	65	COL1A2	0.183
6	LEPR	0.287	30	PRR11	0.215	64	SFRP4	0.001
7	CXCL12	0.269	31	MRC1	0.198	66	ADRF	0.001
8	CFD	0.272	32	LUMI	0.197	68	S100A2	0.001
9	SFRP2	0.290	33	HBG	0.283	67	CXCR7	0.001
10	CXCL14	0.246	34	LGNS	0.205	69	MHS2	0.001
11	FABP4	0.259	35	CPA3	0.201	69	DPYSL2	0.001
12	LYVE1	0.238	38	LHFP	0.192	80	ENPP2	0.001
13	PCOLCE2	0.232	37	FBLN1	0.200	81	CFH	0.001
14	LQNZ	0.256	38	PDGFRA	0.195	82	CD109	0.001
15	HLA-DRB4	0.270	38	COL3A3	0.193	83	TGFB2	0.001
16	SCGB1D2	0.319	40	SPP1	0.177	84	CAV1	0.001
17	FCER1A	0.219	41	COL14A1	0.187	86	ABCAG6	0.001
18	RARBES1	0.246	42	---	0.194	88	ABCB9	0.001
19	PDHA	0.231	45	ADPOQ	0.211	87	PLS3	0.001
20	MGP	0.242	44	ANGPTL1	0.185	88	PMP22	0.001
21	EFEMP1	0.212	46	THB34	0.206	89	CYP11B1	0.001
22	ABCAG6	0.234	48	CCDC39	0.195	70	SEMA5C	0.001
23	GAS1	0.211	47	SCARF5	0.185	71	CCL18	0.001
24	FN1	0.223	48	S100A4	0.193	72	GPXMB	0.001

グレイ: Validation候補遺伝子(5個)、FDR: false discovery rate

3) 発現変動遺伝子の中から、rank 上位、発現量高値、ばらつきが少ない、機能 (ケモカイン、免疫・炎症関連) の条件から 5 個の validation 候補遺伝子 (CXCL12、CXCL14、CCL18、LTF、COLEC12) を抽出した (表 1)。定量 PCR では、IgG4-RD において、LTF は SS と比較し、CCL18 は SS および HC と比較して有意に高発現していた (P<0.05) (図 2)。

4) IgG4-RD の LSG では、多数の CD68 陽性マクロファージ、一部の CD20 陽性 B 細胞が CCL18 を産生していた。一方で、SS では CCL18 産生細胞はほとんど認めず、HC ではマクロファージ、B 細胞の浸潤は認めなかった。CCL18

を産生する CD68 陽性マクロファージの細胞数は、HC、SS と比較して、IgG4-RD では有意に増加していた ( $P<0.05$ ) (図 3)。

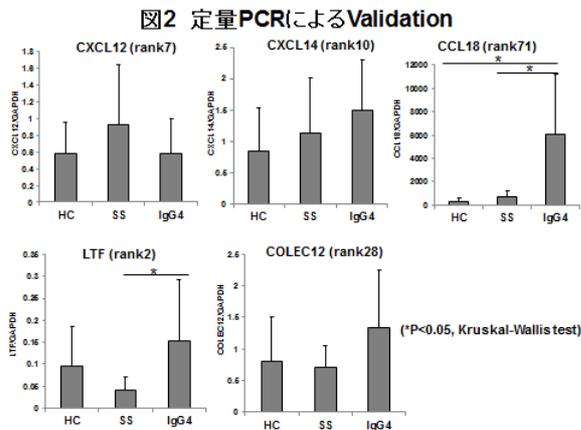
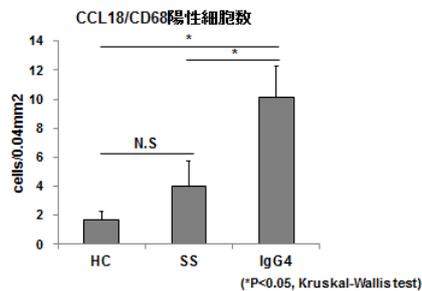


図3 口唇唾液腺におけるCCL18産生CD68陽性マクロファージ



健康人 (HC) (N=1)、シェーグレン症候群 (SS) (N=1)、IgG4関連疾患 (IgG4-RD) (N=2) の口唇唾液腺 (各3視野) において、CCL18、CD68がmergelした細胞数 (cells/0.04mm²) をカウントした。

#### < 考察 >

Lactotransferrin (LTF) はミルク中に大量に含まれる鉄結合タンパクで、抗細菌・抗ウイルス活性、抗ガン活性、創傷治癒、線維芽細胞増殖、骨形成等の幅広い生理的機能を有し、樹状細胞の成熟を誘導するとの報告もある。CCL18 は LPS、IL-10 等の刺激により、マクロファージ、樹状細胞から産生され、T 細胞、B 細胞のケモタキシス、線維芽細胞からのコラーゲン産生を誘導する。IgG4-RD の LSG で高発現した LTF は線維芽細胞増殖、樹状細胞の成熟を介して、主にマクロファージが産生した CCL18 は、T 細胞、B 細胞の病変局所へのケモタキシス、線維化誘導を介して、IgG4-RD の病態形成に寄与する可能性が示唆された。

#### < 結論 >

DNA マイクロアレイでは、IgG4-RD の LSG における遺伝子発現のパターンは、SS とは異なっていた。IgG4-RD の LSG では CCL18、LTF が高発現し、病態形成に関与する可能性が示唆された。

#### < 引用文献 >

1) Tsuboi H et al. Arthritis Res Ther 2012, 14:R171

#### 5. 主な発表論文等

##### [ 雑誌論文 ] (計 3 件)

Ebe H, Tsuboi H, Hagiya C, Takahashi H, Yokosawa M, Hagiwara S, Hirota T, Kurashima Y, Takai C, Miki H, Asashima H, Umeda N, Kondo Y, Ogishima H, Suzuki T, Chino Y, Matsumoto I, Sumida T. Clinical features of patients with IgG4-related disease complicated with perivascular lesions. Mod Rheumatol. 2015, 25:105-109. doi: 10.3109/14397595. 査読有

Tsuboi H, Nakai Y, Iizuka M, Asashima H, Hagiya C, Tsuzuki S, Hirota T, Miki H, Hagiwara S, Kondo Y, Tanaka A, Moriyama M, Matsumoto I, Nakamura S, Yoshihara T, Abe K, Sumida T. DNA microarray analysis of labial salivary glands in IgG4-related disease: comparison with Sjögren's syndrome. Arthritis Rheumatol. 2014, 66:2892-2899. doi: 10.1002/art.38748. 査読有

Hagiya C, Tsuboi H, Yokosawa M, Hagiwara S, Hirota T, Takai C, Asashima H, Miki H, Umeda N, Horikoshi M, Kondo Y, Sugihara M, Ogishima H, Suzuki T, Hiraoka T, Kaji Y, Matsumoto I, Oshika T, Sumida T. Clinicopathological features of IgG4-related disease complicated with orbital involvement. Mod Rheumatol. 2014, 24:471-476. doi: 10.3109/14397595. 査読有

##### [ 学会発表 ] (計 2 件)

Hiroto Tsuboi, Mana Iizuka, Hiromitsu Asashima, Hiroyuki Takahashi, Tomoya Hirota, Yuya Kondo, Isao Matsumoto, and Takayuki Sumida. Up-regulation of CCL18-CCR8 signaling in patients with IgG4-related disease. 第 59 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2015 年 4 月 23 日 ~ 25 日、名古屋

坪井洋人、中井雄治、飯塚麻菜、浅島弘充、高橋広行、廣田智哉、近藤裕也、古川祥子、田中昭彦、森山雅文、松本功、吉原俊雄、中村誠司、阿部啓子、住田孝

之、DNA マイクロアレイによる IgG4 関連疾患の口唇唾液腺における遺伝子発現解析、第 23 回日本シェーグレン症候群学会、2014 年 9 月 12 日～13 日、長崎

〔図書〕(計 1 件)

坪井洋人、中井雄治、飯塚麻菜、森山雅文、吉原俊雄、中村誠司、阿部啓子、住田孝之、前田書店、IgG4 関連疾患実践的臨床から病因へ - IgG4 研究会モノグラフ - 、ケモカインと IgG4 関連疾患、pp.156-161、2015

〔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

坪井 洋人 (TSUBOI, HIROTO)  
筑波大学・医学医療系・講師  
研究者番号 : 80580505

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

中井 雄治 (NAKAI, YUJI)  
弘前大学食料科学研究所・教授  
研究者番号 : 10321788