

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26293430

研究課題名(和文)新疾患概念「IgG4関連疾患」の病態解明に向けた自然免疫からの新戦略

研究課題名(英文) New strategy targeted at innate immunity for the pathologic clarification of new disease concept "IgG4-related disease"

研究代表者

森山 雅文(Moriyama, Masafumi)

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号：20452774

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では自然免疫に重要な役割を果たす病原体センサーであるTLR7に注目し、huTLR7 Tg マウスを作製し、その表現型を検討した。その結果、huTLR7 TgはWTマウスと比較して臓器重量は有意な差は認めなかったが、唾液腺、膵臓、および肺におけるリンパ球浸潤と繊維化は有意に亢進していた。さらに、TLR7アゴニストによる刺激実験を行ったところ、huTLR7 TgマウスではIgG4-RDの好発部位である唾液腺と膵臓でリンパ球浸潤・繊維化が亢進した。さらに、血清IgG1(ヒトのIgG4に相当)の上昇も認めることから、IgG4-RDモデルマウスへの応用が可能であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：IgG4-related disease (IgG4-RD) is a unique inflammatory disorder. In addition, recent studies have also implicated the Toll-like receptor (TLR) pathway. Here, we examined the expression of TLRs in salivary glands (SGs) from patients with IgG4-RD. In patients with IgG4-RD, TLR7 was overexpressed compared with the other groups. Immunohistochemical analysis confirmed strong infiltration of TLR7-positive cells in the SGs of patients with IgG4-RD. Double immunohistochemical staining showed that TLR7 expression co-localized with CD163+ M2 macrophages. In huTlr7 Tg mice, the focus and fibrosis score in SMGs, pancreas, and lungs were significantly higher than those in wild-type mice. Moreover, the concentration of serum IgG in huTlr7 Tg mice was significantly higher than that in wild-type mice and distinctly increased upon stimulation with TLR7 agonist. Thus, huTlr7 Tg mice could lead to the establishment of a mouse model of IgG4-RD.

研究分野：臨床免疫学

キーワード：IgG4関連疾患 自然免疫 Toll様受容体

1. 研究開始当初の背景

IgG4 関連疾患 (IgG4-RD) は、高 IgG4 血症と罹患臓器への著明な IgG4 陽性形質細胞浸潤を特徴とする全身性の疾患であり、本邦から提唱された新しい疾患概念である。2009 年に厚労省「難治性疾患克服研究事業」として研究班が立ち上がり、現在各領域のエキスパートからなるオールジャパン体制で研究に取り組んでおり、我々も歯科からの唯一の研究分担者として「唾液腺病変の病態解明」のプロジェクトを担っている。

IgG4-RD の 1 つである IgG4 関連涙腺・唾液腺炎 (IgG4-DS) いわゆるミクリッツ病は、病理組織学的類似性からシェーグレン症候群 (SS) の一亜型と認識されてきたが、近年両者が全く異なる疾患であることが明らかになった。しかし、免疫学的な検討はほとんどなされていなかったため、我々は SS と IgG4-DS の唾液腺における Th サブセットに注目し、SS では Th1・Th17 が発症に、Th2 が病態進展に関与しており、一方で IgG4-DS では Th2・Treg が病態形成に関与していることを報告している。特に、Th2 サイトカインである IL-4 や IL-10 は、IgG4-DS における IgG4 産生に重要であり、これらの知見は Nature review 誌にも Research Highlight として紹介され (Nat Rev Rheumatol 2011) IgG4-DS が Th2 依存性の疾患であることが世界に広く知られるようになった。しかし、なぜ Th2 にシフトするのは未だ明らかにされていない。

2. 研究の目的

最近の研究により、強力な Th2 活性を持つサイトカインとして IL-33 が同定された。そこで本研究では、IL-33 の産生細胞である自然免疫担当細胞に注目し、自然免疫からのアプローチで IgG4-RD の病態解明を目指す。

3. 研究の方法

本研究の目的は、IgG4-RD の Th2 へのシフトに関わる分子を同定・解析することであり、最終的には、IgG4-DS の発症・病態進展のメカニズムの解明し、新規標的分子治療の確立を目指す。

具体的には、下記の研究項目を検討する。

1) 唾液腺における IL-33 と IL-33 産生細胞の局在および同定

2) 唾液腺以外の IgG4-RD の他臓器 (腎臓、膵臓、リンパ節など) における IL-33 の発現解析

3) IgG4-RD 患者の血清 IL-33 値の測定 (ステロイド治療前後の経時的測定: ELISA 法)

4) 唾液腺からの IL-33 細胞の抽出 + IL-33 産生能の評価 (in vitro)

5) IL-33 以外の病態形成に関わる分子の検索 (顎下腺を用いた DNA マイクロアレイによる網羅的解析)

6) IgG4-RD モデルマウス作成の確立 (東京大学医科学研究所との共同研究)

4. 研究成果

IL-33 は主に上皮細胞、MΦ、樹状細胞 (dendritic cell: DC) などが発現しており、受容体の ST2 は主に Th2 細胞に発現している。Th2 細胞はこの IL-33/ST2 シグナルによって活性化され、Th2 サイトカイン (IL-4、IL-13) を産生しているとされる。そこで本研究では、IgG4-DS 患者 7 例、SS 患者 10 例、健常者 10 例を対象とし、唾液腺における IL-33、ST2、IL-4、IL-13、IFN γ 、MΦ (CD68、CD163)、DC (CD11c、CD123) について検討を行った。その結果、IFN γ の mRNA 発現量は SS で他の群より有意に発現が亢進していたが、それ以外の分子は IgG4-DS で他の群より有意に発現が亢進していた。さらには IgG4-DS では、IL-33 と Th2 サイトカイン (IL-4、IL-13) の mRNA 発現量は正の相関を認めた。IL-33 は全群で導管上皮細胞に認められたが、IgG4-DS のみ異所性杯中心周囲にも散在性に認められた。蛍光二重染色では IL-33 は CD68、CD163 と局在がほぼ一致しており、CD11c や CD123 とはほとんど一致しなかった。これらの結果より、IgG4-DS の病変局所においては、M2 M が産生する IL-33 が Th2 優位な環境を形成し、病態形成に寄与していることが示唆された。

さらに、DNA マイクロアレイでは IgG4-RD では TLR4、7、8、9、10 の発現が対照群よりも有意に亢進していた。さらに、発現亢進を認めた TLR については症例数を増やしてバリデーションを行った結果、対照群と比較して TLR7 のみが有意な亢進を認めた。また、局所での TLR7 の発現細胞について IgG4-RD と同様に二次リンパ濾胞を形成する健常扁桃を比較すると、両者とも濾胞周囲に TLR7 の発現は認めるものの、その局在は扁桃では CD123 陽性形質細胞様樹状細胞とほぼ一致するのに対し、IgG4-RD では CD163 陽性 M2 マクロファージとほぼ一致していた。最近の報告では、R848 でマクロファージを刺激すると Th2 活性化因子である IL-33 が産生されることが示唆されていることから、TLR ファミリーと IL-33 との関連について検討を行った。その結果、TLR7 のみが IL-33 と正の相関を認めた。さらに、ヒト TLR7 Tg マウスを作製して R848 で 1 か月間刺激すると、顎下腺と膵臓ではリンパ球浸潤と線維化が亢進し、血清 IgG および IgG1 値は有意に増加した。これらの結果から、TLR7 による刺激が病変局所の M2 マクロファージを活性化して IL-33 の産生を促進させることで、Th2 サイトカイン産生および IgG4 のクラススイッチに関与していることが示唆された。

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 22 件)

1. The expansion in lymphoid organs of IL-4⁺ BATF⁺ T follicular helper cells is linked to IgG4 class switching in vivo. Maehara T, Mattoo H, Mahajan VS, Murphy SJH, Yuen GJ, Ishiguro N, Ohta M, Moriyama M, Saeki T, Yamamoto H, Yamauchi M, Daccache J, Kiyoshima T, Nakamura S, Stone JH, Pillai S. Life Science Alliance 2018. in press.
2. Clinical practice guideline for Sjögren's syndrome 2017. Sumida T, Azuma N, Moriyama M, Hagiwara S, Takahashi H, Asashima H, Honda F, Abe S, Ono Y, Hirota T, Hirata S, Tanaka Y, Shimizu T, Nakamura H, Kawakami A, Sano H, Ogawa Y, Tsubota K, Ryo K, Saito I, Tanaka A, Nakamura S, Takamura E, Tanaka M, Suzuki K, Takeuchi T, Yamakawa N, Ohta A, Mimori T, Nishiyama S, Yoshihara T, Suzuki Y, Kawano M, Tomiita M, Tsuboi H. Mod Rheumatol 2018. in press
3. cDNA microarray analysis identifies NR4A2 as a novel molecule involved in the pathogenesis of Sjögren's syndrome. Takahashi H, Tsuboi H, Asashima H, Hirota T, Kondo Y, Moriyama M, Matsumoto I, Nakamura S, Sumida T. Clin Exp Immunol 190(1):96-109, 2017.
4. CD163⁺CD204⁺ tumor-associated macrophages contribute to T cell regulation via interleukin-10 and PD-L1 production in oral squamous cell carcinoma. Kubota K, Moriyama M, Furukawa S, Haque R ASM, Maruse Y, Jinno T, Tanaka A, Ohta M, Ishiguro N, Yamauchi M, Sakamoto M, Maehara T, Hayashida JN, Kawano S, Kiyoshima T, Nakamura S. Sci Rep 7:1755, 2017.
5. Comparison of performance of the 2016 ACR-EULAR classification criteria for primary Sjögren's syndrome with other sets of criteria in Japanese patients. Tsuboi H, Hagiwara S, Asashima H, Takahashi H, Hirota T, Noma H, Umehara H, Kawakami A, Nakamura H, Sano H, Tsubota K, Ogawa Y, Takamura E, Saito I, Inoue H, Nakamura S, Moriyama M, Takeuchi T, Tanaka Y, Hirata S, Mimori T, Matsumoto I, Sumida T. Ann Rheum Dis 76(12):1980-1985, 2017.
6. Myeloid dendritic cells stimulated by thymic stromal lymphopoietin promote Th2 immune responses and the pathogenesis of oral lichen planus. Yamauchi M, Moriyama M, Hayashida JN, Maehara T, Ishiguro N, Kubota K, Furukawa S, Ohta M, Sakamoto M, Tanaka A, Nakamura S. PLoS ONE 12(3): e0173017. 2017.
7. Interleukin-33 produced by M2 macrophages and other immune cells contributes to Th2 immune reaction of IgG4-related disease. Furukawa S, Moriyama M, Miyake K, Nakashima H, Tanaka A, Maehara T, Iizuka-Koga M, Tsuboi H, Hayashida JN, Ishiguro N, Yamauchi M, Sumida T, Nakamura S. Sci Rep 7:42413, 2017
8. Th1/Th2 immune balance and other T helper subsets in IgG4-Related Disease. Moriyama M and Nakamura S. Curr Top Microbiol Immunol 401:75-83, 2017
9. Lesional CD4⁺ IFN- γ ⁺ cytotoxic T lymphocytes in IgG4-related dacryoadenitis and sialoadenitis. Maehara T, Mattoo H, Ohta M, Mahajan VS, Moriyama M, Yamauchi M, Drijvers J, Nakamura S, Stone JH, Pillai SS. Ann Rheum Dis 76(2):377-385, 2017
→ Highlighted in Nat Rev Rheumatol 12(9):500, 2016.
10. DNA microarray analysis of submandibular glands in IgG4-related disease indicates a role for MARCO and other innate immune related proteins. Ohta M, Moriyama M, Maehara T, Gion Y, Furukawa S, Tanaka A, Hayashida JN, Yamauchi M, Ishiguro N, Mikami Y, Tsuboi H, Iizuka-Koga M, Kawano S, Sato Y, Kiyoshima T, Sumida T, Nakamura S. Medicine 95(7):e2853, 2016
11. The diagnostic utility of labial salivary gland biopsy in IgG4-related disease. Moriyama M, Ohta M, Furukawa S, Mikami Y, Tanaka A, Maehara T, Yamauchi M, Ishiguro N, Hayashida JN, Kawano S, Ohshima Y, Kiyoshima T, Nakamura S. Mod Rheumatol 26(5):725-9, 2016.
12. IgG4 関連疾患の病態形成における自然免疫の関与 -特に M2 マクロファージに注目して- 森山 雅文 アレルギーの臨床 36(13):1273-1277, 2016
13. Effectiveness of imaging modalities for screening IgG4-related dacryoadenitis

- and sialadenitis (Mikulicz's disease) and for differentiating it from Sjögren's syndrome (SS), with an emphasis on sonography. Shimizu M, Okamura K, Kise Y, Takeshita Y, Furuhashi H, Weerawanich W, Moriyama M, Ohyama Y, Furukawa S, Nakamura S, Yoshiura K. *Arthritis Res Ther* 17:223, 2015.
14. A case of mantle cell lymphoma presenting as IgG4-related dacryoadenitis and sialoadenitis, so-called Mikulicz's disease. Hayashi Y, Moriyama M, M Takashi, Goto Y, Kawano S, Ohta M, Tanaka A, Furukawa S, Hayashida JN, Kiyoshima T, Shimizu M, Chikui T, Nakamura S. *World J Surg Oncol* 13:225, 2015.
 15. A case of marginal zone B cell lymphoma mimicking IgG4-related dacryoadenitis and sialoadenitis. Ohta M, Moriyama M, Goto Y, Kawano S, Tanaka A, Maehara T, Furukawa S, Hayashida JN, Kiyoshima T, Shimizu M, Arinobu Y, Nakamura S. *World J Surg Oncol* 13:67, 2015
 16. Clinical relevance of Küttner tumour and IgG4-related dacryoadenitis and sialoadenitis. Furukawa S, Moriyama M, Kawano S, Tanaka A, Maehara T, Hayashida JN, Goto Y, Kiyoshima T, Shiratsuchi H, Ohyama Y, Ohta M, Imabayashi Y, Nakamura S. *Oral Dis* 21: 257-262, 2015
 17. Saliva as a potential tool for diagnosis of dry mouth including Sjögren's syndrome. Ohyama K, Moriyama M, Hayashida JN, Tanaka A, Maehara T, Ieda S, Furukawa S, Ohta M, Imabayashi Y, Nakamura S. *Oral Dis* 21: 224-231, 2015
 18. Differences of stimulated and unstimulated salivary flow rates in the patients with dry mouth. Hayashida JN, Minami S, Moriyama M, Toyoshima T, Shinozaki S, Tanaka A, Maehara T, Nakamura S. *J Oral Maxillofac Surg Med Pathol* 27(1):96-101, 2015
 19. Preferential M2 macrophages contribute to fibrosis in IgG4-related dacryoadenitis and sialoadenitis, so-called Mikulicz's disease. Furukawa S, Moriyama M, Tanaka A, Maehara T, Tsuboi H, Iizuka1 M, Hayashida JN, Ohta M, Saeki T, Notohara K, Nakamura S. *Clin Immunol* 156:9-18, 2015
 20. DNA microarray analysis of labial salivary glands in IgG4-related disease. Comparison with Sjögren's syndrome. Tsuboi H, Nakai Y, Iizuka1 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. *Arthritis Rheumatol* 66(10):2892-2899, 2014
 21. The diagnostic utility of biopsies from the submandibular and labial salivary glands in IgG4-related dacryoadenitis and sialoadenitis, so-called Mikulicz's disease. Moriyama M, Furukawa S, Kawano S, Goto Y, Kiyoshima T, Tanaka A, Maehara T, Hayashida JN, Ohta M, Nakamura S. *Int J Oral Maxillofac Surg* 43(10):1276-1281, 2014
 22. T helper subsets in Sjögren's syndrome and IgG4-related dacryoadenitis and sialoadenitis: A critical review. Moriyama M, Tanaka A, Maehara T, Furukawa S, Nakashima H, Nakamura S. *J Autoimmun* 51:81-88, 2014
- 〔学会発表〕(計 11 件)
1. 第 55 回 日本神経学会学術大会 シンポジウム「IgG4 関連疾患の病態形成における Th 細胞および自然免疫細胞の関与」森山 雅文、田中 昭彦、前原 隆、古川 祥子、太田 美穂、中村 誠司 福岡、2014.5.21
 2. 第 24 回 日本口腔内科学会・第 27 回 日本口腔診断学会 合同学術大会 シンポジウム「IgG4 関連涙腺・唾液腺の疾患概念と免疫学的特徴」森山 雅文、田中 昭彦、前原 隆、古川 祥子、中村 誠司 福岡、2014.9.20
 3. 第 59 回 日本リウマチ学会総会・学術集会 シンポジウム「シェーグレン症候群の病態形成における T 細胞サブセットの関与」森山 雅文、古川 祥子、田中 昭彦、前原 隆、太田 美穂、山内 昌樹、林田 淳之將、中村 誠司 名古屋、2015.4.23.
 4. 第 25 回日本口腔内科学会学術大会 シンポジウム「IgG4 関連疾患の唾液腺病変 ～病態形成に関わる Th 細胞の活性化機構～」森山 雅文、田中 昭彦、前原 隆、古川 祥子、太田 美穂、中村 誠司 大阪、2015.9.18.
 5. 第 24 回日本シェーグレン症候群学会学術集会 シンポジウム「シェーグレン症候群：診療ガイドラインについて 口腔病変の診断と治療」森山 雅文、田中 昭彦、前原 隆、古川 祥子、太田 美穂、中村 誠司 東京、2015.9.19.
 6. The 63rd Annual Meeting of Japanese

- for Dental Research (JADR) Luncheon meeting 「Management of Xerostomia ~focus on M3 muscarinic receptor agonist~」 Masafumi M. Fukuoka, 2015.10.30-31.
7. Salivary gland disease ~Summer Seminar in Tenjin~
 8. 特別講演「当科における口腔乾燥症の診断とマネージメント - M3型ムスカリン受容体アゴニストによるドライマウス治療 -」森山 雅文 福岡、2015.7.9.
 9. The Annual Meeting of American Academy of Oral Medicine 2016 Oral Abstracts Session II "Diagnostic utility of labial salivary gland biopsy in IgG4-related disease" Moriyama M., Tanaka A, Ohta M, Furukawa S, Maehara T, Yamauchi M, Ishiguro N, Hayashida JN, Nakamura S. Atlanta, 2016.4.5-9
 10. 第31回日本臨床リウマチ学会 特別企画「IgG4関連疾患の世界トップレベルIgG4関連疾患の病因 - 免疫学的アプローチ -」森山 雅文、田中 昭彦、前原 隆、古川 祥子、太田 美穂、石黒 乃理子、中村 誠司 東京、2016.10.30.
 11. 3rd Symposium for "Accelerating Brain Circulation" Special lecture 「Possible involvement of Toll-like receptor in the initiation of IgG4-related dacryoadenitis and sialoadenitis」 Moriyama M., Ishiguro N, Tanaka A, Maehara T, Furukawa S, Ohta M, Yamauchi M, Sakamoto M, Hayashida JN, and Nakamura S. Fukuoka, 2017.2.12.

〔図書〕(計8件)

1. Moriyama M., Nakamura S 「IgG4-related disease」 Umehara H, Stone J 編: <Imaging> Salivary glands in Mikulicz's disease 85-92 頁、Springer 社、2014
2. 森山 雅文、中村 誠司 「臨床放射線 第59巻第8号 8月号」後関 武彦 編: ミクリッツ病/IgG4関連疾患とシェーグレン症候群の新しい理解、1033-1043 頁、金原出版株式会社、2014
3. 森山 雅文、中村 誠司 「IgG4関連疾患 実践的臨床から病因へ」中村 誠司、住田 孝之 編: Th2細胞・制御性T細胞とIgG4関連疾患(1) 144-149 頁、前田書店、2015
4. 森山 雅文、中村 誠司 「臨床医必読 最新IgG4関連疾患」岡崎 和一、川 茂幸 編: 3. 唾液腺病変 52-54 頁、診断と治療社、2015
5. 中元 雅史、森山 雅文、石原 宏、中尾 光善 「ドライシンドロームの基礎と臨床」坪田 一男、斎藤 一郎 編: 第3章

- グルココルチコイドの作用とドライシンドローム 99-105 頁、メディカルレビュー社、2016
6. 森山 雅文 「分子リウマチ治療 第9巻 第1号 2016」住田 孝之 編: 特集 IgG4関連疾患の病因・病態を考える IgG4関連涙腺・唾液腺炎から 1-4 頁、先端医学社、2016
 7. Moriyama M., Nakamura S 「IgG4-Related Kidney Disease」 Saito T, Stone JH, Nakashima H, Saeki T, Kawano M 編: Part . General Remarks Potential Pathways in the Pathogenesis of IgG4-Related Disease. 43-54 頁、Springer 社、2016. (DOI: 10.1007/978-4-431-55687-9)
 8. 森山 雅文、中村 誠司 「臨床免疫・アレルギー科 第67巻 第4号」IgG4関連疾患の病態形成における自然免疫活性化機構 337-342 頁、科学評論社、2017

〔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

森山 雅文 (MORIYAMA, masafumi)

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号: 20452774

(2) 研究分担者

中村 誠司 (NAKAMURA, sei-ji)

九州大学・歯学研究院・教授

研究者番号: 60189040

中島 衡 (NAKASHIMA, hitoshi)

福岡大学・医学部・教授

研究者番号: 70188960

坪井 洋人 (TSUBOI, hi-roto)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号: 80580505