

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 14 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893123

研究課題名(和文) IgG4関連疾患におけるIgG4抗体の病原性と標的抗原の同定

研究課題名(英文) Pathogenicity and antigen of IgG4 antibody in patients with IgG4 related disease

研究代表者

塩川 雅広 (Shiokawa, Masahiro)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・医員

研究者番号：50737880

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではIgGの病原性を明らかにし、その抗原を同定することを目的とした。尋常性モデルマウスを用い、IgG4関連疾患患者のIgG、およびサブクラス(IgG1, IgG2, IgG4)の病原性について解析を行なった。次に、IgG4関連疾患患者の抗原を探索した。この結果、患者IgG1およびIgG4投与群に同様の病変を認めたが、患者IgG1投与群の方がより強く誘導された。また、抗原候補が同定された。IgG4関連疾患患者のIgGが、マウス膵および唾液腺に対して病原性を持つことが示された。これらの抗体がヒトにおいても同様の病原性を示すのか、また候補抗原が真の抗原であるか、更なる研究が必要である。

研究成果の概要(英文)：Objective: The pathogenic roles of IgGs, including IgG4, in patients with IgG4-RD remain unknown. Design: We examined the pathogenic activity of circulating IgGs in patients with IgG4-RD by injecting their IgGs into neonatal Balb/c mice. Binding of patients' IgGs to pancreatic tissues was also analyzed in an ex vivo mouse organ culture model and in tissue samples of patients with autoimmune pancreatitis (AIP). Results: Subcutaneous injection of patients' IgG, but not control IgG, induced pancreatic and salivary gland injuries. Pancreatic injury was also induced by injecting patients' IgG1 or IgG4, with more destructive change induced by IgG1 than by IgG4. The potent pathogenic activity of patients' IgG1 was significantly inhibited by simultaneous injection of patients' IgG4. Conclusions: IgG1 and IgG4 from patients with IgG4-RD have pathogenic activities through binding to affected tissues in neonatal mice.

研究分野：消化器内科

キーワード：IgG4 自己免疫性膵炎 IgG4関連疾患

1. 研究開始当初の背景

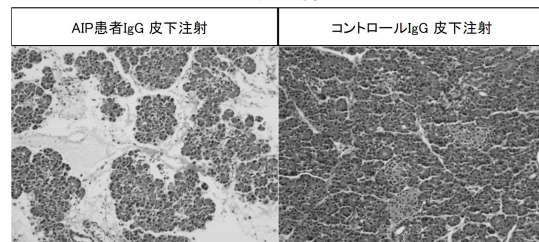
自己免疫性膵炎 autoimmune pancreatitis (AIP) は、我が国において提唱された血清 IgG4 上昇と IgG4 陽性形質細胞浸潤を特徴とする自己免疫性の慢性膵炎である (Hamano H, *N Engl J Med*, 2001)。その後、IgG4 陽性細胞浸潤は膵臓のみならず、様々な臓器 (涙腺、唾液腺、胆管、腎臓、後腹膜など) に生じる例が明らかとなってきた。この結果、以前から知られた別々の疾患としてミクリッツ病、IgG4 陽性の膵炎、間質性肺炎、慢性腎炎、後腹膜線維症は、すべて一連の病態と考えられるようになり、2007 年にはわが国を中心に**全身性 IgG4 関連疾患として新たな疾患概念が確立された**。(Umehara H, *Mod Rheumatol*, 2012, Stone JH, *N Engl J Med*, 2012)。同疾患はステロイド治療への反応が良好な良性疾患であるが、悪性腫瘍との鑑別が困難な例が多く問題となっている。また AIP と膵癌の合併例を含め IgG4 関連疾患と悪性腫瘍合併例が報告されること、さらには膵癌や胆道癌などの悪性腫瘍では約 10% の症例において血清 IgG4 値が高値であることが報告され、悪性腫瘍との関係・鑑別が注目されてきた。

このような中、**申請者らは**多数の AIP 症例を臨床病理学的、統計学的な解析を行った結果、**AIP と悪性腫瘍の関係が paraneoplastic syndrome として有名な多発性筋炎と悪性腫瘍の関係と酷似していることを見出し、AIP の一部(約 5%) は悪性腫瘍によって発症する、Paraneoplastic syndrome である可能性を世界に先駆けて報告した(業績論文 2)**。しかしながら、このような悪性腫瘍に随伴する AIP を含め、**IgG4 関連疾患の病因に関する分子機構は未だ明らかにされておらず、現時点では、この疾患の最も大きな特徴でもある IgG4 の病原性についても不明である**。また、本

疾患が自己抗体による免疫反応によって臓器障害が誘導されるものなのか、あるいは細胞障害性 T 細胞によって生じるもののかなど、そのメカニズムは全く解明されていない。

近年、B 細胞特異的な分子標的薬であるリツキシマブが IgG4 関連疾患に劇的に効果があることが報告され、抗体の病原性が注目されるようになった(Hart P, *Gut*, 2010)が、リツキシマブは抑制性 T 細胞など他の免疫細胞

マウス膵



にも影響を及ぼすため、未だその有無について結論は出ていない。このような背景の中、**申請者らは、IgG4 抗体は病原性を持つのではないかとの仮説をもとに研究を開始した**。そして驚くべきことに、**患者血清中の免疫グロブリンを抽出し、マウスに投与することにより、患者罹患臓器と同一の臓器のみに、容量依存性に IgG4 関連疾患の病理像に合致する病変が生じることを確認した(次ページ図)**。

2. 研究の目的

IgG4 関連疾患は我が国において提唱された、血清 IgG4 上昇と IgG4 陽性形質細胞浸潤を特徴とする全身性の自己免疫疾患である。臨床上、悪性腫瘍との鑑別が問題となる例が多く、その病態に基づいた診断と治療が望まれるが、本疾患の病因病態はほとんど明らかにされていない。

驚くべきことに**申請者らは、IgG4 関連疾患患者の免疫グロブリンをマウスに投与することにより、患者罹患臓器と同一臓器のみに、容量依存性に、IgG4 関連疾患の病理像に合致する病変が生じることを発見した**。これは本

疾患が抗原抗体反応を介して生じていることを示唆している。本研究では IgG4 関連疾患における **自己抗体の病原性、病原性をもつ抗体の IgG サブクラス、その標的自己抗原を明らかにし、新たな診断手法ならびに治療法の開発を目的とする。**

3. 研究の方法

AIP(Ig4 関連疾患)患者 IgG をマウスへ投与し、各臓器への結合と病原性について評価する。

IgG4 を含む各 IgG サブクラスの病原性について、上記マウス実験系において解析する。

病原性をもつ IgG とその標的組織・障害臓器について、マウスと患者組織間で比較検討する。

患者 IgG を抗体とした Western blot、免疫沈降法、および質量分析により、患者 IgG がマウス脾組織・ヒト脾組織において認識する抗原を同定する。

同自己抗原に対する定量法を開発し、臨床への応用を目指す。

4. 研究成果

・患者 IgG の新生児マウスへの皮下注射による病原性の評価

本実験系は尋常性天疱瘡の病態解明において確立されたマウスモデルを応用する。AIP(IgG4 関連疾患)患者 10 名および年齢・性別をマッチさせたコントロール 10 名(健康人 5 名、脾癌患者 5 名)より抽出する。免疫グロブリンの抽出には Ab-Rapid PuRe EX を、定量には Human IgG EIA Kit を使用し、患者とコントロールで投与する免疫グロブリンは同量とする。

同実験において、**患者 IgG のマウスへの投与により同患者の罹患臓器と同一のマウス組織に病変ができることを見出した。本**

用量依存性、時間依存性も認めた。

また、各臓器においてヒト IgG、および IgG4 に対する免疫染色を行うと、細胞外マトリックスに抗体結合部位を認めた。

・患者 IgG の各サブクラスにおける病原性の評価

AIP (IgG4 関連疾患) 患者 IgG を Product sheet capture select IgG1 ~ IgG4(Hu) affinity matrix を用い、IgG1、IgG2、IgG3、および IgG4 のサブクラスに分画する。各分画の病原性について、において確立したマウス実験系を用いて評価した。

患者 IgG1 および IgG4 投与群に同様の病変を認めたが、患者 IgG1 投与群の方がより強く誘導された。興味深いことに、IgG1 と IgG4 を同時に投与すると、IgG1 のみ投与した場合より病変は軽減する傾向にあった。

・ヒト AIP 組織との関連の評価

で明らかとなったマウス脾における患者 IgG、IgG4 の結合部位と、ヒト AIP 組織において IgG、IgG4 が沈着している部位との相同性について検討する。**申請者はマウス・ヒトの両者において、IgG・IgG4 とも細胞外マトリックスに沈着があることを確認した。**

-1. 自己抗原の同定

(1)二次元電気泳動による同定

マウス脾抽出物を二次元電気泳動によりゲル上に展開し、患者あるいはコントロール血清を一次抗体として用いた Western blotting 法を行う。**申請者はこれまでの予備実験において、患者血清を用いた場合にのみ特異的に認められるバンドを見出している。**同バンドを切り出し、トリプシンで消化のうえ、京都大学大学院医学研究科 医学研究支援センターにおいて質量分析を行い、アミノ酸配

列を同定，さらには BLAST で照合し抗原を同定する。

(2)免疫沈降法を使用した同定

上記(1)の方法では、マウスのサンプル調整時の熱処理により真の抗原の抗原性が低下あるいは消失してしまう可能性がある。これを避けるため、患者あるいはコントロール IgG をカラムに結合させ、免疫沈降法によりマウス膵組織から蛋白を抽出する。これを電気泳動することにより患者 IgG に特異的なバンドを見出し、切り出したうえで質量分析を行う。

上記にて、患者 IgG が反応する自己抗原候補が検出された。

-2. 自己抗原の validation

-1 で同定した抗原の recombinant protein をサンプルとし、患者およびコントロール IgG を一次抗体として用いた Western blotting 法を行う。患者 IgG を用いた場合のみに発現する、-1 で得られたバンドとの類似性を検討し、同抗原（自己抗原）とこれに対する自己抗体の存在を確認する。さらに、実験系マウス膵組織における自己抗原に対する抗体を用いた免疫染色（二重染色）により、自己抗原の validation をおこなう。

自己抗原に対する定量法の開発と臨床応用

で同定した自己抗原に対する抗体を、定量的に測定できる ELISA 法を開発し、診断や治療反応性、再発などとの関連について検討し、臨床応用の可能性を探る。

抗原を固相化し、患者血清を一次抗体とし、抗体の力価を測定できる ELISA 法を確

立する。

Training グループ

まず、申請者らが京都大学消化器内科で保存している IgG4 関連疾患患者 20 人と、コントロール 20 人（膵癌患者 10 人、健常人 10 人）の血清を用い、開発した ELISA 法により自己抗体の定量を行う。適切な cut off 値を設定の上、同抗体定量の特異性、あるいは病勢との相関などについて血清 IgG4 値との比較において検討する。

上記にて、患者 7 割にて、反応する自己抗原 X が同定できた。

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 1 件)

1. Shiokawa M, Kodama Y, Kuriyama K, Yoshimura K, Tomono T, Morita T, Kakiuchi N, Matsumori T, Mima A, Nishikawa Y, Ueda T, Tsuda M, Yamauchi Y, Minami R, Sakuma Y, Ota Y, Maruno T, Kurita A, Sawai Y, Tsuji Y, Uza N, Matsumura K, Watanabe T, Notohara K, Tsuruyama T, Seno H, Chiba T. Pathogenicity of Immunoglobulin G in Patients with IgG4-related Disease. *Gut* 2016 doi: 10.1136/gut.jnl-2015-310336

〔学会発表〕(計 3 件)

- 1) ○ Shiokawa Masahiro, Ota Yuji, Tanabe Wataru, Maruno Takahisa, Kurita Akira, Sawai Yugo, Uza Norimitsu, Kodama Yuzo, Chiba Tsutomu. 「Pathogenic Role of IgG in Patients With IgG4-Related Disease on Neonatal Mice」, 『DDW 2016』, San Diego, USA, (May 2016)
- 2) ○ 塩川雅広, 児玉裕三, 妹尾浩, 千葉勉 「IgG4 関連疾患における IgG の病原性と標的抗原の解明」, 『第 102 回日本消化器病学会総会』, 東京 2016 年 4 月
- 3) ○ 塩川雅広, 垣内伸之, 友野輝子, 松森友昭, 美馬淳志, 上田樹, 津田喬之,

西川義浩、山内雄揮、佐久間 洋二郎、
栗山勝利、大田悠司、丸野貴久、澤井
勇悟、辻喜久、宇座徳光、児玉裕三、
千葉勉 「自己免疫性膵炎患者の IgG の
病原性」, 『第 51 回消化器免疫病学会総
会』, 京都 2014 年 7 月

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

塩川 雅広 (SHIOKAWA Masahiro)

京都大学・医学研究科・医員

研究者番号 : 50737880