

令和元年6月14日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K09510

研究課題名(和文) IgG4関連疾患の炎症性単球発現分子および免疫グロブリン対応抗原の同定

研究課題名(英文) Inflammatory monocytoid expression and epitope cloning of immunoglobulin in patients with IgG4-related disease

研究代表者

正木 康史(MASAKI, Yasufumi)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：40238895

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：IgG4関連疾患の治療の多施設共同前方視治療研究を行った。確診群44例では、完全寛解29例(65.9%)、全奏成功率93.2%で、脱落以外の全例100%でステロイドが奏功した。病因病態解析としてのファージ・ディスプレイ型ランダム・ペプチド・ライブラリーによる発現クローニングでは、8種類の患者血清反応性クローンが得られたが、反応クローンは現時点では分析不可能であった。IgG4関連疾患の組織では、リンパ濾胞胚中心部の濾胞樹状細胞がCD14を発現し、その他の疾患ではこの所見は認めなかった。この所見が、IgG4関連疾患の病態形成において重要な鍵を握っていると考え解析を継続している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

IgG4関連疾患は21世紀に入り日本より発信された疾患であるが、鑑別診断が極めて重要であり、診断さえ確定であれば中等量ステロイド治療が有効である事が示された。また、IgG4関連疾患の病因病態として近年幾つかの自己抗原が同定されているが、それだけで全ての本疾患の病態を説明するのは不可能である。増加している多クローン性のガンマグロブリンの反応エピトープが判明すれば別な意味での病因論が展開できる。また本疾患においてCD14陽性濾胞樹状細胞が組織の病態形成において重要な可能性が示され、ここを標的とした治療の開発も期待できる。

研究成果の概要(英文)：We conducted a multicenter phase II prospective clinical trial of glucocorticoid for patients with untreated IgG4-related disease. Of the 44 patients with definite IgG4-RD, 29 (65.9%) achieved CR, and the ORR was 93.2%. No patient was refractory to primary treatment. By phage displayed random peptide assay, we got 8 clone that react to patients' serum, however further analysis of reactive clone was failed. Pathological findings of tissue samples from patients with IgG4-RD (N=22), reactive hyperplasia (N=3), multicentric Castlemans disease (N=3), and Sjogrens syndrome (N=13) were analyzed. CD14-positive lymphoid follicles were observed only in patients with IgG4-RD, and CD14-positive cells were identified as follicular dendritic cells by multicolor immunohistochemistry. The presence of CD14+ follicular dendritic cells in lymphoid follicles may play a pathophysiological role in IgG4-RD.

研究分野：血液内科学、免疫学

キーワード：濾胞樹状細胞 CD14 リンパ濾胞形成 ファージディスプレイ ランダムペプチドライブラリー 多クローン性高ガンマグロブリン血症 多施設共同研究

1. 研究開始当初の背景

2001年に報告された自己免疫性膵炎の高IgG4血症(Hamano H, et al. *N Engl J Med* 2001;344:732)および病変組織におけるIgG4陽性形質細胞増多の報告以後、同様の所見は全身の様々な疾患で報告され、IgG4関連疾患として知られるようになった。

我々は日本シェーグレン症候群学会のメンバーを中心として、IgG4関連疾患(Mikulicz病など)とSjögren症候群の非同源性を議論し、後方視的に多施設調査研究を行った。多数例が登録され150症例をIgG4関連疾患と診断した。その結果、IgG4関連疾患は典型的Sjögren症候群と対比すると、(1)自覚症状としての眼乾燥、口腔乾燥、関節痛の頻度が少なく、合併症としてのアレルギー性鼻炎、気管支喘息の頻度が有意に高い。(2)リウマトイド因子、抗核抗体などの自己抗体は1/4程度の症例にのみ陽性で、抗SS-A抗体、抗SS-B抗体などの疾患特異的自己抗体はほぼ陰性で、血清中のIgG、IgG2、IgG4、IgEが有意に高い。(3)組織学的にIgG4+形質細胞浸潤が著明で(IgG4+/IgG+>40%以上)、リンパ濾胞を形成しやすく、特徴的な硬化性病変/線維化(花筵様線維化)や閉塞性静脈炎が認められ、リンパ上皮性病変(LEL)は稀である。(4)ステロイド治療が著効する。

IgG4関連疾患では、血清と組織のIgG4増加が特徴的ではあるが、増加しているIgG4自体は多クローン性であることから、IgG4自体は根本的な病因ではなく更に上流の異常が存在すると考えられている。サイトカインバランスのTh2、Treg優位が明らかとなっているが、それらの上流を制御する本疾患の根本的な原因はまだ明らかとなっていない。そこで我々はその上流の異常が単球・マクロファージ系にある可能性を探り、本疾患のみが炎症性単球がリンパ濾胞に存在するという分布異常を見いだした。その単球の発現するサイトカインやケモカインを検索する必要があった。

また、本疾患において増加する免疫グロブリンの対応抗原については、イタリアのグループが自己免疫性膵炎を対象として検索し、*H.pylori*関連蛋白PBP等を報告している(*N Engl J Med* 2009;361:2135)が、彼らの使用したサンプルはI型(IgG4関連)/II型(好中球病変)自己免疫性膵炎の混在した雑多なものであり、本邦の追試では*H.pylori*関連蛋白PBPに対する抗体の優位性は確認されていない。我々はより純粋なIgG4関連疾患の血清を用いて検討し、より根本的な病因を探索する。

さらには、IgG4関連疾患の治療については、それまで後方視的な研究のみであり、IgG4関連疾患症例の多い本邦より、前向き研究にてエビデンスを創生する必要があった。

2. 研究の目的

(1) 組織マイクロダイセクション 遺伝子発現解析

IgG4関連疾患の病変組織の特徴が、IgG4陽性形質細胞増多、リンパ濾胞過形成、線維化である点に着目し、これらを引き起こす病因の一部が、単球/マクロファージあるいは樹状突起細胞にあると仮定し病理組織学的に検討した。その結果、IgG4関連疾患の典型的な組織では、リンパ濾胞の胚中心部にCD14陽性細胞が存在するが、その他の疾患(反応性リンパ節腫大、多中心性Castleman病、シェーグレン症候群)では、CD14陽性細胞のリンパ濾胞への分布は全く認められなかった。また興味深い事に、同一組織中にもCD14陽性の濾胞と陰性の濾胞が混在して認められた。そこで本研究では更にCD14の陽性細胞の起源を免疫二重染色を行い同定する。

(2) ランダム・ペプチドライブラリーによる血清中IgG抗体の認識エピトープの発現クローニング

本疾患では多クローン性高グロブリン血症が認められ、病変局所で著明なリンパ球・形質細胞浸潤が認められリンパ濾胞も形成されるなど、局所における免疫反応が著明に活性化されていることから、産生される免疫グロブリンの反応エピトープを探る事により病因に迫れる可能性がある。そこで我々は、IgG4関連疾患症例のプール血清を用いて、ランダム・ペプチド・ライブラリーを用いたファージ・ディスプレイによる発現クローニングを行い、血清に反応するペプチドをクローニングする。得られたペプチドの構造解析により、より純粋なIgG4関連疾患の病因解析が期待される。

3. 研究の方法

病理組織検体に対して、単球系、マクロファージ系、濾胞樹状細胞系等を染色する各種抗体を用いて免疫組織染色を行なう。必要に応じて二重染色も併用する。

また、本疾患患者検体のプール血清に対して、ファージ・ディスプレイ型のランダム・ペプチド・ライブラリーを反応させ、発現クローニングにて反応クローンを得る。

(1) 組織マイクロダイセクション 遺伝子発現解析

血清と病理所見から診断が確実なIgG4関連疾患、およびコントロールとして反応性リンパ節炎(リンパ濾胞過形成)や多中心性Castleman病の組織で免疫組織染色を行ない、炎症性単球(CD14)、M1マクロファージ(CD68+, CD163-)、M2マクロファージ(CD163+)、濾胞樹状細胞(CD21)などの細胞局在を確認する。

(2) ランダム・ペプチドライブラリーを用いた血清中IgGの認識抗体に対する発現クローニング

本疾患患者検体のプール血清に対して、ファージ・ディスプレイ型ランダム・ペプチド・ライブラリー (PhD-12/7; New England BioLab) を反応させパニングし、発現クローニングを行う。反応クローンのシークエンスをデータベース検索する事により、患者血清中の IgG 抗体が反応する抗原の候補が得られる可能性がある。得られた候補に対して、各患者血清が反応するかどうかを、ELISA, Western blot などにて検証する。本研究は研究協力者の伊藤邦彦教授 (静岡県立大学) と共同研究した。

(3) IgG4 関連疾患症例に対するステロイド治療についての多施設共同前方視研究

本疾患患者を全国的に前方視登録し、中等量ステロイド 0.6mg/kg/日を初期投与量とし、そこから漸減維持療法を行う多施設共同研究を行った。

4. 研究成果

IgG4 関連疾患の治療については、多施設共同前方視治療研究を行い、ミクリツ病を含む IgG4 関連疾患のステロイド治療の奏効率、有害事象などにつき検討した。5年間で57例の登録予定で開始したが、4年間で61例の登録があり終了となった。臨床病理中央診断の結果、確診群は44例であり、準確診1例、疑診13例、否定3例であった。3例の脱落例を認めた。確診群44例では、完全寛解29例(65.9%)、全奏効率93.2%であった。特筆すべきは脱落以外の全例100%でステロイドが奏功した事である。prednisolone 維持投与量の中央値は7mg/day(平均6.8mg)であった。本試験の結果を論文化し、前方視研究で得られた知見を元に症例蓄積を継続している。

IgG4 関連疾患の Th2, Treg 優位の上方の異常がリンパ球系以外の細胞の産生するサイトカインやケモカイン等にあると仮定し、病理組織学的に単球/マクロファージあるいは樹状突起細胞の存在と分布を検討した。IgG4 関連疾患の典型的な組織では、リンパ濾胞胚中心部に CD14 陽性細胞が存在するが、その他の疾患では、CD14 陽性細胞のリンパ濾胞への分布は全く認められなかった。この CD14 陽性細胞は濾胞樹状細胞 (CD21) との二重染色の結果、濾胞樹状細胞が CD14 を発現していると結論した。この所見が、IgG4 関連疾患の病態形成において重要な鍵を握っていると考え、更にこれを深く追求する事とし、単球/マクロファージと、T細胞、B細胞、濾胞樹状細胞、PD-1, PD-1L などの免疫染色を追加し検索している。

病因病態解析としてのファージ・ディスプレイ型ランダム・ペプチド・ライブラリーによる発現クローニングでは、8種類の患者血清反応性クローンが得られたが、クローンのアミノ酸解析で既知のアミノ酸配列に相同性が乏しく、反応クローンは現時点では分析不可能であった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計12件)

Masaki Y, Matsui S, Saeki T, Tsuboi H, Hirata S, Izumi Y, Miyashita T, Fujikawa K, Dobashi H, Susaki K, Morimoto H, Takagi K, Kawano M, Origuchi T, Wada Y, Takahashi N, Horikoshi M, Ogishima H, Suzuki Y, Kawanami T, Kawanami Iwao H, Sakai T, Fujita Y, Fukushima T, Saito M, Suzuki R, Morikawa Y, Yoshino T, Nakamura S, Kojima M, Kurose N, Sato Y, Tanaka Y, Sugai S, Sumida T. A multicenter phase II prospective clinical trial of glucocorticoid for patients with untreated IgG4-related disease. *Mod Rheumatol*. 2017 Sep;27(5):849-854. 査読有
doi: 10.1080/14397595.2016.1259602.

正木康史. IgG4 関連疾患の治療. *日医雑誌* 147(2):255-259,2018 査読有

正木康史. IgG4 関連疾患: 内科の立場から「教育セミナー3 IgG4 関連疾患 耳鼻咽喉科と内科の立場から」*口咽科* 31(1)77-81,2018 査読有

河南崇典、河南(岩男)悠、正木康史. IgG4 関連疾患のプロテオーム解析. *臨床免疫・アレルギー科* 67(4):343-348,2017

正木康史、藤本信乃、河南(岩男)悠、坂井知之、河南崇典、藤田義正、川端 浩、福島俊洋. IgG4 関連疾患に対する治療: 前方視的臨床研究を中心に. *臨床リウマチ* 29:140-146,2017

正木康史. 新たな指定難病としての IgG4 関連疾患. *臨床免疫・アレルギー科* 65(1):28-34,2016

正木康史. (特集; IgG4 関連疾患の病因・病態を考える) IgG4 関連リンパ節炎から 分子リウマチ治療 *9(1):17-20,2016*

正木康史. IgG4 関連疾患の管理と治療における国際コンセンサス -日本人臨床医にも妥当で有用か? - *リウマチ科* 55(2):221-226,2016

正木康史. IgG4 関連疾患の治療の最前線- 日米における診断と治療の違いを中心に. *医学のあゆみ* 258(3)217-222,2016

正木康史、黒瀬 望. IgG4 関連疾患と間違っはいけない疾患. *肝胆膵* 73(4):585-590,2016

正木康史、藤本信乃、河南(岩男)悠、坂井知之、河南崇典、藤田義正、川端 浩、福島俊洋. IgG4 関連疾患の診断と治療. *金医大誌* 41:67-72,2016

正木康史. IgG4 関連疾患をどのように治療しているか. *アレルギーの臨床* 36(13):(1255)41-(1258)44,2016

〔学会発表〕(計2件)

正木康史．第57回日本臨床検査医学会東海・北陸支部総会、第336回日本臨床化学会東海・北陸支部例会 連合大会「多クローン性高ガンマグロブリン血症を呈する疾患の鑑別～IgG4関連疾患、多中心性Castleman病など～」2018年3月11日 金沢

正木康史．第30回日本口腔・咽頭科学会総会・学術講演会 教育セミナー「IgG4関連疾患耳鼻咽喉科と内科の立場から 2．内科の立場から」2017年9月7日 金沢

〔図書〕(計2件)

「改訂第3版ステロイドの選び方・使い方ハンドブック」 山本一彦編集．羊土社(東京都) 2018年3月25日 第2部 各疾患別ステロイドの使い方 正木康史 2．血液疾患 pp113-139

シェーグレン症候群の診断と治療マニュアル 改訂第3版.(日本シェーグレン症候群学会編集、竹内 勤、川上 純、住田孝之監修)診断と治療社(東京) 正木康史
第4章 臨床症状 2 腺外症状 1) 血液リンパ増殖性病変 p117-122
第4章 臨床症状 5 IgG4関連疾患 1) 診断 p178-186

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計1件)

名称：IgG4関連疾患診断用マーカー及びその利用

発明者：正木康史、石垣靖人

権利者：同上

種類：特許

番号：特許第5704684号

取得年月日 平成31年3月5日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

6．研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：河南 崇典

ローマ字氏名：KAWANAMI, Takafumi

所属研究機関名：金沢医科大学

部局名：医学部

職名：講師

研究者番号(8桁)：20350762

(2)研究協力者

研究協力者氏名：伊藤 邦彦(静岡県立大学)

ローマ字氏名：ITO, Kunihiko

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。