

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K09999

研究課題名(和文) IgG4関連疾患における自然免疫の役割と新規治療ターゲットの探索

研究課題名(英文) The Role of Innate Immunity in IgG4-Related Diseases and the Search for Novel Therapeutic Targets

研究代表者

山田 和徳 (YAMADA, Kazunori)

金沢医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90397224

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：IgG4関連疾患患者の唾液腺組織において、Galectin-3は炎症部位に発現しており、M2マクロファージから産生されていると考えられた。

LAT Y136F knock-in miceの腎臓を用いてTLR-9の発現を確認したところ、TLR-9は炎症部位に一致し発現していることを確認した。次に、同マウスにTLR-9アゴニストであるCpG-ODNを投与し、Th1へ免疫反をシフトすることにより、病変が軽快するか検討した。その結果、6週齢からCpG-ODNを投与したところ、肺病変の進行が抑制された。一方、9週齢からCpG-ODNを投与したところ肉芽の形成を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

IgG4関連疾患における自然免疫の関与については、これまでも報告されているが、今回Gal-3やTLR-9もIgG4関連疾患の病態形成に何らの影響を与えている可能性が示唆された。今後、新規薬剤のターゲットの候補分子としての基礎となるデータを得た点が学術的意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In salivary gland tissues from patients with IgG4-related diseases, galectin-3, produced by M2 macrophages, is expressed at inflammation sites. It was confirmed that TLR-9 expression coincided with sites of inflammation in the kidneys of LAT Y136F knock-in mice. Thereafter, CpG oligodeoxynucleotides (CpG-ODN), a TLR-9 agonist, were administered to the mice to determine if the lesions could be alleviated by shifting the immune response to a Th1 response. The results demonstrated that administration of CpG-ODN from the age of 6 weeks suppressed the progression of lung lesions. However, when CpG-ODN was administered from the age of 9 weeks, the formation of granulomas was observed.

研究分野：リウマチ・膠原病内科

キーワード：IgG4関連疾患 自然免疫 Toll-like receptor-9 Galectin-3

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

IgG4 関連疾患 (IgG4-RD) は、血清 IgG4 高値、病変への IgG4 陽性細胞浸潤、Th2 優位の免疫反応、線維化を特徴とする全身性炎症性疾患である。しかしながら、IgG4-RD の病態は依然として不明な点が多い。近年、自己免疫性膵炎において Toll-like receptor (TLR) を介した自然免疫の関与が報告されているが、他の臓器病変においては明らかでなく、IgG4-RD における自然免疫の意義については未だ十分解明されていない。IgG4-RD の病態の解明には自然免疫の関与について明らかにする必要があったと考えた。申請者らは自然免疫に関連する分子として、TLR と galectin-3 (Gal-3) に着目した。

Gal-3 は β -ガラクトシドに特異的に結合するレクチンである。Gal-3 は線維芽細胞やマクロファージに作用し、直接および間接的に線維化に関与していることが知られている。Gal-3 は、心臓、肝臓、腎臓、肺の線維化との関連や慢性心不全における予後のマーカーとして最近注目されている。一方、TLR は自然免疫においてウイルスや細菌の構成成分を認識し、生体防御応答を惹起するパターン認識レセプターである。また、TLR3、4、5 および 9 は Th1 優位の、TLR2 は Th2 優位の免疫反応を惹起することが知られている。この中でも、これまで検討されていない TLR-9 に着目した。

申請者らは Th2 免疫反応および全身性のリンパ形質細胞浸潤を自然発症する Lat Y136F knock-in mice が、新規の IgG4-RD のモデル動物であることを報告しており (PLoS One, 2018 Jun 14; 13(6):e0198417)、モデルマウスを用いた検討が可能である。そこで、IgG4-RD 患者および Lat Y136F knock-in mice を用いることで、IgG4-RD における Gal-3 の意義の検討ならびに TLR を介した自然免疫の役割の解明を行うことを目的とした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、Gal-3 および TLR-9 を介した免疫異常の解明を行い、IgG4-RD における自然免疫の役割の解明と新規治療ターゲットの探索を行うことである。

3. 研究の方法

(1) IgG4-RD 患者の唾液腺における Gal-3 の発現の検討

Rabbit anti-human, mouse galectin-3 (Santa Cruz; sc-20157) を用いて、IgG4-RD 患者の唾液腺組織における Gal-3 の発現を検討した。

(2) Lat Y136F knock-in mice における血清 Gal-3 濃度の評価

Lat Y136F knock-in mice およびコントロールマウスの血清を用い、ELISA 法で血清中の Gal-3 濃度の評価を行った。

(3) Lat Y136F knock-in mice における TLR-9 の発現の検討

Rabbit Anti-TLR9 antibody (abcam; ab37154) を用い、6-12 週齢の Lat Y136F knock-in mice の肺組織における TLR-9 の発現を評価した。

(4) Lat Y136F knock-in mice に TLR-9 アゴニストの投与

TLR-9 のアゴニストである CpG-ODN を Lat Y136F knock-in mice に経静脈的に投与して Th1 反応を誘導し、肺および脾臓の病変に変化があるかどうか検討した。Lat Y136F knock-in mice は 4 週齢より病変が出現するため、病変が比較的早期の段階である 6 週齢で CpG-ODN を投与する実験と病変が進行した 9 週齢で CpG-ODN を投与する実験を行った。

6 週齢または 9 週齢の Lat Y136F knock-in mice およびコントロールマウスに CpG-ODN 50 μ g 経静脈的に単回投与し、それぞれ 10 週齢、12 週齢で肺組織を評価した。

4. 研究成果

(1) IgG4-RD 患者の唾液腺における Gal-3 の発現の検討

IgG4-RD 患者の唾液腺組織を用いて、Gal-3 の発現および産生細胞についての評価を行った結果、Gal-3 は炎症部位に発現していた。また、Gal-3 は CD163 陽性 M2 マクロファージと共発現していた。すなわち、M2 マクロファージが Gal-3 産生細胞のひとつであることが示唆された。

(2) Lat Y136F knock-in mice における血清 Gal-3 濃度の評価

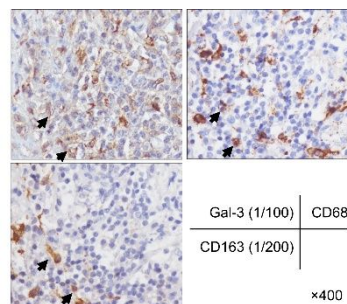


図1 唾液腺におけるGal-3の発現
IgG4関連疾患患者の唾液腺において、Gal-3の発現を認めた。さらにGal-3はCD68、CD163陽性細胞との共発現が見られた。

次に LAT Y136F knock-in mice 血清中の Gal-3 濃度を測定した。LAT Y136F knock-in mice およびコントロールマウスの血清 Gal-3 濃度はそれぞれ、 65.3 ± 43.2 ng/ml、 53.8 ± 12.5 ng/ml ($p=0.905$)であり、有意差は認めなかった。これらより、IgG4-RDにおいて、血清中の Gal-3 濃度に差はないが、病変局所での Gal-3 の発現が亢進している可能性が示唆された。

(3) Lat Y136F knock-in mice における TLR-9 の発現の検討

IgG4-RD では、Th2 優位の免疫反応が惹起されていることが知られている。CpG-ODN は TLR9 と MyD88 依存性に Th1 反応 (IgG2a, IgG2b, IgG3) を誘導し Th2 反応 (IgG1, IgE) を抑制することが知られていることから、我々は IgG4-RD における TLR-9 の役割について着目した。免疫染色にて LAT Y136F knock-in mice の腎臓を用いて TLR-9 の発現を確認したところ、TLR-9 は炎症部位に一致し発現していることを確認した。

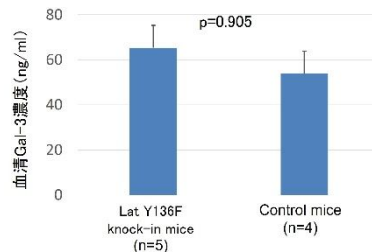


図2 Lat Y136F knock-in miceにおける血清Gal-3濃度
Lat Y136F knock-in miceにおいて、血清Gal-3濃度はコントロールマウスと比較して有意な上昇を認めなかった。

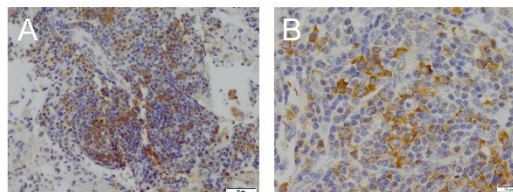


図3 LAT Y136F knock-in miceの肺組織におけるTLR-9の発現
病変部に一致し、TLR-9の発現が見られた。A; x40, B: x200。

(4) Lat Y136F knock-in mice に TLR-9 アゴニストの投与

次に、LAT Y136F knock-in mice に TLR-9 アゴニストである CpG-ODN を投与し、Th1 へ免疫反応をシフトすることにより、病変が軽快するか検討した。その結果、6 週齢の早期の段階で CpG-ODN を投与した場合、一部のマウスでは肺病変の軽減がみられたが、一部で肺胞内にマクロファージが多数浸潤している部位が認められた。一方、9 週齢で CpG-ODN を投与したマウスにおいては、脾臓に肉芽形成を認めた。

これらの結果より、CpG-ODN の投与時期により、炎症の軽減と肉芽形成という異なる反応が見られた。IgG4-RD における TLR-9 の意義については、さらに条件設定を変更して解析する必要があると考えられた。

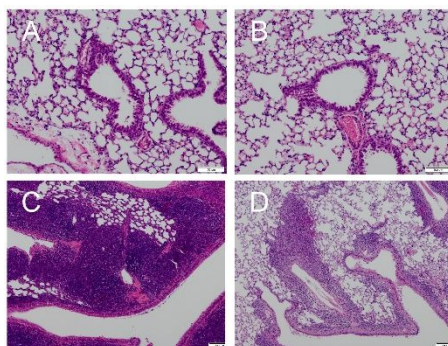


図4 TLR-9アゴニスト投与による肺病変の変化
6週齢よりTLR-9アゴニストであるCpG-ODNを投与した。コントロールマウスでは、PBS(A)、CpG-ODN(B)の投与で変化は見られなかった。一方、LAT Y136F knock-in miceにおいては、PBSを投与したマウス(C)と比較して、CpG-ODNを投与したマウス(D)では病変が軽度であった。コントロールマウス(A、B)、LAT Y136F knock-in mice(C、D)。x40。

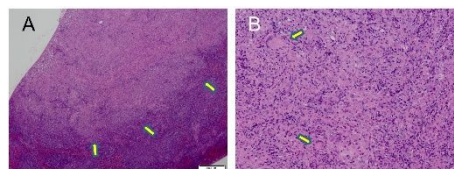


図5 TLR-9アゴニスト投与による脾臓での肉芽形成
9週齢のLAT Y136F knock-in miceにCpG-ODNを投与し、12週齢で評価した。一部のマウスで、脾臓に肉芽形成を認めた。A: x40, B: x200。

(5) まとめ

IgG4-RD において、Gal-3 や TLR-9 の病変部位の発現亢進が見られたことから、IgG4-RD の病態形成に関与している可能性が示唆された。TLR-9 のアゴニストの投与により、LAT Y136F knock-in mice の免疫状態を Th2 から Th1 へシフトする実験においては、さらなる条件設定が必要と考えられ、今後の課題としたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 14件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Waseda Yuko, Yamada Kazunori, Mizuguchi Keishi, Ito Kiyooki, Watanabe Satoshi, Zuka Masahiko, Ishizuka Tamotsu, Malissen Marie, Malissen Bernard, Kawano Mitsuhiro, Matsui Shoko	4. 巻 16
2. 論文標題 The pronounced lung lesions developing in LATY136F knock-in mice mimic human IgG4-related lung disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0247173	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Waseda Y, Yamada K, Mizuguchi K, Ito K, Watanabe S, Zuka M, Ishizuka T, Malissen M, Malissen B, Kawano M, Matsui S.	4. 巻 Mar 4; 16 (3)
2. 論文標題 The pronounced lung lesions developing in LATY136F knock-in mice mimic human IgG4-related lung disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0247173. eCollection 2021.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamada Kazunori, Zuka Masahiko, Ito Kiyooki, Mizuguchi Keishi, Kakuchi Yasushi, Onoe Tamehito, Suzuki Yasunori, Yamagishi Masakazu, Izui Shozo, Malissen Marie, Malissen Bernard, Kawano Mitsuhiro	4. 巻 13
2. 論文標題 LatY136F knock-in mouse model for human IgG4-related disease	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0198417
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0198417	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamada K, Yamamoto M, Saeki T, Mizushima I, Matsui S, Fujisawa Y, Hara S, Takahashi H, Nomura H, Kawa S, Kawano M.	4. 巻 19
2. 論文標題 New clues to the nature of immunoglobulin G4-related disease: a retrospective Japanese multicenter study of baseline clinical features of 334 cases.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Arthritis Res Ther	6. 最初と最後の頁 262-271
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13075-017-1467-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 本田文香、坪井洋人、安倍沙織、高橋広行、伊藤清亮、山田和徳、川野充弘、近藤裕也、松本功、住田孝之
2. 発表標題 IgG4関連疾患モデルマウス（LATマウス）におけるCCL8-CCR8経路の病態形成での役割と治療標的の可能性
3. 学会等名 第65回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	塚 正彦 (ZUKA Masahiko) (00272956)	金沢大学・医学系・教授 (13301)	
研究分担者	伊藤 清亮 (ITO Kiyooki) (10467110)	金沢大学・附属病院・医員 (13301)	
研究分担者	川野 充弘 (KAWANO Mitsuhiro) (20361983)	金沢大学・附属病院・講師 (13301)	
研究分担者	水島 伊知郎 (MIZUSHIMA Ichiro) (50645124)	金沢大学・附属病院・助教 (13301)	
研究分担者	原 怜史 (HARA Satoshi) (80749820)	金沢大学・医学系・助教 (13301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------