

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16149

研究課題名(和文) IgG4関連疾患の抗原同定

研究課題名(英文) research for antigen of IgG4 related disease

研究代表者

塩川 雅広 (SHIOKAWA, MASAHIRO)

京都大学・医学研究科・特定病院助教

研究者番号：50737880

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的であった ラミニン511抗体陰性AIP例における自己抗原の同定、AIP以外のIgG4関連疾患における自己抗原の同定、同定自己抗原のマウスへの免疫による病変誘導の確認はそれぞれ、ラミニン511抗体陰性AIP例におけるインテグリン 6 1抗体陽性AIP患者の発見、IgG4関連腎疾患におけるラミニン 2自己抗体陽性患者の発見、インテグリン 6 1のマウスへの免疫による膵障害の誘導、更にインテグリン 6 1抗体陽性AIP患者は悪性腫瘍の合併が多いという結果からバイオマーカーになりうるという研究成果から、成果は十分にあったと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに、IgG4関連疾患において、病因をなす抗原を同定しているのは、申請者のグループのみであり極めて学術的意義がある。本研究において、さらなるAIPの自己抗原、加えて他のIgG4関連疾患の自己抗原が同定できれば、病態の解明のみならず、特異的な診断、治療に貢献でき、大きな発展性・創造性・社会的意義がある。更に、IgG4関連疾患の一つである、IgG4関連肺疾患やIgG4関連腎疾患などは、現在原因不明の特発性間質性肺炎や糸球体腎炎などと、画像所見や病理所見が共通するところも多く、これらの抗原同定のきっかけになる可能性もあり、大きな創造性も有している。

研究成果の概要(英文)：The objectives of this study were (1) identification of autoantigens in laminin 511 antibody-negative AIP cases, (2) identification of autoantigens in IgG4-related diseases other than AIP, and (3) confirmation of lesion induction by immunization of the identified autoantigens in mice. In this research, we found the results as follows: Discovery of integrin 6 1 antibody-positive AIP patients without laminin 511 antibody, discovery of laminin 2 autoantibody-positive patients in IgG4-related renal disease, induction of pancreatic disorder by immunization of integrin 6 1 mice in mice, and integrin 6 1 antibody-positive AIP patients with malignant tumors, suggesting that it could be a biomarker for malignancy. These results are considered to be sufficient for the first objectives.

研究分野：自己免疫疾患

キーワード：自己抗原 自己抗体 IgG4 自己免疫性膵炎 IgG4関連疾患

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

IgG4 関連疾患は、その Hallmark である血清 IgG4 高値の発見に端を発し、全身性疾患としての IgG4 関連疾患包括診断基準の策定に至るまで、わが国を中心にその概念が確立された新しい疾患である。病態に自己免疫の関与が指摘されているが、その自己抗原・自己抗体は不明であり、病態に基づいた疾患特異的バイオマーカーの発見が課題となっていた。最近、申請者は IgG4 関連疾患の膵病変である自己免疫性膵炎 autoimmune pancreatitis (AIP) の患者血清を用い、その病因となる自己抗原ラミニン 511 を同定した。しかし、特異度は 98% と十分であるが、感度は 51% であり、同自己抗原陽性例は約半数のみである。本研究では、ラミニン 511 抗体陰性 AIP 患者、さらには IgG4 関連疾患の膵外病変の罹患患者における自己抗原同定を目的とする。自己抗原の解明は、正確な診断、疾患活動性のバイオマーカー、更には副作用の少ない特異的な治療開発につながると考えらえる

2. 研究の目的

AIP におけるラミニン 511 以外の自己抗原を同定する。

AIP 以外の IgG4 関連疾患 (IgG4 関連膵炎・唾液腺炎、IgG4 関連腎疾患など) における自己抗原を同定する。

3. 研究の方法

ラミニン 511 抗体陰性 AIP 例における自己抗原の同定

AIP 以外の IgG4 関連疾患における自己抗原の同定

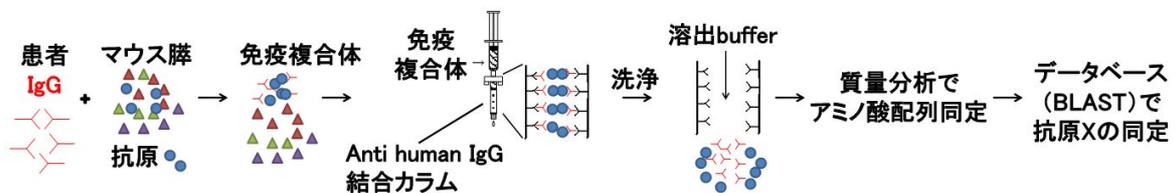
同定自己抗原のマウスへの免疫による病変誘導の確認

自己抗体測定による IgG4 関連疾患の診断・病型分類・治療効果判定における有用性を検討、および新たな診療体系の確立

ラミニン 511 抗体陰性 AIP 例における自己抗原の同定

-1 ラミニン 511 抗体陰性 AIP 患者 IgG に結合する膵タンパク質の解析

免疫沈降法によりヒト膵臓サンプルから患者 IgG に結合するタンパク質を抽出し、質量分析によるアミノ酸配列を解析、患者 IgG が結合する抗原候補を同定する(下図)。ラミニン 511 抗体

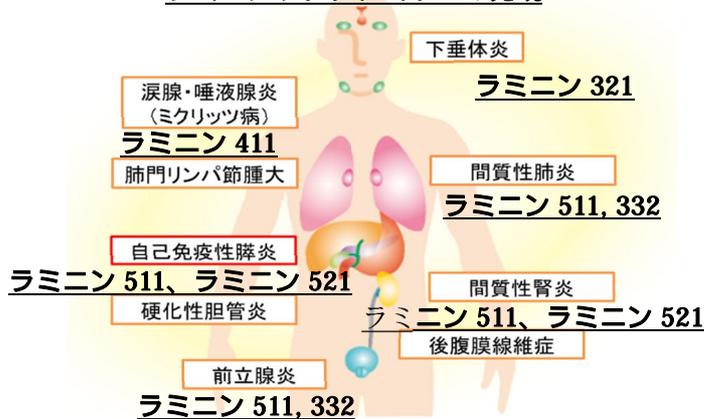


陰性 AIP は優位に膵頭部病変が多く、サンプルは膵頭部病変を使用する。同定した抗原候補は ELISA を用いて、自己抗体を有するか validation する。

-2 ラミニン 511 のサブファミリーもしくは、ラミニン 511 に結合する蛋白に対する ELISA 法によるスクリーニング

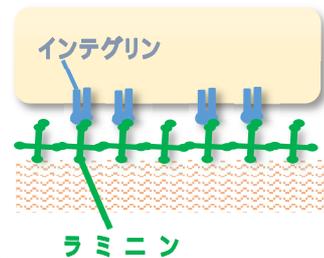
ラミニン 511 に結合する蛋白質はインテグリンなど数種類報告されている(下図)。また、ラミニン 511 はサブファミリーがこれまで 18 種類報告されている。これらの蛋白について、患者血清中の自己抗体の有無について ELISA にて解析する。

IgG4 関連疾患臓器と ラミニンサブファミリーの発現



-3 ラミニンの修飾による抗原の出現の検討

ラミニンは細胞外においてエラスターゼなどの酵素などにより、切断された状態で存在していることが知られている。実際、ヒト膵臓でも尾部と頭部でラミニン 511 の切断の状態が異なることを確認している。これらによって抗原性が異なることは十分に考えられ、既知の酵素でラミニンを処理し(同じ酵素でも条件によって切れ方が異なることも知られている)、抗原性の出現について検証する。



AIP 以外の IgG4 関連疾患における自己抗原の同定

AIP 以外の IgG4 関連疾患の抗原の同定を、の方法で行う。特にラミニンの発現は、臓器ごとに右図のようになっており、関連がある可能性が十分に考えられる。また、マウスではラミニン 511 の切断の状態が各臓器で異なることも確認しており、同一のラミニンでも切断の状態により各臓器の抗原性が異なることも考えられる。

同定自己抗原のマウスへの免疫による病変誘導の確認

申請者は、ラミニン 511 をマウスに免疫し、AIP に合致する病変を誘導できる系を確立している。同様に、で検出された自己抗原をマウスに免疫し、患者さんと同様の罹患臓器に病変を誘導するか確認する。これにより、病因をなす抗原であるかの確認が可能となる。

自己抗体測定による IgG4 関連疾患の診断・病型分類・治療効果判定における有用性を検討、および新たな診療体系の確立

IgG4 関連疾患において、その特徴である血清 IgG4 高値は必ずしも病勢を反映するものではなく、病態に基づいた疾患バイオマーカーが望まれてきた。本研究で発見された IgG4 関連疾患の自己抗原に対する自己抗体を測定し、IgG4 関連疾患の診断・病型分類・治療効果予測・方針決定・治療効果判定における、その臨床的有用性について評価する。

4. 研究成果

ラミニン 511 抗体陰性 AIP 例における自己抗原の同定

申請者は、ラミニン 511 結合タンパクであるインテグリン $\alpha 6 \beta 1$ に、一部の AIP 患者（ラミニン 511 自己抗体陰性例 28 例中 5 例）が自己抗体を有していることを発見した（下表）。また、興味深いことに、すべてのインテグリン $\alpha 6 \beta 1$ 自己抗体陽性例は、膵尾部の中央に病変を認め、画像所見が全例で酷似していた。更に、インテグリン $\alpha 6 \beta 1$ 自己抗体陽性 5 例中、3 例で悪性腫瘍（胃癌と肺癌）の合併を認めた。更に、同腫瘍の免疫染色では、インテグリン $\alpha 6 \beta 1$ の発現を認めた。また、インテグリン $\alpha 6 \beta 1$ をマウスに免疫すると膵臓に障害を認めた。これらから悪性腫瘍が発現するインテグリン $\alpha 6 \beta 1$ を自己抗原として、悪性腫瘍が AIP を起こしている paraneoplastic syndrome の可能性が考えられた。

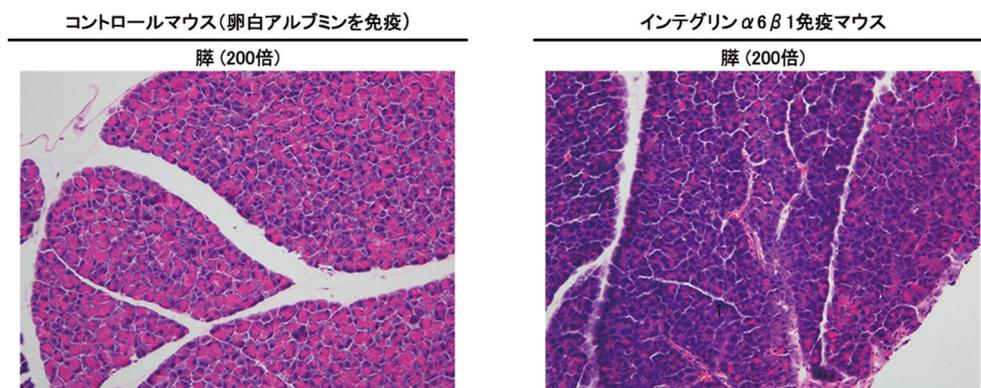
	抗ラミニン 511 抗体陽性	各抗体陰性	抗インテグリン $\alpha 6 \beta 1$ 抗体陽性
AIP 症例数	32	23	5
悪性腫瘍の合併	0 (0%)	6 (26%)	3 (60%)

AIP 以外の IgG4 関連疾患における自己抗原の同定

IgG4 関連腎疾患患者では、ラミニン 521 に対する自己抗体を認め、IgG4 関連腎疾患の自己抗原の可能性が考えられた。また、ラミニンの中のラミニン $\alpha 2$ に抗原があることも判明した。ラミニン $\alpha 2$ 欠損症の患者は、腎障害を生じることから、ラミニン $\alpha 2$ に対する自己抗体が腎障害を有するのは、十分説明ができると考えられた。

同定自己抗原のマウスへの免疫による病変誘導の確認

インテグリン $\alpha 6 \beta 1$ が真の (primary) 抗原であるかを検証するために、インテグリン $\alpha 6 \beta 1$ をアジュバントと共にマウスに免疫したところ、膵臓のみに腺房細胞が明らかに小さくなるという病変が誘導された（下図、n=3）。コントロールの卵白アルブミン免疫マウスの膵臓では、異常を認めなかった。ヒト AIP でも、同様の所見は認める。しかし、同マウスでは AIP のような炎症細胞浸潤に乏しい。今後アジュバントや免疫するマウスの種類を変更し、AIP に合致するような所見を生じるか解析する。



自己抗体測定による IgG4 関連疾患の診断・病型分類・治療効果判定における有用性を検討、および新たな診療体系の確立

インテグリン 6 1 自己抗体は、paraneoplastic syndrome のマーカーとして、期待が持てる。更なる症例数を増やした解析を予定している。また、ラミニン 521 自己抗体も、IgG4 関連腎疾患のマーカーとして可能性を持つが、こちらも症例数を増やして解析する必要がある。また、唾液腺病変である、ミクリッツ病や、AIP の残りの 4 割の自己抗原も今回の研究では同定できなかった。更なる自己抗原の同定を進めることによって、臨床で使用できる診療体系の構築を目指したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Shiokawa M, Kodama Y, Sekiguchi K, Kuwada T, Tomono T, Kuriyama K, Yamazaki H, Morita T, Marui S, Sogabe Y, Kakiuchi N, Matsumori T, Mima A, Nishikawa Y, Ueda T, Tsuda M, Yamauchi Y, Sakuma Y, Maruno T, Uza N, Tsuruyama T, Mimori T, Seno H, Chiba T.	4. 巻 10
2. 論文標題 Laminin 511 is a Target Antigen in Autoimmune Pancreatitis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci Transl Med.	6. 最初と最後の頁 pii: eaaq0997
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/scitranslmed.aaq0997	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 Matsumori T, Shiokawa M, Kodama Y.	4. 巻 155
2. 論文標題 Pancreatic Mass with Elevated Serum IgG4 Level.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 30121-5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1053/j.gastro.2017.11.289.	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 Kato Y, Azuma K, Sameda H, Shiokawa M, Chiba T.	4. 巻 gutjnl-2018-317934.
2. 論文標題 Case of IgG4-associated sclerosing cholangitis with normal serum IgG4 concentration, diagnosed by anti-laminin 511-E8 antibody: a novel autoantibody in patients with autoimmune pancreatitis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Gut	6. 最初と最後の頁 2018-317934
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/gutjnl-2018-317934	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 塩川雅広、児玉裕三、妹尾浩、千葉勉
2. 発表標題 傍腫瘍症候群としての自己免疫性膵炎発症メカニズムの検討
3. 学会等名 JDDW2018
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 塩川雅広、児玉裕三、妹尾浩、千葉勉
2. 発表標題 自己免疫性膵炎の自己抗原同定に関する研究
3. 学会等名 第27回日本シェーグレン症候群学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 塩川雅広、児玉裕三、妹尾浩、千葉勉
2. 発表標題 自己免疫性膵炎の自己抗原同定に関する研究
3. 学会等名 第104回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2018年～2019年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 塩川雅広、児玉裕三	4. 発行年 2018年
2. 出版社 株式会社 ライフ・サイエンス	5. 総ページ数 5
3. 書名 Progress in Medicine	

1. 著者名 塩川雅広	4. 発行年 2018年
2. 出版社 先端医学社	5. 総ページ数 1
3. 書名 消化器病学サイエンス	

1. 著者名 塩川雅広、妹尾 浩、千葉勉	4. 発行年 2018年
2. 出版社 北隆館	5. 総ページ数 4
3. 書名 アレルギーの臨床	

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 潰瘍性大腸炎と原発性硬化性胆管炎患者における抗原の同定と同抗原に対する自己抗体の測定	発明者 塩川雅広、栗田威、妹尾浩、千葉勉、児玉裕三	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-000060	取得年 2020年	国内・外国の別 国内

〔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
---------	---------------------------	-----------------------	----