

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08345

研究課題名(和文) IgG4関連硬化性胆管炎の網羅的組織プロテオーム・リン酸化修飾解析

研究課題名(英文) Global phosphoproteome analysis of IgG4-related sclerosing cholangitis

研究代表者

全陽(Zen, Yoh)

神戸大学・医学研究科・特命教授

研究者番号：90377416

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：IgG4関連硬化性胆管炎の組織からタンパクを抽出し、網羅的なプロテオーム解析ならびにリン酸化修飾解析を行った。対照として用いた原発性硬化性胆管炎と比較すると、IgG4関連硬化性胆管炎は特徴的なリン酸化修飾パターンを示した。パスウェイ解析では、B細胞や免疫グロブリンに関連したシグナルが有意に活性化していた。個別のタンパクでは、FYN-binding proteinやallograft inflammatory factor-1が有意に発現亢進し、主としてM2型マクロファージに発現していた。これらの分子の発現は他臓器のIgG4関連疾患でも見られ、臓器を問わずIgG4関連疾患に特徴的と考えられた。

研究成果の概要(英文)：The tissue phosphoproteomic examination of IgG4-related sclerosing cholangitis (IgG4-SC) and primary sclerosing cholangitis (PSC) revealed that the expression profiles of phosphopeptides discriminated IgG4-SC from PSC better than those of non-phosphopeptides. In the pathway analysis, three immunological pathways activated in IgG4-SC appeared to be all B-cell- or immunoglobulin-related. On immunostaining, two highly up-regulated immunological markers in IgG4-SC were expressed mainly in M2-type macrophages, suggesting increased phagocytotic activity induced by the IgG-Fc-gamma receptor interaction. In addition, those molecules were also strongly expressed in other organ manifestations of IgG4-related disease. In conclusion, this study highlighted crucial roles of B cells and macrophages in IgG4-SC, and also identified potential tissue diagnostic markers for IgG4-related disease.

研究分野：人体病理学

キーワード：IgG4 硬化性胆管炎 プロテオーム リン酸化 自己免疫性膵炎 マクロファージ

## 1. 研究開始当初の背景

IgG4 関連疾患は自己免疫性膵炎から提唱された疾患概念で、膵臓だけでなく全身臓器に同様の病態が発生することが知られている。我々は、IgG4 関連硬化性胆管炎を含むいくつかの臓器病変を世界に先駆けて同定し、IgG4 関連疾患の概念確立に貢献してきた。また、IgG4 関連硬化性胆管炎の病態に関して、Th2 有意の免疫応答、制御性T細胞の活性化、CCL1-CCR8 反応が重要であることを報告してきた。同様の機序は唾液腺炎や間質性腎炎など他の臓器病変でも示され、IgG4 関連疾患に共通の特徴と認識されている。しかしながら、これまでの病態研究のほとんどは molecule targeted study である。つまり、重要と予想される分子を解析してきたにすぎない。そのようなアプローチでは、重要な分子を見逃している可能性がある。

以前、我々は組織プロテオームを網羅的に解析するワークフローを確立し、膵癌研究に応用した。この SysQuant と呼ばれる手法を用いて 30~100 mg の凍結組織を解析すると、約 5,000 のタンパクを同定・定量できるだけでなく、タンパクのリン酸化部位やリン酸化タンパクを定量することができる。リン酸化修飾はタンパクの機能面を反映するため、この手法を用いることでタンパク発現量だけでなく、タンパクの活性化状態を知ることができる。また、タンパクの相互関係を統計学的に処理することで、活性化しているシグナル伝達経路を推定できる。以前の研究では膵癌組織を解析したが、その研究をとおしてこの方法を IgG4 関連疾患に応用すれば molecule targeted study のセレクションバイアスを排除でき、重要な知見が得られるのではないかと発想するにいたった。

## 2. 研究の目的

本研究では、IgG4 関連硬化性胆管炎の凍結組織標本を用いて、タンパク発現とリン酸化修飾を網羅的に解析し、IgG4 関連疾患を特徴づける組織プロテオームを明らかにする。さらに、同定されたタンパクの組織中での局在臓器特異性、また病理診断への応用に関して検証研究を行う。

## 3. 研究の方法

(1) サンプル: IgG4 関連硬化性胆管炎 (n=4) と原発性硬化性胆管炎 (PSC; n=4) の外科的切除材料から採取した凍結組織を用いる。IgG4 関連硬化性胆管炎は膵頭十二指腸切除材料もしくは肝切除材料を、PSC 症例には移植時摘出肝を用い、肝外胆管もしくは肝門部胆管から凍結組織を採取する。膵組織や肝組織は含まない。これらの病変部胆管組織のプロテオームを以下の手順で解析する。

(2) タンパク抽出: 凍結組織片からタンパクを抽出し、トリブシン処理してペプチド化

する。

(3) 標識: 各サンプルを Tandem Mass Tag (TMT) を用いて標識する。

(4) 分離: Strong cation exchange 法により、各サンプルを 8 分画に分離し、各分画別に解析する。

(5) Phosphopeptide enrichment: TiO<sub>2</sub> と Immobilized Metal-Affinity Chromatography (IMAC) を用いて、phosphopeptide enrichment を行う。各サンプルを 3 つに分け、各々 TiO<sub>2</sub> 処理、IMAC 処理、処理なしとする。

(6) 質量分析: サンプルを液体クロマトグラフィー-タンデム型質量分析計 (LC-MS/MS) で解析する。なお、対象は 8 サンプルだが、上述の separation (8 分画)、phosphopeptide enrichment 処理 (3 種類の方法)、また各サンプルを 3 回解析するため (biological repeats)、合計  $8 \times 8 \times 3 \times 3 = 576$  サンプルの解析を行う。

(7) 統計処理: Thermo Scientific Proteome Discoverer 1.3 software を用いて得られたデータからペプチドを同定する。クラスター解析には MeV を、パスウェイ解析には David Bioinformatic Resources (共にフリーソフトウェア) を用いる。

(8) これらの解析により、組織中に存在するペプチドのアミノ酸配列を特定でき、個々のペプチドを定量できる。ペプチドのアミノ酸配列情報から由来するタンパクを同定でき、その発現量を推定できる。さらに、phosphopeptide enrichment 処理を併用することで、リン酸化ペプチドとリン酸タンパクに対しても同様の情報を得ることができる。

(9) プロテオーム解析で得られたデータから、IgG4 関連硬化性胆管炎で過剰発現しているタンパクを同定し、免疫染色を行い、その発現細胞を特定する。同様に、PSC で過剰発現しているタンパクを対象として免疫染色を行う。

(10) さらに、IgG4 関連硬化性胆管炎で過剰発現していたタンパクが、他臓器の IgG4 関連疾患でも発現亢進しているのかを同定する目的で、免疫染色を行う。肺病変、唾液腺病変、後腹膜病変を対象とする。

## 4. 研究成果

(1) IgG4 関連硬化性胆管炎と PSC のプロテオーム解析

IgG4 関連硬化性胆管炎と PSC の凍結組織から採取したタンパクを用いて、網羅的なプロテオーム解析ならびにリン酸化修飾解析を行った。胆管組織からペプチド 23,357 個とリン酸化ペプチド 4,794 個を同定した。各ペプチドの発現量に基づいてクラスター解析を行うと、総ペプチドや非リン酸化ペプチドの発現プロファイルは 2 つの疾患で明確な違

いはなく、両者をクラスターで区別することはできなかった。一方、リン酸化ペプチドのみに着目してクラスター解析を行うと2つの疾患を明瞭に区別することができた。

この結果は病理学的にも理にかなっていると考えられる。IgG4 関連硬化性胆管炎とPSC では浸潤細胞、組織構成細胞に大きな違いはなく、発現ペプチドのみで両者を区別できないのは当然である。両疾患の違いはステロイド反応性を含めた機能的な点であり、タンパクの機能面を反映したリン酸化修飾が両疾患をより明瞭に区別しえたと考えられる。本研究は、網羅的リン酸化修飾解析を非腫瘍性疾患に用いた初めての研究であるが、この手法が非腫瘍性疾患の解析にも有用であることを示すものといえる。

## (2) パスウェイ解析

ペプチドの配列から 4,870 のタンパクを同定した。そのうち 784 のタンパクは IgG4 関連硬化性胆管炎で有意に発現量が多く、164 のタンパクは PSC で発現が亢進していた。また、1,121 のタンパクで、少なくとも 1 か所でリン酸化が同定され、262 のタンパクが IgG4 関連硬化性胆管炎で有意にリン酸化が亢進し、83 のタンパクが PSC でリン酸化が有意に多かった。これらの各疾患で高発現しているタンパクや優位にリン酸化しているタンパクに着目してパスウェイ解析を行うと、11 のパスウェイが IgG4 関連硬化性胆管炎で活性化し、その中に 3 つの免疫関連シグナル伝達が含まれていた (Fc-gamma receptor-mediated phagocytosis, B cell receptor signaling pathway, Fc-epsilon receptor 1 signaling pathway) (表 1)。興味深いことにすべて B 細胞や免疫グロブリン関連であった。

表 1. IgG4 関連疾患で活性化したシグナル

Ribosome
Spliceosome
Fc gamma R-mediated phagocytosis
Protein export
Proteasome
Endocytosis
B cell receptor signaling pathway
Regulation of actin cytoskeleton
Huntington's disease
Fc epsilon RI signaling pathway
Glutathione metabolism

Fc-gamma receptor-mediated phagocytosis は IgG が Fc-gamma receptor に結合した後に活性化するシグナル伝達で、主としてマクロファージ内で生じる。B cell receptor signaling pathway は B 細胞の細胞膜上に存在する B cell

receptor に抗原が結合すると、B 細胞を活性化する時に活性化する。Fc-epsilon receptor 1 signaling pathway は IgE が受容体に結合して活性化するシグナルで、マスト細胞内で生じる。この経路は好酸球反応や Th2 反応とも関連している。IgG4 関連疾患では IgE の上昇がしばしば見られ、Th2 有意の免疫応答が生じていることが知られており、これまでの報告に合致する結果である。しかし、IgG4 は Fc-gamma receptor への結合能力が弱いことが知られており、なぜ Fc-gamma 関連のシグナルが亢進しているのか解釈が難しい。最近、IgG4 関連疾患では IgG4 は病態の本質ではなく、過剰な免疫応答を抑制するために 2 次的に誘導されているのではないかとの考えがある。本研究のこの結果も Fc-gamma receptor 下流のシグナルは IgG4 以外の IgG 分子が活性化し、IgG4 自体はその下流の免疫応答の活性化に関与していないことを示唆している可能性がある。

一方、PSC では 17 のシグナルが有意に活性化し、その中に免疫関連のものはなく、Focal adhesion や Extracellular matrix-receptor interaction など細胞外マトリックスのリモデリングに関連したものが含まれていた(表 2)。

表 2. PSC で活性化していたシグナル

Arginine and proline metabolism
Tyrosine metabolism
Drug metabolism
Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450
Alanine, aspartate and glutamate metabolism
Phenylalanine metabolism
Hypertrophic cardiomyopathy
Focal adhesion
Dilated cardiomyopathy
Fatty acid metabolism
Valine, leucine and isoleucine degradation
Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy
Glutathione metabolism
ECM-receptor interaction
Cysteine and methionine metabolism
Glycolysis/Gluco-genesis
Viral myocarditis

## (3) 個別タンパクの解析

次に、発現亢進していたタンパクのなかから重要と考えられる 2 つのタンパクを選択し、免疫染色にてその発現を検討した。IgG4 関連

硬化性胆管炎に関しては免疫関連の FYN-binding protein ( FBP ) と Allograft inflammatory factor-1 ( AIF-1 ) を選択した。免疫染色を行うと FBP は病変内にびまん性に陽性像が確認された。小型のリンパ球と思われる細胞以外に、細胞質の豊富な間質細胞に陽性像が確認された。2 重免疫染色を行うと、FBP 陽性細胞の一部は CD3 を共発現しており、T 細胞に発現があると考えられた。また、CD68 や CD168 とともに陽性像が見られ、M2 型マクロファージに発現があると考えられた。AIF-1 も同様に、CD68 や CD168 と 2 重陽性細胞が多数見られ、M2 マクロファージが主な産生細胞であることが明らかとなった。PSC には FBP はリンパ球に発現が見られたが、マクロファージでの発現は見られなかった。同様に、AIF-1 の発現もほとんど認められなかった。これらの結果から個別のタンパクに着目すると、M2 型マクロファージの活性化に関連した分子が抽出されたことになる。上述したとおりパスウェイ解析で同定された Fc-gamma receptor-mediated phagocytosis もマクロファージ内のシグナル伝達であり、2 つの手法の解析のいずれでもマクロファージの活性化が同定されたことになる。

一方、PSC では細胞外マトリックスに関連した Filamin-A と Filamin-C に着目して免疫染色を行った。Filamin-A は PSC の組織ではマクロファージや線維芽細胞に発現が見られ、一部では障害された胆管上皮にも aberrant な発現が確認された。さらに興味深いことに、PSC に合併した胆管癌でも発現が見られ、PSC の細胞外マトリックスのリモデリングだけでなく、発癌との関連性も示唆された。Filamin-C は背景組織では血管平滑筋に発現が限られていたが、PSC では線維芽細胞の一部で発現が見られた。IgG4 関連硬化性胆管炎では、Filamin-A の発現が弱く、Filamin-C の発現は血管平滑筋に局限していた。

#### (4) 他臓器病変での解析

他臓器の IgG4 関連疾患でも FBP や AIF-1 の発現が亢進しているのか、また同定したタンパクの発現が診断マーカーとなるのかを検証した。解析した臓器は、唾液腺、肺、後腹膜である。唾液腺では IgG4 関連唾液腺炎とシェーグレン症候群を、肺では IgG4 関連肺病変と特発性間質性肺炎を、後腹膜では IgG4 関連後腹膜線維症と IgG4 非関連の特発性後腹膜線維症を対象とした。予想したとおり、FBP も AIF-1 も他臓器の IgG4 関連疾患でも強発現していた。2 重免疫染色を行うと、硬化性胆管炎と同様に M2 型マクロファージが主な発現細胞であることが明らかとなった。また、対照として用いた他疾患では IgG4 関連疾患に比してこれらのタンパクの発現は弱く、FBP と AIF-1 の過剰発現は臓器を問わず IgG4 関連疾患に特徴的であることが明らかとなった。さらに、これらのタンパクを発現する細胞は病変内にびまん性に認められ、生検検

体でも陽性細胞は容易に検出でき、診断マーカーとして臨床的にも使用できる可能性が示唆された。

#### (5) まとめ

本研究では、網羅的なプロテオーム解析とリン酸化修飾を非腫瘍性疾患で用いた初めての解析であるが、病態解析におけるこの手法の有用性が確認されるとともに、IgG4 関連疾患において活性化しているシグナル伝達の同定につながった。また、FBP と AIF-1 は IgG4 関連疾患で高発現している分子で、M2 マクロファージが主な産生細胞で、これらの分子の発現は病理診断にも応用できる可能性が示唆された。

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 13 件)

Otani K, Inoue D, Itoh T, [Zen Y](#). Transbronchial lung biopsy for the diagnosis of IgG4-related lung disease. *Histopathology*. 2018 [Epub ahead of print] 査読あり. doi: 10.1111/his.13513

Otani K, Inoue D, Fujikura K, Komori T, Abe-Suzuki S, Tajiri T, Itoh T, [Zen Y](#). Idiopathic multicentric Castleman's disease: a clinicopathologic study in comparison with IgG4-related disease. *Oncotarget*. 2018;9:6691-706. 査読あり. doi: 10.18632/oncotarget.24068

Hong SA, Sung YN, Kim HJ, Lee SS, Lee JH, Ahn CS, Hwang S, Yu E, [Zen Y](#), Kim MH, Hong SM. Xanthogranulomatous cholecystitis exhibits overlapping histologic features with IgG4-related cholecystitis. *Histopathology*. 2018;72:569-79. 査読あり. doi: 10.1111/his.13413

Ku Y, Hong SM, Fujikura K, Kim SJ, Akita M, Abe-Suzuki S, Shiomi H, Masuda A, Itoh T, Azuma T, Kim MH, [Zen Y](#). IL-8 expression in granulocytic epithelial lesions of idiopathic duct-centric pancreatitis (type 2 autoimmune pancreatitis). *Am J Surg Pathol*. 2017;41:1129-38. 査読あり. doi: 10.1097/PAS.0000000000000891

Avincsal MO, [Zen Y](#). The histopathology of IgG4-related disease. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2017;401:45-60. 査読あり. doi: 10.1007/82\_2016\_38

[Zen Y](#). The pathology of IgG4-related disease in the bile duct and pancreas. *Semin Liver Dis*. 2016;36:242-56. 査読あり. doi: 10.1055/s-0036-1584319

Nakanuma Y, Ishizu Y, [Zen Y](#), Harada K, Umemura T. Histopathology of IgG4-Related Autoimmune Hepatitis and IgG4-Related Hepatopathy in IgG4-Related Disease. *Semin Liver Dis*. 2016;36:229-41. 査読あり. doi:

10.1055/s-0036-1584320

Zen Y, Kawakami H, Kim JH. IgG4-related sclerosing cholangitis: all we need to know. *J Gastroenterol*. 2016;51:295-312. 査読あり. doi: 10.1007/s00535-016-1163-7

Avincsal MO, Otani K, Kanzawa M, Fujikura K, Jimbo N, Morinaga Y, Hirose T, Itoh T, Zen Y. Sclerosing mesenteritis: A real manifestation or histological mimic of IgG4-related disease? *Pathol Int*. 2016;66:158-63. 査読あり. doi: 10.1111/pin.12386

Zen Y, Britton D, Mitra V, Pike I, Heaton N, Quaglia A. A global proteomic study identifies distinct pathological features of IgG4-related and primary sclerosing cholangitis. *Histopathology*. 2014;65:784-92. 査読あり. doi: 10.1111/his.12813

Inoue D, Yoshida K, Yoneda N, Ozaki K, Matsubara T, Nagai K, Okumura K, Toshima F, Toyama J, Minami T, Matsui O, Gabata T, Zen Y. IgG4-related disease: dataset of 235 consecutive patients. *Medicine (Baltimore)*. 2015;94:e680. 査読あり. doi: 10.1097/MD.0000000000000680

Hart P, Zen Y, Chari S. Recent advances in autoimmune pancreatitis. *Gastroenterology*. 2015;149:39-51. 査読あり. doi: 10.1053/j.gastro.2015.03.010

Kamisawa T, Zen Y, Pillai S, Stone JH. IgG4-related disease. *Lancet*. 2015;385:1460-71. 査読あり. doi: 10.1016/S0140-6736(14)60720-0

〔学会発表〕(計 8 件)

全 陽 . IgG4 関連疾患の病理と病態 . シンポジウム IgG4 関連疾患の基礎と臨床 . 第 90 回日本内分泌学会学術総会 , 2017 年 4 月 20-22 日 , 京都市勧業館 ( 京都府 ) .

全 陽 . IgG4 関連疾患 : 診断における画像と病理のコレボレーション . シンポジウム IgG4 関連疾患の診断 , 第 76 回日本医学放射線学会 , 2017 年 4 月 13-16 日 , パシフィコ横浜 ( 神奈川県 ) .

Zen Y. Molecular pathology of IgG4-related pancreatobiliary disease. International Symposium "Recent Progress in IgG4-related Pancreatobiliary Diseases" . 第 23 回日本消化器関連学会週間 ( JDDW ) , 2015 年 10 月 8-11 日 , 高輪プリンスホテル ( 東京都 ) .

全 陽 . IgG4 関連疾患の病理 . シンポジウム IgG4 関連疾患 : 最新の知見 . 第 24 回日本シェ グレン症候群学会学術集会 , 2015 年 9 月 18-19 日 , 京王プラザホテル ( 東京都 ) .

Zen Y. Role of liver biopsies in the diagnostic process toward primary sclerosing cholangitis. パネルディスカッション 硬化性胆管炎の

診断基準に向けて . 第 51 回日本胆道学会学術集会 , 2015 年 9 月 18-19 日 , ホテル東日本宇都宮 ( 栃木県 ) .

全 陽 . 網羅的 Proteome ・ Phosphorylome 解析を用いた原発性硬化性胆管炎の病態研究 . パネルディスカッション Modern Immunology からみた肝病態 . 第 51 回日本肝臓学会総会 , 2015 年 5 月 21-22 日 , ホテル日航熊本 ( 熊本県 ) .

全 陽 . State of the Art Lecture - IgG4 関連肝胆道疾患 : 10 年の進歩 . 第 51 回日本肝臓学会総会 , 2015 年 7 月 23-24 日 , ポートピアホテル ( 兵庫県 ) .

全 陽 . IgG4 関連疾患の病理診断 : overview と問題点 . シンポジウム IgG4 関連疾患の診断病理 : その進歩と問題点 . 第 104 回日本病理学会総会 , 2015 年 4 月 30 日 - 5 月 2 日 , 名古屋国際会議場 ( 愛知県 ) .

〔図書〕(計 2 件)

岡崎和一 , 川茂幸 , 神澤輝実 , 川上純 , 川野充弘 , 全 陽 , 高橋裕樹 , 中島衡 編 . 最新 IgG4 関連疾患 . 診断と治療社 , 東京 , 2015 , 175 .

川野充弘 , 全 陽 , 佐藤康晴 , 井上大 編 . よくわかる IgG4 関連疾患 . 中外医学社 , 東京 , 2017 , 214 .

## 6 . 研究組織

研究代表者

全 陽 (ZEN, Yoh)

神戸大学・大学院医学研究科・特命教授  
研究者番号 : 90377416