

令和元年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：2015～2018

課題番号：15K09537

研究課題名(和文) プロテオミクスの手法を用いたIgG4関連疾患特異的に変動するタンパク質の機能解析

研究課題名(英文) Proteomics analysis in IgG4-related disease

研究代表者

河南 崇典 (KAWANAMI, Takafumi)

金沢医科大学・医学部・講師

研究者番号：20350762

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関連疾患治療前後および健康人の血清を用い、疾患で特異的に変動するタンパク質群を、プロテオミクスの手法を用い網羅的に解析し、IgG4関連疾患の病因病態に関連するタンパク質の同定を行った。患者・健康人間、また、治療前後において、有意差($p < 0.05$)を持って発現変動を示すスポットが得られた。このうち1.2倍～3倍などの差があるスポットを選択し、質量分析によるタンパク質同定を行った。その結果、IgG4へのクラススイッチに関与するAlpha-1 antitrypsinの発現亢進と、疾患活動性の指標と相関を示すLeucin-rich alpha-2-glycoproteinを見いだした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

IgG4関連疾患において特異的に変動するタンパク質群の網羅解析を行い、病態への関与が類推されるいくつかの因子を見いだした。IgG4関連疾患は、IgG4陽性細胞の増加や浸潤を特徴とするが、なぜIgG4が高いのか、原因なのか、結果なのかは未だ不明である。本研究により、IgG4関連疾患の病態に関わる機能分子や、タンパク質間の相互関係解析が進めば、IgG4関連疾患の病態形成のメカニズムに新たな知見が得られるとともに、その治療戦略への足がかりを掴む一歩になるものと考えている。

研究成果の概要(英文)：To understand the etiology/pathology of IgG4-related disease and its mechanism, we analyzed the proteins whose expression vary depending on the disease and its treatment using a proteomics approach. The proteins whose expressions are significantly different between before and after treatment and between healthy individuals and the patients were identified and validated by ELISA. In the serum before the treatment of IgG4-related disease, we observed the increases in IgG1, IgG4, Ig lambda, Ig kappa, as well as those in inflammatory factors such as -1 antitrypsin (A1AT), apolipoprotein-L1, complement 4, C1q, and serum amyloid A protein precursor and those associated with the regulation of immune systems such as clusterin and Leucin-rich-2-glycoprotein (LRA2G).

研究分野：膠原病学

キーワード：IgG4関連疾患 プロテオミクス クラススイッチ Alpha-1 antitrypsin LRA2G

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

IgG4 関連疾患は、血清 IgG4 高値と病変組織への IgG4 陽性形質細胞の浸潤を特徴とするリンパ増殖性疾患である。罹患臓器は多彩で、著明なリンパ球浸潤にも関わらず、導管などの組織は保たれており、病初期は中等量のステロイド治療の反応性が良い。IgG4 関連疾患の臨床像については症例の蓄積とともに解析が進んでいるものの、本疾患の病因・病態に関する基礎的研究は未だ不明な点が多い。

IgG4 関連疾患の浸潤細胞は IgG4 陽性形質細胞が主体をなしている点が特徴的である。本疾患では血清 IgA や IgM は正常であるにも関わらず、IgG4 は高く、また IgE も高値を示す傾向にあり、IgG4、IgE へのクラススイッチが亢進している。しかし、なぜ IgG4 陽性細胞が多数組織に浸潤するのか、なぜ IgG4 クラススイッチが亢進しているのかについては未だ不明である。本疾患は全身性の多臓器疾患であるが、病変局所の形質細胞と血中の IgG4 陽性形質細胞に体細胞高頻度変異が共通するクローンが検出され、病変部と末梢血間において IgG4 陽性クローンの移動が行われている可能性が報告されている。IgG4 関連疾患の病態は、一つの遺伝子やタンパク質変化だけで説明することはできない。

本疾患で罹患しやすい臓器は、涙腺・唾液腺、膵臓、後腹膜、腎臓など全身諸臓器に分布し、血清 IgG4 高値、病変組織における IgG4 陽性細胞増殖という共通点があるものの、臓器毎に線維化の程度や頻度が異なったり、臓器毎にステロイド治療反応性が異なる事もあり、様々な臓器の IgG4 関連疾患が真に均一な疾患単位かどうかはまだ判明していない。また臨床像や組織像の類似した周辺疾患として多中心性 Castleman 病、サルコイドーシス、悪性リンパ腫、血管炎症候群など多くの疾患があり、それらとの鑑別が困難な症例も多く存在する。さらに、血清 IgG4 値が増加していない「IgG4 陰性 IgG4 関連疾患」も報告され、本疾患の概念がゆらいでいる。現時点で本疾患における診断と治療に有用なバイオマーカーは「IgG4」が唯一無二であり、臓器毎の疾患の異同、周辺疾患との鑑別、IgG4 陰性例が存在しうるのかどうかなどは、IgG4 以外の有用なバイオマーカーが判明しない限り判明しない。

そこで、我々は IgG4 関連疾患の治療前後および健常人における血清を用い、疾患で特異的に変動するタンパク質群をプロテオミクスの手法を用い網羅的に解析し、IgG4 関連疾患の病態解析に有用なバイオマーカーとしてのタンパク質の同定を行うこととした。

2. 研究の目的

新しい疾患単位である全身性慢性炎症疾患の IgG4 関連疾患の病因・病態、またその機序を理解するため、疾患や治療により変動するタンパク質をプロテオミクスの手法を用い解析を行う。

3. 研究の方法

インフォームドコンセントを得た IgG4 関連疾患の治療前・治療後、および健常人の血清を実験に用いた。IgG4 関連疾患包括診断基準 (Comprehensive Diagnostic Criteria for IgG4-related disease (IgG4-RD), 2011) を満たす血清 IgG4 値 135mg/dl 以上、組織における IgG4/IgG 比が 40%以上、かつキャッスルマン病、Wegener 肉芽腫、サルコイドーシス、悪性リンパ腫、癌など既知の疾患を除外できるものを IgG4 関連疾患確定診断例(治療前)とし、ステロイド治療開始後 3 ヶ月のものを治療後検体(治療後)とし研究に用いた。本研究の対照については、性差、年齢差の影響を考慮し、IgG4 関連疾患で多くを占める 50~60 歳代男性とした。対照として健常人男性 4 人 (54-61 才、中央値 59 才) から同意を得た上で血清を採取し、健常人コントロール検体とした。

血清は除蛋白前処理のため、5.0 μ L の患者血清中に 10 倍量のアセトンを加え、 -20°C で静置し、遠心分離で上清を除去した。得られたペレットを 2 次元電気泳動 (pH3-10) により展開し、銀染色により呈色した。治療前後で変動したスポットを切り出し、ゲル内消化処理したタンパク質を、ESI-MS/MS (nano-Frontier-LD ((株) 日立ハイテクノロジーズ)) にて検出を行った。得られたペプチド情報は、Swiss プロットデータベースを用い、MASCOT 検索を行い、タンパク質の同定を行った。

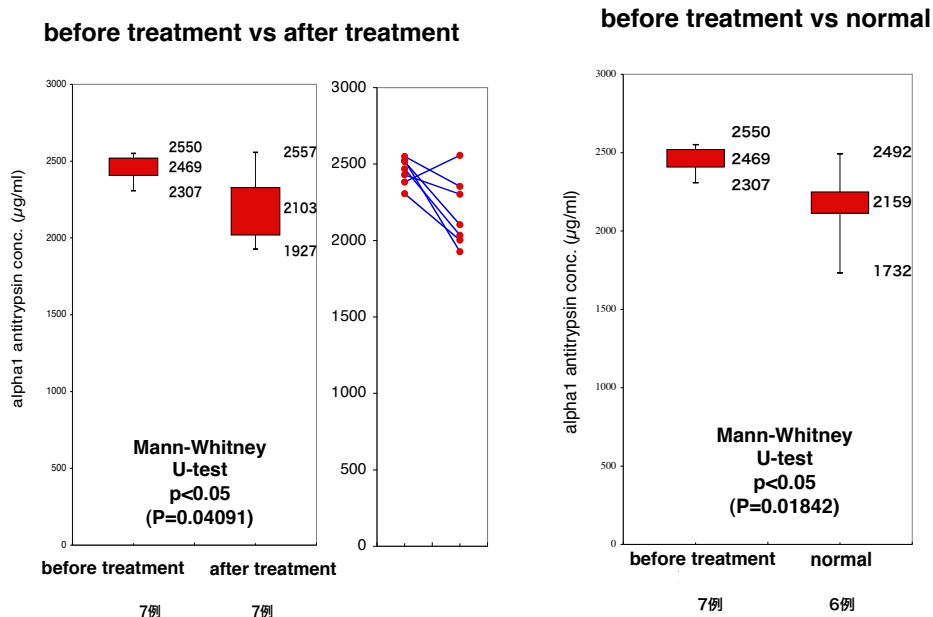
また、疾病特異的なバイオマーカータンパク質は極微量であるため、血清中の高存在量タンパク質の効率的除去と、高感度の検出系が必要となる。そこで前処理として抗体カラム、ビーズを用い、脱アルブミン処理および脱 IgG 処理を行い、高含有タンパク質の選択的除去分離および低分子量タンパク質の濃縮を行った。処理後の血清タンパク質について、「健常人 vs 治療前」および「治療前 vs 治療後」の比較を行うために、血清タンパク質を蛍光標識試薬 Cy2, Cy3, Cy5 で標識し、2 次元電気泳動による展開を行った。Cy 標識されたタンパク質のゲル画像は、Typhoon9400 によってスキャンを行い、Decyder software6.5 を使用したディフアレンシャル解析を行った。治療前後、また、健常人と患者間で有意に発現が変動するタンパク質群を特定し、Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) を用いバリデーションを行った。

4. 研究成果

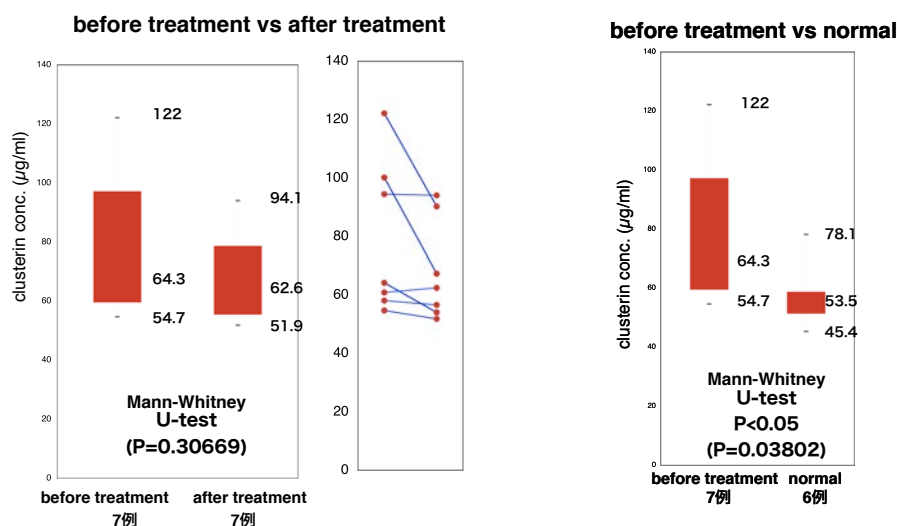
IgG4 関連疾患はステロイド治療が著効し、ステロイド投与後、IgG 値はすみやかに低下した。二次元電気泳動法を用いたプロテオーム解析には、ステロイド治療前の血清と、治療開始後 3 ヶ月のものを実験に用いた。治療前、治療後、健常人コントロールの血清中タンパク質を

2次元電気泳動後、銀染色およびCy染色を行った。各スポットをナンバリングし、治療前後、また、対照と患者で差異があるものについてスポットの回収を行った。IgG4関連疾患の治療前、治療後の血清タンパク質を比較した結果、治療後に低下もしくは消失したスポットは31個であった。また、治療後に増加もしくは出現したスポットは38個であった。治療前後で差が認められたスポットを、質量分析装置を用いて解析した。重複を除き、タンパク質同定の信頼度が高いScore35以上、検出できたペプチド数が2以上、Cover率1%以上のものの選別を行ったところ、IgG4関連疾患症例で、治療後に低下もしくは消失したタンパク質は38個、治療後に増加もしくは出現したタンパク質は52個だった。また、健常人群に比べ、IgG4関連疾患群で高い値を示したタンパク質は19個だった。IgG4関連疾患治療前の血清では、IgG1、IgG4、Ig lambda、Ig kappaの増加、Alpha-1 antitrypsin、Apolipoprotein-L1、Complement 4、Clq、Serum amyloid A protein precursorなどの炎症性因子の増加、免疫システム調節に関連するClusterin、Leucin-rich alpha-2-glycoproteinの増加がみられた。また、健常人と比しても異なるパターンが得られた。さらに抽出されたタンパク質群が、IgG4関連疾患特異的に発現が変動しているかを検討するため、治療前後および健常人の検体を用い、Alpha-1 antitrypsinとClusterinとLeucin-rich alpha-2-glycoproteinについてELISAを用い、その発現動態の検討を行った。

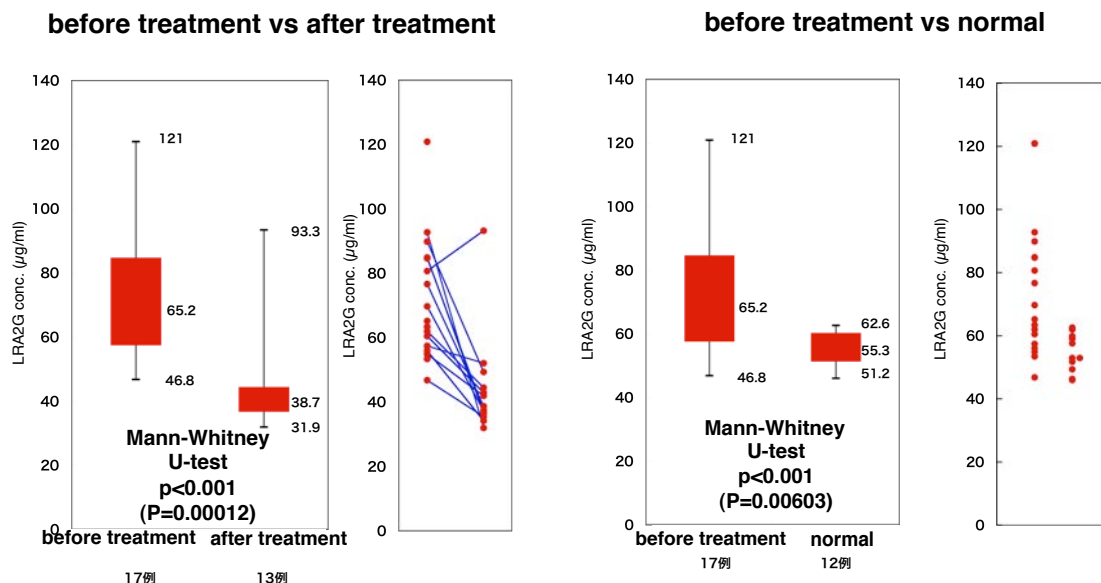
(1) Alpha-1 antitrypsinは、治療前後において、治療前で発現が有意に高く、患者健常人間においても患者群で発現が有意に高かった。



(2) Clusterinは補体活性化の調節、アポトーシスの調節、DNA修復、細胞周期調節など、生体内において非常に多面的な機能を持つ糖タンパク質であり、免疫システム調節に関連する因子である。Clusterinは、治療前後において減少傾向は見られるものの、発現に有意差は認めなかった。患者健常人間においては、患者群で発現が有意に高かった。

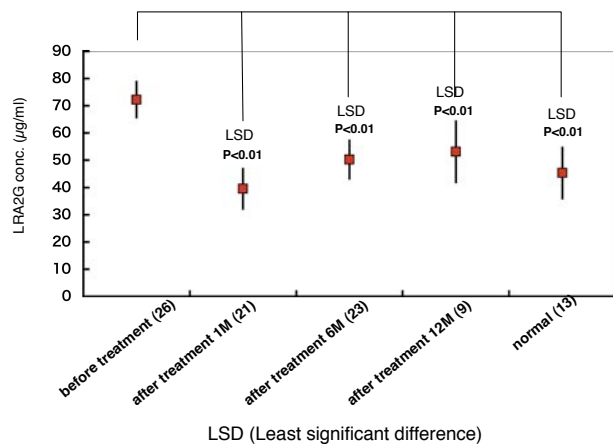


(3) Leucin-rich alpha-2- glycoprotein は、血液中に存在する糖タンパク質の一種で、好中球の分化マーカーになることや、腸上皮細胞などから発現することが知られているもののその機能についてはまだよく分かっていない。近年の報告で、関節リウマチ、クローン病、ベーチェット病などの炎症性自己免疫疾患において、疾患活動性と相関する炎症マーカー蛋白質として報告されている。今回、IgG4 関連疾患患者血清タンパク質のプロテオミクス解析にて、有意差をもって変動したタンパク質としてこの因子が抽出されたので、そのバイオマーカーとしての可能性を検討した。

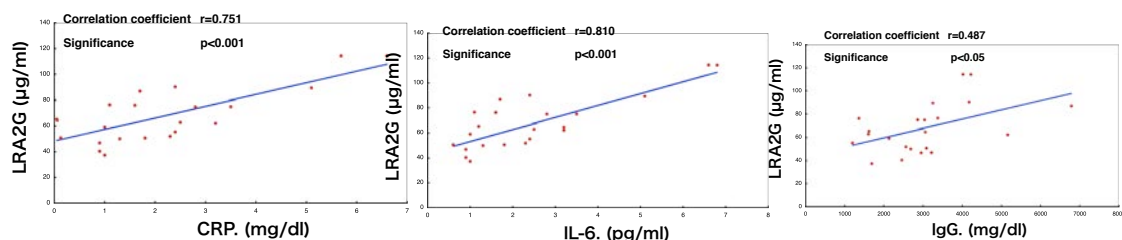


Leucin-rich alpha-2- glycoprotein は、患者 vs 健常人間で、有意に患者群で高い値を示し、治療により、その値を有意に下げた。また、治療前、治療後 1M、6M、12M の値の変動を確認したところ、治療前に示した高い値は、治療後、健常人と同等の数値に抑えられ、その後、継続して同等の値を示しております。

LRG は、病勢を反映する可能性が示唆された。



一般的に自己免疫疾患患者の疾患活動性をモニターする炎症マーカーとして、CRP がよく使用される。炎症マーカーとして CRP は临床上よく使用されるが、疾患活動性が認められても CRP が正常値を示すことも多々ある。治療を行う上で、疾患活動性とよりよく相関する血清マーカーが必要となる。Leucin-rich alpha-2- glycoprotein は、CRP, IL-6 値と相関し、また、IgG4 関連疾患の活動性の指標の一つである IgG 値との相関を示す結果が得られた。



今回の検討で、病態関連蛋白として抽出された Alpha-1 antitrypsin は、B 細胞の IgE、IgG4 産生細胞への分化誘導を増強させる機能を有することが報告されており、IgG4 関連疾患の病因に関わっている可能性がある。Alpha-1 antitrypsin は、生体内において、好中球の活性時に放出される好中球エラスターゼなどセリンプロテアーゼと複合体を形成し、そのタンパク質分解酵素の活性を阻害する相反物質としての生物活性を有する。一般的には活性中心にセリンを持つタンパク質分解酵素を阻害し、組織障害の拡大を防ぐ役割を担っている。造血幹細胞から分化した成熟 B 細胞は、サイトカインなどの外部刺激により、その表面に発現している IgM の構造を変化させて、抗原排除に適したクラスへの変化を行い、抗原との親和性を成熟させる。この Alpha-1 antitrypsin は、IL-4 と CD40 刺激による免疫グロブリン遺伝子再構成をより選択的に増強させ、B 細胞を、IgE、IgG4 産生細胞へ分化誘導させる機能がある。IgM 発現 B 細胞は T 細胞の発現する CD40L と TCR との相互作用によって活性化される。活性化した B 細胞において、CD40 や IL-4 受容体からのシグナルにより発現が誘導された AID (activation induced cytidine deaminase) によりクラススイッチが引き起こされる。Alpha-1 antitrypsin は IL-4 と CD40 刺激によるクラススイッチを亢進させ、IgE と IgG4 産生を選択的に誘導することが報告されている。IgG4 関連疾患では、Alpha-1 antitrypsin の機能が亢進することにより AID の転写が増強され、恒常的に IgG4 へのクラススイッチの誘導が亢進している病態なのかもしれない。また、IgG4 関連疾患は、Th2 優位のサイトカイン産生が亢進しており、制御性のサイトカインである IL-10 や TGF- β の発現が亢進していることが報告されている。IgG4 は Th2 サイトカインである IL-4 によって分化・誘導される。また、IL-10 が B 細胞の IgG1 の産生を抑制し、IgG4 の産生を増加させることが報告されている。IL-4 や IL-10 の増加により IgG4 や IgE の産生は亢進されるが、さらに Alpha-1 antitrypsin の発現亢進が加わり、より選択的に、より増強した IgG4 産生が誘導されている病態が考えられる。

また、今回の検討で、IgG4 関連疾患群において、Leucin-rich alpha-2- glycoprotein が有意に発現亢進し、治療により、その値を低下させることを見いだした。近年、Leucin-rich alpha-2- glycoprotein が、TGF- β の補助受容体エンドグリンに直接結合し、TGF- β シグナル伝達の調節に関与することが報告されている。IgG4 関連疾患は、Th2 サイトカイン優位で、IL-10 や、TGF- β といった制御性サイトカインの発現が亢進した免疫応答が生じていると考えられている。TGF- β シグナルの異常は、がん化以外にも、強皮症や、線維症疾患など様々な病態に関与する因子である。IgG4 関連疾患における Leucin-rich alpha-2- glycoprotein の発現亢進が、ただ、炎症の有無によるものなのか、また、IgG4 関連疾患の病変部の繊維化などに関連しているのかは現段階では、まだ不明である。Leucin-rich alpha-2- glycoprotein の TGF- β シグナルの活性化への関与は、今後の検討課題である

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 11 件)

- ①. Fujimoto S, Iwao-Kawanami H, Kawanami T, Masaki Y, et al. (他 10 名、9 番目) A Case of Osteosarcoma Manifesting Systemic Inflammation and Histological Features Mimicking Plasma Cell-type Castleman Disease. *Intern Med*. Epub ahead of print, 2019, 査読有
- ②. Nakamura T, Kawanami T, Iwao H, Masaki Y, et al. (他 24 名、4 番目) Impaired expression of innate immunity-related genes in IgG4-related disease (IgG4-RD): A possible mechanism in the pathogenesis of IgG4-RD. *Mod Rheumatol*. Epub ahead of print, 2019, 査読有
- ③. Shiboski CH, Baer AN, Shiboski SC, Kawanami T, et al. (他 97 名、72 番目) Natural History and Predictors of Progression to Sjögren's Syndrome Among Participants of the Sjögren's International Collaborative Clinical Alliance Registry. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 70(2):284-294, 2018, 査読有
- ④. Fujimoto S, Kawanami-Iwao H, Kawanami T, Masaki Y, et al. (他 5 名、6 番目) Sjögren's syndrome manifesting as clinicopathological features of TAFRO syndrome: A case report. *Medicine (Baltimore)*. 96(50):e9220, 2017, 査読有
- ⑤. Masaki Y, Matsui S, Kawanami T, Kawanami Iwao H, et al. (他 31 名、20 番目) A multicenter phase II prospective clinical trial of glucocorticoid for patients with untreated IgG4-related disease. *Mod Rheumatol*. 27(5):849-854. 2017, 査読有
- ⑥. Masaki Y, Kawabata H, Kawanami H, Kawanami T, et al. (他 26 名、25 番目) Proposed diagnostic criteria, disease severity classification and treatment strategy for TAFRO syndrome, 2015 version. *Int J Hematol*. 103(6):686-92. 2016, 査読有
- ⑦. Fujita Y, Iwao H, Kawanami T, Masaki Y, et al. (他 12 名、10 番目) Isolation of vascular smooth muscle antigen-reactive CD4(+) α 8Th1 clones that induce pulmonary vasculitis in

MRL/Mp-Fas(+/+) mice. *Cell Immunol.* 303:50-4. 2016, 査読有

⑧. Sakai T, Masaki Y, Iwao H, Kawanami T. et al. (他 15 名、13 番目) Prospective clinical study of R-CMD therapy for indolent B cell lymphoma and mantle cell lymphoma from the Hokuriku Hematology Oncology Study Group. *Med Oncol.* 32(9):232. 2015, 査読有

⑨. Nakajima A, Masaki Y, Kawanami T, Iwao H, et al. (他 28 名、4 番目) Decreased Expression of Innate Immunity-Related Genes in Peripheral Blood Mononuclear Cells from Patients with IgG4-Related Disease. *PLoS One.* 10(5):e0126582. 2015, 査読有

⑩. Satoh-Nakamura T, Kawanami T, Iwao-Kawanami H, Masaki Y. et al. (他 8 名、3 番目) CD14+ follicular dendritic cells in lymphoid follicles may play a role in the pathogenesis of IgG4-related disease. *Biomed Res.* 36(2):143-53. 2015, 査読有

⑪. Baer AN, McAdams DeMarco M, Kawanami T. et al. (他 90 名、61 番目) The SSB-positive/SSA-negative antibody profile is not associated with key phenotypic features of Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis.* 74(8):1557-61. 2015, 査読有

[学会発表] (計 4 件)

①. 河南崇典: IgG4 関連疾患における疾患特異的に変動する代謝物群を利用したメタボロミクス解析, 第 63 回日本リウマチ学会, 国立京都国際会館グランドプリンスホテル京都(京都府, '19. 04. 17).

②. 河南崇典: プロテオミクスの手法を用いた IgG4 関連疾患特異的に変動するタンパク質の機能解析, 第 25 回日本シェーグレン症候群学会, 京王プラザホテル(東京都, '16. 09. 07).

③. 河南崇典: IgG4 関連の炎症の発生と収束にかかわる脂質メディエーターとそのバランス制御, 第 9 回 IgG4 研究会, ピュアリティまきび(岡山県岡山市, '16. 03. 19).

[図書] (計 1 件)

①. 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,

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 岩男 悠

ローマ字氏名: (IWAO, Haruka)

所属研究機関名: 金沢医科大学

部局名: 医学部

職名: 助教

研究者番号 (8 桁): 10612244

研究分担者氏名: 正木 康史

ローマ字氏名: (MASAKI, Yasufumi)

所属研究機関名: 金沢医科大学

部局名: 医学部

職名: 教授

研究者番号 (8 桁): 40238895

(2) 研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

※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。