

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15290

研究課題名(和文) IgG4関連疾患の病因解明及び治療法の開発 - IgG4抗体の病原性を中心に -

研究課題名(英文) Elucidation of pathophysiology and development of treatment for IgG4-related disease (RD)

研究代表者

千葉 勉 (CHIBA, Tsutomu)

京都大学・医学研究科・名誉教授

研究者番号：30188487

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：IgG4関連疾患が自己免疫疾患であるという仮説に基づき自己抗体を探索することを目的とした。患者IgGの投与はマウスに自己免疫性膵炎(AIP)様の病変を誘発した。その際患者IgGは膵の間質、基底膜にC1qとともに沈着していた。そこで自己抗体が細胞外マトリックス蛋白(ECM)を認識していると想定して種々のECM蛋白のELISAを確立して検討したところ、AIP患者の約半数でラミニン 5 1 1-E8に対する抗体が検出された。一方正常人や膵癌、慢性膵炎では本抗体は存在しなかった。以上AIP患者血中には抗ラミニン 5 1 1抗体が存在し、これが膵組織障害を惹起していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：According to the hypothesis that IgG4-related disease (RD) is an autoimmune disease, we tried to clarify the existence of and roles for autoantibodies in patients with IgG4-RD. We first confirmed that injection of IgG in the sera of patients with IgG4-RD induced autoimmune pancreatitis (AIP)-like lesions in mouse pancreas. We also observed that the injected IgG was localized in extracellular matrix (ECM) including basement membrane of pancreatic acini together with C1q, suggesting that the autoantibody in patients' serum recognizes some ECM protein in the pancreas. Thus, we established ELISA for various laminins, and found that about 50% of the patients with IgG4-RD had antibody against laminin 5 1 1-E8 in their sera, but none of normal subjects, patients with pancreatic cancer or those with chronic pancreatitis had this antibody. We concluded this antibody has pathogenic role by dissociating acinar cells from ECM.

研究分野：消化器内科

キーワード：IgG4関連疾患 自己免疫性膵炎 自己抗体 IgG IgG4 Extracellular matrix

### 1. 研究開始当初の背景

IgG4 関連疾患 (IgG4-RD) は、わが国で概念が確立された新しい疾患概念である。本疾患は血中 IgG4 の高値と組織への IgG4 陽性形質細胞の浸潤を特徴とし、自己免疫的機序の関与が想定されているが、その病因は不明である。そこで申請者らは、本疾患患者の血中に IgG4 自己抗体が存在し、それが組織障害性を有しているのではないかと考えて、予備実験を行った結果、患者血中の IgG、IgG4 の投与が、マウス脾に自己免疫性膵炎 (AIP) 様の病変を惹起する事実を見出した。

### 2. 研究の目的

そこで本研究では、IgG4-RD の病因について、特に IgG4 に照準をあてて解明することを目的とした。具体的には本疾患に自己抗体が存在するか否かを検討し、さらにその自己抗体の対応抗原を明らかにして、組織障害性を有するか否かを調べる。またその結果に基づいて新しい診断法、治療法の確立を目指す。

### 3. 研究の方法

(1) IgG4-RD 患者の免疫グロブリン (Ig) の病原性評価：IgG4-RD 患者および年齢・性をマッチさせたコントロールより Ig を抽出する。申請者はこれまでに患者 IgG のマウスへの投与により患者の罹患臓器と同一のマウス組織に病変ができることを見出しており、本研究ではサンプル数を増やし、用量依存性、時間依存性も検討する。また各臓器において免疫染色を行い抗体結合部位を検索する。

(2) IgG4-RD 患者の IgG サブクラスの病原性評価：IgG4-RD 患者の IgG を IgG1, 2, 3, 4 のサブクラスに分画し、各分画の病原性についてマウスで評価する。さらにヒト IgG1-4 に対する免疫染色を行い、病原性をもつ IgG サブクラスの組織結合部位を検索する。

(3) IgG4-RD 患者の IgG4 による組織障害機序の検討：抗体に加えて、ヒト補体 (コントロール血清) を同時に投与し補体の関与を検討する (コントロールとして 56 にて補体を不活化)。さらに組織障害における T 細胞、B 細胞の免疫細胞の関与を、SCID マウス、NOD-SCID マウスにヒト IgG を投与し検討する。

(4) ヒト AIP 組織との相関評価：1) 2) で明らかとなったマウス脾における患者 IgG、IgG4 の結合部位と、ヒト AIP 組織において IgG、IgG4 が沈着している部位との相関性について検討する。

(5) IgG4-RD 患者 IgG4 自己抗体対応抗原の同定と自己抗原に対する低両方の開発：自己抗原の可能性のある種々の ECM 蛋白の ELISA 法を開発し、自己抗原を同定する。

(6) この抗原に対するモノクローナル抗体

(mAb) を作成し、マウス脾組織におけるヒト IgG4 との二重免疫染色により merge するか確認し、自己抗原の validation を行う。更にこの mAb をマウスに投与し組織障害性を検討する。

(7) 自己抗原に対する定量法の開発と臨床応用：(5) で同定した自己抗原に対する抗体を、定量的に測定できる ELISA 法を開発し、診断や治療反応性、再発などとの関連について検討し、臨床応用の可能性を探る。

### 4. 研究成果

(1) IgG4-RD 患者の免疫グロブリン (Ig) の病原性評価：患者 IgG のマウスへの投与により同患者の罹患臓器と同一の組織 (脾、唾液腺) に病変ができることを見出していたが、本研究でサンプル数を増やしても validation でき、用量依存性、時間依存性についても確認できた。

(2) IgG4-RD 患者の IgG サブクラスの病原性評価：サブクラスの解析では、患者 IgG1 および IgG4 投与群に同様の病変を認めたと、患者 IgG1 投与群の方がより強く誘導された。興味深いことに、IgG1 と IgG4 を同時に投与すると、IgG1 のみ投与した場合より病変は軽減された。

(3) IgG4-RD 患者の IgG4 による組織障害機序の検討：IgG の投与では、組織に免疫複合体 (C1q) の沈着があり、補体による組織障害が一因である可能性が示唆された。標的組織としては、膵臓に強い障害、唾液腺に弱い障害があり、AIP 患者 IgG は膵臓・唾液腺に対する病原性をもつ抗体を有することが示唆された。また、マウス・ヒト AIP 組織の両者において、IgG、IgG1、IgG4 とも基底膜を含めた、細胞外マトリックス (ECM) に沈着があった。

(4) IgG4-RD 患者 IgG 自己抗体対応抗原の同定：種々のリコンビナント ECM 蛋白を抗原として、ELISA 系を確立し、自己抗体の同定を試みたところ、ラミニン 5 1 1-E8 のみが AIP 患者 (50%) 血清に反応し、コントロールではまったく反応しなかった。

(5) 自己抗原に対する定量法の開発と臨床応用：上記のラミニン 5 1 1-E8 に対する抗体を、定量的に測定できる ELISA 系を確立して検討したところ、本自己抗体陽性例と陰性例では、臨床症状が異なることが明らかとなった。すなわち陽性例は陰性例と比較すると、がんの合併がない、アレルギー疾患の合併がない、など特徴的な病態を示した。また本抗体陰性例のうち、30% 程度に、本自己抗原のリガンド分子に対する自己抗体が見出された。以上より、これらの自己抗体は、これらのリガンド、受容体の結合を阻害すること

で病原性を発揮しているものと考えられた。また、本 ELISA による自己抗体陽性例では、ステロイド離脱後の再発が多いことが確認された。

(6)本自己抗体蛋白をマウスに投与したところ、自己免疫性膵炎と同様の病変が形成された。したがって、本自己抗原に対する抗体は、病原性を有することが確認された。

(7)本自己抗体をマウスの in vivo, in vitro (ex vivo)で投与したところ、本抗体はマウス膵臓の腺房細胞の基底膜を染色した。以上より本抗体が基底膜の接着分子をターゲットとしていることが確認された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Tanaka A, Tazuma S, Okazaki K, Nakazawa T, Inui K, Chiba T, Takikawa H: Clinical features, treatment response, and outcome of IgG4-related sclerosing cholangitis. Clin Gastroenterol Hepatol 15 : 320-926 e3: 2017. doi: 10.1016/j.cgh.2016.12.038

Watanabe T, Sadakane Y, Yamaga N, Sakurai T, Ezoe H, Kudo M, Chiba T, Strober W. Nucleotide-binding oligomerization domain 1 acts in concert with the cholecystokinin receptor agonist, cerulein, to induce IL-33-dependent chronic pancreatitis. Mucosal Immunol 9:1234-1249:2016.doi: 10.1038/mi.2015.144

Shiokawa M, Kodama Y, Kuriyama K, Yoshimura K, Tomono T, Morita T, Kakiuchi N, Matsumori T, Mima A, Nishikawa Y, Ueda T, Tsuda M, Yamauchi Y, Minami R, Sakuma Y, Ota Y, Maruno T, Kurita A, Sawai Y, Tsuji Y, Uza N, Matsumura K, Watanabe T, Notohara K, Tsuruyama T, Seno H, Chiba T: Pathogenicity of immunoglobulin G in patients with IgG4-related disease. Gut 65:1322-1332:2016. doi: 10.1136/gutjnl-2015-310336

〔学会発表〕(計 5 件)

Shiokawa M  
Is Serum IgG In Patients With AIP Pathogenic?  
International Symposium on IgG4-RD& Fibrosis  
2017年2月18日 Hawaii

塩川雅広、児玉裕三、千葉 勉  
IgG4 関連疾患における IgG の病原性と標的抗

#### 原の解明

JDDW2016 第 24 回日本消化器関連学会週間・ワークショップ 2016年11月5日 神戸

Sakuma Y, Kodama Y, Matsumori T, Tomono T, Kakiuchi N, Mima A, Yamauchi Y, Nishikawa Y, Tsuda M, Ueda T, Kuriyama K, Maruno T, Ota Y, Shiokawa M, Tsuji Y, Uza N, Watanabe T, Nakase H, Seno H, Chiba T  
Chemokine CXCL16 Plays a Critical Role in the Development of Severe Acute Pancreatitis  
2016年5月22日  
Digestive Disease Week2016・ポスター San Diego

Shiokawa M, Kodama Y, Kuriyama K, Tomono T, Morita T, Kakiuchi N, Matsumori T, Mima A, Nishikawa Y, Ueda T, Tsuda M, Yamauchi Y, Sakuma Y, Ota Y, Maruno T, Uza N, Seno H, Chiba T  
Pathogenic Role of IgG in Patients With IgG4-Related Disease on Neonatal Mice  
2016年5月22日  
Digestive Disease Week2016・ポスター San Diego

塩川雅広、児玉裕三、千葉 勉  
IgG4 関連疾患における IgG の病原性と標的抗原の解明  
2016年4月21日 第102回日本消化器病学会総会・ワークショップ 東京

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: IgG4 関連疾患の検査法  
発明者: 塩川雅広、児玉裕三、千葉 勉  
権利者: 国立大学法人 京都大学  
種類: 自己免疫膵炎の検出方法に関する発明  
番号: 特願 2016-142701  
出願年月日: 2016年7月20日  
国内外の別: 国内

取得状況(計 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

千葉 勉 (CHIBA, Tsutomu)  
京都大学・医学研究科・名誉教授  
研究者番号： 30188487

(2)研究分担者

児玉 裕三 (KODAMA, Yuzo)  
京都大学・医学研究科・講師  
研究者番号： 80378687

(3)連携研究者

(4)研究協力者

関口 清俊 (SEKIGUCHI, Kiyotoshi)  
塩川 雅広 (SHIOKAWA, Masahiro)  
栗山 勝利 (KURIYAMA, Katsutoshi)