

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09324

研究課題名(和文)線維化機序に着目したIgG4関連疾患の病態解明

研究課題名(英文)The mechanisms of salivary gland fibrosis in IgG4-related disease

研究代表者

高野 賢一 (Takano, Kenichi)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：70404689

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：IgG4関連硬化性唾液腺炎において顎下腺に高度線維化をもたらすメカニズムの解析に焦点を当て、本疾患におけるヒト顎下腺組織およびヒト顎下腺組織由来の線維芽細胞の解析を行った。本研究から、IgG4関連硬化性唾液腺炎においてもたらされる腺組織の線維化は、炎症性サイトカインによるNF- κ Bを介したIL-6およびWISP1誘導の線維芽細胞の増殖に密接に関連することが明らかとなり、IL-6、WISP1はIgG4関連疾患における新規バイオマーカーのみならず、治療標的となり得る可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

IgG4関連疾患は、いまだ病態不明の疾患であり、特に高度な線維化により罹患臓器では臓器障害が惹起される詳細な線維化機序については解明されていない。本研究では、線維化誘導因子となるサイトカインとしてIL-6およびWISP1を新たに同定した。さらに、これらサイトカインによる線維化誘導メカニズムとして、NF- κ B経路が関与することを明らかにした。これにより、新規バイオマーカーとしての潜在的有用性、およびステロイド抵抗性や再燃例の増加といった臨床的問題を解決に導く可能性のある抗線維化という新たなアプローチによる治療法開発に繋がる基礎的知見が得られた点に学術的・社会的意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to investigate the mechanisms driving fibrosis in the submandibular glands (SMG) of patients with IgG4-related disease (IgG4-RD). Our results suggest fibrosis in the SMG of affected patients is closely linked to the proliferation of fibroblasts following induction of IL-6 and WISP1 by inflammatory cytokines. The Th2 cytokines TSLP and IL-33 are also upregulated in affected SMG, and thus may cause chronic inflammation and IgG4 accumulation.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：唾液腺 線維化 IgG4関連疾患 IL-6 WISP1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

唾液腺は IgG4 関連疾患におけるもっとも罹患頻度の高い臓器のひとつである。IgG4 関連涙腺・唾液腺炎 (IgG4-DS) の臨床的特徴は、持続する涙腺・唾液腺の腫脹および腺分泌障害を認める疾患であり、ときに自己免疫性膵炎などの他臓器合併症を伴う。組織学的には IgG4 陽性形質細胞浸潤に加え storiform fibrosis pattern などと呼ばれる特徴的な線維化を来すものの、これまでに高度な「線維化」がなぜ進むのかほとんど分かっていなかった。同じ IgG4-DS 患者における唾液腺組織を病理学的に検討してみると、小唾液腺では線維化はほとんど認められず、大唾液腺ではほぼ全例で線維化が認められることを申請者らは明らかとした。これまで口唇腺を用いた研究報告も散見されるが、本研究を進めるうえでは、大唾液腺である顎下腺を対象臓器とすることが理にかなっている。

一方、これまでの研究からは、病変局所におけるサイトカイン産生 (CD4+ Cytotoxic T Lymphocytes : CTLs からの TGF- β 、IFN- γ 、IL-1 β 、制御性 T 細胞 : Treg からの TGF- β など) が線維芽細胞の活性化を促すことが推測されているが、線維化が進む詳細なメカニズムはいまだ不明であった。

2. 研究の目的

IgG4 関連疾患における線維化機序を解明することを目的とする。具体的には、IgG4-DS 患者の大唾液腺線維化に関与する因子を探索し、その因子による線維化誘導機序を解明することである。

3. 研究の方法

対象は、札幌医科大学附属病院において IgG4 関連疾患確定診断目的に外科的に摘出された顎下腺組織とし、正常対照群として顎下腺唾石症にて摘出された顎下腺または頸部郭清時に摘出された癌細胞の浸潤がない顎下腺とした。診断は臨床的診断基準を満たし、かつ病理組織学的に確定診断を得ている。

方法は、免疫組織・細胞染色法、GeneChip 解析、Flow cytometry、ELISA 法、HTRF アッセイ、RT-PCR 法、Western Blot 法、細胞周期解析法を用いている。培養法は以下に示す。

組織を 2 ~ 3 mm³ の小片に刻み ペニシリン (100U/およびストレプトマイシン (100 μ g/を含む PBS で 3 回洗浄した

0.5 μ g/mL の DNase I と 0.04 mg/mL のリベラーゼを添加した 10 mL のハンクス液で検体を懸濁し 37 $^{\circ}$ C で 15 分間バブリングしながらインキュベートした

300 μ m セルストレーナー 40 μ m セルストレーナーで濾過したものを 1200 rpm で 3 分間遠心分離した後 単離した細胞をラットテイルコラーゲンで被覆した 35mm または 60mm 培養皿に入れた

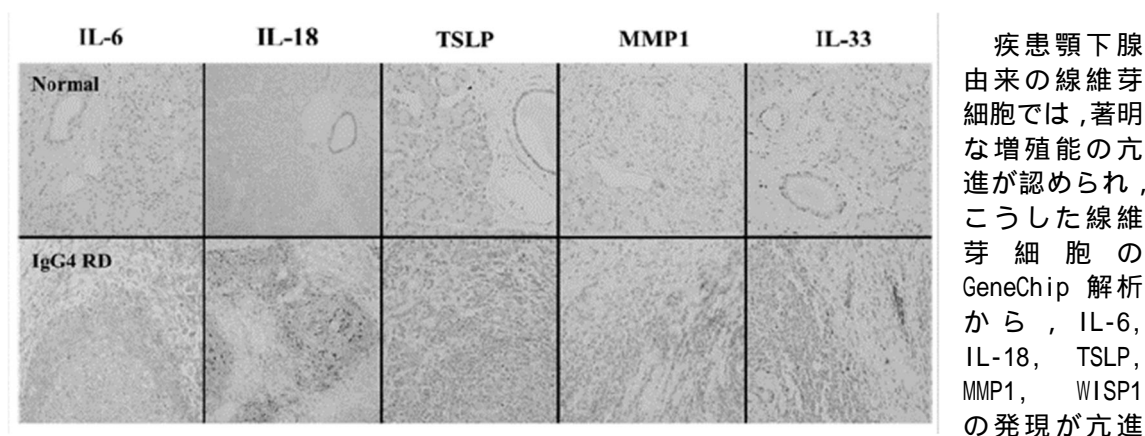
その後 10 %ウシ胎児血清、ペニシリン (100U/ml) ストレプトマイシン (100 μ g/ml) アムホテリシン B (50 μ g/ml)、および BEGM を含む BEBM 培地で満たした

細胞を上記の手順でサンプルあたり 4 ~ 5 回収集しインキュベーターで 37 度を維持した

4. 研究成果

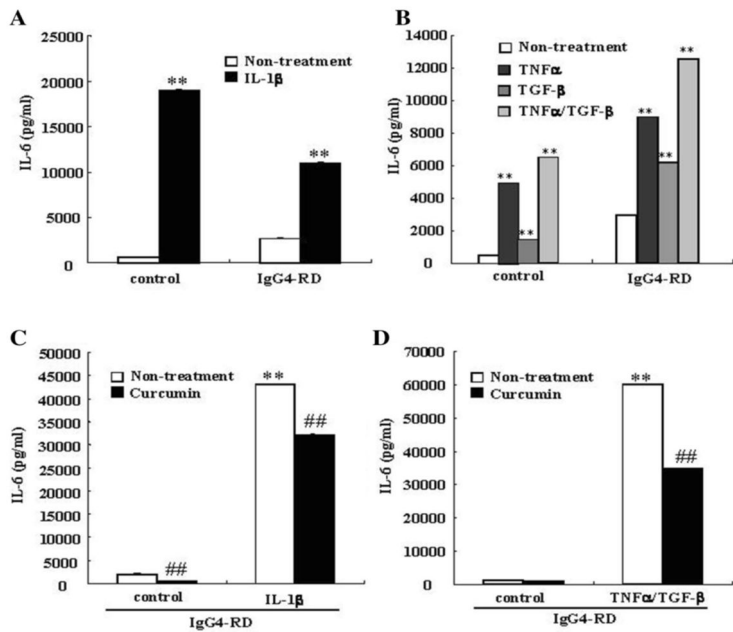
IgG4RD 患者由来の顎下腺組織において 図 1 に示すように IL-6、IL-18、TSLP、IL-33、MMP1 を発現する線維芽細胞様の細胞を多数認め、とりわけ IL-6、IL-18 の発現増加が認められた。

図 1 疾患由来および正常顎下腺組織における各サイトカインの発現比較



していることが明らかとなった。この結果は RT-PCR によって mRNA レベルでも確認した。

図2 顎下腺線維芽細胞におけるサイトカイン処理による IL-6 分泌の増加

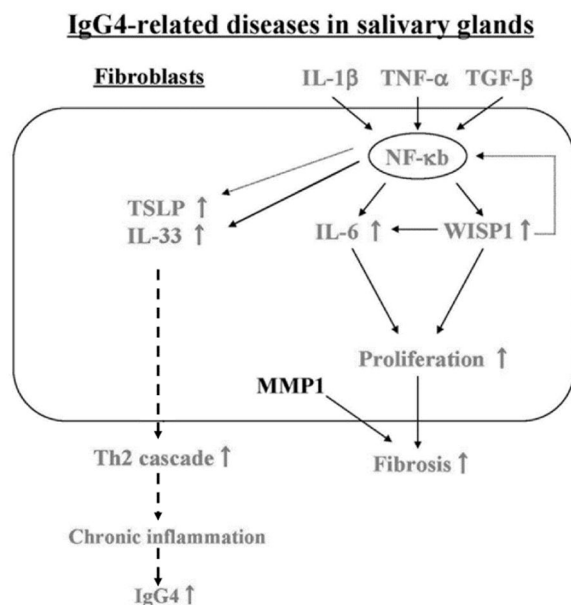


HTRF アッセイにより、疾患由来の顎下腺線維芽細胞では IL-6 の分泌が亢進しており、また細胞周期を解析すると G0/M1 期の減少と S 期 G2/M 期の増加が認められた。さらに、IL-1、TNF、TGF、TNF + TGF 処置により有意な IL-6 分泌増加が誘導され、この発現誘導は NF- κ B 阻害剤であるクルクミンによって阻害された (図 2)。

次に線維化関連因子として WISP1 (WNT1 inducible signaling pathway protein 1) に着目した。WISP1 は IL-6 と協同でヒト肺線維芽細胞の増殖を調節し、TGF- β 1 および TNF によって、時間および濃度依存的に誘導される。この WISP1 を線維芽細胞に処置することで IL-6 分泌増加が誘導され、正常由来線維芽細胞に WISP1 を処置すると G2/M 期の増加を認めた。

次に TSLP と IL-33 に着目し検討を行ったところ、疾患由来線維芽細胞において、両者とも発現するものの、TSLP は細胞質に、IL-33 は細胞核に集積が認められた。線維芽細胞に前述の各種サイトカイン処置を行うと、IL-33 陽性細胞核が増加し、この発現誘導には NF- κ B を介することを確認した。

本研究において得られた結果から、IgG4 関連硬化性唾液腺炎においてもたらされる腺組織の線維化は、右図に示すような、炎症性サイトカインによる NF- κ B を介した IL-6 および WISP1 誘導の線維芽細胞の増殖に密接に関連することが明らかとなった。IL-6、WISP1 は IgG4 関連疾患における新規バイオマーカーのみならず、抗線維化を目指した新たな治療標的となり得る可能性が示唆された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ito Fumie, Kamekura Ryuta, Yamamoto Motohisa, Takano Kenichi, Takaki Hiromi, Yabe Hayato, Ikegami Ippei, Shigehara Katsunori, Himi Tetsuo, Takahashi Hiroki, Ichimiya Shingo	4. 巻 207
2. 論文標題 IL-10+ T follicular regulatory cells are associated with the pathogenesis of IgG4-related disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Immunology Letters	6. 最初と最後の頁 56～63
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.imlet.2019.01.008	査読の有無 有
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 -
1. 著者名 Yabe Hayato, Kamekura Ryuta, Yamamoto Motohisa, Murayama Kosuke, Kamiya Shiori, Ikegami Ippei, Shigehara Katsunori, Takaki Hiromi, Chiba Hirofumi, Takahashi Hiroki, Takano Kenichi, Takahashi Hiroki, Ichimiya Shingo	4. 巻 --
2. 論文標題 Cytotoxic Tph-like cells are involved in persistent tissue damage in IgG4-related disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Modern Rheumatology	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） 10.1080/14397595.2020.1719576	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 -
1. 著者名 Takano Kenichi, Okuni Tsuyoshi, Yamamoto Keisuke, Kamekura Ryuta, Yajima Ryoto, Yamamoto Motohisa, Takahashi Hiroki, Himi Tetsuo	4. 巻 29
2. 論文標題 Potential utility of core needle biopsy in the diagnosis of IgG4-related dacryoadenitis and sialadenitis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Modern Rheumatology	6. 最初と最後の頁 393～396
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/14397595.2018.1465665	査読の有無 有
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 -
1. 著者名 Konno Takumi, Takano Kenichi, Kaneko Yakuto, Kakuki Takuya, Nomura Kazuaki, Yajima Ryoto, Kakiuchi Akito, Kohno Takayuki, Himi Tetsuo, Kojima Takashi	4. 巻 371
2. 論文標題 Guanylate binding protein-1-mediated epithelial barrier in human salivary gland duct epithelium	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Experimental Cell Research	6. 最初と最後の頁 31～41
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.yexcr.2018.07.033	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Yajima Ryoto, Takano Kenichi, Konno Takumi, Kohno Takayuki, Kaneko Yakuto, Kakuki Takuya, Nomura Kazuaki, Kakiuchi Akito, Himi Tetsuo, Kojima Takashi	4. 巻 49
2. 論文標題 Mechanism of fibrogenesis in submandibular glands in patients with IgG4-RD	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Molecular Histology	6. 最初と最後の頁 577 ~ 587
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10735-018-9796-x	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 -

1. 著者名 Ito Fumie, Kamekura Ryuta, Yamamoto Motohisa, Takano Kenichi, Takaki Hiromi, Yabe Hayato, Ikegami Ippei, Shigehara Katsunori, Himi Tetsuo, Takahashi Hiroki, Ichimiya Shingo	4. 巻 207
2. 論文標題 IL-10+ T follicular regulatory cells are associated with the pathogenesis of IgG4-related disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Immunology Letters	6. 最初と最後の頁 56 ~ 63
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.imlet.2019.01.008	査読の有無 有
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6件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 高野賢一
2. 発表標題 教育セミナー IgG4関連疾患
3. 学会等名 日本耳鼻咽喉科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高野賢一
2. 発表標題 耳鼻咽喉科における免疫アレルギー疾患-IgG4関連疾患を中心に
3. 学会等名 第309回山口県地方部会総会・学術講演会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大國 毅, 高野 賢一, 近藤 敦, 黒瀬 誠, 小幡 和史
2. 発表標題 IgG4関連唾液腺疾患の診断におけるCore Needle Biopsy(CNB)の有用性についての検討
3. 学会等名 日本口腔・咽頭科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 矢島 諒人, 高野 賢一, 氷見 徹夫, 小島 隆
2. 発表標題 IgG4関連疾患における顎下腺の線維化メカニズムの解析
3. 学会等名 日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 亀倉 隆太, 高野 賢一, 伊藤 史恵, 一宮 慎吾, 氷見 徹夫
2. 発表標題 IgG4関連涙腺・唾液腺炎の病態におけるperipheral helper T cellsの役割
3. 学会等名 日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高野賢一
2. 発表標題 耳鼻咽喉科医が知っておきたいIgG4関連疾患
3. 学会等名 第14回信州耳鼻咽喉科臨床問題懇話会(招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 高野賢一	4. 発行年 2018年
2. 出版社 全日本病院出版会	5. 総ページ数 5
3. 書名 ENTONI【みみ・はな・のど診断 これだけは行ってほしい決め手の検査】	

1. 著者名 高野賢一	4. 発行年 2018年
2. 出版社 全日本病院出版会	5. 総ページ数 5
3. 書名 ENTONI【子どもから大人までの唾液腺疾患-鑑別の要点-】	

〔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	亀倉 隆太 (KAMEKURA Ryuta) (70404697)	札幌医科大学・医学部・講師 (20101)	
研究分担者	矢島 諒人 (YAJIMA Ryoto) (90722455)	札幌医科大学・医学部・研究員 (20101)	
研究分担者	山本 圭佑 (YAMAMOTO Keisuke) (50738515)	札幌医科大学・医学部・助教 (20101)	

6. 研究組織（つづき）

	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	小島 隆 (KOJIMA Takashi) (30260764)	札幌医科大学・医学部・教授 (20101)	
研究分担者	一宮 慎吾 (ICHIMIYA Shingo) (30305221)	札幌医科大学・医学部・教授 (20101)	

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