

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 20 日現在

機関番号：33303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659503

研究課題名（和文） 新規疾患、IgG4 関連疾患の病因解明の為の研究

研究課題名（英文） Analysis of pathogenesis of IgG4-related disease

研究代表者

梅原 久範 (UMEHARA HISANORI)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：70247881

研究成果の概要（和文）：IgG4 関連疾患は、血清 IgG4 高値と IgG4 陽性形質細胞の腫瘍形成あるいは組織浸潤を特徴とする病態で、本邦から発信する新たな疾患概念である。未だその原因は不明であり、登録患者抹消血の DNA micro array 解析と血清蛋白の MALDI-MS/MS 解析を行い、IgG4 関連疾患の病因病態に関連する遺伝子蛋白を明らかにする。

研究成果の概要（英文）：IgG4-related disease (IgG4-RD) is a new disease concept first recognized in the 21st century. The condition is characterized by elevated serum IgG4 values and marked IgG4-positive plasma cell infiltration of affected lesions. Pathogenesis of IgG4-RD is still unclear. We have done DNA microarray and proteomics analysis to investigate its pathogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：医歯薬

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病アレルギー内科学

キーワード：膠原病学

1. 研究開始当初の背景

IgG4 関連疾患は、血清 IgG4 高値と IgG4 陽性形質細胞の腫瘍形成あるいは組織浸潤を特徴とする病態で、本邦から発信する新たな疾患概念である。そして、IgG4 関連疾患は全身の諸臓器に発生するという特徴があり、単一の診療科による病態解明および診断基準作成は不可能である。当研究班では、リウマチ膠原病、消化器、呼吸器、腎臓、内分泌および眼科、病理など多領域を網羅できる研究班を組織した。さらに、自己免疫性膵炎グループを中心に組織された厚労省 IgG4 研究岡崎班と協力し、正にオールジャパン体制として研究に取り組み、現在までに、「IgG4 関連疾患の病名統一」、「IgG4 関連疾患概念の確立」「IgG4 関連疾患包括診断基準」を世界に向けて発信してきた。本年 9 月には、日本シ

エーグレン学会を金沢で主宰し、世界で初めての IgG4 関連疾患国際シンポジウムも開催し、「日本の IgG4 関連疾患」の評価を国内外にアピールした。IgG4 関連疾患は病変が多臓器に及ぶ全身性の疾患ではあり、領域別臓器別の詳細な診断基準あるいは指針が必要となる。当研究班では、腎臓学会と協力し「IgG4 関連腎症診断基準」を制定した。新たに、呼吸器学会と協力し「IgG4 関連呼吸器疾患診断基準」制定を進めている。国内の推計罹患者数は 26000 人と推測される。現在、倫理委員会承認施設は 23 施設におよび、症例登録も 140 例に達した。現在、DNA micro array 解析、蛋白 SELDI-TOF-MS 解析を行ない病因遺伝子蛋白解析を行っている。

2. 研究の目的

IgG4 関連疾患は、血清 IgG4 高値を特徴としたリンパ増殖性の疾患で、組織中に著明な IgG4 陽性形質細胞の浸潤を特徴とする。最初に IgG4 の関与が報告された自己免疫性膵炎をはじめとして、ミクリッツ病、硬化性胆管炎、下垂体炎、Riedel 甲状腺炎、間質性肺炎、間質性腎炎、肥厚性硬膜炎、前立腺炎、リンパ節腫大、縦隔線維症、後腹膜線維症、炎症性大動脈瘤、冠動脈腫瘍性病変および乳腺、肺、肝などの炎症性偽腫瘍など多岐に渡る病態が IgG4 関連であることが報告されている。対称性の涙腺・顎下腺・耳下腺腫脹を有する症例は Mikulicz 病と呼ばれるが、欧米においては Mikulicz 病は独立した臨床的/病理学的疾患概念ではなくシェーグレン症候群の一表現型であると結論づけられている。しかし、本邦では自己免疫性膵炎における血清 IgG4 値高値や IgG4 陽性形質細胞浸潤、それと同様の所見が硬化性胆管炎、後腹膜線維症、キュツナー腫瘍、間質性腎炎および Mikulicz 病などでも認められることが報告されていた。当萌芽研究で IgG4 に関する DNA micro array 解析と血清蛋白の MALDI-MS/MS 解析を行い、IgG4 関連疾患の病因病態を明らかにしたい。

3. 研究の方法

全国の施設より IgG4 関連全身性疾患の登録はすでに 140 症例以上に上っている。

(1) 病理組織解析：(病理組織班)

IgG4 関連全身性疾患は病変組織に 50%以上のポリクローナルな IgG4 陽性形質細胞浸潤を特徴とする。

登録症例で使用可能な病理検体のあるものに関して、免疫染色により、CD3, CD4, CD8, CD56, CD20, CD38, IgG, IgG4, IgG2, IgE の組織染色を行った。

(2) DNA 解析：新たに登録され SRL から DNA 分離後送付されてきた検体については、IgG4 関連全身性疾患の診断確定後、Sjögren 症候群典型例および健常人の末梢血 DNA を対照として DNA micro-array にて遺伝子発現プロファイルを解析した。

①組織・細胞からの RNA の抽出には RNA 抽出キット RNeasy (QIAGEN) を利用して行なった。

②得られた RNA を用いて RT-PCR あるいは定量性のあるリアルタイム PCR (装置 7900HT (AB)) を行い、発現 mRNA 量の差異を測定した。

③各種遺伝子の発現レベルを網羅的に解析

するためには、抽出 RNA に標識等を施し、DNA チップ法—マイクロアレイ (Affymetrix) を活用した。

④この際に網羅的解析では費用および時間的に、有用な情報を得ることが困難と思われる。従って、1) 炎症関連遺伝子群、2) サイトカイン遺伝子群、3) ケモカイン遺伝子群、4) B 細胞のクラススイッチに関連する遺伝子群などの着目し解析を行なった。

(3) MALDI-MS/MS 解析：(金沢医科大学蛋白解析チーム：友杉直久教授他)

新たに登録され SRL から血清分離後送付されてきた検体については、分画をトリプシン処理し MALDI-MS/MS (AXIMA-TOF/TOF、島津) で配列解析し同定した。

①最終分画に含まれる標的蛋白質は、トリプシンなどの酵素を用い断片化し、得られた複数のペプチドの質量を島津製作所の AXIMA-TOF/TOF にて測定し、ゲノム情報などに基づいて作製されたタンパク質データベースと照合し、PMF (peptide massfingerprinting) 法で同定した。

②PMF に加え、AXIMA-TOF/TOF および nanoFrontier (LC-MS/MS) で蛋白質/ペプチドを同定した。

③より病態と関連した蛋白同定を行うために、同一症例で経時的にステロイド治療前後あるいは経過的に採取できた血清について SLEDI-TOF-MS 解析を行なった。

4. 研究成果

DNA マイクロアレイにて治療前後で発現量が 3 倍以上変化のあった遺伝子を 30 個抽出し、患者群および健常人群で 3 倍以上の差を認めた遺伝子を 21 個抽出した。その中から Charcot-Leyden crystal protein (CLC)、defensin alpha (DEFA)、interleukin 8 receptor (IL8R)、membrane-spanning 4-domains subfamily A member 3 (MS4A3) のリアルタイム PCR を行なった。患者群では、DEFA および MS4A3 の発現が有意に低く、治療前後では治療前で有意に低かった。CLC、IL8R は患者群で発現が有意に低かったが、治療前後において有意差はなかった。

また、病態関連候補遺伝子から自然免疫関連遺伝子の transcobalamin I (Vitamin B12 binding protein, R binder family) (TCN1)、bactericidal/permeability-increasing protein (BPI)、secretory leukocyte peptidase inhibitor (SLPI)、myeloperoxidase (MPO)、lactotransferrin (LTF) を選び、リアルタイム PCR を行なった。TCN1、SLPI、LTF は健常人-

患者間で患者群が有意に低下し、患者群の治療前後間で治療後に有意な上昇を認めた。BPI は健常人-患者間に有意差はなく、治療前後間は治療後に有意に上昇した。MPO は健常人-患者間、治療前後間ともに有意差はなかった。

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 10 件)

1. Umehara, H., K. Okazaki, Y. Masaki, M. Kawano, M. Yamamoto, T. Saeki, S. Matsui, T. 他 and all Japan IgG4 team "Comprehensive Diagnostic Criteria (CDC criteria) for IgG4-related disease (IgG4-RD), 2011." *Mod. Rheum.* 22(1): 21-30.2012 (査読あり)

2. Umehara, H., K. Okazaki, Y. Masaki, M. Kawano, M. Yamamoto, T. Saeki, S. Matsui, T. Sumida, T. Mimori, Y. Tanaka, K. 他 and the Research Program for Intractable Disease by Ministry of Health, Labor and Welfare (MHLW) Japan G4 team. "A Novel Clinical Entity, IgG4-Related Disease (IgG4RD) - General Concept and Details-" *Mod Rheum* 22(1): 1-14.2012 (査読あり)

3. Umehara, H. "A new clinical entity: IgG4-related disease (IgG4-RD) discovered in the 21st century." *Intern Med* 51(8): 821-822. 2012. (査読あり)

4. Ito K, Yamada K, Mizushima I, Aizu M, Fujii H, Mizutomi K, Matsumura M, Hayashi K, Yamagishi M, Umehara H, Yamaguchi Y, Nagata M, and Kawano M. Henoch-Schonlein purpura nephritis in a patient with IgG4-related disease: A possible association. *Clin Nephrol*, (accession number 22841022) 2012. (査読あり)

5. Stone, J. H., A. Khosroshahi, V. Deshpande, J. H. Umehara, 他 . "IgG4-Related Disease: Recommendations for the Nomenclature of this Condition and its Individual Organ System Manifestations." *Arthritis & Rheumatism.* 64: 3061-3067, 2012 (査読あり)

6. Okazaki, K. and H. Umehara "Are Classification Criteria for IgG4-RD Now Possible? The Concept of IgG4-Related Disease and Proposal of Comprehensive Diagnostic Criteria in Japan." *Int J Rheumatol* 2012: 357071. 2012. (査読あり)

7. Masaki, Y., N. Kurose, M. Yamamoto, H., H. Umehara 他. "Cutoff Values of Serum IgG4 and Histopathological IgG4+ Plasma Cells for

Diagnosis of Patients with IgG4-Related Disease." *Int. J. Rheumatol.* doi:10.1155/2012/580814.2012 (査読あり)

8. Deshpande, V., Y. Zen, J. K. C. Chan, E. Yi, Y. Sato, T. Yoshino, Umehara 他 . "Consensus Statement on the Pathology of IgG4-related disease." *Mod. Pathol.* 2012(1-12). 2012. (査読あり)

9. Kawano M, Saeki T, Nakashima H, Nishi S, Yamaguchi Y, Hisano S, Umehara H, 他 . Proposal for diagnostic criteria for IgG4-related kidney disease. *Clin Exp Nephrol* 2011;15(5):615-626. (査読あり)

10. Masaki Y, Iwao H, Nakajima A, Miki M, Sugai S, Umehara H. IgG4-Related Disease (IgG4+MOLPS) - Diagnostic Criteria and Diagnostic Problems. *Current Immunology Reviews* 2011;7:172-77. (査読あり)

[学会発表] (計 3 件)

1. 梅原久範。第 8 6 回日本内分泌学会総会、指定シンポジウム、「IgG4 関連疾患発見の経緯と概念」平成 2 5 年 4 月 2 7 日、仙台。

2. 梅原久範。第 5 7 回日本リウマチ学会シンポジウム「IgG4 関連疾患包括診断基準」平成 2 5 年 4 月 2 0 日、京都。

3. 梅原久範。第 2 0 回日本シェーグレン学会、会長講演「IgG4 関連疾患の誕生 - 今、日本から世界にむけて発信！」平成 2 3 年 9 月 9 日、金沢。

[図書] (計 1 件)

IgG4 関連疾患アトラス、監修梅原久範、岡崎和一、2012、199 頁。前田書店、金沢

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梅原 久範 (UMEHARA HISANORI)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：70247881

(2) 研究分担者

竹上 勉 (TAKEGAMI TSUTOMU)

金沢医科大学・総合医学研究所・教授

研究者番号：10113490

友杉 直久 (TOMOSUGI NAOHISA)

金沢医科大学・総合医学研究所・教授

研究者番号：80155580

(3) 連携研究者

福島 俊洋 (FUKUSHIMA TOSHIHIRO)

金沢医科大学・医学部・准教授
研究者番号：60251998

正木 康史 (MASAKI YASUFUMI)
金沢医科大学・医学部・准教授
研究者番号：40238895

河南 崇典 (KAWANAMI TAKAFUMI)
金沢医科大学・医学部・講師
研究者番号：20350762

藤田 義正 (FUJITA YOSHIMASA)
金沢医科大学・医学部・講師
研究者番号：70450880

石垣 靖人 (ISHIGAKI YASUTO)
金沢医科大学・総合医学研究所・講師
研究者番号：20232275

澤木 俊興 (SAWAKI TOSHIOKI)
金沢医科大学・医学部・助教
研究者番号：90534694
(H23)

坂井 知之 (SAKAI TOMOYUKI)
金沢医科大学・医学部・助教
研究者番号：90566902