

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591158

研究課題名(和文)モデルマウスを用いたIgG4関連呼吸器疾患の基礎的研究

研究課題名(英文)Basic study of IgG4-related respiratory disease using the model mouse

研究代表者

松井 祥子(Matsui, Shoko)

富山大学・保健管理センター・准教授

研究者番号：40334726

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々はTh2 優位の免疫反応とリンパ増殖性疾患を自然発症するLATY136Fknock-inマウス(LATマウス)が、IgG4 関連疾患の動物モデルとなり得るかについて、その肺病変を検討した。肺の病理学的検討では、LATマウス4週目以降、気管支血管束周囲にリンパ増殖性疾患を発症することが明らかとなった。また肺の線維化は週齢に伴い進行し、著明な炎症細胞浸潤を認めた。気管支肺胞洗浄液でもリンパ球優位であり、ヒトのIgG4関連疾患類似の結果であった。これらの結果より、LATマウスはIgG4関連呼吸器疾患のモデルとなる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：LATY136F Knock-in mice (LAT mice), having a mutation in Tyr136 of the linker for activation of T cells, show accumulation of Th2 effector cells. IgG4-related disease (IgG4-RD) is a novel clinical disease entity characterized by elevated serum IgG4 concentration and tumefaction or tissue infiltration by IgG4 positive plasma cells. We examined lung lesion of LAT mice whether they became the model of IgG4-RD. Lung fibrosis score were significantly higher in Homo group than in Wild group and there were tissue infiltration by lymphocytes and IgG1 positive plasma cells around broncho-vascular bundles. In analysis of bronchoalveolar lavage, total cell count and percentage of lymphocyte increased in Homo group. The feature of lung lesion of LAT mice has a similar with them of IgG4-RD. We considered that they could be a model of IgG4-RD.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：IgG4関連疾患 IgG4関連呼吸器疾患

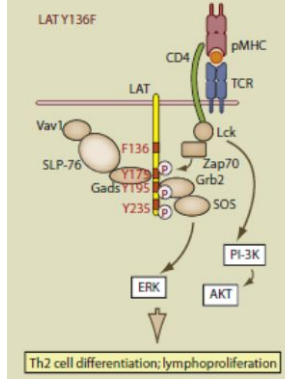
1. 研究開始当初の背景

免疫グロブリン IgG のサブクラスの一つである IgG4 が関連する「IgG4 関連疾患」は、21 世紀に提唱された新たな疾患概念である。本疾患は、血清 IgG4 の上昇と全身の諸臓器に IgG4 陽性細胞浸潤と線維化をきたす疾患である。その原因は不明であるが、同時性あるいは異時に病変が生じ、ステロイド治療に反応することや再燃・再発を来しやすいことも知られている。

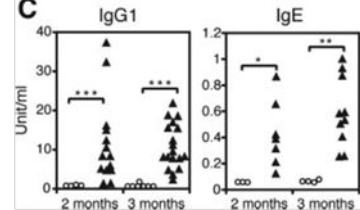
多施設共同の臨床研究では、IgG4 関連疾患の臨床的特徴として、発症時や患者背景にアレルギー症状があり、好酸球増多や高 IgE 血症が認められることから、その病態に Th2 反応が関与していることが示唆された。また病変局所でも Th2 優位のサイトカイン産生がおり、Treg が増加し IL-10、TGF- β 等のサイトカイン産生により局所の線維化と IgG4 陽性形質細胞の増加が認められる事も報告された。また呼吸器病変の臨床研究から、本疾患がリンパ路沿いに病変を生じること明らかにした。

LAT knock-in マウスは、フランスの Dr. Malissen らによって作製された Th2 優位の免疫応答とリンパ増殖性疾患を来す免疫異常マウスである。T 細胞活性化リンカー (Linker for activation of T cell; LAT) は T 細胞レセプターの下流に位置する細胞内シグナル伝達を司る分子であり、Zap70 によりリン酸化され更に下流の蛋白へとシグナルを伝える役割を果たす(右欄の図 1 参照: 文献 より引用)。LAT knock-in マウスは、LAT の 136 番目のチロシンがフェニルアラニンに変異したマウスであり、血清中の IgG1 (ヒトの IgG4 に対応) および IgE の高値を示し、肺、肝臓、腎臓へのポリクローナルな形質細胞浸潤を来すことが知られている(右欄の図 2, 3 参照: 文献 より引用)。

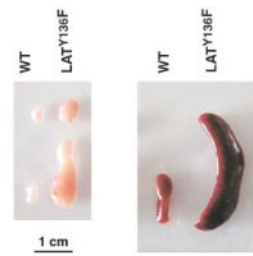
< 図 1 : 細胞内シグナル伝達 >



< 図 2 : 血清 IgG1(左)と IgE(右) >



< 図 3 : 鼠径部・腸間膜リンパ節(左)と脾臓(右) >



2. 研究の目的

Lat Y136F knock-in マウスは、前述のように Th2 優位の免疫応答とリンパ増殖性疾患を来す免疫異常マウスであるが、共同研究者の金沢大学、川野・山田等は、本マウスが、血清 IgG1 の上昇を認め、また脾臓、腎臓、唾液腺において、ヒト IgG4 関連疾患と類似する組織像を示すことを確認した。そこで我々は、Lat Y136F knock-in マウスの肺病変の解析を行い、Lat Y136F knock-in マウスが IgG4 関連疾患の動物モデルとなり得るかを探求することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) Lat Y136F knock-in マウスの肺の病理学

的検討

Lat Y136F knock-in マウス4、6、10、20週齢における肺組織を採取し、HEおよびアザン染色を行い、病理組織学的検討を行った。また線維化の評価をAshcroft scoreを用いて行った。

(2) Lat Y136F knock-in マウスの肺・気道病変における免疫学的評価

6~10週齢のLat Y136F knock-in マウスおよび野生種マウスの気管支肺胞洗浄液を回収し、サイトカインについて比較検討した。

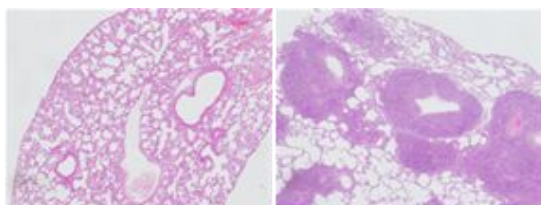
(3) ステロイド治療の反応性

4週齢のLat Y136F knock-in マウスに生理食塩水またはステロイドを腹腔内投与し、6週齢における肺病変を比較検討した。

4. 研究成果

(1) Lat Y136F knock-in マウスの肺の病理学的検討

Lat Y136F knock-in マウスは、4週齢より肺に炎症細胞浸潤および線維化を認めた。



<左：野生種の肺組織> HE染色 X40

<右：Lat Y136F knock-in マウスの肺組織> 病変部位は上図のように、気管支血管束を中心に形成されており、4週齢、6週齢と週齢が進むにつれて、IgGおよびIgG1陽性細胞浸潤を強く認めていた。

線維化スコアは、4週齢のLat Y136F knock-in マウスおよび野生種において、それぞれ2点、0点であり、有意にLat Y136F knock-in マウスで高かった。また6週齢のLat Y136F knock-in マウスでは5点、野生種は1点、20週齢のLat Y136F knock-in マウスは6点、野生種は1点であり、炎症性細胞浸潤と同様に週齢が進むにつれて、有意に線維化スコアの上昇が認められた。

(2) Lat Y136F knock-in マウスの肺・気道病変における免疫学的評価

6~10週齢のLat Y136F knock-in マウスおよび野生種マウスにおいて、気管支肺胞洗浄液を行い、その洗浄液を回収し解析を行った。その結果、Lat Y136F knock-in マウスは野生種マウスに比して、有意に総細胞数とリンパ球数の増加を認めた(総細胞数 $11.9 \pm 8.1 \times 10^5 / \mu\text{l}$ ($p < 0.01$), リンパ球数 $10.4 \pm 7.3 \times 10^5 / \mu\text{l}$ ($p < 0.01$)). またサイトカインについては、IL-4、IL13などTh2サイトカインがLat Y136F knock-in マウスでは野生種に比して高い結果が得られた (IL-4: 2.87 ± 2.55 pg/mL vs. 1.35 ± 0.67 pg/mL, $p = 0.08$, IL-13: 0.80 ± 0.82 pg/mL vs. 0.47 ± 0.15 pg/mL, $p < 0.01$). 一方、炎症の指標であるIL-6はLat Y136F knock-in マウス、野生種マウスともに上昇は認めず、Th1サイトカインであるIFNは野生種に比して低値であった。またTregに誘導されると考えられるTGF- β 1は有意に上昇を認めていた (207.7 ± 238.6 pg/mL vs. 64.9 ± 32.5 pg/mL, $p < 0.01$).

(3) ステロイド治療の反応性

ステロイドの反応性については、ステロイドを投与したLat Y136F knock-in マウス群(n=7)は生食を投与した群(n=6)に比して、有意に肺重量の低下が認められたことから、ステロイドによる炎症の進展抑制が示唆された。また線維化スコアにおいても、Ashcroft scoreでは生食投与群が5点に比してステロイド投与群は3点であり、有意に肺病変の線維化の進行抑制が認められた ($p < 0.05$).

以上(1)(2)(3)の結果より、Lat Y136F knock-in マウスは、1)肺組織において4週齢よりIgG1(ヒトIgG4に対応)陽性細胞浸潤と線維化を認め、週齢がすすむにつれて炎症部位の進展が認められること、2)炎症部位はステロイドに反応すること、3)肺の炎症部位での気管支肺胞洗浄液中のTh2サイトカイン

の上昇を認めたこと、が確認できた。したがって Lat Y136F knock-in マウスは、肺病変においてもヒト IgG4 関連疾患と類似した特徴を有することから、IgG4 関連疾患のモデルマウスになり得ると考えられた。

<引用文献>

Brownli R, et al. LAT polices T cell activation. *Immunity* 2009;31:174-176.

Aguado E, et al. Induction of T helper type 2 immunity by a pointmutation in the LAT adaptor. *Science* 2002; 296: 2036-40.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Umehara H, Nakajima A, Nakamura T, Kawanami T, Tanaka M, Dong L, Kawano M:IgG4-related disease and its pathogenesis-cross-talk between innate and acquired immunity. *Int Immunol.* 26;585-95,2014. 査読無
doi: 10.1093/intimm/dxu074.

Matsui S, Hebisawa A, Sakai F,et al. Immunoglobulin G4-related lung disease: clinicoradiological and pathological features. *Respirology.* 18:480-7, 2013. 査読有
doi: 10.1111/resp.12016

〔学会発表〕(計 6 件)

早稲田優子、松井祥子、佐伯啓吾、渡辺知志、松沼 亮、高戸葉月、市川由加里、安井正英、山田和徳、川野充弘、笠原寿郎 . IgG4 関連肺疾患モデルマウスの確立 . 第 55 回日本呼吸器学会学術講演会 ; 2015 Spr.17-19 ; 東京.

山田和徳、早稲田優子、塚雅彦、渡辺知志、伊藤清亮、林龍二、川野充弘、松井祥子 . IgG4 関連疾患モデルマウスの確立 ~ Lat Y136F knock-in マウスの肺病変の解析 ~ . 第 23 回日本シェーグレン症候群学会学術集会 ; 2014 Sep 12-13 ; 長崎.

Waseda Y, Matsui S, Yamada K, Watanabe S, Itho K, Matsunuma R, Takato H, Kawano M, Kasahara K. Evaluation of Lung Lesions in *LAT^{Y136F}* Mutant Mice ~Are They recognized as the models of IgG4 related lung disease?~. ERS annual congress 2014; 2014 Sep 6-10; Munich .

Matsui S, Tokui K, Okazawa S, Kambara K, Inomata M, Suzuki K, Yamada T, Miwa T, Hayashi R, Tobe K. Allergic manifestations in IgG4-related disease. ATS 2014 International Conference; 2014 May 17-21; San Diego.

Matsui S. Intrathoracic involvement in IgG4-related disease. 12th International symposium on Sjögren's syndrome, 2013 Oct9-12;Kyoto.

Matsui S, Hayashi R, et al. Comparison of clinical features in igG4-related disease and sarcoidosis. ATS 2013 International Conference, 2013 May 17-22; Philadelphia.

〔図書〕(計 2 件)

山田和徳、塚正彦、川野充弘 . 前田書店、IgG4 関連疾患 実践的臨床から病因へ、2015、206.

Matsui S, et al. Springer; 2014, IgG4-related disease; 163.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :

取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松井 祥子 (MATSUI, Shoko)
富山大学・保健管理センター・准教授
研究者番号：40334726

(2) 研究分担者

川野 充弘 (KAWANO, Mitsuhiro)
金沢大学・大学病院・講師
研究者番号：20361983

林 龍二 (HAYASHI, Ryuji)
富山大学・大学病院・講師
研究者番号：60345585

山田 和徳 (YAMADA, Kazunori)
金沢大学・医薬保健学総合研究科・特任准
教授
研究者番号：90397224

(3) 連携研究者

()

研究者番号：