

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24591459

研究課題名(和文) 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

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

研究代表者

岩男 悠 (IWAO, Haruka)

金沢医科大学・医学部・助教

研究者番号：10612244

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：IgG4関連疾患治療前後および健常人の血清を用い、疾患特異的に変動する代謝物のパターンを解析し、疾患により生じた代謝の変動から、IgG4関連疾患の病因および疾患特異的に増減するマーカーの探索を行った。解析については分子量約50-1000の糖・アミノ酸・核酸・脂質を解析対象とした。血液検体を前処理し、極性代謝低分子を質量分析装置を用い計測した。その結果、IgG4関連疾患群では、アラキドン酸が高く、起炎性の脂質メディエーターが健常人群に比べ、治療前後とも高い値を示した。産生亢進が認められた起炎性の脂質メディエーターは、IgG4関連疾患群で高値を示し、その値は、ステロイド治療によって変動しなかった。

研究成果の概要(英文)：IgG4-related disease is indicated by increased infiltration of IgG4-positive plasma cells, typically elevated IgG4 serum levels and the formation of lymphoplasmacytic infiltrate in one or more organs. We explored the metabolome of >400 small molecules in serum from 10 matched pair IgG4-related disease subjects prior to (PRE) and following (POST) steroid treatment and contrast these profiles with a cohort of 10 normal non-diseased subjects (NORM). The polyunsaturated fatty acid arachidonate is involved in pro-inflammatory activities through its metabolism to the pro-inflammatory prostaglandins via cyclooxygenase activity and HETEs via lipoxygenases. Individuals with PRE IgG4-related disease had elevated arachidonate and the 12-lipoxygenase product, 12-HETE, as compared to NORM subjects. The higher levels of the pro-inflammatory arachidonate and 12-HETE was unaffected by steroid treatment as POST subjects had similar levels of these biochemicals as was observed in PRE subjects.

研究分野：膠原病学、血液学

キーワード：IgG4関連疾患 メタボロミクス 脂質メディエーター

1. 研究開始当初の背景

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、全身の諸臓器に腫瘍性病変を形成し多彩な症状を呈する。血清学的には高 IgG4 血症(135 mg/dl 以上)を特徴とし、症状は各臓器ごとに異なる。罹患臓器は多彩であるが、いずれの臓器に発生しても組織学的に、IgG4 陽性形質細胞の浸潤と線維性・硬化性病変といった共通の病理学的特徴を示しており、発生臓器にかかわらず共通の病因、病態の存在が推定される。また、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、ステロイド治療が極めて良いという新たな疾患で、リウマチ膠原病領域および自己免疫性膵炎をはじめ多領域で注目を浴びている。

現時点では、IgG4 関連疾患の原因は不明であるが、臨床像については症例の蓄積とともにいくつかの特徴が見出されている。IgG4 関連疾患は、アレルギー疾患の併発を特徴とし、比較的ゆっくりと全身諸臓器に IgG4 陽性形質細胞が浸潤し、徐々に腫瘍形成から臓器障害に至る疾患である。その発症様式は、持続する免疫異常により炎症が遷延するという慢性炎症そのものと考えられる。しかし、(1)IgG4 関連疾患における暴露抗原、(2) *Helicobacter pylori* 感染による特発性血小板減少性紫斑病や、自己免疫性膵炎の発症のようなトリガーとなる病原菌、あるいは体内タンパク質の存在など、IgG4 中心の免疫反応を引き起こしうる抗原についてはほとんど解明されていない。また、(3)樹状細胞による抗原提示機能やサイトカイン産生能など自然免疫系の活性化、(4)アレルギーを起こす Th1/Th2 細胞のバランス異常を来すサイトカイン産生異常についても不明な点は多く、解明すべき多くの問題が存在する。

IgG4 関連疾患は病変の発生する臓器や頻度、時期などは異なるものの、その病因や病変部での制御機構、病態形成に関しては共通する可能性が高く、病変は全身性に分布するが、一つの疾患単位であると考えられる。IgG4 関連疾患の病態は、局所病変から臓器病変へ、さらに多臓器病変へと進展する多段階のステップがあり、その要因や病態を一つの遺伝子やタンパク質変化だけで説明することは出来ない。そこで本研究ではメタボロームの視点から IgG4 関連疾患を理解するため、IgG4 関連疾患の治療前後および健康人における血清を用い、疾患特有の代謝物のパターンを網羅的に解析し、疾患特異的に増減するバイオマーカー探索を行うこととした。

2. 研究の目的

新しい疾患単位である IgG4 関連疾患の病因・病態、またその機序を理解するため、IgG4 関連疾患患者の治療前後、また、健康人血清を用い、IgG4 関連疾患の疾患特異的に変動する代謝物群のパターン解析を行い、疾患や治療により変動する代謝物をメタボローム

の手法を用い解析する。

3. 研究の方法

「IgG4 関連多臓器リンパ増殖症候群、Castleman 病その他の多クローン性高 γ グロブリン血症の鑑別診断のための多施設共同前方視的臨床研究」を介して、全国から収集された IgG4 関連疾患患者検体を、IgG4 関連疾患包括診断基準 (Comprehensive Diagnostic Criteria for IgG4-related disease (IgG4-RD), 2011) のアルゴリズムに当てはめ、確定群、擬診群、正確診群、否定群に分けるとともに、疾患、臓器別にカテゴリーを行った。IgG4 関連疾患包括診断基準を満たす血清 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 肉芽種、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 6 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。治療前(PRE)、治療後(POST)、健康人コントロール(NORM)の血清それぞれ 10 例準備し、3 群間、n=10 例で、治療前・後、患者・健康人間での解析を行った。

本研究では、IgG4 関連疾患におけるアレルギー反応に着目し、メタボロームの視点から解析を行った。解析については、ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ株式会社(HMT)のライブラリに登録された代謝物質(分子量約 50~1000 の糖・アミノ酸・核酸・脂質等)を解析対象とし、アレルギー反応に関連する代謝低分子を中心に解析を行った。実際の測定については、それぞれの血液サンプル 200 μ l を前処理し、MeOH/H₂O 画分中の極性代謝低分子を、HMT のキャピラリー電気泳動-質量分析装置(CE-MS)を用い計測を行った。得られたデータは、病態群、投薬群、コントロール群に有意な差があるか、群間差の比較はどうなっているか、目的的分離傾向がある因子の抽出はどうするかなど有意差検定、Ratio 比較、多変量解析を組み合わせ、検討を行った。

データの解釈

- 有意差検定
- Ratio比較
- 多変量解析



解析後、多量の検出値が得られるが、病態群、投薬群、コントロール群に有意な差があるか、群間差の比較はどうなっているか、群内の分散はどうなっているか、目的的分離傾向がある因子の抽出はどうするかなどをいくつかの解析を組み合わせ、スクリーニングを行う。

4. 研究成果

登録された症例は104例。その内訳は、IgG4関連疾患(IgG4-RD)確定診断65例、同疑診29例、Sjogren症候群2例、Castleman病4例、その他であった。IgG4-RD確定診断例の平均年齢は64.0歳、男性41人、女性20人であった。障害臓器は、単独25例のうち唾液腺14例、膵4例、眼窩3例等であった。また、2臓器22例、3臓器以上18例だった。臓器別の内訳は、唾液腺35例、膵19例、涙腺12例、リンパ節12例、後腹膜線維症10例、眼窩8例、甲状腺8例、胆管6例、前立腺4例、腎4例、肺3例等であった。また14例にアレルギー性鼻炎、8例に気管支喘息がみられた。検査所見各平均値は、IgG 2252.7mg/dL、IgG1 1092.6mg/dL、IgG2 809.2mg/dL、IgG3 77.8mg/dL、IgG4 715.4mg/dL、IgE 536.8mg/dL、好酸球5.0%だった。C3 87.3mg/dL、C4 18.8mg/dL、CH50 42.8mg/dLと基準値内であった。IL-6 2.55pg/mL、CRP 1.46mg/dL、RF 7.8U/mL、抗核抗体陽性18例(Homogeneous7例、Speckled3例等)であった。カテゴリー分けした確定群の治療前(PRE)、治療後(POST)の血清、および健常人コントロール(NORM)の血清それぞれ10例準備し、3群間、n=10例で、治療前・後、患者・健常人間での解析を行った。IgG4関連疾患で、治療後に変動した代謝物群は93、また、健常人、IgG4関連疾患群で変動を示した代謝物群は118だった。

IgG4 関連疾患で変動が認められた代謝物

Statistical Comparisons		
Welch's Two-Sample t-Test	PRE NORM	POST NORM
Total biochemicals p<0.05	118	84
Biochemicals (↑↓)	24 94	31 53
Total biochemicals 0.05<p<0.10	42	34
Biochemicals (↑↓)	13 29	12 22

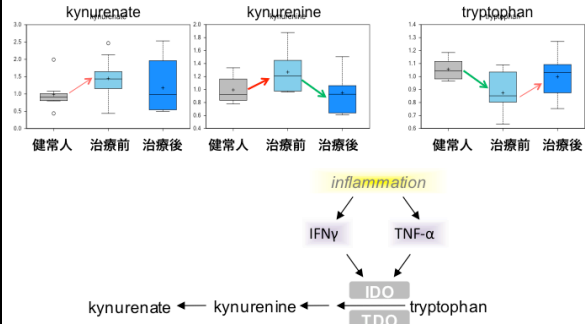
Statistical Comparisons	
Matched Pairs t-Test	POST PRE
Total biochemicals p<0.05	93
Biochemicals (↑↓)	70 23
Total biochemicals 0.05<p<0.10	26
Biochemicals (↑↓)	20 6

From a total of 439 named biochemicals

IgG4 関連疾患は、アレルギー疾患の併発を特徴とし、持続する免疫異常により炎症が遷延する慢性炎症性疾患である。体内免疫系の過剰反応によって引き起こされるアレルギー反応が、IgG4 関連疾患の病態に関与する可能性は高い。アレルギー疾患は、抗原・抗体といったタンパク質や白血球細胞、病原菌などがそのトリガーであるが、代謝低分子の中に重要な役割を持つものも存在する。解析を行った代謝低分子の内、治療前後また、健常人と患者間で有意な変動を示した代謝物の特定と検定を行った。

トリプトファンジオキシングナーゼ(TDO)、インドールアミン 2,3 ジオキシングナーゼ(IDO)は、トリプトファン代謝酵素の一つで、肝臓では、NAD 生合成経路で、トリプトファンからキヌレニンへ酸化される。ステロイド治療により炎症性サイトカインが減少し、IFN γ や、TNF- α によって活性化される IDO が減少し、結果として、tryptophan から kynurenine の産生が減少していることが明らかとなった。この結果は、ステロイド治療による炎症の低下を示している。

ステロイド治療はIDO活性を低下させる



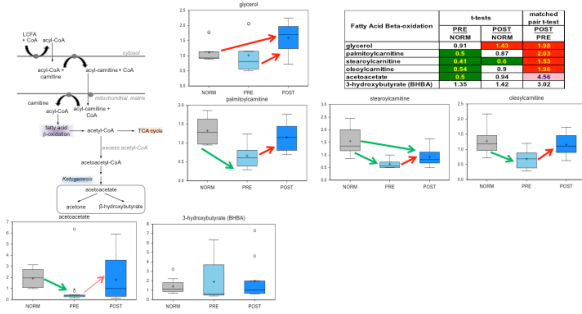
また、内在性のステロイドは、外からのステロイド治療により減少するという結果が示された。これら2つの結果は、ステロイド治療による炎症の低下を示していた。

内在性のステロイドは、ステロイド治療により減少する

Endogenously Produced Steroids	t-tests		matched pair t-test
	PRE NORM	POST NORM	POST PRE
pregnenolone sulfate	0.93	0.25	0.29
pregnen-diol disulfate*	1.04	0.27	0.28
pregn steroid monosulfate*	0.88	0.18	0.21
pregnanediol-3-glucuronide	0.82	0.7	0.94
cortisol	1.03	0.18	0.2
cortisone	0.83	0.42	0.58
dehydroisoandrosterone sulfate (DHEA-S)	0.5	0.14	0.28
epiandrosterone sulfate	0.57	0.37	1.43
androsterone sulfate	0.63	0.41	1.11
4-androsten-3beta,17beta-diol disulfate 1*	0.42	0.15	0.43
4-androsten-3beta,17beta-diol disulfate 2*	0.98	0.27	0.32
5alpha-androstan-3beta,17alpha-diol disulfate	0.65	0.44	0.83
5alpha-androstan-3alpha,17beta-diol disulfate	0.76	0.59	0.86
5alpha-androstan-3beta,17beta-diol disulfate	0.56	0.32	0.74
andro steroid monosulfate 2*	0.95	0.18	0.26

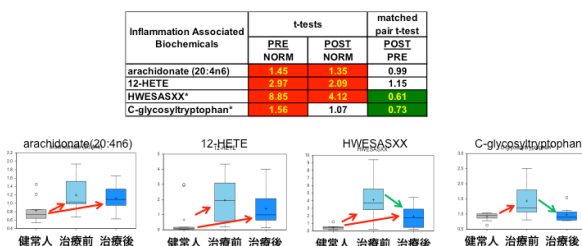
次に、ステロイド治療による代謝プロファイルの変化について検討を行った。ステロイドは、肝臓での糖代謝(糖新生)、筋肉での蛋白質代謝、脂肪組織での脂質代謝(中性脂肪の代謝)に影響を与え、結果的に、グルコースの血液中への供給を増加させた。本解析において、ステロイド治療による脂肪酸の β 酸化の亢進が認められた。

ステロイド治療により脂肪酸β酸化が亢進する



多価不飽和脂肪酸は、シクロオキシゲナーゼや、リポキシゲナーゼなどの酸化酵素によって活性代謝物に変換され、これらは脂質メディエーターとして様々な生体調節機能を担っている。脂質メディエーターはこれまで、極めて微量であること、半減期が短いこと、直接遺伝子にコードされないことなどから、横断的・総論的な研究はなされていなかった。しかし近年、高感度な質量分析計の開発により、脂質メディエーターの網羅的な定性・定量解析が可能となり、多種多様で、微量な脂質が生体内に存在し、生理的あるいは病理的条件下でそのレベルが変動することが報告されている。IgG4 関連疾患患者・健常人間、また治療前・治療後群で特異な変動を示す脂質メディエーターについて検討を行ったところ、IgG4 関連疾患群では、アラキドン酸 (arachidonate(20:4n6)) が高く、起炎性の脂質メディエーターである 12-HETE が健常人群に比べ、治療前・治療後とも高い値を示した。また、その値は、ステロイド治療後も、低下しなかった。IgG4 関連疾患は、ステロイド治療により症状は著明に改善するが、ステロイド治療を中止すると高率に再発することが知られている。ステロイド治療で症状は改善しても、その根本的な原因は潜在していると考えられる。起炎性の脂質メディエーターが、IgG4 関連疾患群で高値を示し、またその値は、ステロイド治療によって変動しないことから、これらの起炎性メディエーターが、IgG4 関連疾患の炎症の遷延化に関連することが推察された。

起炎性脂質メディエーターとIgG4関連疾患



起炎性の脂質メディエーターが、IgG4 関連疾患群では高値を示し、ステロイド治療によって変動しない点は、IgG4 関連疾患の持続する免疫異常により炎症が遷延するという慢性炎症性疾患の一因とも考えられる。脂質メ

ディエーターは、アラキドン酸由来のエICOSANOIDのように起炎性に働くものもあれば、一方で、リポキシシン、レゾルビン、プロテクチンなど、強い抗炎症作用を持つ脂肪酸代謝物もある。炎症の遷延化には、炎症を促進する「起炎性脂質メディエーター」と、炎症の制御に関与する「抗炎症性脂質代謝物」のバランスとその制御が重要な役割を果たしていると考えられている。IgG4 関連疾患の炎症の「発生と収束」に関わる脂質メディエーターとそのバランス制御を明らかにするため、IgG4 関連疾患群で高値を示したアラキドン酸由来の起炎性および抗炎症活性を有する n-6 系のアラキドン酸由来起炎性メディエーターを網羅的に解析し、現在、得られた結果をパスウェイデータベース Ingenuity Pathways Analysis (IPA) に落とし込み、転写・代謝プロファイルを作成し、代謝機能による分類を行っている。

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 16 件)

①. Fujita Y, Fujii T, Shimizu H, Sato T, Nakamura T, Iwao H, Nakajima A, Miki M, Sakai T, Kawanami T, Tanaka M, Masaki Y, Fukushima T, Okazaki T, Umehara H, Mimori T. Isolation of vascular smooth muscle antigen-reactive CD4(+) $\alpha\beta$ Th1 clones that induce pulmonary vasculitis in MRL/Mp-Fas(+/+) mice. *Cell Immunol.* 303:50-54, 2016, 査読有

②. Masaki Y, Kawabata H, Takai K, Kojima M, Tsukamoto N, Ishigaki Y, Kurose N, Ide M, Murakami J, Nara K, Yamamoto H, Ozawa Y, Takahashi H, Miura K, Miyauchi T, Yoshida S, Momoi A, Awano N, Ikushima S, Ohta Y, Furuta N, Fujimoto S, Kawanami(Iwao) H, Sakai T, Kawanami T, Fujita Y, Fukushima T, Nakamura S, Kinoshita T, Aoki S. Proposed diagnostic criteria, disease severity classification and treatment strategy for TAFRO syndrome, 2015 version. *Int J Hematol.*, in press, 2016, 査読有

③. Nakajima A, Masaki Y, Nakamura T, Kawanami T, Iwao H, et al. (他 27 名, 2, 4, 25 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

④. Nakamura TS, Kurose N, Kawanami T, Iwao-Kawanami H, Masaki Y. et al. (他 7 名, 3, 5, 12 番目) CD14⁺ follicular

dendritic cells in lymphoid follicles may play a role in the pathogenesis of IgG4-related disease. *Biomedical Res*, 36(2):143-153, 2015, 査読有

⑤. Sakai T, Masaki Y, Otsuki N, Sakamaki I, Kishi S, Miyazono T, Urasaki Y, Murakami J, Satoh T, Nakamura T, Iwao H, Nakajima A, Kawanami T, et al. (他 6 名、2, 11, 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):232-238. 2015, 査読有

⑥. Masaki Y, Shimizu H, Sato T, Nakamura T, Nakajima A, Iwao H, Miki M, Sakai T, Kawanami T, Fujita Y, Tanaka M, Fukushima T. IgG4 related disease - Diagnostic methods and therapeutic strategies in Japan. *J Clin Exp Hematol.*, 54(2): 95-101, 2014, 査読有

⑦. Fujita Y, Fujii T, Mimori T, Sato T, Nakamura T, Iwao H, Nakajima A, Miki M, Sakai T, Kawanami T, Tanaka M, Masaki Y, Fukushima T, Okazaki T, Umehara H. Deficient leptin signaling ameliorates systemic lupus erythematosus lesions in MRL/Mp-Fas lpr mice. *J Immunol*. 192(3): 979-984, 2014, 査読有

⑧. 梅原 久範、三木美由貴、岩男 悠、中島章夫 IgG4 関連疾患の診断. *神経内科* 80: 157-162, 2014, 査読無

⑨. Masaki Y, Nakajima A, Iwao H, Kawanami T, Tanaka M, Umehara H. et al.(他 9 名、1, 3, 9, 12, 15 番目) Japanese variant of multicentric Castleman's disease associated with serositis and thrombocytopenia- a report of two cases: is TAFRO syndrome (Castleman-Kojima disease) a distinct clinicopathological entity? *J Clin Exp Hematop* 53(1):79-85, 2013, 査読有

⑩. Kawanami T, Iwao H, Masaki Y, Tanaka M, Umehara H. et al. (他 12 名、1, 5, 10, 16 番目) Skewed production of IL-6 and TGFβ by cultured salivary gland epithelial cells from patients with Sjögren's syndrome, *PLoS ONE*, 7:e45689 1-5, 2012, 査読有

⑪. Masaki Y, Iwao H, Kawanami T, Tanaka M, Umehara H. et al. (他 26 名、1, 20, 25, 27, 31 番目) Cutoff values of serum IgG4 and histopathological IgG4+ plasma cells for diagnosis of patients with

IgG4-related disease, *Int. J.Rheumatol.*, e580814,1-5, 2012, 査読有

⑫. Dong L, Watanabe K, Itoh M, Huan CR, Tong XP, Nakamura T, Miki M, Iwao H, Nakajima A, Sakai T, Kawanami T, Sawaki T, Masaki Y, Fukushima T, Fujita Y, Tanaka M, Yano M, Okazaki T, Umehara H. CD4+ T-cell dysfunctions through the impaired lipid rafts ameliorate concanavalin A-induced hepatitis in sphingomyelin synthase 1-knockout mice. *Int Immunol*. (5):327-37. 2012, 査読有

⑬. 正木康史, 中村拓路, 中島章夫, 岩男 悠, 三木美由貴, 梅原久範: IgG4 関連疾患の治療. *最新医*, 67:990-996, 2012. 査読無

⑭. 正木康史, 中村拓路, 中島章夫, 岩男 悠, 三木美由貴, 梅原久範: IgG4 関連疾患の治療, 腎と透析, 73:651-655, 2012. 査読無

⑮. 梅原久範, 三木美由貴, 中島章夫, 岩男 悠, 正木康史: リンパ増殖性疾患, 肝胆膵, 64:123-128, 2012. 査読無

⑯. 正木康史, 中村拓路, 中島章夫, 岩男 悠, 三木美由貴, 梅原久範: IgG4 関連疾患, 血液内科, 64:365-372, 2012. 査読無

[学会発表] (計 3 件)

①. 岩男 悠, 正木康史, 佐伯敬子, 松井祥子, 川野充弘, 平田信太郎, 藤川敬太, 折口智樹, 宮下賜一郎, 坪井洋人, 梅原久範 IgG4+MOLPS(IgG4 関連多臓器リンパ増殖症候群)、Castleman 病その他の多クローン性高γグロブリン血症の鑑別診断のための施設共 同前方視的臨床研究」の中間報告, 第 57 回日本リウマチ学会総会・学術集会/第 22 回国際リウマチシンポジウム, (国立京都国際会館, 京都府京都市, '13.4.18-4.20).

②. 岩男 悠, 正木康史, 黒瀬 望, 福島万奈, 湊 宏, 三木美由貴, 佐藤智美, 中村拓路, 中島章夫, 坂井知之, 福島俊洋, 梅原久範: AIYL あるいは age-associated EBV+ DLBCL が疑われた診断困難なリンパ腫症例, 第 16 回リンパ腫炉辺会議, (新潟グランドホテル, 新潟県新潟市, '13.1.26).

③. 岩男 悠, 中島章夫, 田中真生, 正木康史, 佐藤智美, 中村拓路, 三木美由貴, 坂井知之, 澤木俊興, 藤田義正, 福島俊洋, 岡崎俊朗, 梅原久範: トロンボポエチン受容体作動薬が有効であった SLE 合併難治性血小板減少症の一例, 第 56 回日本リウマチ学会総会・学術集会/第 21 回国際リウマチシンポジウム, (グランドプリンスホテル新高輪, 東京都港区, '12.4.26-4.28).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩男 悠 (IWAO, Haruka)
金沢医科大学・医学部・助教
研究者番号：10612244

(2) 研究分担者

梅原 久範 (UMEHARA, Hisanori)
金沢医科大学・医学部・教授
研究者番号：70247881

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

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

田中 真生 (TANAKA, Masao)
京都大学・医学部・特定准教授
研究者番号：10332719

(3) 連携研究者

該当無し