

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：33303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2015

課題番号：24791011

研究課題名(和文) IgG4関連疾患患者末梢血単核球におけるトランスクリプトーム解析

研究課題名(英文) Transcriptome analysis of peripheral blood mononuclear cells from patients with IgG4-related disease

研究代表者

中島 章夫 (NAKAJIMA, Akio)

金沢医科大学・医学部・助教

研究者番号：80612241

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：IgG4関連疾患は近年報告された疾患であり、その病因、病態はまだ十分にわかっていない。病因、病態解明を目的としIgG4関連疾患患者の末梢血単核球におけるトランスクリプトーム解析を行なった。IgG4関連疾患患者の末梢血単核球におけるトランスクリプトーム解析は今まで報告がなく、申請者は世界に先駆け2015年に初めて論文を発表し、IgG4関連疾患患者において自然免疫や制御性T細胞に関連する遺伝子の発現が低下していることを報告した。当研究からIgG4関連疾患の病因、病態において自然免疫能の低下や制御性T細胞機能の低下等に関連している可能性が示唆され、病因、病態の解明につながる可能性があると考えられた。

研究成果の概要(英文)：IgG4-related disease (IgG4-RD) is a new clinical entity of unknown etiology. To investigate the pathogenesis of IgG4-RD, this study compared the expression of genes related to innate immunity or regulatory T cells (Tregs) in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from patients with IgG4-RD and healthy controls. DNA microarray analysis identified 21 genes that showed a greater than 3-fold difference in expression between IgG4-RD patients and healthy controls and 30 genes that showed a greater than 3-fold change in IgG4-RD patients following steroid therapy. The expression of genes related to innate immunity or Tregs was lower in PBMCs from patients with IgG4-RD than from healthy controls. Although there is the limitation in the number of patients applied in DNA microarray, impaired expression of genes related to innate immunity may be involved in the pathogenesis of IgG4-RD as well as in abnormalities of acquired immunity.

研究分野：膠原病・アレルギー内科学

キーワード：IgG4関連疾患 トランスクリプトーム解析 自然免疫 制御性T細胞

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近年報告された新たな疾患単位である (引用文献)。臨床的には、全身の炎症病態に加え、罹患臓器固有の障害を示す。IgG4 関連疾患の大きな特徴は、IgG4 陽性形質細胞浸潤が、涙腺、唾液腺、膵臓、胆管、肺、腎臓、前立腺、甲状腺、下垂体、リンパ節、大動脈など多臓器に認められることである。多くの症例は複数の病変が併発し全身性疾患として発症するが、まれに単一病変の報告もあり、症例ごとに病変分布は異なる。また臨床的にステロイド治療が著効することが知られているが、IgG4 関連疾患の原因は未だ不明であり、その病態についてもまだ十分にわかっていない。

IgG4 関連疾患においては、これまで疾患概念の確立について、日本が先駆的な役割を果たしてきた。そして当講座は、平成 21 年に厚生労働省科学研究難治性疾患克服研究事業研究奨励分野に採択され、「新規疾患、IgG4 関連多臓器リンパ増殖性疾患 (IgG4+MOLPS) の確立のための研究」班 (IgG4 梅原班) の事務局を務めた。IgG4 関連疾患の病因、病態についてはまだ十分にわかっておらず、今後も日本が IgG4 関連疾患研究の先駆けであり続けるために、基礎研究面における病因、病態を解明することが重要である。

IgG4 関連疾患患者の末梢血単核球におけるトランスクリプトーム解析については研究開始当初時点において報告がなされておらず、IgG4 関連疾患の病因、病態解明に重要な研究であると考え当研究を行なった。

2. 研究の目的

IgG4 関連疾患患者の末梢血単核球における mRNA 量を網羅的に解析することにより、IgG4 関連疾患の疾患特異的マーカーとなる遺伝子や病因、病態に関連する遺伝子群の検索を行ない、それらを明らかにすることを目的とし研究を遂行した。

3. 研究の方法

IgG4 関連疾患の疾患特異的マーカーの発見および病因、病態を解明するため、IgG4 関連疾患患者の末梢血単核球におけるトランスクリプトーム解析を行なった。検体は、IgG4 梅原班を通じて全国 18 施設より収集された。患者ステロイド治療前後と健常人の末梢血単核球 RNA を用いて DNA マイクロアレイ

分析を行ない、患者ステロイド治療前後で発現変化のある遺伝子を抽出し、病態関連遺伝子の検索を行なった。また患者と健常人間で発現量の異なる遺伝子を抽出し、病因に関連する遺伝子あるいは疾患特異的マーカーとなる遺伝子を検索した。DNA マイクロアレイ分析で抽出された各遺伝子に関して、患者ステロイド治療前後と健常人の末梢血単核球 RNA を用いてリアルタイム PCR にてバリデーションを行なった。トランスクリプトーム解析により抽出された遺伝子を、遺伝子パスウェイデータベースである Ingenuity Pathway Analysis (Ingenuity Systems, USA) を利用し、変動した遺伝子群の相互関係を解析した。

トランスクリプトーム解析は以下の方法を用いて行なった。ヘパリン添加末梢血から末梢血単核球を Lymphoprep® (Axis-Shield, Norway) を用いた比重遠心法により分離し、RNeasy® Plus Mini kit (Qiagen, USA) を用いて RNA 抽出を行なった。抽出した total RNA から The Ambion® WT Expression kit (Applied Biosystems, USA) を用いて cDNA を合成した。GeneChip® WT Terminal Labeling and Controls kit (Affymetrix, USA) を用いて断片化に続いて末端のピオチン標識を行ない、GeneChip® Human Gene 1.0 ST Array (Affymetrix, USA) にハイブリダイズした。データ取得は GeneChip® Operating Software (Affymetrix, USA) により行ない、DNA マイクロアレイデータの解析は GeneSpring version 11.0 (Affymetrix, USA) を用いた。患者治療前後間と患者健常人間でそれぞれ発現量の異なる遺伝子を抽出し、リアルタイム PCR によるバリデーションを行なった。リアルタイム PCR は TaqMan gene expression assay (Applied Biosystems, USA)、Thunderbird Probe qPCR mix (Toyobo, Japan) を用い、ABI Prism 7700 Sequence Detector (Applied Biosystems, USA) にて行なった。

4. 研究成果

IgG4 関連疾患患者の末梢血単核球におけるトランスクリプトーム解析は今まで報告がなく、申請者は世界に先駆け 2015 年に初めて論文を発表し、その病因、病態において自然免疫能の低下や制御性 T 細胞機能の低下、アトピー素因などが関連している可能性を報告した (引用文献)。

DNA マイクロアレイ分析では、IgG4 関連疾患患者のステロイド治療前後で 3 倍以上の発現量増加あるいは減少を認めた遺伝子から、K-means clustering を用いて治療後に 3 倍以上の発現量増加を認めた 21 個の遺伝子を抽出した。また患者ステロイド治療前後と健常人の間で 3 倍以上の発現量増加あるいは減少

を認めた 30 個の遺伝子を抽出した。DNA マイクロアレイ分析では、自然免疫に関連する遺伝子や、I 型アレルギー、制御性 T 細胞機能に関連する遺伝子、アトピー素因に関連する遺伝子などが抽出された。DNA マイクロアレイ分析により抽出した遺伝子群から、Charcot-Leyden crystal protein (CLC)、interleukin 8 receptor alpha (IL8RA)、interleukin 8 receptor beta (IL8RB)、membrane-spanning 4-domains subfamily A member 3 (MS4A3)、defensin alpha 3 (DEFA3)、defensin alpha 4 (DEFA4) においてリアルタイム PCR によるバリデーションを行ない、それぞれの遺伝子で発現に有意差があることを確認した。

本研究で、IgG4 関連疾患患者において、好中球顆粒内殺菌活性物質で、かつ樹状細胞や T 細胞を細菌が侵入した部位に走化させる作用をもち、自然免疫と獲得免疫の橋渡しとしての機能も持つ DEFA 遺伝子、好中球の遊走と活性化を主な作用とする IL-8 の受容体である IL8R 遺伝子、I 型アレルギーや制御性 T 細胞機能に関連する CLC 遺伝子、ヒトアトピー表現型との関連が報告されている MS4A3 遺伝子の発現が優位に低下していることを確認し、病因、病態への関連が示唆された。IgG4 関連疾患と自然免疫については Watanabe らが toll-like receptor 活性などの障害が関連している可能性を報告しており、その報告を支持する結果であった(引用文献)。また IgG4 関連疾患において制御性 T 細胞機能の関与を示唆した報告は今までされていないが、IgG4 関連疾患はこれまでの報告で、しばしばアレルギー性疾患や高 IgE 血症を伴うこと(引用文献)、末梢血・局所病変において CD4+CD25+制御性 T 細胞が増加していること(引用文献)、多彩な自己抗体が出現すること(引用文献)などが報告されていた。これらがどのような機序で起こりどのように病態に関与しているかについては十分にわかっていないが、制御性 T 細胞機能の低下によってこれらを一元的に説明することができ、病因、病態の解明につながる可能性があると考えられた。

本研究の限界としては、解析症例数が少数であり、また末梢血単核球の mRNA 量を解析しており病変自体の解析ではないため、病態の二次的な変化をとらえている可能性がある。

しかし本研究により、IgG4 関連疾患の病態に、好中球機能低下や自然免疫から獲得免疫への移行の障害、制御性 T 細胞機能の低下、アトピー素因などが関連している可能性が示唆された。

(引用文献)

- Umehara H, et al: A novel clinical entity, IgG4-related disease (IgG4RD): general concept and details. *Modern rheumatology / the Japan Rheumatism Association* 2012, 22(1):1-14
- Nakajima A, et al: Decreased expression of innate immunity-related genes in peripheral blood mononuclear cells from patients with IgG4-related disease. *PLoS One* 2015, 14;10(5):e0126582
- Watanabe T, et al: Involvement of activation of toll-like receptors and nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors in enhanced IgG4 responses in autoimmune pancreatitis. *Arthritis and rheumatism* 2012, 64(3):914-924.
- Masaki Y, et al: Proposal for a new clinical entity, IgG4-positive multiorgan lymphoproliferative syndrome: Analysis of 64 cases of IgG4-related disorders. *Ann Rheum Dis* 2009; 68: 1310-5
- Miyoshi H, et al: Circulating Naïve and CD4+ CD25high regulatory T cells in patients with autoimmune pancreatitis. *Pancreas* 2007; 36: 133-140
- Koyabu M, et al: Analysis of regulatory T cells and IgG4-positive plasma cells among patients of IgG4-related sclerosing cholangitis and autoimmune liver diseases. *J Gastroenterol* 2010; 20: 732-41
- Okazaki K, et al: Recent advances in autoimmune pancreatitis: concept, diagnosis, and pathogenesis. *J Gastroenterol* 2008; 43: 409-418

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1件)

- Akio Nakajima, Yasufumi Masaki, Takuji Nakamura et al.(32人中1番目), Decreased expression of innate immunity-related genes in peripheral blood mononuclear cells from patients with IgG4-related disease, *PLoS One*, 査読有, 14:10(5), 2015, e0126582, DOI:10.1371/journal.pone.0126582

〔学会発表〕(計3件)

Akio Nakajima, Analysis of CLC and MS4A3 gene expression in peripheral blood mononuclear cells from patients with IgG4-related disease. 12th International Symposium on Sjogren's syndrome, 2013/10/9-10/12, Kyoto Hotel Okura, Kyoto (Japan)

中島章夫, IgG4 関連疾患のトランスクリプトーム解析、第7回 IgG4 研究会、2013年3月2日、岡山国際交流センター(岡山県・岡山市)

中島章夫, IgG4 関連疾患のトランスクリプトーム解析、IgG4 キックオフミーティング、2012年8月18日、京都大学芝蘭会館(京都府・京都市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中島 章夫 (NAKAJIMA, Akio)

金沢医科大学・医学部・助教

研究者番号：80612241