

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460465

研究課題名(和文) IgG4関連疾患におけるThy-1、PDGFの発現に関する解析

研究課題名(英文) Immunohistochemical analysis of Thy-1 and PDGF in IgG4-related disease

研究代表者

黒瀬 望 (KUROSE, Nozomu)

金沢医科大学・医学部・助教

研究者番号：10319048

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：IgG4関連疾患における線維化の機序と臓器毎の線維化の程度を定量化することを目的に研究がなされた。pericyteと筋線維芽細胞の増生はIgG4関連疾患の線維化に関連があると思われた。非IgG4関連疾患と比較して、IgG4関連疾患は線維化の程度が有意に高く、線維化の程度を定量化することが可能となった。

研究成果の概要(英文)：To quantify the degree of fibrosis in various organs in IgG4 related disease, and to clarify the mechanism of the fibrosis in IgG4 related disease, this study was performed. Pericyte and myofibroblast cells were thought to be related to fibrosis of IgG4 related disease. Compared to non-IgG4 related disease, the degree of fibrosis was significantly higher. It was possible to quantify the degree of fibrosis in IgG4 related disease.

研究分野：病理診断学

キーワード：IgG4関連疾患 線維化

1. 研究開始当初の背景

組織障害によって組織の欠損が生じた場合、組織の修復が行われる。線維組織によって損傷部が置換され、最終的に癒痕化した組織が形成される。一般的に組織の障害が強くなれば線維化は広範化し、障害が弱ければ線維化の程度は軽い。また、臓器によっても組織修復の過程は異なっている。

Myofibroblast は、平滑筋の性格を有す線維芽細胞で、細胞外基質だけでなく、様々な増殖因子やサイトカインを分泌し、組織修復に重要な働きを担っている。

Pericyte は微小血管の基底膜に局在し、毛細血管を取り巻き、組織修復に関与している。また、間葉系細胞の幹細胞としての役割を担い、骨や軟骨、筋、脂肪細胞を生じさせると考えられている。

IgG4 関連疾患は近年報告された原因不明の全身性線維硬化性疾患である。IgG4 関連疾患は多臓器を侵し、対称性・非対称性の臓器腫大、同時性・異時性の結節性病変を形成する (Umehara H et al. A novel clinical entity, IgG4-related disease (IgG4-RD): general concept and details. Mod Rheumatol 2012; 22: 1-14)。

IgG4 関連疾患は、臨床的に中年男性に発症し、抗核抗体の存在、アレルギー性疾患の合併、好酸球増多、高グロブリン血症、血清 IgG、血清 IgG4、血清 IgE の上昇、ステロイド治療に対する良好な反応性によって特徴づけられる。組織学的に、著明なリンパ球、形質細胞浸潤、リンパ濾胞の形成、好酸球浸潤、IgG4 陽性形質細胞浸潤、花むしろ状線維化、閉塞性静脈炎が認められる (Deshpande V et al. Consensus statement on the pathology of IgG4-related disease. Mod Pathol 2012; 25: 1181-92)。

2012 年、Umehara 等 (Umehara et al. Comprehensive diagnostic criteria for

IgG4-related disease (IgG4RD), 2011. Mod Rheumatol 2012; 22: 21-30.) によって、IgG4 関連疾患の包括的診断基準が提唱され、IgG4 関連疾患が広く認知されるようになった。

IgG4 関連疾患において、IgG4 の産生に関する様々なサイトカインが発現することが報告 (Lang D et al. IgG4-related disease: current challenges and future prospects. Ther Clin Risk Manag 2016; 15: 189-99.) されている。IgG4 関連疾患では Th2 優位の免疫環境下であり、制御性 T 細胞 (Tregs) の浸潤が多数みられる。それに伴って IL-10 の分泌が亢進し、形質細胞による IgG4 の産生亢進が引き起こされる。一方、Tregs は線維化誘導サイトカインである transforming growth factor (TGF- $\beta$ ) の産生も亢進させ、これが IgG4 関連疾患の線維性硬化に関係していると考えられている (Zen et al. Th2 and regulatory immune reactions are increased in immunoglobulin G4-related sclerosing pancreatitis and cholangitis. Hepatology. 2007; 45: 1538-46)。

シスプラチンの投与に伴って、ラットの腎臓の尿細管間質に線維化が引き起こされ、myofibroblast のマーカーである Thy-1 の発現が線維化に深く関わっていることが報告 (Yuasa et al. Thy-1 expression, a possible marker of early myofibroblast development, in renal tubulointerstitial fibrosis induced in rats by cisplatin. Exp Toxicol Pathol. 2013; 65: 651-9) されている。また、肺の pericyte (PDGFR、SMA を発現) が myofibroblast に形質転換することによって肺の線維化が引き起こされることが報告 (Hung et al. Role of lung pericytes and resident fibroblasts in the pathogenesis of pulmonary fibrosis. Am J Respir Crit Care Med. 2013; 188: 820-30) されている。それ故、IgG4 関連疾患の線維の発症機序においても myofibroblast や pericyte が関与し

ていることが推察され、pericyte-myofibroblast transition を介した線維化が引き起こされると思われた。しかしながら、IgG4 関連疾患の線維性硬化に関する研究はまだ十分になされているとはいえない。

一方、IgG4 関連疾患は、臓器によって線維化の程度に違いがみられるが、線維化の程度を定量的に評価する基準はなく、臓器毎に線維化の程度が異なる理由についても解明されていない。

更に、IgG4 関連疾患の病巣中心部では、花むしろ状線維化、閉塞性静脈炎、著明な線維性硬化が認められ、病巣辺縁部では血管周囲や導管周囲に同心円状の線維化がみられるが、IgG4 関連疾患の初期線維化巣に関する研究もまだ十分になされていない。

## 2. 研究の目的

(1) IgG4 関連疾患の線維化の機序の一端を明らかにし、pericyte や myofibroblast が IgG4 関連疾患の線維化に関わっているのか、pericyte-myofibroblast transition が認められるか否か検討する。

(2) IgG4 関連疾患では、臓器毎に線維化の程度が異なっているが、その理由について明らかにする。

(3) 種々の臓器に発生した IgG4 関連疾患の線維化の程度を定量化する。

(4) IgG4 関連疾患の初期線維化病巣を検討する。

## 3. 研究の方法

(1, 2) 2001 年～2014 年に金沢医科大学病院で切除された外科手術材料を用いた。正常膵

組織、慢性膵炎組織、正常顎下腺組織、慢性唾液腺炎組織、正常リンパ節組織を対象とし、pericyte マーカーとされている Platelet derived factor alpha(PDGFR ) と、myofibroblast のマーカーとされている smooth muscle actin ( SMA)、Thy-1 を用いて IgG4 関連疾患(膵臓、大唾液腺、リンパ節)との間の染色性の違いを比較検討し、PDGFR、SMA、Thy-1 陽性細胞の局在性、臓器毎の染色性の違いについて検討した。

(3) 膵臓の IgG4 関連疾患と正常膵組織、慢性膵炎組織における、膵腺房構成細胞数(100 か所)と高倍率視野における平均膵腺房細胞数(10 か所)、腺房細胞の直径(50 か所)を計測した。

(4) 2001 年～2014 年に金沢医科大学病院で切除された外科手術材料と、厚生労働科学研究補助金難治性疾患克服研究事業「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」で得られたコンサルテーション症例を用いて、IgG4 関連疾患の線維化の程度を定量的に解析した。IgG4 関連疾患の包括的診断基準を用いて、IgG4 関連疾患を確診群(83 例)、準確診群(4 例)、疑診群(6 例)に分類し、非 IgG4 関連疾患群(34 例)と比較した。線維化の程度を評価するための指標として、Fibrosis grade(0 ; 線維化なし、1 ; わずかな線維化、2 ; 線維性隔壁形成、3 ; 密な線維化または硬化)を新たに作成し、IgG4 関連疾患と非 IgG4 関連疾患との間の差異を比較した。

## 4. 研究成果

(1, 2) IgG4 関連疾患(膵臓、大唾液腺)は、正常膵組織、慢性膵炎組織、正常顎下腺組織、慢性唾液腺炎組織と比し、腺房細胞や導管細

胞周囲に PDGFR、SMA 陽性の pericyte、myofibroblast の増生が目立っていた。Thy-1 の免疫染色は、良好な染色性が得られなかったため、評価できなかった。リンパ節組織と IgG4 関連疾患(リンパ節)では PDGFR、SMA 陽性の pericyte、myofibroblast の増生は目立たなかった。

pericyte、myofibroblast が線維化に深く関わっていると思われ、また、臓器毎の pericyte、myofibroblast の反応性の違いと局在性が臓器毎の線維化の程度の違いを反映していると思われた。

(3) 腺房構成細胞数は、正常膵組織(平均 10.33 個)、慢性膵炎組織(平均 8.06 個)に比し、IgG4 関連疾患(平均 4.34 個)では有意差をもって減少していた( $p < 0.0001$ )。高倍率視野における平均腺房細胞数は、正常膵組織(平均 630.3 個)、慢性膵炎組織(平均 342.7 個)、IgG4RD(平均 83.8 個)では有意差をもって減少していた( $p < 0.0001$ )。個々の腺房細胞の直径は、正常膵組織(平均  $25.7 \mu\text{m}$ )、慢性膵炎組織(平均  $24.4 \mu\text{m}$ )に比し、IgG4 関連疾患( $18.3 \mu\text{m}$ )は有意差をもって減少していた。

IgG4 関連疾患では、正常膵組織、慢性膵炎組織と比べて、腺房細胞数の減少がより目立ち、腺房細胞径の減少がみられた。慢性膵炎組織では腺房構成細胞数の減少がみられたが、IgG4 関連疾患ほど減少しておらず、腺房細胞径は比較的保持されていた。

IgG4 関連疾患では、腺房細胞間に pericyte、myofibroblast が増生した結果、腺房細胞が離解して、個細胞萎縮が目立っていると思われた。一方、慢性膵炎は、腺房細胞が領域性、集団性をもって萎縮しているため、個細胞性萎縮は目立たなかった。両者の萎縮の違いは IgG4 関連疾患を診断する上で、有用と思われた。

(4) 非 IgG4 関連疾患群の Fibrosis grade ( $0.7 \pm 1.0$ )と比較して、IgG4 関連疾患の確診群( $1.9 \pm 1.1$ ,  $p < 0.0001$ )、準確診群( $2.2 \pm 1.3$ ,  $p < 0.05$ )、疑診群( $1.7 \pm 1.0$ ,  $p < 0.005$ )の Fibrosis grade は有意差をもって高かった。Fibrosis grade を用いることで IgG4 関連疾患における線維化の程度を臓器毎に定量化することが可能となった。Fibrosis grade の高い臓器は大唾液腺、膵臓、後腹膜、胆管、肝臓、副鼻腔、心膜であった。これらの臓器は、体表面から触知されにくい深部臓器であり、臨床的に発見されにくいことも関係していると思われた。特に、準確診群は線維化の程度が強く、確診群の進行期をみていると思われた。また、好酸球、肥満細胞浸潤が目立ち、これらの細胞から分泌された TGF- $\beta$ 1 は、線維芽細胞の TGF signaling pathway を刺激し、fibrogenic target genes (SMA, Collagen, connective tissue growth factor, tissue inhibitor of metalloprotease, periostin)を活性化させ、線維化を引き起こしたと思われた(Cheng E et al. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 303: G175-87, 2012)。

Fibrosis grade が高くなるにつれ、花むしろ状線維化と閉塞性静脈炎の頻度は増加した。それ故、線維化は花むしろ状線維化と閉塞性静脈炎の発生に深く関与していると思われた。

本研究において、IgG4 関連疾患の線維化の機序の一端が明らかとなり、pericyte や myofibroblast が IgG4 関連疾患の線維化に重要な役割を担っていることが示唆された。しかしながら、pericyte-myofibroblast transition を証明するには至らなかった。今後は、どのような因子が、pericyte を myofibroblast へ形質転換させるのか、検討していきたい。そのための方策として、二重免疫染色法や、他の pericyte マーカー(PDGFR

、CD248、MY01B)についての検討が必要である。また、各々の部位からレーザーマイクロダイセクションを行って RNA を抽出し、Real-time PCR を行うことで、PDGF や SMA の発現の有無と mRNA の量的解析を検討しなければならない。更に、TGF- $\beta$ 1 を介した myofibroblast の分化の有無を検討し、TGF- $\beta$ 1/Smad シグナル伝達経路を介した線維形成が IgG4 関連疾患で引き起こされているか否か明らかにする必要がある。

各臓器における、pericyte、myofibroblast の反応性と局在性が線維化の程度の違いを規定していると考えられた。pericyte や myofibroblast を活性させる因子が、臓器によって異なっているのか、他の臓器に発生した IgG4 関連疾患例も用いて、今後比較検討しなければならない。

本研究において、各臓器の線維化の程度を定量化することができた。線維化の程度の評価が IgG4 関連疾患の診断と治療にどのように役立つか、今後検討が必要である。

IgG4 関連疾患の初期線維化病巣に関し考察することができた。今後は、IgG4 関連疾患の腎病変だけでなく、他の臓器に発生した IgG4 関連疾患の初期線維化病巣に関して検討を進め、線維化の進行過程を明らかにしていきたい。

IgG4 関連疾患の線維化の機序はまだ明らかにされておらず、更なる研究が望まれる。

本研究の一部は、金沢医科大学雑誌に投稿中である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1) Satoh-Nakamura T, Kurose N, Kawanami T, Nakamura T, Iwao-Kawanami H, Nakajima A, Miki M, Sakai T, Fujita Y, Tanaka M,

Fukushima T, Masaki Y. CD14(+) follicular dendritic cells in lymphoid follicles may play a role in the pathogenesis of IgG4-related disease. Biomed Res. 2015; 36: 143-53.

2) H.Adachi, H.Okuyama, H.Yamaya, N.Kurose, K.Kojima, H.Toga, H.Yokoyama. A case of IgG4-related kidney disease complicated by eosinophilic lung disease. CEN Case Reports. 2014; Des: 1-7.

3) Doai M, Tonami H, Akai Takuya, Kurose N, Hirata K. 1H-MR spectroscopy in a case of isolated intracranial Rosai-Dorfman disease. J Neurolog Sci. 2014; 31: 790-95.

4) Y.Masaki, A Nakajima, H Iwao, N.Kurose, T Sato, T Nakamura, M Miki, T Sakai, T Kawanami, T Sawaki, Y Fujita, M Tanaka, T Fukushima, T Okazaki, H Umehara. 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. 2013; 53:79-85.

〔学会発表〕(計 4 件)

1) T Satoh, T Nakamura, N.Kurose, H Iwao, M Miki, T Sakai, Y Fujita, M Tanaka, T Fukushima, Y.Masaki: Inflammatory monocytes may play a role of pathophysiology in IgG4-RD, The 76<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology, 大阪国際会議場(大阪府大阪市), 2014年10月31日~2014年11月02日.

2) 土屋直子, 道合万里子, 北楯優隆, 近藤環, 的場宗孝, 利波久雄, 笹川泰生, 赤井卓也, 飯塚秀明, 黒瀬望, 野島孝之: 頭蓋内に現局した Rosai-Dorfman 病の 1 例, 第 49 回日本医学放射線学会秋季大会, 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市), 2013 年 10 月 12 日 ~ 2013 年 10 月 14 日.

3) 赤井卓也, 笹川泰生, 立花修, 飯塚秀明, 黒瀬望: 髄膜種に類似した画像を呈した Rosai-Dorfman disease の 1 例, 第 31 回日本脳腫瘍病理学会, KFC Hall 国際ファッションセンター(東京都墨田区), 2013 年 05 月 24 日 ~ 2013 年 05 月 25 日.

4) 森田貴義, 正木康史, 加藤保宏, 川崎貴裕, 小林久美子, 黒瀬望, 梅原久範, 藤原弘士: 多発肺結節影を伴った IgG4 関連疾患の 1 例, 第 57 回日本リウマチ学会総会 学術集会, 国立京都国際会館(京都府京都市), 2013 年 04 月 24 日 ~ 2013 年 04 月 26 日.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

黒瀬 望 (KUROSE, Nozomu)

金沢医科大学・医学部・助教

研究者番号: 10319048

### (2) 研究分担者

湊 宏 (Minato, Hiroshi)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号: 10293367

### (3) 正木 康史 (MASAKI, Yasufumi)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号: 40238895