

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462675

研究課題名(和文) IgG4関連疾患の病態の解明と新規分子を標的とした治療戦略の新展開

研究課題名(英文) New treatment for IgG4-related disease as new molecules

## 研究代表者

太田 伸男 (Ohta, Nobuo)

山形大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：20282212

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：IgG4関連硬化性疾患は、全身の諸臓器にCD4ないしCD8陽性Tリンパ球とIgG4陽性形質細胞が浸潤する全身性疾患で早期に診断し治療を開始することが重要である。本研究では、IgG4関連硬化性疾患の病態、特にTh17の関与および繊維化におけるペリオスチン分子の関与について検討した。その結果、EBウイルスの過剰発現が認められ、これら分子を標的とした治療法の開発が新たな道を開く可能性があると考えられた。

研究成果の概要(英文)：IgG4-related disease is a recently recognized disease entity characterized by high serum IgG4 concentration and IgG4-producing plasma cell expansion with fibrotic or sclerotic changes in affected organs. The copy number of EBV DNA in the affected salivary gland(s) was upregulated in the affected tissues. These results suggest that the copy number of EBV DNA could be useful as a novel biomarker and therapeutic target in IgG4-related disease.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：IgG4関連疾患 ミクリッツ病 EBウイルス

### 1. 研究開始当初の背景

IgG4 関連硬化性疾患は、全身の諸臓器に CD4 ないし CD8 陽性 T リンパ球と IgG4 陽性形質細胞が浸潤する全身性疾患である。その IgG4 陽性形質細胞の浸潤は、膵臓、胆管、唾液腺、甲状腺、後腹膜などに認められることが多い。キュットナー腫瘍などの硬化性唾液腺炎、自己免疫性膵炎、原発性硬化性胆管炎、後腹膜線維症と独立して診断されてきた疾患は、この新しい疾患概念である IgG4 関連硬化性疾患の一つの表現型である可能性が示唆されている。診断は唾液腺、涙腺などの両側対称性の肥大と血清中の IgG4 の上昇あるいは組織中の IgG4 陽性形質細胞の確認によってなされている。耳下腺、顎下腺など唾液腺の腫脹を初発症状とすることが多いが、膵臓や胆管に病変が進展し自己免疫性膵炎や硬化性胆管炎などの重篤な合併症をおこす可能性があり、早期に診断し治療を開始することが重要である。

また、自己免疫性膵炎などの唾液腺外病変を合併する例で、EB ウイルス抗体価が高い傾向にあり、IgG4 関連疾患の病態に EB ウイルスが関与している可能性があると考えられる。

### 2. 研究の目的

IgG4 関連硬化性疾患は、全身の諸臓器に CD4 ないし CD8 陽性 T リンパ球と IgG4 陽性形質細胞が浸潤する全身性疾患である。その IgG4 陽性形質細胞の浸潤は、膵臓、胆管、唾液腺、甲状腺、後腹膜などに認められることが多い。キュットナー腫瘍などの硬化性唾液腺炎、自己免疫性膵炎、原発性硬化性胆管炎、後腹膜線維症と独立して診断されてきた疾患は、この新しい疾患概念である IgG4 関連硬化性疾患の一つの表現型である可能性が示唆されている。診断は唾液腺、涙腺などの両側対称性の肥大と血清中の IgG4 の上昇あるいは組織中の IgG4 陽性形質細胞の確認によってなされている。耳下腺、顎下腺など唾液腺の腫脹を初発症状とすることが多いが、膵臓や胆管に病変が進展し自己免疫性膵炎や硬化性胆管炎などの重篤な合併症をおこす可能性があり、早期に診断し治療を開始することが重要である。また、病理学的には腺組織の高度な破壊像と繊維化が認められており、この病態には Th17 細胞、Th1 細胞と Th2 細胞が関わり、繊維化にはペリオスチンや TGF などのサイトカインや分子が関与していると推測される。さらに自己免疫性膵炎などの重篤な唾液腺外合併症を発症する場合があります。治療戦略の上で将来唾液腺外合併症を発症するか否かは臨床上大きな問題である。本研究では、IgG4 関連硬化性疾患の病態、特に唾液腺外合併症の発症に EB ウイルスの関与を検討するとともに、唾液腺外合併症を予測するバイオマーカーを確立し、これら分子を標的とした治療法を確立することが目的である。

### 3. 研究の方法

IgG4 関連硬化性疾患の病態、特に Th17 の関与および繊維化におけるペリオスチン分子の関与について免疫組織学的に検討した。(1)血清 IgG4 濃度と組織中の IgG4 陽性形質細胞の浸潤の程度との関連: IgG4 関連硬化性疾患患者から得られた血清と組織標本のそれぞれの IgG4 について測定した。血清中の IgG4 の濃度は ELISA で組織中の IgG4 陽性形質細胞は免疫組織学的に染色し細胞数を測定した。IgG4 関連硬化性疾患の疾患活動性と IgG4 の値との関連性について検討を行った。また、硬化性病変のマーカーである繊維化の程度は腺組織の損傷と繊維組織の増殖の程度を目安として、繊維化と IgG4 との関連についても検討した。

(2) 腺組織中のペリオスチン、ペンドリン、ステロイド受容体、NFκB、IκB の測定: 心筋梗塞後の創傷治癒機転としてペリオスチンが発現し心筋組織の高度を高めることが報告されている。IgG4 関連硬化性疾患でもその繊維化にはペリオスチンが関与していると推測される。この点を確認するために、本疾患患者から得られた腺組織のホルマリン固定、パラフィン切片を用いて免疫組織化学的に検討する。免疫染色には適切な抗原賦活化前処理を加えた ABC 法を用いる。抗ペリオスチン抗体、抗ペンドリン抗体、抗ステロイド受容体 および 抗体、抗 NFκB 抗体、抗 IκB 抗体、抗 AP-1 抗体を 1 次抗体とし、光学顕微鏡にてこれら抗体の発現を検討した。また、本疾患の治療薬として現在ステロイドが使用されているが、その反応性には個人差がありステロイド受容体の発現が関与していると見込まれる。この点を検討するために腺組織に浸潤した炎症細胞に焦点を絞り、好中球やリンパ球の細胞内におけるステロイド受容体の局在について蛍光顕微鏡を用いて検討した。

(3) Th17 細胞およびペリオスチン発現の抑制 IgG4 関連硬化性疾患患者から得られた Th17、Th1、Th2、Tc1、Tc2 細胞と各種薬剤 (特に種々のプロテインキナーゼのインヒビター、抗ヒスタミン剤、抗アレルギー剤、ステロイド剤など) を混合培養し産生する各種サイトカインの量を測定することによってインバランスの有無や、インバランスを正常化するために有効な薬剤やその組み合わせ、さらにその濃度を検討する。

(4) EB ウイルス関連分子の発現等については In situ hybridization にて EBER の組織中の EBV DNA を確認し、real time PCR にて EBV DNA 量を定量した。

### 4. 研究結果

IgG4 関連硬化性疾患患者から得られた血清中の IgG4 の値は高値で、外科的に得られた腺組織には多くの IgG4 陽性形質細胞が認められた。また、自己免疫性膵炎や硬化性胆管炎などの致死的な全身的な疾患を合併している率は約 60% であった。また、興味

深いことに 25 例中 2 症例で顎下腺癌と眼窩の悪性リンパ腫が認められ、IgG4 関連疾患を基礎とした悪性腫瘍の発生が疑われた。臨床的には、IgG4 関連疾患では自己免疫性膵炎など致死的な全身合併症や悪性腫瘍を併発する可能性があることが極めて重要なポイントであることが確認された。

IgG4 硬化性疾患では CD4 陽性細胞が局所に浸潤していることから、Th1 および Th2 のバランスが崩れている可能性が疑われる。この点を確認するために、末梢血中の Th1 細胞および Th2 細胞を検討したところ、Th1 にシフトしたインバランスが認められた。さらに IgG4 関連硬化性疾患の病態と関連する硬化の機序を検討する目的で、ペリオスチンと IL-17 の発現を唾液腺局所で検討した。その結果、ペリオスチンと IL-17 の過剰発現が認められた。ペンドリンの発現は、対照と比較して減弱しており、これは腺管構造の破壊に伴う変化と考えられた。耳下腺、顎下腺など唾液腺の腫脹を初発症状とすることが多いが、膵臓や胆管に病変が進展し自己免疫性膵炎や硬化性胆管炎などの重篤な合併症をおこす可能性がある。全身合併症を引き起こすか否かを予測するバイオマーカーについても検討を加えた。その結果、この病態には Th17 細胞、Th1 細胞と Th2 細胞が関わり、繊維化にはペリオスチンや TGF などのサイトカインや分子が関与していると推測されたが、日常臨床で測定することは困難であり、これらの分子の検索に代わる簡便な方法として IgG4 値および IgG4/IgG 値が高い場合には全身合併症を引き起こす可能性が有意に高いことが確認された。

IgG4 関連疾患では、LMP1 および EBER の発現を認めなかったが EBNA2 は強い発現を認めた。EBV DNA 量は IgG4 関連疾患の方が有意に多く、血中 IgG4 値や組織中 IgG4 陽性形質細胞数や合併症数と比例しており、病勢を反映しているものと思われた。以上から、IgG4 関連疾患の病原性に EBV が関与している可能性が示唆された。また、IgG4 関連疾患の進行を判定する biomarker として、EBV-DNA コピー数が有用な指標になると思われた。

治療としては、ステロイドの内服が有効であるが、合併症もありなるべく減量あるいは中止が望ましい。しかし、ステロイド中止あるいは減量による IgG4 関連疾患の再燃や再発も認められ、離脱が困難であることステロイドに代わる新たな治療法の開発急務であると考えられた。本研究の結果を踏まえて、唾液腺局所にペリオスチンおよび IL-17 の強い発現が認められることから、これらの所見から、IgG4 関連硬化性疾患の硬化にはペリオスチンと IL-17 が重要な役割を果たしており、これら分子を標的とした治療法の開発が新たな道を開く可能性があると考えられた。

#### 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 14 件)

- 1) Ueki S, Konno Y, Takeda M, Moritoki Y, Hirokawa M, Matsuwaki Y, Honda K, Ohta N, Yamamoto S, Takagi Y, Wada A, Weller PF: Eosinophil extracellular trap cell death-derived DNA traps: Their presence in secretions and functional attributes. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;137(1):258-267 (査読あり)
- 2) Masuyama K, Goto M, Takeno S, Ohta N, Okano M, Kamijo A, Suzuki M, Terada T, Sakurai D, Horiguchi S, Honda K, Matsune S, Yamada T, Sakashita M, Yuta A, Fuchiwaki T, Miyanochara I, Nakayama T, Okamoto Y, Fujieda S. Guiding principles of sublingual immunotherapy for allergic rhinitis in Japanese patients. *Auris Nasus Larynx*. 2016;43(1):1-9 (査読あり)
- 3) Okano M, Kariya S, Ohta N, Imoto Y, Fujieda S, Nishizaki K: Association and management of eosinophilic inflammation in upper and lower airways. *Allergol Int*. 2015;64(2):131-138
- 4) Furukawa T, Shimotai Y, Ohta N, Ishida A, Kurakami K, Hongo S, Kakehata S: Roles of Epstein-Barr virus in patients with IgG4 Mikulicz's disease. *Laryngoscope* 2015;134:206-210 (査読あり)
- 5) Meng HX, Li HN, Geng JS, Ohe R, Yu XY, EXQ, Ye F, Yang SR, Kato T, Zhang L, Ishida A, Ohta N, Jin XM, Kakehata S, Geng JS, Yamakawa M: Decreased expression of follicular dendritic cell-secreted protein correlates with increased immunoglobulin A production in the tonsils of individuals with immunoglobulin A nephropathy. *Transl Res*. 2015;166(3):281-291 (査読あり)
- 6) Okamoto Y, Ohta N, Okano M, Kamijo A, Gotoh M, Suzuki M, Takeno S, Terada T, Hanazawa T, Horiguchi S, Honda K, Matsune S, Yamada T, Yuta A, Nakayama T, Fujieda S.: Guiding principles of subcutaneous immunotherapy for allergic rhinitis in Japan. *Auris Nasus Larynx*. 41:1-5, 2014 (査読あり)
- 7) Ohta N, Fukase S, Suzuki Y, Kurakami K, Aoyagi M, Kakehata S: OK-432 treatment of ranula extending to the parapharyngeal space. *Acta Otolaryngol* 134:206-210, 2014 (査読あり)
- 8) Ohta N, Ishida A, Kurakami K, Suzuki Y, Kakehata S, Ono J, Ikeda H, Okubo K, Izuhara K: The Expressions and Roles of Periostin in Otolaryngological Diseases. *Allergology Int*. 63(2):171-180, 2014 (査読あり)
- 9) Gotoh M, Yuta A, Okano M, Ohta N, Matsubara A, Okubo K: Severity assessment of Japanese Cedar Pollinosis using the practical guideline for the management of allergic rhinitis in Japan and the allergic rhinitis and its impact on asthma guideline. *Allergol Int*. 62:181-189,

2013 (査読あり)

10) Ohta N, Watanabe T, Ito T, Kubota T, Suzuki Y, Ishida A, Aoyagi M, Matsubara A, Izuhara K, Kakehata K: Clinical and pathological characteristics of organized hematoma. Int. J Otolaryngology 2013 (査読あり)

11) Ohta N, Fukase S, Suzuki Y, Aoyagi M, Kakehata S : Treatment of ranula by OK-432: Pearls and Pitfalls. J Rhinology-Otology 1:26-30, 2013 (査読あり)

12) Ohta N, Waki T, Fukase S, Suzuki Y, Kakehata S, Aoyagi M: Aortic aneurysm rupture as a rare complication of Granulomatosis angiitis. Journal of Medical Case Reports 7:202, 2013 (査読あり)

13) Ohta N, Kurakami K, Ishida A, Furukawa T, Suzuki Y, Aoyagi, Matsubara A, Izuhara K, Kakehata S: Roles of TGF-beta and periostin in fibrosclerosis in patients with IgG4-related diseases. Acta Otolaryngol 133:1322-1327, 2013 (査読あり)

14) 太田伸男: 第5章 頸部・甲状腺ほか IgG4関連疾患の全身合併症は予測可能か? 耳鼻咽喉科でこぼった症例のブレイクスルー 206-207, 2013 (査読なし)

〔学会発表〕(計 5件)

1) 太田伸男, 古川孝俊, 下平義隆, 石田晃弘, 倉上和也, 本郷誠治, 欠畑誠治: IgG4関連疾患における Epstein-Barr virus の検討. 第60回日本唾液腺学会, 文京学院大学(東京都文京区); 2015年12月

2) 太田伸男, 倉上和也, 古川孝俊, 欠畑誠治, 出原賢治: IgG4関連疾患の唾液腺外合併症は予測できるか? 第59回日本唾液腺学会, 文京学院大学(東京都文京区); 2014年12月

3) 太田伸男, 倉上和也, 石田晃弘, 古川孝俊, 鈴木祐輔, 欠畑誠治: IgG4関連疾患の全身合併症は予測できるか? 第32回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会, ホテルクレメント徳島(徳島県徳島市); 2014年2月

4) 太田伸男: シンポジウム アレルギー疾患とペリオスチン 耳鼻咽喉科疾患とペリオスチン 第63回日本アレルギー学会秋季学術大会, ホテルニューオータニ(東京都); 2013年11月

5) 太田伸男, 倉上和也, 石田晃弘, 鈴木祐輔: IgG4関連疾患の全身合併症は予測できるか? 第63回日本アレルギー学会, ホテルニューオータニ(東京都); 2013年11月

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

太田 伸男 (Nobuo Ohta)

山形大学・医学部・非常勤講師

研究者番号: 2028221

(2) 研究分担者

太田 裕子 (Yuko Ota)

羽陽学園短期大学・幼児教育科・准教授

研究者番号: 40442016

植木 重治 (Ueki Shigeharu)

秋田大学・医学部・准教授

研究者番号: 60361234

吉武 洋 (Yoshitake Hiroshi)

順天堂大学・医学部・非常勤講師

研究者番号: 00396574

阿部 靖弘 (Abe Yasuhiro)

山形大学・医学部・助教

武田裕司 (Takeda Yuji)

山形大学・医学部・助教

研究者番号: 90302299

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: