

平成 28 年 5 月 16 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861401

研究課題名(和文) 唾液腺上皮および線維芽細胞に着目したIgG4関連疾患の病態解析

研究課題名(英文) Molecular analysis of epithelial and fibroblastic cells in IgG4-related disease

研究代表者

阿部 亜由美 (Abe, Ayumi)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：80644468

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：IgG4関連疾患由来の顎下腺組織では、正常由来同様にタイト結合関連分子の安定発現が認められた。さらにIgG4関連疾患由来の顎下腺導管上皮細胞は、IFN γ 処置により上皮バリア機能が著しく亢進し、これはタイト結合分子であるclaudin-7の発現上昇によることを見出した。これはIgG4関連疾患における特徴、すなわち腺機能障害は組織に高度な線維化を認めるにも関わらず可逆的であることの一因であると示唆される。

研究成果の概要(英文)：We examined submandibular gland (SMG) tissue from control individuals and patients with IgG4-RD and established an HSDEC culture system. Claudin-4, claudin-7, occludin, and JAMA were expressed at the apical side of the duct epithelium in SMG tissue and at the cell borders in HSDECs of normal and IgG4-RD. The expression and distribution of TJs in SMG tissue were not different in control individuals and patients with IgG4-RD in vivo and in vitro. Although interferon-gamma (IFN γ) generally disrupts the integrity and function of TJs, IFN γ markedly increased the epithelial barrier function of HSDECs via upregulation of claudin-7 expression in HSDECs from patients with IgG4-RD. This is the first report showing an IFN γ -dependent increase in epithelial barrier function in the salivary gland duct epithelium. Our results provide insights into the functional significance of TJs in salivary gland duct epithelium in physiological and pathological conditions, including IgG4-RD.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：IgG4関連疾患 唾液腺 上皮バリア タイト結合

1. 研究開始当初の背景

唾液腺において唾液が産生・分泌される際には、原唾液が腺房で産生され、導管で電解質の分泌・再吸収が行われている。唾液腺上皮も他の上皮と同じく、細胞間接着装置により細胞同士が結合する。特にタイト結合は腺と管の管腔側とを隔てる強固なバリアとしての働きをすると同時に、唾液分泌機能に関与することが知られている。タイト結合は、claudin をはじめ複数のタンパクから構成されており、細胞間の物質の移動を制御するバリア機能、頂端領域と基底領域の領域を区分し、細胞の極性を維持するフェンス機能のほか、細胞内シグナル伝達も担う。これらタイト結合分子は、生体内ではサイトカインなどの様々な因子の影響を受け、その発現が動的に変化している。

一方、IgG4 関連涙腺・唾液腺炎 (IgG4-DS) は IgG4 関連疾患に含まれ、持続する涙腺・唾液腺の腫脹および腺分泌障害を認める疾患であり、ときに自己免疫性膵炎などの他臓器合併症を伴う。概要でも触れたが、腺機能障害は組織に高度な線維化を認めるにも関わらず可逆的である。唾液腺分泌機能には腺上皮が関与しており、実際我々の予備検討でも IgG4-DS では、腺分泌を行う上で重要な役割を担う上皮間接着分子のひとつであるタイト結合関連蛋白の発現に変化は認められていない。一方で病変局所においては、Th2 サイトカイン (IL-4, IL-13) や制御性 T 細胞 (Treg) 産生サイトカイン (IL-10, TGF-β) の発現増加が報告されている。こうしたサイトカインは本来、上皮タイト結合に影響を与えるはずであるが、実際には変化はない。

2. 研究の目的

IgG4 関連疾患は、高 IgG4 血症および組織学的に IgG4 陽性形質細胞浸潤を病態基盤とする全身性、慢性炎症性疾患であり、今世紀に入り本邦から提唱された新しい疾患概念である。頭頸部領域においては IgG4-DS が含まれるが、本疾患の病因病態はいまだ不明である。唾液腺においてはシェーグレン症候群と比較し、高度の線維化を認めるものの腺機能に可逆性があることが特徴的である。治療はステロイドが著効するが、近年治療抵抗性やステロイド維持が必要な症例が増加している。そこで本研究では、IgG4-DS のヒト唾液腺および正常のヒト唾液腺の培養細胞、特に導管上皮細胞に着目し、本疾患の病態に迫るとともに、新たな治療法開発の突破口につながることを目標とする。

具体的には、

ヒト顎下腺導管上皮細胞 (Human salivary duct epithelial cells; HSDECs) の培養を行い、in vitro での実験・解析を可能とする実験系を確立すること。

正常および IgG4 関連疾患患者のヒト顎下腺上皮における上皮および上皮バリア機能の違いの有無を明らかにすること。

IgG4 関連疾患における線維化とタイト結合分子との関連を明らかにすること。

を目的とし検討を行った。

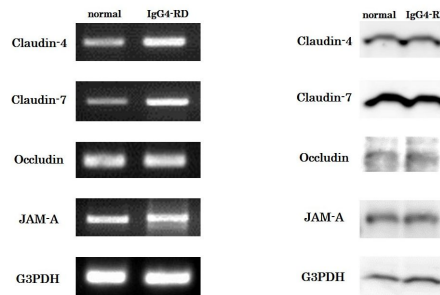
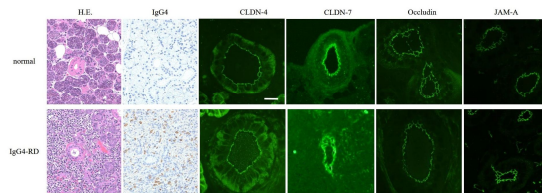
3. 研究の方法

解析に用いた細胞は、hTERT を導入し延命化したヒト顎下腺導管上皮培養細胞で、培養はヒト腭管上皮細胞の培養法に準じた。

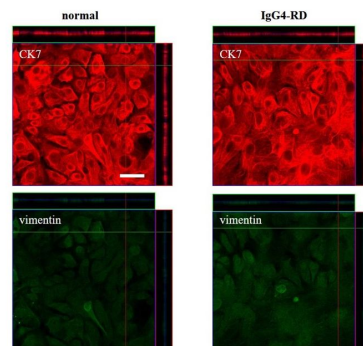
組織は正常および IgG4-DS 患者の摘出顎下腺組織を凍結およびパラフィン固定したものを解析に用いた。サイトカインの影響を検討するために処置した薬剤は、EGF, TGF-β, IFN-γ で RT-PCR 法, Western blotting 法, 免疫組織化学染色法, 免疫細胞化学染色法, 経上皮電気抵抗値 TER 測定にて、解析を行った。

4. 研究成果

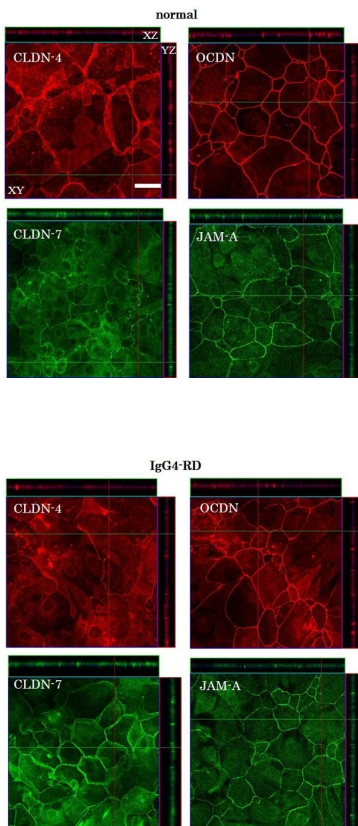
正常顎下腺および IgG4-DS 由来顎下腺において、タイト結合関連蛋白である Claudin-4, -7, Occludin, JAM-A が導管上皮の頂端側で認められ、両者の発現に違いは認められなかった。RT-PCR 解析, ウェスタンブロット解析においても同様の結果が得られている。



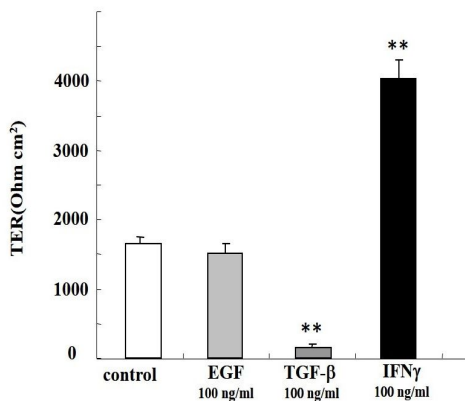
培養細胞は、顎下腺導管上皮のマーカーである CK7 を発現し、間葉系マーカーであるビメンチンの発現は認めてなかった。各タイト結合関連分子の免疫染色を行うと、正常由来顎下腺導管上皮細胞, IgG4-DS 由来顎下腺導管上皮細胞, いずれにおいても



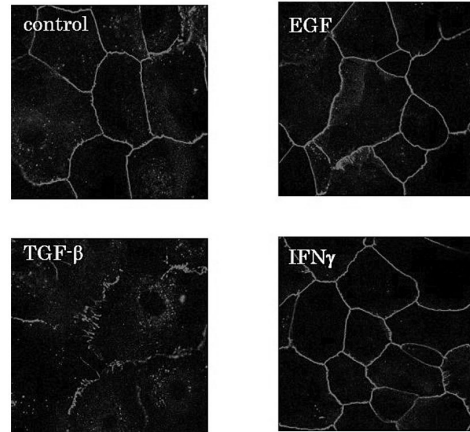
Claudin-4,7,Occludin,JAM-A の各種タイト結合関連蛋白が 細胞膜上に発現していた .



ヒト顎下腺導管上皮細胞の上皮バリア機能に対し、サイトカインがどのような影響を与えるか調べるため、EGF, TGF- β , IFN γ の各サイトカインを処置した培養細胞の TER を測定した . その結果、EGF 処置では有意な差を認めなかったものの、TGF- β 処置で TER は有意に減少し、興味深いことに IFN γ 処置において TER が著明に上昇した . IgG4-RD 由来の培養細胞に サイトカインを処置したところ、正常由来と同様の結果で、TGF- β 処置で TER は有意に減少し、IFN γ 処置で TER が著明に上昇した .

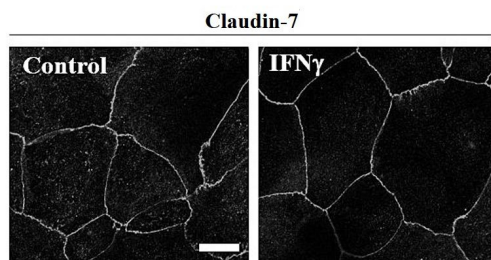
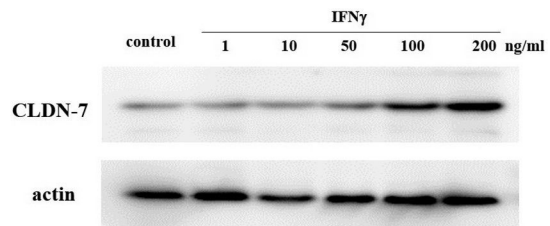


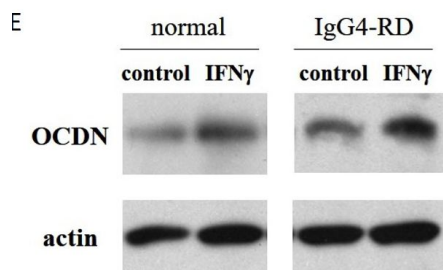
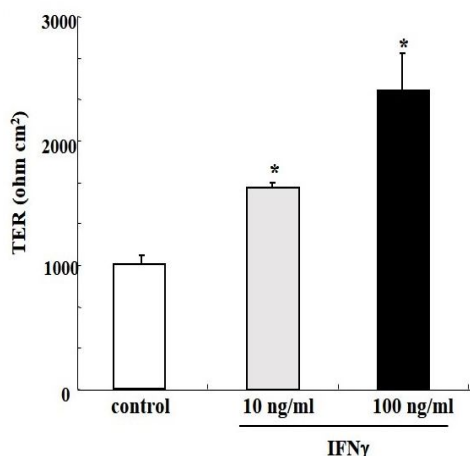
各サイトカインを処置したヒト顎下腺導管上皮細胞の Occludin の発現を免疫染色によって解析したところ、TGF- β 処置細胞では、細胞膜上の Occludin の発現が低下し、一方 IFN γ 処置細胞では、Occludin が細胞膜上に安定高発現していた . これは正常由来、IgG4-DS 由来どちらの細胞でも同様の結果で



あった .

次に IFN γ によるバリア機能増強のメカニズムを探るため、Claudin-7 に注目して解析したところ、RT-PCR 法およびウェスタンブロット法にて、IFN γ 濃度依存性に Claudin-7 の発現が上昇することが確認された . これに一致して、IFN γ 濃度依存性に TER の有意な上昇を認めた . また、免疫染色でも IFN γ 処置細胞で Claudin-7 が細胞膜上に安定して発現していることが示された .





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 8 件)

Takano K, Nomura K, Abe A, Kamekura R, Yamamoto M, Ichimiya S, Takahashi H, Himi T. Clinicopathological analysis of salivary gland tissue from patients with IgG4-related disease. *Acta Otolaryngol* (in press) 【査読あり】

Abe A, Takano K, Kojima T, Nomura K, Kakuki T, Kaneko Y, Yamamoto M, Takahashi H, Himi T. Interferon-gamma increased epithelial barrier function via upregulating claudin-7 expression in human submandibular gland duct epithelium. *J Mol Histol* (in press) 【査読あり】

氷見 徹夫, 高野 賢一, 野村 一顕, 阿部 亜由美, 山本 元久, 高橋 裕樹. 耳鼻咽喉科領域の IgG4 関連疾患 日本耳鼻咽喉科学会会報 117 巻 12 号:1438-1447,

2014. 【査読あり】

Takano K, Abe A, Yajima R, Kakuki T, Jitsukawa S, Nomura K, Himi T. Clinical Evaluation of Sinonasal Lesions in Patients With Immunoglobulin G4-Related Disease. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 124:965-71, 2015. 【査読あり】

Seki N, Yamazaki N, Koizumi J, Takano K, Abe A, Ikeda T, Noguchi H, Himi T. A case of progressively transformed germinal center-type IgG4-related lymphadenopathy. *Auris Nasus Larynx* 42:345-7, 2015. 【査読あり】

Abe A, Takano K, Seki N, Jitsukawa S, Yamamoto M, Takahashi H, Himi T. The clinical characteristics of patients with IgG4-related disease with infiltration of the labial salivary gland by IgG4-positive cells. *Mod Rheumatol* 24:949-52, 2014. 【査読あり】

Takano K, Yajima R, Seki N, Abe A, Yamamoto M, Takahashi H, Himi T. A study of infraorbital nerve swelling associated with immunoglobulin G4 Mikulicz's disease. *Mod Rheumatol* 24:798-801, 2014. 【査読あり】

Takano K, Keira Y, Seki N, Abe A, Yamamoto M, Takahashi H, Himi T. Evaluation of submandibular versus labial salivary gland fibrosis in IgG4-related disease. *Mod Rheumatol* 24:1023-5, 2014. 【査読あり】

〔学会発表〕(計 2 件)

阿部亜由美, 高野賢一, 亀倉隆太, 氷見徹夫. IgG4 関連疾患における顎下腺導管上皮タイト結合分子の発現変化. 第 28 回日本口腔・咽頭科学会, 平成 27 年 9 月 10 日 - 11 日, ホテル阪神 (大阪府大阪市)

阿部亜由美, 高野賢一, 亀倉隆太, 氷見徹夫. IgG4 関連疾患における顎下腺導管上皮タイト結合分子の発現変化. 第 24 回日本シェーグレン症候群学会, 平成 27 年 9 月 18 日 - 19 日, 京王プラザホテル (東京都新宿区)

〔図書〕(計 0 件)

〔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：
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

阿部 亜由美 (ABE, Ayumi)
札幌医科大学・医学部・研究員
研究者番号：80644468

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：