

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591460

研究課題名(和文) IgG4 関連疾患の病態解明に向けて - T 細胞機能異常に基づいたモデルマウスの確立

研究課題名(英文) Clarification of the etiopathogenesis of IgG4-related disease: Establishment of a mouse model based on abnormal T cell functional abnormalities

研究代表者

川野 充弘 (Kawano, Mitsuhiro)

金沢大学・大学病院・講師

研究者番号：20361983

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000 円、(間接経費) 1,200,000 円

研究成果の概要(和文)：Th2優位の免疫反応を示すLat Y136F knock-inマウス(Latマウス)がIgG4関連疾患(IgG4-RD)のモデル動物となり得るかを検討した。Latマウスは腎臓、膵臓、唾液腺においてヒトIgG4-RDと類似した病変を形成し、良好なステロイド反応性を示したことからIgG4-RDのモデルとなりうると考えられた。更に、APRILの意義を検討する為、LatマウスにAPRIL阻止抗体を投与した。APRIL阻止抗体投与群ではコントロール群と比較して腎臓の炎症が有意に抑制された。この結果より、APRILは少なくともIgG4関連腎臓病において病変形成に関与する因子である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We evaluated whether Lat Y136F knock-in mice, which show Th2 predominant immunoreaction with increased serum IgG1, a counterpart of human IgG4, are a novel mice model for IgG4-related disease (IgG4-RD). Lat Y136F knock-in mice showed a similar pathology to that of human IgG4-RD in kidney, pancreas and salivary glands, and a good response to corticosteroid. These results suggested that Lat Y136F knock-in mice are a novel mice model for IgG4-RD. Next, we analyzed the role of APRIL in IgG4-RD using Lat Y136F knock-in mice. We administered APRIL blocking antibody to Lat Y136F knock-in mice, and found that the inflammation in kidney in an APRIL blocking antibody group was significantly decreased as compared to that in a control group. This result indicated that APRIL plays some role in the promotion of lesions at least in IgG4-related kidney disease.

研究分野：リウマチ・膠原病内科

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー内科学

キーワード：IgG4関連疾患 モデルマウス APRIL

## 1. 研究開始当初の背景

IgG4 関連疾患は、血清 IgG4 の高値および膵臓、胆管、後腹膜、涙腺、唾液腺、肺、腎臓、肝臓、下垂体、前立腺など多岐にわたる臓器への IgG4 陽性形質細胞の浸潤、線維化を特徴とする全身性炎症性疾患である。

IgG4 関連疾患の発症機序については、申請者らは B 細胞および T 細胞の観点から研究を行ってきた。IgG4 関連の涙腺・唾液腺炎において、組織浸潤および末梢血中の IgG4 陽性細胞のクローナリティーを解析した結果、組織に浸潤している IgG4 陽性形質細胞の大部分はポリクローナルであることを報告した (Yamada K, Kawano M, Clin Exp Immunol 2008)。一方で、IgG4 関連疾患では病変局所で Th2 有意のサイトカイン産生が起こり、病変局所で Treg が増加し IL-10、TGF- $\beta$  等のサイトカインを産生することにより局所の線維化と IgG4 陽性形質細胞の増加を認めることが明らかとなった。

我々は、形質細胞の生存に関与する分子の一つである A proliferation-inducing ligand (APRIL) に着目した。我々は、IgG4 関連腎臓病患者の腎臓組織において APRIL 産生細胞および可溶性 APRIL の発現亢進およびステロイド投与後の発現低下を確認した。

しかしながら、IgG4 関連疾患の発症機序については未だに不明であり、本疾患の動物モデルの確立が急務であると考えられる。

## 2. 研究の目的

Th2 優位の免疫反応とリンパ増殖性疾患を起こす Lat Y136F knock-in マウスが、IgG4 関連疾患の動物モデルとなり得るかを検討し、IgG4 関連疾患の発症機序の解明を通して、諸臓器の発症に応じた治療法の開発及び確立を本研究の目的とする。

さらに、確立したモデルを用い IgG4 関連疾患における病変組織への IgG4 陽性細胞浸潤に関与する分子について検討することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) Lat Y136F knock-in マウスの組織学的検討

Lat Y136F knock-in マウス 47 匹と野生種のマウス 58 匹について、6、8、10、12、16、20 週齢で血液および組織 (腎臓、膵臓、唾液腺) を採取した。HE、アザン、IgG および IgG1 染色を行った。さらに、炎症および線維化の程度について、それぞれ炎症スコア (0-4)、線維化スコア (0-3) を用いて評価した。

### (2) ステロイド反応性の評価

Lat Y136F knock-in マウスに 4 週齢または 7 週齢から週 3 回水溶性プレドニゾロン 20mg/kg を腹腔内投与し、腎臓、膵臓、唾液腺の組織学的評価を行った。

### (3) APRIL 阻止抗体の投与

4-5 週齢の Lat Y136F knock-in マウスに 100  $\mu$ g の APRIL 阻止抗体 (n=6) またはコントロール IgG (n=7) を週 2 回静脈内投与した。6-7 週齢で腎臓および膵臓の組織学的評価を行った。それぞれ 7 週齢、9 週齢に組織を評価した。腎臓においては、3 強視野におけるリンパ球、形質細胞浸潤数をカウントし、1 強視野当たりの平均細胞数を算出した。膵臓においては、50 細胞以上の細胞浸潤を認める部位を 1 フォーカスと定義し、膵臓全視野におけるフォーカス数を算出した。

## 4. 研究成果

### (1) Lat Y136F knock-in マウスの組織学的検討

Lat Y136F knock-in マウスは少なくとも 6 週齢において腎臓、膵臓、唾液腺に炎症および線維化を認めた。病変部位において、IgG および IgG1 (ヒトの IgG4 に対応) 陽性細胞浸潤を認めた。

### (2) ステロイド反応性の評価

ステロイド投与実験において、Lat Y136F knock-in マウスは、腎臓、膵臓、唾液腺病変

のいずれもコントロール群と比較して病変が軽度であった。

Lat Y136F knock-in マウスは、Th2 優位の免疫反応性を有し、さらに上記に示した組織学的特徴、ステロイド反応性を認めることより、新規のヒト IgG4 関連疾患動物モデルであると結論づけた。

### (3) APRIL 阻止抗体の投与

Lat Y136F knock-in マウスに APRIL 阻止抗体を投与し、APRIL が病変形成に関与しているかを検討した。

腎臓において、APRIL 阻止抗体投与群では、平均 318 個に対しコントロール IgG 投与群では 862 個であり、優位に APRIL 投与群では炎症細胞が少なかった。また、特筆すべき点としては、APRIL 阻止抗体投与群において 50% (3/6) のマウスで腎臓に炎症を認めなかった。以上の結果より腎臓において APRIL を阻害することにより病変の進行が抑制されることが示された。脾臓においては、APRIL 阻止抗体およびコントロール IgG 投与群におけるフォーカスコアはそれぞれ、3.0、4.1 であった。APRIL 組織抗体投与群において炎症スコアが低い傾向が見られたが、有意差は認めなかった。

以上の結果より、我々は Lat Y136F knock-in マウスに APRIL 阻止抗体を投与することにより腎臓においては病変の形成が抑制された。脾臓においては、明らかな APRIL 阻止抗体の効果は認めなかった。腎臓と脾臓で APRIL 阻止抗体の効果に差を認めた理由は定かではないが、組織による APRIL 以外の別の因子の関与している可能性が推測された。今後、IgG4 関連疾患における APRIL の意義についてさらに検討が必要と考えられた。

### (4) 研究成果のまとめ

以上の結果より、我々は Th2 有意の免疫反応を有する新規 IgG4 関連疾患のモデル動物

を確立し、APRIL が IgG4 陽性細胞浸潤に関与していることを示した。

今後、本モデルマウスは IgG4 関連疾患の病因の解明やステロイド代替薬の評価に有用と考えられた。

### 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 17 件)

1. Ito N, Yagi K, Kawano M, Mori Y, Okazaki S, Chujo D, Takeda Y, Kobayashi J, Yamagishi M. Analysis of pancreatic endocrine function in patients with IgG4-related diseases, in whom autoimmune pancreatitis was ruled out by diagnostic imaging. *Endocrine Journal* 2014. (in press) (査読あり)

2. Hara S, Kawano M, Mizushima I, Yamada K, Fujita K, Harada K, Matsumura M, Yamagishi M, Sato Y, Yamaguchi Y, Nakanuma Y, Nagata M. A condition closely mimicking IgG4-related disease despite the absence of serum IgG4 elevation and IgG4-positive plasma cell infiltration. *Mod Rheumatol*. 2014. (in press) (査読あり)

3. Yamada K, Hamaguchi Y, Saeki T, Yagi K, Ito N, Kakuchi Y, Yamagishi M, Takehara K, Nakanuma Y, Kawano M. Investigations of IgG4-related disease involving the skin. *Mod Rheumatol*. 23(5):986-93, 2013. doi: 10.1007/s10165-012-0786-7 (査読あり)

4. Saeki T, Kawano M, Mizushima I, Yamamoto M, Wada Y, Nakashima H, Homma N, Tsubata Y, Takahashi H, Ito T, Yamazaki H, Saito T, Narita I. The clinical course of patients with IgG4-related kidney disease. *Kidney Int*. 84(4):826-33, 2013. doi: 10.1038/ki.2013.191 (査読あり)

5. Ito K, Yamada K, Mizushima I, Aizu M, Fujii H, Mizutomi K, Matsumura M, Hayashi

- K, Yamagishi M, Umehara H, Yamaguchi Y, Nagata M, Kawano M. Henoch-Schönlein purpura nephritis in a patient with IgG4-related disease: A possible association. *Clin Nephrol*. 79(3):246-52, 2013. doi: 10.5414/CN107114. ( 査読あり )
6. Kawano M, Suzuki Y, Yamada K, Mizushima I, Matsumura M, Nakajima K, Yamagishi M, Yamaguchi Y. Primary Sjögren's syndrome with chronic tubulointerstitial nephritis and lymphadenopathy mimicking IgG4-related disease. *Mod Rheumatol*. 2013 Oct 21. [Epub ahead of print] <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/14397595.2013.844303>. ( 査読あり )
7. Kawano M, Mizushima I, Yamaguchi Y, Imai N, Nakashima H, Nishi S, Hisano S, Yamanaka N, Yamamoto M, Takahashi H, Umehara H, Saito T, Saeki T. Immunohistochemical Characteristics of IgG4-Related Tubulointerstitial Nephritis: Detailed Analysis of 20 Japanese Cases. *Int J Rheumatol*. 2012:609795. 2012. doi: 10.1155/2012/609795 ( 査読あり )
8. Stone JH, Khosroshahi A, Deshpande V, Chan JK, Heathcote JG, Aalberse R, Azumi A, Bloch DB, Brugge WR, Carruthers MN, Cheuk W, Cornell L, Castillo CF, Ferry JA, Forcione D, Klöppel G, Hamilos DL, Kamisawa T, Kasashima S, Kawa S, Kawano M, Masaki Y, Notohara K, Okazaki K, Ryu JK, Saeki T, Sahani D, Sato Y, Smyrk T, Stone JR, Takahira M, Umehara H, Webster G, Yamamoto M, Yi E, Yoshino T, Zamboni G, Zen Y, Chari S. Recommendations for the nomenclature of IgG4-related disease and its individual organ system manifestations. *Arthritis Rheum*. 64(10):3061-7, 2012. doi: 10.1002/art.34593 ( 査読あり )
9. Deshpande V, Zen Y, Chan JK, Yi EE, Sato Y, Yoshino T, Klöppel G, Heathcote JG, Khosroshahi A, Ferry JA, Aalberse RC, Bloch DB, Brugge WR, Bateman AC, Carruthers MN, Chari ST, Cheuk W, Cornell LD, Fernandez-Del Castillo C, Forcione DG, Hamilos DL, Kamisawa T, Kasashima S, Kawa S, Kawano M, Lauwers GY, Masaki Y, Nakanuma Y, Notohara K, Okazaki K, Ryu JK, Saeki T, Sahani DV, Smyrk TC, Stone JR, Takahira M, Webster GJ, Yamamoto M, Zamboni G, Umehara H, Stone JH. Consensus statement on the pathology of IgG4-related disease. *Mod Pathol*. 25(9):1181-92, 2012. doi: 10.1038/modpathol.2012.72. ( 査読あり )
10. Mizushima I, Yamada K, Fujii H, Inoue D, Umehara H, Yamagishi M, Yamaguchi Y, Nagata M, Matsumura M, Kawano M. Clinical and histological changes associated with corticosteroid therapy in IgG4-related tubulointerstitial nephritis. *Mod Rheumatol*. 22(6):859-70, 2012. ( 査読あり )
11. Yoshita K, Kawano M, Mizushima I, Hara S, Ito Y, Imai N, Ueno M, Nishi S, Nomura H, Narita I, Saeki T. Light-microscopic characteristics of IgG4-related tubulointerstitial nephritis: distinction from non-IgG4-related tubulointerstitial nephritis. *Nephrol Dial Transplant*. 27(7):2755-61, 2012. doi: 10.1007/s10165-011-0589-2. ( 査読あり )
12. Yamaguchi Y, Kanetsuna Y, Honda K, Yamanaka N, Kawano M, Nagata M; Japanese study group on IgG4-related nephropathy. Characteristic tubulointerstitial nephritis in IgG4-related disease. *Hum Pathol*. 43(4):536-49, 2012. doi: 10.1016/j.humpath.2011.06.002 ( 査読あり )
13. Masaki Y, Kurose N, Yamamoto M,

Takahashi H, Saeki T, Azumi A, Nakada S, Matsui S, Origuchi T, Nishiyama S, Yamada K, Kawano M, Hirabayashi A, Fujikawa K, Sugiura T, Horikoshi M, Umeda N, Minato H, Nakamura T, Iwao H, Nakajima A, Miki M, Sakai T, Sawaki T, Kawanami T, Fujita Y, Tanaka M, Fukushima T, Eguchi K, Sugai S, Umehara H. Cutoff Values of Serum IgG4 and Histopathological IgG4+ Plasma Cells for Diagnosis of Patients with IgG4-Related Disease. *Int J Rheumatol*. 2012:580814, 2012. doi: 10.1155/2012/580814. ( 査読あり )

14. Takahira M, Ozawa Y, Kawano M, Zen Y, Hamaoka S, Yamada K, Sugiyama K. Clinical Aspects of IgG4-Related Orbital Inflammation in a Case Series of Ocular Adnexal Lymphoproliferative Disorders. *Int J Rheumatol*. 2012:635473, 2012. doi: 10.1155/2012/635473 ( 査読あり )

15. Umehara H, Okazaki K, Masaki Y, Kawano M, Yamamoto M, Saeki T, Matsui S, Yoshino T, Nakamura S, Kawa S, Hamano H, Kamisawa T, Shimosegawa T, Shimatsu A, Nakamura S, Ito T, Notohara K, Sumida T, Tanaka Y, Mimori T, Chiba T, Mishima M, Hibi T, Tsubouchi H, Inui K, Ohara H. Comprehensive diagnostic criteria for IgG4-related disease (IgG4-RD), 2011. *Mod Rheumatol*. 22(1):21-30, 2012. doi: 10.1007/s10165-011-0571-z ( 査読あり )

16. Kawano M, Saeki T, Nakashima H, Nishi S, Yamaguchi Y, Hisano S, Yamanaka N, Inoue D, Yamamoto M, Takahashi H, Nomura H, Taguchi T, Umehara H, Makino H, Saito T. Proposal for diagnostic criteria for IgG4-related kidney disease. *Clin Exp Nephrol*. 15(5):615-26, 2011. doi: 10.1007/s10157-011-0521-2 ( 査読あり )

17. Kim F, Yamada K, Inoue D, Nakajima K,

Mizushima I, Kakuchi Y, Fujii H, Narumi K, Matsumura M, Umehara H, Yamagishi M, Kawano M. IgG4-related tubulointerstitial nephritis and hepatic inflammatory pseudotumor without hypocomplementemia. *Intern Med*. 50(11):1239-44, 2011. [https://www.jstage.jst.go.jp/article/internalmedicine/50/11/50\\_11\\_1239/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/internalmedicine/50/11/50_11_1239/_article) ( 査読あり )

[ 学会発表 ] ( 計 13 件 )

1. Kazunori Yamada, Masahiko Zuka, Kiyooki Ito, Yasunori Suzuki, Yasushi Kakuchi, Tamehito Onoe, Masakazu Yamagishi, and Mitsuhiro Kawano. Inhibition of APRIL suppresses disease progression: Analysis from a novel mouse model for IgG4-related disease. The 2nd International Symposium on IgG4-Related Diseases & Associated Conditions. HONOLULU, U.S.A, 2014.2.16-19.

2. Kazunori Yamada, Takahiro Kawakami, Ichiro Mizushima, Ryoko Hamano, Hiroshi Fujii, Masakazu Yamagishi, and Mitsuhiro Kawano. Abundant APRIL-Producing Macrophages in IgG4-related Kidney Disease. The 2nd International Symposium on IgG4-Related Diseases & Associated Conditions. HONOLULU, U.S.A, 2014.2.16-19.

3. Mitsuhiro Kawano. Overview of New Entities within the IgG4-RD spectrum. Second International Symposium on IgG4 & Related Disease. HONOLULU, U.S.A, 2014.2.16-19.

4. Kazunori Yamada, Masahiko Zuka, Kiyooki Ito, Yasunori Suzuki, Yasushi Kakuchi, Tamehito Onoe, Masami Matsumura, Masakazu Yamagishi, Shozo Izui, Bertrand Huard, Marie Malissen, Bernard Malissen and

Mitsuhiro Kawano, Inhibition of APRIL suppresses disease progression in an IgG4-related disease mice model. 12th International Symposium on Sjögren's syndrome. Kyoto Hotel Okura, Kyoto, Japan. 2013.10.9-12.

5. 川野充弘. シェーグレン症候群の腎病変 (IgG4 関連腎臓病との比較). シンポジウム 1 シェーグレン症候群の臓器病変と腺病変の最前線. 第 22 回日本シェーグレン症候群学会, プリーゼプラザ, 大阪, 2013.9.13-14.

6. 山田和徳, 塚正彦, 伊藤清亮, 小野江為人, 鈴木康倫, 水島伊知郎, 濱野良子, 藤井博, 松村正巳, 川野充弘. IgG4 関連疾患の病態形成における APRIL の関与: モデルマウスを用いた検討. 第 22 回日本シェーグレン症候群学会, プリーゼプラザ, 大阪, 2013.9.13-14.

7. 川野充弘. リウマチ・膠原病疾患における IgG4 関連疾患. ランチョンセミナーII. 第 25 回 中部リウマチ学会. 金沢. 2013.9.6-7.

8. 川野充弘. IgG4 関連腎臓病. シンポジウム 17 IgG4 関連疾患. 第 57 回日本リウマチ学会総会・学術集会. 京都. 2013.4.18-20.

9. Takahiro Kawakami, Kazunori Yamada, Ichiro Mizushima, Hiroshi Fujii, Kiyooki Ito, Shozo Izui, Bertrand Huard, and Mitsuhiro Kawano. Kidney Week 2012, San Diego Convention Center, San Diego, USA, 2012.11.1-4

10. Mitsuhiro Kawano. Special Seminar: IgG4-related Disease: Initial Discovery, Evolving Concepts, Up-to-date Knowledge, role of a proliferation inducing ligand (APRIL). University of Geneva, Geneva, Switzerland. 2012.6.5

11. 山田和徳, 川上貴裕, 水島伊知郎, 鈴木康倫, 藤井博, 松村正巳, 能登原憲司, 川野

充弘. IgG4 関連腎臓病における APRIL 発現の検討. 第 21 回日本シェーグレン症候群学会. ウェスティン都ホテル京都, 京都市, 2012.9.7-8.

12. 川野充弘, 山田和徳, 水島伊知郎, 鈴木康倫, 谷悠紀子, 川村里佳, 濱野良子, 藤井博, 松村正. IgG4 関連疾患におけるステロイド維持療法期の再発の検討. ワークショップ 71 IgG4 関連疾患 1. 第 56 回日本リウマチ学会総会・学術集会. 東京. 2012.4.26-28

13. Mitsuhiro Kawano. Proposal for diagnostic criteria for IgG4-related kidney disease. International Symposium for IgG4-related disease. Kanazawa, Japan, 2011.9.10.

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

川野 充弘 (KAWANO, Mitsuhiro)  
金沢大学・大学病院・講師  
研究者番号: 20361983

##### (2) 研究分担者

山田 和徳 (YAMADA, Kazunori)  
金沢大学・大学病院・助教  
研究者番号: 90397224