

筑波大学

博士（医学）学位論文

Pathogenic roles and therapeutic potential
of the CCL8-CCR8 axis in a murine model
of IgG4-related sialadenitis

(IgG4 関連疾患モデルマウスの唾液腺炎における
CCL8-CCR8 経路の病態形成での役割と
治療標的としての可能性)

2 0 2 1

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

本田 文香

目次

1. 研究背景	5
1.1 IgG4 関連疾患とは	5
1.2 IgG4 関連疾患と CCL18 (CC chemokine ligand 18)-CCR8 (CC chemokine receptor 8)経路	7
1.3 IgG4 関連疾患のモデルマウス	9
2. 目的	11
3. 方法	12
3.1 マウス	12
3.2 マウス線維芽細胞の培養と処理	12
3.3 唾液腺の病理組織学的評価	13
3.4 唾液腺の免疫染色	14
3.5 定量リアルタイム PCR (polymerase chain reaction)	15
3.6 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	16
3.7 マウス唾液腺からの単核球細胞分離	17
3.8 フローサイトメトリー	17
3.9 マウスへの CCL8 中和抗体投与	18

3.10 統計解析	19
4. 結果	20
4.1 LAT マウスの唾液腺の病理学的評価	20
4.2 LAT マウスにおける CCL8-CCR8 経路の発現亢進	20
4.3 LAT マウスにおける Th2 サイトカインの発現亢進	20
4.4 唾液腺における CCL8 発現細胞	21
4.5 抗 CCL8 中和抗体投与による唾液腺炎への効果	22
4.6 線維芽細胞における CCL8 のコラーゲン産生への影響	22
5. 考察	24
6. 結論	29
7. 略語	30
8. 謝辞	31
9. 出典	32
10. 参考文献	33
11. 図表	41

1. 研究背景

1.1 IgG4 関連疾患とは

IgG4 関連疾患(Immunoglobulin G4-related disease: IgG4-RD)は、血清 IgG4 の上昇と、種々の臓器の腫大、IgG4 陽性形質細胞の浸潤と線維化を特徴とし[1]、2001 年に本邦より初めて報告された疾患である[2]。

罹患臓器は、涙腺・唾液腺・膵臓・胆管・後腹膜腔など広範囲に及びうるが単一臓器のこともあり、各臓器の専門家から疾患概念が提唱され、近年、既存の疾患が IgG4-RD に再分類されている[3]。涙腺や唾液腺の両側性腫脹を特徴とするミクリッツ病は、もともとシェーグレン症候群の亜型とされていたが、シェーグレン症候群で見られる特異抗体である抗 SS-A 抗体、抗 SS-B 抗体は通常陰性であり[4]、血清 IgG4 値の上昇が特徴であることから、IgG4-RD に再分類されたという歴史がある[3]。

IgG4-RD では、アレルギー疾患の合併が多いことが報告されているが[5]、ミクリッツ病とシェーグレン症候群および健常コントロールの口唇唾液腺におけるサイトカイン産生を比較した研究において、ミクリッツ病では type-2 T helper (Th2)関連サイトカインである IL-4、また IL-10、TGF (Transforming growth factor)- β といった制御性 T 細胞関連のサイ

トカインの有意な発現上昇が認められる一方で、IFN- γ 、IL-17には有意差が認められず、Th2 優位の免疫環境を示すことが示唆されている[4]。

IgG4-RD では、血清 IgG4 と臓器への IgG4 陽性形質細胞の浸潤が特徴とされているものの[1]、IgG4 の病態形成における役割は未だ不明である。健常人における血清総 IgG における IgG4 の割合は通常 5%以下であり[6]、基準値内での個人差が大きいものの、個人における値は通常一定であるとされる[7]。IL-4 や IL-13 といった Th2 サイトカインは IgG4 や IgE へのクラススイッチを引き起こすことが知られているが[6]、さらに IL-10 が加わると、より IgG4 へのクラススイッチへシフトすることが報告されている[8]。また、Th2 細胞や濾胞性 T 細胞 (Follicular helper T cell; Tfh) から産生される IL-21 も、B 細胞や形質細胞の活性化や IgG4 へのクラススイッチ亢進に関与することが報告されている[9]。IgG4-RD では血清 IgG4 だけでなく組織における IgG4 陽性形質細胞が増加していること、ステロイドが有効であることから、自己免疫的な病態、すなわち病原性を持つ自己抗体の存在が想定されてきたが、一部の自己免疫性膵炎において抗ラミニン 511-E8 抗体の存在が報告されているのみで[10]、その他の臓器病変における病原的自己抗体の存在は未だ明らかで

ない。

そのほか、近年 CD4 陽性細胞傷害性 T 細胞が、IgG4-RD の病変局所で IFN- γ を産生し、病態形成に関与するとの報告[11]や、末梢血中の Tfh1、Tfh2 が IgG4-RD で上昇しており、このうち、Tfh2 は plasmablast の分化や IgG4 産生に関与するという報告があり[12]、複数の CD4 陽性 T 細胞サブセットが病態に関与する可能性が示唆されている[9]。また、IgG4-RD の末梢血中の plasmablast は健常人や他の炎症性疾患と比較し有意に増加しており、診断や治療反応性の判断においてバイオマーカーとして有用である可能性が報告されている[9][13]。

治療としては、ステロイドが有効であるが、ステロイド減量後の再燃例も多く、臨床的な課題である[14]。また、ステロイド投与による糖尿病や高血圧といった合併症も臨床的に問題となることが多く、病因に基づいた疾患特異的な治療戦略の構築が求められている。

1.2 IgG4 関連疾患と CCL18 (CC chemokine ligand 18)-CCR8 (CC chemokine receptor 8)経路

先行研究において、いずれも唾液腺炎をきたす IgG4-RD とシェーグ

レン症候群の口唇唾液腺における遺伝子発現を、DNA マイクロアレイにより網羅的に比較し、IgG4-RD の口唇唾液腺で相対的に発現が上昇していた発現変動遺伝子の中から、T 細胞や B 細胞のケモタキシス、線維化に関わるケモカインである CCL18 が同定された[15]。IgG4-RD の口唇唾液腺に浸潤するマクロファージ、樹状細胞、形質細胞では、シェーグレン症候群、健常人コントロールと比較して、有意に CCL18 の mRNA レベル、タンパクレベルでの発現が増加していた[9][15]。さらに、IgG4-RD の顎下腺では、CD163 陽性 M2 マクロファージが CCL18 を産生し、線維化スコアと相関することや[16]、血清 CCL18 濃度は IgG4-RD の疾患活動性および罹患臓器数と相関すること[17]、in vitro において、CCL18 は IL-4、IL-10 と共に IgG4 へのクラススイッチに関わること[18]が報告されている。

IgG4-RD とシェーグレン症候群は、共に唾液腺炎を生じるものの、臨床的には性差やステロイド反応性が異なる[4][15]。IgG4-RD とシェーグレン症候群の網羅的遺伝子解析から抽出された CCL18 およびその受容体である CCR8 経路は、IgG4-RD の病態へ関与していることが示唆される。

1.3 IgG4 関連疾患のモデルマウス

免疫難病の病因や病態形成のメカニズムの解明、また治療標的候補分子に関する薬剤の有効性を明らかにするにあたっては、疾患モデルマウスを用いたアプローチが大きな役割を果たすが、IgG4-RD においては、マウスが IgG4 サブタイプを持たないことから、IgG4-RD の病態を完全に再現したモデルマウスの開発が課題である。LAT (The linker for activation of T cells) Y136F knock-in mice (LAT マウス)は、LAT の 136 番目のチロシンがフェニルアラニンに変異したマウスであり、Th2 優位の免疫応答、血清 IgG1、IgE の上昇をきたし、リンパ増殖性疾患を自然発症する[19]。LAT マウスがこのような特徴を呈するメカニズムについては、未だ明らかにされていないものの、ヒト IgG4-RD と類似した特徴からモデルマウスとなりうる可能性について着目された。近年、LAT マウスの唾液腺、膵臓、腎臓[20]、硬膜[21]といった臓器に、線維化を伴う IgG1 陽性形質細胞浸潤をきたし、ステロイド投与によって病変の改善を認めることが報告されており[20]、IgG4-RD と類似した特徴を持つ疾患モデルマウスとして期待されている。現在、LAT マウス以外にも、MRL/lpr マウスへの poly (I.C)投与による自己免疫性膵炎モデル[22]や、

ヒト TLR7 を強発現させた huTLR7Tg/mTlr7KO マウス[23]、などが疾患モデルマウスとなる可能性が報告されている。この中で、LAT マウスの強みは、多臓器に IgG1 陽性形質細胞浸潤と線維化を早期に自然発症するだけでなく、IgG4-RD で特徴とされる Th2 優位の免疫応答を示し、ステロイド投与による臓器病変の改善も明らかにされていることから[20]、ヒト IgG4-RD の免疫応答により類似した環境を *in vivo* で再現可能である、という点である。

CCR8 の T 細胞における発現は Th2 条件で上昇するとされ[24][25]、この点はヒトとマウスで共通である一方、マウスは CCL18 を持たず、ヒト CCL18 の機能的アナログはマウス CCL8 であるとされている[25]。いずれも IL-4 および IL-10 によって主にマクロファージから産生され、CCR8 陽性細胞のケモタキシスを誘導する[25]。今回 LAT マウスを用いるにあたっては、CCL8-CCR8 経路を解析することで、IgG4-RD に対する治療標的としての可能性を検討することとした。

2. 目的

本研究は、IgG4-RD の病態形成における CCL18-CCR8 経路の役割を、モデルマウスを用いて検証し、またこの経路 (マウスにおいては CCL8-CCR 経路)の治療標的としての可能性を明らかにすることを目的とした。

3. 方法

3.1 マウス

C57BL/6J系統のLATマウス (LATY136F knock-in mice)[19]は作成者であるMarseille UniversitéのBernard Malissen先生、Marie Malissen先生
の厚意による許可を得て、金沢大学の川野充弘先生、山田和徳先生、伊藤清亮先生より提供された。LATマウスのホモ接合体およびLittermateは、ヘテロ接合体同士の交配により作成した。LATマウスおよびその比較対照であるLittermateは6週齢の雄マウスを使用した。マウスは、specific pathogen-free条件下で飼育し、全ての実験プロトコルは本学の許諾 (承諾番号20-189)を得て、また倫理ガイドラインを遵守して施行した。

3.2 マウス線維芽細胞の培養と処理

理研バイオリソースセンター (つくば市)よりNIH/3T3マウス線維芽細胞株を購入し使用した。NIH/3T3は10%ウシ胎児血清、ペニシリン (100 U/mL)、ストレプトマイシン (100 µg/mL)を含有したDulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)に懸濁し、37°C、5%CO₂条件で培養した。3~7継代目までの細胞を実験に用いた。

In vitroにおけるCCL8の機能解析では、96ウェルプレートの各ウェルにNIH/3T3を 1×10^5 cells/mLの濃度となるように播種した。測定の24時間前に培地のウシ胎児血清濃度を1%に変更し、各濃度のリコンビナントマウスCCL8 (BioLegend)を添加した。総コラーゲンの定量は、Sirius Red Collagen Detection Kit (Chondrex)を用いて、購入元のマニュアルに従い測定した。

3.3 唾液腺の病理組織学的評価

マウスから唾液腺を採取し、10%ホルマリン緩衝液で固定した後、3 μ m厚のパラフィン切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン (HE; Hematoxylin and eosin)染色およびマッソントリクローム (MT; Masson's trichrome)染色を行なった。

炎症スコアはGreenspanらによって報告された[26]以下のフォーカススコアを用いた：フォーカススコアは4mm²の範囲におけるフォーカスの数で表す。1フォーカスは1腺管周囲の50個以上の単核球細胞浸潤で定義される。

線維化スコアは4mm²の範囲における線維化の占有する面積で示し

た：0: 線維化なし、1: 1-24%の線維化、2: 25-49%の線維化、3: 50%以上の線維化。いずれのスコアリングも、マウスの種類、治療内容に関して盲検下で、別の研究協力者が光学顕微鏡を用いて行なった。

3.4 唾液腺の免疫染色

蛍光免疫染色のために、唾液腺を optimum cutting temperature compound (Sakura Finetek) に包埋した後に -80°C で凍結した。クリオスタットを用いて 5µm 厚の凍結切片を作成した。使用した抗体および試薬は以下の通りである：Alexa Fluor 488 標識抗マウス CD4 抗体 (Thermo Fisher Scientific); Alexa Fluor 647 標識抗マウス B220 抗体 (BioLegend); Alexa Fluor 488 標識抗マウス F4/80 抗体 (BioLegend); Alexa Fluor 488 標識抗マウス CD11c 抗体 (BioLegend); 抗マウス MCP2/CCL8 抗体 (R&D); Alexa Fluor 594 標識ストレプトアビジン (BioLegend); 4'6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (BioLegend)。

また、CCR8 の細胞蛍光染色のために、NIH/3T3 を Smear Gel (GenoStaff) を用い、購入元のマニュアルに従ってスライドガラスに塗り 10% ホルマリン 緩衝液で 15 分間固定した。使用した抗体および試薬は以下

の通りである：非標識抗マウスCCR8抗体 (Abcam); Alexa Fluor546標識ヤギ由来抗ウサギIgG (H+L)抗体 (Thermo Fisher Scientific); DAPI (BioLegend)。

CD138の免疫化学染色には5 μ m厚のパラフィン切片を用いた。使用した抗体、試薬は以下の通りである：非標識抗マウスCD138抗体 (BioLegend); シンプルステインMAX-PO (ニチレイバイオ); シンプルステインDAB溶液 (ニチレイバイオ)。

陰性コントロール染色はアイソタイプを一致させたコントロール抗体を用いて行なった。全ての染色において、サンプルへの非特異的な抗体結合を防ぐために、抗体反応の前に1%ウシ血清由来アルブミンを含有するリン酸緩衝食塩水 (PBS; Phosphate Buffered Salts)で室温にて30分間、ブロッキングを行なった。全ての抗体はSolution B (東洋紡)に溶解し、反応に用いた。Fluoview FV10i共焦点レーザー顕微鏡 (オリンパス)およびBiozero BZ-8100 (キーエンス)を用いて切片を観察し、画像を得た。

3.5 定量リアルタイムPCR

頸部リンパ節および唾液腺は、マウスから採取後、速やかに容積の5

倍以上のRNA later solution (Thermo Fisher Scientific)に浸漬し、-20°Cで保存した。脾臓は、0.16M 塩化アンモニウムで室温にて5分間処理し赤血球を溶血させた後に、40µmフィルターで濾過した。これらの組織および細胞をIsogen (Nippon gene)に浸漬し、よく破碎し懸濁した。Isogenの購入元のマニュアルに従い、総RNAを抽出した。Prime Script reverse transcriptase master mix (タカラバイオ)を用いて、37°C条件下で15分間反応させることで相補的DNAを作成した。定量リアルタイムPCRはGlyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*Gapdh*)を内因性コントロールとして、Taqman gene expression assay (Thermo Fisher Scientific)を用いて行なった。使用したプライマーは以下の通りである：*Gapdh*, Mm999999915_g1; *Ccr8*, Mm99999115_s1; *Ccl8*, Mm01297183_m1; *Il4*, Mm00445259_m1; *Il10*, Mm00439614_m1; *Col1a2*, Mm00483888_m1。

3.6 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

血清CCL8濃度の測定はELISAキット (R&D)を用いて、購入元のマニュアルに従って行なった。

3.7 マウス唾液腺からの単核球細胞分離

採取した唾液腺は鉈を用いて細かく切断し、CollagenaseD (Roche) (2mg/mL)およびCaCl₂ (5mM)に調整したPBSに浸漬し、37°Cで振盪しながら30分間反応させた。反応後、柔らかくなった唾液腺をスライドガラスに挟んですり潰し、40μmフィルターで細胞をろ過し、PBSで洗浄した。唾液腺実質細胞から、単核球細胞を分離するためにOptiPrep (コスモバイオ)を用いて、密度勾配遠心法で中間層に含まれる単核球細胞を得た。密度勾配遠心法はOptiprepの購入元のマニュアルに従い、マウス細胞に適した密度を選択した。

3.8 フローサイトメトリー

2%ウシ胎児血清含有PBSをバッファーとして用いた。抗マウスCD4抗体 (BioLegend)は20分氷上で反応させた。死細胞はFixable Viability Dye eFluor780 (BioLegend)を用いてゲートアウトした。IFN-γ、IL-4、IL-17、細胞内染色は、Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set (eBioscience)を使用し、透過処理を行なった後に染色した。また、サイトカインの染色前に、細胞をPhorbol myristate acetate (PMA) (50ng/mL)、

Ionomycin (0.5 μ g/mL)、Goldistop (eBioscience)を添加したRPMI-1640培地 (Sigma-Aldrich)中で37°C、5%CO₂条件下にて4時間反応させた。

リン酸化ERK1/2の染色にはPhosflow Lyse/Perm buffer (Becton, Dickinson and Company[BD])およびPerm Buffer III (BD)を用いて、細胞を固定、透過処理を行なった上で、抗リン酸化ERK (Extracellular signal-regulated kinase)1/2抗体で染色を行なった。解析はFACSVerse flow cytometer (BD)を用いて行い、データはFlowJo software (Tree Star)を用いて解析した。

3.9 マウスへのCCL8中和抗体投与

抗マウスCCL8中和抗体 (clone17D6)は、東京薬科大学生命科学部免疫制御学研究室より提供いただいた。既報[27]を参考に、5週齢雄のLATマウスに、1日目と2日目に抗CCL8中和抗体あるいはアイソタイプを一致させたコントロール抗体 (BioLegend)100 μ g/回を尾静脈より投与した。8日目の6週齢時点で、組織を採取し、解析に用いた。予備投与実験で各N=1~2のLATマウスに投与し、マウスの生存を確認した後に、本実験として各N=3で行なった。

3.10 統計解析

全てのデータは平均±標準誤差で示した。二群間の統計学的な有意差検定にはUnpaired t testを用いた。三群間以上の統計学的な有意差検定にはKruskal-Wallis testを用いた。結果は $p < 0.05$ である時に統計学的に有意であるとした。統計解析はGraphPad Prism version 9 (GraphPad software)で行なった。

4. 結果

4.1 LATマウスの唾液腺の病理学的評価

6週齢のLATマウスおよびlittermateの唾液腺の組織学的な評価を行った。LATマウスでは、線維化を伴う単核球浸潤を認め (図1A)、炎症細胞浸潤の程度を定量化したフォーカススコア、および線維化スコアはlittermateと比較して有意に高値であった (図1B)。免疫染色では、CD4陽性細胞、B220陽性細胞(図2A)、CD138陽性細胞の浸潤が認められた (図2B)。

4.2 LATマウスにおけるCCL8-CCR8経路の発現亢進

6週齢のLATマウスおよびlittermateの脾臓、頸部リンパ節、唾液腺における*Ccl8*、*Ccr8*のmRNA発現を定量PCRで比較したところ、脾臓で*Ccl8*、唾液腺で*Ccr8*の発現がLATマウスで有意に高値であった (図3A, B)。また、血清のCCL8濃度はLATマウスで有意に高値であった (図4)。

4.3 LATマウスにおけるTh2サイトカインの発現亢進

6週齢のLATマウスおよびlittermateの脾臓、頸部リンパ節、唾液腺に

における *Il4*、*Il10* の mRNA 発現を定量 PCR で比較したところ、脾臓、唾液腺ではいずれも *littermate* と比較して有意に高値であった (図 5A, B)。

また、脾臓の CD4 陽性細胞のサイトカイン産生を比較したところ (図 6A, B)、LAT マウスでは、*littermate* に比較し、CD4 陽性細胞における IL-4 陽性細胞の割合が有意に高値であった (図 6C)。一方で、IFN- γ 陽性細胞、IL-17 陽性細胞については、*littermate* と LAT マウスで明らかな差を認めなかった (図 6C)。また、LAT マウスにおいて、脾臓と唾液腺の CD4 陽性細胞におけるサイトカイン産生を比較したが、脾臓と唾液腺では明らかな有意差を認めず (図 6D)、同様の傾向があると示唆された。

4.4 唾液腺における CCL8 発現細胞

唾液腺における CCL8 発現細胞を確認するために、二重蛍光免疫染色を行なった。F4/80 陽性マクロファージ、および CD11c 陽性樹状細胞において、CCL8 との共陽性が確認できた (図 7A, B)。先行研究において、ヒト IgG4-RD の唾液腺における CCL18 の主な発現細胞はマクロファージや樹状細胞であることが報告されており [18]、この結果と一致した。

4.5 抗CCL8中和抗体投与による唾液腺炎への効果

CCL8-CCR8経路が治療標的となりうるのかを検討するために、LATマウスに抗CCL8中和抗体あるいはコントロール抗体を投与し、唾液腺炎の組織学的評価を行なった (図8A)。抗CCL8中和抗体を投与したLATマウスでは、コントロール抗体を投与したマウスと比較し、有意にフォーカスコアと線維化スコアが低値であった (図8B, C)。また、コントロール抗体投与群と比較し、抗CCL8中和抗体投与群ではCD4陽性細胞の浸潤が有意に少なかった (図8D, E)。

一方で、*I14*、*I110*のmRNA発現については、脾臓、頸部リンパ節、唾液腺のいずれにおいてもコントロール抗体投与群と抗CCL8中和抗体投与群で明らかな有意差は認めなかった (図9A, B)。

4.6 線維芽細胞におけるCCL8のコラーゲン産生への影響

これまでの結果で、CCL8がリンパ球の遊走の他に、線維化に対する影響を直接及ぼしている可能性を想定し、引き続き*in vitro*の実験を行なった。

まず、マウス線維芽細胞株 (NIH/3T3)におけるCCL8の受容体である

CCR8の発現を蛍光免疫染色で確認した (図10)。次に、NIH/3T3を各種濃度 (0, 10, 100, 300, 1000ng/mL)のリコンビナントマウスCCL8存在下で培養し、*Col1a2*のmRNA発現および総コラーゲンのタンパク発現を解析した。リコンビナントマウスCCL8濃度依存的に、*Col1a2*のmRNA発現および総コラーゲンのタンパク発現は有意に上昇した (図11A, B)。次にリコンビナントマウスCCL8濃度300ng/mLでNIH/3T3を刺激し、リン酸化ERK1/2の発現をフローサイトメトリーで解析したところ、刺激12分後において、リン酸化ERK1/2の有意な発現上昇を認めた (図12A, B)。

5. 考察

本研究では、LATマウスがヒトIgG4-RDと同様に線維化を伴う形質細胞浸潤だけでなく、CCL8-CCR8経路の発現亢進を示すことを明らかにした。また、CCL8の中和抗体投与により、線維化を含む唾液腺炎の改善を認め、マウスCCL8はERK1/2のリン酸化を介して線維芽細胞によるコラーゲン誘導に関与している可能性が示唆された。本研究により得た3つの知見を以下に述べる。

第一に、LATマウスのIgG4-RDとのさらなる類似点を明らかにした。唾液腺病変を含むIgG4-RDでは、Th2優位の免疫環境を示すことが報告されているが[19]、LATマウスもTh2優位のサイトカイン環境を持つことが示唆され、この点は既報とも一致した。また、マウスCCL8-CCR8経路の発現が亢進している可能性があることを確認した。これは、IgG4-RDにおけるCCL18-CCR8経路の発現亢進との類似点と考える。IgG4-RDにおいて、CCL18-CCR8経路が病態の形成に関与することが示唆されているものの、この経路が新規治療標的となりうるかについては明らかでなかった。今回、LATマウスにおいてもCCL8-CCR8経路の亢進が示唆されたことから、この経路の治療標的としての可能性について、LATマウスを用いて検討す

ることとした。一方で、背景でも述べたように、ケモカイン-ケモカイン受容体のシステムにはヒトとマウスでの相違点がある。マウスは、CCL18を持たず、CCL1とCCL8がCCR8のリガンドであり[28]、このうちCCL8がヒトCCL18の機能的アナログであることが報告されている[25]。ヒトCCL18とマウスCCL8はいずれもIL-4とIL-10によって主にマクロファージにより産生されることが報告されているが[25]、本研究においてもLATマウスの唾液腺においてCCL8産生マクロファージの存在を確認した。さらに、*Il4*と*Il10*のmRNA発現レベルはいずれもLATマウスの唾液腺で高値であり、この環境がCCL8の誘導に寄与した可能性が示唆される。

第二に、本研究からCCL8-CCR8経路が治療標的となりうる可能性について明らかにした。LATマウスへの抗CCL8中和抗体の投与により、線維化を含む唾液腺炎が改善する可能性が示唆された。炎症細胞浸潤の改善は、リンパ球のケモタキシスの抑制によるものと考えられる。T細胞におけるCCR8の発現はTh2環境で亢進することが報告されており[25]、Th2優位の免疫環境を持つLATマウスにおいてはCCR8発現が上昇しやすい環境であることが予想される。さらに、興味深いことは抗CCL8中和抗体の投与により炎症細胞浸潤だけでなく、線維化も改善する可能性が示唆されたこ

とである。CCL8-CCR8経路は炎症細胞の遊走に加えて、線維化誘導を介してIgG4-RD病態形成に関与し、治療標的となりうる可能性が示唆された。

第三に、マウスCCL8はERK1/2のリン酸化を介した線維芽細胞からのコラーゲン産生を誘導する可能性を明らかにした。CCR8の下流経路については未だ不明な点も多いが、ERKのリン酸化が関与するという報告がある[29][30]。ERKはMAPK (Mitogen-activated protein kinase)に含まれる、細胞外シグナル伝達分子であり[31]、ERK1/2は線維芽細胞の増殖に関わると報告されている[32]。ヒトCCL18の線維芽細胞からのコラーゲン誘導に関する報告は未だ限られており[33]、IL-4やIL-13といったTh2サイトカイン環境そのものが、ペリオスチンを介した線維芽細胞の増殖促進などにより、線維化に関与するという報告もあるが[34][35]、本研究からはCCL8がTh2サイトカインとは独立してERKを介した経路により線維芽細胞からのコラーゲン産生を誘導する可能性が示唆された。

現在、IgG4-RDにおける線維化については、病変臓器に浸潤するCD4陽性細胞傷害性T細胞がgranzyme Bやパーフォリンといった細胞傷害性タンパクや[36]、線維芽細胞およびM2マクロファージを活性させるIL-1 β 、

IFN- γ 、TGF β といったサイトカインを産生し[11]、線維化に寄与することが報告されている。また、唾液腺に浸潤するM2マクロファージの数は、IgG4-RDにおける唾液腺炎の線維化スコアと相関し、このM2マクロファージがCCL18を産生していることが報告されている[16]。これらの報告は、CCL18がprofibroticなfactorとして働いている可能性を示唆している。

また、ケモカインの機能として、リンパ球の遊走、いわゆるケモタキシス以外の機能が近年着目されている。T細胞分化におけるケモカインの果たす役割については、helper type-1細胞におけるCXCL10[37][38]、T regulatory-1細胞におけるCXCL11、CXCL12[39][40]、Foxp3陽性制御性T細胞におけるCCL1[29]など、いくつかの報告がある。今回、CCL8が線維化を誘導する可能性が示唆されたが、T細胞分化を含めた機能については未だ不明な点であり今後のさらなる研究が必要と考える。

このように本研究から、LATマウスの唾液腺炎におけるCCL8 (ヒトCCL18)-CCR8経路の発現亢進と治療標的としての可能性が示唆されたが(図13)、今後はより多数のマウスを用いたin vivoでの治療効果の再現性の確認、唾液腺以外の臓器特異性や、ステロイドとの併用による作用など、さらなる研究を進めることで、新規治療戦略の開発につながられる可能性

があると考える。

6. 結論

LATマウスはIgG4-RDと同様にCCL8 (ヒトCCL18の機能的アナログ)-CCR8経路の発現亢進を認め、CCL8はERK1/2のリン酸化を介した線維芽細胞からのコラーゲン産生を誘導することが示唆された。また、抗CCL8中和抗体投与により線維化を含む唾液腺炎の改善を認め、マウスCCL8 (ヒトCCL18)-CCR8経路はIgG4-RDの新規治療標的としての可能性を持つことが示唆された。

7. 略語

IgG4-RD; Immunoglobulin G4-related disease

Th2; Type-2 T helper

TGF- β ; Transforming growth factor- β

Tfh; Follicular helper T cell

LAT; The linker for activation of T cells

LAT Y136F knock-in mice; LAT mice

CCL18; CC chemokine ligand 18

CCR8; CC chemokine receptor 8

DMEM; Dulbecco's modified Eagle's medium

HE; Hematoxylin and eosin

MT; Masson's trichrome

DAPI; 4',6-diamidino-2-phenylindole

PBS; Phosphate buffered salts

Gapdh; Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

PMA; Phorbol myristate acetate

ERK; Extracellular signal-regulated kinase

MAPK; Mitogen-activated protein kinase

8. 謝辞

本研究の遂行および論文作成にあたり、ご指導を賜りました住田孝之先生(筑波大学医学医療系膠原病リウマチアレルギー内科学名誉教授)、松本功先生(同 准教授)、坪井洋人先生(同 講師)に心から感謝申し上げます。また、LATマウスのご提供をいただきましたMarie Malissen先生(Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy, Aix Marseille Université)およびBernard Malissen先生(同)、LATマウスの繁殖に当たってのご助言、ご指導を賜りました川野充弘先生(金沢大学附属病院リウマチ・膠原病内科教授)、山田和徳先生(同)、伊藤清亮先生(同)、抗マウスCCL8中和抗体の作成と提供を賜りました浅野謙一先生(東京薬科大学生命科学研究部免疫制御学研究室 准教授)、田中正人先生(同 教授)に深謝致します。

また、研究にあたり数々のご助言を賜りました筑波大学膠原病リウマチアレルギー内科研究室の皆様にご感謝いたします。

9. 出典

本学位論文では *Arthritis Research & Therapy*. 14;23(1):214,2021.

doi.org/10.1186/s13075-021-02597-6.に記載された論文の内容を、BioMed

Central社の規定に従って、一部改変し再利用している。

10. 参考文献

1. Umehara H, Okazaki K, Kawa S, Takahashi H, Goto H, Matsui S, et al. The 2020 revised comprehensive diagnostic (RCD) criteria for IgG4-RD. *Mod Rheumatol*. 2021;31:529–33.
2. Hamano H, Kawa S, Horiuchi A, Unno H, Furuya N, Akamatsu T, et al. High serum IgG4 concentrations in patients with sclerosing pancreatitis. *N Engl J Med*. 2001;344:732–8.
3. 厚生労働省難治性疾患克服研究事業. IgG4 関連疾患包括診断基準 2011. *日内会誌*. 2012;101:795～804.
4. Tanaka A, Moriyama M, Nakashima H, Miyake K, Hayashida JN, Maehara T, et al. Th2 and regulatory immune reactions contribute to IgG4 production and the initiation of Mikulicz disease. *Arthritis Rheum*. 2012;64:254–63.
5. Masaki Y, Dong L, Kurose N, Kitagawa K, Morikawa Y, Yamamoto M, 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.

6. Aalberse RC, Stapel SO, Schuurman J, Rispens T. Immunoglobulin G4: An odd antibody. *Clin Exp Allergy*. 2009;39:469–77.
7. Stone JH, Zen Y, Deshpande V. IgG4-Related Disease. *N Engl J Med*. 2012;366:539–51.
8. Satoguina JS, Weyand E, Larbi J, Hoerauf A. T Regulatory-1 Cells Induce IgG4 Production by B Cells: Role of IL-10. *J Immunol*. 2005;174:4718–26.
9. Tsuboi H, Iizuka M, Takahashi H, Asashima H, Hirota T, Kondo Y, et al. Pathogenesis of IgG4-related disease-Molecular biological approaches. *Clin Rheumatol Relat Res*. 2017;29:128–39.
10. Shiokawa M, Kodama Y, Kuriyama K, Yoshimura K, Tomono T, Morita T, et al. Pathogenicity of IgG in patients with IgG4-related disease. *Gut*. 2016;65:1322–32.
11. Maehara T, Mattoo H, Ohta M, Mahajan VS, Moriyama M, Yamauchi M, et al. Lesional CD4+IFN- γ + cytotoxic T lymphocytes in IgG4-related dacryoadenitis and sialoadenitis. *Ann Rheum Dis*. 2017;76:377–85.
12. Akiyama M, Yasuoka H, Yamaoka K, Suzuki K, Kaneko Y, Kondo H, et al. Enhanced IgG4 production by follicular helper 2 T cells and the

involvement of follicular helper 1 T cells in the pathogenesis of IgG4-related disease. *Arthritis Res Ther.* 2016;18:1–14.

13. Wallace ZS, Mattoo H, Carruthers M, Mahajan VS, Della Torre E, Lee H, et al. Plasmablasts as a biomarker for IgG4-related disease, independent of serum IgG4 concentrations. *Ann Rheum Dis.* 2015;74:190–5.

14. Yamamoto M, Takahashi H, Shinomura Y. Mechanisms and assessment of IgG4-related disease: Lessons for the rheumatologist. *Nat Rev Rheumatol.* 2014;10:148–59.

15. Tsuboi H, Nakai Y, Iizuka M, Asashima H, Hagiya C, Tsuzuki S, et al. DNA microarray analysis of labial salivary glands in IgG4-related disease: Comparison with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheumatol.* 2014;66:2892–9.

16. Furukawa S, Moriyama M, Tanaka A, Maehara T, Tsuboi H, Iizuka M, et al. Preferential M2 macrophages contribute to fibrosis in IgG4-related dacryoadenitis and sialoadenitis, so-called Mikulicz's disease. *Clin Immunol.* 2015;156:9–18.

17. Akiyama M, Yasuoka H, Yoshimoto K, Takeuchi T. CC-chemokine

ligand 18 is a useful biomarker associated with disease activity in IgG4-related disease. *Ann Rheum Dis.* 2018;77:1386–7.

18. Tsuboi H, Iizuka-Koga M, Asashima H, Takahashi H, Kudo H, Ono Y, et al. Upregulation and pathogenic roles of CCL18-CCR8 axis in IgG4-related disease. *Mod Rheumatol.* 2020;30:729–37.

19. Aguado E, Richelme S, Nuñez-Cruz S, Miazek A, Mura AM, Richelme M, et al. Induction of T helper type 2 immunity by a point mutation in the LAT adaptor. *Science (80-)*. 2002;296:2036–40.

20. Yamada K, Zuka M, Ito K, Mizuguchi K, Kakuchi Y, Onoe T, et al. LatY136F knock-in mouse model for human IgG4-related disease. *PLoS One.* 2018;13:1–14.

21. Cui Y, Masaki K, Zhang X, Yamasaki R, Fujii T, Ogata H, et al. A novel model for treatment of hypertrophic pachymeningitis. *Ann Clin Transl Neurol.* 2019;6:431–44.

22. Qu WM, Miyazaki T, Terada M, Okada K, Mori S, Kanno H, et al. A novel autoimmune pancreatitis model in MRL mice treated with polyinosinic:polycytidylic acid. *Clin Exp Immunol.* 2002;129:27–34.

23. Ishiguro N, Moriyama M, Furusho K, Furukawa S, Shibata T, Murakami

Y, et al. Activated M2 Macrophages Contribute to the Pathogenesis of IgG4-Related Disease via Toll-like Receptor 7/Interleukin-33 Signaling. *Arthritis Rheumatol.* 2020;72:166–78.

24. Panina-Bordignon P, Papi A, Mariani M, Di Lucia P, Casoni G, Bellettato C, et al. The C-C chemokine receptors CCR4 and CCR8 identify airway T cells of allergen-challenged atopic asthmatics. *J Clin Invest.* 2001;107:1357–64.

25. Islam SA, Ling MF, Leung J, Shreffler WG, Luster AD. Identification of human CCR8 as a CCL18 receptor. *J Exp Med.* 2013;210:1889–98.

26. Greenspan JS, Daniels TE, Talal N, Sylvester RA. The histopathology of Sjögren's syndrome in labial salivary gland biopsies. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol.* 1974;37:217–29.

27. Asano K, Takahashi N, Ushiki M, Monya M, Aihara F, Kuboki E, et al. Intestinal CD169 + macrophages initiate mucosal inflammation by secreting CCL8 that recruits inflammatory monocytes. *Nat Commun.* Nature Publishing Group; 2015;6:1–14.

28. Islam SA, Chang DS, Colvin RA, Byrne MH, McCully ML, Moser B, et al. Mouse CCL8, a CCR8 agonist, promotes atopic dermatitis by recruiting

IL-5+TH2 cells. *Nat Immunol.* 2011;12:167–77.

29. Barsheshet Y, Wildbaum G, Levy E, Vitenshtein A, Akinseye C, Griggs J, et al. CCR8+FOXP3+ Treg cells as master drivers of immune regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114:6086–91.

30. Spinetti G. The chemokine receptor CCR8 mediates rescue from dexamethasone-induced apoptosis via an ERK-dependent pathway. *J Leukoc Biol.* 2003;73:201–7.

31. Segar, R., Krebs EG. The MAPK signaling cascade. *FASEB J.* 1995;9:726–35.

32. Ihn H, Tamaki K. Oncostatin M Stimulates the Growth of Dermal Fibroblasts Via a Mitogen-Activated Protein Kinase-Dependent Pathway. *J Immunol.* 2000;165:2149–55.

33. Atamas SP, Luzina IG, Choi J, Tsybalyuk N, Carbonetti NH, Singh IS, et al. Pulmonary and Activation-Regulated Chemokine Stimulates Collagen Production in Lung Fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003;29:743–9.

34. Masuoka M, Shiraishi H, Ohta S. Periostin promotes chronic allergic inflammation in response to Th2 cytokines. *J Clin Invest.* 2012;122:2590–

600.

35. Jinnin M, Ihn H, Yamane K, Tamaki K. Interleukin-13 stimulates the transcription of the human $\alpha 2(I)$ collagen gene in human dermal fibroblasts. *J Biol Chem.* 2004;279:41783–91.

36. Mattoo H, Mahajan VS, Maehara T, Deshpande V. Clonal expansion of CD4+cytotoxic T lymphocytes in patients with IgG 4 -related disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2016;138:825–38.

37. Salomon I, Netzer N, Wildbaum G, Schif-Zuck S, Maor G, Karin N. Targeting the Function of IFN- γ -Inducible Protein 10 Suppresses Ongoing Adjuvant Arthritis. *J Immunol.* 2002;169:2685–93.

38. Wildbaum G, Netzer N, Karin N. Plasmid DNA Encoding IFN- γ -Inducible Protein 10 Redirects Antigen-Specific T Cell Polarization and Suppresses Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Immunol.* 2002;168:5885–92.

39. Zohar Y, Wildbaum G, Novak R, Salzman AL, Thelen M, Alon R, et al. CXCL11-dependent induction of FOXP3-negative regulatory T cells suppresses autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest.* 2017;127:3913.

40. Meiron M, Zohar Y, Anunu R, Wildbaum G, Karin N. CXCL12 (SDF-1 α)

suppresses ongoing experimental autoimmune encephalomyelitis by
selecting antigen-specific regulatory T cells. *J Exp Med.* 2008;205:2643–
55.

11. 図表

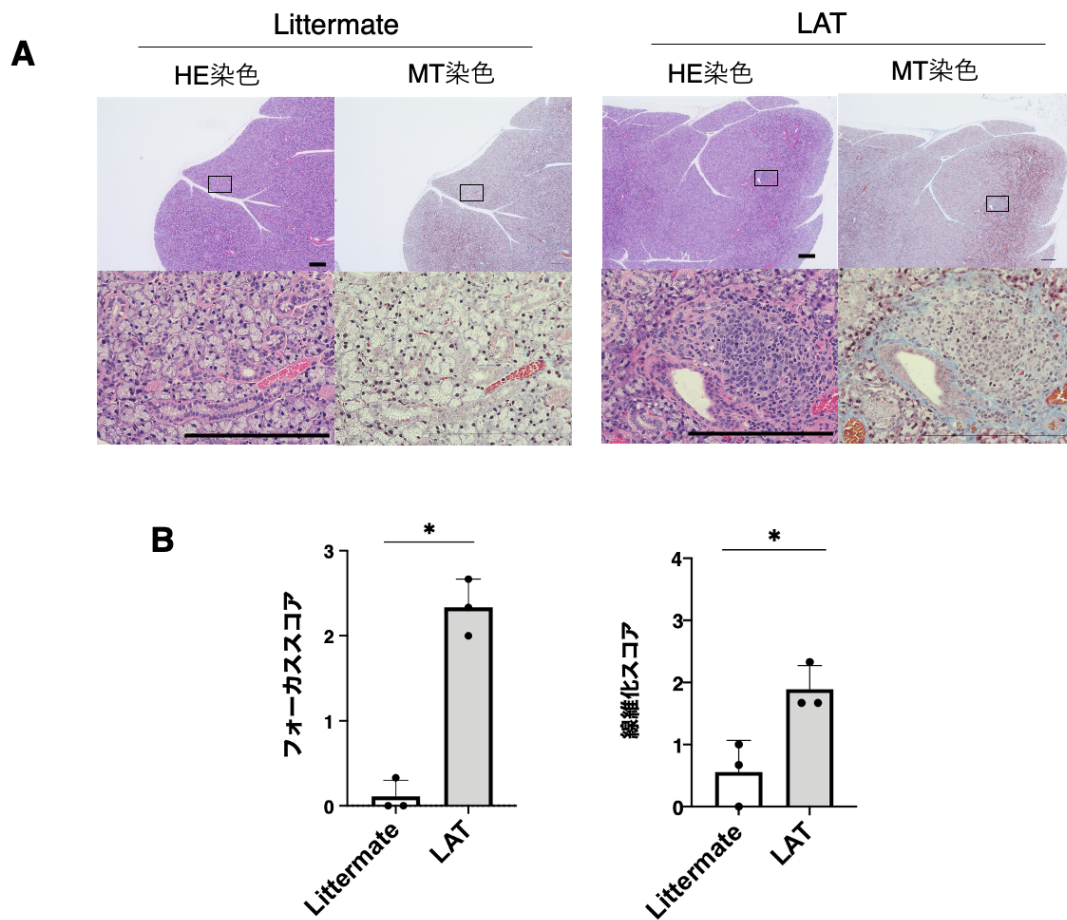


図1. 6週齢のLATマウスとLittermateの唾液腺の組織学的評価

A. ヘマトキシリン・エオジン (HE)染色、およびマッソントリクローム (MT)染色の代表的な光学顕微鏡写真。上段の四角で囲った部分の拡大を、下段に示した。(Scale bar; 200 μ m)

B. フォーカススコアと、線維化スコアを盲検下に測定した。

(Littermate N=3; LATマウス N=3)

*p<0.05 (Unpaired t-testによる)

Experiment=1

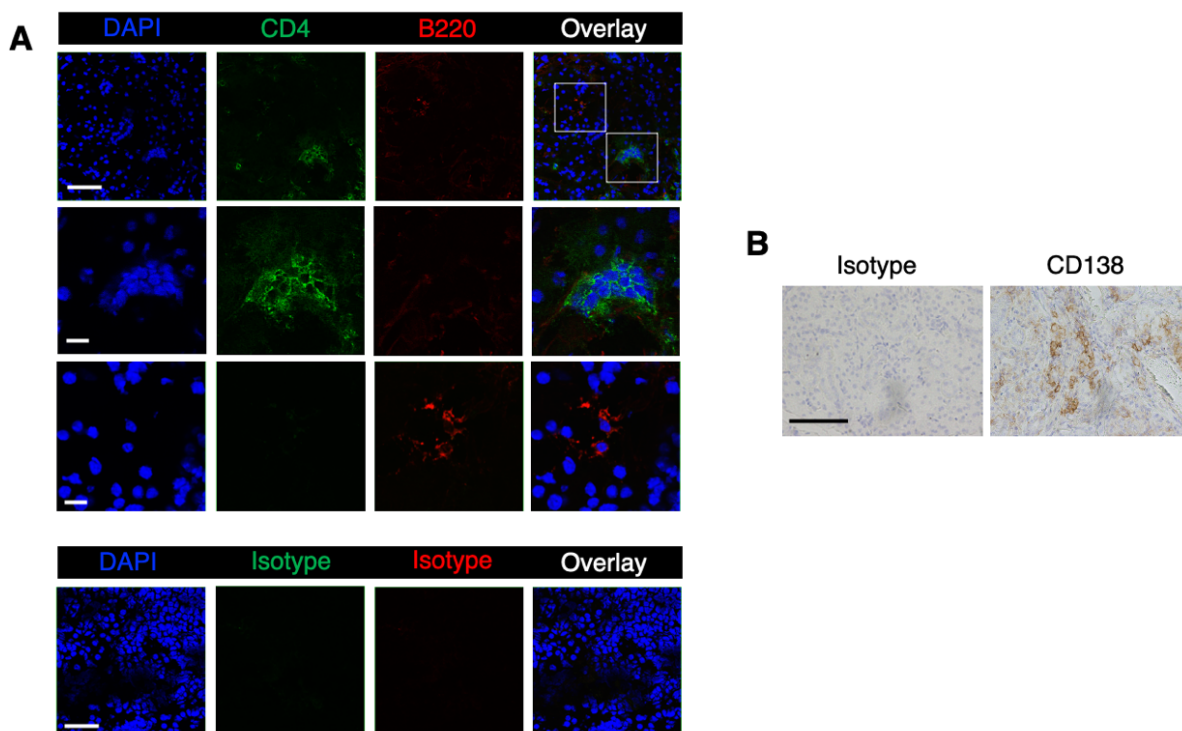


図2. 6週齢のLATマウス唾液腺の免疫染色

A. CD4 (緑)、B220 (赤)の蛍光免疫染色。核染色はDAPI (青)で行なった。

最上段 (Scale bar; 50µm)、2段目・3段目(Scale bar; 10µm)は最上段の四角で囲った部分の拡大像を示した。

最下段は、CD4、B220に対する抗体のIsotypeを一致させたコントロール抗体による染色像を示した。(Scale bar; 50µm)

B. CD138の免疫組織化学染色。(Scale bar; 100µm)

N=3の代表的な図。

DAPI; 4'6-diamino-2-phenylindole

Experiment=1

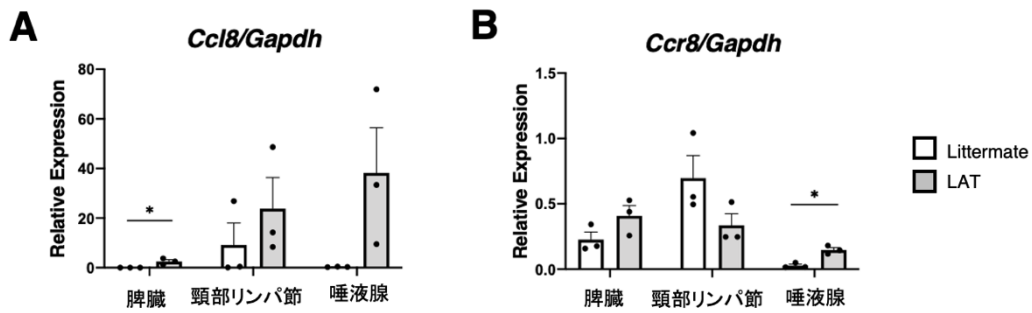


図3. LATマウスにおける *Ccl8*、*Ccr8*のmRNA発現レベル

6週齢におけるLittermate (N=3)とLATマウス (N=3)の脾臓、頸部リンパ節、唾液腺における、mRNAレベルでの遺伝子発現レベルを定量PCRで比較した。*Gapdh*を内因性コントロールとした。

A. *Ccl8*の発現レベルの比較

B. *Ccr8*の発現レベルの比較

Gapdh; Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

* $p < 0.05$ (Unpaired t-testによる)

Experiment=1

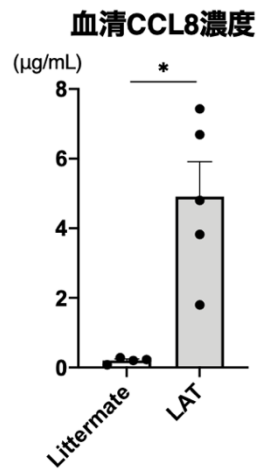


図4 6週齢における血清CCL8濃度の比較

6週齢のLittermate (N=4)、LATマウス(N=5)の血清CCL8濃度をELISAで測定した。

ELISA; Enzyme-linked immunosorbent assay

* $p < 0.05$ (Unpaired t-testによる)

Experiment=1

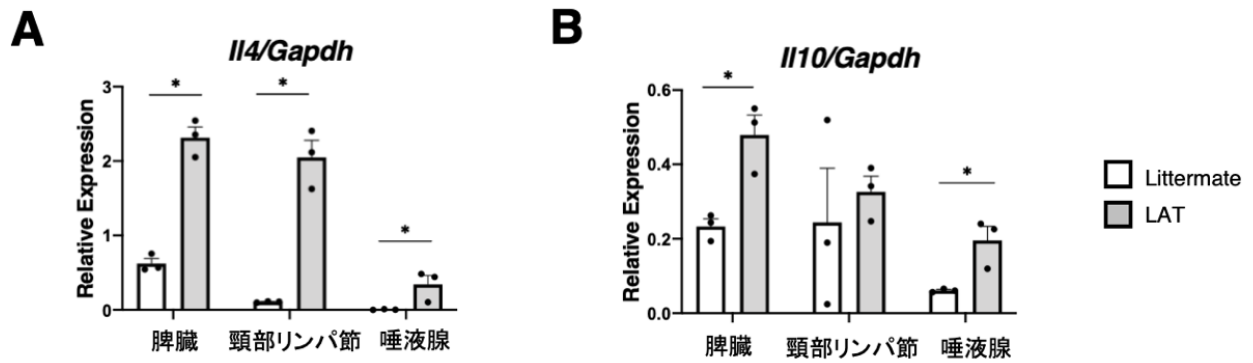


図5 LATマウスにおける *I14*、*I110* の mRNA 発現レベル

6週齢における Littermate (N=3) と LAT マウス (N=3) の脾臓、頸部リンパ節、唾液腺における、mRNA レベルでの遺伝子発現レベルを定量PCRで比較した。*Gapdh* を内因性コントロールとした。

A. *I14* の発現レベルの比較

B. *I110* の発現レベルの比較

Gapdh; Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

* $p < 0.05$ (Unpaired t-testによる)

Experiment=1

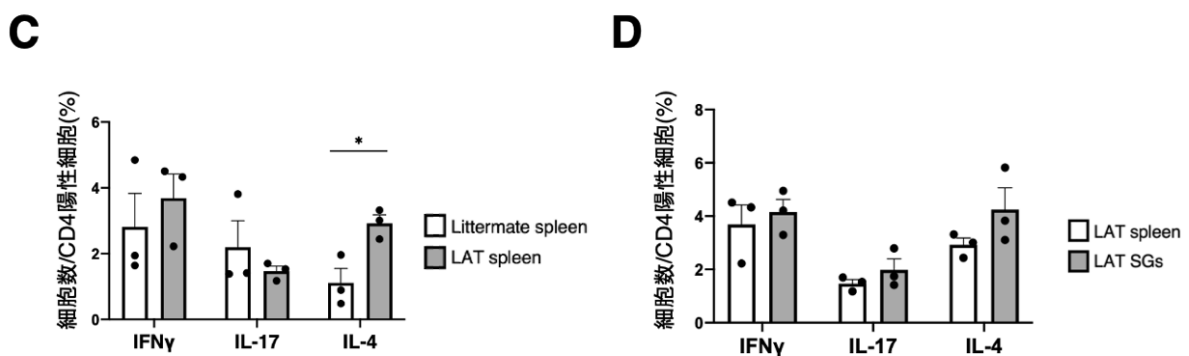
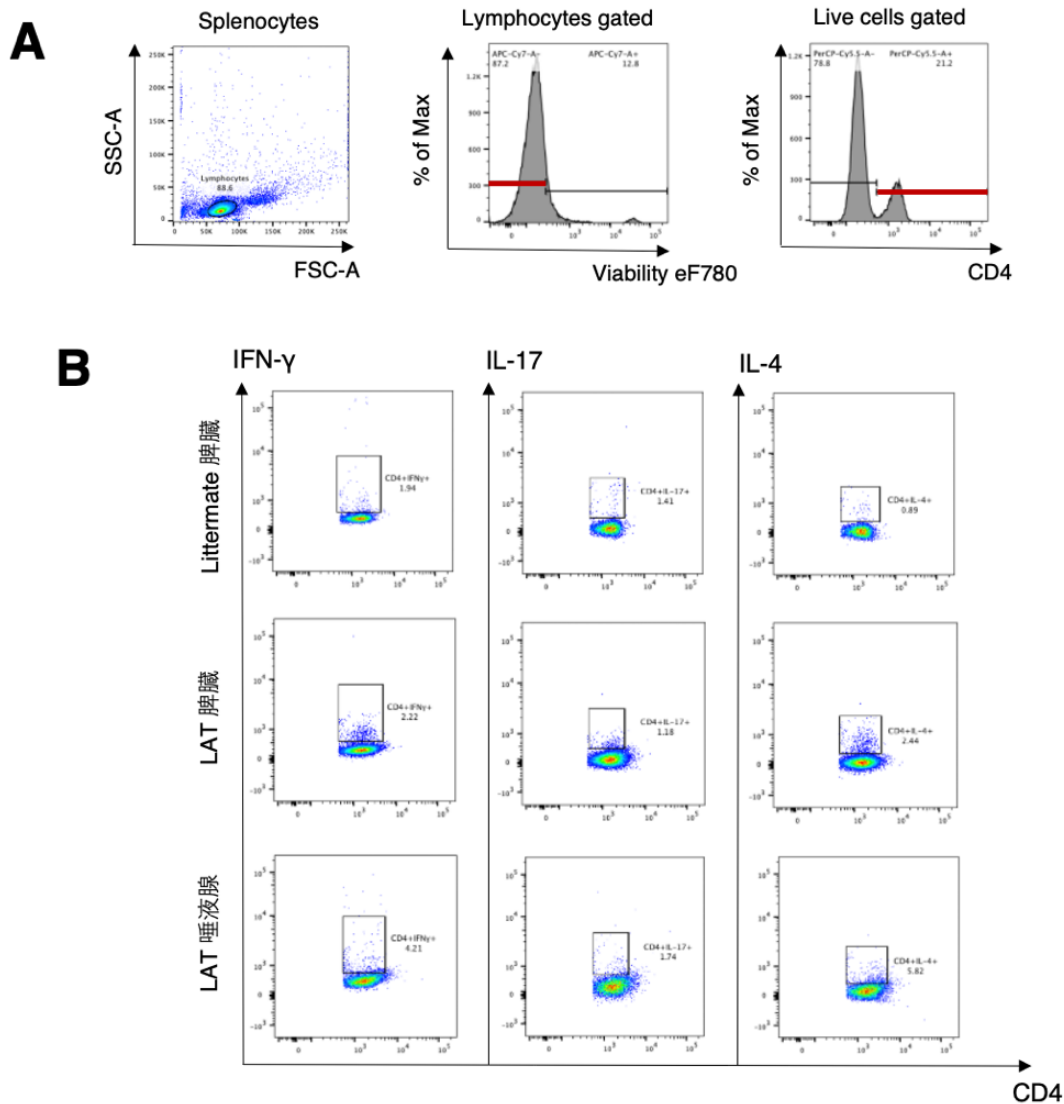


図6 LATマウスにおけるサイトカイン産生

6週齢でフローサイトメトリーによってCD4陽性細胞に占めるIFN- γ 、IL-

17、IL-4の陽性細胞の割合を比較した。

A. Littermate脾臓における、gating strategyを示す。Viability eF780を用いて死細胞をgate outした後、CD4陽性細胞にgatingした。

B. Littermateの脾臓、LATマウスの脾臓、唾液腺における代表的なFACS plotsを示す。

C. Littermate (N=3) とLATマウス (N=3) の脾臓における、CD4陽性細胞に占める各サイトカイン陽性細胞の割合の比較。

D. LATマウス (N=3) の脾臓と唾液腺における、CD4陽性細胞に占める各サイトカイン陽性細胞の割合の比較。

* $p < 0.05$ (Unpaired t-testによる)

Experiment=1

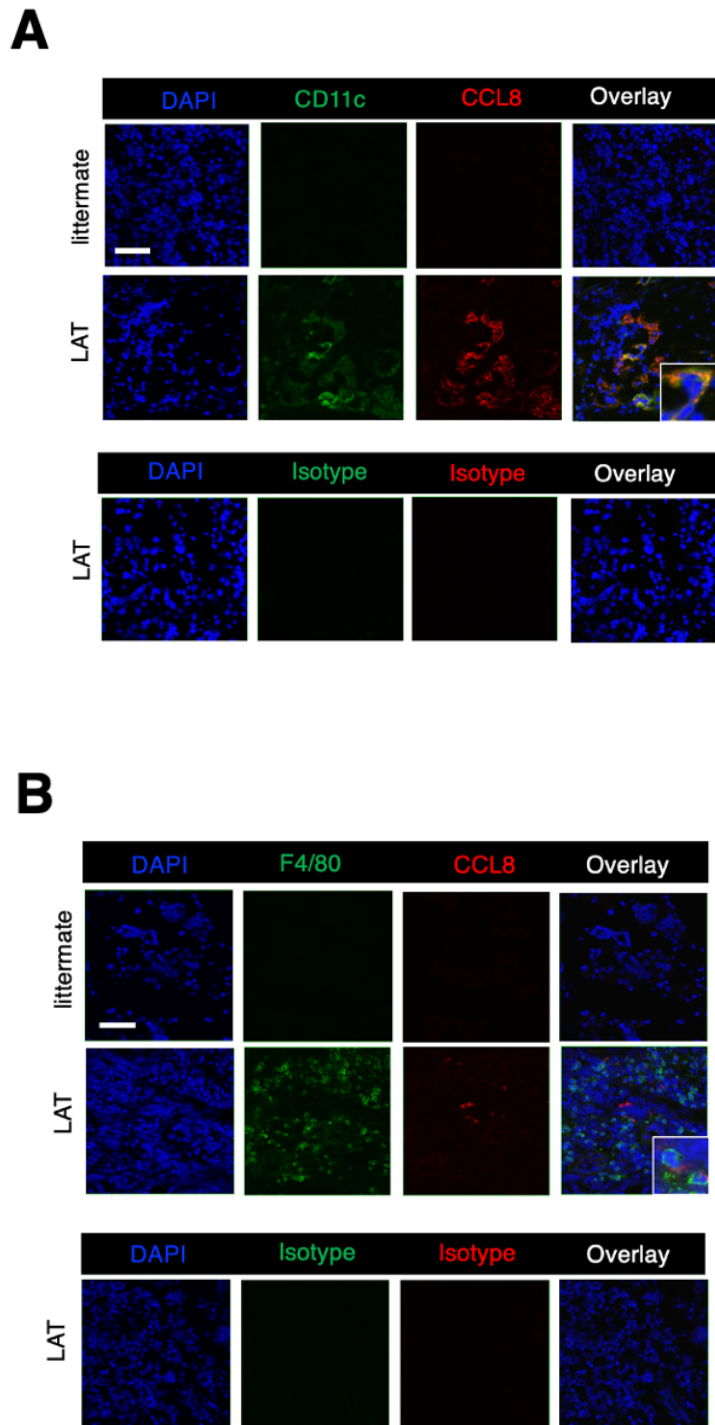


図7 LATマウス唾液腺におけるCCL8発現細胞

6週齢のLATマウス、littermateの唾液腺の蛍光免疫染色を示した（各N=3のうちの代表的な図）。

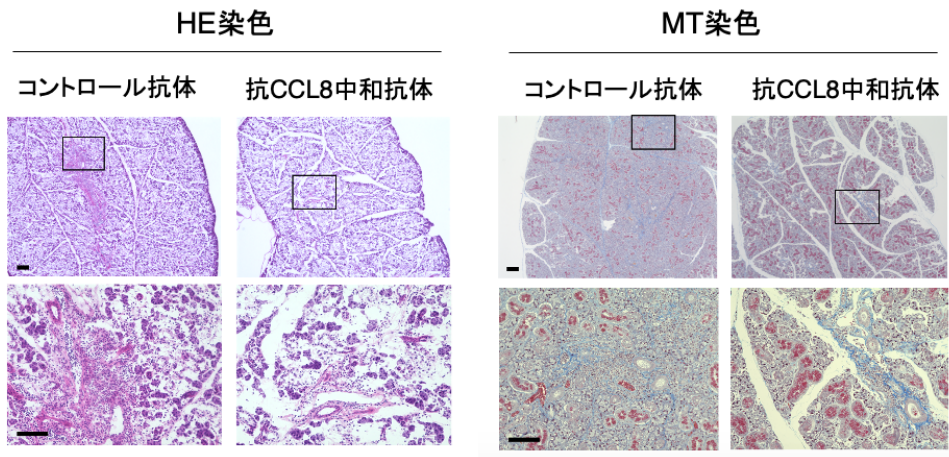
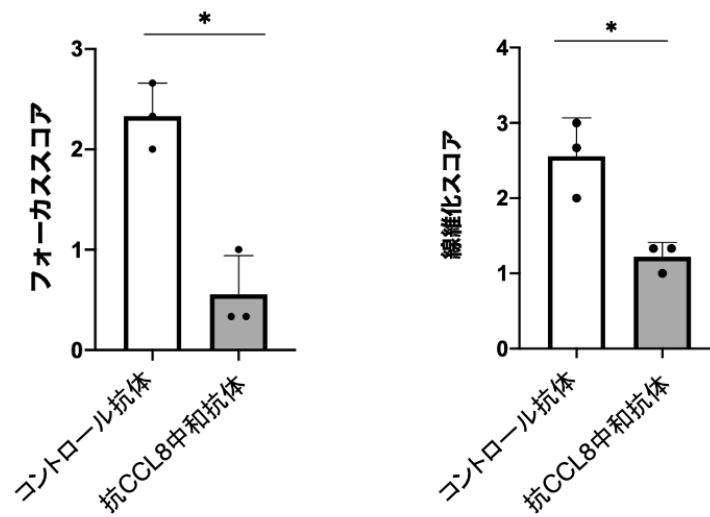
A. CD11c (緑)、CCL8 (赤)の二重蛍光免疫染色。

B. F4/80 (緑)、CCL8 (赤)の二重免疫染色。

Scale bar; 50 μ m

DAPI; 4'6-diamino-2-phenylindole

Experiment=1

A**B****C**

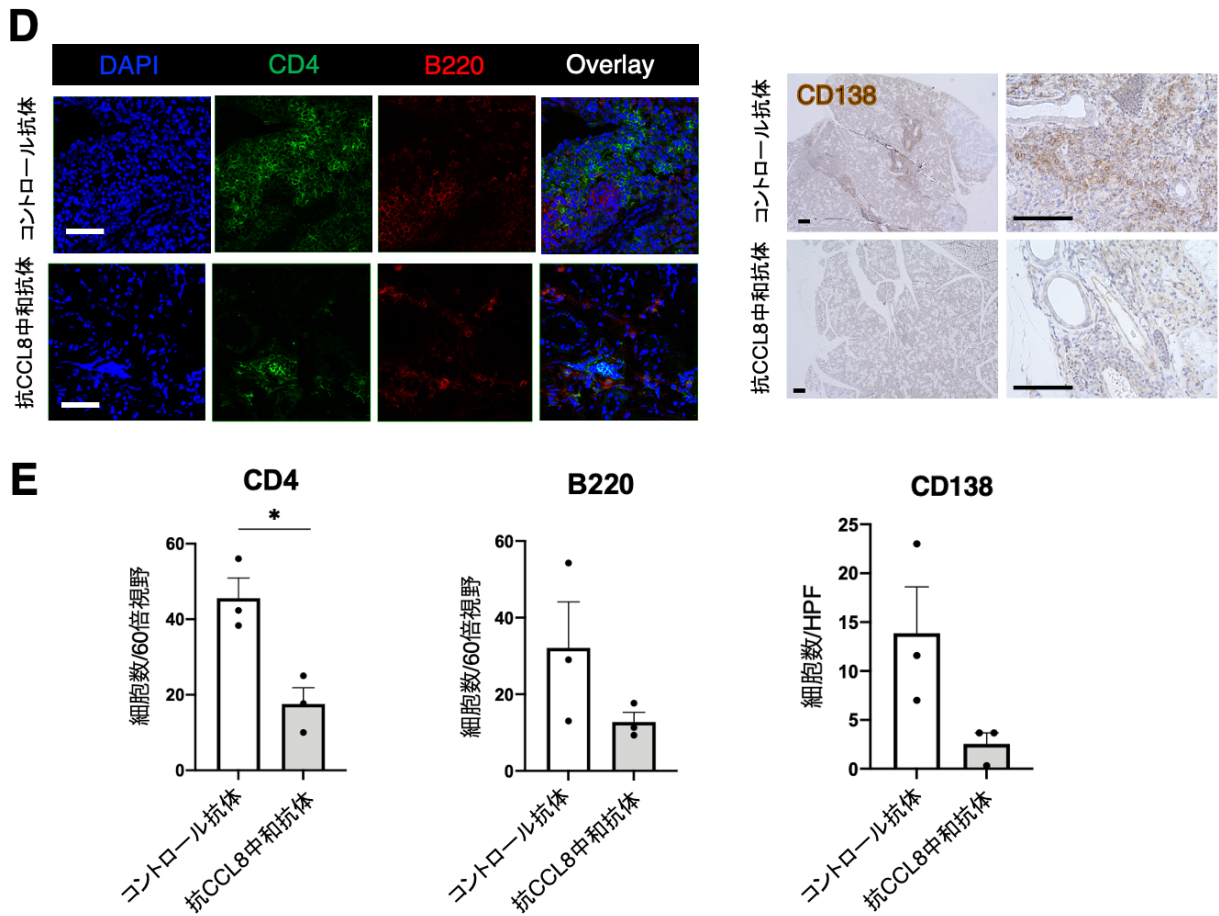


図8 抗CCL8中和抗体による唾液腺炎の改善

抗CCL8中和抗体 (N=3)およびコントロール抗体 (N=3)投与後のLATマウスの唾液腺の組織学的評価を行なった。

A. 抗CCL8中和抗体投与のプロトコールを図示した。5週齢のLATマウスに、抗CCL8中和抗体あるいはコントロール抗体 (100 μ g/mouse/day)を、経静脈投与し、8日目(6週齢)に組織を採取した。

B. ヘマトキシリン・エオジン (HE)染色とマッソントリクローム (MT)染色の代表的な光学顕微鏡像を示す。上段 (Scale bar; 200 μ m)、下段；上段の四角で囲った部分の拡大像 (Scale bar; 100 μ m)。

C. 盲検下でフォーカススコアおよび線維化スコアを測定した。

D. CD4 (緑)、B220 (赤)の蛍光免疫染色 (Scale bar; 50 μ m)、CD138の免疫

化学染色 (Scale bar; 上段200 μ m、下段100 μ m)の代表的像。DAPI;
4'6-diamino-2-phenylindole

E. 60倍視野あたりのCD4陽性細胞、B220陽性細胞の数、およびhigh
power field (HPF)あたりのCD138陽性細胞数を抗CCL8中和抗体投与群
とコントロール抗体投与群で比較した。

* $p < 0.05$ (Unpaired t-testによる)

Experiment=1

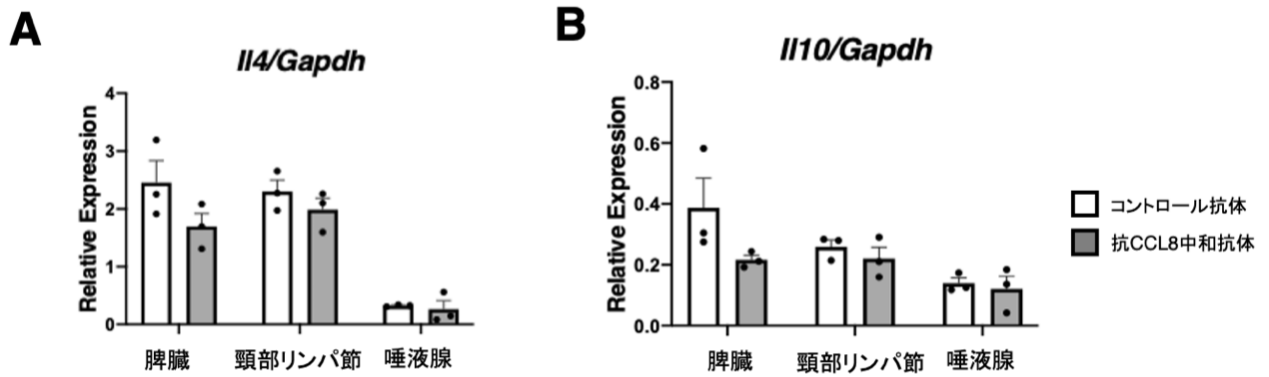


図9 抗CCL8中和抗体投与による *I14*, *I110* の mRNA 発現

コントロール抗体 (N=3) および抗CCL8中和抗体 (N=3) を投与後のLATマウスの脾臓、頸部リンパ節、唾液腺における、mRNAレベルでの遺伝子発現レベルを定量PCRで比較した。*Gapdh* を内因性コントロールとした。

A. *I14* の発現レベルの比較

B. *I110* の発現レベルの比較

Gapdh; Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

* $p < 0.05$ (Unpaired t-testによる)

Experiment=1

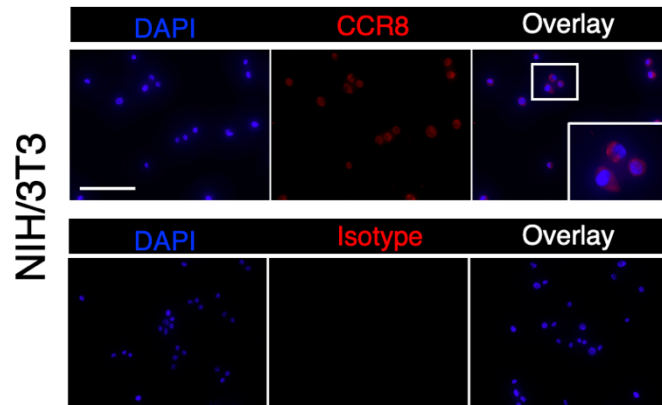


図10 NIH/3T3におけるCCR8発現

NIH/3T3の蛍光免疫染色によるCCR8 (赤)のタンパク発現を確認した。

Scale bar; 50 μ m

Experiment=2

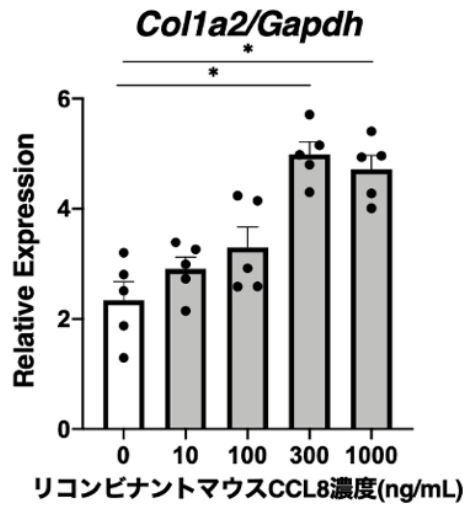
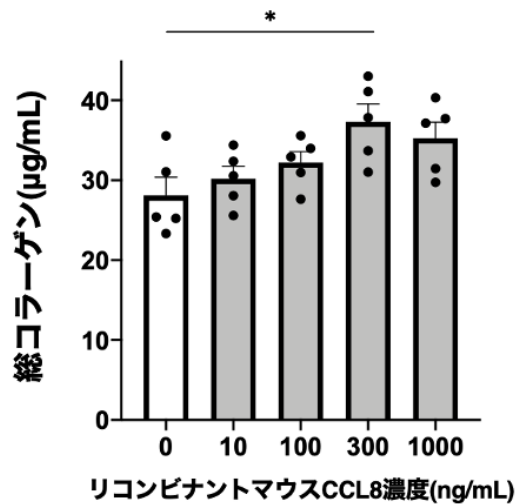
A**B**

図11 CCL8による線維芽細胞からのコラーゲン産生誘導

NIH/3T3を各濃度 (0, 10, 100, 300, 1000ng/mL) (各濃度5wells)のリコンビナントマウスCCL8で24時間刺激した。

A. 定量PCRで*Col1a2*のmRNA発現レベルを解析した。*Gapdh*を内因性コントロールとした。

B. 培養上清中の総コラーゲン濃度を測定した。

Gapdh; Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

* $p < 0.05$ (Kruskal-Wallis testによる)

2回の実験の代表的な図。

Experiment=2

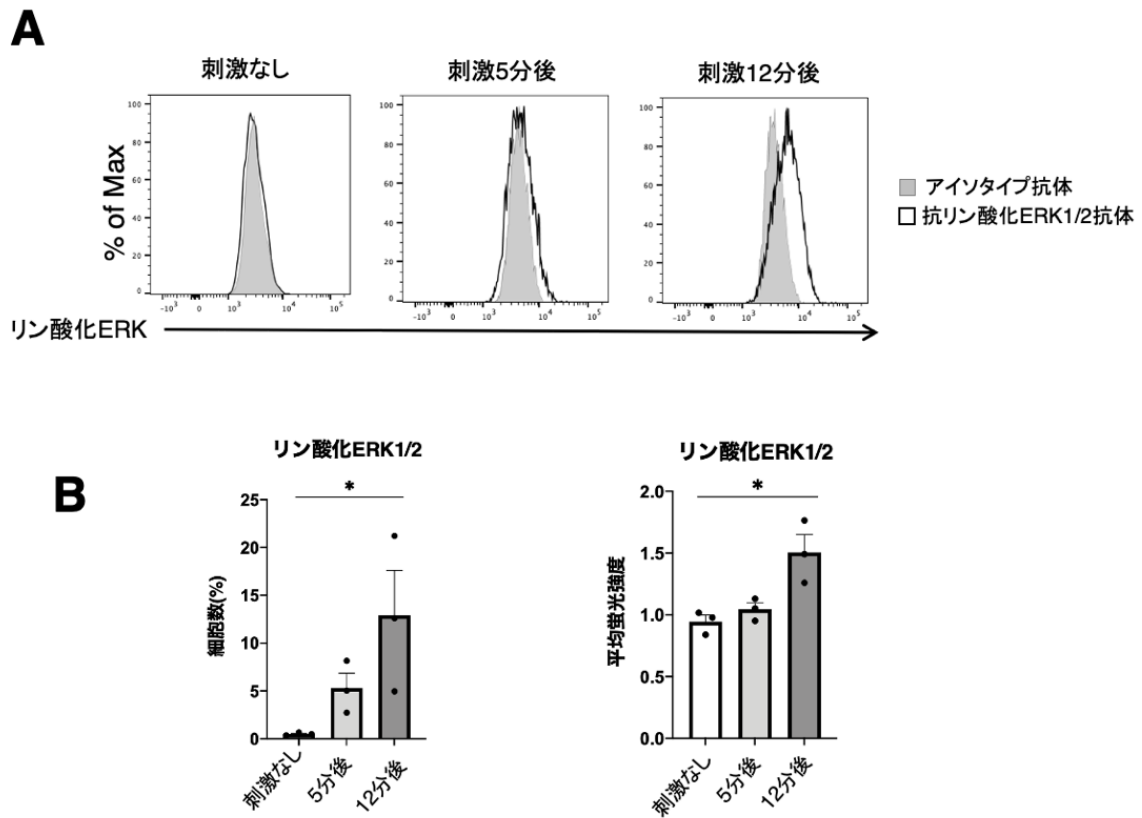


図12 CCL8刺激によるリン酸化ERK1/2発現の上昇

NIH/3T3をリコンビナントマウスCCL8 (300ng/mL)で刺激し、フローサイトメトリーを用いてリン酸化ERKの発現を解析した。

A. 刺激なし、刺激5分、刺激12分 (各3wells) におけるリン酸化ERK1/2の発現をアイソタイプ抗体と比較した。各時間における代表的なヒストグラムを示した。

B. リン酸化ERK1/2の発現細胞の割合、平均蛍光強度を示した。

ERK; Extracellular signal-regulated kinase

* $p < 0.05$ (Kruskal-Wallis testによる)

2回の実験の代表的な図。

Experiment=2

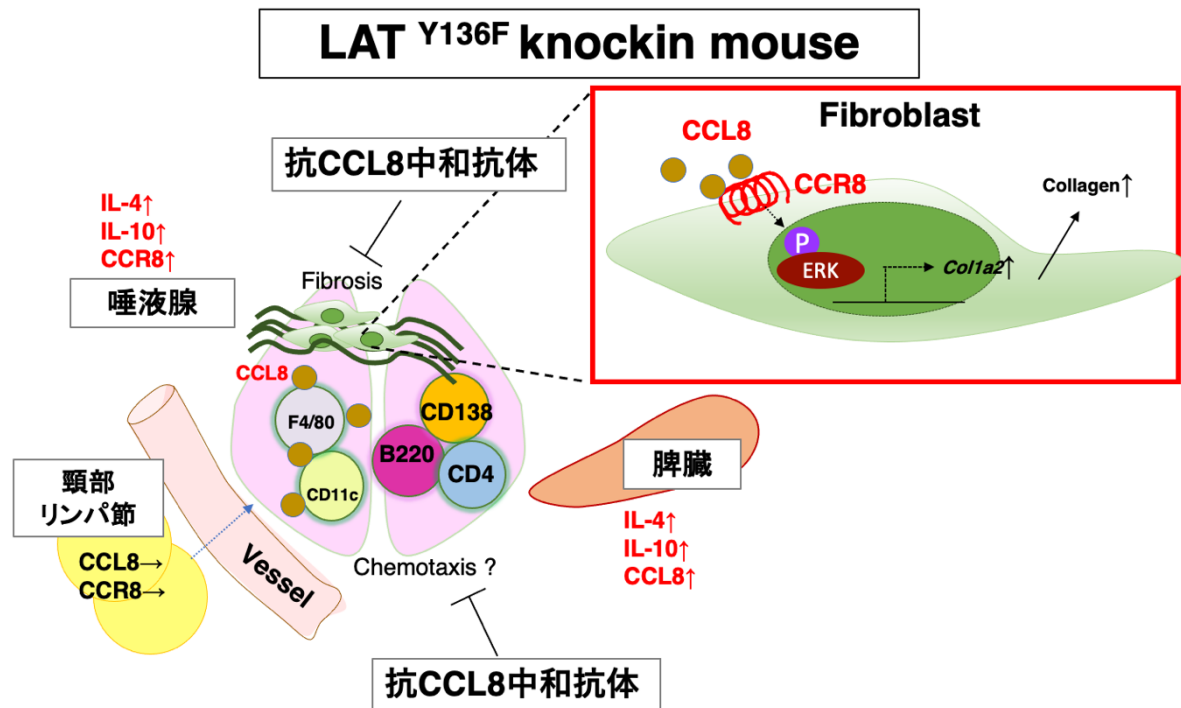


図13 LATマウス唾液腺炎におけるCCL8-CCR8経路 (模式図)

LAT^{Y136F} knockin mouse (LATマウス)の唾液腺では線維化を伴うリンパ球浸潤を認め、脾臓でCCL8、唾液腺でCCR8の発現が亢進していることが示唆された。また、脾臓、唾液腺でIL-4、IL-10の発現が亢進しており、CCL8-CCR8発現亢進と合わせて、IgG4-RDの唾液腺と類似する特徴を呈していた。また、唾液腺のF4/80陽性マクロファージ、CD11c陽性樹状細胞でCCL8の発現を確認した。抗CCL8中和抗体の投与により、線維化を含む唾液腺炎の改善が示唆され、さらに、*in vitro*の実験により、CCL8はERKリン酸化を介した線維芽細胞からのコラーゲン産生誘導に関わる可能性が考えられた。これらのことから、CCL8-CCR8経路は治療標的となる可能性が示唆された。