

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08381

研究課題名(和文) IgG4関連疾患の新規治療戦略構築に向けたCCL18-CCR8シグナルの解析

研究課題名(英文) Analysis of CCL18-CCR8 signal for developing new therapeutic strategy in IgG4-related disease

研究代表者

坪井 洋人 (Tsuboi, Hiroto)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：80580505

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：IgG4関連疾患におけるケモカインCCL18とその受容体であるCCR8シグナルの病態形成における役割と治療標的の可能性を解析した。IgG4関連疾患の病変局所では、CCL18陽性マクロファージ、樹状細胞、形質細胞、B細胞が増加し、*in vitro*ではCCL18は末梢血単核球からのIgG4産生を誘導することを明らかにした。さらに、IgG4関連疾患類似モデルマウス(LATY136F knock in mouse; LATマウス)では、CCL8(CCL18のマウスにおける機能的アナログ)-CCR8経路の発現が増加し、抗CCL8中和抗体の投与はLATマウスの唾液腺における炎症細胞浸潤と線維化を改善した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

IgG4関連疾患におけるCCL18-CCR8シグナルの病態形成における役割と治療標的の可能性をはじめて明らかにした。今後CCL18-CCR8経路を標的とした新規治療戦略の有効性を、疾患モデルマウスを用いて*in vivo*、ヒト細胞を用いて*in vitro*で検証する予定である。本研究成果は、IgG4関連疾患の病態に基づく疾患特異的新規治療戦略の構築に繋がる有意義なものと考えられる。本経路を標的とした治療戦略の実用化は、ステロイド減量後の再燃が多いIgG4関連疾患の再燃予防やステロイドの更なる減量に寄与できる可能性が期待される。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the pathogenic roles and therapeutic potential of chemokine CCL18-CCR8, which is the receptor for CCL18, signal in IgG4-related disease. CCL18 producing macrophages, dendritic cells, plasmacytes, and B cells were increased in affected organs of IgG4-related disease. Interestingly, CCL18 specifically enhanced IgG4 production by peripheral blood mononuclear cells stimulated with CD40L, IL-4, IL-10, and IL-21 *in vitro* assays. Moreover, we showed that LATY136F knock in mouse (LAT mice), which is one of the model mice for IgG4-related disease, had enhanced CCL8 (functional analogue of human CCL18)-CCR8 axis. Importantly, anti-CCL8 neutralizing antibody could improve the inflammatory cells infiltration and fibrosis in the salivary glands of the LAT mice.

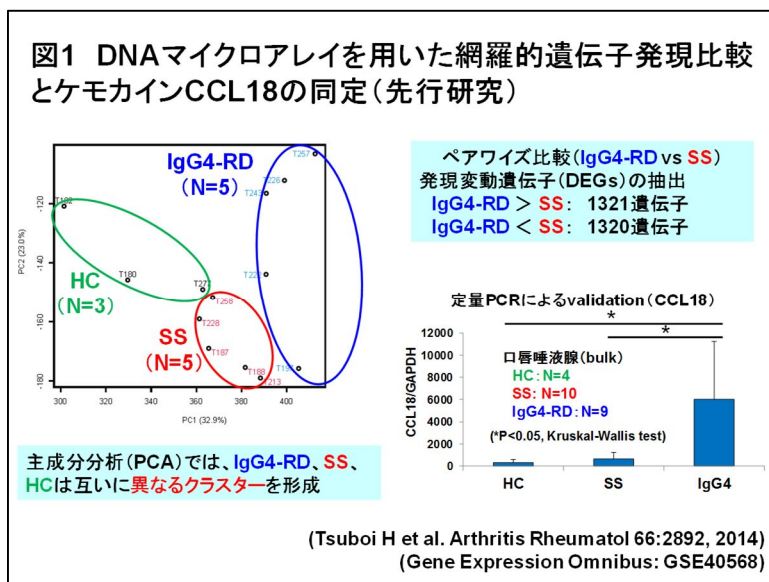
研究分野：膠原病内科学

キーワード：IgG4関連疾患 ケモカイン CCL18 CCL8 CCR8

1. 研究開始当初の背景

IgG4 関連疾患 (IgG4-RD) は、血清 IgG4 の上昇、全身諸臓器への IgG4 陽性形質細胞の浸潤および線維化を特徴とする新規疾患であり、ステロイドが有効だが、減量後の再燃が臨床的課題となっている。IgG4-RD の病態には獲得免疫と自然免疫の両方が関与する知見が蓄積されてきたが、疾患特異的かつ根治的な治療標的細胞、治療標的分子はいまだ同定されていない。

我々は先行研究において、IgG4-RD、シェーグレン症候群 (SS)、健康人 (HC) の口唇唾液腺 (LSG) における遺伝子発現を、DNA マイクロアレイを用いて網羅的に解析した。主成分分析 (PCA) では、3 群間で遺伝子発現のパターンは異なっていた。SS と比較して IgG4-RD で発現増加した発現変動遺伝子の中から、リンパ球の遊走と線維化に関するケモカイン CCL18 を見出し、定量 PCR による validation で、HC および SS と比較して、IgG4-RD の口唇唾液腺における有意な発現増加を確認した (図 1)。



2. 研究の目的

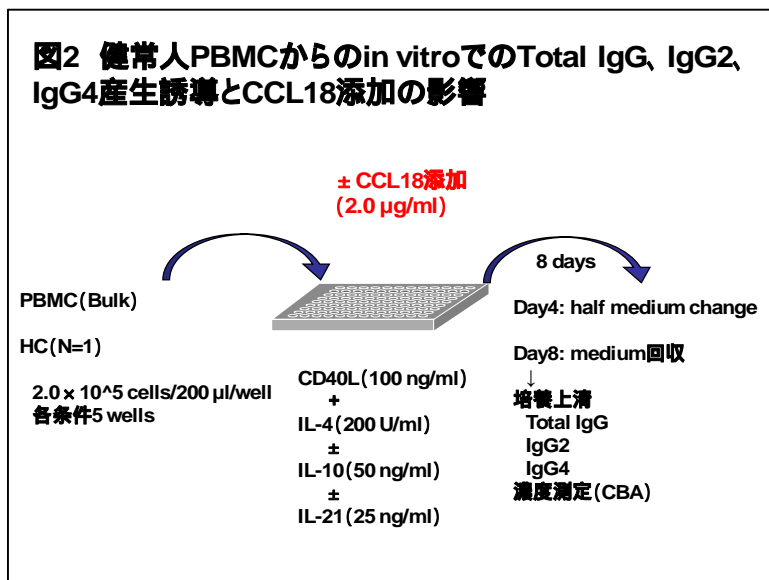
IgG4-RD の病態形成における CCL18-CCR8 (CCL18 の受容体) シグナルの役割を解明し、同経路を標的とした治療戦略の有効性を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) IgG4-RD の病変局所における CCL18-CCR8 経路のタンパクレベルでの発現と発現細胞の同定、および in vitro での機能解析

IgG4-RD (N=3)、SS (N=4)、HC (N=5) の間で、LSG における CCL18、CCR8 のタンパクレベルでの発現および発現細胞 (CD68 陽性マクロファージ、CD11c 陽性樹状細胞、CD20 陽性 B 細胞、CD138 陽性形質細胞、CD3 陽性 T 細胞) を免疫蛍光染色 (IF) で比較した。

HC の末梢血単核球 (PBMC) を CD40L + IL-4 ± IL-10 ± IL-21 刺激下で 8 日間 in vitro で培養し、上清中の total IgG、IgG2、IgG4 濃度を CBA (Cytometric Bead Array) で測定した。さらに CCL18 を添加し、total IgG、IgG2、IgG4 産生に対する影響を解析した (図 2)。

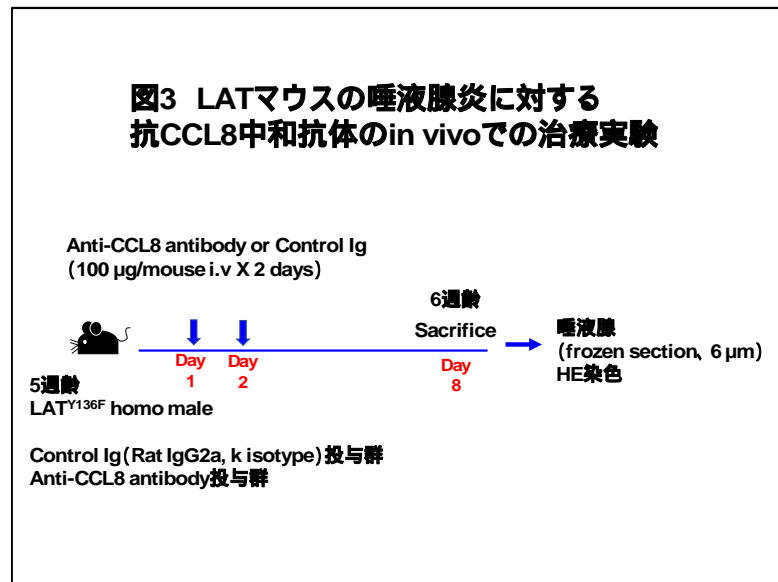


(2) IgG4-RD の疾患類似モデルマウスにおける CCL8(CCL18 のマウスにおける機能的アナログ) -CCR8 経路の発現と同経路を標的とした in vivo での治療実験

IgG4-RD の疾患類似モデルマウスとして報告されている LATY136F knock-in mouse(LAT マウス)(6 週齢) の唾液腺(SG) のヘマトキシリンエオジン(HE) 染色、マツソントリクローム(MT) 染色、免疫染色を行い littermate と比較した。

②LAT マウスの脾臓、頸部リンパ節、SG における Ccl8、Ccr8 の mRNA 発現を、littermate と比較した。

5 週齢の LAT マウスに抗 CCL8 中和抗体、コントロール抗体を経静脈投与し、6 週齢で SG の HE 染色を行った(図 3)。



4 . 研究成果

(1) IgG4-RD の病変局所における CCL18-CCR8 経路のタンパクレベルでの発現と発現細胞の同定、および in vitro での機能解析

①IgG4-RD の LSG では、SS、HC と比較して CCL18 陽性マクロファージ(CD68 陽性) 樹状細胞(CD11c 陽性) 形質細胞(CD138 陽性) HC と比較して CCL18 陽性 B 細胞(CD20 陽性) は有意に増加していた(図 4) 。 IgG4-RD の LSG における CCR8 陽性 T 細胞(CD3 陽性) B 細胞(CD20 陽性) 形質細胞(CD138 陽性) は、HC と比較して有意に増加していたが、SS と同等だった(図 5) 。

②CD40L + IL-4 刺激と比較して、CD40L + IL-4 + IL-10 + IL-21 刺激では、健常人 PBMC からの total IgG、IgG2、IgG4 産生が有意に増加した。さらに CCL18 を添加すると、IgG4 産生は有意に増加したが、total IgG、IgG2 産生は変化がなかった(図 6) 。

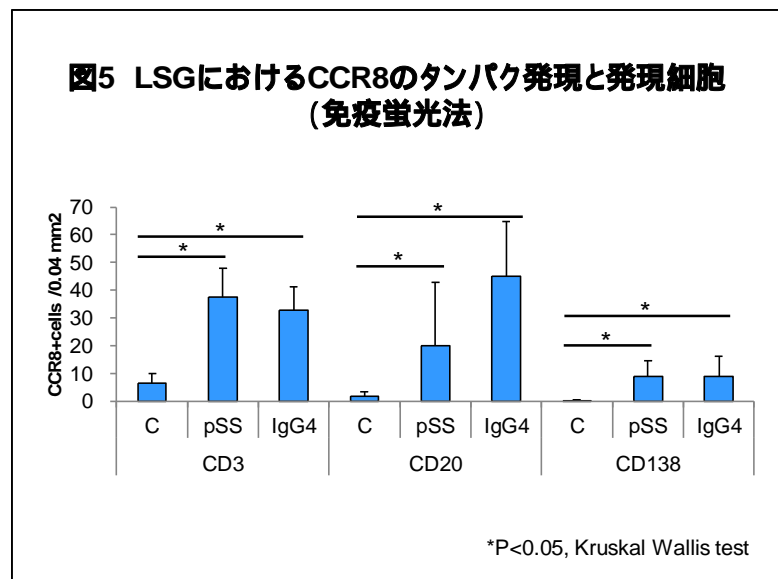
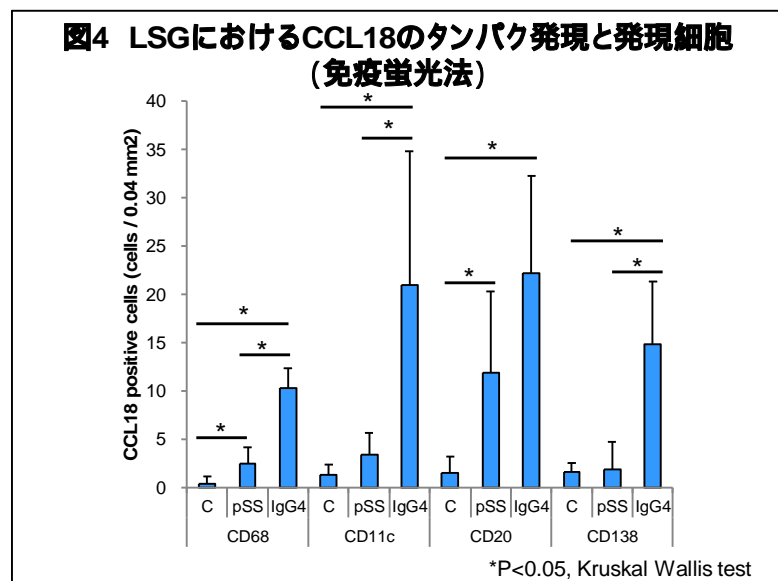
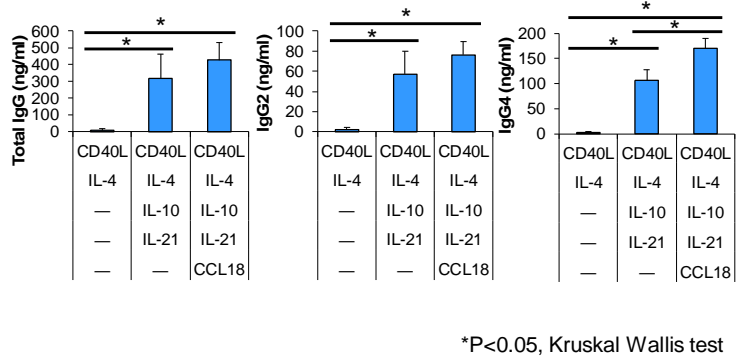


図6 健康人PBMCからのin vitroでのIgG4産生誘導に対するCCL18添加の影響



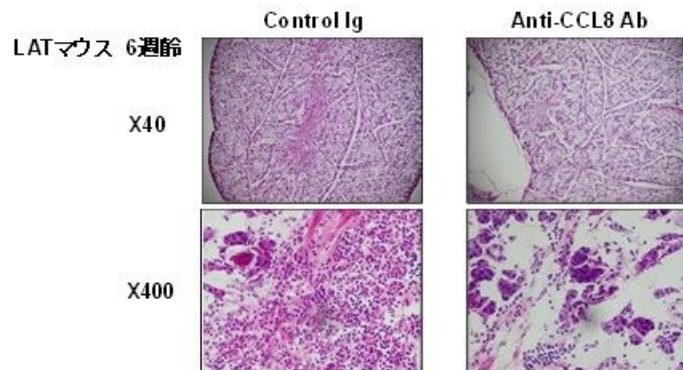
(2) IgG4-RDの疾患類似モデルマウスにおけるCCL8-CCR8経路の発現と同経路を標的としたin vivoでの治療実験

①LATマウスのSGではCD4陽性T細胞、B220陽性B細胞、CD138陽性形質細胞を含む単核球浸潤と線維化を認めた。

②LATマウスでは、SGにおけるCcr8、脾臓におけるCcl8発現がlittermateと比較して有意に高値であった。

抗CCL8中和抗体投与群では、コントロール抗体投与群と比較して、SGの炎症細胞浸潤、線維化が改善した(図7)。

図7 LATマウスの唾液腺炎に対する抗CCL8中和抗体の効果



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tsuboi H, Honda F, Takahashi H, Ono Y, Abe S, Kondo Y, Matsumoto I, Sumida T	4. 巻 30
2. 論文標題 Pathogenesis of IgG4-related disease. Comparison with Sjogren's syndrome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mod Rheumatol	6. 最初と最後の頁 7-16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/14397595.2019.1650694	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Okamoto S, Tsuboi H, Sato R, Terasaki M, Terasaki T, Toko H, Shimizu M, Honda F, Yagishita M, Ohyama A, Kurata I, Abe S, Takahashi H, Osada A, Hagiwara S, Kondo Y, Matsumoto I, Sumida T	4. 巻 40
2. 論文標題 IgG4-related pleural disease with aortitis and submandibular glands involvement successfully treated with corticosteroid: case-based review	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Rheumatol Int	6. 最初と最後の頁 1725-1732
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00296-020-04555-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tsuboi H, Iizuka-Koga M, Asashima H, Takahashi H, Kudo H, Ono Y, Honda F, Iizuka A, Segawa S, Abe S, Yagishita M, Yokosawa M, Kondo Y, Moriyama M, Matsumoto I, Nakamura S, Sumida T	4. 巻 30
2. 論文標題 Upregulation and pathogenic roles of CCL18-CCR8 axis in IgG4-related disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mod Rheumatol	6. 最初と最後の頁 729-737
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/14397595.2019.1632061	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 坪井洋人、本田文香、小野由湖、安部沙織、高橋広行、近藤裕也、松本功、住田孝之
2. 発表標題 IgG4関連疾患におけるCCL18-CCR8経路の意義
3. 学会等名 第28回日本シェーグレン症候群学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坪井洋人、本田文香、工藤華枝、小野由湖、安部沙織、高橋広行、近藤裕也、松本功、住田孝之
2. 発表標題 IgG4関連疾患におけるCCL18-CCR8経路の意義
3. 学会等名 第63回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坪井洋人、浅島弘充、高橋広行、工藤華枝、小野由湖、安部沙織、近藤裕也、松本功、住田孝之
2. 発表標題 IgG4関連疾患の病変局所におけるCCL18-CCR8シグナルの発現解析
3. 学会等名 第62回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 坪井洋人、瀬川誠司、飯塚晃、浅島弘充、高橋広行、工藤華枝、小野由湖、本田文香、安部沙織、近藤裕也、松本功、住田孝之
2. 発表標題 IgG4関連疾患の新規治療標的の開発に向けたCCL18-CCR8経路の発現と機能解析
3. 学会等名 第27回日本シェーグレン症候群学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------