

平成30年6月14日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09519

研究課題名(和文) IgG4関連疾患におけるCCL18-CCR8と疾患特異的治療標的分子の探索

研究課題名(英文) CCL18-CCR8 axis and novel disease specific therapeutic targets for 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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：IgG4関連疾患(IgG4-RD)の口唇唾液腺(LSG)では、シェーグレン症候群(SS)・健康人(HC)と比較して、CCL18を発現するマクロファージ・樹状細胞・形質細胞は有意に増加していた。IgG4-RDとSSのLSGでは、T・B細胞・形質細胞にCCL18の受容体であるCCR8が発現していたが、HCではCCR8の発現はなかった。HCのPBMCおよび末梢血B細胞をCD40L+IL-4+IL-10+IL-21で刺激すると、CD40L+IL-4刺激と比較して、IgG4産生が有意に増加し、CCL18添加でさらに増加した。以上よりCCL18-CCR8経路はIgG4-RDの新規治療標的分子となり得る。

研究成果の概要(英文)：We clarified that CCL18 expressing macrophages, dendritic cells, and plasmacytes were significantly increased in labial salivary glands (LSGs) of IgG4-related disease (IgG4-RD) compared with Sjögren's syndrome (SS) and healthy controls (HC). In LSGs of IgG4-RD and SS, T, B cells and plasmacytes expressed CCR8 which is a receptor for CCL18, whereas not in LSGs of HC. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and peripheral B cells stimulated with CD40L, IL-4, IL-10, and IL-21 significantly highly produced IgG4 compared with those stimulated with CD40L and IL-4. Moreover addition of CCL18 enhanced IgG4 production from PBMCs and peripheral B cells stimulated with CD40L, IL-4, IL-10, and IL-21. These findings suggested that the CCL18-CCR8 axis might be a novel therapeutic target for IgG4-RD.

研究分野：臨床免疫学

キーワード：IgG4関連疾患 シェーグレン症候群 ケモカイン CCL18 CCR8 口唇唾液腺

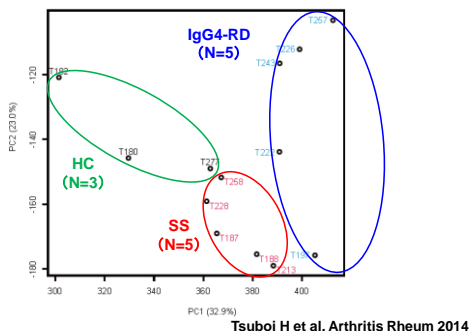
### 1. 研究開始当初の背景

IgG4 関連疾患 (IgG4-related disease; IgG4-RD) は、高 IgG4 血症と全身の諸臓器に IgG4 陽性形質細胞の浸潤を認め、リンパ増殖性病変・線維化病変をきたす原因不明の免疫疾患である。21 世紀になって本邦より発信され、本邦を中心に疾患の臨床的、病因的解析が進められてきた新規疾患である (Mod Rheumatol 2012)。IgG4-RD にはステロイドが有効だが、ステロイド減量後の再燃例も多く報告されるようになり、臨床的な課題である (Rheumatology (Oxford) 2015)。近年 IgG4-RD の再燃例や難治例に対して、種々の免疫抑制薬やキメラ型抗 CD20 モノクローナル抗体であるリツキシマブ等の生物学的製剤の有効性が報告されているが (Medicine (Baltimore) 2016)、無効例の存在、免疫抑制に起因する感染症の増加など、アンメットニーズも多く残されている。現在 IgG4-RD の根本の病因・病態の解明と病態に基づいた新規疾患特異的治療戦略の構築が求められている。

我々は先行研究で、IgG4-RD の口唇唾液腺 (Labial salivary gland; LSG) において、健常人 (Healthy control; HC) やシェーグレン症候群 (Sjögren's syndrome; SS) と比較して、IL-10、TGF $\beta$ 、AID が高発現し、IgG4 クラススイッチ亢進や線維化に関与する可能性を示してきた (Tsuboi H et al. Arthritis Res Ther 2012)。

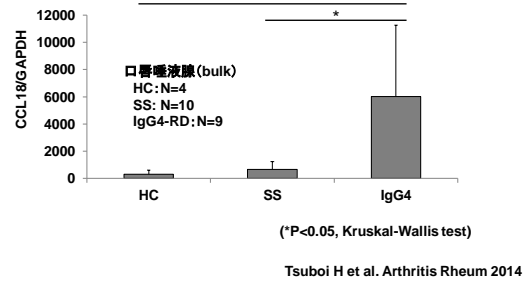
さらに IgG-RD と SS の LSG における遺伝子発現を、DNA マイクロアレイを用いて網羅的に比較し、主成分分析で IgG4-RD と SS の遺伝子発現パターンは互いに異なることを明らかにした (図 1) (Tsuboi H et al. Arthritis Rheum 2014)。

**図1 DNAマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現比較(口唇唾液腺)**



また IgG4-RD の LSG で相対的に発現増加した発現変動遺伝子の中から、T 細胞、B 細胞の病変局所へのケモタキシス、線維化誘導に関わるケモカインである CCL18 を見出し、定量 PCR による validation で、HC、SS と比較して IgG4-RD の LSG における CCL18 の有意な発現増加を確認した (図 2) (Tsuboi H et al. Arthritis Rheum 2014)。

**図2 定量PCRによるvalidation(CCL18)**



### 2. 研究の目的

本研究では、IgG4-RD の病変局所における CCL18 とその受容体である CCR8 の発現・発現細胞、病態形成における機能、治療標的の可能性を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

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

2) IgG4-RD (N=3)、SS (N=4)、HC (N=5) の間で、LSG における CCR8 のタンパクレベルでの発現および発現細胞 (T 細胞 (CD3)、B 細胞 (CD20)、形質細胞 (CD138)) を IF で比較した。

3) HC の末梢血単核球 (Peripheral blood mononuclear cell; PBMC)、および PBMC より分離した CD19 陽性 B 細胞を、CD40L+IL-4 $\pm$ IL-10 $\pm$ IL-21 刺激下で 8 日間 in vitro で培養し、培養上清中の IgG4 濃度を Cytometric Bead Array (CBA) で測定した。さらに PBMC および末梢血 B 細胞からの IgG4 産生に対する CCL18-CCR8 経路の影響を検討した。

### 4. 研究成果

1) SS・HC と比較して、IgG4-RD の LSG では CCL18 の高発現を認め、マクロファージ、樹状細胞、B 細胞、形質細胞における CCL18 陽性細胞数は同等であった (P=0.118) (図 3、4)。IgG4-RD の LSG では、SS・HC と比較して CCL18 陽性マクロファージ・樹状細胞・形質細胞、HC と比較して CCL18 陽性 B 細胞は有意に増加していた (P<0.05) (図 5)。

2) IgG4-RD と SS の LSG ではともに CCR8 が発現していたが、HC の LSG では CCR8 の発現は認めなかった (図 6)。IgG4-RD の LSG における CCR8 陽性 T 細胞・B 細胞・形質細胞数は、HC と比較して有意に増加していたが (P<0.05)、SS とは同等であった (図 7、8)。

3) HC の PBMC を CD40L+IL-4+IL-10+IL-21 で刺激すると、CD40L+IL-4 刺激と比較して、有意に IgG4 産生が増加した (P<0.05) (図 9)。CD40L+IL-4+IL-10+IL-21 刺激に、さらに

CCL18 を添加すると PBMC からの IgG4 産生が増加傾向となったが、CD40L+IL-4 刺激に CCL18 を添加しても IgG4 産生は増加しなかった (図 9)。

HC の末梢血 B 細胞を CD40L+IL-4+IL-10+IL-21 で刺激すると、CD40L+IL-4 刺激と比較して、有意に IgG4 産生が増加した ( $P<0.05$ ) (図 10)。CD40L+IL-4+IL-10+IL-21 刺激に、さらに CCL18 を添加すると末梢血 B 細胞からの IgG4 産生が増加傾向となった (図 10)。

図3 LSGにおけるCCL18発現の比較

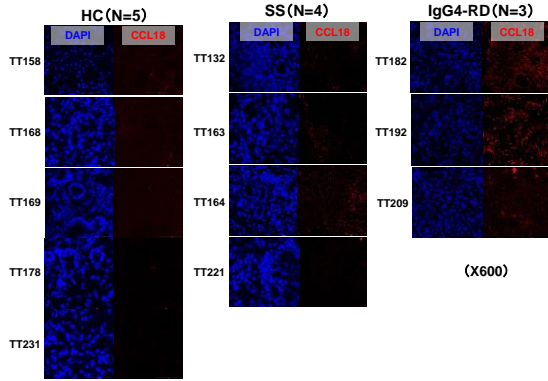


図4 CCL18発現細胞(IgG4-RD)

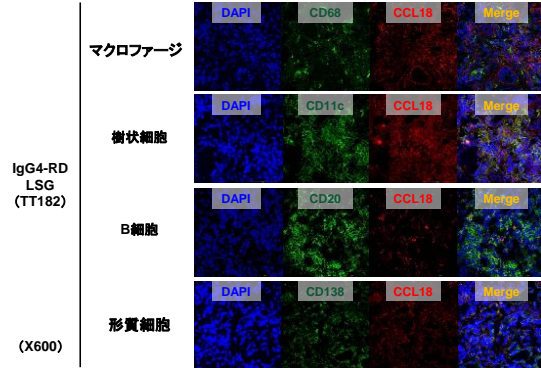


図5 HC、SS、IgG4-RDのLSGにおけるCCL18陽性細胞数の比較

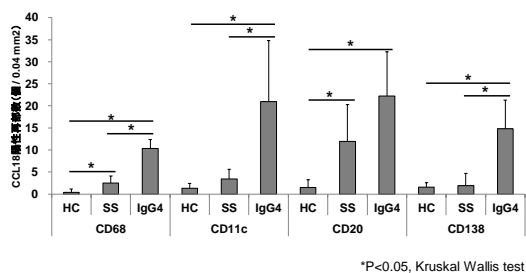


図6 LSGにおけるCCR8発現の比較

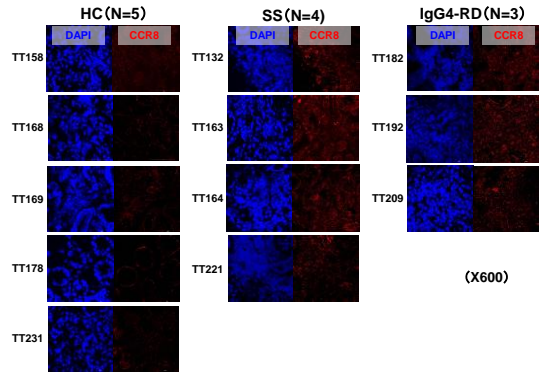


図7 CCR8発現細胞の比較(SS vs IgG4)

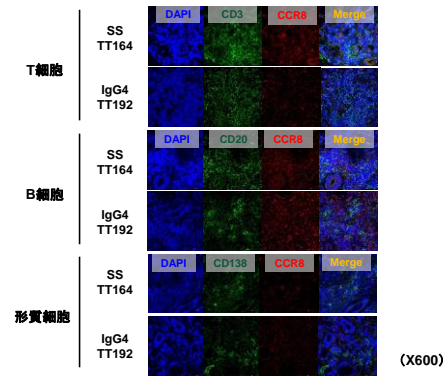


図8 HC、SS、IgG4-RDのLSGにおけるCCR8陽性細胞数の比較

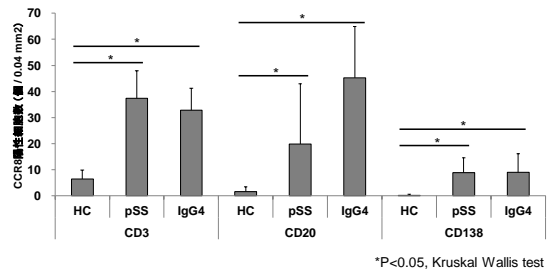


図9 HCのPBMCからのIgG4産生に対するCCL18の影響

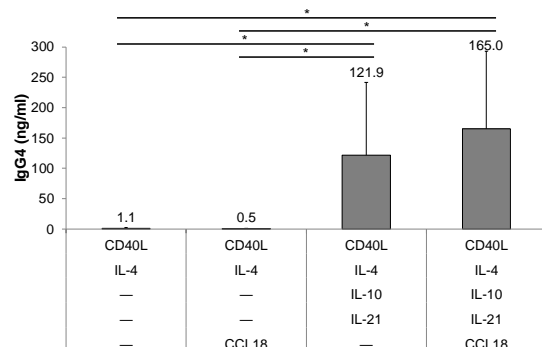
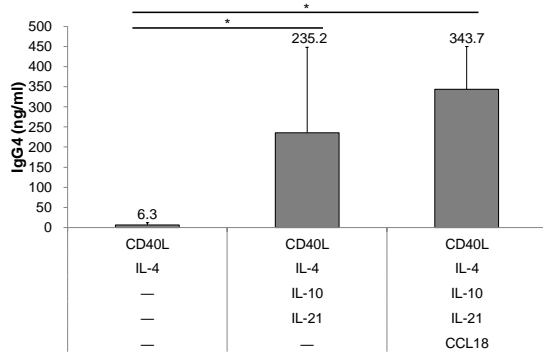
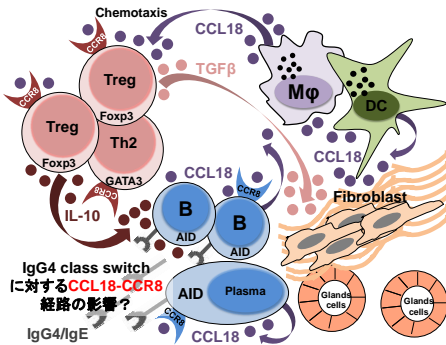


図10 HCの末梢血B細胞からのIgG4産生に対するCCL18の影響



以上の結果から、IgG4-RDの病変局所でマクロファージ、樹状細胞、B細胞、形質細胞が産生したCCL18は、その受容体であるCCR8を発現するT細胞、B細胞、形質細胞の病変局所へのケモタキシス、線維化誘導を介して、IgG4-RDの病態形成に寄与する可能性が考えられた。またIgG4-RDの特徴的な病態であるIgG4産生亢進に対しても、CCL18-CCR8経路が影響する可能性が示唆された(図11)。CCL18-CCR8経路はIgG4-RDの新規治療標的分子となり得る可能性が示された。

図11 IgG4-RDの病態形成におけるCCL18-CCR8経路の役割



#### 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5件)

- 1) Masaki Y, Matsui S, Saeki T, Tsuboi H, Hirata S, Izumi Y, Miyashita T, Fujikawa K, Dobashi H, Susaki K, Morimoto H, Takagi K, Kawano M, Origuchi T, Wada Y, Takahashi N, Horikoshi M, Ogishima H, Suzuki Y, Kawanami T, Kawanami Iwao H, Sakai T, Fujita Y, Fukushima T, Saito M, Suzuki R, Morikawa Y, Yoshino T, Nakamura S, Kojima M, Kurose N, Sato Y, Tanaka Y, Sugai S, Sumida T.: A multicenter phase II prospective clinical trial of glucocorticoid for patients with

untreated IgG4-related disease. *Mod Rheumatol* 27:849-854, 2017 (査読有) doi: 10.1080/14397595.2016.1259602.

- 2) Furukawa S, Moriyama M, Miyake K, Nakashima H, Tanaka A, Maehara T, Iizuka-Koga M, Tsuboi H, Hayashida JN, Ishiguro N, Yamauchi M, Sumida T, Nakamura S.: Interleukin-33 produced by M2 macrophages and other immune cells contributes to Th2 immune reaction of IgG4-related disease. *Sci Rep* 7:42413, 2017 (査読有) doi: 10.1038/srep42413.
- 3) Tsuboi H, Iizuka M, Takahashi H, Asashima H, Hirota T, Kondo Y, Nakai Y, Abe K, Tanaka A, Moriyama M, Nakamura S, Yoshihara T, Matsumoto I, Sumida T.: Pathogenesis of IgG4-related disease-Molecular biological approaches. *Clin Rheumatol Rel Res* 29:128 ~ 139, 2017 (査読有) doi: 10.14961/cra.29.128.
- 4) Ohta M, Moriyama M, Maehara T, Gion Y, Furukawa S, Tanaka A, Hayashida JN, Yamauchi M, Ishiguro N, Mikami Y, Tsuboi H, Iizuka-Koga M, Kawano S, Sato Y, Kiyoshima T, Sumida T, Nakamura S.: DNA Microarray Analysis of Submandibular Glands in IgG4-Related Disease Indicates a Role for MARCO and Other Innate Immune-Related Proteins. *Medicine (Baltimore)* 95:e2853, 2016 (査読有) doi: 10.1097/MD.0000000000002853.
- 5) Ebe H, Tsuboi H, Hagiya C, Takahashi H, Yokosawa M, Hagiwara S, Hirota T, Kurashima Y, Takai C, Miki H, Asashima H, Umeda N, Kondo Y, Ogishima H, Suzuki T, Chino Y, Matsumoto I, Sumida T.: Clinical features of patients with IgG4-related disease complicated with perivascular lesions. *Mod Rheumatol* 25:105-109, 2015 (査読有) doi: 10.3109/14397595.2014.903596.

[学会発表] (計6件)

- 1) 坪井洋人、飯塚麻菜、高橋広行、浅島弘充、工藤華枝、小野由湖、安部沙織、近藤裕也、中井雄治、阿部啓子、田中昭彦、森山雅文、中村誠司、松本功、住田孝之。IgG4関連疾患の病因・病態の解明：シェーグレン症候群との比較から見てきたもの。2017年第4回日本リウマチ学会、ベーシックリサーチカンファレンス、次世代リーダーセッション2(東京)10月14日、2017
- 2) 坪井洋人、飯塚麻菜、高橋広行、浅島弘

充、廣田智哉、近藤裕也、中井雄治、阿部啓子、田中昭彦、森山雅文、中村誠司、吉原俊雄、松本功、住田孝之：IgG4 関連疾患の病因-分子生物学的アプローチ-第31回日本臨床リウマチ学会（東京）10月30日、2016

- 3) 坪井洋人、高橋広行、飯塚麻菜、浅島弘充、廣田智哉、近藤裕也、中井雄治、阿部啓子、田中昭彦、森山雅文、中村誠司、吉原俊雄、松本功、住田孝之：IgG4 関連疾患 vs シェーグレン症候群：遺伝子発現比較からみた病因・病態の違い. 第25回日本シェーグレン症候群学会学術集会（東京）9月8日、2016
- 4) 坪井洋人、飯塚麻菜、浅島弘充、高橋広行、廣田智哉、近藤裕也、松本功、住田孝之：IgG4 関連疾患の病変局所におけるCCL18-CCR8シグナルの発現亢進. 第60回日本リウマチ学会総会・学術集会（横浜）4月22日、2016
- 5) Tsuboi H, Iizuka M, Asashima H, Takahashi H, Hirota T, Kondo Y, Matsumoto I, Sumida T. : Up-regulation of CCL18-CCR8 signaling in affected tissues of patients with IgG4-related disease. The 44th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology (Sapporo) 11月19日、2015
- 6) Tsuboi H, Iizuka M, Asashima H, Takahashi H, Hirota T, Kondo Y, Matsumoto I, Sumida T. : Up-regulation of CCL18-CCR8 signaling in patients with IgG4-related disease. 第59回日本リウマチ学会総会・学術集会（名古屋）4月24日、2015

〔図書〕（計2件）

- 1) 坪井洋人、中井雄治、飯塚麻菜、森山雅文、吉原俊雄、中村誠司、阿部啓子、住田孝之：ケモカインとIgG4関連疾患 IgG4 関連疾患 実践的臨床から病因へ. 中村誠司、住田孝之監修. 川茂幸、川野充弘編集. 前田書店、156-161, 2015
- 2) 坪井洋人、住田孝之：唾液腺病変 臨床医必読 最新IgG4関連疾患. 岡崎和一、川茂幸編集主幹. 神澤輝実、川上純、川野充弘、全陽、高橋裕樹、中島衡編集. 診断と治療社、58-61, 2015

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/clinical-med/rheumatology/>

6. 研究組織

(1) 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