

IgG4関連涙腺・唾液腺炎の病態形成分子機構に関する研究：自然免疫と獲得免疫のネットワーク

古川, 祥子

<https://doi.org/10.15017/1500643>

出版情報：九州大学, 2014, 博士（歯学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：全文ファイル公表済

IgG4 関連涙腺・唾液腺炎の病態形成分子機構に関する研究
～自然免疫と獲得免疫のネットワーク～

**A study on molecular pathogenesis of IgG4-related
dacryoadenitis and sialoadenitis
- Network of innate and acquired immunities -**

2014 年

九州大学大学院歯学府口腔顎顔面病態学講座

顎顔面腫瘍制御学分野

古川 祥子

指導教員

九州大学大学院歯学研究院口腔顎顔面病態学講座

顎顔面腫瘍制御学分野

中村 誠司 教授

本研究の一部は下記の学術雑誌に掲載している。

Clinical relevance of Küttner tumour and IgG4-related dacryoadenitis and sialoadenitis

Sachiko Furukawa, Masafumi Moriyama, Shintaro Kawano, Akihiko Tanaka, Takashi Maehara, Jun-Nosuke Hayashida, Yuichi Goto, Tamotsu Kiyoshima, Hideki Shiratsuchi, Yukiko Ohyama, Miho Ohta, Yumi Imabayashi, and Seiji Nakamura

Accepted to *Oral Disease* May 21; 2014.

Preferential M2 macrophages contribute to fibrosis in IgG4-related dacryoadenitis and sialoadenitis, so-called Mikulicz's disease

Sachiko Furukawa, Masafumi Moriyama, Akihiko Tanaka, Takashi Maehara, Hiroto Tsuboi, Mana Iizuka, Jun-Nosuke Hayashida, Miho Ohta, Takako Saeki, Kenji Notohara, Takayuki Sumida, and Seiji Nakamura

Accepted to *Clinical Immunology* 156:9-18, 2014.

略語表

AIP: autoimmune pancreatitis (自己免疫性膵炎)

BAFF: B cell activating factor belonging to the TNF family

cDNA: complementary DNA

CS: chronic sialoadenitis (慢性唾液腺炎)

CSS: chronic sclerosing sialoadenitis (慢性硬化性唾液腺炎)

DC: dendritic cell (樹状細胞)

DEPC: diethyl pyrocarbonate

eGC: ectopic germinal center (異所性胚中心)

GC: germinal center (胚中心)

HE: hematoxylin eosin (ヘマトキシリン・エオジン)

HPF: high power field (強拡大視野)

IgG4-DS: IgG4-related dacryoadenitis and sialoadenitis (IgG4 関連涙腺・唾液腺炎)

IgG4-RD: IgG4-related disease (IgG4 関連疾患)

IL: interleukin (インターロイキン)

KT: Küttner tumor (キュトナー腫瘍)

KT-S (-) : KT without sialolith (唾石を伴わないキュトナー腫瘍)

KT-S (+) : KT with sialolith (唾石を伴ったキュトナー腫瘍)

LPS: lipopolysaccharide (リポ多糖)

MΦ: macrophage (マクロファージ)

MD: Mikulicz's disease (ミクリッツ病)

mDC: myeloid dendritic cell (骨髄系樹状細胞)

MHC: major histocompatibility comp (主要組織適合遺伝子複合体)

mRNA: messenger RNA

MT: Masson's trichrome (マッソントリクローム)

NLR: nod-like receptor (Nod 様受容体)

OSCC: oral squamous cell carcinoma (口腔扁平上皮癌)

PCR: polymerase chain reaction

pDC: plasmacytoid dendritic cells (形質細胞様樹状細胞)

PSL: prednisolone (プレドニゾロン)

RPF: retroperitoneal fibrosis (後腹膜線維症)

SMG: submandibular gland (顎下腺)

SS: Sjögren's syndrome (シェーグレン症候群)

Tfh: follicular helper T (濾胞性ヘルパーT)

Th: T helper (ヘルパーT)

Th0: T helper 0 (ヘルパーT type 0)

Th1: T helper 1 (ヘルパーT type 1)

Th2: T helper 2 (ヘルパーT type 2)

Th17: T helper 17 (ヘルパーT type 17)

TLR: toll-like receptor (Toll 様受容体)

Treg: regulatory T (制御性 T)

目 次

要 旨	6
緒 言	9
材料と方法	13
結 果	20
研究 1. IgG4-DS と KT の臨床的・病理組織学的検討	
1-1. 患者内訳	
1-2. 臨床的所見	
1-3. 病理組織学的所見	
研究 2. IgG4-DS の線維化における M1/M2 MΦ の関与の検討	
2-1. 唾液腺における M1/M2 MΦ の発現と局在	
2-2. 唾液腺における線維化と M2 MΦ との関連	
2-3. 唾液腺以外の IgG4-RD 罹患臓器における M1/M2 MΦ の発現と局在	
研究 3. IgG4-DS の病態形成における IL-33 の関与の検討	
3-1. IL-33 の発現と局在	
3-2. 自然免疫担当細胞の発現と局在	
考 察	42
謝 辞	51
参考文献	52

要 旨

IgG4 関連疾患 (IgG4-related disease: IgG4-RD) は、高 IgG4 血症と罹患臓器への IgG4 陽性形質細胞の浸潤を特徴とする全身性疾患であり、本邦から提唱された新規疾患概念である。その中の 1 つである IgG4 関連涙腺・唾液腺炎 (IgG4-related dacryoadenitis and sialoadenitis: IgG4-DS) は、涙腺や唾液腺の腫脹と線維化を特徴とし、近年ではキョトナー腫瘍 (Küttner tumor: KT) との臨床的関連について報告があるが、詳細な検討がなされていない。そこで本研究では第一に、IgG4-DS と KT との関連を明らかにするために臨床的・病理組織学的に比較検討を行った。

また、われわれはこれまでに免疫学的解析を行い、過去に IgG4-DS が T helper type 2 (Th2) 優位な疾患であることを見だし、近年では IgG4-RD の 1 つである自己免疫膵炎においてマクロファージ (macrophage: MΦ) の著明な浸潤が報告されている。MΦ は、M1 と M2 に分類され、M2 MΦ (CD163) は Th2 サイトカインにより誘導され、局所の線維化に深く関与しているとされている。そこで第二に、唾液腺における MΦ (M1+M2: CD68) の発現と局在に注目し、IgG4-DS の線維化と MΦ との関連について検討を行った。

さらに近年、IL-33 という新たに同定されたサイトカインが Th2 細胞上にある受容体の ST2 を介して Th2 の活性化に関与していることが明らかになったので、最後に IgG4-DS の唾液腺におけるインターロイキン (interleukin: IL) -33 の発現と局在について検討を行った。以下に本研究で得られた結果をまとめた。

1. IgG4-DS と KT の臨床的・病理組織学的検討

病理組織検査で慢性硬化性顎下腺炎もしくは KT と診断された 54 例を対象とし、これらを唾石あり群 (46 例) となし群 (8 例) の 2 群に分けて検討を行った。その結果、唾石あり群は全症例で片側性であり、他の IgG4-RD の合併を認めなかったが、唾石なし群の 3 例 (37.5%) は両側に腫脹を認め、他の IgG4-RD の合併を 1 例 (12.5%) で認めた。病理組織学的には、IgG4 陽性細胞数および比率は唾石なし群で有意に高かった。これらの結果より、KT は「IgG4-DS の部分症」と考えられ、特に両側性で明らかな原因が不明である症例では、血清 IgG4 値や IgG4 陽性細胞の病理学的な検索が必要であることが示唆された。

2. IgG4-DS の線維化における MΦ の関与の検討

IgG4-DS 患者 7 例、シェーグレン症候群 (Sjögren syndrome: SS) 患者 10 例、慢性唾液腺炎 (chronic sialoadenitis: CS) 患者 10 例、健常者 10 例を対象とし、MΦ と線維化因子 (IL-10、IL-13、CCL18) の局在と発現を検索した。その結果、IgG4-DS は他の群より CD163 陽性細胞数および比率が有意に高かった。線維化因子は IgG4-DS 群のみに線維化部分で強い発現を認め、二重蛍光免疫染色では IL-13 の局在は一部で一致していたが、CD163 と IL-10 および CCL18 の局在はほぼ一致していた。線維化スコアは IgG4-DS が他の群に比べ有意に高く、CD163 陽性細胞比率と正の相関を示した。これらの結果より、IgG4-DS に特徴的な線維化は M2 MΦ が産生する IL-10 や CCL18 が重要であることが示唆された。

3. IgG4-DS の病態形成における IL-33 の関与の検討

IgG4-DS 患者 7 例、SS 患者 10 例、健常者 10 例を対象とし、唾液腺における

IL-33、Th2 サイトカイン、MΦ について検討を行った。その結果、IgG4-DS では、いずれの分子の発現も他の群より有意に亢進しており、IL-33 と Th2 サイトカインの mRNA 発現量は正の相関を認めた。IL-33 は全群で導管上皮細胞に発現を認めたが、IgG4-DS 群のみ異所性濾胞形成周囲に散在性に認めた。Th2 サイトカインは SS 群と IgG4-DS 群で導管周囲のリンパ球浸潤部に発現を認めた。二重蛍光免疫染色では IL-33 は CD68 および CD163 と局在がほぼ一致していた。これらの結果より、M2 MΦ が産生する IL-33 が Th2 細胞の選択的活性化を起し、IgG4-DS の病態形成に寄与していることが示唆された。

以上より、IgG4-DS の病態形成には獲得免疫だけではなく、自然免疫、特に M2 MΦ が深く関与していることが示唆され、IgG4-RD は自己免疫疾患というよりはむしろ感染性あるいはアレルギー性疾患ではないかと推察された。

緒 言

IgG4 関連疾患 (IgG4-related disease: IgG4-RD) は、高 IgG4 血症と罹患臓器への IgG4 陽性形質細胞の著しい浸潤と線維化を特徴とし、同時性あるいは異時性に全身臓器の腫大や結節・肥厚などを認める原因不明の疾患である。2001 年に Hamano ら [1] が自己免疫性膵炎 (autoimmune pancreatitis: AIP) に IgG4 の関与を報告したのをはじめとし、ミクリッツ病 (Mikulicz's disease: MD) [2]、硬化性胆管炎 [3]、間質性肺炎 [4]、間質性腎炎 [5]、後腹膜線維症 (retroperitoneal fibrosis: RPF) [6] などでも同様の報告があり、これらの疾患を 1 つの疾患概念「IgG4-RD」として捉えることが本邦から提唱された。現在は、厚生労働省科学研究「難治性疾患克服研究事業」のプロジェクトを中心とした研究グループが立ち上がり、IgG4-RD の病態解明のための研究取り組みがなされている。

口腔外科領域に発症する MD は、両側性の涙腺や唾液腺の著明な線維化とそれに伴う持続的な腫脹を特徴とするが、病理組織学的類似性から従来シェーグレン症候群 (Sjögren's syndrome: SS) の一亜型として認識されてきた [7]。しかし、MD の腺腫脹は持続性で両側性であり、ステロイドが著効するなど、SS と臨床的相違点を呈していた。さらに近年、Yamamoto ら [8] が、MD 患者に高 IgG4 血症や罹患組織への IgG4 陽性形質細胞の浸潤の特徴を認めることを報告してからは、MD と SS は全く異なった機序で生じる疾患であることが明らかになり、最近では MD が IgG4-RD の 1 つであることを明確にするために「IgG4 涙腺・唾液腺炎 (IgG4-related dacryoadenitis and sialoadenitis: IgG4-DS)」と呼ばれるようになった [9]。

一方、顎下腺の両側または片側の硬化性腫脹を特徴とするキュトナー腫瘍 (Küttner tumor: KT) は、慢性硬化性顎下腺炎 (chronic sclerosing sialoadenitis: CSS) とも呼ばれ、1896年に Küttner らによって提唱された [10]。その後、1977年に病理医の Seifert らが顎下腺にリンパ球浸潤や線維化を認めるものを一様に KT と位置づけ [11]、その中に唾石症などの炎症性疾患を多く含んでいたため、KT は炎症性偽腫瘍として認識されるようになった。しかし近年、KT の一部の症例で高 IgG4 血症や顎下腺に IgG4 陽性形質細胞の浸潤を認めることが報告され [12]、IgG4-DS との関連が指摘されている。そこで研究 1 では、IgG4-DS と KT との関連を明らかにするため、臨床的・病理組織学的所見について比較検討を行った。

IgG4-RD の病態解明においては日本を中心に免疫学的解析が行われ、主に獲得免疫を担当する B 細胞や T 細胞に注目した研究がなされている。一般に、免疫系のバランスや恒常性は CD4 陽性 ヘルパー T (T helper: Th) 細胞により保たれており、その Th 細胞群のバランスの破綻が、様々な自己免疫性疾患の原因となっていると考えられている [13-16]。Th 細胞は、分泌するサイトカインや発現している転写因子の違いから機能的に異なるいくつかのサブセットに分類されており、少なくとも 6 つのサブセットとして Th type 0 (Th 0)、Th type 1 (Th1)、Th type 2 (Th2)、Th type 17 (Th17)、濾胞性ヘルパー T (follicular helper T: Tfh)、および制御性 T (regulatory T: Treg) 細胞が報告されている [17]。Th0 は他の Th サブセットへと分化しうる前駆細胞と考えられており、Th1 はインターロイキン (interleukin: IL) -12 により誘導され、主に細胞性免疫を担っているとされる。一方で、Th2 は IL-4 により誘導され、主に体液性免疫を担っている

とされる [13]。また、近年報告されている Th17 は IL-1 β 、IL-6、および IL-23 によって誘導され、IL-17 を産生し、種々の自己免疫疾患の発症との関連が報告されている [15, 16, 18]。Tfh は IL-21 を産生し、胚中心 (germinal center: GC) の形成や自己免疫疾患の病態に関与し [19]、Treg は IL-10、TGF- β を産生し他の Th 細胞の免疫応答を調節するとされている [20, 21]。IgG4 の産生は、Th2 サイトカインである IL-4 が B 細胞に作用して誘導されることが知られている。われわれは過去の研究で、IgG4-DS 患者の唾液腺におけるサイトカインプロファイルを行い、Th2 および Treg が産生する IL-4、IL-5、IL-10 の発現が SS 患者と比較して有意に亢進しており、特定の Th サブセットの免疫応答が病態形成に関与していることが明らかにした [22]。それに加えて、IgG4-DS の特徴である異所性胚中心 (ectopic germinal center: eGC) の形成にも Th2 細胞が産生する IL-21 が重要な役割を担っていることが示唆されたことから [9]、現在では IgG4-DS は Th2 優位な疾患であると考えられている。

最近では獲得免疫だけではなく自然免疫との関連についても注目され、IgG4-RD の 1 つである AIP では自然免疫担当細胞であるマクロファージ (macrophage: M Φ) の著明な浸潤を認め、その細胞内センサーファミリーである Toll 様受容体 (toll-like receptor: TLR) や Nod 様受容体 (nod-like receptor: NLR) の活性化が IgG4 産生を促進することが報告されている [23]。M Φ は一般に大きく分けて M1 M Φ と M2 M Φ に分類され、M1 M Φ は「古典活性化 M Φ 」ともよばれ、細菌感染やウイルス感染時に活性化され、IFN- γ や IL-6 を産生することで Th1 細胞の活性化や酸化ストレスの産生に関与する。一方、M2 M Φ は「選択的活性化 M Φ 」ともよばれ、Th2 サイトカインによって活性化し、IL-10、IL-13、

CCL18 を産生することにより線維化を促し、組織修復や免疫反応活性化に関与するとされる [24]。そこで研究 2 では、唾液腺における M1/M2 MΦ の発現と局在に注目し、IgG4-DS の線維化と MΦ との関連について検討を行った。

前述の通り、IgG4-RD は Th2 優位の疾患であると考えられているが、なぜ Th2 にシフトするか、その機序についてはいまだ不明である。しかし近年、同じ Th2 優位な疾患であるアトピー性皮膚炎や気管支喘息の発症に IL-33 という新規サイトカインが関与していることが示唆されている [25, 26]。この IL-33 は、主に上皮細胞や MΦ、樹状細胞 (dendritic cell: DC) が産生しており、Th2 細胞上に発現している ST2 (IL-33 受容体) を介して Th2 細胞の活性化や Th2 サイトカインの産生が促進されることが報告されている [27, 28]。そこで研究 3 では、唾液腺における IL-33 とその産生細胞である MΦ や DC の発現および局在について検討を行った。

材料と方法

1. 対象患者

<研究 1>

平成 15 年から平成 25 年に九州大学病院顎顔面口腔外科または耳鼻咽喉科を受診し、病理組織検査にて CSS、もしくは KT と病理組織学的に診断された 54 症例（男性 22 症例、女性 32 症例、平均年齢：51.3 ± 28.3 歳）と対象とした。

<研究 2>

平成 22 年から平成 25 年に九州大学病院顎口腔外科を受診し、IgG4-DS と診断された 7 症例（男性 5 症例、女性 2 症例、平均年齢：61.7 ± 12.1 歳）、SS と診断された 10 症例（男性 5 症例、女性 5 症例、平均年齢：61.5 ± 14.9 歳）、唾石による慢性唾液腺炎（chronic sialoadenitis: CS）と診断された 10 症例（男性 5 症例、女性 5 症例、平均年齢: 51.5 ± 17.2 歳）を対象とした。また、口腔扁平上皮癌（oral squamous cell carcinoma: OSCC）患者の中で顎下腺（submandibular gland: SMG）に病変を認めず、かつ放射線・化学療法を行っていない 10 症例（男性 5 症例、女性 5 症例、平均年齢: 58.4 ± 16.3 歳）をコントロールとした。

<研究 3>

平成 22 年から平成 25 年に九州大学病院顎顔面口腔外科を受診し、IgG4-DS と診断された<研究 2>と同じ 7 症例（男性 5 症例、女性 2 症例、平均年齢: 61.7 ± 12.1 歳）、SS と診断された 10 症例（男性 5 症例、女性 5 症例、平均年齢: 61.5

± 14.9 歳) を対象とした。また、<研究 2>と同じ 10 症例 (男性 5 症例、女性 5 症例、平均年齢: 58.4 ± 16.3 歳) をコントロールとした。

2. 組織採取

対象患者の SMG は、Moriyama ら [29] が提唱した手技に沿って生検時に採取した。また、コントロールの SMG は OSCC 患者の頸部郭清時に採取し、ヘマトキシリン・エオジン (hematoxylin eosin: HE) 染色にて病理組織学的に正常で、かつ腫瘍細胞の浸潤がないことを確認した。採取した SMG は、免疫組織学的解析にはパラフィンワックスに包埋し、messenger RNA (mRNA) の解析用には直ちに液体窒素を用いて凍結し、-80°C で保存した後に実験に用いた。

3. IgG4-DS および SS の診断

IgG4-DS の診断は、「IgG4 関連疾患包括診断基準」 [30] および「IgG4 関連涙腺・唾液腺炎診断基準」 [2] に準じて行った。また、SS の診断はすべて「厚生省シェーグレン診断基準 (1999 年改定基準)」 [31] および「アメリカ・ヨーロッパ改訂分類基準」に準じて行った [32]。

4. RNA および complementary DNA (cDNA) の抽出

RNA の抽出には acidified guanidinium-phenol-chloroform 法を用いた。SMG に Torizol® Reagent (Invitrogen, California, USA) を 1 ml 加え、ホモジナイザーを用いて粉砕した。200 µl のクロロホルム (Nacalai tesque, Kyoto, Japan) を加えて攪拌後、15 分間静置した。4°C、15,000 rpm で 15 分間遠心した後に RNA を含む水層を採取し、これに 1 ml のイソプロパノール (Nacalai tesque) を加えて攪拌後、4°C、15,000 rpm で 15 分間遠心し、上清の除去後に得られた RNA ペレットを 70% EtOH (Nacalai tesque) で洗浄後乾燥させ、50 µl の 0.1% diethyl pyrocarbonate (DEPC)

処理水に溶解した。その後、吸光度計にて RNA の濃度を測定した。cDNA の合成には、DEPC 処理水に約 1.0 μg の total RNA、20 U/ μl の Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor (Promega, Madison, USA) を 0.5 μl 、0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の oligo-1218 (Pharmacia, Uppsala, Sweden) を 1 μl 、10 mM PCR Nucleotide Mix (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, [New Jersey](#), USA) を 1 μl 、250 mM トリス塩酸塩 (pH 8.3) 、375 mM KCl および 15 mM MgCl を含む反応緩衝液を 4 μl 、100 mM dithiothreitol を 2 μl 、200 U/ml の SUPERScript™ II RNase H- Reverse Transcriptase (Life Technologies, Rockville, Maryland, USA) を 0.5 μl 加えて合計 20 μl とし、42°C で 1 時間インキュベートした。その後、95°C で 5 分間加温して酵素を失活させ、直ちに氷冷した。これを DEPC 処理水で 10 倍に希釈し、サイトカイン、ケモカイン、細胞表面マーカーの mRNA の解析に用いた。

5. real-time polymerase chain reaction (PCR) 法によるサイトカイン、ケモカイン、細胞表面マーカーの mRNA 発現の解析

real-time PCR は Brilliant® II SYBR® Green QPCR Master Mix (Agilent technologies, California, USA) を用いて行った。滅菌水に Master Mix を 10 μl 、template DNA を 10 ng、20 pM センスおよびアンチセンスプライマーをそれぞれ 0.5 μl ずつ加え、全反応量を 20.0 μl とした。反応条件は、熱変性は 95°C で 1 サイクル目が 5 分、2 サイクル目以降は 10~20 秒間で行い、伸張反応は 72°C、10~30 秒間とし、全 45 サイクルの増幅を行った。mRNA の発現を解析する分子は、サイトカイン (IFN- γ 、IL-4、IL-13、IL-33) 、ケモカイン (CCL18) 、および細胞表面マーカー (CD11c、CD68、CD123、CD163、ST2) とした。各プライマー

配列を表 1 に示す。また、各症例間でサイトカイン、ケモカインおよび細胞表面マーカーおよび細胞表面マーカーの mRNA 発現量を定量化するために、それぞれの mRNA の発現量はハウスキーピング遺伝子である β -actin の mRNA 発現量を用いて補正し、相対的発現量を算出した。

6. 免疫組織学的解析

パラフィン切片 (4 μ m) を作製し、通常のアビジン-ビオチン法による免疫組織化学染色を CSA II (Biotin-Free Catalyzed Amplification) System (Dako, Carpinteria, UK) を用いて行った [22]。本研究の解析に使用した抗体は、抗 IgG ポリクローナル抗体 (A0423, Dako)、抗 IgG4 モノクローナル抗体 (The Binding Site, Birmingham, UK)、抗 CD68 モノクローナル抗体 (clone: ab955, Abcam, Massachusetts, USA)、抗 CD163 モノクローナル抗体 (clone: NCL-CD163, Leica Biosystems, Germany)、抗 CCL18 ポリクローナル抗体 (clone: ab104867, Abcam)、抗 IL-10 ポリクローナル抗体 (clone: ab34843, Abcam)、抗 IL-13 ポリクローナル抗体 (clone: HPA042421, Atlas Antibodies AB, Sweden)、抗 IL-33 モノクローナル抗体 (clone: Nessey-1, Enzo, Japan)、抗 ST2 ポリクローナル抗体 (clone: HPA007406, Atlas Antibodies)、抗 IL-4 ポリクローナル抗体 (clone: ab9622, Abcam)、抗 IFN- γ ポリクローナル抗体 (clone: ab9657, Abcam)、抗 CD11c モノクローナル抗体 (clone: ab52632, Abcam)、抗 CD123 モノクローナル抗体 (clone: NCL-CD123, Leica Biosystems) を用いた。全ての免疫組織化学染色において対比染色としてヘマトキシリン (Merck, Darmstadt, Germany) を使用した。なお、各抗体の陽性細胞は、顕微鏡用デジタルカメラ BZ-9000 series (Keyence, Tokyo, Japan) を用いて撮影、記録した。

7. 特殊染色法解析

膠原線維部を特異的に染色するため、マッソントリクローム (Masson's trichrome: MT) 染色を行った。パラフィン切片 (4 μm) を作製し、キシレン・アルコールにて脱パラフィン処理を行った後、MT 染色キット (Polyscience, Warrington, Pennsylvania, USA) を用いた。染色ではワイゲルトの鉄を用いて核を濃紫色に染色し、リンモリブデン酸/リントングステン酸溶液にて細胞質を赤色に染色した。最後にアニリン青を用いて膠原線維を青色に染色した。染色した組織の検出には、顕微鏡用デジタルカメラ BZ-9000 series (Keyence) を用いて記録、撮影した。

8. IgG4/IgG 陽性細胞率の算出

IgG4/IgG 陽性細胞率は、強拡大視野 (high power field: HPF) 5 視野で IgG4 陽性細胞と IgG 陽性細胞をそれぞれ計測し、各視野の IgG4 陽性細胞数を IgG 陽性細胞数で除したものを平均した。

9. M2 M Φ 陽性率の算出

M2 M Φ 陽性率は強拡大 5 視野で CD163 陽性細胞と CD68 陽性細胞をそれぞれ計測し、各視野の CD163 陽性細胞数を CD68 陽性細胞数で除した CD163 (M2M Φ) /CD68 (M1+M2 M Φ) 陽性細胞率の平均値を M2 M Φ 陽性率として算出した。

10. 線維化スコアの算出

MT 染色を行ったのち、強拡大視野中に染色された全ての染色面積 (濃紫色、赤色、青色) と、青色で染色された染色面積をそれぞれ計測し、各視野の膠原

線維染色面積（青色）を全染色領域で除した値を強拡大 5 視野で算出し、これらの平均値を線維化スコアとして算出した。

11. 蛍光二重免疫染色

パラフィン切片（4 μm ）を作製し、キシレン・アルコールにて脱パラフィン処理を行った後、前述の抗体を用いて室温暗所で 2 時間インキュベートし、100 倍希釈した Alexa Fluor® 488 もしくは Alexa Fluor® 568 二次抗体 (Abcam, USA) を用いて室温暗所で 30 分インキュベートした。第一抗原の検出反応と第二抗原の検出反応の間には 1% BSA 含有ブロッキング溶液を室温暗室で 40 分インキュベートした。スライドの封入には DAPI 含有 VECTASHIELD® (Vector Laboratories, California, USA) を用いた。染色した組織の検出には、顕微鏡用デジタルカメラ BZ-9000 series (Keyence) を用いて記録、撮影した。

12. 統計

統計処理には Student の t 検定、Fisher の検定、Mann-Whitney の U 検定、One-way ANOVA 検定および Spearman 順位相関係数を用いた。なお、統計解析ソフトとして JMP software version 8 (SAS Institute, North Carolina, USA) を使用し、 $P < 0.05$ の場合を統計学的有意差ありとした。

表 1. real-time PCR のプライマー配列

Gene	(bp)	primer
IFN- γ	142	forward 5'-TGT CCA ACG CAA AGC AAT AC-3'
		reverse 5'-ATA TTG CAG GCA GGA CAA CC-3'
IL-4	90	forward 5'-AGC TGA TCC GAT TCC TGA AAC-3'
		reverse 5'- TAC TCT GGT TGG CTT CCT TCA C-3'
IL-13	240	forward 5'-GGT CAA CAT CAC CCA GAA CC-3'
		reverse 5'-TTT ACA AAC TGG GCC ACC TC-3'
IL-33	155	forward 5'-ATG AGT CTC AAC ACC CCT CAA-3'
		reverse 5'- CTG GTC TGG CAG TGG TTT TT-3'
CCL18	187	forward 5'-AGC TCT GCT GCC TCG TCT AT-3'
		reverse 5'-CAG GCA TTC AGC TTC AGG TC-3'
CD11c	228	forward 5'- TAC CTC ACC GGA CTC TGC TT-3'
		reverse 5'-GGA GAA CTG CAT CAG GGA AA-3'
CD68	199	forward 5'- TCA GAA TGC ATC CCT TCG AG-3'
		reverse 5'-GAT GAG AGG CAG CAA GAT GG-3'
CD123	200	forward 5'-CCC AAC ATG ACT GCA AAG TG-3'
		reverse 5'-CTT TCC CGG GCT CTT ATT TG-3'
CD163	168	forward 5'-TGA TT CGG ACT TCT CTC TGG-3'
		reverse 5'-ACT GGG CAG AGT GAA AGA TG-3'
ST2	240	forward 5'-ATT TGC ATG GCT TGA GAA GG-3'
		reverse 5'-AGA GAA GCT CCC AGC AAA CA-3'
β -actin	260	forward 5'-GCA AAG ACC TGT ACG CCA AC-3'
		reverse 5'-CTA GAA GCA TTT GCG GTG GA-3'

結 果

<研究 1> IgG4-DS と KT の臨床的・病理学的検討

1-1. 患者内訳

CSS もしくは KT と診断された 54 例を対象とし、唾石の有無で唾石なし群を KT-S (-) 群、唾石あり群を KT-S (+) 群として 2 群に分けた。さらに、「IgG4 関連涙腺・唾液腺炎診断基準」に照らし合わせ、IgG4 陽性細胞率 40% 以上のものを陽性、以下のものを陰性として 4 群に分けた。その内訳を図 1 に示す。

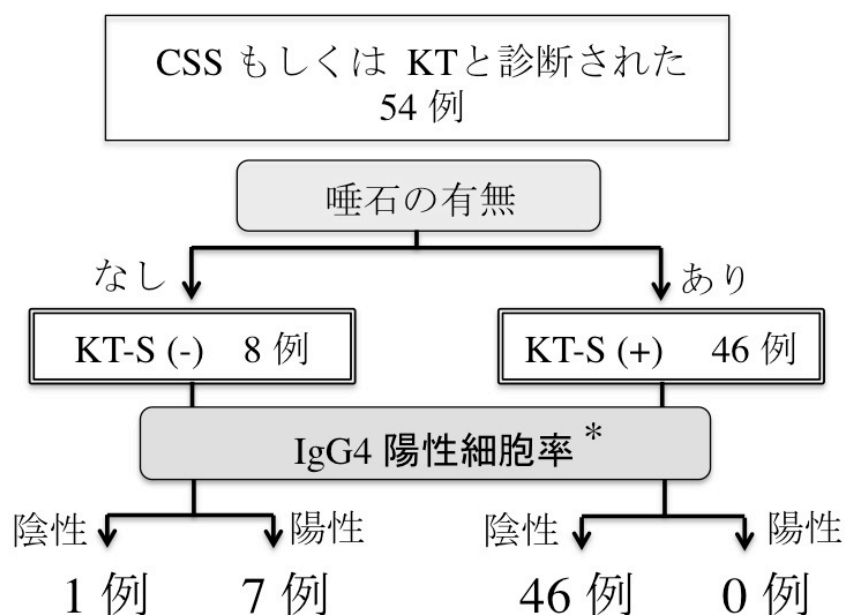


図 1. CSS 患者の分類ツリー

* IgG4 陽性/IgG 陽性形質細胞率 > 40%、CSS: 慢性硬化性顎下腺炎、KT: キュトナー腫瘍、KT-S (+): 唾石を伴ったキュトナー腫瘍、KT-S (-): 唾石を伴わないキュトナー腫瘍

1-2. 臨床的所見

KT-S (-) 群の臨床所見を表 2 に示す。両側涙腺の腫脹を 8 例中 2 例 (25.0%) で認め、両側顎下腺の腫脹を 3 例 (37.5%) で認めた。血清学的所見では、血清 IgG4 は 4 例 (50.0%) で IgG4-DS の診断基準値である 135 mg/dl 以上であり、135 mg/dl 未満が 2 例 (25.0%)、未施行のものが 2 例 (25.0%) であった。また、抗 SS-A 抗体および抗 SS-B 抗体は、全例で陰性であった。その他の IgG4-RD の合併を 1 例 (12.5%) で認め、治療中に再発を 1 例 (12.5%) で認めた。

さらに、KT-S (-) 群と KT-S (+) 群の臨床的特徴に比較検討したものを表 3 に示す。両群間で平均年齢、性別、病悩期間に有意な差は認めなかった。しかし、KT-S (+) 群は全例で片側性の腫脹であり、両側性の腫脹を呈する症例は KT-S (-) 群の 3 例 (37.5%) のみに認めた。血清学的所見 (血清 IgG4 値) については、KT-S (+) 群では検索されておらず、KT-S (-) 群と比較することはできなかった。

表 2. KT-S (-) 患者の臨床的特徴

患者番号	年齢性別	病期	腫脹部位		初診時血清値			病理組織学的所見		その他のIgG4関連疾患	治療方法	再発部位
			涙腺	顎下腺	IgG (mg/dl)	IgG4 (mg/dl)	Anti-SS-A	Anti-SS-B	IgG4陽性形質細胞数 (HPF)			
1	67 M	1ヶ月	-	片側	1244	220	-	133	63.3	-	経過観察	両側涙腺・顎下腺
2	59 F	3年	両側	両側	2236	452	-	85	82.5	AIP, RPF	PSL 内服治療	-
3	64 F	6ヶ月	-	両側	2016	19.5	-	102	72.8	-	PSL 内服治療	-
4	67 F	4ヶ月	両側	両側	1223	232	-	112	76.3	-	経過観察	-
5	56 F	3ヶ月	-	片側	961	24.9	-	137	65.2	-	経過観察	-
6	59 M	5ヶ月	-	片側	ND	ND	-	121	61.7	-	経過観察	-
7	57 F	4ヶ月	-	片側	1188	151	-	52	71.2	-	経過観察	-
8	62 M	4ヶ月	-	片側	1682	ND	-	4	4.9	-	経過観察	-

AIP: 自己免疫性膵炎、RPF: 後腹膜線維症、PSL: プレドニゾロン、-: 陰性、ND: 未実施、HPF: 強拡大視野
 正常値より高値は太字斜字で示す

	KT-S (+) 群 n=46	KT-S (-) 群 n=8	<i>P</i> valu e
平均年齢 (歳)	49.8 ± 20.4	61.3 ± 4.6	<i>P</i> = 0.30 6
性別 (男 : 女)	20 : 26	2 : 6	<i>P</i> = 0.45 0
病変部位 (片側 : 両 側)	46 : 0	5 : 3	<i>P</i> = 0.00 2
病悩期間 (月)	50.7 ± 70.0	7.8 ± 11.5	<i>P</i> = 0.10 0
血清 IgG4 値 (mg/dl)	ND	183.2 ± 162.1	/
IgG4 陽性/IgG 陽性 細胞率 (%)	3.0 ± 2.0	62.5 ± 24.3	[†] <i>P</i> = 0.00 1
IgG4 陽性形質細胞 (/HPF)	1.5 ± 1.3	93.2 ± 95.4	[†] <i>P</i> = 0.00 1
その他の IgG4 関連 疾患	0% (46/46 例)	12.5% (1/8 例)	<i>P</i> = 0.14 8
再発 (%)	0% (46/46 例)	12.5% (1/8 例)	<i>P</i> = 0.14 8

* Student の *t* 検定および[†]Fisher の検定で有意差を認めた。

1-3. 病理組織学的所見

病理組織学的特徴を把握するために、免疫組織学的染色およびMT染色を行った。KT-S (+) 群とKT-S (-) 群 (IgG4 陽性例と陰性例) の代表的症例の組織像を図 2 に示す。KT-S (+) ではeGCを伴う著明なリンパ球の浸潤を認めたが、IgG4 陽性細胞の浸潤はほとんど認めなかった。一方、KT-S (-) 群のIgG4 陽性例ではKT-S (+)と同様にeGCを伴うリンパ球の浸潤を認め、さらにIgG4 陽性細胞の著明な浸潤も認めた。KT-S (-) 群のIgG4 陰性例ではリンパの浸潤を認めたが、eGCの形成およびIgG4 陽性細胞の浸潤を認めなかった。また、MT染色にて膠原線維 (青色) を検索したところ、KT-S (+) 群およびKT-S (-) 群とも重度の線維化を認めたが、2群間に線維化のパターンや局在に明らかな相違を認めなかった。次に、KT-S (+) 群とKT-S (-) 群のIgG4 陽性形質細胞を検索したところ、KT-S (-) 群はKT-S (+) 群と比較してIgG4/IgG 陽性形質細胞率およびIgG4 陽性細胞数が有意に多かった。しかし、KT-S (-) 群の1例だけは、IgG4 陽性細胞浸潤をほとんど認めなかった (図 3)。

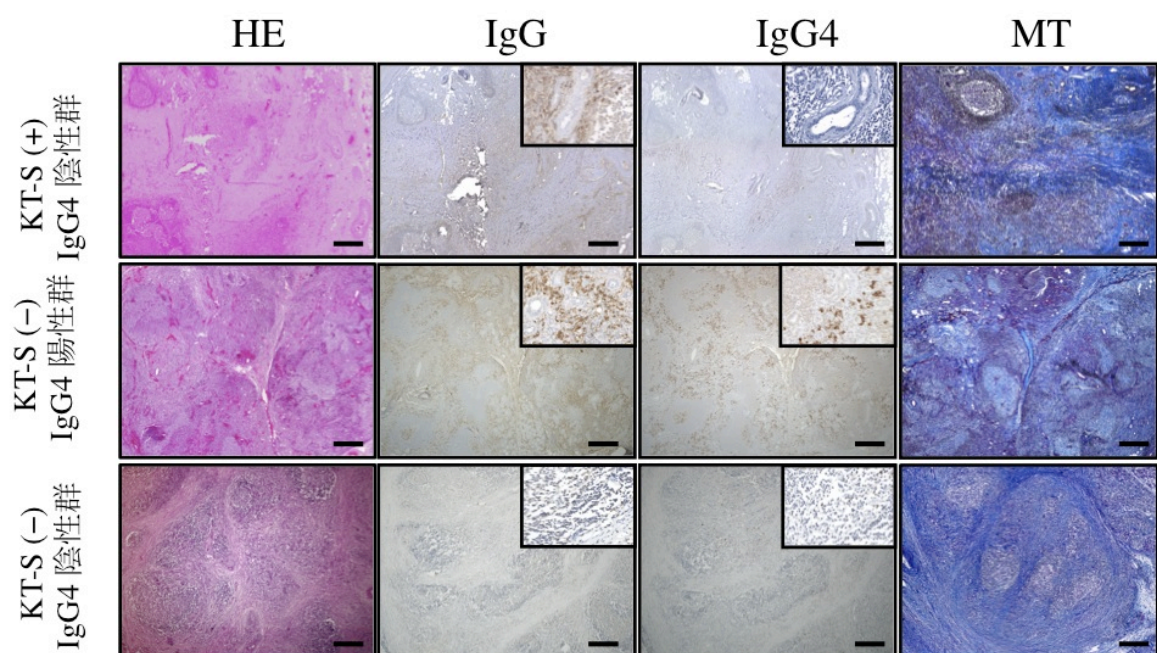


図 2. CSS 患者の顎下腺における病理組織学的所見

HE: ヘマトキシリン・エオジン、MT: マッソントリクローム、scale bars: 400 μ m

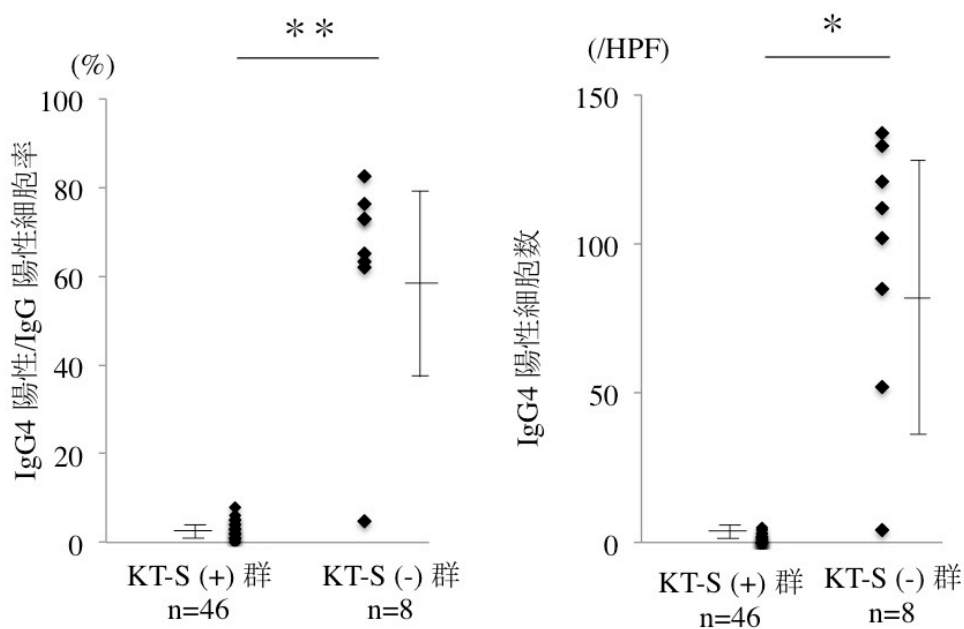


図 3. KT-S (+) および KT-S (-) 患者における IgG4 陽性形質細胞
統計は Mann-Whitney の U 検定を行った (* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$)。

<研究 2> IgG4-DS の線維化における M1/M2 MΦ の関与の検討

2-1. 唾液腺における M1/M2 MΦ の発現と局在

免疫学的検討に用いた IgG4-DS 患者の臨床病理学的所見を表 4 に示す。まず、各症例間で MΦ 細胞抗原の mRNA 発現量を比較した。相対的 mRNA 発現量で見ると、IgG4-DS および SS 患者の SMG では健常者と比較して CD68 (M1+M2 MΦ) および CD163 (M2 MΦ) の mRNA 発現が有意に亢進していた。さらに、IgG4-DS 患者は SS 患者と比較しても CD68 および CD163 の mRNA 発現が有意に亢進していた (図 4A)。

次に、MΦ の局在を明らかにするために、免疫組織化学染色を行った。その結果、CS および SS 患者では CD68 の発現は散在性に認められたが、CD163 の発現はほとんど認めなかった。一方、IgG4-DS 患者では線維化部分に CD68 と CD163 の強い発現を認めた。健常者では CD68 および CD163 の発現はほとんど認めなかった (図 4B)。

免疫組織化学染色の結果をもとに、M2 MΦ の細胞数および陽性率を算出した。その結果、IgG4-DS 患者は他の患者群と比較して M2 MΦ の細胞数および陽性率ともに有意に高かった。また、その他の患者間に有意な差は認めなかった (図 5)。

表 4. IgG4-DS 患者 7 例の臨床病理学的所見

患者番号	年齢性別	病歴期間	合併症	腫腺部位						客観的乾燥症状		唾液量検査		病理組織学的所見		血清学的所見								
				涙腺	耳下腺	顎下腺	舌下腺	口蓋腺	口唇腺	眼	口腔	ガムテスト (ml/10min)	サクションテスト (g/2min)	IgG4/IgG 陽性細胞率 (%)	IgG4 陽性細胞数 (/HPF)	RF (U/ml)	ANA (倍)	IgG (mg/dl)	IgG4 (mg/dl)	IgA (mg/dl)	IgE (U/ml)	IgM Anti-SSA (U/ml)	Anti-SSB (U/ml)	
1	58 F	6ヶ月	-	-	-	+	+	-	-	-	-	12.0	3.62	73	28	4	80	1188	151	193	178	56	-	-
2	68 F	9ヶ月	AIP	-	-	+	+	-	-	-	-	6.0	2.2	52.3	42	5	160	6758	1500	78	13	81	-	-
3	39 M	2年	花粉症	+	-	+	-	-	+	-	-	16.4	4.71	64.2	77	5	-	1534	188	170	1619	99	-	-
4	69 M	3ヶ月	高血圧	+	-	+	+	-	+	-	-	6.0	1.8	61.2	32	ND	±	1662	458	97	60	79	-	-
5	74 M	4ヶ月	AIP	+	-	+	+	-	+	-	-	10.2	3.82	50.0	85	ND	40	4217	524	177	29	60	-	-
6	55 M	3年	AIP、直腸癌	+	-	+	+	-	-	-	-	7.4	3.24	70	18	4	-	2092	510	148	ND	70	-	-
7	69 M	4ヶ月	AIP	-	-	+	+	-	+	-	-	12.0	6.80	63.2	79	ND	ND	1675	494	229	283	44	-	-

IgG4-DS: IgG4 関連涙腺・唾液腺炎・腫腺炎、+：陽性、正常値より高値は太字斜字で示す。

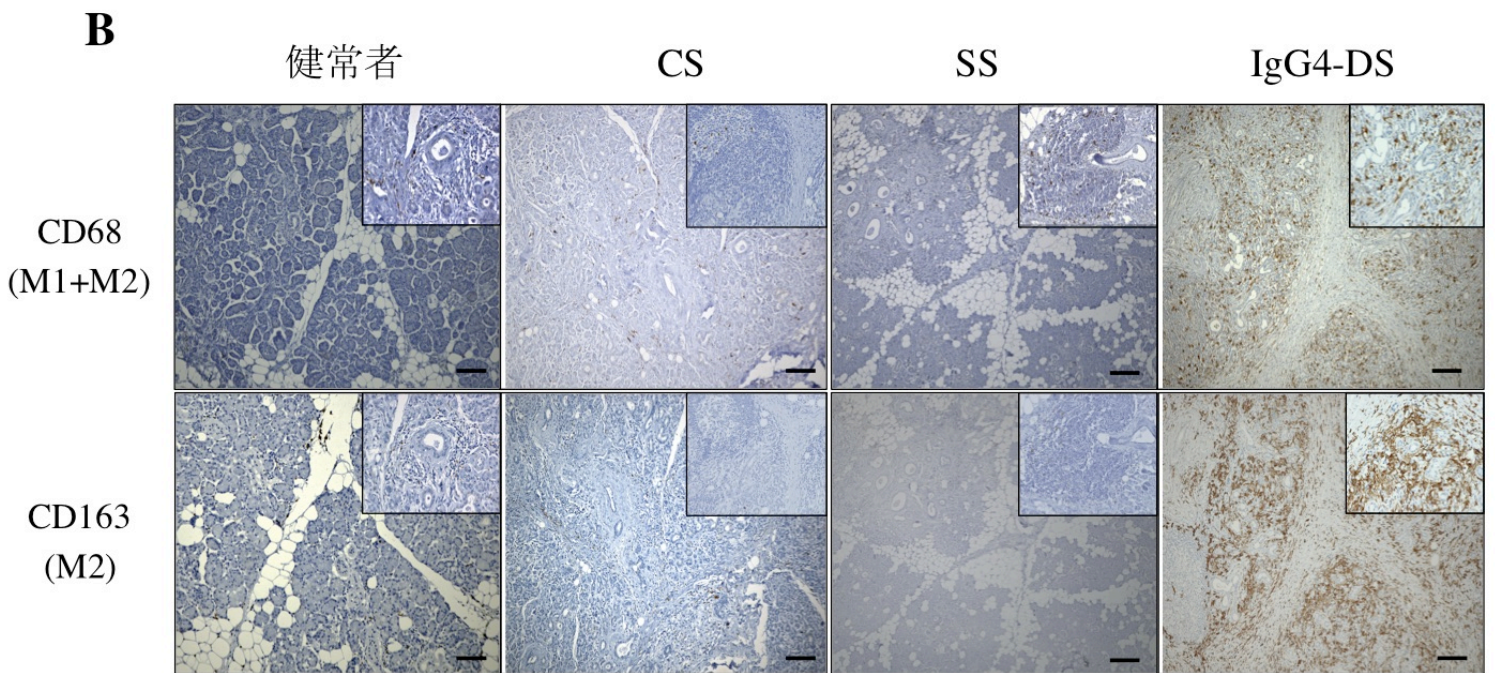
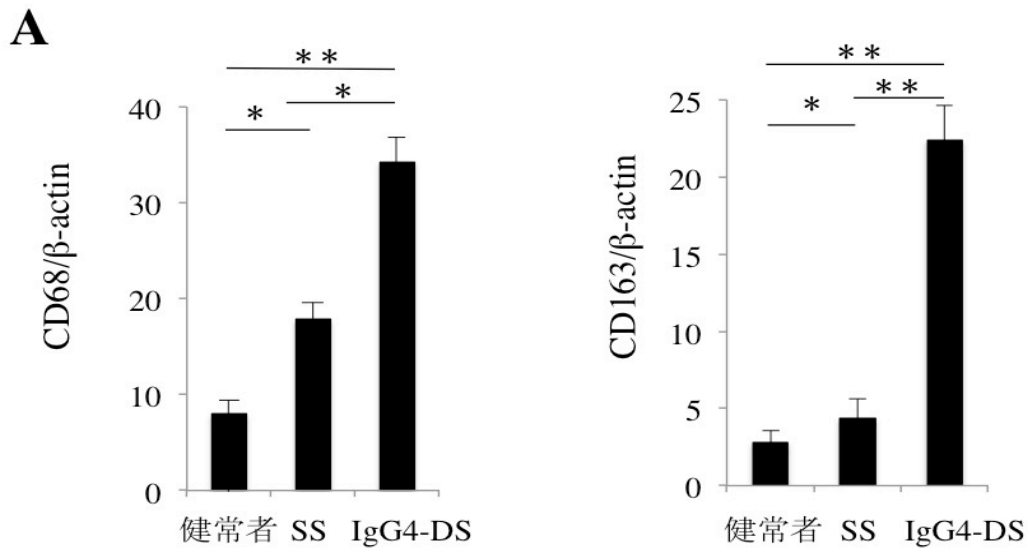


図 4. 唾液腺における M1/M2 MΦ の発現と局在

A. MΦ 細胞抗原の mRNA 発現量、B. M1/M2 MΦ の局在、SS: シェーグレン症候群、scale bars: 100 μm、統計は Mann-Whitney の U 検定を行った (* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$)。

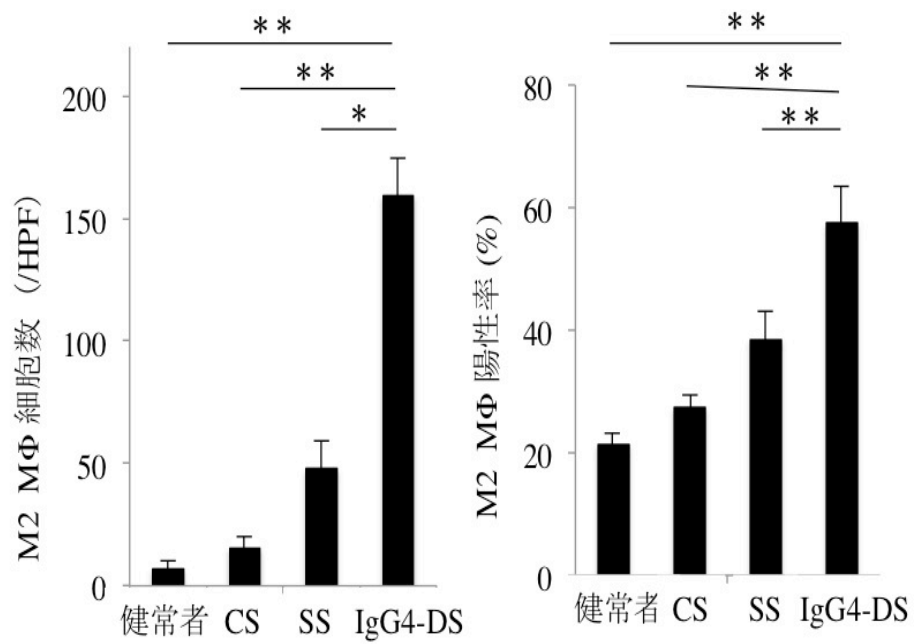


図 5. 唾液腺における M2 MΦ の細胞数および陽性率

浸潤 M2 MΦ 細胞数および陽性率の算出方法は「材料と方法」に示す。統計は Mann-Whitney の U 検定を行った (* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$)。

2-2. 唾液腺における線維化と M2 MΦ との関連

各症例間で線維化因子である CCL18、IL-10、IL-13 の mRNA 発現量を比較した。IgG4-DS および SS 患者では健常者と比較して CCL18 および IL-10 の mRNA 発現が有意に亢進しており、さらに IgG4-DS 患者は他の患者群と比較しても CCL18、IL-10、および IL-13 の mRNA 発現が有意に亢進していた (図 6A)。

次に、線維化因子の局在を明らかにするために、免疫組織化学染色を行った。その結果、CS 患者および健常者では CCL18、IL-10、および IL-13 の発現をほとんど認めなかったが、SS 患者では導管周囲に発現を認めた。一方、IgG4-DS 患者では CCL18、IL-10、IL-13 とともに線維化部分に強い発現を認めた (図 6B)。

線維化と M2 MΦ との関連を明らかにするため、MT 染色を行い、線維化スコアを算出した。MT 染色の結果を図 7A に示す。SMG における線維化 (赤矢印) は、健常者では腺房周囲に散在性に認め、CS および SS 患者では導管周囲に認めた。一方、IgG4-DS 患者では導管周囲よりもむしろ、eGC を取り囲むように索状に線維化を認めた。また、線維化スコアを各症例間で比較すると、IgG4-DS 患者は他の患者群と比較して有意に高く (図 7B)、IgG4-DS 患者のみ M2 MΦ 陽性率と線維化スコアに正の相関を認めた (図 7C)。

最後に、IgG4-DS 患者の SMG における M2 MΦ と線維化因子の局在を明らかにするために、蛍光二重免疫染色を行った。線維化の周囲では、CCL18 および IL-10 は CD163 とほぼ局在が一致していたが、IL-13 は CD163 の一部のみ局在が一致していた (図 8)。

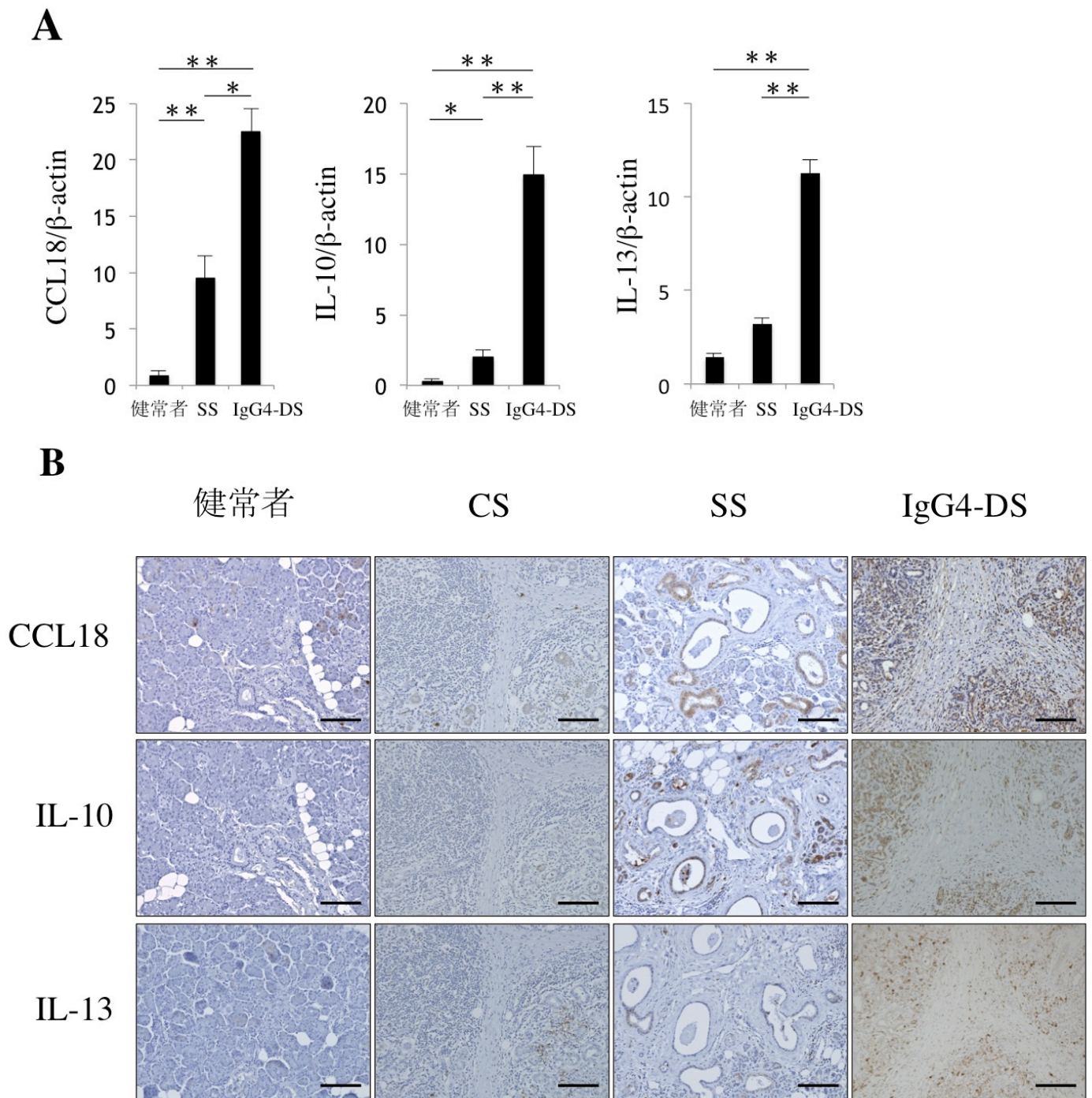


図 6. 唾液腺における線維化因子の発現と局在

A. 唾液腺における線維化因子の mRNA 発現、B. 唾液腺における線維化因子の局在、scale bars: 200 μ m、統計は Mann-Whitney の U 検定を行った (* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$)。

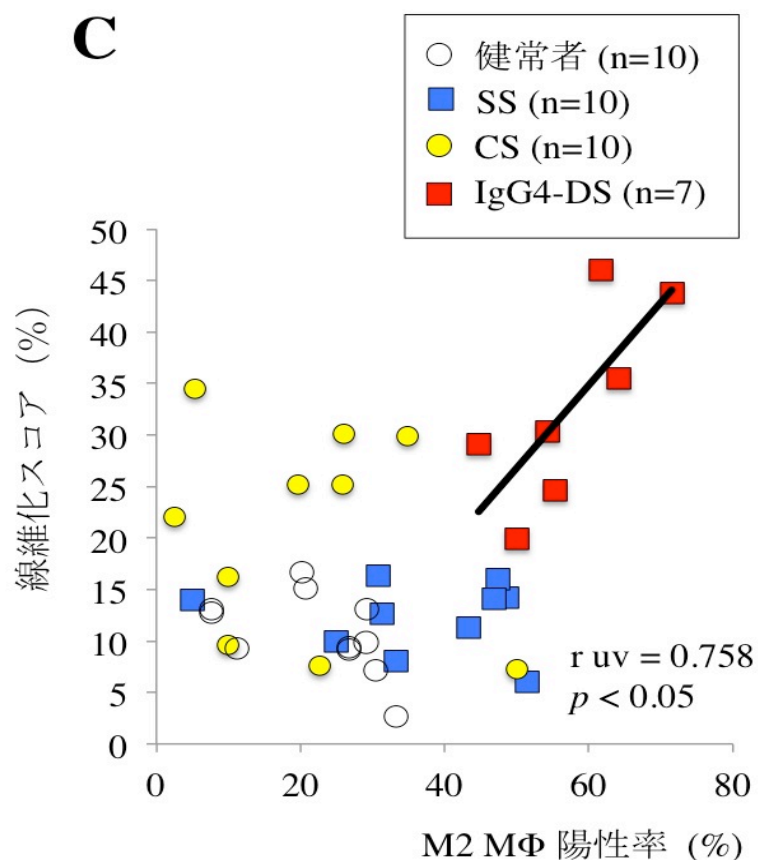
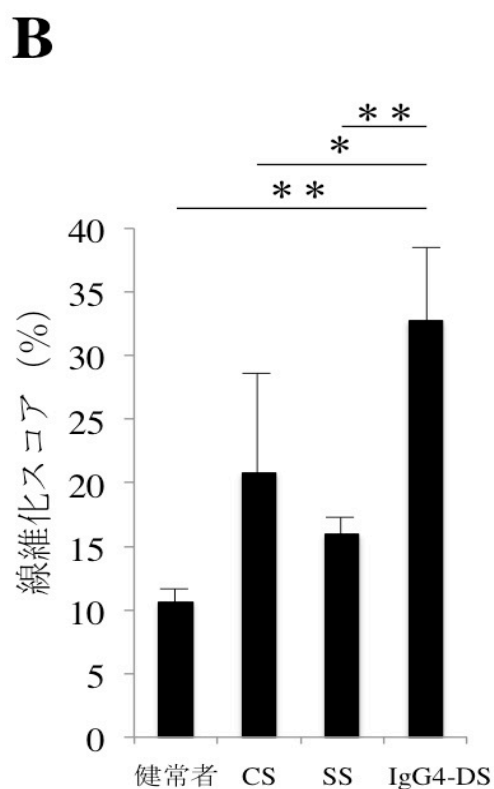
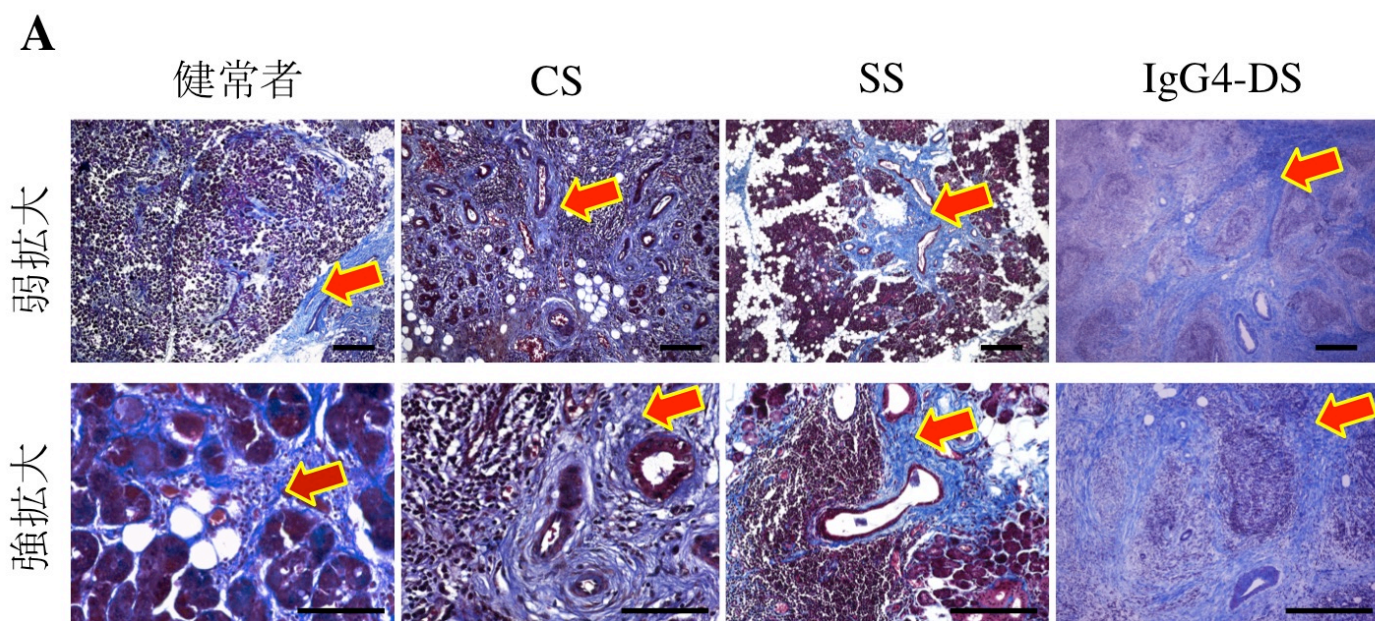


図 7. 唾液腺における線維化と M2 MΦ 陽性率との相関

A. 唾液腺における MT 染色、B. 唾液腺における線維化スコア、C. 唾液腺における線維化スコアと M2 MΦ の相関、scale bars: 200 μ m、染色された線維化部分を赤矢印で示す。MT 染色方法や線維化スコアの算出方法は「材料と方法」に示す。統計は One-way ANOVA 検定および Spearman の順位相関係数検定を行った (* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$)。

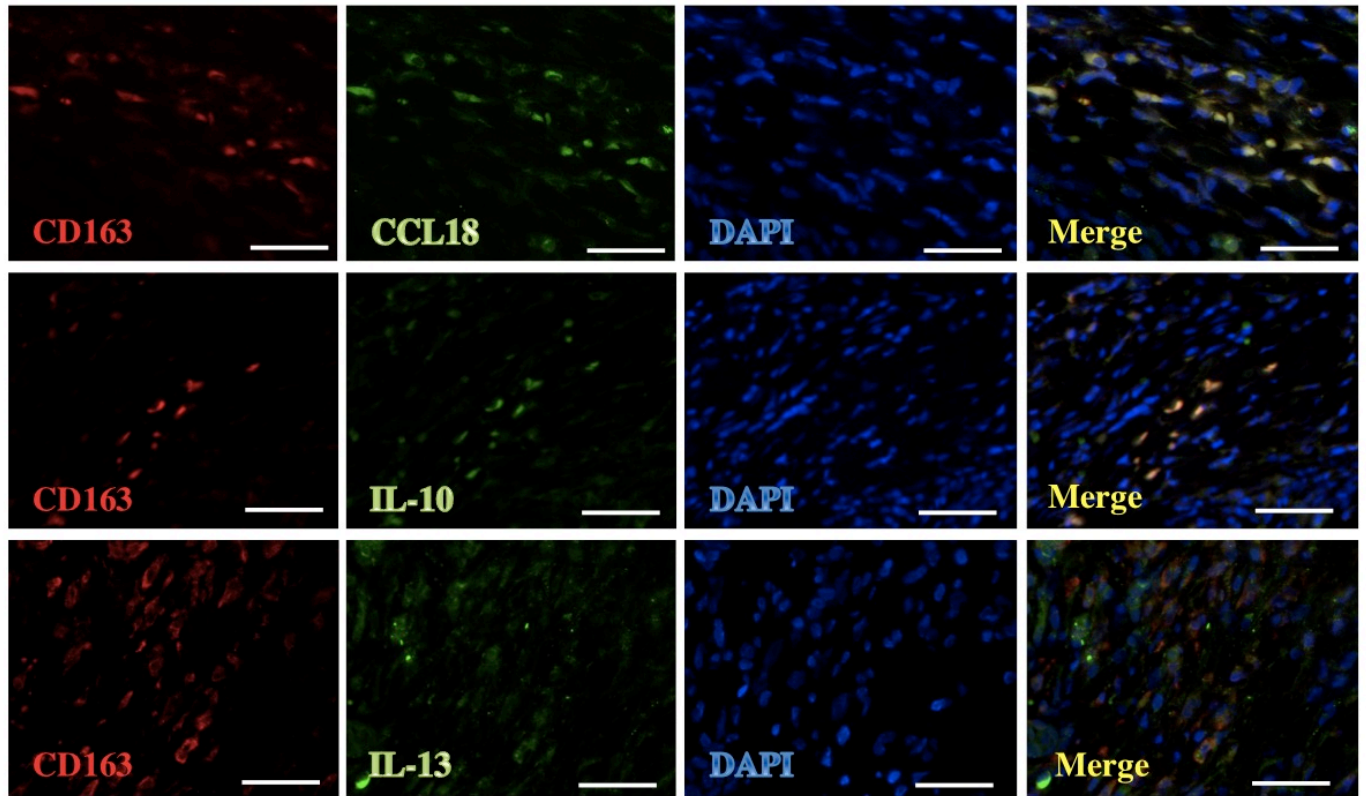


図 8. IgG4-DS の顎下腺における M2 MΦ と線維化因子の局在
 蛍光二重染色法は「材料と方法」に示す。scale bars: 50 μm

2-3. 唾液腺以外の IgG4-RD 罹患臓器における M1/M2 MΦ の発現

IgG4-DS の唾液腺における M2 MΦ の局在が IgG4-RD の罹患臓器に共通なものなのかを検討するため、今回対象とした IgG4-DS 患者の中で唾液腺以外の臓器に IgG4-RD を合併した症例を対象とし、他臓器（涙腺、膵臓、前立腺、および胸膜）における M1/M2 MΦ の発現について検索を行った。その結果、全ての臓器において、IgG4-DS と同様に CD68 および CD163 の浸潤を強く認めた（図 9）。

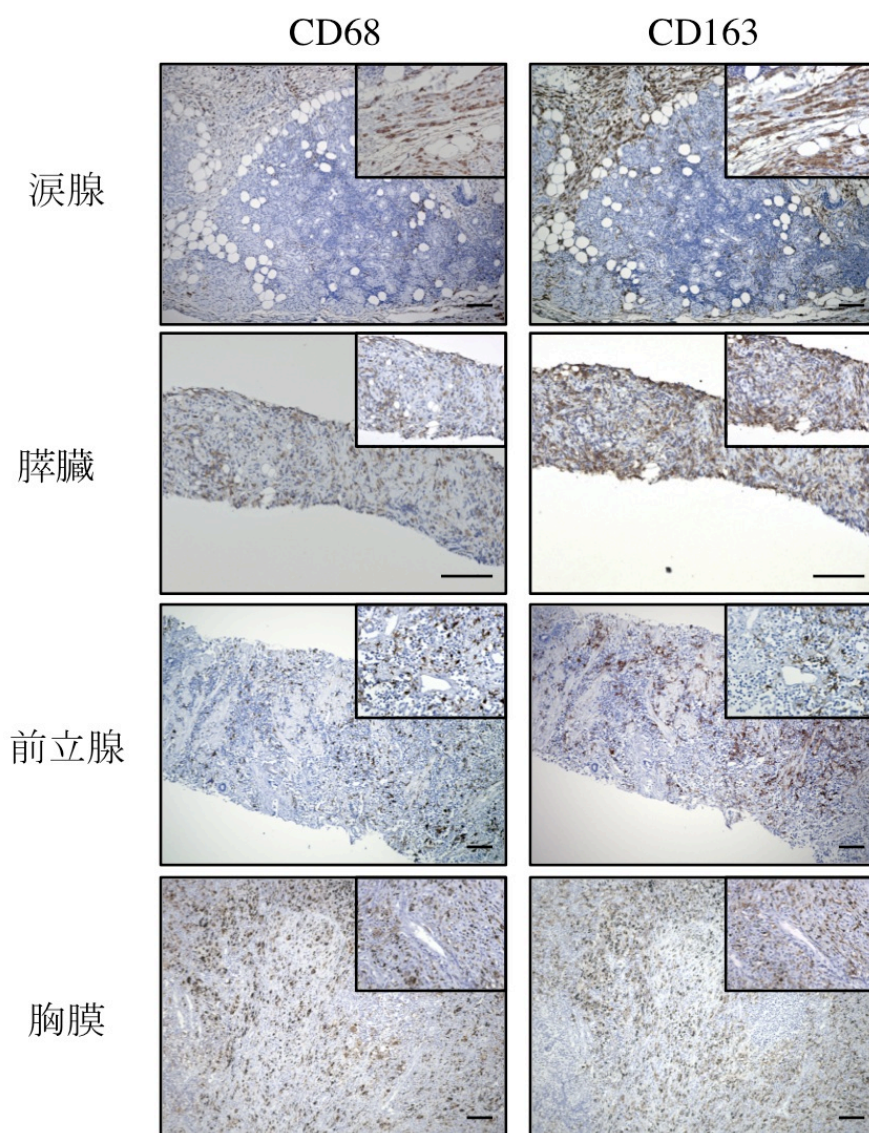


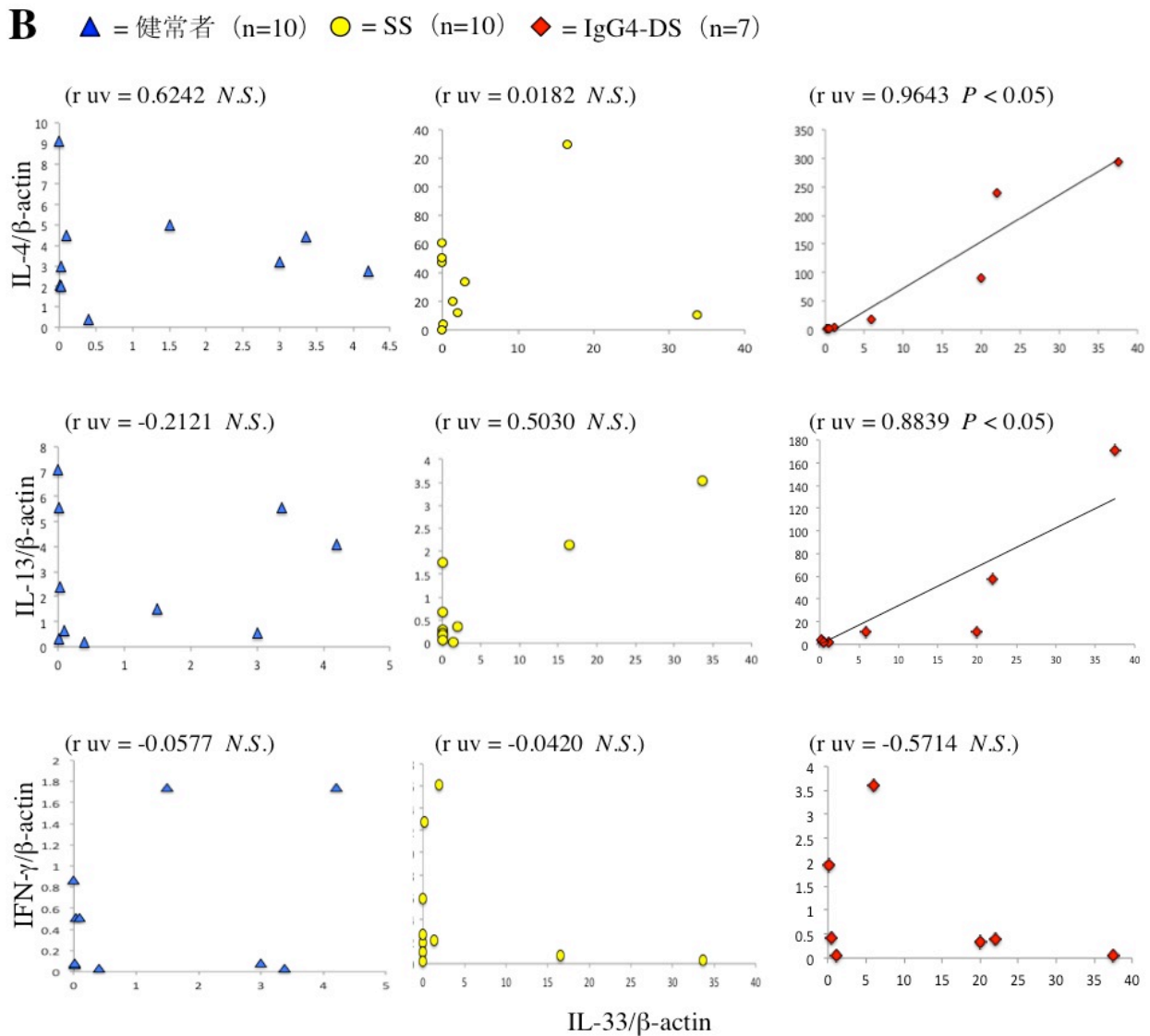
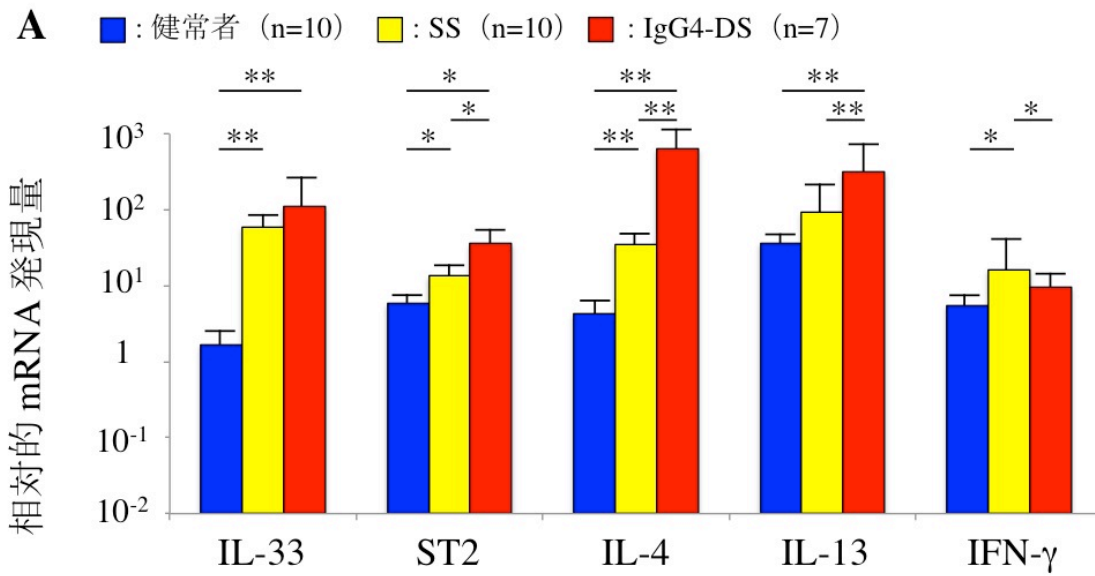
図 9. 唾液腺以外の IgG4 関連疾患罹患臓器における M1/M2 MΦ の局在
scale bars: 100 μm

<研究 3> IgG4-DS における病態形成における IL-33 の関与の検討

3-1. IL-33 の発現と局在

対象とした IgG4-DS 患者は研究 2 と同様である (表 4)。まず、各症例間で IL-33、ST2 (IL-33 受容体)、Th2 サイトカイン (IL-4、IL-13)、および Th1 サイトカイン (IFN- γ) の mRNA 発現量を比較した。相対的 mRNA 発現量で見ると、IgG4-DS および SS 患者では健常者と比較して IL-33、ST2、および IL-4 の発現が有意に亢進しており、さらに IgG4-DS 患者は他の患者群と比較しても ST2、IL-4、および IL-13 の発現が有意に高かった。一方、IFN- γ は SS 患者が他の患者群と比較して発現が有意に亢進していた (図 10A)。IL-33 と Th サイトカインの mRNA 発現量の関連について検討したところ、SS 患者および健常者ではいずれの Th サイトカインも IL-33 との間に有意な相関は認められなかった。一方、IgG4-DS 患者では IL-33 と IFN- γ との間に有意な相関は認められなかったが、IL-33 と IL-4 および IL-13 との間に正の相関を認めた (図 10B)。

次に、唾液腺における IL-33 と ST2 および関連サイトカインの局在を明らかにするために免疫組織化学染色を行った。その結果、IL-33 は全ての患者群で唾液腺導管上皮細胞に発現を認めた。さらに、SS 患者では導管周囲にも一部発現を認めたが、IgG4-DS 患者では eGC 周囲に強い発現を認めた。ST2、IL-4、および IL-13 は健常者ではほとんど発現を認めなかったが、SS 患者では導管周囲に、IgG4-DS 患者では eGC の内部および周囲に強い発現を認めた。一方、IFN- γ は IgG4-DS 患者および健常者ではほとんど発現を認めなかったが、SS 患者では導管周囲に発現を認めた (図 10C)。



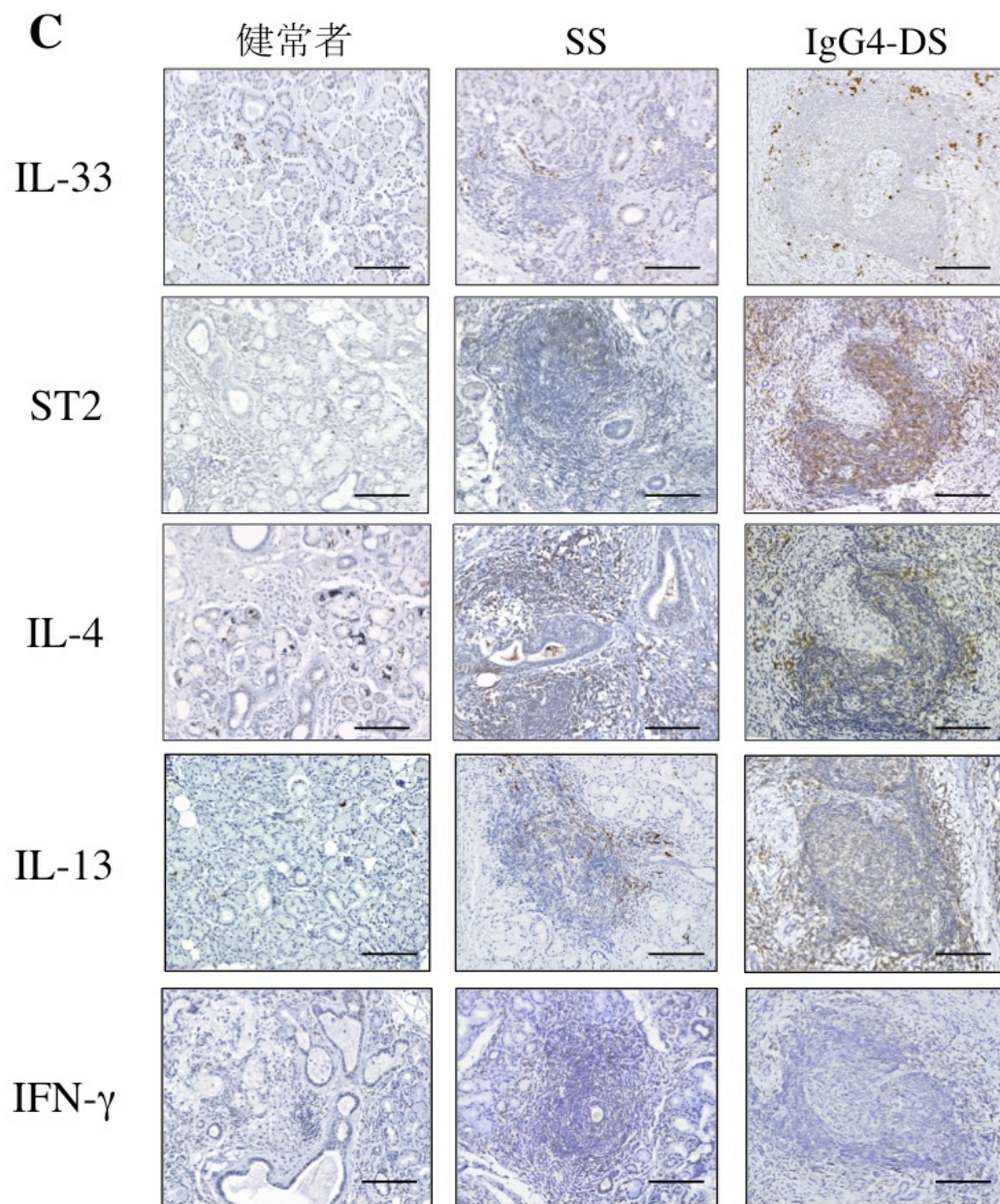


図 10. 唾液腺における IL-33 とサイトカインの発現と局在

A. IL-33 と関連因子の mRNA 発現、B. IL-33 と Th サイトカインとの相関、C. IL-33 と関連分子の発現と局在、scale bars: 100 μ m、統計は Mann-Whitney の U 検定および Spearman の順位相関係数を行った (* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$)。

3-2. 自然免疫担当細胞の発現と局在

前述のとおり、IL-33 産生細胞は上皮細胞だけではなく MΦ や DC などの自然免疫担当細胞も挙げられる。DC も MΦ と同様に大きく分けて 2 種類のサブセットがある。1 つは骨髄系樹状細胞 (myeloid dendritic cell: mDC) と呼ばれるもので、抗原提示細胞としてリポ多糖 (lipopolysaccharide: LPS) などの感染細菌由来成分を認識し、IL-12 や IFN- γ を産生することで単球や T 細胞の活性化に関与するとされ、免疫学的には CD11c^{high} CD123^{low} として同定される。もう 1 つは形質細胞様樹状細胞 (plasmacytoid dendritic cells: pDC) とよばれるもので、樹状突起を伸ばして主要組織的相遺伝子複合体 (major histocompatibility comp: MHC) - II 型分子を発現し、Th2 細胞を刺激する特徴があり、免疫学的には CD11c^{neg} CD123^{high} として同定される。そこで、本研究では mDC の同定に CD11c を、pDC の同定に CD123 を用いた。各症例間で自然免疫担当細胞である MΦ (CD68、CD163) および DC (CD11c、CD123) の mRNA 発現量を比較した。IgG4-DS および SS 患者では健常者と比較して CD68、CD163 の mRNA 発現量が有意に亢進しており、さらに IgG4-DS 患者では他の患者群と比較しても CD68、CD163、CD11c、および CD123 の発現が有意に亢進していた (図 11A)。

次に、唾液腺における自然免疫担当細胞の局在を明らかにするために、免疫組織化学染色を行った。その結果、SS 患者では導管周囲に CD68 および CD11c の発現を散在性に認めたが、CD163 および CD123 の発現はほとんど認めなかった。一方、IgG4-DS 患者では eGC の内部および周囲に CD68、CD163、および CD11c の発現を認め、eGC の内部のみに CD123 の発現を散在性に認めた。健常者ではいずれの発現もほとんど認めなかった (図 11B)。

最後に、IgG4-DS 患者における IL-33 産生細胞を明らかにするために、蛍光二重免疫染色を行った。その結果、IL-33 は CD11c および CD123 とは局在がほとんど一致しなかったが、CD68 および CD163 とは局在がほぼ一致していた (図 12)。

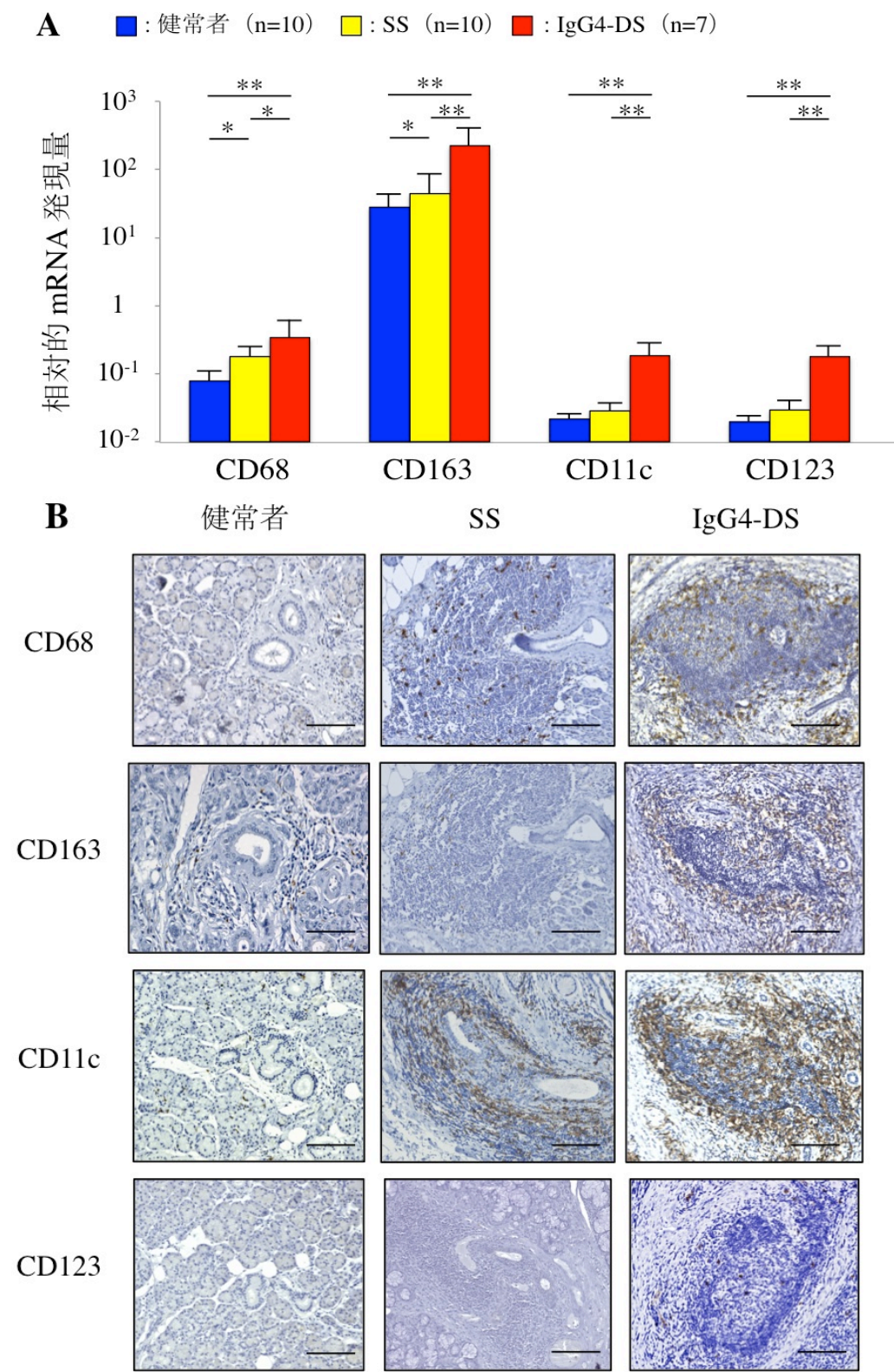


図 11. 唾液腺における自然免疫担当細胞の発現と局在
 A.自然免疫担当細胞の mRNA 発現、B.自然免疫担当細胞の局在、scale bars: 100 μm、
 統計は Mann-Whitney の U 検定を行った (* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$)。

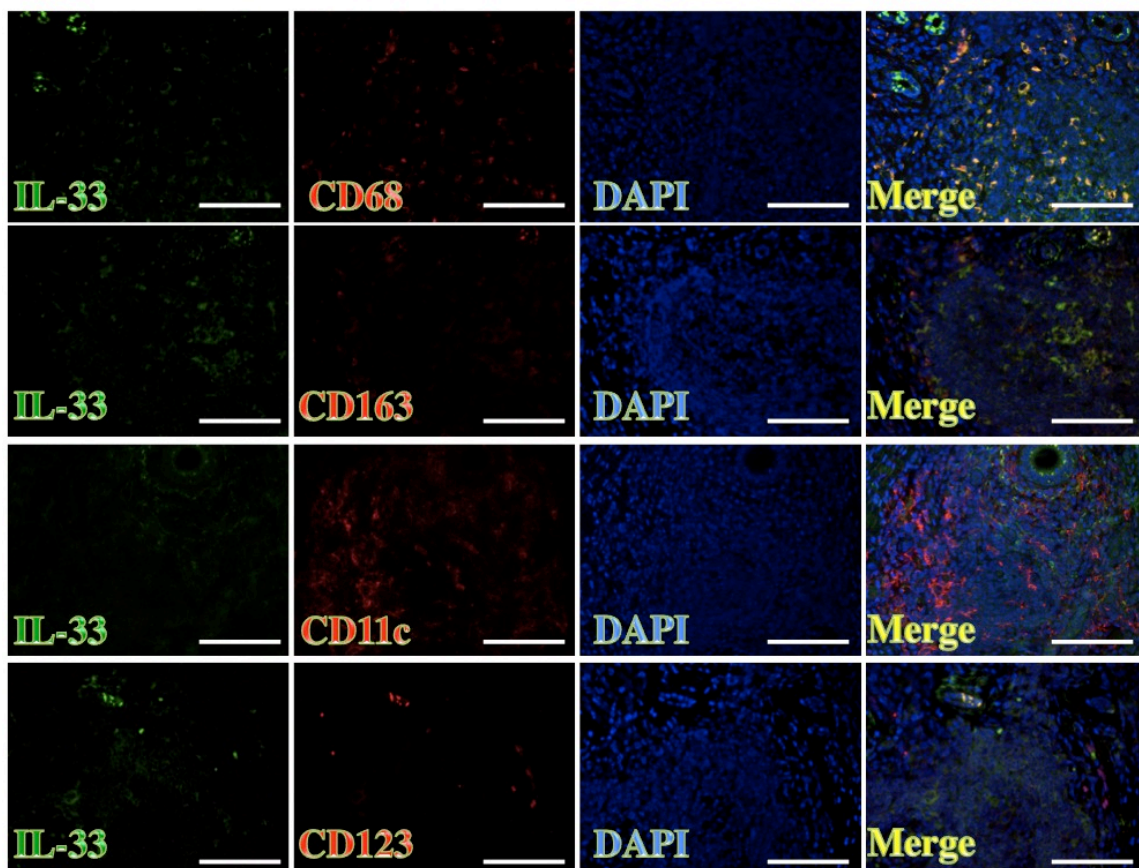


図 12. IgG4-DS の顎下腺における IL-33 と自然免疫担当細胞の局在
 蛍光二重染色法は「材料と方法」に示す。scale bars: 50 μ m

考 察

KT は慢性硬化性顎下腺炎とも呼ばれ、1986 年に Küttner [10] が両側顎下腺の持続的腫脹を認めた症例について病理組織的に検索し、リンパ球の著明な浸潤と線維化を認めたことから名付けられた慢性炎症性疾患である。その後、Seifert ら [11] は KT と診断された 349 例について後ろ向きに検索を行い、143 例 (41%) が唾石を伴った症例であったことから、KT は炎症性偽腫瘍であると結論づけた。しかし、彼らは同時に唾石などの明らかな原因がない症例 63 例 (18%) では多数の GC 形成を伴うリンパ球の浸潤と線維化を認め、また男性患者の比率が高かったことも報告しており、免疫学的異常が病態形成に関与している可能性を示唆していた。

本邦では、今野ら [33] が MD と KT が同一の病因を有する可能性を報告しており、さらに近年、北川ら [12] は CSS もしくは KT と診断された症例で IgG4 陽性形質細胞の著明な浸潤を認めたとしている。そこで本研究 1 では、当院で病理組織学的に KT もしくは CSS と診断された症例について後ろ向き研究を行った。その結果、唾石を伴う症例（いわゆる唾石症）では IgG4 陽性形質細胞の浸潤はほとんど認められない一方で、唾石を伴わない症例ではほとんどの症例で IgG4 陽性形質細胞の浸潤を多く認めた。このことから、唾石の有無により容易に唾石症と IgG4-DS との鑑別が可能であると考えられるが、唾石を伴わない症例で 1 例のみ IgG4 陽性細胞の浸潤をほとんど認めず、その後も局所の再発やその他の IgG4-RD の合併を認めなかった。そのため、図 13 に示すように KT

は IgG4-DS の部分症であると捉えることができる。

特に、唾石などの明らかな原因のない顎下腺腫脹を認める症例では、血清 IgG4 値や組織中の IgG4 陽性形質細胞の浸潤の有無を確認することが診断の一助になると考えられる。また、病理組織検査だけではなく画像検査も IgG4-DS の診断に有用である。特に唾液腺超音波検査では IgG4-DS の唾液腺内部では特徴的な敷石状の低エコー領域を呈することを報告しており、SS や唾石症との鑑別診断に非常に有用な侵襲の低い検査方法であることを見いだした [34]。また、その他の画像検査（CT、MRI、FDG-PET 検査など）も唾液腺以外の全身の病変分布の評価に重要である。IgG4-DS 患者の長期経過観察中に悪性リンパ腫に進展した症例が報告されていることから [35]、IgG4-RD の全容が解明されていない現時点ではこれらの検査を含む慎重な臨床的経過観察が必要であると考えられる。

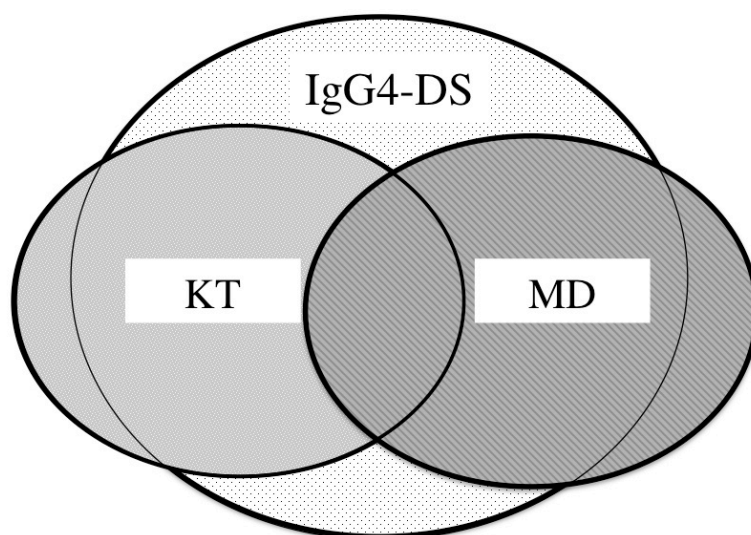


図 13. IgG4-DS、MD、および KT の臨床的位置づけ

MD: ミクリッツ病

IgG4-RD は本邦から発信された新規疾患概念であり、現在では世界的にも注目されている。近年では世界中で IgG4-RD の臨床研究がなされているが、発症や病態進展のメカニズムなどの基礎研究については、IgG4-RD の罹患部位が深部臓器である場合、組織採取（生検）が非常に困難であることから、病変組織を用いた免疫学的な検討はほとんどなされていない。また、IgG4-RD における IgG4 の臨床的意義については、直接的に発症や病態進展を惹起するものなのか、二次的に誘導されたものかはいまだ結論が出されていない。そもそも IgG4 は IgG サブクラスの分画で、正常人の血中では IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 の形で存在しており、それぞれの分画は 65%、23%、8%、4%の割合で、IgG4 の分画は最も少ない。IgG は各種抗原に対する抗体を含み、補体結合性、胎盤透過性、白血球遊走促進、リウマチ因子反応性、食細胞の貪食能などが異なっている。最も分画の多い IgG1 はほとんどのタンパク質やペプチド抗原に対して最も優位な免疫となる抗体であるのに対し、IgG4 は抗原に対する親和性が低く、補体の C1q 部に結合できないといった特徴を持っており、補体および細胞活性化の誘導能は低いとされている [36]。また、IgG4 は補体を結合せず、構成している 2 つの重鎖間のジスルフィド結合が弱いため、IgG4 抗体の半分は容易に解離し別の IgG4 抗体と結合し [37]、1 つの分子で 2 つの異なる抗原を認識する「二重特異性分子」を形成する。この二重特異性分子は抗原架橋能や免疫複合体形成能を欠くことにより、抗炎症作用を有すると考えられている [38]。また、Fc 受容体を介した組織破壊力が IgG1 より低く、白血球を介した組織破壊に関与しているという。そのため、IgG4-RD で上昇する IgG4 の意義は病原因子であるのか、病態の結果を反映しているのか、未だ解明されていない（図 14）。

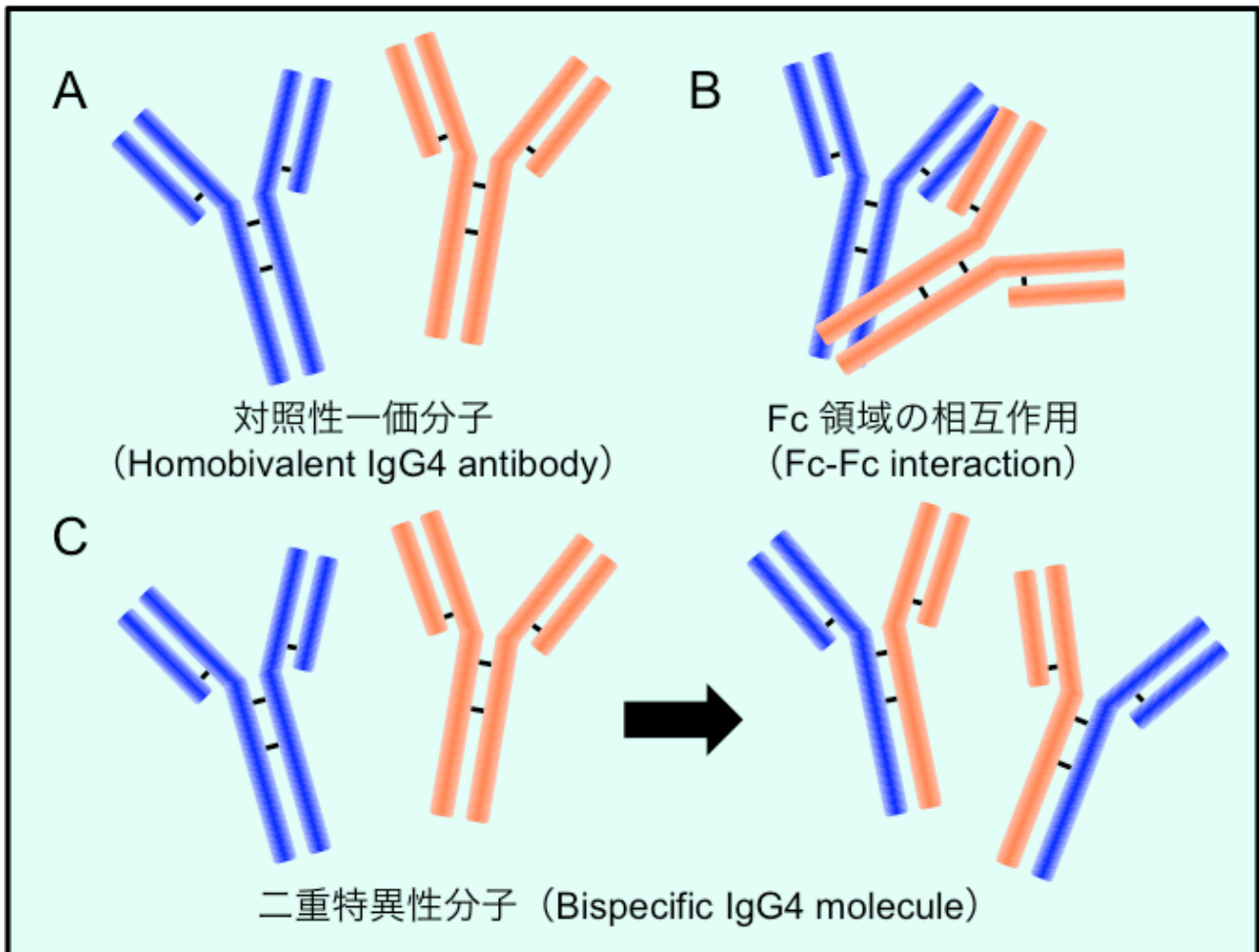


図 14. IgG4 抗体の特異構造 (Moriyama M, et al [39] より改変引用)

IgG4 の産生は Th2 サイトカインである IL-4 が B 細胞に作用して誘導されることから、われわれは特定の Th サブセットの活性化により二次的に IgG4 が誘導された可能性が高いと以前より考えていた。そこで、IgG4-DS 患者の末梢血単核球を用いてステロイド治療前後の Th1/Th2 バランスの検討を行ったが、治療前は Th2 優位でありステロイド治療後は Th1 にシフトしたことから、IgG4-DS が Th2 疾患であることが示唆された [40]。さらに、IgG4-DS 患者の唾液腺においてサイトカインプロファイルを行った結果、Th2 細胞や Treg 細胞が産生する IL-4、IL-5、IL-10 の発現が SS 患者と比較して有意に亢進しており、Th2 だけでなく制御性の免疫応答も病態形成に関与していることが明らかになった [22]。

しかし、Th2 細胞が産生する IL-4 は IgG4 以外にも I 型アレルギーを引き起こす IgE の産生も誘導するが、高 IgE 血症を呈する IgG4-RD 患者は半数以下であり、Th2 細胞または IL-4 のみで IgG4 の特異的誘導は説明できない。興味深いことに、最近の研究によりアレルギー患者に対する特異的免疫療法を行うと、抗原特異的な IgG4 のみが増加することが明らかになった。この作用機序として、免疫抑制能を有する IL-10 が、IL-4 による IgE 産生を抑制し、かわりに IgG4 産生を促進するという、いわゆるクラススイッチを引き起こすことが報告されている [41, 42]。この選択的な IgG4 の誘導は「modified Th2 reaction」と呼ばれており、われわれは IgG4-RD における IgG4 産生もこの反応によるものであることを見いだした [22]。このように、IgG4 産生と獲得免疫との関連が明らかになるにつれ、発症と獲得免疫を活性化させる自然免疫との関連についても注目を集めてきている。

Watanabe らは IgG4-RD の病態形成における自然免疫担当細胞の関与を調べるために、IgG4-RD 患者由来の末梢血中の抗原提示細胞の機能を検索している。IgG4-RD 患者の末梢血由来の単球/MΦ が多量の B cell activating factor belonging to the TNF family (BAFF) という B 細胞活性化サイトカインを産生し、ナイーブ B 細胞を効率よく IgG4 産生形質細胞に分化させることが分かっており [23, 43]、IgG4-RD 患者では治療前の血清中 BAFF 濃度が健常者より高値であり、治療後に BAFF 濃度が低下することが報告されている [44, 45]。

このように MΦ が IgG4-RD の発症に重要な役割を担っていると考えられるが、MΦ はその機能や反応性により少なくとも 2 つのサブセットに分類される。ひとつは IFN- γ 、TNF- α 、および LPS などの Th1 サイトカイン刺激を受け Th1

免疫反応の促進や酸化ストレスを介した病原体の排除に関与する「古典的活性化 (M1) MΦ」と、もう1つは IL-4 や IL-13 などの Th2 サイトカイン刺激を受け Th2 免疫反応の促進や組織修復に寄与する「選択活性化 (M2) MΦ」がある [24, 46]。過去の報告では、IgG4-RD の1つである AIP において脾臓に MΦ の強い浸潤を認めたという報告があるが [47]、MΦ の局在についてのみ検討しており、MΦ の機能やサブセットについての検索はなされていない。M2 MΦ は Th2 サイトカインにより活性化され、IL-10 などの抗炎症性サイトカインや IL-13、CCL18、TGF-β などの線維化促進因子を産生し、抗炎症反応を惹起するとともに組織修復や組織の線維化に関与することが分かっている [48]。IgG4-RD は病理組織学的に IgG4 陽性形質細胞の浸潤だけでなく、著明なリンパ球の浸潤と重度の線維化を特徴とする疾患で、臨床的にも全身性に弾性硬の腫脹もしくは腫瘤を形成する疾患である。特に、AIP は花筵状もしくは渦巻き状と呼ばれる特徴的な線維化が認められ、それぞれ「storiform fibrosis」または「bird's eye fibrosis」と名付けられている。IgG4-DS においても強い線維化を認めるが [49]、IgG4-RD のいずれの臓器においても線維化のメカニズムについては詳細な検討はなされていない。そこで本研究 2 では、MΦ、特に M2 MΦ と IgG4-RD の線維化について検討を行った。その結果、IgG4-DS の SMG および IgG4-RD に罹患した他臓器でも MΦ の著明な浸潤を認め、さらに M2 MΦ が優位であった。また、M2 MΦ と線維化因子である CCL18 および IL-10 との局在がほぼ一致していた。このことから、IgG4-RD の特徴的な線維化には M2 MΦ が関与していることが示唆された。

本研究で着目した CCL18 は主に MΦ や DC から産生されるケモカインで、T 細胞への強い遊走能を持ち、特発性肺線維症 [50] や気管支喘息 [51]、アトピー

性皮膚炎 [52] といった慢性炎症性疾患の病態形成に関与することが明らかになっている。特に、M2 MΦ は CCL18 を産生することで、線維芽細胞のコラーゲン産生を促進している [48]。IL-13 は Th2 サイトカインで、IL-4 と同様に Th2 疾患の病態形成に関与するサイトカインである。IL-4 と異なり、T 細胞上には IL-13 受容体の発現がないため、Th2 細胞の分化誘導は IL-13 ではなく IL-4 によってなされている。喘息において IL-13 受容体を有する気道上皮細胞が線維芽細胞における eotaxin の産生を促し、気道粘膜下の線維化を起こさせることが分かっている。また、喘息患者の肺胞 MΦ は IL-13 を高発現しており、これが肺の線維化を誘導していると報告されていることから、IgG4-RD の線維化においても同様の機序が考えられる。また、TGF-β もまた線維化因子で全身性硬化症、肺線維症、肝硬変といった硬化性病変との関連が報告されているが、IgG4-DS 患者の TGF-β の mRNA 発現量および局在は SS 患者と有意な相違は認めなかった（結果は示していない）。

このように、Th2 環境下で活性化した M2 MΦ が IgG4-RD の線維化に重要であることが研究 2 で示唆されたが、IgG4-RD の病態形成の本質である Th2 細胞が活性化される機序については未だ不明である。今回注目した IL-33 は、IL-1 ファミリーのサイトカインであり、Th2 細胞上に発現している ST2 (IL-33 受容体) を介して Th2 細胞を直接活性化させるサイトカインとして、アレルギー性鼻炎や気管支喘息といった Th2 疾患の病態形成に関与していると考えられている [53]。さらに、近年のゲノムワイド関連解析によって IL-33 および ST2 遺伝子の一塩基多型がアトピー性皮膚炎の病勢と相関していることが明らかになっている [54, 55]。IL-33 産生細胞とされているものは、非免疫細胞の上皮細胞お

よび線維芽細胞がよく知られているが、最近では免疫細胞の MΦ、DC、およびマスト細胞も IL-33 産生細胞として報告されている [27]。そこで本研究 3 では、IL-33 と IgG4-DS の関連を検索し、IgG4-DS 患者の SMG では IL-33 の発現亢進と Th2 サイトカインとの相関を認め、さらに、二重蛍光免疫染色により M2 MΦ と IL-33 の局在がほぼ一致していた。このことより、M2 MΦ が産生する IL-33 が Th2 細胞を活性化し、Th2 サイトカインが産生されることで、IgG4-DS の病態形成に寄与していることが示唆された。研究 2 および 3 から得られた結果から示唆される IgG4-DS の病態モデルを図 15 に示すが、IgG4-RD の病態形成には自然免疫担当細胞が関与しており、IgG4-RD は自己免疫疾患というよりも、むしろアレルギー疾患または感染症の一種ではないかと考えられる。

IgG4-RD の治療には一般にステロイドが用いられ著効する症例が多いが、再燃することも稀ではない。Yamamoto らはステロイド治療を行った IgG4-DS 患者 41 例の長期経過を診ているが、一旦は症状が消失しても 11 例 (26.8%) で再発を認めたことを報告している [56]。さらに、ステロイドの長期投与の副作用として、糖尿病や骨粗鬆症などがあり、ステロイドの適応基準についても今後検討が必要とされる。一方で、ステロイドに代わる治療法の開発として、免疫抑制剤やリツキシマブ (抗ヒト CD20 ヒト・マウスキメラ抗体) による治験が行われているが、適応は難治症例や再発症例に限られており、その作用機序については不明である。以上のことから、IgG4-RD の治療法の開発には免疫学的アプローチによる病因解明が不可欠であり、今後のさらなる研究により疾患特異的な分子が同定されれば、ステロイドに代わる非常に有効な抗サイトカイン療法といった標的分子治療が確立に繋がることが期待される。

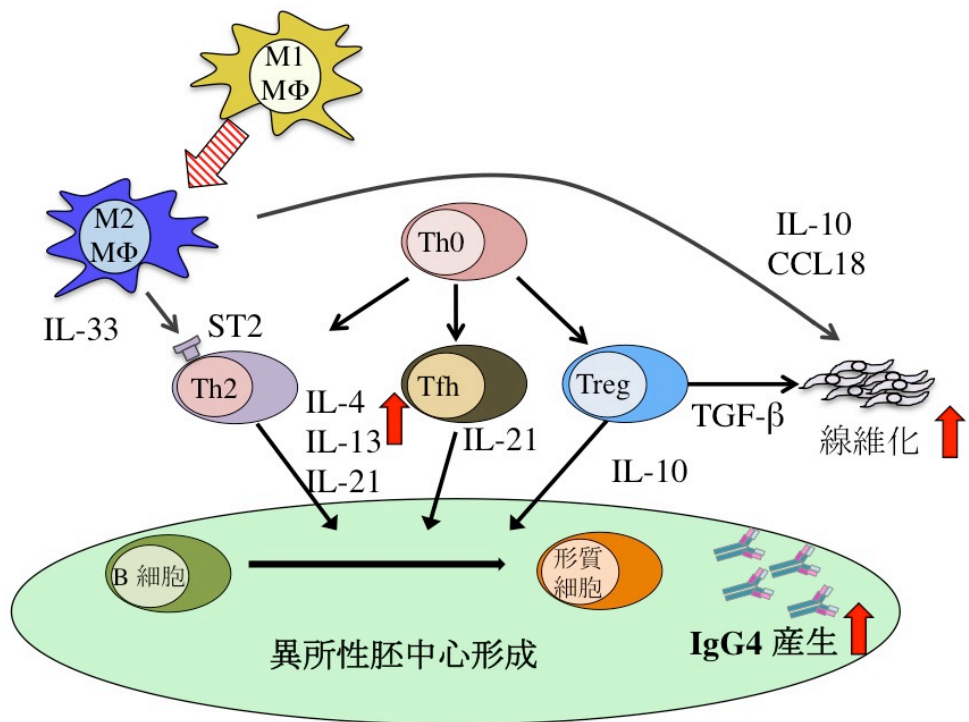


図 15. IgG4-DS の病態モデル

IL: インターロイキン、Th: ヘルパー T、Tfh: 濾胞性ヘルパー T、Treg: 制御性 T

謝 辞

稿を終えるにあたり、御懇篤なる御指導を頂きました中村誠司教授に深甚なる謝意を表します。また、直接御指導頂きました森山雅文助教に深謝致します。最後に、常に励ましの言葉を頂きました九州大学大学院歯学研究院口腔顎顔面病態学講座顎顔面腫瘍制御学分野の皆様に深く感謝致します。

参考文献

1. Hamano, H. et al. High serum IgG4 concentrations in patients with sclerosing pancreatitis. *N Engl J Med* **344**, 732-8 (2001).
2. Yamamoto, M. et al. A new conceptualization for Mikulicz's disease as an IgG4-related plasmacytic disease. *Mod Rheumatol* **16**, 335-40 (2006).
3. Zen, Y. et al. IgG4-related sclerosing cholangitis with and without hepatic inflammatory pseudotumor, and sclerosing pancreatitis-associated sclerosing cholangitis: do they belong to a spectrum of sclerosing pancreatitis? *Am J Surg Pathol* **28**, 1193-203 (2004).
4. Zen, Y. et al. IgG4-positive plasma cells in inflammatory pseudotumor (plasma cell granuloma) of the lung. *Hum Pathol* **36**, 710-7 (2005).
5. Saeki, T. et al. Renal lesions in IgG4-related systemic disease. *Intern Med* **46**, 1365-71 (2007).
6. Hamano, H. et al. Hydronephrosis associated with retroperitoneal fibrosis and sclerosing pancreatitis. *Lancet* **359**, 1403-4 (2002).
7. Morgan, W.S. & Castleman, B. A clinicopathologic study of Mikulicz's disease. *Am J Pathol* **29**, 471-503 (1953).
8. Yamamoto, M., Takahashi, H., Sugai, S. & Imai, K. Clinical and pathological characteristics of Mikulicz's disease (IgG4-related plasmacytic exocrinopathy). *Autoimmun Rev* **4**, 195-200 (2005).
9. Maehara, T. et al. Interleukin-21 contributes to germinal centre formation and immunoglobulin G4 production in IgG4-related dacryoadenitis and sialoadenitis, so-called Mikulicz's disease. *Ann Rheum Dis* **71**, 2011-19 (2012).
10. Küttner, H. Über entzündliche Tumoren der Submaxillar-Speicheldüse. *Beitr Klin Chir* **15**, 815 (1896).
11. Seifert, G. & Donath, K. [On the pathogenesis of the Kuttner tumor of the submandibular gland -- Analysis of 349 cases with chronic sialadenitis of the submandibular (author's transl)]. *HNO* **25**, 81-92 (1977).
12. Kitagawa, S. et al. Abundant IgG4-positive plasma cell infiltration characterizes chronic sclerosing sialadenitis (Kuttner's tumor). *Am J Surg Pathol* **29**, 783-91 (2005).
13. Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A. & Coffman, R.L. Two

- types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* **136**, 2348-57 (1986).
14. Merrill, J.E. et al. Inflammatory leukocytes and cytokines in the peptide-induced disease of experimental allergic encephalomyelitis in SJL and B10.PL mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 574-8 (1992).
 15. Kennedy, M.K., Torrance, D.S., Picha, K.S. & Mohler, K.M. Analysis of cytokine mRNA expression in the central nervous system of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis reveals that IL-10 mRNA expression correlates with recovery. *J Immunol* **149**, 2496-505 (1992).
 16. Rapoport, M.J. et al. Interleukin 4 reverses T cell proliferative unresponsiveness and prevents the onset of diabetes in nonobese diabetic mice. *J Exp Med* **178**, 87-99 (1993).
 17. Afzali, B., Lombardi, G., Lechler, R.I. & Lord, G.M. The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease. *Clin Exp Immunol* **148**, 32-46 (2007).
 18. Acosta-Rodriguez, E.V., Napolitani, G., Lanzavecchia, A. & Sallusto, F. Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol* **8**, 942-9 (2007).
 19. Infante-Duarte, C., Horton, H.F., Byrne, M.C. & Kamradt, T. Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells. *J Immunol* **165**, 6107-15 (2000).
 20. Ziolkowska, M. et al. High levels of IL-17 in rheumatoid arthritis patients: IL-15 triggers in vitro IL-17 production via cyclosporin A-sensitive mechanism. *J Immunol* **164**, 2832-8 (2000).
 21. Teunissen, M.B., Koomen, C.W., de Waal Malefyt, R., Wierenga, E.A. & Bos, J.D. Interleukin-17 and interferon-gamma synergize in the enhancement of proinflammatory cytokine production by human keratinocytes. *J Invest Dermatol* **111**, 645-9 (1998).
 22. Tanaka, A. et al. Th2 and regulatory immune reactions contribute to IgG4 production and the initiation of Mikulicz disease. *Arthritis Rheum* **64**, 254-63 (2012).
 23. Watanabe, T. et al. Involvement of activation of toll-like receptors and nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors in enhanced IgG4 responses in autoimmune pancreatitis. *Arthritis Rheum* **64**, 914-24 (2012).
 24. Gordon, S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* **3**, 23-35 (2003).
 25. Savinko, T. et al. IL-33 and ST2 in atopic dermatitis: expression profiles and modulation by triggering factors. *J Invest Dermatol* **132**, 1392-400 (2012).

26. Sakashita, M. et al. Association of serum interleukin-33 level and the interleukin-33 genetic variant with Japanese cedar pollinosis. *Clin Exp Allergy* **38**, 1875-81 (2008).
27. Schmitz, J. et al. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity* **23**, 479-90 (2005).
28. Yanagawa, Y., Matsumoto, M. & Togashi, H. Adrenoceptor-mediated enhancement of interleukin-33 production by dendritic cells. *Brain Behav Immun* **25**, 1427-33 (2011).
29. Moriyama, M. et al. The diagnostic utility of biopsies from the submandibular and labial salivary glands in IgG4-related dacryoadenitis and sialoadenitis, so-called Mikulicz's disease. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* (2014).
30. Umehara, H. et al. Comprehensive diagnostic criteria for IgG4-related disease (IgG4-RD), 2011. *Mod Rheumatol* **22**, 21-30 (2012).
31. Fujibayashi, T., Sugai, S., Miyasaka, N., Hayashi, Y. & Tsubota, K. Revised Japanese criteria for Sjogren's syndrome (1999): availability and validity. *Mod Rheumatol* **14**, 425-34 (2004).
32. Vitali, C. et al. Classification criteria for Sjogren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann Rheum Dis* **61**, 554-8 (2002).
33. Konno, A. A special disease. *Rinsho jibiinkoka-Tokeibugeka zensho* **7B**, 36 (1987).
34. Shimizu, M. et al. Sonographic diagnosis for Mikulicz disease. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **108**, 105-13 (2009).
35. Uehara, T. et al. A case of Mikulicz's disease complicated by malignant lymphoma: a postmortem histopathological finding. *Intern Med* **51**, 419-23 (2012).
36. van der Neut Kolfschoten, M. et al. Anti-inflammatory activity of human IgG4 antibodies by dynamic Fab arm exchange. *Science* **317**, 1554-7 (2007).
37. Schuurman, J. et al. Normal human immunoglobulin G4 is bispecific: it has two different antigen-combining sites. *Immunology* **97**, 693-8 (1999).
38. Rispens, T. et al. Human IgG4 binds to IgG4 and conformationally altered IgG1 via Fc-Fc interactions. *J Immunol* **182**, 4275-81 (2009).
39. Moriyama, M. et al. T helper subsets in Sjogren's syndrome and IgG4-related dacryoadenitis and sialoadenitis: A critical review. *J Autoimmun* (2013).
40. Miyake, K. et al. Peripheral CD4+ T cells showing a Th2 phenotype in a patient with Mikulicz's disease associated with lymphadenopathy and pleural effusion. *Mod*

- Rheumatol* **18**, 86-90 (2008).
41. Meiler, F., Klunker, S., Zimmermann, M., Akdis, C.A. & Akdis, M. Distinct regulation of IgE, IgG4 and IgA by T regulatory cells and toll-like receptors. *Allergy* **63**, 1455-63 (2008).
 42. Satoguina, J.S., Weyand, E., Larbi, J. & Hoerauf, A. T regulatory-1 cells induce IgG4 production by B cells: role of IL-10. *J Immunol* **174**, 4718-26 (2005).
 43. Watanabe, T. et al. Toll-like receptor activation in basophils contributes to the development of IgG4-related disease. *J Gastroenterol* **48**, 247-53 (2013).
 44. Kiyama, K. et al. Serum BAFF and APRIL levels in patients with IgG4-related disease and their clinical significance. *Arthritis Res Ther* **14**, R86 (2012).
 45. Yamanishi, H. et al. Clinical significance of B cell-activating factor in autoimmune pancreatitis. *Pancreas* **40**, 840-5 (2011).
 46. Gordon, S. & Martinez, F.O. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity* **32**, 593-604 (2010).
 47. 内野かおり. 1型自己免疫性膵炎におけるマクロファージの分布の検討. *日本病理学会会誌* **102**, 439 (2013).
 48. Schraufstatter, I.U., Zhao, M., Khaldoyanidi, S.K. & Discipio, R.G. The chemokine CCL18 causes maturation of cultured monocytes to macrophages in the M2 spectrum. *Immunology* **135**, 287-98 (2012).
 49. Takano, K. et al. Evaluation of submandibular versus labial salivary gland fibrosis in IgG4-related disease. *Mod Rheumatol* **24**, 1023-5 (2014).
 50. Prasse, A. et al. CCL18 as an indicator of pulmonary fibrotic activity in idiopathic interstitial pneumonias and systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* **56**, 1685-93 (2007).
 51. Tsicopoulos, A., Chang, Y., Ait Yahia, S., de Nadai, P. & Chenivesse, C. Role of CCL18 in asthma and lung immunity. *Clin Exp Allergy* **43**, 716-22 (2013).
 52. Kim, H.O. et al. Expression of CCL1 and CCL18 in atopic dermatitis and psoriasis. *Clin Exp Dermatol* **37**, 521-6 (2012).
 53. Kamekura, R. et al. The role of IL-33 and its receptor ST2 in human nasal epithelium with allergic rhinitis. *Clin Exp Allergy* **42**, 218-28 (2012).
 54. Hirota, T. et al. Genome-wide association study identifies eight new susceptibility loci for atopic dermatitis in the Japanese population. *Nat Genet* **44**, 1222-6 (2012).
 55. Gudbjartsson, D.F. et al. Sequence variants affecting eosinophil numbers associate with asthma and myocardial infarction. *Nat Genet* **41**, 342-7 (2009).

56. Yamamoto, M. et al. Evaluation and Clinical Validity of a New Questionnaire for Mikulicz's Disease. *Int J Rheumatol* **2012**, 283459 (2012).