

A study on an involvement of cytokines, chemokines, and chemokine receptors in the pathogenesis of Mikulicz's disease

田中, 昭彦
Faculty of Dental Science, Kyushu University

<https://doi.org/10.15017/19958>

出版情報 : 九州大学, 2010, 博士 (歯学), 課程博士
バージョン :
権利関係 :

ミクリッツ病の病態形成における
サイトカイン、ケモカイン、およびケモカインレセプターの
関与に関する研究

**A study on an involvement of cytokines, chemokines, and
chemokine receptors in the pathogenesis of Mikulicz's disease**

2011 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

田中 昭彦

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投稿中である。

Th2 and Regulatory Immune Reaction Contributes to IgG4

Production and the Initiation of Mikulicz's Disease

Akihiko Tanaka, Masafumi Moriyama, Hitoshi Nakashima, Katsuhisa
Miyake, Jun-nosuke Hayashida, Takashi Maehara, Shouichi Shinozaki,
Yoshiaki Kubo, and Seiji Nakamura

Submitted to Arthritis & Rheumatism.

略語表

AIP:	autoimmune pancreatitis (自己免疫性膵炎)
CCR:	CC chemokine receptor (CC ケモカインレセプター)
CTLA4:	cytotoxic T lymphocyte antigen 4
CXCR:	CXC chemokine receptor (CXC ケモカインレセプター)
DEPC:	diethyl pyrocarbonate
Foxp3:	forkhead box p3
IFN- γ :	interferon- γ (インターフェロン- γ)
Ig:	immunoglobulin (免疫グロブリン)
IL:	interleukin (インターロイキン)
IP-10:	interferon-inducible protein-10
LSG:	labial salivary gland (口唇腺)
MD:	Mikulicz's disease (ミクリッツ病)
MDC:	macrophage-derived chemokine
mRNA:	messenger RNA
PBMC:	peripheral blood mononuclear cells (末梢血単核球)
PCR:	polymerase chain reaction
PHA:	phytohemagglutinin
PSC:	primary sclerosing cholangitis (原発性硬化性胆管炎)
SS:	Sjögren's syndrome (シェーグレン症候群)
TARC:	thymus and activation-regulated chemokine
TGF- β :	transforming growth factor- β (トランスフォーミング増殖因子- β)
Th:	T helper (ヘルパー T)
TNF- α :	tumor necrosis factor- α (腫瘍壊死因子 α)
T reg:	regulatory T cell (制御性 T 細胞)

目 次

要旨	5
緒言	9
材料と方法	13
結果	
1. SS および MD 患者の臨床所見の比較	20
2. SS および MD 患者の LSG における浸潤リンパ球サブセットの比較検討	26
3. SS および MD 患者の LSG におけるサイトカイン、ケモカイン、ケモカインレセプター発現の比較検討	28
4. SS および MD 患者におけるの IgG4 産生に関わる分子の比較検討	35
考察	38
謝辞	46
参考文献	47

要 旨

ミクリッツ病 (Mikulicz' disease: MD) は、涙腺や唾液腺の腫脹を特徴とし、病理組織学的類似性から、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。しかし、MD の腺腫脹は持続性であり、ステロイドが著効することなど、臨床的に SS と異なる所見も多い。また近年、MD に高免疫グロブリン (Immunoglobulin: Ig) G4 血症や腺組織への IgG4 陽性形質細胞の浸潤が認められることから、MD は SS と全く異なった機序で生じる疾患であることが示唆されている。近年「IgG4 関連疾患」として、自己免疫性膵炎 (autoimmune pancreatitis: AIP)、原発性硬化性胆管炎 (primary sclerosing cholangitis: PSC)、間質性腎炎、後腹膜繊維症などでも同様に IgG4 陽性形質細胞の浸潤が認められることが報告されており、MD も「IgG4 関連疾患」に加えることが提唱されている。そこで、本研究では、MD の発症や病態形成のメカニズムをより明確なものにするために、はじめに SS と MD の臨床像を比較検討した。次いで病変局所に浸潤しているリンパ球の検索と T 細胞によるサイトカイン発現や、T 細胞の浸潤や集積に関わるケモカインやケモカインレセプターの発現を比較検討することにした。最後に MD 患者における IgG4 の産生に関連する分子の検討を行った。

以下に本研究で得られた結果をまとめた。

1. SS および MD 患者の臨床所見の比較検討

SS 患者 18 症例、MD 患者 15 症例を対象とした。なお、検討した MD 患者は全症例リンパ球浸潤程度が重度であるため、比較対象とした SS も全症例重度の症例を選択した。MD では SS と比較して、高頻度に AIP や PSC などの IgG4 関連疾患を合併していた。MD の腺腫脹は全例 3 ヶ月以上継続しており、唾液量の減少は軽度であった。また、MD の唾液腺造影では、SS に特徴的な点状陰影は認められなかった。血清学的検査では、MD は検査を行った全症例 IgG4 値は高値を示し、SS に特異的な抗 SS-A/SS-B 抗体は認められなかった。

2. SS および MD 患者の LSG における免疫学的検討

SS 患者 18 症例、MD 患者 15 症例、および健常者 18 症例の口唇腺 (labial salivary glands: LSG) を材料として比較検討を行った。病理組織学的所見では、両疾患とも重度リンパ球浸潤を認めたが、MD ではリンパ濾胞形成を高頻度に認め、SS で特徴的な導管周囲の破壊像は認められなかった。免疫組織化学染色での検討では、SS ではリンパ濾胞とその周囲に CD20 陽性 B 細胞の浸潤は認めるものの、IgG4 陽性形質細胞は認められなかった。これに対して、MD では多数のリンパ濾胞形成を認め、その周囲には CD20 陽性 B 細胞の浸潤が浸潤しており、加えて IgG4 陽性形質細胞および制御性 T 細胞 (regulatory T cell: Treg) の転写因子である forkhead box p3 (Foxp3) 陽性細胞の浸潤が認められた。

次に、リアルタイム polymerase chain reaction (PCR) 法を用いてサイトカイン、ケモカイン、ケモカインレセプターの messenger RNA (mRNA) 発現を検討した。

SS 患者の LSG では、健常者の LSG と比較して T ヘルパー (Th) 1、Th2、Th17 タイプのサイトカイン、ケモカイン、ケモカインレセプターの mRNA 発現が有意に亢進していた。これに対して、MD 患者の LSG では、健常者の LSG と比較して Th2 および Treg タイプのサイトカイン、ケモカイン、ケモカインレセプターの mRNA 発現が亢進していたが、Th1 と Th17 タイプの亢進は認められなかった。さらに、発現が有意に亢進していた分子について免疫組織化学染色にてその局在をみたところ、MD ではリンパ濾胞とその周囲に インターロイキン (interleukin: IL)-4、IL-10、thymus and activation-regulated chemokine (TARC)、macrophage-derived chemokine (MDC) が検出され、リンパ濾胞周囲に浸潤するリンパ球に CC ケモカインレセプター (CC chemokine receptor: CCR) 4 が発現していた。

3. SS および MD 患者における IgG4 産生に関する分子の検討

病変局所の IgG4 産生と調節因子といわれている IL-4、IL-10 および Foxp3 との相関をみたところ、SS では IgG4 の mRNA 発現量と IL-4、IL-10、Foxp3 の mRNA 発現量との間に有意な相関は認められなかったが、MD では IgG4 の mRNA 発現量と IL-4、IL-10、Foxp3 の mRNA 発現量との間に正の相関を認めた。特に IL-10 と Foxp3 では IgG4 陽性細胞率とも正の相関を認めた。

本研究で得られた結果より、MD は SS と臨床所見および分子生物学的に明らかに異なる病態を呈しており、SS の一亜型ではなく、独立した疾患である可能性が強く示唆された。さらに、MD における Th2 タイプである IL-4 と Treg

タイプである IL-10 は、病変局所における IgG4 産生に重要な役割を果たしており、これらのタイプのサイトカイン、ケモカイン、ケモカインレセプターが MD の特徴的な病態を形成していることが示された。

緒 言

ミクリッツ病 (Mikulicz' disease: MD) は対称性で無痛性の涙腺と唾液腺腫脹を特徴とする疾患であるが、その原因は不明とされてきた。病理組織学的には涙腺・唾液腺組織において、その導管・腺房周囲に著明な炎症性細胞浸潤を認め、原発性シェーグレン症候群 (Sjögren's syndrome: SS) の典型像と類似点が多いことから、SS の一亜型であるという考え方が定着していた (1)。しかし、MD は SS と比較して口腔および眼乾燥症状や乾燥所見が乏しく、腺の腫脹は持続的であるが、ステロイド治療によりその腫脹は速やかに改善し、さらに腺分泌機能も改善するという特徴を有している (2)。また、血清学的検査においても、MD は SS に特異的な抗 SS-A/SS-B 抗体をはじめ種々の自己抗体に乏しいという所見を呈することが報告されている。さらに山本らは (3)、MD は著明な高免疫グロブリン (immunoglobulin: Ig) G4 血症を呈し、その腺組織の中に IgG4 陽性細胞を認め、それらは SS や他のリウマチ性疾患では観察されない極めて特徴的な所見であることを明らかにした。同様の特徴は 2001 年に最初に報告された自己免疫性膵炎 (autoimmune pancreatitis: AIP) にも認められており (4)、MD の合併例も存在していた (5)。またその後、硬化性胆管炎 (primary sclerosing cholangitis: PSC) (6)、間質性腎炎 (7)、後腹膜繊維症 (4) などの臓器障害が MD に合併することも報告され、MD は高 IgG4 血症を特徴とした、全身性かつ慢性炎症性疾患のひとつとして SS と異なった疾患として再認識されてきており、MD を含めこれら多臓器に及ぶ障害を「IgG4 関連疾患」と総称することが提言

された。この IgG4 関連疾患は日本から提唱されたものであり、内科・眼科・病理、そして口腔外科を主体とした病態解明のための研究班を厚生労働科学研究「難治性疾患克服研究事業」として推進しており、われわれも研究協力者として「唾液腺病変の病態解明」のプロジェクトを担っている。しかし、MD を SS から独立させる特徴となった IgG4 産生の機序、病態との関連はいまだ明らかにはなっておらず、「IgG4 関連疾患」としてとらえた際の全身的な関連も含め不明な点が多く残されている。

免疫グロブリンの中で最も多い IgG は 1 から 4 のサブクラスを持つが、健康人の血中における IgG4 は、総 IgG のおよそ 4% 前後と最も量が少ない (8)。IgG4 は、抗原に対する親和性が低く、さらに補体の C1q 部に結合できないといった特徴を持っている (9)。IgG4 の産生は、T ヘルパー (T helper: Th) 2 タイプサイトカインであるインターロイキン (interleukin: 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が、同時にその IL-4 は IgE の産生も誘導している。しかし最近の研究では、アレルギー患者に対する特異的免疫療法を行うと、その抗原特異的な IgG4 が上昇することが明らかになってきた。この作用機序として、Th2 細胞や制御性 T 細胞 (regulatory T cell: Treg) が産生する 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クラススイッチを引き起こすことが報告されている (10, 11)。また、IL-10 そのものが B 細胞の IgG1 産生を抑制することで、かわりに IgG4 の産生を促進させることも併せて報告されている (12)。これらのことから、MD における IgG4 産生促進は IL-4 と IL-10 を介することから Th2 細胞および Treg 依存性である可能性が示唆されている。さらに、MD と同じく IgG4 関連疾患であ

る AIP や PSC では、Th2 細胞だけでなく Treg も病態形成に関与する可能性が示唆されているため (13)、同様に MD でもその関与が注目されている。

免疫系のバランスや恒常性は、CD4 陽性 Th 細胞により保たれているが、その Th 細胞群のバランスの崩れが様々な免疫性疾患の原因となっていると考えられている。これまでは Th 細胞は分泌するサイトカインの違いから、Th1 細胞と Th2 細胞という機能的に異なる 2 つの Th サブセットに分類されてきた (14)。Th1 細胞は IL-12 によって誘導され、IL-2 とインターフェロン- γ (interferon- γ : IFN- γ) を産生し、主に細胞性免疫を担っている。一方、Th2 細胞は IL-4 によって誘導され、IL-4、IL-5、IL-13 を産生し、体液性免疫を担っている。これらのサイトカインは、Th サブセット間の増殖や機能を互いに調節することで、Th1/Th2 のバランスを保っているが、多くの自己免疫疾患は、この Th1/Th2 バランスの破綻によって引き起こされることが報告されている (14-17)。われわれの過去の研究でも、SS の発症と維持、病態進展においてサイトカインによる Th1/Th2 バランスが重要な役割を担っているということを報告してきた (18)。また 2000 年に、寄生虫感染によって活性化される Th 細胞は、Th1 細胞・Th2 細胞でもない IL-17 を産生するサブセットであることが報告され (19)、Th17 細胞と呼ばれるようになった。この Th17 細胞の発見により Th1/Th2 バランスの破綻だけでは説明がつかなかった多くの疾患が、この Th17 細胞によって制御されていることが明らかになってきた (20, 21)。さらにこれらの Th 細胞は、免疫応答を抑制する機能を持った Treg により能動的に制御されていることも明らかになってきている (22)。

一方最近では、強力なリンパ球活性と走化活性能を持つケモカインが同定さ

れ (23, 24)、このケモカインおよびその受容体であるケモカインレセプターとの相互作用が細胞を選択的に炎症部位へ浸潤させると報告されている (25, 26)。ケモカインとは広義のサイトカインではあるが、分子量は 8~14 kDa と小さい分泌型タンパク質で、免疫担当細胞の遊走に関わることが知られている。Th1/Th2 バランスの形成にも関与しており、Th1 細胞および Th2 細胞に選択的なケモカインとケモカインレセプターも同定され、各細胞の遊走機構も解析されている (27)。心臓移植拒否反応 (28) や、自己免疫性糖尿病 (29)、アトピー性角結膜炎 (30)、皮膚エリテマトーデス (31)、多発性硬化症 (32) などにおける免疫応答にも関与していると考えられており、SS においてもサイトカインだけでなくケモカインの関与が重要視されている (33, 34)。

そこで、本研究では、MD の発症や病態形成のメカニズムをより明確なものにするために、はじめに SS と MD の臨床像を比較検討した。病次いで変局所に浸潤しているリンパ球の検索と T 細胞によるサイトカイン発現や、T 細胞の浸潤や集積に関わるケモカインやケモカインレセプターの発現を比較検討し、最後に MD の病態局所での IgG4 の産生に関連する分子の検討を行った。

材料と方法

1. 対象患者

対象は、平成 4 年から平成 21 年に九州大学病院顎顔面口腔外科を受診し、SS と診断された 18 症例 (男性 2 症例、女性 16 症例、平均年齢: 54.6 歳)、MD と診断された 15 症例 (男性 3 症例、女性 12 症例、平均年齢: 56.3 歳)、唾液分泌機能障害がみられない健常者 18 症例 (男性 6 症例、女性 12 症例、平均年齢: 49.8 歳) とした。口唇腺 (labial salivary gland: LSG) は生検時に採取した (35)。免疫組織学的解析用にはパラフィンに包埋して保存し、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。

2. SS および MD の診断

SS の診断は厚生省シェーグレン診断基準 (1999 年改定) に準じて行った (36)。また、すべての患者はヨーロッパとアメリカで用いられている SS の診断基準によっても SS と診断された (37)。一方、MD の診断は日本シェーグレン症候群学会にて承認された診断基準 (38, 39) に準じて行った。ガムテストは、水で口腔内を軽くすすいだ後、ガムを 10 分間噛み、その間に分泌される唾液を容器に採取してその容量を測定し、10 分間で 10 ml 以下であれば有意な減少と判定した。SS と MD の LSG におけるリンパ球浸潤程度は、石川・小守の分類により ±、+、++、+++ と評価したが (40)、MD は全症例で浸潤度が +++ であったため、SS は浸潤度 +++ の 18 症例を対照とした。SS と MD における

耳下腺造影の評価は、Rubin & Holts の分類により stage 0、I、II、III とした (41)。

3. 免疫組織学的解析

パラフィン切片 (5 [m) を作製し、通常のスレプトアビジン-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, Cambridge, UK) を用いて行った (42-44)。浸潤リンパ球のサブセットの解析に使用した一次抗体は、抗 CD4 モノクローナル抗体 (clone: B12, MBL, Woburn, Massachusetts, USA)、抗 CD20 モノクローナル抗体 (Clone: L26, M0755, Dako)、抗 Foxp3 モノクローナル抗体 (clone: mAbcam 22510, Abcam, Cambridge, UK) であった。IgG4/IgG 陽性細胞の解析には抗 IgG4 モノクローナル抗体 (The Binding Site, Birmingham, UK)、抗 IgG ポリクローナル抗体 (A0423, Dako) を用いた。サイトカイン、ケモカインおよびケモカインレセプターの解析には、抗 IL-4 ポリクローナル抗体 (clone: ab9622, Abcam)、抗 IL-10 ポリクローナル抗体 (clone: ab34843, Abcam)、抗 IFN- γ ポリクローナル抗体 (clone: ab9657, Abcam)、抗 IL-17 ポリクローナル抗体 (sc-7927, SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC., CA, USA)、抗 interferon-inducible protein 10 (IP-10) モノクローナル抗体 (clone: ab73837, Abcam)、抗 CXC ケモカインレセプター 3 (CXC chemokine receptor 3: CXCR3) モノクローナル抗体 (clone: ab64714, Abcam)、抗 thymus and activation-regulated chemokine (TARC) ポリクローナル抗体 (57226, R&D systems, Minneapolis, MN, USA)、抗 macrophage-derived chemokine (MDC) モノクローナル抗体 (MAB3361, R&D systems)、抗 CC chemokine receptor 4 (CCR4) モノクローナル抗体 (MAB1567, R&D systems) を

用いた。なお、各抗体の陽性細胞は、顕微鏡用デジタルカメラ DP25 (オリンパス株式会社、東京、日本) で撮影、記録した。

4. IgG4 陽性細胞率の算出

IgG4 陽性細胞率は、強拡大 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。本研究では、その IgG4 陽性細胞が 50% 以上の症例を IgG4 陽性細胞の有意な浸潤ありとした (38, 39)。

5. RNA の抽出および complementary DNA (cDNA) の合成

RNA の抽出には acidified guanidinium-phenol-chloroform (45-47) 法を用いた。まず、LSG に Torizol[®] Reagent (Invitrogen, California, USA) を 1 ml 加え、ホモジナイザーを用いて粉碎した。0.2 ml のクロロホルム (和光純薬、大阪、日本) 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 (和光純薬) 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 80% エタノール (和光純薬) で洗浄後乾燥させ、30 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 3 µg の total RNA、40 U/µl の Recombinant RNasin[®] Ribonuclease Inhibitor (Promega, Madison, WI, USA) を 0.5 µl、0.5 µg/µl の pd(T)₁₂₋₁₈ を 1 µl、10 mM PCR Nucleotide Mix (以上、Amersham

Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA) を 1 μ l、250 mM トリス塩酸塩 (pH 8.3)、375 mM KCl および 15 mM MgCl₂ を含む 5 x 反応緩衝液を 4 μ l、100 mM dithiothreitol を 2 μ l、200 U/ μ l の SUPERSCRIPTM II RNase H⁻ Reverse Transcriptase (以上、Life Technologies, Rockville, MD, USA) を 0.5 μ l 加えて合計 20 μ l 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 2 倍に希釈し、サイトカイン、ケモカイン、ケモカインレセプターの mRNA の解析に用いた。

6. リアルタイム polymerase chain reaction (PCR) 法によるサイトカイン、ケモカイン、ケモカインレセプターの mRNA 発現の解析

全てのリアルタイム PCR は LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green 1 kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) を用いて行った。mRNA 発現を解析する分子は、Th1 タイプのサイトカインである IFN- γ 、IL-2、IL-12、Th1 タイプのケモカインである IP-10、およびそのレセプターである CXCR3、Th2 タイプのサイトカインである IL-4 と IL-5、Th2 タイプのケモカインである TARC と MDC、およびそのレセプターである CCR4、Treg の転写因子である Foxp3 と Treg タイプのサイトカインである IL-10、TGF- β 、Th17 タイプサイトカインである IL-17、そして IgG と IgG4 とした。反応条件は、熱変性は 95°C で 1 サイクル目が 10 分間、2 サイクル以降は 10 秒間で行った。伸張反応は 72°C で 20 秒間とし、全て 45 サイクルの増幅を行った。各プライマー配列、MgCl₂ 濃度、アニーリング温度を表 1 に示す。陽性対象群としては、健常者の新鮮 PBMC を、10 μ g/ml phytohemagglutinin (PHA) を加えた RPMI 1640 (Life

Technologies) 培養液中で 72 時間刺激し、そこから抽出した mRNA から合成した cDNA を用いた。定量化には LightCycler Software Version 3.5 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) を用いた。また、各症例間でサイトカイン、ケモカイン、ケモカインレセプターの mRNA 発現量を比較するために、サイトカインとケモカインレセプターの mRNA 発現量は同一症例の CD3 δ の mRNA 発現量で、ケモカイン、IL-6、IgG、IgG4 の mRNA 発現量は β -actin の mRNA 発現量で比較して、相対的発現量を算出した。

表 1 リアルタイム PCR のプライマーと反応条件

検出する mRNA	フラグメントのサイズ (bp)	プライマーの塩基配列 (5'→3')		MgCl ₂ 濃度 (mM)	アニーリング 温度 (°C)
β-actin	258	センス	GCAAGACCTGTACGCCAAC	3	60
		アンチセンス	CTAGAAGCATTTGCGGTGGA		
CD3α	184	センス	GATGTCATTGCCACTCTGC	3	60
		アンチセンス	ACTTGTTCGAGCCAGTT		
IL-2	180	センス	ACTCACCAGGATGCTCACAT	3	60
		アンチセンス	AGGTAATCCATCTGTTCAGA		
IFN-γ	121	センス	GAG ACC ATC AAG GAA GAC AT	3	60
		アンチセンス	GTA TTG CTT TGC GTT GGA		
IL-12	180	センス	CCTGACCCACCCAAGAACTT	3	60
		アンチセンス	GTGGCTGAGGTCTTGCCGT		
IP-10	288	センス	GCAAGACCTGTACGCCAAC	3	60
		アンチセンス	GCAAGACCTGTACGCCAAC		
CXCR3	184	センス	CTGGTGGTGTGGTGGACAT	3	60
		アンチセンス	AGAGCAGCATCCACATCCG		
IL-4	108	センス	GCA GTT CCA CAG GCA CAA	3	60
		アンチセンス	CTC TGG TTG GCT TCC TTC AC		
IL-5	123	センス	CCA ACT GTG CAC TGA AGA	3	60
		アンチセンス	TGG CCG TCA ATG TAT TTC		
TARC	140	センス	TAGAAAGCTGAAGACGTGGT	3	60
		アンチセンス	GGCTTTGCAGGTATTTAACT		
MDC	253	センス	CGCGTGGTGAACACTTCTA	3	60
		アンチセンス	GAATGCAGAGAGTTGGCACA		
CCR4	214	センス	GTGCTCTGCCAATACTGTGG	3	60
		アンチセンス	CTTCCTCCTGACACTGGCTC		
IL-10	161	センス	AAC CTG CCT AAC ATG CTT C	3	60
		アンチセンス	AAC TGG ATC ATC TCA GAC AAG		
TGF-β	142	センス	GCC CCT ACA TTT GGA GCC TG	3	60
		アンチセンス	TTG CGG CCC ACG TAG TAC AC		
Foxp3	207	センス	CCCCTTGCCCCACTTACA	3	60
		アンチセンス	GCCACGTTGATCCCAGGT		
IL-17	186	センス	GCA GGA ATC ACA ATC CCA C	3	60
		アンチセンス	TCT CTC AGG GTC CTC ATT GC		
IgG	129	センス	CAA GTG CAA GGT CTC CAA CA	3	60
		アンチセンス	TGG TTC TTG GTC AGC TCA TC		
IgG4	145	センス	TGA CGG TGT CGT GGA ACT	3	60
		アンチセンス	ACG TTG CAG GTG TAG GTC T		

7. 統計

統計処理には Student's t 検定、 χ^2 検定 (Yates の補正)、Mann-Whitney の U 検定および Spearman 順位相関係数を用い、 $P < 0.05$ の場合を有意差ありとした。

結 果

1. SS と MD 患者の臨床所見の比較

MD 症例の患者背景および臨床所見を表 2 から 5 に示す。男女比は男性 3 例、女性 12 例 (男女比=1:4) と女性に多い傾向であった。主訴は涙腺および唾液腺の腫脹が多く、その腺腫脹は全症例弾性硬で圧痛がなく、3 ヶ月以上持続していた。口腔乾燥感については、自覚症状を認める症例は多いものの、刺激時唾液分泌量の減少を認めた症例は少なく、その程度は SS と比べ軽度であった (表 5)。また、MD には AIP や PSC など他の IgG4 関連疾患を合併している症例が多くみられた。血清学的検査では、MD のほとんどの症例で高 γ グロブリン血症を認め、血清 IgG4 値は測定した症例では全例において高値を示した (表 4)。MD における抗核抗体は SS 症例と比べると陰性例が有意に多く、さらに抗 SS-A/SS-B 抗体は全例陰性であった。一方、SS では高 γ グロブリン血症を呈したが、抗核抗体および抗 SS-A/SS-B 抗体は全例陽性であった。また、MD における唾液腺造影の代表例を図 1 に示すが、腫脹した唾液腺の一部に末梢導管の狭窄を認めるものの、SS に特徴的な末梢導管や腺房の破壊を示すとされる点状陰影は認められず、全例 stage 0 であった。以上のように MD は臨床的に SS とは異なる点が多くみられた。

表2 MD患者の患者背景

患者 番号	年齢	性別	主訴		病悩期間	全身症状	合併症
			腫脹	乾燥症状			
1	70	男性	顎下腺	口腔	1ヶ月	体重減少	喘息
2	48	女性	涙腺	口腔	3ヶ月	倦怠感	喘息
3	31	女性	涙腺	口腔	1年6ヶ月	体重減少	AIP、糖尿病
4	68	女性	舌下腺	口腔	3ヶ月	関節痛	AIP、糖尿病
5	52	女性	顎下腺	口腔	3年	体重減少	乳癌
6	37	女性	耳下腺	口腔・眼	20年	なし	前立腺肥大
7	66	男性	顎下腺	なし	2年	なし	なし
8	65	男性	顎下腺	なし	5ヶ月	なし	水腎症
9	57	女性	顎下腺	なし	6ヶ月	貧血	AIP、PSC
10	61	女性	顎下腺	口腔・眼	3ヶ月	体重減少	AIP、PSC
11	79	女性	顎下腺	口腔	10ヶ月	腹部違和感	AIP、PSC
12	64	女性	顎下腺	口腔・眼	1年	なし	AIP
13	60	女性	顎下腺	口腔	1年	なし	AIP、PSC
14	70	女性	耳下腺	口腔	5年	なし	逆流性食道炎
15	76	女性	顎下腺	口腔	4ヶ月	なし	糖尿病

AIP：自己免疫性膵炎

PSC：硬化性胆管炎

表3 MD患者の臨床所見

患者 番号	腫脹を認めた腺					客観的乾燥症状		ガムテスト ^a (ml/10min)	シルマーテスト ^b (右/左) (mm/5min)
	涙腺	耳下腺	顎下腺	舌下腺	口蓋腺	口腔	眼		
1		○	○			○	○	1.0	1/1
2	○					○	○	4.0	8/4
3	○	○		○		○		8.0	N.D.
4	○		○	○		○		13.0	N.D.
5	○		○	○	○	○		7.8	N.D.
6	○	○	○			○	○	14.0	4/9
7			○	○				16.0	N.D.
8			○					12.0	N.D.
9	○		○					9.8	3/3
10			○			○	○	6.3	3/1
11		○	○			○	○	N.D.	N.D.
12		○	○			○	○	N.D.	N.D.
13			○			○	○	1.0	N.D.
14		○				○	○	11	N.D.
15		○	○			○	○	5.3	N.D.

a ガムテストの検査方法は「材料と方法」に示しており、未実施のものについては N.D.: not done とした。

b シルマーテストはろ紙を用いて行い、5分間で5mm以下を減少と判定した。
未実施のものについては N.D.: not done とした。

表 4 MD 患者の血清学的所見

患者 番号	RF (IU/ml)	ANA	IgG (mg/dl)	IgG4 (mg/dl)	IgA (mg/dl)	IgM (mg/dl)	抗 SS-A 抗体	抗 SS-B 抗体
当院での 正常値	20>	-	872 ∩ 1815	95 ∩ 405	95 ∩ 405	59 ∩ 269	-	-
1	20>	-	2010	N.D.	390	222	-	-
2	20>	1+	2401	N.D.	161	85	-	-
3	20>	1+	2055	N.D.	184	36	-	-
4	20>	-	2827	N.D.	290	91	-	-
5	20>	2+	3191	N.D.	197	142	-	-
6	65	3+	1443	N.D.	285	111	-	-
7	N.D.	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	-	-
8	20>	-	3142	1700	138	59	-	-
9	20>	-	1842	748	187	63	-	-
10	N.D.	-	2891	1080	187	63	-	-
11	61	2+	2585	456	305	53	-	-
12	20>	2+	2430	896	182	53	-	-
13	20>	-	1614	490	276	74	-	-
14	20>	2+	4410	1930	148	89	-	-
15	N.D.	-	2381	823	187	52	-	-

N.D. : not done

(-) : 陰性

表 5 SS と MD 患者の臨床所見の比較

	SS (n=18)	MD (n=15)
リンパ球浸潤程度 [†] (石川・小守の分類)	+++	+++
ガムテスト ^a (ml/10 分)	4.9	8.4 [†]
腺腫脹 (%)	13	100 [†]
唾液腺造影 (Rubin & Holt 分類)	stage 0 (%)	0
	stage I (%)	6
	stage II (%)	44
	stage III (%)	50
高 IgG 血症 (%)	69	92
高 IgG4 血症 (%)	N.D.	100
ANA 陽性率 (%)	100*	42
抗 SS-A 抗体陽性率 (%)	88*	0
抗 SS-B 抗体陽性率 (%)	50*	0

a ガムテストは「材料と方法」に示す方法で行った。

MD 患者と SS 患者間で、Student's *t* 検定 ([†] $p < 0.05$) および χ^2 検定 [Yates の補正] (* $p < 0.05$) を行った。

N.D. : not done

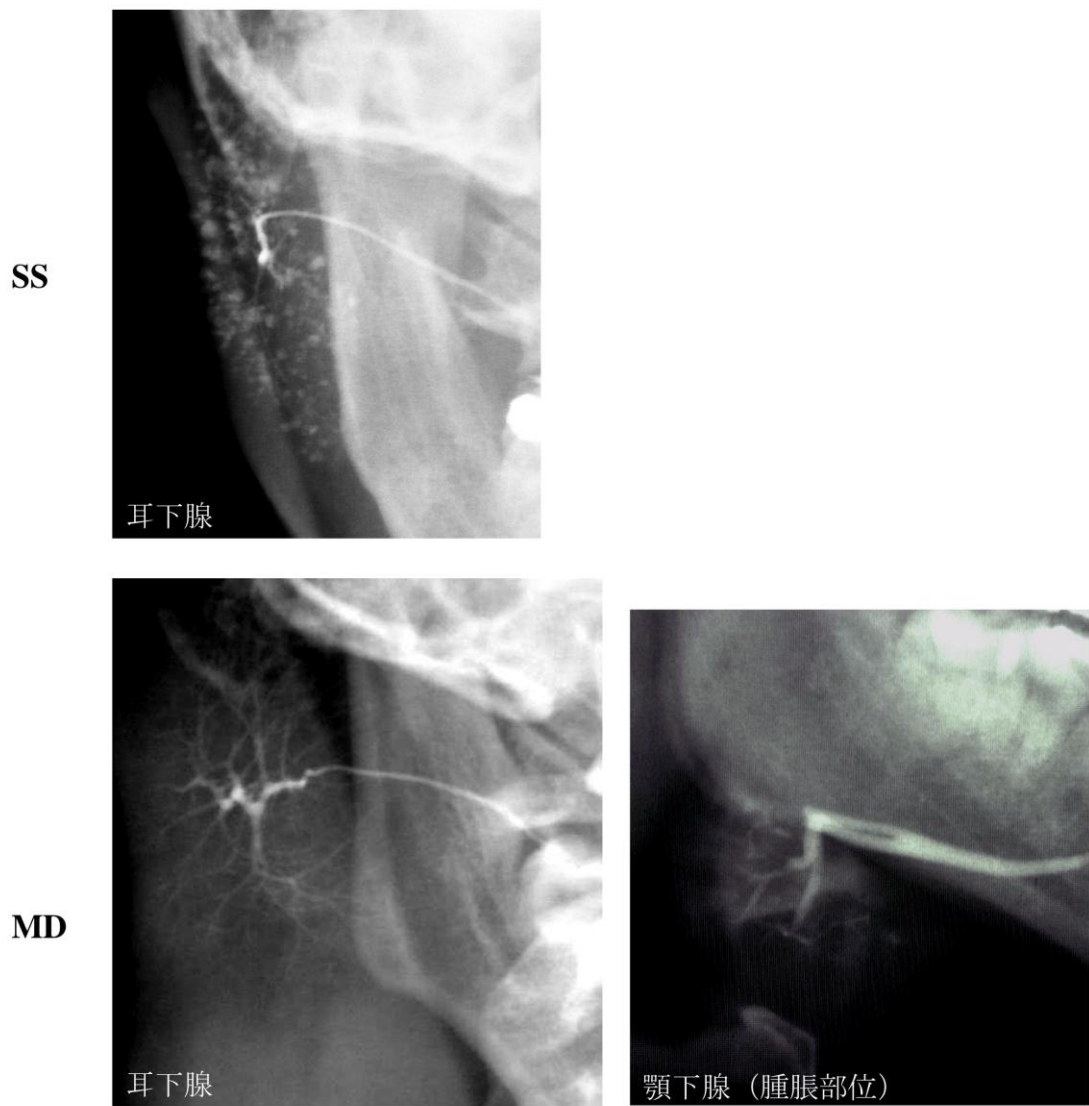


図1 SS と MD 患者の唾液腺造影像 (代表症例)

上段に SS、下段に MD の唾液腺造影の代表例を示す。MD は全例 stage 0 であり、SS に特徴的な点状陰影は認められなかった。腫脹部位である顎下腺においても異常所見は認められなかった (下段右)。

2. SS および MD 患者の LSG におけるリンパ球サブセットの比較検討

SS および MD 患者の代表的症例の LSG の組織像を図 2 に示すが、SS 患者では、導管周囲のリンパ球浸潤と腺房および導管の破壊と消失がみられた。一方、MD 患者では SS と同様に強いリンパ球の浸潤を認めるものの、リンパ濾胞の形成が高頻度で認められ、SS で典型的な導管の破壊はほとんど認められなかった。また、LSG における浸潤細胞および局在をみるため、抗 CD20 抗体、抗 IgG4 抗体、抗 Foxp3 抗体を用いて免疫組織学的染色を行った。SS では、リンパ濾胞様の胚中心とその周囲に CD20 陽性 B 細胞の浸潤は認められるものの、IgG4 陽性形質細胞および Treg の浸潤はみられなかった。これに対し MD では、CD20 陽性 B 細胞浸潤に加え、IgG4 陽性形質細胞および Treg のびまん性の浸潤が認められた。このように、SS と MD では同程度のリンパ球浸潤を認めるものの、その浸潤様式およびリンパ球サブセットが異なっていた。

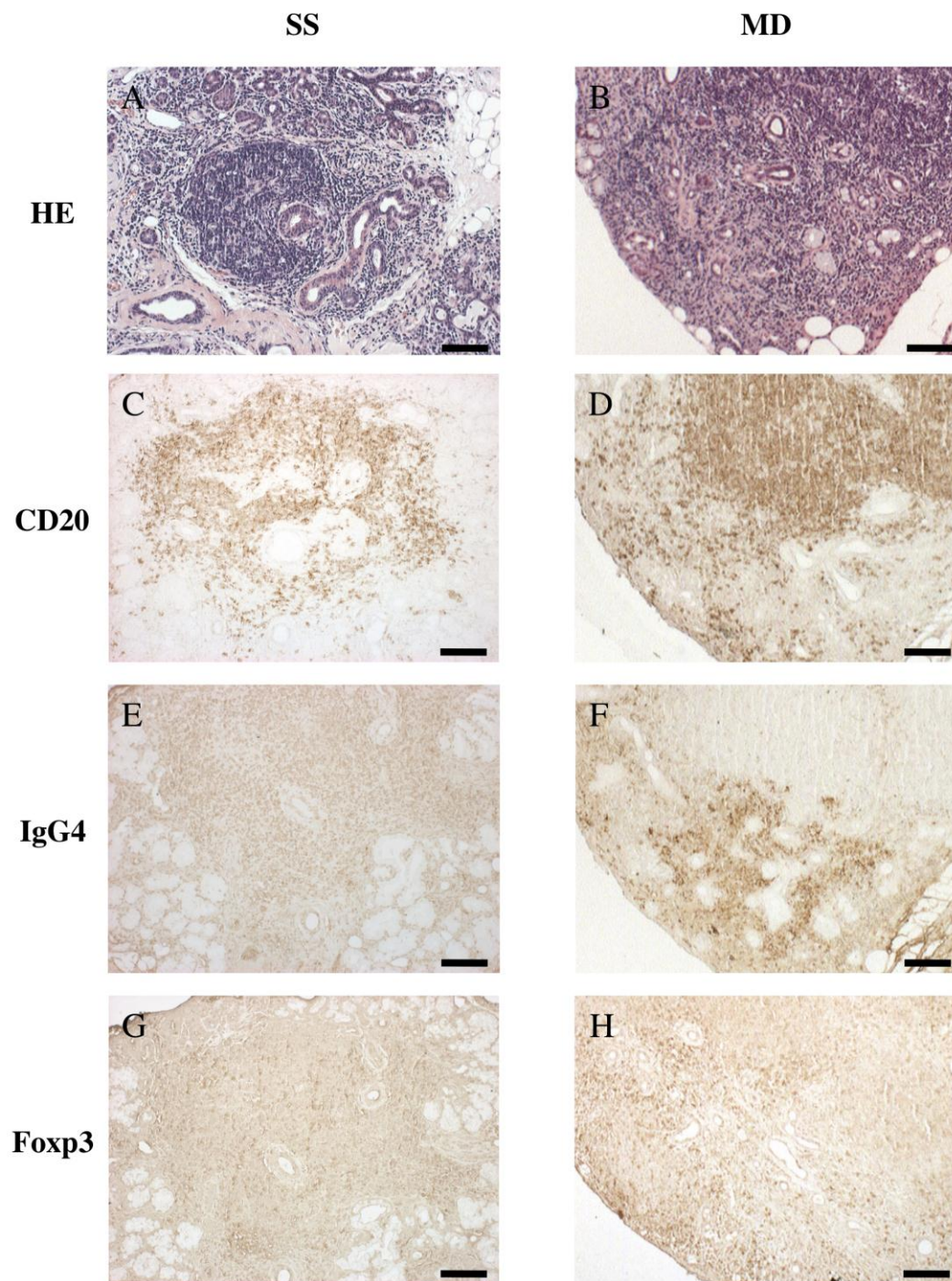


図2 SS患者およびMD患者のLSGにおける浸潤リンパ球のサブセット
 (代表症例のパラフィン包埋標本を用いた免疫組織化学染色: scale bars 100 μ m)
 SSとMDともに強いリンパ球の浸潤を認める。IgG4陽性細胞およびFoxp3陽性はMDにのみ発現がみられた。実験方法は「材料と方法」に示す。

3. SS および MD 患者の LSG におけるサイトカイン、ケモカイン、ケモカインレセプター発現の検討

SS と MD での病変局所におけるリンパ球サブセットに違いがあることが示唆されたため LSG におけるサイトカイン、ケモカイン、ケモカインレセプターの解析を行った。

図 3a に示すように LSG における相対的 mRNA 発現量で見ると、SS 患者では健常者と比較して IFN- γ 、IP-10、CXCR3、IL-4、TARC、MDC、CCR4 および IL-17 の mRNA 発現量が有意に亢進していた。一方、MD 患者では健常者と比較して、IL-4、IL-5、TARC、MDC、CCR4、IL-10、TGF- β および Fpxp3 の mRNA 発現量が有意に亢進していた (図 3b、 $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$; Mann-Whitney の U 検定)。

次に、発現が有意に亢進していた分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。代表的な結果を図 4 および図 5 に示す。サイトカインについては、Th2 タイプである IL-4 との Treg タイプである IL-10 は両疾患ともにリンパ濾胞とその周囲に発現を認め、特に IL-10 は MD で強い発現を認めた。Th1 タイプである IFN- γ と Th17 タイプである IL-17 については、SS において導管周囲の発現を認めた (図 4)。また、ケモカインとケモカインレセプターについては、SS では導管上皮とその周囲に Th1 タイプのケモカインである IP-10 および Th2 タイプのケモカインである MDC、TARC が発現し、導管周囲に浸潤するリンパ球には、Th1 タイプのケモカインレセプターである CXCR3 に加え Th2 タイプのケモカインレセプターである CCR4 の発現を認めた (図

5a)。一方、MD ではリンパ濾胞とその周囲に MDC および TARC が検出され、リンパ濾胞周囲に浸潤するリンパ球に CCR4 が発現していた (図 5b)。MD では Th1 タイプのケモカイン、ケモカインレセプターの発現はみられなかった。

以上より、SS では Th1、Th2 および Th17 タイプの分子が、MD においては Th2 と Treg タイプの分子の発現が亢進しており、SS と MD では異なる発現パターンを呈していた。

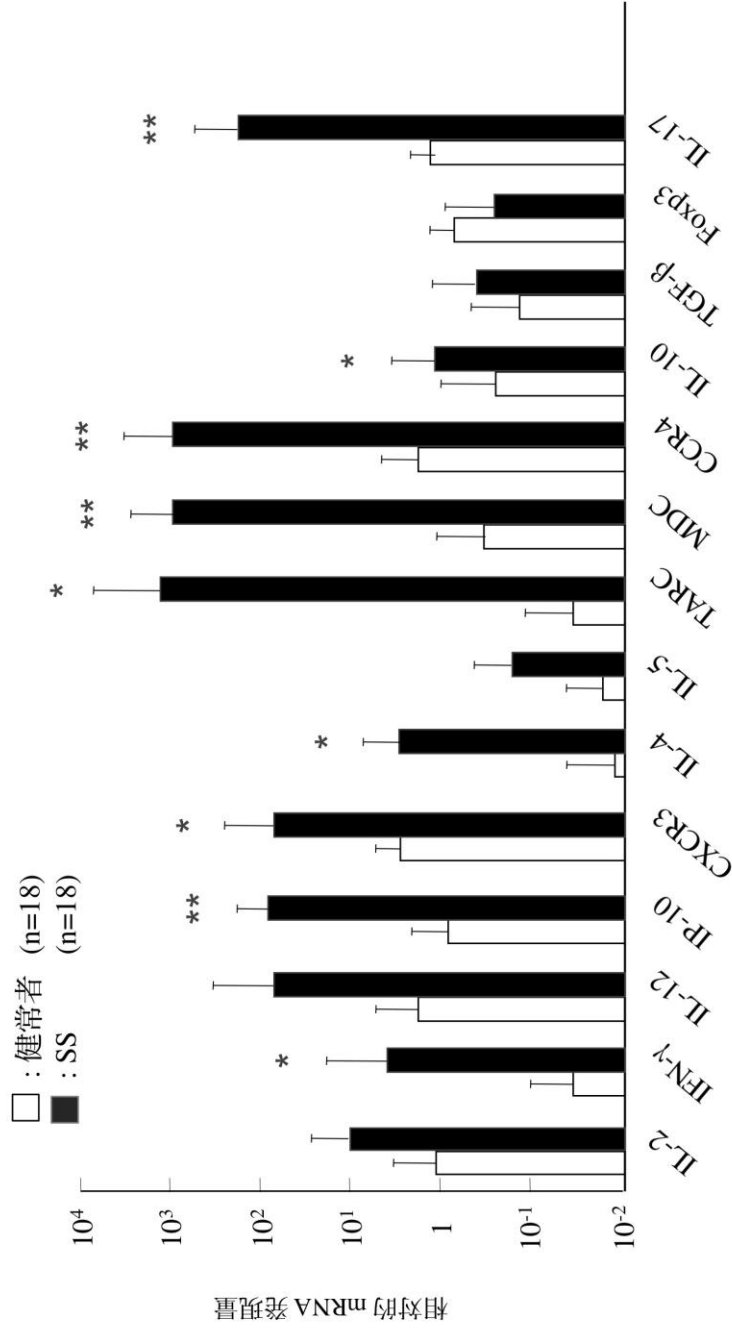


図 3a SS 患者と健常者の LSG におけるサイトカイン、ケモカイン、ケモカインレセプター mRNA 発現量

定量リアルタイム PCR を「材料と方法」に示すようにに行い、相対的な mRNA 発現量を算出した。SS 患者と健常者の LSG 間で Mann-Whitney の U 検定を行った (* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$)。

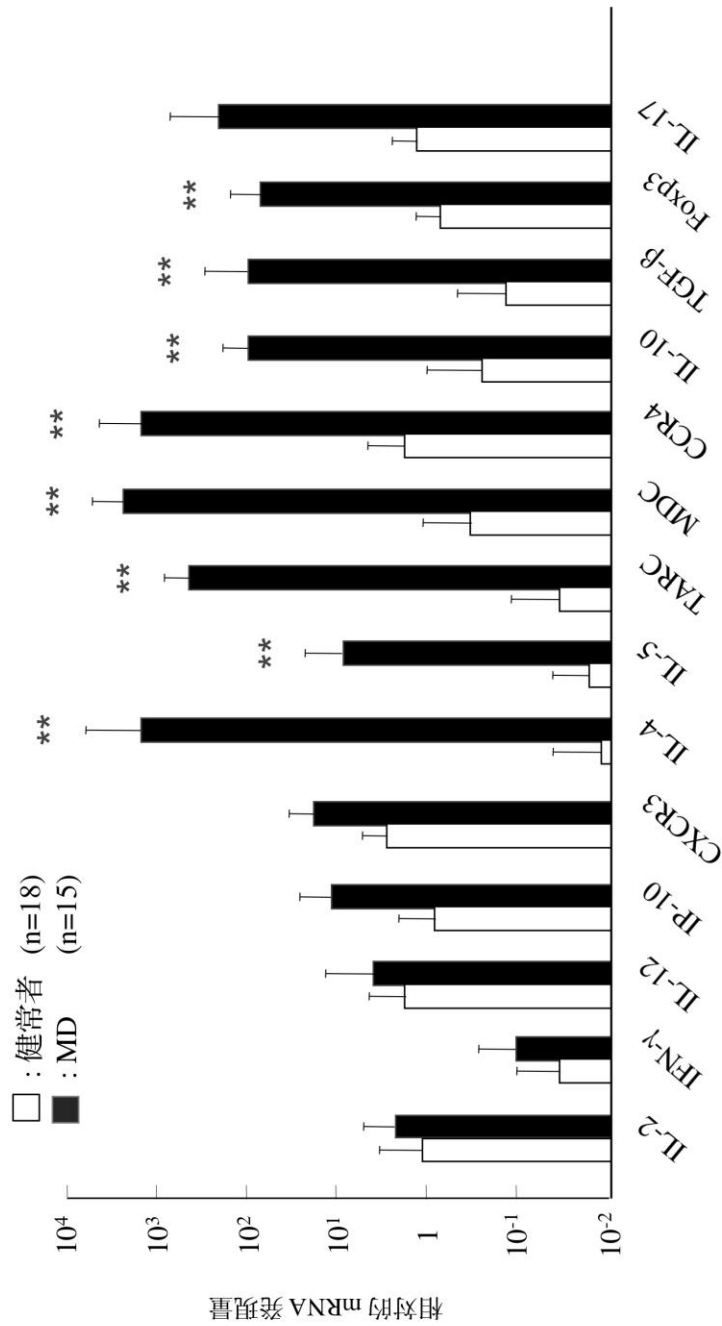


図 3b MD 患者と健常者の LSG におけるサイトカイン、ケモカイン、ケモカインレセプター mRNA 発現量
 定量リアルタイム PCR を「材料と方法」に示すようにに行い、相対的な mRNA 発現量を算出した。SS 患者と
 健常者の LSG 間で Mann-Whitney の U 検定を行った (* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$)。

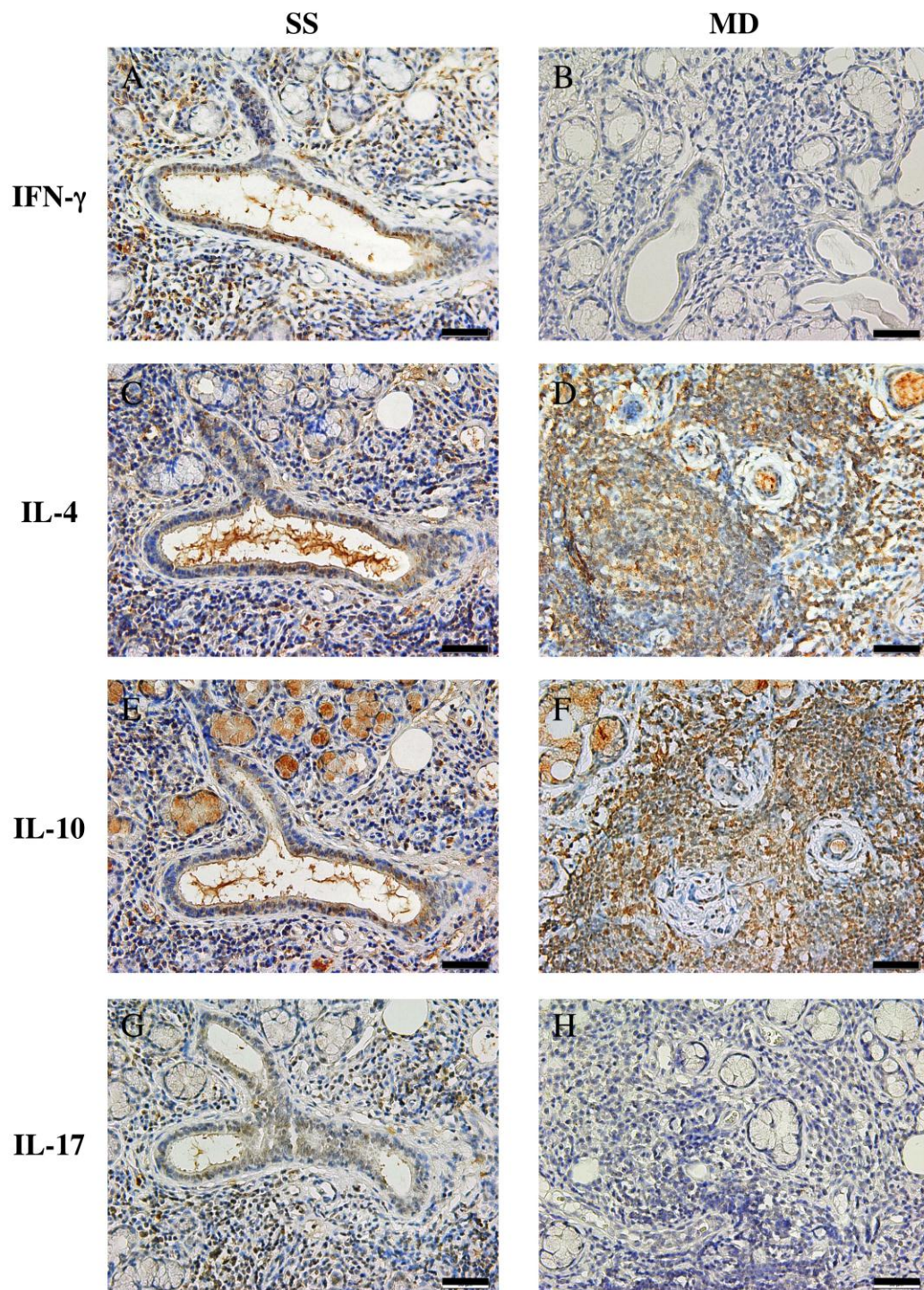


図4 SS患者およびMD患者のLSGにおけるサイトカインの発現

(代表症例のパラフィン包埋標本を用いた免疫組織化学染色: scale bars 50 μ m)

IFN- γ およびIL-17はSSにのみ発現がみられた。IL-4およびIL-10はSSとMDの両疾患にて発現がみられた。実験方法は「材料と方法」に示す。

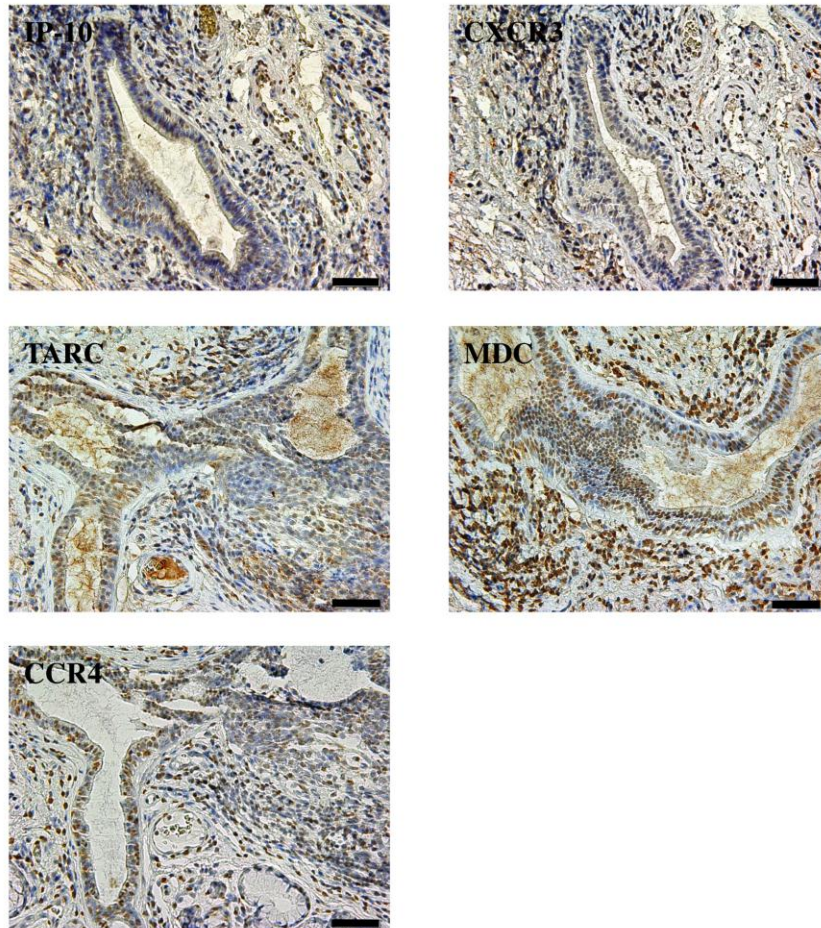


図 5a SS 患者の LSG におけるケモカインとケモカインレセプターの発現

(代表症例のパラフィン包埋標本を用いた免疫組織化学染色: scale bars 50 μ m)
 導管上皮とその周囲に IP-10、MDC、TARC の発現を認め、導管周囲に浸潤するリンパ球には、ケモカインレセプターである CXCR3 と CCR4 の発現を認めた。実験方法は「材料と方法」に示す。

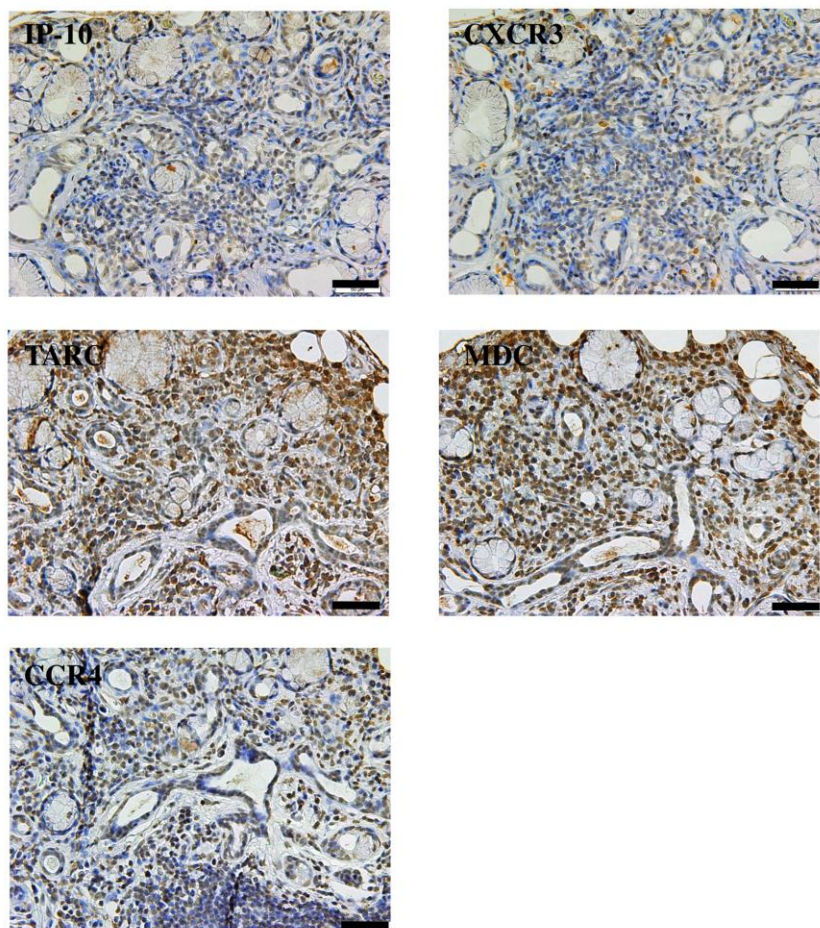


図 5b MD 患者の LSG におけるケモカインとケモカインレセプターの発現
 (代表症例のパラフィン包埋標本を用いた免疫組織化学染色: scale bars 50 μ m)
 導管上皮とその周囲に MDC と TARC の発現を認め、導管周囲に浸潤するリンパ球には、ケモカインレセプターである CCR4 の発現を認めた。実験方法は「材料と方法」に示す。

4. SS および MD 患者におけるの IgG4 産生に関わる分子の比較検討

前述のとおり IgG1 から IgG4 への特異的なクラススイッチには、Th2 タイプのサイトカインである IL-4 および Treg タイプのサイトカインである IL-10 の関与が報告されている (10, 11)。そこで、これらのサイトカインおよび Treg の転写因子である Foxp3 と病変局所の IgG4 産生との相関について検討した。

図 6a に示すように、SS では IgG4 の mRNA 発現量と IL-4、IL-10、および Foxp3 の mRNA 発現量との間に有意な相関は認められなかったが、MD では IgG4 の mRNA 発現量と IL-4、IL-10、および Foxp3 の mRNA 発現量との間に正の相関を認めた。

次に、免疫組織化学染色における IgG4 陽性細胞率と IL-4、IL-10、および Foxp3 の mRNA 発現量についても同様の検討を行った。その結果、IgG4 陽性細胞率と IL-4 との間には有意な相関関係は認められなかったものの、IL-10 と Foxp3 においては正の相関関係を認めた (図 6b)。

以上の結果より、IgG4 産生には IL-4、IL-10 両者が関与している可能性があり、特に、Treg が産生する IL-10 が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

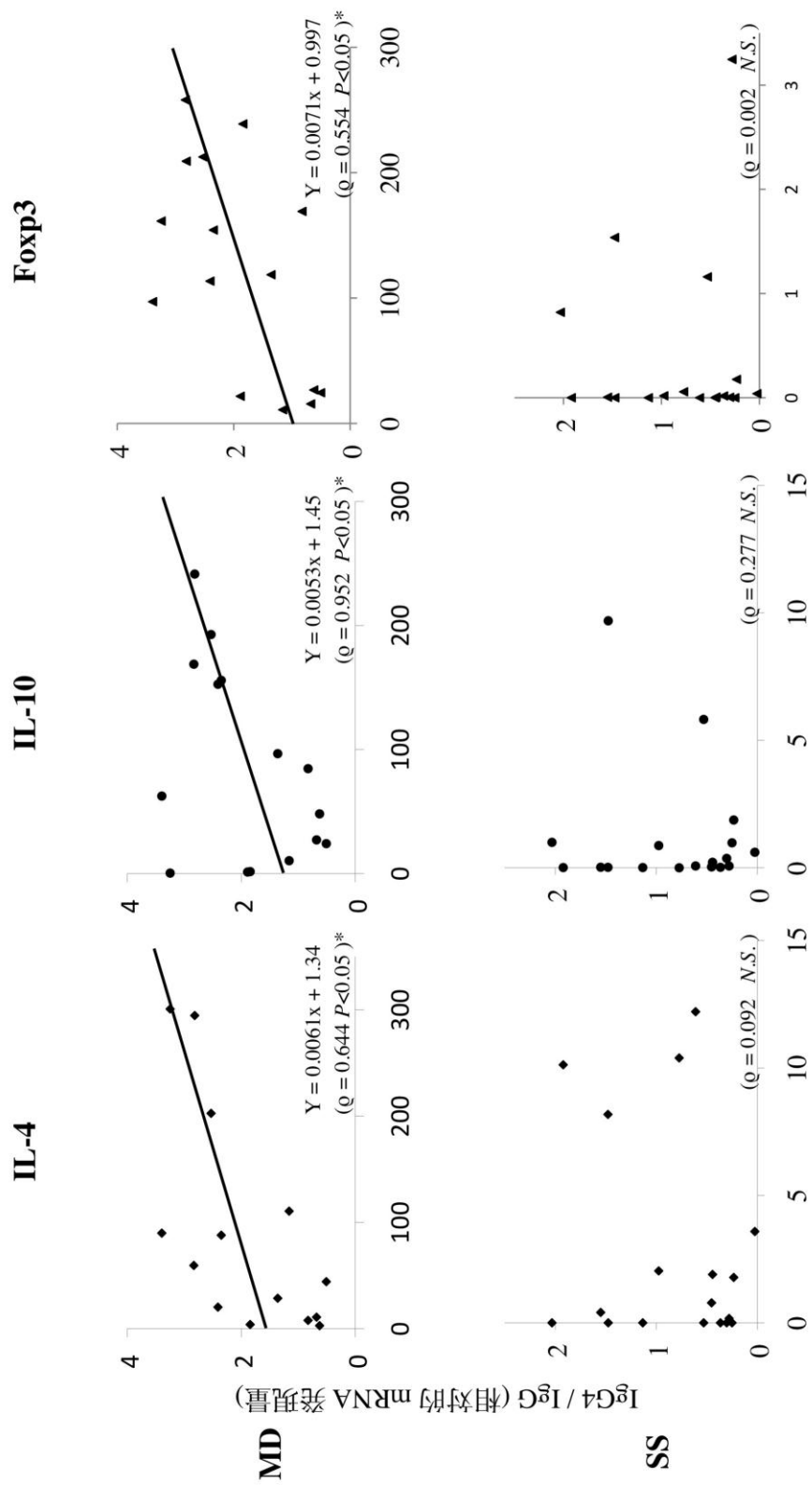


図 6a MD 患者と SS 患者の LSG における IgG4 とサイトカインの mRNA 発現量の相関

定量リアルタイム PCR を「材料と方法」に示すようにに行い、相対的な mRNA 発現量を算出した。IgG4 と IL-4、IL-10 および Foxp3 それぞれとの相関関係を示している。Spearman 順位相関係数 (* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$)、*N.S.* : not significant

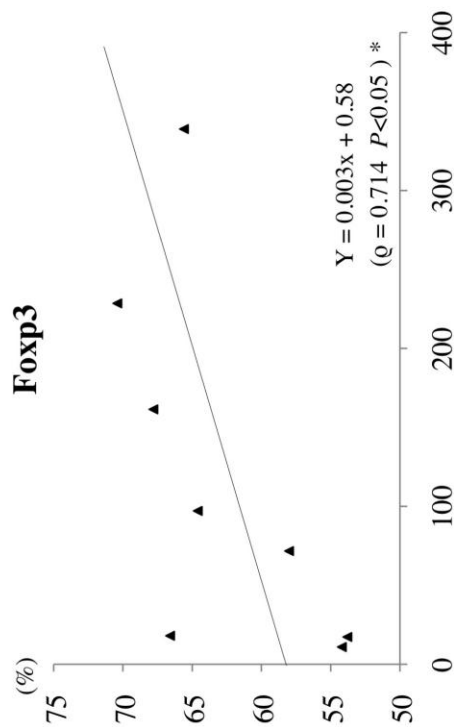
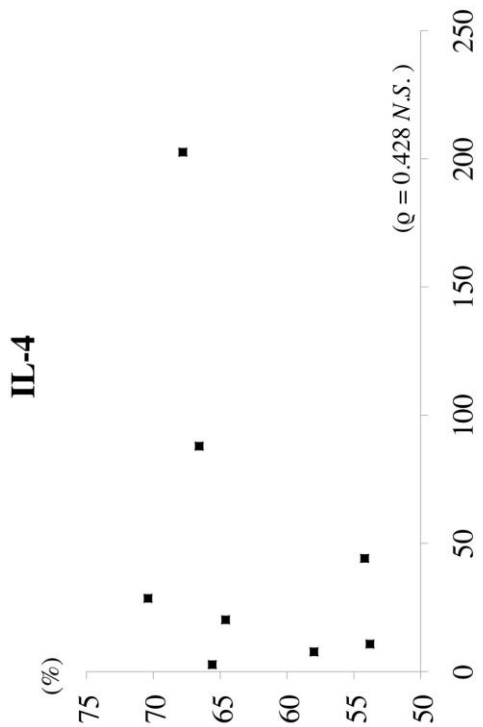
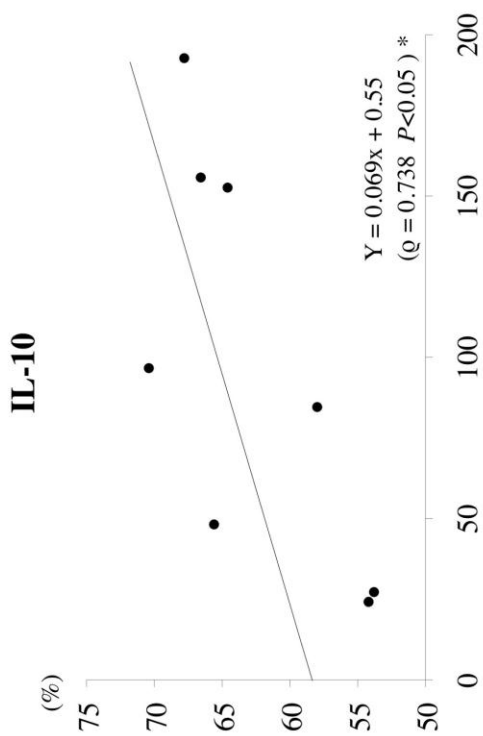


図 6b MD 患者の LSG における IgG4 陽性細胞率とサイトカインの mRNA 発現量の相関

IgG4 陽性細胞率を「材料と方法」に示すように算出した。定量リアルタイム PCR を「材料と方法」に示すように行い、相対的な mRNA 発現量を算出した。IgG4 陽性細胞率と IL-4、IL-10 および Fcγ3 それぞれとの相関関係を示している。Spearman 順位相関係数 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)、N.S.: not significant

考 察

SS と MD はともに涙腺、唾液腺の腫脹を呈する疾患でその臨床的な類似性が古くから言われてきた (1)。しかし、SS は涙腺、唾液腺にリンパ球などの炎症性細胞が導管周囲に浸潤し、導管と腺組織の破壊、機能障害をきたす自己免疫疾患であり、抗 SS-A/SS-B 抗体をはじめ、多くの自己抗体の出現を認めることが多い。SS における浸潤細胞の多くは CD4 陽性 T 細胞で、唾液腺上皮細胞に発現した HLA class II 分子を提示することで炎症が惹起されると考えられている (48)。一方、MD の原因はいまだ解明されていないが、病理組織学的な類似性から、これまでは SS の一亜型と認識されてきた (1)。しかし、最近になって臨床的所見、血清学的所見において SS とは異なる所見が報告されており (2)、さらに、MD は高 IgG4 血症を呈し、腺組織中に著明な IgG4 陽性細胞浸潤を認めることが明らかになり SS と MD は異なる病態であることが示唆されている (3)。

MD が SS と臨床的に異なる点としては特に次の 4 つがある。①涙腺・唾液腺の持続的な腫脹、②唾液腺分泌機能は正常か、機能障害を認めても軽～中程度、③高 γ グロブリン血症を呈し、抗 SS-A/SS-B 抗体はほとんど陰性、④ステロイド治療に対する反応性が良好、ということである (49)。今回の研究の対象者において、腺腫脹は SS では 13% にしか認められなかったが、MD では全例に認められ、その腫脹は 3 ヶ月以上わたる持続性のものであり、唾液分泌検査では、MD 患者は刺激時唾液分泌量の有意な減少はほとんど認めなかった。

今回の対象者ではみられなかったが、SS においても腺腫脹をきたすことはある。しかし、その腫脹は反復性であることが多く、唾液分泌検査でも SS では著明に減少している症例がほとんどであった。このことより、腺腫脹の期間や唾液分泌量検査の結果は SS と MD を鑑別する際の診断根拠の一つになり得ると考えられた。

耳下腺造影においては、MD では SS に特徴的な末梢導管や腺房の破壊を示す点状陰影は認められず、さらに、MD 患者の腫脹した顎下腺を造影した場合でも、耳下腺と同様に末梢導管の軽度の狭窄はみられるものの点状陰影は認められなかった。造影検査において点状陰影がみられなかった要因としては、MD では唾液腺導管の破壊がほとんど認められないため、導管からの造影剤の漏出がなかったことが考えられ、今回の結果を鑑みると、唾液腺造影は MD と SS の鑑別診断において非常に有用であることが示唆された。また、血清学的所見では、SS と MD の両者とも高 γ ガンマグロブリン血症を認め、さらに検索できた MD では全症例で高 IgG4 血症を認められた。また、SS に特異的な抗 SS-A/SS-B 抗体は SS では全症例陽性であったのに対し、MD では全症例陰性と明らかに異なる所見を示しており、両者を鑑別する際に抗 SS-A/SS-B 抗体検査は非常に有用な検査であると考えられる。さらに MD はステロイド治療によって症状が著明に改善されることが知られているが、これは MD の病態の主体が炎症性細胞の浸潤によるものであるため、ステロイドの抗炎症作用により腺の腫脹や腺分泌機能障害といった症状が改善するものと推察される。このように、治療後に腺機能が速やかに回復する点も MD の特徴的な臨床所見の 1 つであるが、罹患臓器に重度の炎症性細胞浸潤をこれだけ認めるにも関わらず、腺分

泌能が温存される機序については明らかにはされていない。そこで、本研究では SS と MD の LSG におけるリンパ球の浸潤様式の検討を行ったが、SS では導管周囲に重度のリンパ球浸潤を認め、導管の破壊像も認められ、一方、MD では、SS と同様に重度のリンパ球の浸潤を認めるものの、導管破壊像はほとんど認められなかった。このように、SS と MD では同程度に強いリンパ球浸潤を認めるが、病理組織像よりその浸潤様式と病態が異なることが明らかになった。これらのことは、先に述べた MD にはステロイド治療が著効することの裏付けとも考えられる。つまり、MD ではステロイドによって唾液腺への炎症性細胞浸潤が抑制されると、温存されていた導管上皮内の幹細胞が腺房の再生を促進させ、速やかに唾液分泌能が回復すると推察される。一方、SS は導管周囲への炎症性細胞浸潤により、導管が破壊され導管内の幹細胞が障害されるため、罹患期間の長い SS にステロイド治療を施しても、腺分泌機能の回復は期待できないと推察される (50)。

以上のように SS と MD ではリンパ球の浸潤様式に相違が認められるため、次に両疾患の病変局所における浸潤細胞の違いを明らかにするべく、免疫組織化学染色による検討を行った。今回結果は示していないが、T 細胞については SS と MD 間では明らかな違いは認められなかったが、MD では SS と比べ CD20 陽性 B 細胞の重度で広範な浸潤を認めた。また、MD では血清学的検査でも高値を認めた IgG4 陽性形質細胞も多数認められ、さらに IgG4 産生に関与するといわれている Treg の転写因子である Foxp3 の陽性細胞も認められた。このことより、SS と MD では浸潤様式に加え、浸潤するリンパ球サブセットが異なることが考えられた。

Mosmann と Sad がサイトカイン産生様式により Th1 細胞と Th2 細胞に大別できる事を報告して以来 (51)、多くの免疫反応による病態が Th1 病あるいは Th2 病という概念で理解されるようになり、Th1/Th2 バランスが疾患の発症、進行、予後に重大な影響を及ぼすことが明らかにされてきた。しかし近年、Th1・Th2 いずれでもない IL-17 を産生する Th17 と呼ばれる新たな Th サブセットの発見により、これまで Th1 より産生される IFN- γ や TNF によって制御されていると考えられてきた SS、慢性関節リウマチ、多発性硬化症、乾癬などの多くの自己免疫疾患が、この Th17 によって制御されていることが明らかにされている (19)。さらに、免疫系には免疫抑制機能を有した Treg と呼ばれる CD4 陽性 T 細胞サブセットが存在し、自己免疫、炎症、アレルギーといった病的な免疫応答を抑制的に制御することで免疫恒常性の維持に重要な機能を担っていることが明らかにされてきた (52)。今回の病変局所におけるサイトカインの検討では、SS では Th1、Th2、Th17 タイプのサイトカインの発現の亢進がみられた。SS は、これまで Th1 疾患として定義されてきたが、最近では Th17 が発症に関与するという報告があり (53)、今回の結果はその報告と矛盾しないものであった。一方、MD では Th2 および Treg タイプのサイトカインの発現亢進が認められ、SS でみられた Th17 の発現はみられなかった。過去にわれわれは、MD 患者の PBMC を用いて、ステロイド治療前後の全身における Th1/Th2 バランスの検討を行ったが、治療前は Th2 優位であり、ステロイド治療後には Th1 にシフトしたことから、MD は Th2 疾患と推察された (54)。さらに、Treg の転写因子である Foxp3 陽性細胞の発現を MD でのみ認めたことから、MD の病態形成には Th2 だけでなく Treg の関与も示唆される結果が得られた。し

かし、これらの Th 細胞の病変局所への選択的な浸潤についてはいまだ報告がない。

そこで、本研究では Th 細胞の遊走因子であるケモカインとケモカインレセプターに注目し、SS と MD の病変局所におけるこれらの分子の mRNA 発現量を検討した。ケモカインはサイトカインの一種で、ケモカインレセプター発現細胞を遊走・活性化させる作用をもち、免疫系細胞を局所に誘導する役割を果たしている。慢性関節リウマチでは滑膜組織で産生されているケモカインと炎症性細胞上に発現するケモカインレセプターにより滑膜細胞に選択的に浸潤・凝集していると考えられている (55)。他にも、SS (33)、アレルギー性皮膚炎 (56)、全身性エリテマトーデス (56, 57)、全身性硬化症 (56, 57)、アトピー性皮膚炎 (58) 等の自己免疫疾患でも ケモカインとの関連が報告されている。今回の結果では、SS では Th1 および Th2 両タイプの発現が亢進している一方で、MD は Th2 タイプのみの発現が亢進しており、サイトカインの解析とほぼ同様の結果を得た。さらに、免疫組織化学染色にてその局在を確認したところ、SS では、導管上皮細胞やその周囲に Th1 と Th2 タイプのケモカインの発現がみられ、それぞれのレセプターが導管周囲に浸潤するリンパ球に認められた。一方、MD では導管上皮とその周囲に Th2 タイプのケモカインである MDC、TARC が、その周囲のリンパ球にケモカインレセプターである CCR4 の発現が認められた。われわれは今まで SS の唾液腺導管上皮細胞が、ノンプロフェッショナル抗原提示細胞として働いている可能性を報告してきたが (59)、本研究の結果より、MD でも導管上皮細胞とその周囲にケモカイン、ケモカインレセプターの発現を認めたことから、MD においても導管上皮細胞が抗原提示細胞様の機能

をはたしてしていると考えられ、Th1/Th2 バランスを Th2 へシフトさせることで MD の病態形成がなされていることが示唆された。

以上の結果から、本研究では MD において Th2 および Treg の関連分子が発現されていることが確認され、特に IL-10 や TGF- β といった Treg が主に産生する制御性サイトカインの病変局所での産生が亢進している点は、MD における IgG4 の産生に重要な意味を持つと考えられた。つまり、IL-10 は Treg や Th2 などが産生し免疫反応を抑制する働きをするが、前述のとおり IL-4 とともに IgG4 の特異的なクラススイッチに重要とされている (10-12)。本研究では、IL-4、IL-10 および Foxp3 の mRNA 発現量と IgG4 の mRNA 発現量および IgG4 陽性細胞率との間に正の相関が認められたことから、IgG4 の産生にはこれらのサイトカインが深く関与している可能性が示唆された。特に IL-10 と Foxp3 については、IL-4 より強い相関を示し IgG4 産生と関連を認めたことから、IL-10 は 主に Treg から産生されることが示唆された。しかし、通常 Treg は免疫を抑制する過程で機能しており、IgG4 は喘息やアレルギー疾患においてはアレルゲンと IgE 抗体の反応を阻止する遮断抗体でもあることが知られている (60)。したがって、IgG4 関連疾患における血中 IgG4 の上昇や IgG4 陽性形質細胞浸潤により組織障害が生じているのではなく、組織障害に伴って過剰産生されている可能性が報告されている (61)。

今回の研究結果から、MD は SS とは臨床的にも免疫学的にも明らかに異なる病態を呈し、MD は Th2 および Treg の免疫反応を主体とした特有な疾患であることが示唆された。MD と SS の鑑別には、臨床症状のほかに唾液腺の機能検査や IgG4 以外の血清学的検査も非常に有用であることが示唆された。し

かし、IgG4 関連疾患は全身に症状を呈する疾患である。その病態は臓器ごとにさまざまな特徴を有しており、各疾患の診断基準は確立されつつあるものの、多臓器共通の診断基準についてはいまだ検討中である。今回の対象患者に対して行った口唇腺生検は、生検が困難とされている膵臓や腎臓の IgG4 関連疾患が疑われる際、その診断として用いられる場合もある。今後はこの口唇腺生検が MD 以外の IgG4 関連疾患においても、有用な検査法の一つとなることをさらに検討していきたい。

また、MD をはじめ IgG4 関連疾患の治療においてはステロイド療法が主流となっているが、再燃する症例もあり根本的な治療法は確立されておらず、その病因・病態についてはいまだ不明な点が多い。IgG4 関連疾患は高 γ グロブリン血症を呈し、病変局所への形質細胞の著明な浸潤も認め、さらにステロイド治療が著効することから、その発症に自己免疫機序の関与が当初から考えられ研究が進められてきた。しかし、抗原抗体反応の関与が推察される報告 (62) はあるものの、現時点で SS で認められているような疾患特異的な自己抗体は確認されておらず、罹患組織へのグロブリンの沈着も一部の症例でしか確認されていない。また、涙腺組織に浸潤する IgG4 陽性形質細胞と PBMC のクロナリティの研究ではポリクローナルな病態であることが明らかにされている (63)。これにより、浸潤していた IgG4 陽性形質細胞は特定の抗原ではなく、様々な抗原と免疫反応を起こしているものと推測される。最近では、IgG4 関連疾患のひとつである AIP は多因子性遺伝子疾患と考えられており、Treg 上に発現している制御因子である cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CTLA4) の遺伝子多型が、AIP の発症に関与する可能性が報告されている (64, 65)。CTLA4 は Treg に高

発現しており、Foxp3 がその発現を制御することで免疫寛容において重要な働きをしていることが明らかにされてきた (66)。今回の研究では MD の IgG4 の産生および病態形成に Treg が強く関与している可能性を提示したが、CTLA4 の異常により Treg の機能異常がおこることで免疫寛容が破綻し、さらに Th1/Th2 バランスに偏位が生じている可能性が考えられる。今後は Treg の浸潤を誘導する更に上流にある免疫応答の解明が、IgG4 関連疾患の病態のさらなる理解につながると考える。

以上のように、MD の発症の一端には Th1/Th2 バランスが関与している可能性が十分示唆されたが、さらなる検討が必要である。

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林田淳之将助教、森山雅文先生に深謝致します。また、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. Morgan WS and Castleman B. A clinicopathologic study of Mikulicz's disease. *Am J Pathol* 1953;29:471-503.
2. Yamamoto M, Harada S, Ohara M, Suzuki C, Naishiro Y, Yamamoto H, *et al.* Clinical and pathological differences between Mikulicz's disease and Sjogren's syndrome. *Rheumatology (Oxford)* 2005;44:227-34.
3. Yamamoto M, Takahashi H, Ohara M, Suzuki C, Naishiro Y, Yamamoto H, *et al.* A new conceptualization for Mikulicz's disease as an IgG4-related plasmacytic disease. *Mod Rheumatol* 2006;16:335-40.
4. 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.
5. 山本元久, 小原美琴子, 鈴木知佐子, 岡俊州, 苗代康可, 山本博幸, *et al.* ステロイド療法により耐糖能障害の改善を認めた自己免疫性膵炎合併 Mikulicz 病の 1 例. *日本臨床免疫学会雑誌(0911-4300)* 2005;28:349-56.
6. Hamano H, Kawa S, Uehara T, Ochi Y, Takayama M, Komatsu K, *et al.* Immunoglobulin G4-related lymphoplasmacytic sclerosing cholangitis that mimics infiltrating hilar cholangiocarcinoma: part of a spectrum of autoimmune pancreatitis? *Gastrointest Endosc* 2005;62:152-7.
7. Saeki T, Nishi S, Ito T, Yamazaki H, Miyamura S, Emura I, *et al.* Renal lesions in IgG4-related systemic disease. *Intern Med* 2007;46:1365-71.
8. 崎山幸雄. IgG サブクラス欠乏症. *Medical Immunology* 1989;17:105-10.
9. Spiegelberg HL. Biological activities of immunoglobulins of different classes and subclasses. *Adv Immunol* 1974;19:259-94.
10. Jeannin P, Lecoanet S, Delneste Y, Gauchat JF, and Bonnefoy JY. IgE versus IgG4 production can be differentially regulated by IL-10. *J Immunol* 1998;160:3555-61.
11. Meiler F, Klunker S, Zimmermann M, Akdis CA, and Akdis M. Distinct regulation of IgE, IgG4 and IgA by T regulatory cells and toll-like receptors. *Allergy* 2008;63:1455-63.

12. Satoguina JS, Weyand E, Larbi J, and Hoerauf A. T regulatory-1 cells induce IgG4 production by B cells: role of IL-10. *J Immunol* 2005;174:4718-26.
13. Zen Y, Fujii T, Harada K, Kawano M, Yamada K, Takahira M, *et al.* Th2 and regulatory immune reactions are increased in immunoglobulin G4-related sclerosing pancreatitis and cholangitis. *Hepatology* 2007;45:1538-46.
14. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, and Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986;136:2348-57.
15. Merrill JE, Kono DH, Clayton J, Ando DG, Hinton DR, and Hofman FM. 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* 1992;89:574-8.
16. Kennedy MK, Torrance DS, Picha KS, and Mohler KM. 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* 1992;149:2496-505.
17. Rapoport MJ, Jaramillo A, Zipris D, Lazarus AH, Serreze DV, Leiter EH, *et al.* Interleukin 4 reverses T cell proliferative unresponsiveness and prevents the onset of diabetes in nonobese diabetic mice. *J Exp Med* 1993;178:87-99.
18. Ohyama Y, Nakamura S, Matsuzaki G, Shinohara M, Hiroki A, Fujimura T, *et al.* Cytokine messenger RNA expression in the labial salivary glands of patients with Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1996;39:1376-84.
19. Infante-Duarte C, Horton HF, Byrne MC, and Kamradt T. Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells. *J Immunol* 2000;165:6107-15.
20. Ziolkowska M, Koc A, Luszczkiewicz G, Ksiezopolska-Pietrzak K, Klimczak E, Chwalinska-Sadowska H, *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* 2000;164:2832-8.
21. Teunissen MB, Koomen CW, de Waal Malefyt R, Wierenga EA, and Bos JD. Interleukin-17 and interferon-gamma synergize in the enhancement of proinflammatory cytokine production by human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1998;111:645-9.
22. Sakaguchi S. Naturally arising CD4⁺ regulatory t cells for immunologic

- self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 2004;22:531-62.
23. Luster AD. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 1998;338:436-45.
 24. Kelner GS, Kennedy J, Bacon KB, Kleyensteuber S, Largaespada DA, Jenkins NA, *et al.* Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokine. *Science* 1994;266:1395-9.
 25. Rabin RL, Park MK, Liao F, Swofford R, Stephany D, and Farber JM. Chemokine receptor responses on T cells are achieved through regulation of both receptor expression and signaling. *J Immunol* 1999;162:3840-50.
 26. Murdoch C and Finn A. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood* 2000;95:3032-43.
 27. Wyszocki CA, Panoskaltsis-Mortari A, Blazar BR, and Serody JS. Leukocyte migration and graft-versus-host disease. *Blood* 2005;105:4191-9.
 28. Haskell CA, Hancock WW, Salant DJ, Gao W, Csizmadia V, Peters W, *et al.* Targeted deletion of CX3CR1 reveals a role for fractalkine in cardiac allograft rejection. *The Journal of Clinical Investigation* 2001;108:679-88.
 29. Kim SH, Cleary MM, Fox HS, Chantry D, and Sarvetnick N. CCR4-bearing T cells participate in autoimmune diabetes. *J Clin Invest* 2002;110:1675-86.
 30. Yamagami S, Ebihara N, and Amano SY. Chemokine receptor gene expression in giant papillae of atopic keratoconjunctivitis. *Mol Vis* 2005;11:192-200.
 31. Wenzel J, Henze S, Worenkamper E, Basner-Tschakarjan E, Sokolowska-Wojdylo M, Steitz J, *et al.* Role of the chemokine receptor CCR4 and its ligand thymus- and activation-regulated chemokine/CCL17 for lymphocyte recruitment in cutaneous lupus erythematosus. *J Invest Dermatol* 2005;124:1241-8.
 32. Sorensen TL, Ransohoff RM, Strieter RM, and Sellebjerg F. Chemokine CCL2 and chemokine receptor CCR2 in early active multiple sclerosis. *Eur J Neurol* 2004;11:445-9.
 33. Ogawa N, Ping L, Zhenjun L, Takada Y, and Sugai S. Involvement of the interferon-gamma-induced T cell-attracting chemokines, interferon-gamma-inducible 10-kd protein (CXCL10) and monokine induced by interferon-gamma (CXCL9), in the salivary gland lesions of patients with

- Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 2002;46:2730-41.
34. Ogawa N, Kawanami T, Shimoyama K, Ping L, and Sugai S. Expression of interferon-inducible T cell alpha chemoattractant (CXCL11) in the salivary glands of patients with Sjogren's syndrome. *Clin Immunol* 2004;112:235-8.
 35. Greenspan JS, Daniels TE, Talal N, and Sylvester RA. The histopathology of Sjogren's syndrome in labial salivary gland biopsies. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1974;37:217-29.
 36. Fujibayashi T, Sugai S, Miyasaka N, Hayashi Y, and Tsubota K. Recised Japanese criteria for Sjögren's syndrome (1999): availability and validity. *Mod Rheumatol* 2004;14:425-34.
 37. Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R, Moutsopoulos HM, Alexander EL, Carsons SE, *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* 2002;61:554-8.
 38. Yamamoto M, Takahashi H, and Shinomura Y. Mikulicz's disease and its extraglandular lesions. *Curr Immunol Rev.*;in press:
 39. 高橋裕樹, 山本元久, 日本シェーグレン症候群研究会 編, 住田孝之 監, and 江口勝美. IgG4 関連疾患. シェーグレン症候群の診断と治療マニュアル 2009p172-84.
 40. 石川梧朗, 小守昭, and 他. sjögren 症候群における口唇腺生検の診断的価値. *日本口腔科学会誌* 1979;38:3-6.
 41. Rubin P and Holt JF. Secretory sialography in diseases of the major salivary glands. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med* 1957;77:575-98.
 42. Hiroki A, Nakamura S, Shinohara M, Gondo H, Ohyama Y, Hayashi S, *et al.* A comparison of glandular involvement between chronic graft-versus-host disease and Sjogren's syndrome. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1996;25:298-307.
 43. Nakamura S, Hiroki A, Shinohara M, Gondo H, Ohyama Y, Mouri T, *et al.* Oral involvement in chronic graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1996;82:556-63.
 44. Ohyama Y, Nakamura S, Matsuzaki G, Shinohara M, Hiroki A, Oka M, *et al.* T-cell receptor V alpha and V beta gene use by infiltrating T cells in labial glands of patients with Sjogren's syndrome. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*

- Oral Radiol Endod 1995;79:730-7.
45. Mouri T, Nakamura S, Ohyama Y, Matsuzaki G, Shinohara M, Kishihara K, *et al.* T cell receptor V alpha and V beta gene usage by tumour-infiltrating lymphocytes in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother* 1996;43:10-8.
 46. Sasaki M, Nakamura S, Ohyama Y, Shinohara M, Ezaki I, Hara H, *et al.* Accumulation of common T cell clonotypes in the salivary glands of patients with human T lymphotropic virus type I-associated and idiopathic Sjogren's syndrome. *J Immunol* 2000;164:2823-31.
 47. Kawamura E, Nakamura S, Sasaki M, Ohyama Y, Kadana T, Kumamaru W, *et al.* Accumulation of oligoclonal T cells in the infiltrating lymphocytes in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* 2003;32:282-9.
 48. Sumida T, Matsumoto I, Maeda T, and Nishioka K. T-cell receptor in Sjogren's syndrome. *Br J Rheumatol* 1997;36:622-9.
 49. Yamamoto M, Takahashi H, Sugai S, and Imai K. Clinical and pathological characteristics of Mikulicz's disease (IgG4-related plasmacytic exocrinopathy). *Autoimmun Rev* 2005;4:195-200.
 50. Kong L, Ogawa N, Nakabayashi T, Liu GT, D'Souza E, McGuff HS, *et al.* Fas and Fas ligand expression in the salivary glands of patients with primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1997;40:87-97.
 51. Mosmann TR and Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 1996;17:138-46.
 52. Coutinho A BA. Tolerize one, tolerize them all: tolerance is self-assertion. *Immunol today* 1989;10:264-6.
 53. Nguyen CQ, Hu MH, Li Y, Stewart C, and Peck AB. Salivary gland tissue expression of interleukin-23 and interleukin-17 in Sjogren's syndrome: findings in humans and mice. *Arthritis Rheum* 2008;58:734-43.
 54. Miyake K, Moriyama M, Aizawa K, Nagano S, Inoue Y, Sadanaga A, *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* 2008;18:86-90.
 55. Nanki T, Hayashida K, El-Gabalawy HS, Suson S, Shi K, Girschick HJ, *et al.* Stromal cell-derived factor-1-CXC chemokine receptor 4 interactions play a

- central role in CD4⁺ T cell accumulation in rheumatoid arthritis synovium. *J Immunol* 2000;165:6590-8.
56. Lee EY, Lee ZH, and Song YW. CXCL10 and autoimmune diseases. *Autoimmun Rev* 2009;8:379-83.
 57. Fragoso-Loyo H, Richaud-Patin Y, Orozco-Narvaez A, Davila-Maldonado L, Atisha-Fregoso Y, Llorente L, *et al.* Interleukin-6 and chemokines in the neuropsychiatric manifestations of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2007;56:1242-50.
 58. Miyahara H, Okazaki N, Nagakura T, Korematsu S, and Izumi T. Elevated umbilical cord serum TARC/CCL17 levels predict the development of atopic dermatitis in infancy. *Clin Exp Allergy* 2010
 59. Moser B, Wolf M, Walz A, and Loetscher P. Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *Trends Immunol* 2004;25:75-84.
 60. Aalberse RC and Schuurman J. IgG4 breaking the rules. *Immunology* 2002;105:9-19.
 61. Okazaki K, Uchida K, and Fukui T. Recent advances in autoimmune pancreatitis: concept, diagnosis, and pathogenesis. *J Gastroenterol* 2008;43:409-18.
 62. Yamada K, Kawano M, Inoue R, Hamano R, Kakuchi Y, Fujii H, *et al.* Clonal relationship between infiltrating immunoglobulin G4 (IgG4)-positive plasma cells in lacrimal glands and circulating IgG4-positive lymphocytes in Mikulicz's disease. *Clin Exp Immunol* 2008;152:432-9.
 63. Kojima M, Sipos B, Klapper W, Frahm O, Knuth HC, Yanagisawa A, *et al.* Autoimmune pancreatitis: frequency, IgG4 expression, and clonality of T and B cells. *Am J Surg Pathol* 2007;31:521-8.
 64. Chang MC, Chang YT, Tien YW, Liang PC, Jan IS, Wei SC, *et al.* T-cell regulatory gene CTLA-4 polymorphism/haplotype association with autoimmune pancreatitis. *Clin Chem* 2007;53:1700-5.
 65. Umemura T and Higashi Y. Endothelial progenitor cells: therapeutic target for cardiovascular diseases. *J Pharmacol Sci* 2008;108:1-6.
 66. Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T, Miyara M, Fehervari Z, *et al.* CTLA-4 control over Foxp3⁺ regulatory T cell function. *Science* 2008;322:271-5.

