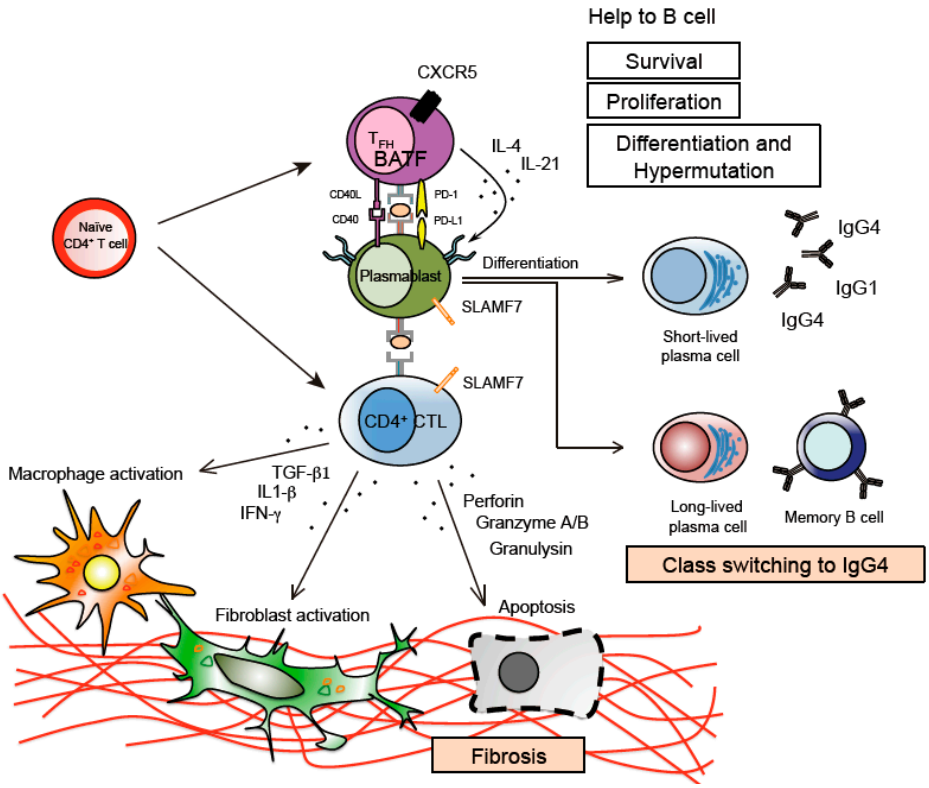
205　日米共同研究IgG4関連疾患の病因解明への新戦略	前原　隆

【目的】本邦から提唱された IgG4 関連疾患（IgG4-related disease : IgG4-RD）は、高 IgG4 血症と罹患臓器への IgG4 陽性形質細胞の著名な浸潤、特徴的な花筵用線維化ならびに閉塞性静脈炎を呈する慢性炎症性疾患である。現在その治療にはステロイドが第一選択薬で有効である反面、ステロイド維持療法において累積ステロイド投与量の増加に伴う副作用のリスクや活動性の高い症例では再発率は極めて高いなど問題となっている。そのため病因究明と新規治療法の確立が求められている。これまで我々は、IgG4 関連疾患の罹患臓器における $CD4^+$cytotoxicT（$CD4^+$CTL）細胞による慢性炎症性線維化について報告してきた。さらに特異的に IgG4 へクラススイッチしている疾患であり、この免疫学的特異性を標的にする分子標的薬が新規治療として有効ではないかと大いに期待できる。

濾胞性ヘルパーT（Tfh）細胞は主に Interleukin-21（IL-21）を産生し、胚中心の形成や B 細胞の成熟と活性化、抗体産生細胞への分化制御などの役割を担う $CD4^+$T 細胞である。IgG4 関連疾患の罹患臓器では拡大した胚中心が過形成されており、また血中にはオリゴクローナルに増殖した $IgG4^+$Plasmablast が多数認められる。さらに特定の免疫グロブリンが上昇するクラススイッチング病変であることを考えると、Tfh 細胞が病態形成に大きく関与している可能性が想定される。しかしながら、サイトカイン産生による機能的に区別された Tfh 細胞と各免疫グロブリンのクラススイッチに関する報告はなかった。

【方法と結果】そこで本研究では、クラススイッチに関与するサイトカインである IL-4 に着目した。クラススイッチが実際に起こっているヒトリンパ組織を用いて IL-4 産生 Tfh 細胞を IL-4 Capture アッセイにてソーティングし、その遺伝子発現を解析した。その結果、IL-4 産生 Tfh 細胞は non-IL-4Tfh 細胞とは異なる遺伝子群を発現しており、B 細胞との相互作用に関連した遺伝子や特徴的な遺伝子（*BATF*、*ICOS*、*CD40L*、*IL-21R*、*PD1*、*CD200*）が特に上昇していた。この $IL\text{-}4^+$Tfh 細胞は IgG4 関連疾患患者の胚中心形成部位とその周囲で増加しており、*in vivo* で血清 IgG4 値と正の相関を認めた。

IgG4 関連疾患の病態形成におけるモデル



205. 日米共同研究 IgG4 関連疾患の病因解明への新戦略

前原　隆

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

Key words：IgG4 関連疾患，クラススイッチ，B 細胞、$CD4^+$T 細胞，Tfh

緒　言

本邦から提唱された IgG4 関連疾患（IgG4-relateddisease：IgG4-RD）は、高 IgG4 血症と罹患臓器への IgG4 陽性形質細胞の著名な浸潤、特徴的な花筵用線維化ならびに閉塞性静脈炎を呈する慢性炎症性疾患である。現在その治療にはステロイドが第一選択薬で有効である反面、ステロイド維持療法において累積ステロイド投与量の増加に伴う副作用のリスクや活動性の高い症例では再発率は極めて高いなど問題となっている。そのため病因究明と新規治療法の確立が求められている。IgG4 関連疾患は特異的に IgG4 へクラススイッチしている疾患であり、その免疫学的特異性を標的にする分子標的薬が新規治療として有効ではないかと大いに期待できる。

濾胞性ヘルパーT（Tfh）細胞は主に IL-21 を産生し、胚中心の形成や B 細胞の成熟と活性化、抗体産生細胞への分化制御などの役割を担う $CD4^+$T 細胞である。IgG4 関連疾患の罹患臓器では拡大した胚中心が過形成されており、また血中にはオリゴクローナルに増殖した $IgG4^+$Plasmablast が多数認められる。さらに特定の免疫グロブリンが上昇するクラススイッチング病変であることを考えると、Tfh 細胞が病態形成に大きく関与している可能性が想定される。しかしながら、サイトカイン産生による機能的に区別された Tfh 細胞と各免疫グロブリンのクラススイッチに関する報告はなかった。

そこで本研究では、IgG4 関連疾患患者の検体を用いて、クラススイッチに関与するサイトカインである IL-4 に着目し、IL-4 産生 Tfh 細胞を同定し、この細胞と IgG4 産生への関与について *in vivo* で検討した。

方法および結果

1.　IL-4 産生 Tfh 細胞の特異的マーカーの同定

Tfh 細胞は主に IL-21 を産生し、胚中心の形成や B 細胞の成熟と活性化、抗体産生細胞への分化制御などの役割を担う $CD4^+$T 細胞である［5］。*In-vitro* の研究でヒトの末梢血よりソーティングされた Tfh 細胞と naïveB 細胞の共培養により抗体産生する形質芽細胞が分化誘導されることが報告されている［6］。実際に、過剰な自己抗体産生があるヒト自己免疫疾患患者においても、血中の Tfh 細胞の病因への関与が報告されている。一方、IgG4 関連疾患の罹患臓器では拡大した胚中心が過形成されており［7］、また血中にはオリゴクローナルに増殖した $IgG4^+$Plasmablast が多数認められる［8］。さらに特定の免疫グロブリンが上昇するクラススイッチング病変であることを考えると、Tfh 細胞が病態形成に大きく関与している可能性が想定される。

これまでヒトの末梢血 memory Tfh 細胞に関する研究成果は多数あるが、実際にクラススイッチが生じているリンパ組織での Tfh 細胞に関する検討はなされていなかった。そこでまずは、ヒトリンパ器官に存在する Tfh 細胞に焦点をあてその産生サイトカインに注目して検討を行った。

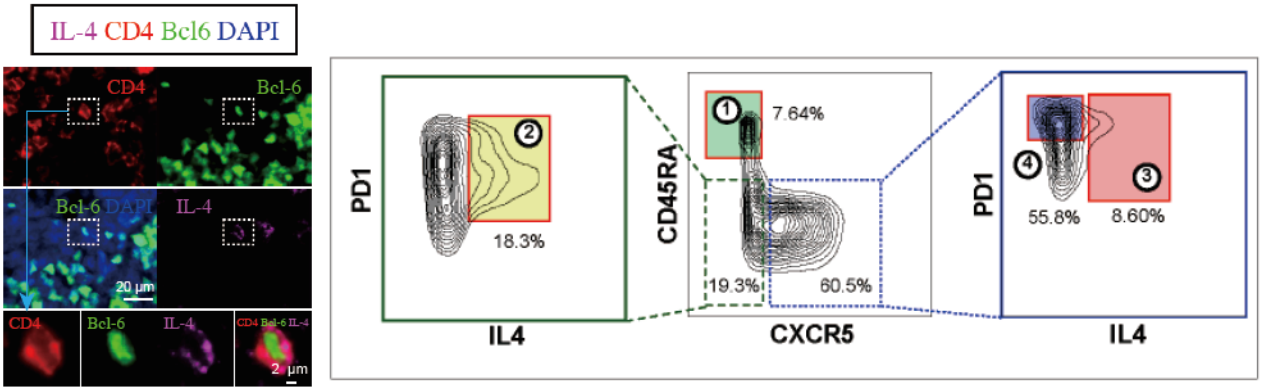


Fig.1　Identification for IL-4 secreting Tfh cells

Left) Immunofluorescence staining of CD4 (red), Bcl-6 (green), IL-4 (magenta) and DAPI (blue) in normal tonsil.

Right) Gating strategy used to sort IL-4 secreting and non-secreting tonsillar $CD45RA^{+}CXCR5^{+}$ Tfh cells following anti-CD3/anti-CD28 stimulation. $CD45RA^{+}CXCR5^{-}$ cells, and $CD45RA^{-}CXCR5^{-}IL\text{-}4^{+}$ cells were sorted as additional controls.

健常者リンパ組織を用いて、多重蛍光免疫染色により $IL\text{-}4^{+}CD4^{+}Bcl6^{+}$Tfh 細胞を同定した（Fig.1Left）。さらに IL-4 Capture アッセイにより IL-4 産生する Tfh 細胞を分離しシングルセルレベルで遺伝子発現解析を行なった（Fig.1 Right）。その結果、Fig.1 Right ③に示す IL-4 産生 Tfh 細胞ではいくつか特徴的な遺伝子（*BATF*、*ICOS*、*CD40L*、*IL-21R*、*PD1*、*CD200*）の増加を認めた。クラススイッチに関与するとされる Tfh 細胞が IL-4 産生しており、これらの Tfh 細胞は、IL-4 産生していないものと比べて、より活性化されたポピュレーションであり、B 細胞刺激への共刺激分子を強く発現していることが明らかとなった。

2. $IL\text{-}4^{+}$Tfh 細胞の IgG4 関連疾患への関与

$IL\text{-}4^{+}$Tfh 細胞に特徴的な分子について、IgG4 関連疾患の罹患臓器を用いて、多重蛍光免疫染色法にてその発現を解析し、臨床データとして高 IgG4 血症との関連を検討した。

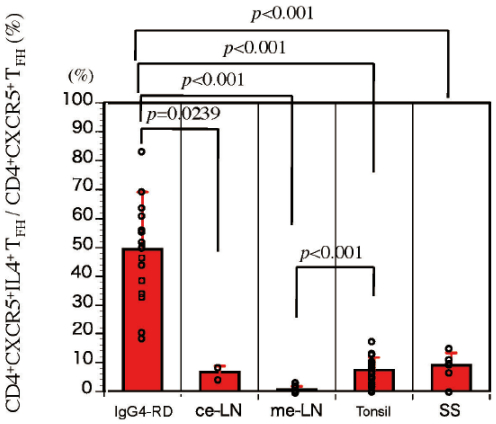


Fig.2　Quantification of $CD4^{+}CXCR5^{+}IL\text{-}4^{+}$ and $CD4^{+}CXCR5^{+}$ Tfh cells in various tissues

IgG4-RD：17 IgG4-RD Salivary mandibular glands, ce-LN：2 cervical lymph nodes, me-LN：3 mesenteric lymph nodes, Tonisl：12 tonsils, SS：7 Sjogren's syndrome labial salivary glands. *P* value is based on Mann-Whitney *U* test.

IgG4 関連疾患患者の 2 次リンパ節や 3 次リンパ節において、IL-4 産生 Tfh 細胞が健常者やシェーグレン症候群と比較して増加していることが明らかとなった（Fig.2）。

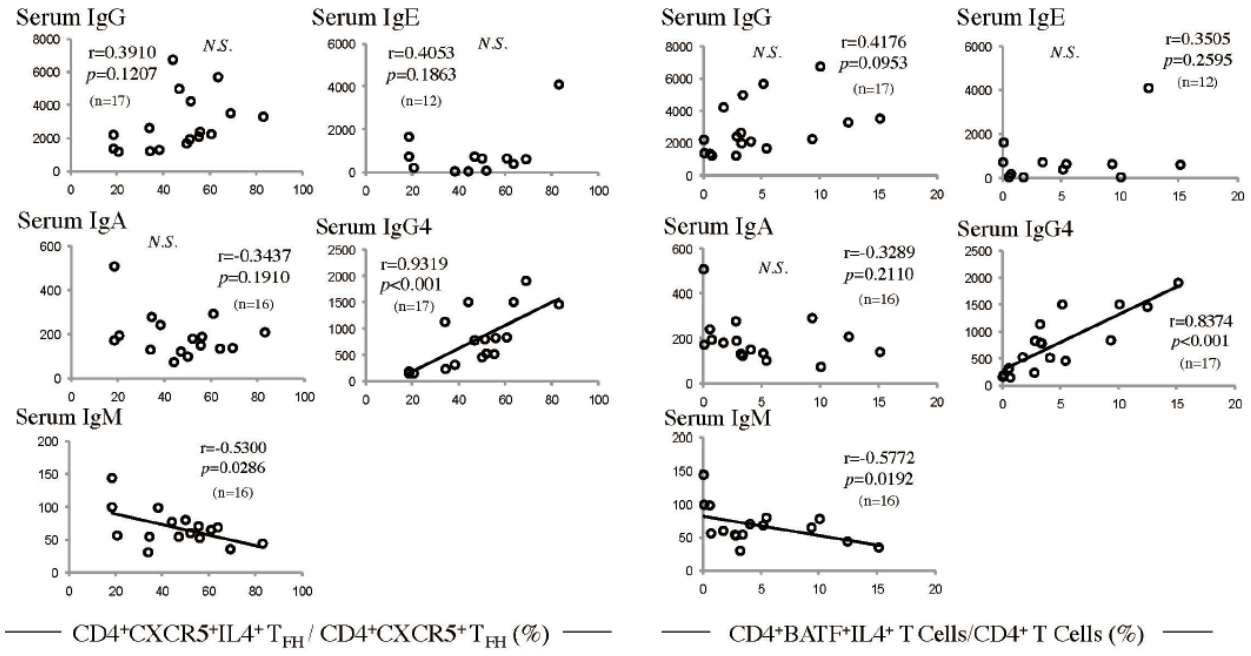


Fig.3　Correlation of the proportion of $CD4^+CXCR5^+IL\text{-}4^+$ Tfh cells and $CD4^+BATF^+IL\text{-}4^+$ T cells in salivary mandibular glands from IgG4-RD patients and their serum IgG, IgA, IgE, IgM or IgG4 levels.
The correlation coefficients and *P* value were determined using Spearman's rank correlations.

IgG4 関連疾患患者の罹患臓器における $IL\text{-}4^+$Tfh／Tfh（%）は、血清 IgG4 値と正の相関を示し、血清 IgM とは負の相関を示すことが明らかとなった（Fig. 3）。

考　察

以上の結果より、IgG4 関連疾患におけるクラススイッチのメカニズムについてその機序を考察する（Fig.4）。IgG4 関連疾患患者の罹患臓器における *in situ*、*in vivo* study により 2 次リンパ節（SLOs）および 3 次リンパ節（TLOs）の濾胞外に $IL\text{-}4^+$Tfh 細胞が多数浸潤していることが明らかとなった。この $IL\text{-}4^+$Tfh 細胞は、胚中心の外で $IgG4^+$B 細胞と cell-cell contact していることがわかった。実際にタンパクレベルでも $IL\text{-}4^+$Tfh 細胞は、共刺激分子である ICOS や CD40L を発現しており、contact している B 細胞には免疫グロブリンのクラススイッチや親和性成熟に必須である AID の発現を認めた。これらの B 細胞は、濾胞外で IgG4 を産生する Short-lived Plasmablast に分化するもの、また胚中心へ移動し親和性成熟を受けるものがある。末梢血中の IgG4 を産生する $CD19^+$ CD20- CD27hiCD38hiPlasmablasts はオリゴクローナルに増殖しており、これらの胚中心由来と考えられる。また $IgG4^+$ Plasmacell／Plasmablasts のいくつかは Bonemarrow において Long-lived Plasmacell へと分化する可能性が示唆される［9］。

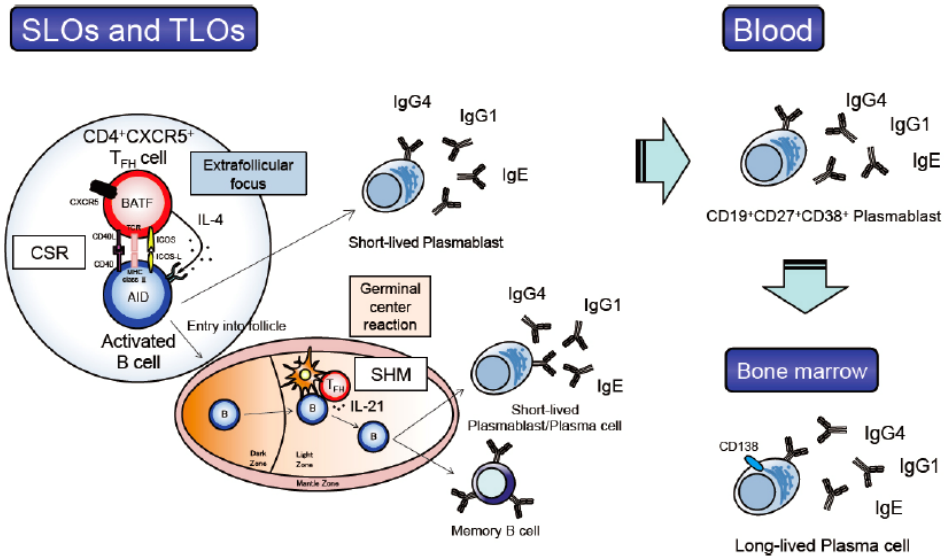


Fig.4　Tfh-B 細胞の機能連関による抗体産生 plasma cells／plasmablasts の分化モデル
CSR：Class-switch recombination, SH：Somatic hypermutation.

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、ハーバード大学 Ragon Institute of MGH, MIT and Harvard の Shiv Pillai 教授である。

文　献

1) Maehara T, Moriyama M, Nakamura S: Pathogenesis of IgG4-related disease: a critical review. Odontology 2018. PMID: 30019169 DOI: 10.1007/s10266-018-0377-y

2) Maehara T, Mattoo H, Ohta M, Mahajan VS, Moriyama M, Yamauchi M, Drijvers J, Nakamura S, Stone JH, Pillai SS: Lesional CD4+ IFN-gamma+ cytotoxic T lymphocytes in IgG4-related dacryoadenitis and sialoadenitis. Ann Rheum Dis 2017, 76(2):377-385. PMID: 27358392 DOI: 10.1136/annrheumdis-2016-209139

3) Mattoo H, Mahajan VS, Maehara T, Deshpande V, Della-Torre E, Wallace ZS, Kulikova M, Drijvers JM, Daccache J, Carruthers MN et al: Clonal expansion of CD4 cytotoxic T lymphocytes in patients with IgG-related disease. J Allergy Clin Immunol 2016, 138(3):825-838. PMID: 26971690 DOI: 10.1016/j.jaci.2015.12.1330

4) Maehara T, Pillai S, Stone JH, Nakamura S: Clinical features and mechanistic insights regarding IgG4-related dacryoadenitis and sialoadenitis: a review. Int J Oral Maxillofac Surg 2019. pii: S0901-5027(19)30009-8. PMID: 30686634 DOI: 10.1016/j.ijom.2019.01.006

5) Crotty S: Follicular helper CD4 T cells (TFH). Annu Rev Immunol 2011, 29:621-663. PMID: 21314428 DOI: 10.1146/annurev-immunol-031210-101400

6) Morita R, Schmitt N, Bentebibel SE, Ranganathan R, Bourdery L, Zurawski G, Foucat E, Dullaers M, Oh S, Sabzghabaei N et al: Human blood CXCR5(+)CD4(+) T cells are counterparts of T follicular cells and contain specific subsets that differentially support antibody secretion. Immunity 2011, 34(1):108-121. PMID: 21215658 DOI: 10.1016/j.immuni.2010.12.012

7) Maehara T, Moriyama M, Nakashima H, Miyake K, Hayashida JN, Tanaka A, Shinozaki S, Kubo Y, Nakamura S: 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 2012, 71(12):2011-2019. PMID: 22753386 DOI: 10.1136/annrheumdis-2012-201477

8) Mattoo H, Mahajan VS, Della-Torre E, Sekigami Y, Carruthers M, Wallace ZS, Deshpande V, Stone JH, Pillai S: De novo oligoclonal expansions of circulating plasmablasts in active and relapsing IgG4-related disease. J Allergy Clin Immunol 2014, 134(3):679-687. PMID: 24815737 DOI: 10.1016/j.jaci.2014.03.034
9) Maehara T: IgG4-related disease -Mechanistic insights from both clinical and immunologic understanding of this condition. Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi 2017, 40(3):206-212. PMID: 28747608 DOI: 10.2177/jsci.40.206