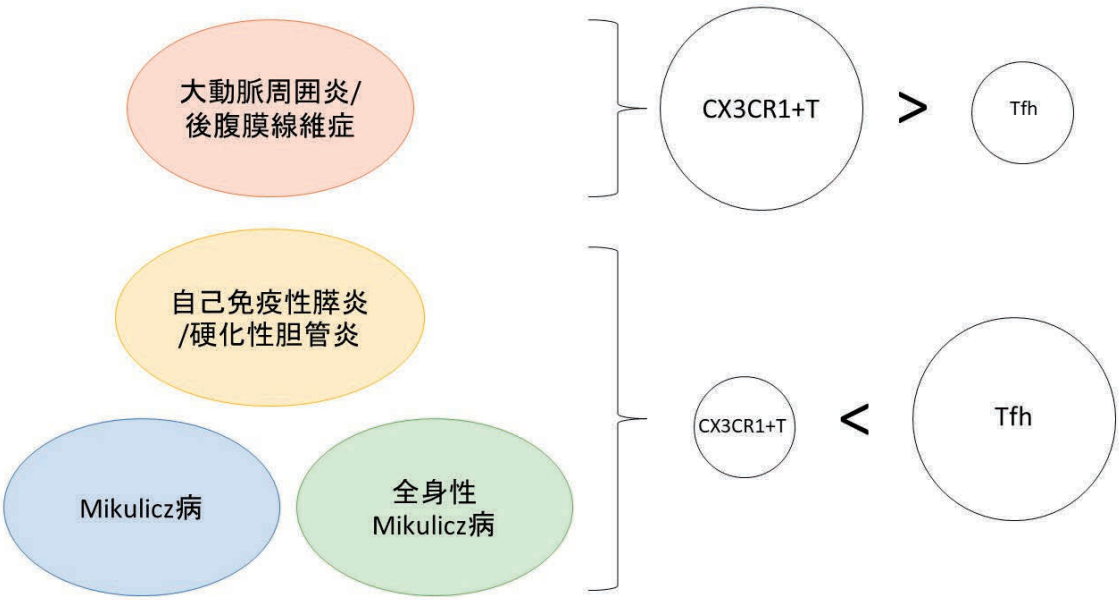
91　IgG4関連疾患の臓器横断的病態解明	金子　祐子

【目的】IgG4 関連疾患（IgG4-related disease : IgG4-RD）は、全身諸臓器に腫大や肥厚を来たし機能障害をもたらす慢性炎症性疾患である。病変は複数臓器に及ぶため臓器横断的なアプローチにより各臨床病型の違いを明らかにすることと、その病態に基づいた治療エビデンスの構築が望まれる。本研究では、組織障害と炎症に関与することで知られる CX3CR1 陽性細胞障害性 T 細胞に着目し、臓器横断的 IgG4-RD 患者コホートと臨床検体を用いて臨床病型別の病態の理解を深めることを目的とする。

【方法】54 人の IgG4-RD 患者、疾患コントロールとして 57 人の pSS 患者、40 人の健常者から検体提供を受けた。末梢血中の CD4 T 細胞または CD8 T 細胞における CX3CR1 陽性細胞の比率を、フローサイトメトリーを用いて解析した。臨床データとの関連解析における 2 群間の比較は Mann Whitney 検定（非ペアサンプル）または Wilcoxon matched-pairs signed rank 検定（ペアサンプル）、3 群間の比較は、Kruskal-Wallis 検定による分散分析を行った後、Dunn's multiple comparisons による多重検定を行った。相関分析は Spearman の r を用いた。非再燃生存曲線は Kaplan-Meier 分析を用いて作成し、log-rank 検定によって比較した。

【結果】CX3CR1 陽性 CD4 および CX3CR1 陽性 CD8 T 細胞の比率は、健常人と比較して IgG4-RD と pSS で有意に増加していた。また、増加した CX3CR1 陽性 CD4 T 細胞の比率は CX3CR1 陽性 CD8 T 細胞の比率と正の相関を示した。臨床病型別解析では、後腹膜線維症と大動脈周囲炎を合併した IgG4-RD 患者は、涙腺唾液腺炎合併患者と比較して CX3CR1 陽性 CD4 および CX3CR1 陽性 CD8 T 細胞の比率が有意に高かった。また、疾患活動性と CX3CR1 陽性 CD4 および CX3CR1 陽性 CD8 T 細胞の比率が正に相関していた。さらに、グルココルチコイド治療による臨床的改善とともに CX3CR1 陽性 CD4 および CX3CR1 陽性 CD8 T 細胞の比率が減少し、治療前の CX3CR1 陽性 CD4 および CX3CR1 陽性 CD8 T 細胞の比率が高い IgG4-RD 患者では臨床経過中の非再燃生存率が高かった。

IgG4-RD の臓器横断的アプローチによる臨床病型別病態解明



91. IgG4 関連疾患の臓器横断的病態解明

金子　祐子

慶應義塾大学 医学部 リウマチ・膠原病内科

Key words：IgG4 関連疾患，CX3CR1，T 細胞，大動脈周囲炎，後腹膜線維症

緒　言

IgG4 関連疾患（IgG4-related disease：IgG4-RD）は、主に涙腺や唾液腺が腫大し機能障害をきたすが、涙腺唾液腺外の諸臓器も罹患しえる全身性慢性炎症疾患である。特に、最近の研究報告では本疾患の後腹膜線維症と大動脈周囲炎は特異な臨床病型であり、涙腺唾液腺病変をもつ患者と比べて血清 C 反応性タンパク質の上昇を呈し、重篤な組織障害による尿管閉塞や大動脈瘤破裂を来たしえることが知られている。しかしながら、各臨床病型別の病態解明はいまだ不十分であり、我々はこれまでに涙腺唾液腺病変を有する臨床病型ではT 濾胞ヘルパー細胞（T follicular helper cell：Tfh）が関与していることを報告してきた。臓器横断的なアプローチにより各臨床病型別の病態解明とそれに基づく治療エビデンスの構築が望まれる。本研究では、組織障害と炎症に関与することで知られている CX3CR1 陽性T 細胞に着目し、当院の臓器横断的 IgG4-RD 患者コホートと臨床検体を用いて臨床病型別の病態の理解を深めることにより、将来的に新しい治療標的やバイオマーカーの探索、病態にもとづいた個別化医療の発展へとつなげたいと考える。

方　法

1. 研究対象者

本研究は、54 人の IgG4-RD 患者、疾患コントロールとして 57 人の pSS 患者、40 人の健常者から検体提供を受けた。IgG4-RD と pSS は研究登録時に免疫抑制療法による治療開始前であり、疾患活動性を有していた。IgG4-RD 患者は 2019 年の米国リウマチ学会／欧州リウマチ学会分類基準または本邦の 2011 年包括的 IgG4-RD 診断基準を満たしているものとした。本研究は慶應義塾大学医学部倫理委員会の承認を受け、ヘルシンキ宣言に従い実施された。全ての患者と健常者から研究参加に際し、書面による同意を得た。

2. フローサイトメトリーによるT 細胞の解析

患者と健常者からの末梢血中の CD4 T 細胞または CD8 T 細胞における CX3CR1 陽性細胞の比率を、フローサイトメトリーを用いて解析した。具体的には、末梢血 50 μl を、Pacific Blue 標識抗 CD3（BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, U.S.A.; clone UCHT1）、APC 標識抗 CD4（Beckman coulter, Shizuoka, Japan; clone 13B8.2）、APC 標識抗 CD8（Beckman coulter, Shizuoka, Japan; clone B9.11）、PE 標識抗 CX3CR1（BioLegend, San Diego, CA, U.S.A.; clone 2A9-1）抗体を用いて 30 分間室温で反応させた。その後 Lyse/Fix Buffer（BD Biosciences, San Jose, CA, U.S.A.）によって赤血球を取り除き、細胞を洗浄後、MACSQuant Analyzer（MACSQuant Analyzer®, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany）を用いてデータを取得した。

3. 統計解析

データは GraphPad Prism ソフトウェア（バージョン 7、GraphPad Software、La Jolla, CA）を使って解析した。2 群間の比較は Mann Whitney 検定（非ペアサンプル）または Wilcoxon matched-pairs signed rank 検定（ペアサンプル）を用いた。3 群間の比較は、Kruskal-Wallis 検定による分散分析を行った後、Dunn's multiple comparisons に

よる多重検定を行った。相関分析はSpearmanのrを用いた。非再燃生存曲線はKaplan-Meier分析を用いて作成し、log-rank検定によって比較した。両側P値0.05以下を統計的に有意と見なした。

結　果

1. IgG4-RDでは末梢血中CX3CR1陽性CD4とCX3CR1陽性CD8 T細胞が増加

まず、患者と健常者のCX3CR1陽性CD4およびCX3CR1陽性CD8 T細胞の比率を比較した。健常者と比較して、IgG4-RDまたはpSS患者ではCX3CR1陽性CD4およびCX3CR1陽性CD8 T細胞の比率が高値であった（図1）。したがって、CX3CR1陽性T細胞は自己免疫疾患に共通して上昇していることが推察された。次に、同一患者内でCX3CR1陽性CD4およびCX3CR1陽性CD8 T細胞が共に増加しているかどうかを調べるために、CX3CR1陽性CD4 T細胞比率とCX3CR1陽性CD8 T細胞比率の相関関係を分析した。結果、IgG4-RDとpSSの両方でCX3CR1陽性CD4 T細胞の比率がCX3CR1陽性CD8 T細胞の比率と正の相関を示すことが分かった（図2）。 以上から、IgG4-RDではCX3CR1陽性CD4およびCX3CR1陽性CD8 T細胞が増加しており、CX3CR1陽性CD4 T細胞の比率が高い患者ではCX3CR1陽性CD8 T細胞の比率も高いことが示された。

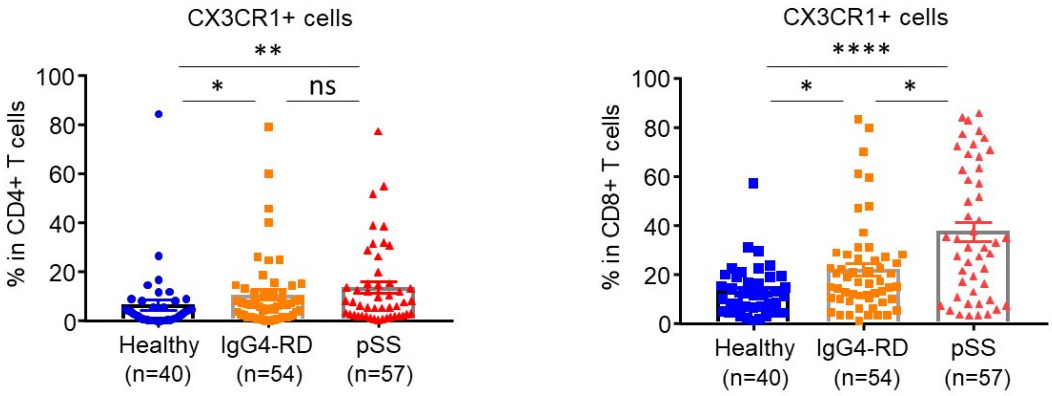


図1. IgG4-RDとpSSにおけるCX3CR1陽性T細胞比率

IgG4-RD、pSS、健常人（Healthy）から得た末梢血中CD4およびCD8 T細胞におけるCX3CR1陽性細胞の比率を比較解析した。Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparisons test（****p＜0.0001、**p＜0.01、*p＜0.05、ns：not significant).

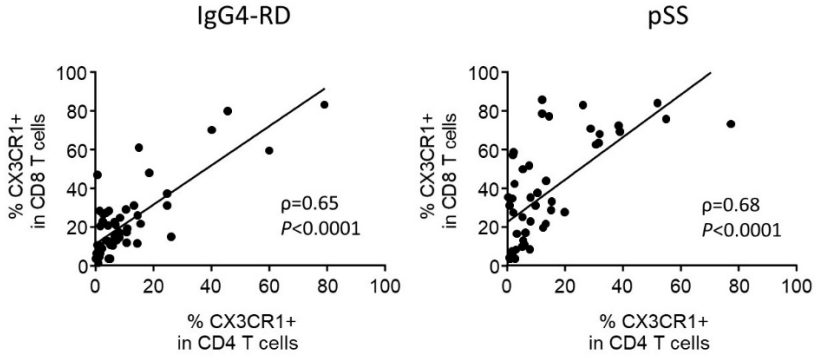


図2. CX3CR1陽性CD4 T細胞比率とCX3CR1陽性CD8 T細胞比率の相関

IgG4-RDとpSSでのCX3CR1陽性CD4 T細胞とCX3CR1陽性CD8 T細胞比率を相関解析した。Spearman's correlation analysis.

2. 大動脈周囲炎・後腹膜線維症を有する IgG4-RD 患者で CX3CR1 陽性 CD4 と CX3CR1 陽性 CD8 T 細胞が増加

次に、CX3CR1 陽性 CD4 および CX3CR1 陽性 CD8 T 細胞の増加を IgG4-RD の臨床病型別に解析した。解析を行うにあたり、国際的な研究報告に従い IgG4-RD 患者を次の 4 つの臨床病型に分類した［1］。グループ 1 は膵臓・肝臓・胆道疾患、グループ 2 は大動脈周囲炎・後腹膜線維症、グループ 3 は頭頸部限局病変、グループ 4 は全身性病変を合併する Mikulicz 病とした。結果、CX3CR1 陽性 CD4 および CX3CR1 陽性 CD8 T 細胞は大動脈周囲炎・後腹膜線維症を有するグループ 2 で、グループ 3 またはグループ 4 に比べて有意に増加していた（図 3a）。グループ 1（n＝1）は患者数が少ないため統計学的な評価はできなかった。次に、IgG4-RD responder index（IgG4-RD RI）スコアに基づいて疾患活動性を決定し、CX3CR1 陽性 CD4 および CX3CR1 陽性 CD8 T 細胞の増加との関連を解析した。結果、CX3CR1 陽性 CD4 および CX3CR1 陽性 CD8 T 細胞の比率は、IgG4-RD RI スコア、罹患臓器の数、IgG 値、IgG4 値、C 反応性タンパク質の値と正の相関を示す傾向があった（図 3b）。一方で、アレルギーの指標（血中好酸球数または血清 IgE 値）は CX3CR1 陽性 CD4 または CX3CR1 陽性 CD8 T 細胞の比率と相関を認めなかった（図 3b）。IgG4-RD 患者のアトピー歴（喘息またはアレルギー性鼻炎）の有無でも解析をしたが、CX3CR1 陽性 CD4 および CX3CR1 陽性 CD8 T 細胞の比率の増加との関連は認めなかった。以上より、CX3CR1 陽性 CD4 および CX3CR1 陽性 CD8 T 細胞の増加は大動脈周囲炎・後腹膜線維症病変と関連しており、IgG4-RD の疾患活動性が高いほど増加していることが分かった。

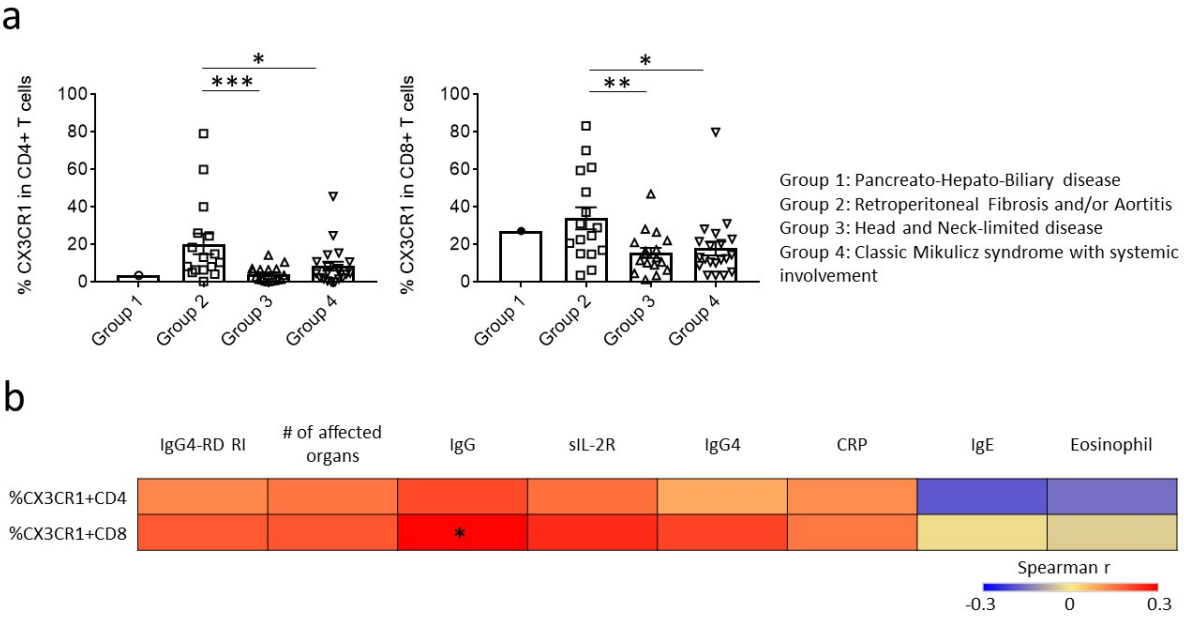


図 3. CX3CR1 陽性 T 細胞比率の IgG4-RD における臓器横断的解析

a) 罹患臓器別の CX3CR1 陽性 T 細胞比率の解析。Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparisons test (***p＜0.001, **p＜0.01, *p＜0.05).

b) 疾患活動性指標と CX3CR1 陽性 T 細胞比率の相関解析。Spearman's correlation analysis.

3. CX3CR1 陽性 CD4 または CX3CR1 陽性 CD8 T 細胞の増加は治療後の非再燃率と関連

IgG4-RD 患者はグルココルチコイドに良好な治療反応性を示すが、グルココルチコイド減量中に疾患の再燃を高率に起こす［2］。したがって、我々は次に CX3CR1 陽性 CD4 および CX3CR1 陽性 CD8 T 細胞の比率がグルココルチコイド治療後の再燃と関連しているかを調べた。解析を行うにあたり、CX3CR1 陽性 CD4 および CX3CR1 陽性 CD8 T 細胞比率の正常上限基準値は、統計学的に健常者の平均値＋1.96 標準誤差とした。IgG4-RD 患者を CX3CR1 陽性

T 細胞増加群（健常人の正常上限基準値以上）または非増加群に分類し、治療開始後の臨床経過を平均 43 ヶ月間追跡した。疾患再燃の定義は、新規の臓器病変の出現またはもともとの罹患臓器の再増悪により主治医が治療強化を行ったものとした。結果、CX3CR1 陽性 T 細胞増加群は非増加群と比べて、再燃率が低いことが分かった（図 4a）。これらの結果は、CX3CR1 陽性 CD4 および CX3CR1 陽性 CD8 T 細胞の比率別で解析を行っても同様の結果であった（図 4b, c）。

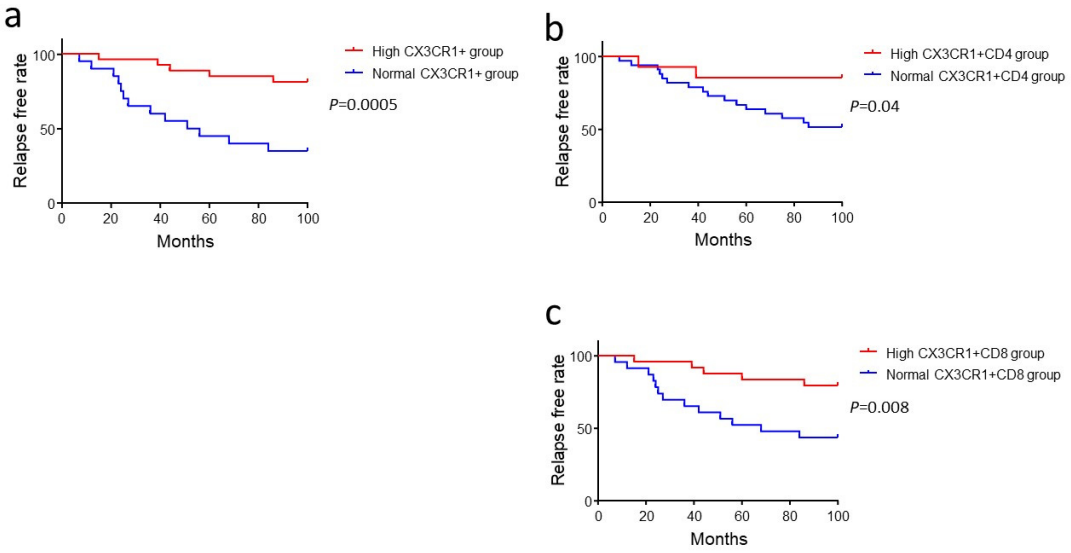


図 4. IgG4-RD における CX3CR1 陽性 T 細胞比率と疾患再燃との関連

a）CX3CR1 陽性 T 細胞増加群と非増加群での非再燃生存曲線。

b）CX3CR1 陽性 CD4 T 細胞増加群と非増加群での非再燃生存曲線。

c）CX3CR1 陽性 CD8 T 細胞増加群と非増加群での非再燃生存曲線。

Kaplan-Meier analysis and the log-rank test.

4. CX3CR1 陽性 CD4 または CX3CR1 陽性 CD8 T 細胞はグルココルチコイド治療後に減少

最後に、グルココルチコイド治療が CX3CR1 陽性 CD4 および CX3CR1 陽性 CD8 T 細胞比率に与える影響を解析した。経時的に解析可能であった IgG4-RD 患者 15 症例において、グルココルチコイド治療による病勢の改善とともに CX3CR1 陽性 CD4 および CX3CR1 陽性 CD8 T 細胞の比率は減少した（図 5）。一方で、CD4 および CD8 T 細胞の総数は変化しておらず、病態と関連する CX3CR1 陽性 T 細胞のみが減少したことが示唆された。

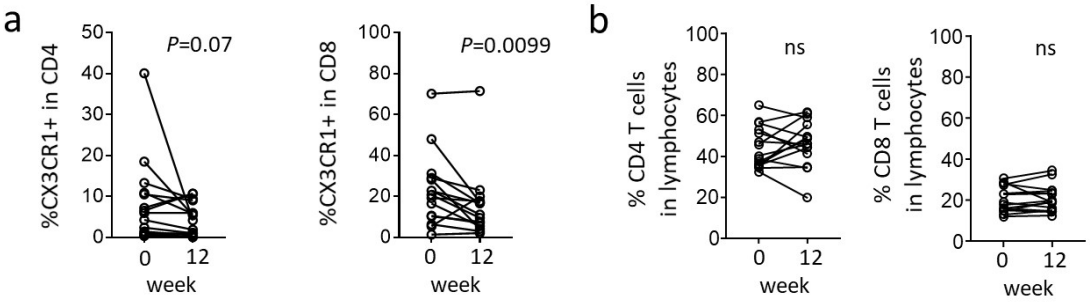


図 5. IgG4-RD でのグルココルチコイド治療前後の CX3CR1 陽性 T 細胞比率の変化

a）CX3CR1 陽性 CD4 および CX3CR1 陽性 CD8 T 細胞比率の結果。

b）CX3CR1 陽性 CD4 および CX3CR1 陽性 CD8 T 細胞比率の結果。

Wilcoxon matched-pairs signed rank test.

考　察

本研究では、IgG4-RD 患者の末梢血中に CX3CR1 陽性 CD4 および CX3CR1 陽性 CD8 T 細胞が増加していることが明らかとなった。さらに臓器横断的な解析により、これらの T 細胞の増加は、特定の罹患臓器合併と関連していることが分かった。具体的には、IgG4-RD において CX3CR1 陽性 CD4 および CX3CR1 陽性 CD8 T 細胞の増加は大動脈周囲炎と後腹膜線維症病変と関連していた。さらに、CX3CR1 陽性 T 細胞が増加した IgG4-RD 患者は、臨床経過中の再燃率が低かった。また、グルココルチコイド治療後、CX3CR1 陽性 CD4 および CX3CR1 陽性 CD8 T 細胞の比率は臨床的改善とともに減少しており、病態への関与が示唆された。

CX3CR1 陽性細胞は T 細胞の中でも細胞障害性機能を有していることが特徴として知られている [3]。本研究では、これらの細胞傷害性 T 細胞が IgG4-RD の罹患臓器のうち大動脈周囲炎と後腹膜線維症の合併と関連していることを世界で初めて明らかにした。細胞傷害性 T 細胞の機能特性を考慮すると、これらの臓器において CX3CR1 陽性 T 細胞が組織破壊を引き起こし、臨床的な尿管閉塞、大動脈解離、動脈瘤破裂などを呈している可能性があると考えられた。また、我々はこれまで、IgG4-RD の涙腺唾液腺病変では Tfh が関与していることを報告しており［4］、同一疾患でもその罹患臓器により病態と強く関連する免疫細胞サブセットが異なる可能性が示唆され、臓器横断的アプローチの重要性が示された（要旨概要図）。

本疾患において治療開始前の血中 IgG4、IgE、または好酸球数が高いほどグルココルチコイド治療後の経過中に再燃しやすいと報告されている［5］。今回、我々の研究結果から血中 CX3CR1 陽性 T 細胞が増加している患者では経過中の再燃率は非増加群と比べて低いことが分かった。したがって、上記のバイオマーカーと血中 CX3CR1 陽性 T 細胞を組み合わせることで、将来的に IgG4-RD 患者の疾患再燃予測に有用な手段となり、個別化医療の開発に貢献する可能性があると思われた。

CX3CR1 陽性 CD4 T 細胞と CX3CR1 陽性 CD8 T 細胞は、慢性的な抗原刺激によりクローナルに増殖した細胞集団であることが報告されている［6］。したがって、大動脈周囲炎と後腹膜線維症合併 IgG4-RD では CX3CR1 陽性 T 細胞を増加させる何らかの抗原刺激が本疾患の発症に関与している可能性がある。今後は疾患と関連する病因抗原を同定することが本疾患の病因病態を解明する上で重要であることが示唆された。

以上より、我々は臓器横断的に本疾患の病態解明を試みた結果、CX3CR1 陽性 T 細胞が IgG4-RD の臓器病変のうち大動脈周囲炎と後腹膜線維症に関連していることを新たに明らかとした。今後は、CX3CR1 陽性 T 細胞の分化と機能に関与する詳細な分子メカニズムを解明して、新しい治療標的分子の発見と治療戦略の開発を目指し、個別化医療の実現につなげたいと考える。

共同研究者・謝辞

本研究は、共同研究者の慶應義塾大学医学部内科学（リウマチ・膠原病）教室の秋山光浩君の多大な貢献のもとで実施された。

文　献

1） Wallace ZS, Zhang Y, Perugino CA, Naden R, Choi HK, Stone JH; ACR/EULAR IgG4-RD Classification Criteria Committee. Clinical phenotypes of IgG4-related disease: an analysis of two international cross-sectional cohorts. Ann Rheum Dis. 2019;78:406-412. doi: 10.1136/annrheumdis-2018-214603. PMID: 30612117

2） Takanashi S, Akiyama M, Furuhashi K, Yoshimoto K, Tanemura S, Seki N, Tsujimoto H, Chiba K, Kaneko Y. Distinct impact of malignancy and allergy on the clinical and immunological features of IgG4-related disease. Clin Exp Rheumatol. 2023 Jan 31. doi: 10.55563/clinexprheumatol/7g2na0. Online ahead of print. PMID: 36719757

3) Nishimura M, Umehara H, Nakayama T, Yoneda O, Hieshima K, Kakizaki M, et al. Dual functions of fractalkine/CX3C ligand 1 in trafficking of perforin+/granzyme B+ cytotoxic effector lymphocytes that are defined by CX3CR1 expression. J Immunol. 2002;168:6173-80. doi: 10.4049/jimmunol.168.12.6173 PMID: 12055230
4) Akiyama M, Suzuki K, Yasuoka H, Kaneko Y, Yamaoka K, Takeuchi T. Follicular helper T cells in the pathogenesis of IgG4-related disease. Rheumatology (Oxford). 2018;57:236-245. doi: 10.1093/rheumatology/kex171. PMID: 28460058
5) Sasaki T, Akiyama M, Kaneko Y, Yasuoka H, Suzuki K, Yamaoka K, et al. Risk factors of relapse following glucocorticoid tapering in IgG4-related disease. Clin Exp Rheumatol. 2018;36:186-189. PMID: 29846165
6) Weiskopf D, Bangs DJ, Sidney J, Kolla RV, De Silva AD, de Silva AM, et al. Dengue virus infection elicits highly polarized CX3CR1+ cytotoxic CD4+ T cells associated with protective immunity. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015;112:E4256-63. doi: 10.1073/pnas.1505956112. PMID: 26195744