

日本医療研究開発機構 医療分野研究成果展開事業
産学連携医療イノベーション創出プログラム
セットアップスキーム (ACT-MS)
事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名： (日本語) IgG4 関連疾患の自己抗体の同定とこれを用いた新規診断キットの開発による
新しい診療体系の確立

(英語) Development of Novel Diagnostic Kit and Establishment of New Diagnostic System by Identification of Autoantibody for IgG4-related Disease

研究開発実施期間：2016年10月25日～2018年3月31日

研究開発代表者 氏名：(日本語) 児玉 裕三
(英語) Yuzo Kodama

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

(日本語) 国立大学法人京都大学 大学院医学研究科 消化器内科学講座 講師

(英語) Senior Lecturer, Department of Gastroenterology and Hepatology, Graduate School of Medicine, Kyoto University

II 研究開発の概要

(和文)

IgG4 関連疾患は、その Hallmark である血清 IgG4 高値の発見に端を発し、全身性疾患としての IgG4 関連疾患包括診断基準の策定に至るまで、わが国を中心にその概念が確立された新しい自己免疫性疾患である。しかし、その自己抗原・自己抗体は不明であり、正確な診断や病態の国際比較には、病態に基づいた疾患特異的バイオマーカーの発見が課題となっていた。今回、申請者らは IgG4 関連疾患の膝病変である自己免疫性膝炎の患者血清を用い、その自己抗原ラミニン 511 E8 と抗ラミニン 511 E8 自己抗体を同定した。本開発研究では、申請者らが発見した IgG4 関連疾患の病因を成す「自己抗原ラミニン 511 E8」および「抗ラミニン 511 E8 自己抗体」を基に、汎用性のある抗ラミニン 511 E8 自己抗体の新規診断キットを開発し、同疾患の新たな診療体系を確立することを目標とし、以下の開発研究を行った。

1) IgG4 関連疾患の自己抗体の同定による病態解明

我々によって発見された IgG4 関連疾患の病因自己抗原ラミニン 511 E8 が、どのようなメカニズムによって同疾患を引き起こすかを解明するために、同抗原を用いたマウスモデルの確立を行った。ヒト recombinant ラミニン 511 E8 を 8 週齢の Balb/c マウスに免疫したところ、全身の臓器の中で膝臓および唾液腺にのみ病変が誘導されることが再現性をもって確認された。本マウスモデルの膝病変には、IgG4 関連疾患に特徴的な炎症細胞浸潤・線維化・閉塞性静脈炎などの病理所見が認められた。また、上記のマウスモデルにおいて、IgG4 関連疾患の最も大きな特徴の一つである血清 IgG4 の上昇、および IgG4 陽性形質細胞浸潤について、ヒト IgG4 のマウスにおけるカウンターパートである IgG1 を中心に解析を

行なった。その結果、ヒト recombinant ラミニン 511 E8 を免疫したマウスでは、コントロール蛋白質を免疫したマウスには認められない抗ラミニン 511 E8 自己抗体の存在が確認されたが、総血清 IgG1 値の上昇は認められなかった。脾病変には IgG1 陽性の形質細胞の浸潤が確認された。このように、ラミニン 511 E8 の免疫により、抗ラミニン 511 E8 自己抗体を介して IgG4 関連疾患と同様の病変を誘導するマウスモデルを確立することができた。また、ラミニン 511 E8 の抗原エピトープの探索するために、ラミニン 511 E8 を断片化、あるいは単鎖化したうえでその抗原性について検討を行った。その結果、抗原エピトープは、ラミニン $\beta 1$ 鎖の C 末端側に存在する可能性が高いと考えられた。

2) IgG4 関連疾患の自己抗体測定による新規診断キットの開発

ヒト recombinant ラミニン 511-E8 の精製度、安定性について検討を行い、界面活性剤の添加や 8M 尿素の添加によっても患者検体が反応し、抗原性が失われないことを確認した。続いて、京都大学からの ELISA 測定系のトランスファーを行い、MBL で使用している材料でも測定可能であることを確認した。さらに、ELISA 測定系についてブロッキング方法や検体希釈液の組成などについて改良を行った。その結果、再現性悪化の要因を低減することができた。測定系の評価を行うため、対照検体として準備できた MBL 保有の健常人検体について多検体測定を実施したところ、当初の想定より多くの高値偽陽性の検体が存在することが判明した。その結果、感度・特異度が目標を下回る結果となった。京都大学の対照検体 112 例との差異について、検体の濁りを原因とみて検討を行ったが、検体の濁りによる影響ではないと判断した。また、由来の異なる 3 群の健常人検体を用いて多検体測定をおこなったが、いずれも同様の結果を示した。抗原による吸収試験の結果から、健常人高値検体で抗原により吸収がかかり測定値が大きく低下する検体が半数程度認められたことから、高値となった原因は非特異的な吸着ではなく、抗原-抗体反応によるものと判断した。本測定系を診断薬化するという観点からすると、希少疾患では特に特異性の高さが要求されるため、現行抗原のまま診断薬化するのは難しく、対応抗原の改良が必要と考えられた。

3) IgG4 関連疾患の診断における新規診断キットの有用性についての臨床試験

多施設共同にて IgG4 関連疾患 51 例、およびコントロール 112 例の血清サンプルを集積した。これらを用い、我々が確立した ELISA 法により、ヒト血清中の抗ラミニン 511 E8 自己抗体を測定し、その診断における有用性について後ろ向きに検討した。その結果、IgG4 関連疾患 51 例のうち 26 例で陽性となり、その診断感度は 51% (26/51) であった。一方、コントロール 112 例では 110 例が陰性となり、その診断特異度は 98% と非常に高く、血清 IgG4 値による既存の血清診断の特異度 (約 75%) を大きく上回るものであった。しかしながら、2) に示すように、医学生物学研究所保有の健常人検体において検討した場合、高値偽陽性となる検体が多数認められ、自己抗原の見直しが必要と考えられた。そこで、ラミニン 511 との結合により機能する蛋白質であるインテグリン $\alpha 6 \beta 1$ 、およびインテグリン $\alpha 3 \beta 1$ に着目し検討を行った。その結果、自己免疫性脾炎 51 例のなかで、抗ラミニン 511 E8 抗体陰性の 25 例中 4 例の血清中に抗インテグリン $\alpha 6 \beta 1$ 抗体を認めた。また、2) で示した健常人における高値偽陽性例への対処として、1) で示したラミニン 511 E8 の抗原エピトープを用いた ELISA 法により、特異度の改善が得られるかどうかについて検討を行った。自己免疫性脾炎 12 例、および健常人において抗ラミニン 511 E8 抗体高値を示した 36 例を対象として検討を行った。その結果、コントロール高値例の多くが陰性化し偽陽性例は大きく減少した。

上記のように、IgG4 関連疾患の病態解明については、本研究開発において、ヒト recombinant ラミニン 511 E8 をマウスに免疫することにより、抗ラミニン 511 E8 自己抗体の産生、および IgG4 関連疾患に特徴的

な炎症細胞浸潤・線維化・閉塞性静脈炎などの病理所見を示す膵病変が誘導された。このことは、ラミニン 511 E8 が病因を成す自己抗原であるという我々の仮説を証明するものであり、我が国において確立した本疾患概念の原因の一端を解明し得たものと考えられる。本マウスモデル開発は、IgG4 関連疾患の他の自己抗原の発見や、他臓器病変の病態解明、さらには新しい治療開発の礎となるものであり、発展性・将来性のある開発と思われる。

一方、自己抗体測定による診断キットの開発については、京都大学で確立した株式会社医学生物学研究所保有の健常人血清を用いた場合、偽陽性となる例が多く認められ、その製造法の開発には至らなかった。しかし、京都大学と株式会社医学生物学研究所との密な情報交換により、この偽陽性は非特異的な吸着ではなく、抗原-抗体反応によるものである可能性が高いとの判断に至った。この考察により、抗原の改良を目指した取り組みを開始し、新たな自己抗原の発見や、抗原エピトープの絞り込みにおいて期待の持てる結果を得ている。本研究開発により、IgG4 関連疾患自己抗体がラミニン-インテグリン結合によるタンパク質機能ユニットを構成する複数の抗原エピトープを標的としていること、さらに当初目指したラミニン 511 E8 蛋白を抗原とした ELISA 法では、非特異的な抗原抗体反応が擬陽性の原因となるとの知見が得られた。このことは、今後の製品開発において、繊細な抗原エピトープの同定による複数の自己抗体測定が必要となるという、新しいコンセプトを得るために極めて重要であったと考えている。

(英文)

IgG4-related disease is a new autoimmune disease whose concept have been established mainly in Japan including discovery of serum IgG4 elevation and development of diagnostic criteria. However, autoantigens or autoantibodies for IgG4-related disease has been unknown, and disease specific biomarkers based on the pathogenesis has been eagerly anticipated. Recently, using the sera of patients with autoimmune pancreatitis, we identified laminin 511 E8 and anti-laminin 511 E8 as autoantigen and autoantibody of the disease, respectively. In the current study, based on our findings of autoantigen and autoantibody, we aimed to develop a diagnostic kit and to establish novel diagnostic criteria for IgG4-related disease.

1) Elucidation of the pathogenesis of IgG4-related disease.

To elucidate the pathogenesis of IgG4-related disease, we tried to establish a mouse model for the disease by immunizing the autoantigen laminin 511 E8. As a result, immunization of Balb/c mice with laminin 511 E8 reproducibly induced production of anti-laminin 511 E8 antibody and subsequent pancreatic lesions. Histologically, these pancreatic lesions included characteristic findings for IgG4-related disease such as lymphoplasmacyte infiltration, storiform fibrosis, obliterative phlebitis. Thus, by immunization of laminin 511 E8, we could establish a mouse model for IgG4-related disease. In addition, in order to search for the antigenic epitope, antigenicity of laminin 511 E8 fragments were analyzed. As a result, C-terminal of laminin beta1 chain was considered as the antigenic epitope.

2) Development of new diagnostic kit for IgG4-related disease.

First, we confirmed purity and stability of human recombinant laminin 511 E8. Next, we transferred the ELISA system from Kyoto University to Medical & Biological Laboratories CO., LTD. (MBL), and improved the reaction condition including the blocking condition and

composition of diluent. In order to evaluate the ELISA system, we measured anti-laminin 511 E8 antibody in the serum of healthy controls obtained by MBL. As a result, there were false positive samples more than expected. From these results, it was considered that the improvement of antigen used in the ELISA was necessary.

3) Evaluation of clinical utilities of the new diagnostic kit.

We collected serum samples of 51 cases of IgG4-related disease and 112 cases of controls and measured anti-laminin 511 E8 antibody by multicenter study. As a result, the sensitivity and specificity for the diagnosis of IgG4-related disease were 51% and 98%, respectively. However, as shown in 2), false positive samples were found in the sera of healthy controls obtained by MBL. So, we utilized the fragment of laminin 511 E8 found in 1) for ELISA, and the false positive cases were markedly decreased. Furthermore, we focused on integrin $\alpha 6 \beta 1$ and integrin $\alpha 3 \beta 1$ that bind to laminin 511 E8, and newly found anti-integrin $\alpha 6 \beta 1$ antibody in the sera of patients with autoimmune pancreatitis.

As described above, we established the mouse model of IgG4-related disease by immunizing the autoantigen laminin 511 E8. These results clearly proved our hypothesis that laminin 511 E8 is the pathogenic autoantigen for IgG4-related disease. This mouse model will contribute to the elucidation of pathogenesis of the disease, discovery of other autoantigens for IgG4-related disease, and development of new therapy for the disease.

On the other hand, as for the novel diagnostic ELISA kit, we could not achieve the complete manufacturing method for the kit. However, current study demonstrated that autoantibody of IgG4-related disease may target multiple antigenic epitopes on laminin-integrin protein complex. These findings will be important information for the future development of the diagnostic kit of the disease.