

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：(日本語) 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 (ACT-MS)

(英語) Medical Research and Development Programs Focused on Technology Transfer

Acceleration Transformative research for Medical innovation (ACT-MS)

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断体系の確立

(英語) Development of Novel Diagnostic Kit and Establishment of New Diagnostic

System by Identification of Autoantibody for IgG4-related Disease

研究開発担当者 (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 児玉裕三

所属 役職 氏名：(英語) Yuzo Kodama, Senior Lecturer, Department of Gastroenterology and Hepatology, Graduate School of Medicine, Kyoto University

実施期間：平成 28 年 10 月 24 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

II. 成果の概要 (総括研究報告)

IgG4 関連疾患は、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が、その自己抗原・自己抗体は不明であった。本開発研究では、研究開発担当者らによって発見された IgG4 関連疾患の病因を成す「自己抗原 X」を基に、株式会社 医学生物学研究所との共同により、抗 X 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する。

平成 28 年度は、国立大学法人京都大学大学院と株式会社 医学生物学研究所との間で秘密保持契約・共同研究契約を締結したうえで以下の研究を行った。

(1) IgG4 関連疾患の自己抗体の同定による病態解明 (京都大学)

- ① **マウスモデルの確立**： 研究開発担当者らによって発見された IgG4 関連疾患の病因自己抗原 X 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 抗原 X を 8 週齢の Balb/c マウスに免疫したところ、全身の臓器の中で脾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。本マウスモデルの脾病変には、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 抗原 X を免疫したマウスの血清 IgG1 値には有意な上昇を認めなかったが、脾病変には IgG1 陽性の形質細胞の浸潤が確認された。

(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 (医学生物学研究所)

- ① **固相抗原の調整**： 本開発に用いるヒト recombinant 抗原 X の精製度について SDS-PAGE にて確認したところ、同抗原は十分精製されていることが確認された。また、同抗原の調整時の条件として、界面活性剤等の影響について検討し最適な条件を得た。
- ② **ELISA 法による測定系の確立**： 上記で調整した調整したヒト recombinant 抗原 X を用い、ELISA 法によるヒト抗 X 自己抗体測定系の開発を行った。まず、京都大学において確立された方法により検討したところ、IgG4 関連疾患患者血清において抗 X 自己抗体が検出され、京都大学での結果が再現された。一方、コントロール血清において抗体陽性となる例が認められたため、抗原感作後のブロッキング、検体希釈液の組成、検体希釈濃度、反応時間、洗浄条件、酵素標識抗ヒト IgG 抗体濃度など反応に関与する条件検討により、体外診断用医薬品としての性能を担保できることを目指したキットの改良を行っている。
- ③ **較正用基準物質の確立**： 海外の供給元に患者検体の手配を依頼した。

(3) IgG4 関連疾患の診断における新規診断キットの有用性の検討 (京都大学)

- ① **後ろ向き観察研究**： 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、京都大学において確立した ELISA 法による自己抗体測定を行ったところ、IgG4 関連疾患の診断特異度は 98%と、既存の血清診断の特異度 (約 75%) を大きく上回る結果が得られた。

このように、研究開発担当者らによって発見された自己抗原 X を用いた IgG4 関連疾患のマウスモデルが確立され、今後の病態解明に期待がもたれる。また、同抗原 X を用いた自己抗体測定系の開発が進行しており、予備的な検討での良好な成績よりその有用性が期待された。

IgG4-related disease is a novel autoimmune disease whose concept was established in Japan, but its autoantigen/autoantibody has been unknown. In this study, based on the discovery of “autoantigen X” which is thought to be one of the cause of the disease, we aimed to develop a novel diagnostic kit and to establish a new diagnostic system for IgG4-related disease in collaboration with Medical & Biological Laboratories CO., LTD.

In this year, after concluding confidentiality agreement and collaborative research agreement between Kyoto University and Medical & Biological Laboratories CO., LTD., we conducted following research.

(1) Elucidation of the pathogenesis of IgG4-related disease by identification of its autoantibody (Kyoto University)

- ① **Establishment of mouse model**: Immunization of 8-week Balb/c mice with human

recombinant protein X reproducibly induced pancreatic and salivary gland lesions. The pathological findings in the pancreatic lesions showed inflammatory cell infiltration, fibrosis, and obstructive phlebitis that are characteristic for IgG4-related disease. The pancreatic lesions in this mouse model showed abundant infiltration of IgG1-positive plasma cells that are counterpart of human IgG4-positive plasma cells, although the serum IgG1 levels in these mice were not significantly elevated.

(2) Development of novel diagnostic kit for IgG4-related disease by measurement of its autoantibody (Medical & Biological Laboratories CO., LTD.)

- ① **Preparation of solid phase antigen:** Human recombinant protein X for this study was confirmed to be sufficiently purified by SDS-PAGE.
- ② **Establishment of ELISA system:** A human anti-x autoantibody measurement system by ELISA method was developed. The results of ELISA in Kyoto University was reproduced in Medical & Biological Laboratories CO.,LTD. On the other hand, autoantibody-positive was detected in few controls samples. We are now improving the kit to guarantee its diagnostic performance.
- ③ **Establishment of calibration material:** We asked overseas suppliers to obtain the calibration material.

(3) Evaluation of the usefulness of new diagnostic kit for IgG4-related disease (Kyoto University)

- ① **Retrospective study:** We collected serum samples of 51 IgG4-related disease cases and 112 controls, and anti-X autoantibody was measured by the ELISA method that was established in Kyoto University. The diagnostic specificity of IgG4-related disease was 98%, which was much higher than that of existing serodiagnosis.

Thus, a mouse model of IgG4-related disease was established using autoantigen X, and elucidation of the pathogenesis of IgG4-related disease is expected. Development of a novel ELISA system for measurement of anti-X autoantibody is in progress. From the preliminary results, the usefulness of the diagnostic system by ELISA is greatly expected.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0件、国際誌 0件）

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

Is Serum IgG in Patients with AIP Pathogenic?, 口頭, 塩川雅広, 児玉裕三, 妹尾浩, 千葉勉,
International Symposium on IgG4-RD & Fibrosis, 2017/2/18, 国外

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

該当なし

(4) 特許出願

特願 2016-142701 号