

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460453

研究課題名(和文) 自己免疫性膵炎のDNAメチレーション異常についての検討

研究課題名(英文) DNA methylation alterations in autoimmune pancreatitis

研究代表者

上原 剛 (UEHARA, Takeshi)

信州大学・学術研究院医学系・准教授

研究者番号：80402121

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：自己免疫性膵炎(AIP)のDNAメチル化異常について網羅的な解析を行った。AIPに対するコントロールには、閉塞性膵炎と正常膵を選択した。それぞれの症例に対してイルミナ社のInfinium MethylationEPIC Kitを用いて全ゲノム網羅的なメチル化アレイ解析を行った。コントロール群に比べて、AIPでプロモータ領域が高メチル化されている炎症や線維化に關与する遺伝子を複数選択し、AIPに特異的なメチル化異常どうかの再検証をメチル化特異的PCR法で行った。しかしプライマー設定の困難な遺伝子もあり、全ての検証が終わってはいない。今後は免疫染色など別の再検証法などでも解析を進める予定である。

研究成果の概要(英文)：We used an Illumina Infinium MethylationEPIC Kit to conduct a comprehensive analysis of DNA methylation in tissues of patients with autoimmune pancreatitis (AIP). Controls included pancreatic tissue acquired from patients with obstructive pancreatitis caused by pancreatic carcinomas as well as from normal pancreatic tissue. We compared genes with promoter hypermethylation between patients with AIP and the controls. The validation of the method was affected by technical problems. Immunohistochemical analysis will be required to determine if promoter hypermethylation of specific genes is involved in the pathogenesis of AIP.

研究分野：IgG4関連疾患

キーワード：自己免疫性膵炎 メチル化解析

## 1. 研究開始当初の背景

自己免疫性膵炎 (autoimmune pancreatitis:AIP)は、自己抗体の存在や、免疫グロブリンの上昇、膵のびまん性腫大と主膵管のびまん性狭窄、リンパ球と形質細胞を主体とした著明な細胞浸潤と線維化、さらにステロイドが著効してこれらの所見が改善する特異的な慢性炎症である。比較的高齢者に多く、最近増加傾向にある。

AIPは2001年に信州大学医学部附属病院消化器内科の浜野らにより、血清学的にIgG4の上昇がみられることが発見され、病因を解明するための糸口がつかめた(Hamano et al. The New England Journal of Medicine, 2001)。本研究には研究代表者も黎明期より参加して病理学的解析を担当している。病理組織学的解析では、膵管周囲に多数のIgG4陽性の形質細胞の浸潤が認められる特徴がある。また後腹膜線維症、シェーグレン症候群、硬化性胆管炎や前立腺炎など多くの炎症性疾患が合併することが知られており、これらの多くはAIPと同様に多数のIgG4陽性の形質細胞の浸潤が認められることがある。

AIPでは体液性免疫異常である自己抗体として、抗核抗体、抗carbonic anhydrase-II(CA-II)抗体、抗ラクトフェリン抗体、リウマチ因子、抗平滑筋抗体など多様な自己抗体の出現を認めるが疾患特異性は低い。AIPの細胞性免疫異常としてはナイーブ制御性T細胞(Foxp3+CD4+RA+CD25high)の低下とメモリー制御性T細胞(Foxp3+CD4+RA-CD25high)の増加が認められ、減少したナイーブ制御性T細胞がAIPの発症に関与し、一方メモリー制御性T細胞はIL-10、TGF- $\beta$ の産生を促しIgG4産生や線維化をきたす。上皮細胞におけるMHCクラスII抗原の発現は、炎症に伴う二次的な変化の可能性を否定できないが免疫学的機序による膵炎の可能性を支持する所見で

ある。また末梢血には好酸球やHLA陽性の活性化CD4、CD8陽性細胞、特にTh1型CD4陽性細胞の増加を認めるとの報告もある。

研究代表者はこれまでAIPに合併する硬化性胆管炎、前立腺炎、胃炎の病理組織学的検討(上原ら Pathol International, 2005)(上原ら Pathol International, 2008)(上原ら American journal of Surgical Pathology, 2010)を行ってきた。また、AIPに合併した硬化性胆管炎と、原発性硬化性胆管炎(primary sclerosing cholangitis;以下PSC)を病理組織学的に比較検討し、AIPに合併する硬化性胆管炎には膵臓に見られるものと同様にIgG4陽性形質細胞の浸潤などの特徴的な所見が見られ、ステロイド治療が著効することを報告した(上原ら Pathol International, 2005)。さらにAIPに合併する前立腺炎や胃炎においてもAIPと同様の病態が認められ、ステロイド治療が著効するものがあると報告するなど(上原ら Pathol International, 2008)(上原ら American journal of Surgical Pathology, 2010)、AIPに関連する前立腺炎、胃炎の存在を明らかにしてきた。今回の検討において、これまでの病理組織学的な知見を踏まえ、分子病理学的手法を導入して原因究明と確実な診断方法の確立を目指した解析を行ってみたいと考えている。

## 2. 研究の目的

第1にAIPの原因は、リンパ球系の異常のみではなく、被障害臓器(膵臓)そのものにもあり、これらは何らかの疾患特異的なエピゲネティックな修飾を受けていること、第2に疾患特異的な共通のエピゲネティックな修飾を特定し、特定されたメカニズムに基づき、遺伝子発現レベルや蛋白発現レベルを解析する。

## 3. 研究の方法

## AIP 症例の選択

信州大学医学部附属病院で生検ないしは手術が行われ AIP と診断された症例をレトロスペクティブに検索して選択する。それら症例に関する保存されている組織や血清に関して以下のような実験を行う。

## AIP における各遺伝子でのメチル化異常の網羅的解析

エピゲネティック異常の中でゲノムワイドな低メチル化は、癌や一部の自己免疫性疾患で起こることが知られている。またゲノムワイドな低メチル化は、遺伝子プロモーター領域の高メチル化と関係が深い。そこで以下の方法で、AIP における遺伝子プロモーター領域のメチル化異常について解析を行う。そこで患者症例臓組織の DNA をマイクロダイセクションで抽出し、その後抽出された DNA に bisulfite 処理を行い、イルミナ社の Infinium MethylationEPIC Kit を用いて網羅的なメチル化解析を行う。

## メチル化異常のある遺伝子をメチル化特異的 PCR で再検証する

AIP で特異的なメチル化異常を呈している遺伝子を複数選択し、定量 Methylation Specific PCR (MSP) を用いて解析する。

## タンパク発現を免疫染色で解析

メチル化異常を呈する遺伝子に対応する、タンパク発現の有無を AIP 患者の組織切片に対して、タンパクに対する抗体を用いて免疫染色を行い確認する。原因候補遺伝子によって作られるタンパク質に対する抗原が免疫染色によって確認できれば病状の把握が可能となる。

## 4 . 研究成果

網羅的解析を行う前に、AIP に関連が疑われる transcription factor のプロモーター

領域のメチル化異常について検討した。

13 症例の AIP を対象とし、正常膵臓をコントロールとして、10 個の transcription factor について検討を行った。Transcription factor は炎症制御に関係のあるものから、腫瘍関連のものまで幅広く対象とした。MSP 法でメチル化異常の検討を行った。AIP でメチル化異常が明確な遺伝子は認められなかったが、プライマー設定の困難なものも多く、別方法での検討などが必要である。

AIP の DNA メチル化異常についてイルミナ社の Infinium MethylationEPIC Kit を用いて網羅的な解析を行った。13 症例の AIP、コントロールには閉塞性膵炎 14 症例と、正常膵を 14 症例選択した。それぞれの症例に対してマイクロダイセクションを行い DNA を濃度 20ng/μL で 1000ng の DNA を抽出した。Bisulfite 法によって DNA を処理したのちに、およそ 45 万カ所の CpG アイランド部位に対して全ゲノム網羅的なメチル化アレイ解析を行った。解析後、上位 50 および下位 50 位の高メチル化遺伝子領域をピックアップした。そこからプロモーター領域でメチル化異常を認める遺伝子をデータベースと比較しながら選択し、メチル化異常を示す AIP に関与が疑われる遺伝子を複数選択した。

その後、選択された遺伝子のプロモーター領域のターゲット CpG 周辺の DNA 配列を検索し、メチル化特異的プライマーとメチル化非特異的プライマーを作成し、MSP 法を用いてメチル化異常が AIP に特異的なものかどうかの再検証解析を行っている。プライマー条件が難しく再検証が困難な遺伝子があるので、別の手法での解析を行う予定である。また選択された遺伝子のタンパク発現に関して、免疫染色での解析を行っている。

## 5 . 主な発表論文等

( 研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線 )

[ 雑誌論文 ] ( 計 8 件 )

菅野光俊、上原剛、石嶺南生、宇佐美陽子、川崎健治、濱野英明、本田孝行. 電気泳動検査が発見の端緒となった自己免疫性膵炎の診断基準. 電気泳動, 59, :35-38, 2015, 査読 : なし

上原剛. 免疫炎症検査と新しい疾患概念 IgG4 関連疾患の病態と検査 自己免疫性膵炎を中心に ( 解説 ). 臨床病理, 63, 1202-1206, 2015, 査読 : なし

上原剛、小川輝之、黒住昌弘. IgG4 関連疾患と前立腺疾患. 腎臓内科・泌尿器科, 2, 313-319, 2015, 査読 : なし

Arai T, Kobayashi A, Yokoyama T, Ohya A, Fujinaga Y, Shimizu A, Motoyama H, Furusawa N, Sakai H, Uehara T, Kadoya M, Miyagawa S. Signal intensity of the pancreas on magnetic resonance imaging: Prediction of postoperative pancreatic fistula after a distal pancreatectomy using a triple-row stapler. Pancreatology, 15, 380-386, 2015, 査読 : あり

Sato M, Kodaira M, Ishii W, Nakagawa M, Kishida D, Miyazaki D, Shimojima Y, Matsuda M, Uehara T, Ikeda S. Multifocal Fibrosclerosis with Hypertrophic Pachymeningitis and a Soft Tissue Mass around the Thoracic Vertebral Bodies: A Case Report with Review of the Literature. Intern Med, 54, 2267-2272, 2015, 査読 : あり

Uehara T, Hamano H, Kawa S, Kobayashi Y, Yoshizawa A, Oki K, Nakata R, Kobayashi A, Sano K, Ota H. Comparison of histopathological features of pancreatic carcinoma and type 1 autoimmune pancreatitis. Pathol Int, 64, 51-57, 2014, 査読 : あり

Uehara T, Hamano H, Suga T, Kawa S, Yoshizawa A, Kobayashi Y, Murata K, Oki K, Sano K, Onodera R, Ota H. Inflammation of colon adenoma in the setting of type 1 autoimmune pancreatitis. Pathol Int, 64, 67-74, 2014, 査読 : あり

Uehara T, Masumoto J, Yoshizawa A, Kobayashi Y, Hamano H, Kawa S, Oki K, Oikawa N, Honda T, Ota H. IgG4-related disease-like fibrosis as an indicator of IgG4-related lymphadenopathy. Ann Diagn Pathol, 17, 416-420, 2013, 査読 : あり

[ 学会発表 ] ( 計 6 件 )

黒川徹、村田敏規、浜野英明、藤永康成、上原剛、杠俊介、茂木英明. IgG4 関連眼疾患診断基準による当科症例の検討. 第 9 回 IgG4 研究会、2016.3.19、岡山

伊藤哲也、木村崇、上原剛、IgG4 関連膵胆管病変における内視鏡の役割 IgG4 関連硬化性胆管炎に対する経乳頭的胆管生検の有用性と限界. 第 89 回日本消化器内視鏡学会総会、2015.5.31、名古屋

神宮邦彦、上原剛、古澤徳彦. 術前診断が困難であった限局性の自己免疫性膵炎の一例. 第 104 回 日本病理学会総会、2015.4.30、名古屋

野沢修平、山本 洋、立石一成、牛木淳人、漆畑一寿、安尾将法、花岡正幸、吉田和夫、川上聡、吉澤明彦、上原剛、肺結節に対して肺切除術を施行された IgG4 関連疾患の臨床画像病理学的検討。第 55 回日本呼吸器学会学術講演会、2015.4.18、東京

上原剛、免疫炎症検査と新しい疾患概念 IgG4 関連疾患の病態と検査。第 10 回日本臨床検査医学会特別例会(第 29 回日本医学会総会)、2015.4.13、京都

上原剛。膵癌と 1 型自己免疫性膵炎の組織学的鑑別。第 103 回 日本病理学会総会、2014.4.25、広島

〔図書〕(計 2 件)

上原剛、太田浩良、小林幸弘、臨床検査法提要、14 病理検査。金原出版株式会社、2015。総頁数：1970。1315, 1372-1373

Uehara T, Ma D, Sepulveda AR: Part II Epithelial Neoplastic Disease 10 Molecular Pathology of Inflammatory Bowel Disease-Associated Neoplasia. Molecular Pathology of Neoplastic Gastrointestinal Disease, Springer, 2013。総頁数：277。173-178

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

上原 剛 (UEHARA, Takeshi)  
信州大学・学術研究院医学系・准教授  
研究者番号：80402121

### (2)研究分担者

増本 純也 (MASUMOTO, Junya)  
愛媛大学・大学院学医学系研究科ゲノム病理学分野・教授