

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN

**METODOLOGIE DI RICERCA NELLE MALATTIE
VASCOLARI**

Ciclo XXIII

**Settore scientifico-disciplinare di afferenza:
Area 06 MED/22 chirurgia vascolare**

**“VALUTAZIONE DELLE COMPONENTI PLASMATICHE,
CELLULARI E GENETICHE COINVOLTE NELL’ANEURISMA
DELL’AORTA ADDOMINALE”**

Presentata da: Dott.ssa ELPINIKI TSOLAKI

Coordinatore Dottorato

Relatore

C.mo Prof. A. STELLA

C.mo Prof. A. STELLA

Esame finale anno 2011

INDICE

- INTRODUZIONE	3
<i>Aneurismi dell'aorta addominale</i>	3
<i>Aneurismi aortici addominali infiammatori</i>	3
<i>Markers di flogosi</i>	5
<i>IgG4</i>	7
<i>Malattia autoimmune sistemica IgG4 correlata (IgG4-SD)</i>	8
- SCOPO DELLO STUDIO	10
- DISEGNO DELLO STUDIO	11
- RISULTATI	13
- DISCUSSIONE	23
- BIBLIOGRAFIA	25

INTRODUZIONE

ANEURISMI DELL'AORTA ADDOMINALE

La patogenesi dell'aneurisma aortico rimane non del tutto chiarita. Sembrano coinvolti fattori genetici, metabolici, infettivi, strutturali ma è ormai chiaro, che si tratti di un processo degenerativo concomitante alla patologia arteriosclerotica, ma non da essa direttamente dipendente.

Le arteriopatie generalizzate, la presenza di aneurismi multipli, l'associazione con ernie inguinali, fibrosi retroperitoneale ed enfisemi polmonari sembrano indicare che la patologia aneurismatica sia una conseguenza di alterazioni del metabolismo connettivale, piuttosto che una complicanza della patologia aterosclerotica.

Aneurismi Aortici Addominali Infiammatori (AAAI)

Gli aneurismi infiammatori dell'aorta addominale IAAA rappresentano un sottogruppo ben definito degli aneurismi aortici. La loro incidenza varia dal 2.5% al 18.1%. Descritti per la prima volta nel 1972 da Walker et al¹, la loro eziologia rimane controversa. Alcuni studi sostengono che l'AAA aterosclerotico sia il fenomeno iniziale e che la risposta infiammatoria rappresenti una risposta estrema, finale, e secondaria^{1 2 3}. Altri autori suggeriscono una reazione di tipo autoimmunitario^{4 5 6 7} basati sulla presenza di positività anticorpale o

sulla coesistenza di malattie autoimmunitarie. Inoltre è stata anche ipotizzata un'origine legata ad una abnorme risposta infiammatoria ad agenti infettivi^{8 9}.

L'80% dei pazienti con IAAA presenta dolore addominale o lombare, perdita di peso ed aumento della VES. Complicanze frequenti sono la compromissione e l'intrappolamento delle strutture circostanti nel processo fibrotico, prima fra tutte l'uretere con conseguente idroureteronefrosi ed il duodeno. La diagnosi può essere pre operatoria, con TAC e RMN che garantiscono un'accuratezza intorno al 90%, o intraoperatoria per l'aspetto biancastro e traslucido della parete dell'aneurisma e per l'infiammazione del tessuto avventiziale che determina tenaci aderenze ai tessuti circostanti. La conferma è data dall'esame istologico.

MARKERS DI FLOGOSI

CD 34

Rappresenta una glicoproteina transmembrana¹⁰ con un peso molecolare di 105-120 kd¹¹, senza omologia con altra proteina nota. La proteina contiene 354 aminoacidi, nove siti di glicosilazione in corrispondenza di un residuo di azoto e diversi punti di glicosilazione in radicali contenenti ossigeno; essa è, inoltre, molto ricca in acido sialico. Il gene per l'antigene CD34 è situato sul cromosoma 1, in stretta vicinanza con altri geni che codificano per fattori di crescita o molecole funzionali, quali CD1, CD45, TGF2 e laminina. La funzione della glicoproteina CD34 di superficie nelle cellule staminali emopoietiche è ancora oggetto di discussione; alla luce di risultati più recenti sembrerebbe giocare un ruolo rilevante nella modulazione delle cellule di adesione¹², probabilmente agendo come ligando per la L-selectina. E' stato inoltre ipotizzato un ruolo protettivo della molecola CD34 contro il danno proteolitico, grazie al suo alto numero di siti O-glicosilati.

Gli anticorpi monoclonali CD34 si legano specificamente all'endotelio vascolare. La molecola CD34 ha una localizzazione ultrastrutturale sulle cellule endoteliali: è concentrata principalmente sulla superficie rivolta verso il lume vascolare, in particolare su estroflessioni della membrana, molte delle quali si interdigitano con quelle delle cellule endoteliali adiacenti¹³. Poiché questa regione è di cruciale importanza per l'adesione leucocitaria e il passaggio transendoteliale, è stato

ipotizzato che la molecola CD34 possa essere antagonista o inibitrice della funzione adesiva dell'endotelio vascolare.

TRIPTASI

Glicoproteina di superficie cellulare prodotta dai mastociti, rappresenta un mitogeno delle linee fibroblastiche.

CD44

La proteina CD-44 è una proteina transmembrana, monomericamente, altamente glicosilata con funzione di legare l'acido ialuronico ed altre glicoproteine della matrice extracellulare. È principalmente una molecola di adesione intercellulare espressa sui linfociti; è il principale recettore per l'acido ialuronico ed è espressa in cellule infiammatorie e vascolari. In un recente studio¹⁴ emerge che il CD 44 contribuisce allo sviluppo dell'aneurisma dell'aorta addominale nel topo attraverso un'interazione con l'acido ialuronico ed il reclutamento di macrofagi. Un'intensa positività corrispondeva ad un intenso processo flogistico parietale chiamato periaortite.

IgG4

Le IgG4 sintetizzate dalle plasmacellule, costituiscono il 3-6% delle immunoglobuline G totali. Hanno la capacità di indurre la migrazione leucocitaria, non legano il complemento ¹⁵ e alte concentrazioni si possono riscontrare in condizioni limitate come la dermatite atopica, l'asma bronchiale, pemfigo volgare e foliaceo.

MALATTIA AUTOIMMUNE SISTEMICA IGG4 CORRELATA (IGG4 RELATED- SYSTEMIC DISEASE- IGG4-SD)

Nel 2001, Hamano *et al*¹⁶ hanno descritto l'associazione tra alti livelli di IgG4 e la pancreatite autoimmune caratterizzata da infiltrati linfoplasmatici e fibrosi con successiva atrofia parenchimale. Successivamente sono stati individuati infiltrati di IgG4 anche in organi extrapancreatici quali il dotto biliare, le ghiandole lacrimali, il polmone ed il retroperitoneo^{17 18 19 20 21 22} con identificazione quindi di un gruppo di patologie che vanno sotto il nome di malattia autoimmune sistemica IgG4 correlata (IgG4 related-systemic disease, IgG4-SD). Tale malattia si manifesta con edema dell'organo affetto e ottima risposta alla terapia steroidea. Tuttavia possono coesistere lesioni multiple in diversi organi. Istologicamente è caratterizzata da infiltrati di cellule infiammatorie contenenti numerose plasmacellule IgG4 positive, spesso anche eosinofili, fibrosi ed aspetti di flebite cronica²³.

Studi più recenti riportano che tale malattia può coinvolgere l'aorta toracica e quella addominale con manifestazioni quali l'aortite e gli aneurismi infiammatori^{24 25}. Kasashima *et al*²⁶ hanno individuato un sottogruppo di AAA infiammatori con caratteristiche clinico patologiche della Malattia autoimmune Sistemica IgG4 Correlata suggerendo che appartengano a questo gruppo di malattie sistemiche. Esisterebbero quindi 3 gruppi di AAA: aterosclerotici, infiammatori e infiammatori IgG4 correlati. Rispetto agli AAA aterosclerotici e quelli infiammatori che presentano un infiltrato di

neutrofili ma un trascurabile infiltrato di eosinofili, gli AAA IgG4 correlati erano frequentemente associati ad infiltrati eosinofili ma non neutrofili.

La distinzione tra i gruppi di AAA è clinicamente importante sia per il follow up che per il trattamento, data la sensibilità degli AAAI alla terapia steroidea che sembra essere ancora maggiore nei pazienti con AAAI IgG4 Correlati. Ulteriori studi sono necessari al fine di confermare questa ipotesi e approfondire le possibilità terapeutiche.

SCOPO DELLO STUDIO

Kasashima e Stone ^{27 28 29} hanno individuato nella popolazione di aneurismi aortici addominali (AAA) un sottogruppo di aneurismi infiammatori con le caratteristiche clinico patologiche della Malattia autoimmune Sistemica IgG4 Correlata. La distinzione tra i diversi gruppi di AAA è clinicamente importante sia per il follow up che per il trattamento di questa patologia. Obiettivo dello studio era la valutazione della componente flogistica, vascolare e stromale della parete aortica aneurismatica, la ricerca di aneurismi infiammatori ed in particolare di AAA IGg4 correlati.

DISEGNO DELLO STUDIO

Materiali e metodi

Popolazione

Lo studio ha ricevuto l'approvazione del comitato etico nel Dicembre del 2008. Tutti i pazienti inclusi erano stati presentati all'Unità Operativa di Chirurgia Vascolare ed Endovascolare di Ferrara per il trattamento chirurgico ed hanno firmato il consenso informato per la partecipazione allo studio. L'unico criterio di arruolamento era la presenza di aneurisma dell'aorta addominale sottorenale di interesse chirurgico documentato mediante angioTC. I dati raccolti sono stati raggruppati ed analizzati mediante creazione di un database elettronico. Tutti i pazienti oggetto dello studio sono stati sottoposti ad intervento chirurgico di sostituzione aortica, aortobisiliaca a aortobifemorale durante il quale è stato eseguito un prelievo di parete aortica aneurismatica.

I segmenti di parete aortica prelevati sono stati fissati in formalina tamponata al 10%, successivamente inclusi in paraffina e predisposti al taglio al microtomo. Le sezioni seriate ottenute sono state sottoposte inizialmente ad analisi istologica utilizzando delle colorazioni specifiche (Ematossilina-Eosina, PAS, Acido Periodico di Schiff, Weigert-Van Geison, Alcian-PAS, Alcian-Weigert) e successivamente ad analisi immunohistochimiche. Quest'ultime sono

state eseguite utilizzando anticorpi mono / policlonali diretti contro determinanti antigenici specifici della componente:

1. vascolare (CD34)
2. muscolare liscia (ASMA)
3. infiammatoria (Tryptasi)
4. stromale (CD44)
5. IgG4

Pertanto sono state eseguite 6 sezioni istologiche in bianco raccolte su vetri silanati o polarizzati (2 sono per riserva) ed 1 sezione colorata con ematossilina ed eosina per riferimento.

Per la valutazione delle IgG4 è stato utilizzato un anticorpo monoclonale murino diretto contro le immunoglobuline di tipo G (CELL MARQUE • Rocklin, CA 95677 USA).

In seguito alle analisi immunoistochimiche i pazienti con positività alle IgG4 sono stati indirizzati all'Unità Operativa di Reumatologia di Ferrara per ricerca di autoanticorpi antinucleo (ANA) e di IgG4 sieriche.

RISULTATI

I fattori di rischio e le comorbidità dei pazienti inclusi nello studio sono riassunti nella tabella I. Complessivamente sono stati valutati 21 pazienti, sono in fase di analisi istologica ulteriori 10 casi che non sono stati inclusi nello studio; tutti di sesso maschile. L'età media era di 68,5 anni (range 58-88 anni). Il diametro aneurismatico medio era di 58 mm (range 48-90 mm). 5 pazienti (24%) risultavano sintomatici all'ingresso in ospedale. 4 presentavano dolore lombare per cui sono stati sottoposti ad accertamenti diagnostici che hanno evidenziato l'AAA mentre in 1 caso l'aneurisma era in fase di fissurazione (dolori lombari ed addominali); 6 pazienti (29%) erano affetti da bronchite cronica ostruttiva (BPCO) documentata radiologicamente e seguiti dall'U.O. di Pneumologia. 19 pazienti erano affetti da ipertensione arteriosa (91%), 6 da cardiopatia ischemica (29%), 2 da diabete mellito di tipo II (9.5%). 17 pazienti erano ex fumatori (81%), 3 erano fumatori (14%) mentre solo in 1 non era presente l'abitudine tabagica. 13 pazienti erano affetti da dislipidemia. Nessuno dei pazienti era affetto da malattie di tipo autoimmunitario. 5 pazienti (24%) avevano manifestato pregresse reazioni allergiche ai FANS o antibiotici ed infine 4 pazienti (19%) erano stati sottoposti a trattamento chirurgico per ernia inguinale. Solo 1 paziente presentava fibrosi retroperitoneale associata alla patologia aneurismatica aortica. Nessun paziente aveva una diagnosi preoperatoria di aneurisma infiammatorio.

tabella I.

FATTORI DI RISCHIO	
Età media	68,5
Sesso M	21
Diametro AAA	58
Sintomi	5 (24%)
Fumo (ex+attuali fumatori)	20 (95%)
I.A.*	19 (91%)
IMA	6 (29%)
Diabete	2 (9.5%)
Dislipidemia	13 (62%)
BPCO	6 (29%)
Allergie	5 (24%)
Familiarità	1 (4.8%)

**I.A: ipertensione arteriosa*

Analisi Immunoistochimiche

In relazione al CD 34 è stata valutata non solo la positività ma anche l'eventuale variazione della sua concentrazione che risultava maggiore dove era più espresso il processo flogistico. In particolare 5 pazienti sono risultati negativi e quindi classificati come AAA aterosclerotici. 2 casi (CV3 e CV5) in cui l'espressione del CD 34 era molto debole, suggerendo una modesta reazione infiammatoria, sono stati classificati come AAA aterosclerotici. Viceversa 14 pazienti sono risultati altamente positivi ipotizzando la presenza di un processo flogistico (Foto 1).

In relazione al CD 44 sono stati evidenziati 3 gruppi di pazienti: il primo con un intensa positività (11 casi), indice di periaortite, il secondo con positività intermedia (5 casi) ed un terzo gruppo negativi al CD 44 (7 casi) (Foto 2). Infine in tutti i pazienti dello studio è stata osservata una positività alla triptasi (foto 3).

In base ai dati delle analisi immunoistochimiche abbiamo effettuato una prima distinzione tra AAA aterosclerotici ed infiammatori: gli AAA con intensa o intermedia positività al CD 34, 44 e triptasi sono stati classificati di tipo infiammatorio (AAAI *n*10) confermata anche dalla presenza di aortite mentre quelli che hanno dimostrato una risposta assente o debole sono stati classificati come aterosclerotici (AAAa *n*11) Foto 1. Considerando il numero ristretto dei casi dello studio, il confronto tra i due gruppi per quanto riguarda le comorbidità e i fattori di rischio preoperatori non ha evidenziato differenze statisticamente significative, (tabella 2). In particolare i pazienti del gruppo AAAI

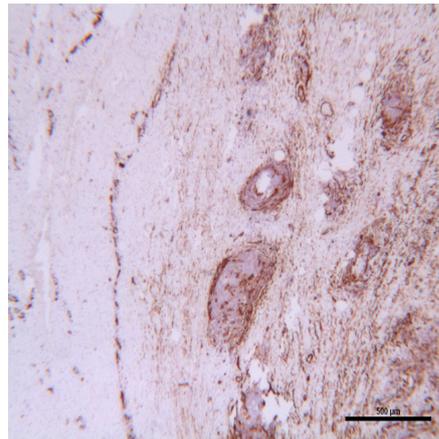
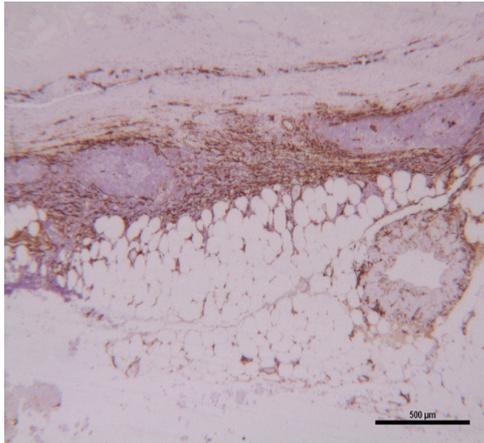
erano di età inferiore (63 vs 69 anni) con un diametro aneurismatico lievemente minore (56 vs 62 mm), presentavano sintomi quali dolore lombare ed allergie in minor percentuale e differivano dagli AAAI solo per il minor numero di pazienti affetti da dislipidemia (*n* 45-90).

Tabella 2.

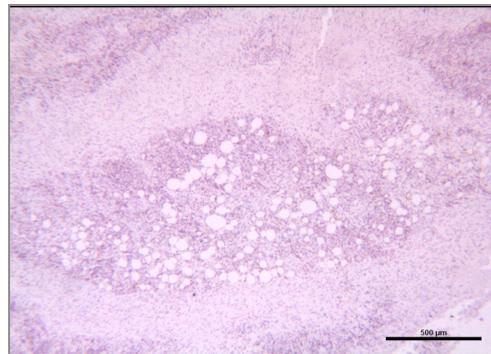
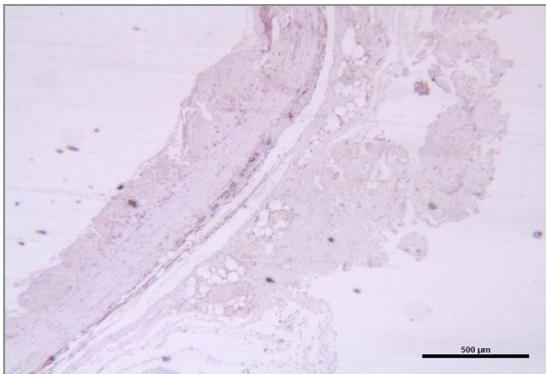
	AAAa 11	AAAi 10
Età media (aa)	69	63
Sesso M	11/11	10/10
Diametro AAA (mm)	62	56
Sintomi	3/11 (27%)	2/10 (20%)
Fumo (ex+attuali fumatori)	10/11(91%)	10/10 (100%)
I.A.*	10/11 (91%)	9/10(90%)
IMA	3/11(27%)	3/10(30%)
Diabete	1/11 (9%)	1/10(10%)
Dislipidemia	5/11 (45%)	9/10 (90%)
BPCO	3/11(27%)	3/10 (30%)
Allergie	3/11(27%)	2/10 (20%)
Familiarità	0	1/10 (10%)

AAAa:aneurismi aortici addominali aterosclerotici, AAAi: aneurismi aortici addominali infiammatori.

Foto 1



CV 1,2



CV 3,4

foto 1: nei primi 2 casi si evidenzia positività al CD34 mentre gli ultimi 2 (3cv e 4cv) sono risultati negativi.

Foto 2

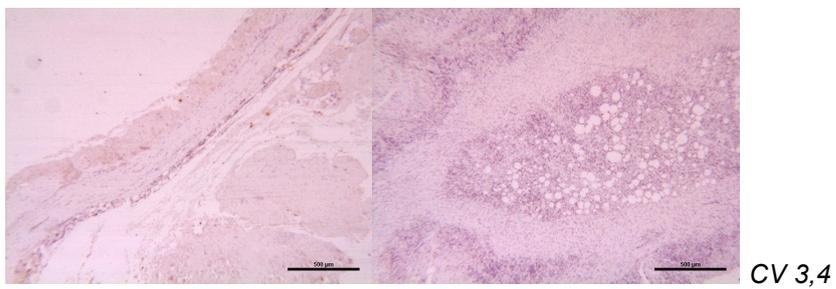
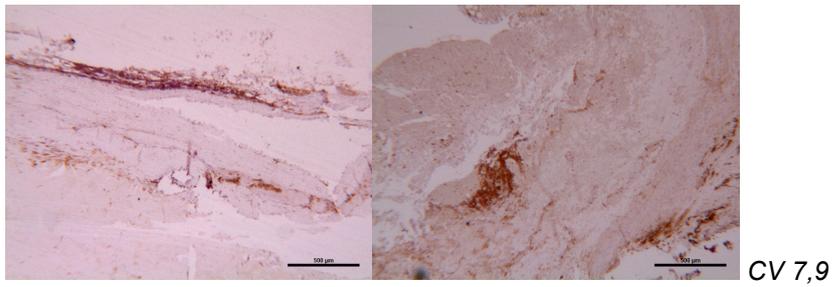
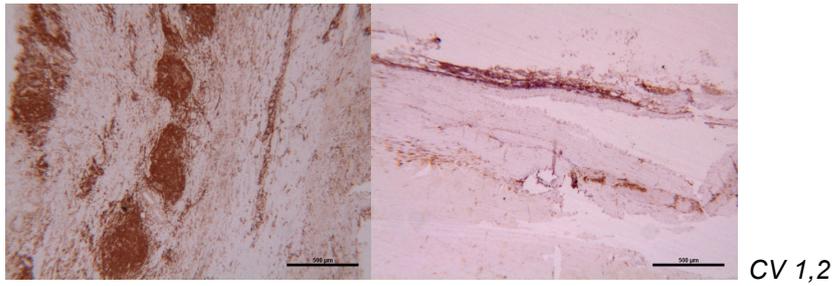


Foto 2: intensa positività al CD 44 nei casi CV1 e 2, positività intermedia nei casi CV7 e 9, negatività nei casi CV3 e 4.

Foto 3

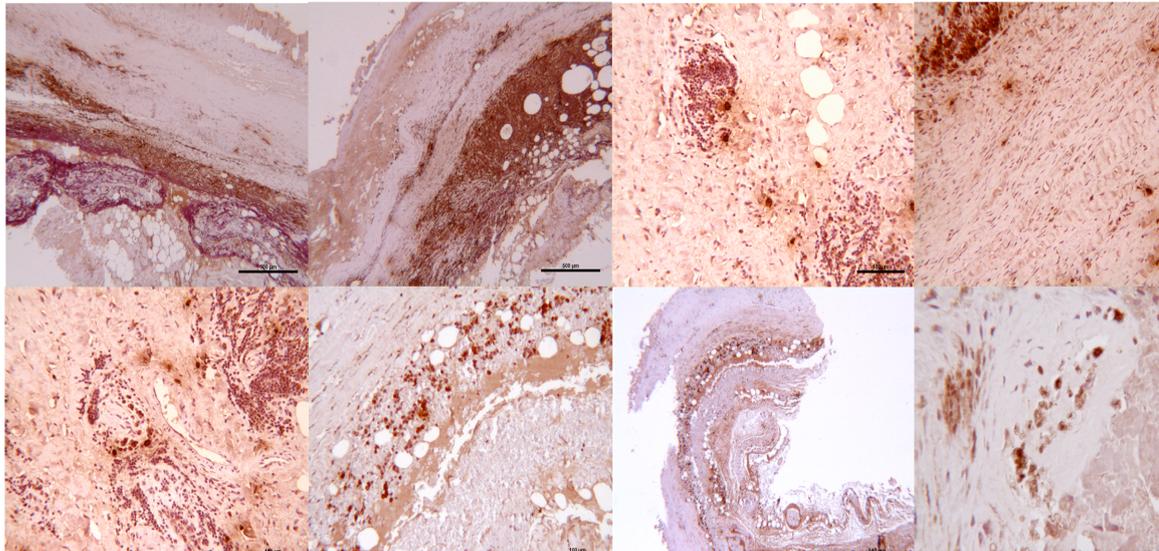


Foto 3: positività alla triptasi in tutti i pazienti.

IgG4

Nel nostro gruppo di studio 3 pazienti (14%) hanno dimostrato positività per l'IgG4 in presenza di periaortite. Inoltre tutti presentavano positività anche per il CD 44 ed il CD 34 (Foto 4). Si trattava in tutti i casi di ex fumatori e dislipidemicici, 1 solo paziente era

affetto da BPCO, 1 presentava anamnesi cardiologica positiva per cardiopatia ischemica. 1 presentava sintomatologia algica lombare regredita in seguito all'intervento chirurgico. 2 dei 3 pazienti risultavano allergici a farmaci o alimenti. L'esame istologico dei prelievi aortici confermava la presenza di tessuto fibroso sclerotico con marcata infiltrazione flogistica linfoplasmacellulare realizzante follicoli linfatici ed aspetti di flebite cronica. In seguito alla dimissione i pazienti sono stati indirizzati al D.H. Reumatologico per la ricerca di ANA (antimembrana nucleare) e dosaggio di IgG4 sieriche. Tali indagini sono ancora in fase di studio.

Dato il numero limitato di pazienti positivi alle IgG4 non è stata calcolata la significatività statistica con gli AAA aterosclerotici e quelli infiammatori.

FOTO 4

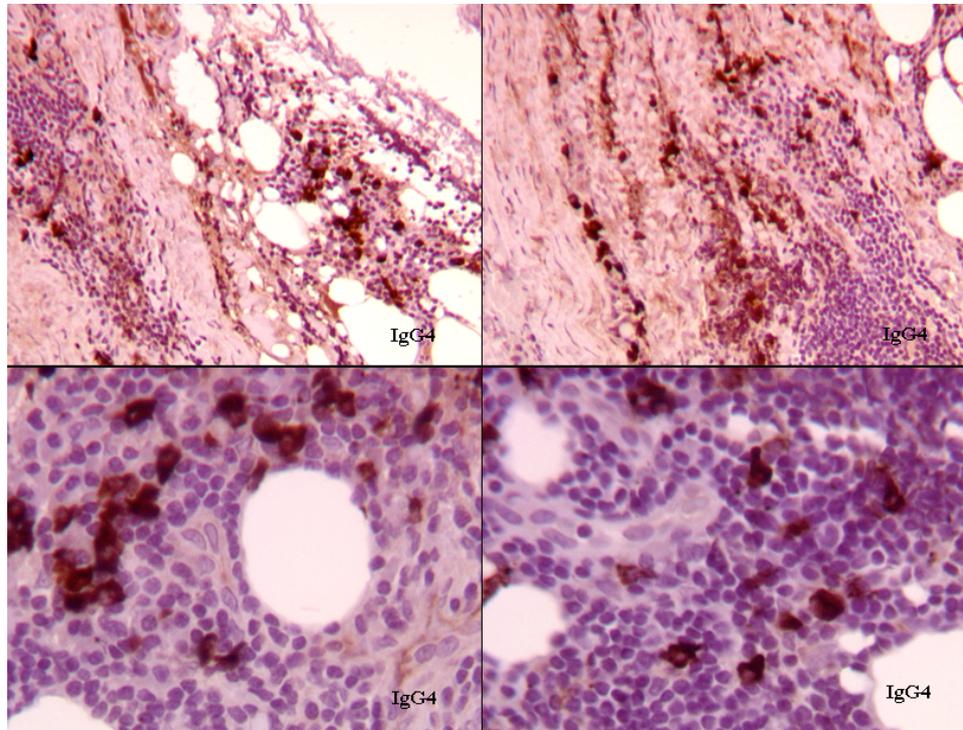


Foto 4: si evidenzia la presenza di tessuto fibrotico con molteplici calcificazioni e molteplici infiltrati flogistici frammentati ad infiltrati adiposi. La positività all'IgG4 delle plasmacellule è localizzata nella flogosi.

DISCUSSIONE

In letteratura esistono pochi gli studi relativi alla patologia dilatativa aortica IgG4 correlata. Inoltre la ricerca eseguita finora era concentrata solo nella popolazione giapponese mentre esistono pochi lavori sulla presenza di tali lesioni nella popolazione caucasica.

Nel nostro studio abbiamo voluto studiare i meccanismi di flogosi a livello della parete aortica aneurismatica e di ricercare mediante indagini immunoistochimiche, l'eventuale presenza di aneurismi infiammatori. Una volta identificato questo gruppo di pazienti abbiamo voluto ricercare un possibile correlazione con la patologia IgG4 correlata. I dati emersi hanno infatti identificato 3 sottopopolazioni di pazienti con AAA: un primo gruppo con aneurismi di tipo aterosclerotico associato a negatività ai markers infiammatori (AAAa), il secondo con aneurismi di tipo infiammatorio con positività ai markers infiammatori e negatività per le IgG4 (AAAI) ed infine un terzo gruppo di pazienti con aneurismi di tipo infiammatorio e positività alle IgG4 (AAAI-IgG4). Quest'ultimo gruppo anche se contiene un numero ridotto di pazienti sembra avere caratteristiche clinicopatologiche simili ai casi descritti da Kasashima^{11, 30}. Infatti oltre ad essere positivi ai markers infiammatori ed alle IgG4, 2 dei 3 pazienti risultavano asintomatici, nessuno aveva presentato segni di rottura e tutti sono stati trattati in regime di elezione. Infine 2 dei 3 pazienti risultavano allergici a farmaci o alimenti.

Il dato clinico più importante della malattia autoimmune sistemica IgG4 correlata (IgG4 related-systemic disease-IgG4-SD) è la sensibilità alla terapia steroidea somministrata per 2-3 settimane³¹. Un obiettivo importante per la futura ricerca è la valutazione del beneficio di questa terapia anche per gli aneurismi aortici infiammatori IgG4 correlati. Kasashima³² sostiene che la terapia steroidea potrebbe essere utile nel periodo preoperatorio per ridurre la reazione fibrosa nello spazio retroperitoneale e quindi facilitare l'isolamento dell'asse vascolare anche se potrebbe anche indurre un assottigliamento dell'avventizia della aortica con aumento del rischio di rottura dell'aneurisma. Ulteriori studi sono necessari per stabilire la durata ed il dosaggio della terapia steroidea prima del trattamento chirurgico. Tuttavia un approccio combinato tra la terapia steroidea preoperatoria e l'esclusione aneurismatica mediante tecnica endovascolare potrebbe essere utile nei pazienti ad alto rischio chirurgico.

In conclusione questo studio ha dimostrato che la malattia aneurismatica IgG4 correlata è presente anche nella popolazione caucasica. Con il proseguimento del nostro studio sarà interessante verificare la conferma di questi dati anche in altri pazienti al fine di ricercare la miglior strategia terapeutica e minimizzare il rischio di complicanze.

BIBLIOGRAFIA

¹ Crawford JL, Stowe CL, Safi HJ, Hallman CH, Crawford ES. Inflammatory aneurysms of the aorta. *J Vasc Surg* 1985;2:113-24.

² Rose AG, Dent DM. Inflammatory variant of abdominal atherosclerotic aneurysm. *Arch Pathol Lab Med.* 1981 Aug;105(8):409-13.

³ Leu HJ. Inflammatory abdominal aortic aneurysms: a disease entity? Histological analysis of 60 cases of inflammatory aortic aneurysms of unknown aetiology. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* 1990;417(5):427-33. Review.

⁴ Stella A, Gargiulo M, Faggioli GL, Bertoni F, Cappello I, Brusori S, et al. Postoperative course of inflammatory abdominal aortic aneurysms. *Ann Vasc Surg* 1993; 7: 229-238.

⁵ Vaglio A, Buzio C. Chronic periaortitis: a spectrum of diseases. *Curr Opin Rheumatol.* 2005 Jan;17(1):34-40. Review.

⁶ Ramshaw AL, Parums DV. Immunohistochemical characterization of inflammatory cells associated with advanced atherosclerosis. *Histopathology*. 1990 Dec;17(6):543-52.

⁷ Vaglio A, Greco P, Corradi D, Palmisano A, Martorana D, Ronda N, Buzio C. Autoimmune aspects of chronic periaortitis. *Autoimmun Rev*. 2006 Aug;5(7):458-64. Epub 2006 Apr 25. Review.

⁸ Karlsson L, Gnarpe J, Nääs J, Olsson G, Lindholm J, Steen B, Gnarpe H. Detection of viable *Chlamydia pneumoniae* in abdominal aortic aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2000 Jun;19(6):630-5.

⁹ Tanaka S, Komori K, Okadome K, Sugimachi K, Mori R. Detection of active cytomegalovirus infection in inflammatory aortic aneurysms with RNA polymerase chain reaction. *J Vasc Surg*. 1994 Aug;20(2):235-43.

¹⁰ Lara Rossi. Il nucleotide extracellulare UTP. Induzione della migrazione di cellule staminali emopoietiche CD34. Dottorato di ricerca in ematologia clinica e sperimentale, XIX ciclo, Università di Bologna.

¹¹ Greaves MF, Brown J, Molgaard HV et al. Molecular features of CD34: a hemopoietic progenitor cell-associated molecule. *Leukemia* 1992, 6 : 31.

¹² Lanza F, Bi S, Castoldi GL, Goldman JM. Abnormal expression of N-CAM (CD56) adhesion molecule on myeloid and progenitor cells from Chronic Myeloid leukemia. *Leukemia* 1993, 7 : 1570.

¹³ Fina L, Molgaard HV, Robertson D et al. Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood* 1990, 75 : 2417.

¹⁴ Toru Miyoshi; Tomoko Yonezawa; Satoshi Hirohata; Kazufumi Nakamura; Shozo Kusachi; Kengo Kusano; Yoshifumi Ninomiya; Hiroshi Ito Cd44 Contributes to the Development of Abdominal Aortic Aneurysm in Mice Through the Interaction With Hyaluronic Acid and the Recruitment of Macrophages. *Circulation*. 2010;122:A17430

¹⁵ Oxelius VA. Immunoglobulin constant heavy G subclass chain genes in asthma and allerg. *Immun Res* 2008: 40:179-191.

¹⁶ Hamano H, Kawa S, Horiuchi A, Unno H, Furuya N, Akamatsu T, Fukushima M, Nikaido T, Nakayama K, Usuda N, Kiyosawa K. High serum IgG4 concentrations in patients with sclerosing pancreatitis. *N Engl J Med*. 2001 Mar 8;344(10):732-8.

¹⁷ Zen Y, Kasahara Y, Horita K, Miyayama S, Miura S, Kitagawa S, Nakanuma Y. Inflammatory pseudotumor of the breast in a patient with a high serum IgG4 level: histologic similarity to sclerosing pancreatitis. *Am J Surg Pathol*. 2005 Feb;29(2):275-8.

¹⁸ Smyrk TC. Pathological features of IgG4-related sclerosing disease. *Curr Opin Rheumatol*. 2011 Jan;23(1):74-9.

¹⁹ Zen Y, Kitagawa S, Minato H, Kurumaya H, Katayanagi K, Masuda S, Niwa H, Fujimura M, Nakanuma Y. IgG4-positive plasma cells in inflammatory pseudotumor (plasma cell granuloma) of the lung. *Hum Pathol*. 2005 Jul;36(7):710-7.

²⁰ Takahira M, Kawano M, Zen Y, Minato H, Yamada K, Sugiyama K. IgG4-Related Chronic Sclerosing Dacryoadenitis. *Arch Ophthalmol*. 2007 Nov;125(11):1575-8.

²¹ Inoue D, Zen Y, Abo H, Gabata T, Demachi H, Kobayashi T, Yoshikawa J, Miyayama S, Yasui M, Nakanuma Y, Matsui O. Immunoglobulin G4-related lung disease: CT findings with pathologic correlations. *Radiology*. 2009 Apr; 251(1):260-70.

²² Zen Y, Onodera M, Inoue D, Kitao A, Matsui O, Nohara T, Namiki M, Kasashima S, Kawashima A, Matsumoto Y, Katayanagi K, Murata T, Ishizawa S, Hosaka N, Kuriki K, Nakanuma Y. Retroperitoneal fibrosis: a clinicopathologic study with respect to immunoglobulin G4. *Am J Surg Pathol*. 2009 Dec; 33(12):1833-9.

²³ Tabata T, Kamisawa T, Takuma K, Anjiki H, Egawa N, Kurata M, Honda G, Tsuruta K, Setoguchi K, Obayashi T, Sasaki T. Serum IgG4 concentrations and IgG4-related sclerosing disease. *Clin Chim Acta*. 2009 Oct;408(1-2):25-8.

²⁴ Kasashima S, Zen Y. IgG4-related inflammatory abdominal aortic aneurysm. *Curr Opin Rheumatol*. 2011 Jan; 23(1):18-23.

²⁵ Stone JR. Aortitis, periaortitis, and retroperitoneal fibrosis, as manifestations of IgG4-related systemic disease. *Curr Opin Rheumatol*. 2011 Jan;23(1):88-94.

²⁶ Kasashima S, Zen Y, Kawashima A, Konishi K, Sasaki H, Endo M, Matsumoto Y, Kawakami K, Kasashima F, Moriya M, Kimura K, Ohtake H, Nakanuma Y. Inflammatory abdominal aortic aneurysm: close relationship to IgG4-related periaortitis. *Am J Surg Pathol*. 2008 Feb;32(2):197-204.

²⁷ Kasashima S, Zen Y, Kawashima A, Konishi K, Sasaki H, Endo M, Matsumoto Y, Kawakami K, Kasashima F, Moriya M, Kimura K, Ohtake H, Nakanuma Y. Inflammatory abdominal aortic aneurysm: close relationship to IgG4-related periaortitis. *Am J Surg Pathol*. 2008 Feb;32(2):197-204.

²⁸ Kasashima S, Zen Y. IgG4-related inflammatory abdominal aortic aneurysm. *Curr Opin Rheumatol*. 2011 Jan; 23(1):18-23.

²⁹ Stone JR. Aortitis, periaortitis, and retroperitoneal fibrosis, as manifestations of IgG4-related systemic disease. *Curr Opin Rheumatol*. 2011 Jan;23(1):88-94.

³⁰ Kasashima S, Zen Y. IgG4-related inflammatory abdominal aortic aneurysm. *Cur Opin Rheumatology*.2011, 23:18-23.

³¹ Ghazale A, Chari ST, Zhang L, Smyrk TC, Takahashi N, Levy MJ, Topazian MD, Clain JE, Pearson RK, Petersen BT, Vege SS, Lindor K, Farnell MB. Immunoglobulin G4-associated cholangitis: clinical profile and response to therapy. *Gastroenterology*. 2008 Mar;134(3):706-15.

³² A new clinicopathological entity of IgG4-related inflammatory abdominal aortic aneurysm. Kasashima S, Zen Y, Kawashima A, Endo M, Matsumoto Y, Kasashima F. *J Vasc Surg*. 2009 May;49(5):1264-71; discussion 1271.