

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11254

研究課題名(和文) IP-10 を分子標的としたシェーグレン症候群の新規診断・治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a new method for diagnostic and treating Sjogren's syndrome by targeting IP-10

研究代表者

青田 桂子 (AOTA, Keiko)

徳島大学・病院・講師

研究者番号：70437391

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)：シェーグレン症候群(SS)は、外分泌腺を標的とする自己免疫疾患であり、その発症機序は未だ解明されていない。このため標準治療は確立されておらず、対症療法が主体である。我々はSS患者口唇腺の網羅的DNA発現解析を行った結果、ケモカインであるIP-10が過剰発現していることを見出した。詳細な解析をすすめたところ、SS唾液腺ではIFN- γ 刺激により導管細胞からIP-10が著明に分泌され、その結果IP-10のレセプターであるCXCR3+マクロファージが集簇されることが明らかとなった。IP-10を分子標的とすることでマクロファージの集簇を抑制し、SS唾液腺の慢性炎症を制御できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Sjogren's syndrome (SS), one of the most common autoimmune diseases, is characterized by the eventual total replacement of the acinar structure by marked lymphocytic infiltrates in the salivary and lacrimal glands. The pathogenesis of this selective and progressive destruction of the acinar structure in salivary glands is not yet fully understood.

By using a DNA microarray of lip salivary glands (LSGs), we detected significantly increased expressions of IP-10 in SS patients' LSGs compared to those from healthy controls. Our results suggest that the enhanced production of IP-10 by IFN- γ from ductal cells results in the migration of CXCR3+ macrophages. Strategies for blocking IP-10 may be a new intervention for the treatment of SS.

研究分野：口腔外科

キーワード：IP-10 シェーグレン症候群 CXCR3 マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

唾液は、抗菌作用、消化作用、自浄作用、pH 緩衝作用、歯の再石灰化作用など様々な作用を担っている。唾液分泌量が低下すると、食物の咀嚼や嚥下に支障をきたすだけでなく、う蝕の増加、口内炎、舌痛症、義歯不適合、構音障害などを引き起こし、生活の質 (QOL) を低下させる原因となる。この唾液分泌低下、すなわちドライマウスを主症状とする疾患の一つがシェーグレン症候群 (Sjögren's syndrome, 以下 SS) である。SS は外分泌腺を標的とする自己免疫疾患であり、主として中年以降の女性に発症する。標準治療は確立されておらず、現行の治療法は乾燥症状に対する対症療法のみである。本邦における SS 患者は、潜在的患者を含めると 10 ~ 30 万人と推測されているが、超高齢社会に伴い今後さらに増加すると予想される。SS 患者の豊かなライフステージのためにエビデンスに基づいた治療法の確立が望まれている。

2. 研究の目的

我々は、SS 患者の唾液中に存在する蛋白質を網羅的に解析した結果、ケモカインである interferon γ inducible protein 10 (以下 IP-10, 別名 CXCL10) が過剰に存在することを見出した。IP-10 は、炎症性サイトカインに応答して単球や上皮細胞、内皮細胞で発現誘導され、リンパ球の遊走に関するケモカインである。本研究では、SS の唾液腺破壊の原因分子として IP-10 に着目し、その機能解析を行い、SS に対する新規の診断、治療法を確立することを目指した。

3. 研究の方法

(1) SS 患者口唇腺の DNA マイクロアレイ解析

SS 患者および健常者の口唇腺を用いて DNA マイクロアレイ解析 (Affymetrix® Human Genome U219) を行った。

(2) SS 患者口唇腺における IP-10 およびそ

のレセプター CXCR3 の局在の検証

SS 患者から採取した口唇腺における IP-10 および CXCR3 の局在を蛍光免疫組織化学染色法にて検索した。

(3) 不死化正常ヒト唾液腺腺房細胞および唾液腺導管細胞における IP-10 の発現機構の解析

当科で樹立した不死化正常ヒト唾液腺導管細胞株 (NS-SV-DC) および腺房細胞株 (NS-SV-AC) の培養上清に TNF- α 、IFN- γ 、IL-18 および *P. gingivalis* 由来 LPS を添加し、6、12、24 時間培養後の CXCL9、10、11 蛋白質発現を ELISA にて解析した。IFN- γ および TNF- α 刺激時の両細胞のシグナル伝達経路を検索するためにウエスタンブロット法およびシグナルインヒビターを用いた解析を行った。両サイトカインと STAT1 インヒビター (MTA) あるいは NF- κ B インヒビター (Bay11-7082) を共培養し、IP-10 蛋白質発現に及ぼす影響を ELISA で検索した。

(4) サイトカイン刺激唾液腺細胞株が免疫細胞走化性に及ぼす影響

両細胞株に IFN- γ を添加し、ヒト単球/マクロファージ cell line である THP-1 cell の走化性を migration assay にて解析した。

4. 研究成果

(1) SS 患者口唇腺の DNA マイクロアレイ解析

SS 患者口唇腺のマイクロアレイの結果、49,386 の遺伝子が抽出され、そのうちコントロール群と比較し、5 倍以上の過剰発現があった遺伝子は 18 プローブであった。Interferon inducible protein とともに、CXCL9、IP-10、CCL4、CXCL13 といったケモカインや MMP-9 の過剰発現を認めた。

(2) SS 患者口唇腺における IP-10、CXCR3 の局在

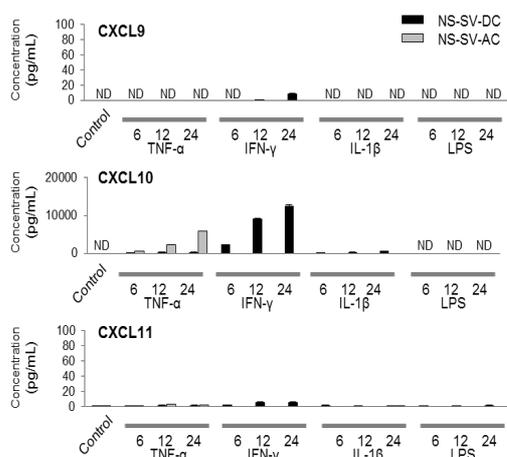
SS 口唇腺では、IP-10 は導管上皮に強発現していることが明らかになった。また、

CXCR3 は免疫担当細胞のうち、CD3⁺ T 細胞や CD123⁺ DC 細胞にも発現していたが、主に CD68⁺ マクロファージに発現していることが明らかになった。

(3) 不死化正常ヒト唾液腺細胞における IP-10 の発現機構

唾液腺導管細胞と腺房細胞では、IP-10 発現を誘導するサイトカインが異なり、導管細胞では IFN- γ 、腺房細胞では TNF- α にて IP-10 が分泌されることが明らかになった (図 1)。シグナル伝達経路を調べたところ、導管細胞では IFN- γ 刺激により JAK/STAT 経路を介し IP-10 発現が上昇することが判明した。一方、腺房細胞においては TNF- α 刺激により NF- κ B 経路を介し IP-10 発現が上昇することが明らかとなった。

図 1 正常ヒト唾液腺細胞株においてサイトカインおよび LPS が CXCL9、IP-10 (CXCL10)、CXCL11 蛋白質発現に及ぼす影響



(4) サイトカイン刺激唾液腺細胞株が免疫細胞走化性に及ぼす影響

Migration assay では、IFN- γ 刺激 NS-SV-DC 細胞において単球/マクロファージの有意な走化性亢進を認めた。

以上の結果より、IP-10 を分子標的にすることにより、SS 唾液腺において CXCR3⁺ マクロファージの集簇を抑制し、SS の炎症巣を制御できる可能性が示唆された。

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 3 件)

1. Aota K, Kani K, Yamanoi T, Nakashiro KI, Ishimaru N, Azuma M. Distinct Regulation of CXCL10 Production by Cytokines in Human Salivary Gland Ductal and Acinar Cells. *Inflammation* 2018; in press. 査読有 .
2. Aota K, Yamanoi T, Kani K, Azuma M. Cepharanthine inhibits IFN- γ -induced CXCL10 by suppressing the JAK2/STAT1 signal pathway in human salivary gland ductal cells. *Inflammation* 2018; 41: 50-58. 査読有 .
3. Yamanoi T, Aota K, Momota Y, Azuma M. Treatment with the biscochlorine alkaloid cepharanthin significantly increase salivary secretion in primary Sjögren's syndrome patients. *Journal of Oral Health and Biosciences* 2016; 29: 39-48. 査読有 .

〔学会発表〕(計 7 件)

1. 青田桂子, 山ノ井朋子, 可児耕一, 桃田幸弘, 東雅之. 唾液腺細胞における CXCL10 発現機構の解析. 第 72 回日本口腔科学会学術集会 2018.5.11-5.13. ウィンクあいち (愛知県).
2. 青田桂子, 山ノ井朋子, 可児耕一, 東雅之. セファランチンはヒト唾液腺導管細胞由来 IFN γ 誘導性 CXCL10 を抑制する. 第 54 回日本口腔組織培養学会学術大会. 2017.11.4. 岩手医科大学附属病院循環器医療センター (岩手県).
3. 青田桂子, 山ノ井朋子, 可児耕一, 石丸直澄, 東雅之. シェーグレン症候群における CXCR3⁺マクロファージの動態. 第 71 回日本口腔科学会学術集会. 2017.4.26-2.28. ひめぎんホール (愛媛県).
4. 青田桂子, 山ノ井朋子, 可児耕一, 石丸直

澄，東雅之．ヒト唾液腺細胞株における CXCL10 の発現機能解析．第 53 回日本口腔組織培養学会学術大会．2016.11.18. 石川県立美術館（石川県）．

5. 青田桂子，山ノ井朋子，可児耕一，高野栄之，桃田幸弘，松本文博，石丸直澄，東雅之．Sjögren 症候群唾液腺における IP-10 の発現制御機構．第 70 回日本口腔科学会学術集会．2016.4.15-4.17．福岡国際会議場（福岡県）．

6. 青田桂子，山ノ井朋子，石丸直澄，東雅之．シェーグレン症候群唾液腺における CXCR3 ligands の発現解析．第 25 回日本シェーグレン症候群学会学術集会．2016.9.8-9.9. 京王プラザホテル(東京都)．

7. 青田桂子，シェーグレン症候群の分子標的治療戦略．第 25 回口腔内科学会学術大会．2015.9.18-9.19．大阪大学コンベンションセンター（大阪府）．

6．研究組織

(1)研究代表者

青田 桂子（AOTA, Keiko）

徳島大学・病院・講師

研究者番号：70437391