

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11690

研究課題名(和文) シェーグレン症候群と腸内細菌叢の構成異常・腸管免疫の解明

研究課題名(英文) Relationship between Sjogren's syndrome and intestinal flora and intestinal immunity

研究代表者

大山 順子(OHYAMA, YUKIKO)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：70294957

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：シェーグレン症候群(SS)では転写因子やサイトカインの発現とリンパ球浸潤の関係から、Th2細胞は病態進展に関与しており、診断および病勢のバイオマーカーとしても応用できることが示唆された。同様にIgG4関連涙腺・唾液腺炎ではTfh細胞が病態形成に関与していることが示唆された。SSの腸内細菌叢の解析や比較はこれらのバイオマーカーの変化との関係を解析する必要が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

シェーグレン症候群、IgG4関連涙腺・唾液腺炎患者の腸内細菌叢の解析においては、診断および病勢のバイオマーカーを指標に分類、検討していくことが必要であることがわかり、今後の研究の方向性となった。

研究成果の概要(英文)：In Sjogren's syndrome (SS), the relationship between transcription factors and cytokine expression and lymphocyte infiltration suggests that Th2 cells are involved in the progression of disease and can be applied as biomarkers for diagnosis and disease progression. Similarly, it was suggested that Tfh cells are involved in the pathogenesis of IgG4-related lacrimal glands and salivary glands. It was suggested that the analysis and comparison of the intestinal microbiota of SS should analyze the relationship with changes in these biomarkers.

研究分野：口腔外科学

キーワード：シェーグレン症候群 IgG4関連涙腺・唾液腺炎 腸内細菌叢

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

## 1. 研究開始当初の背景

次世代シーケンサーを用いたメタゲノム解析方法が飛躍的に発展し、腸内常在細菌の偏倚と炎症性腸疾患、肥満、糖尿病、大腸がんなどの関係が報告された。さらに腸内常在細菌による免疫反応の調整に関する研究が進み、免疫応答の活性化、抑制のバランスへの腸内常在菌の関与、自己免疫疾患モデルでの免疫調整への関与、ヒトにおいても関節リウマチや多発性硬化症では細菌叢の構成の偏倚が疾患に関与することが報告された。このような背景からシェーグレン症候群（SS）における腸内細菌叢と疾患の関係を検討することを考えた。

## 2. 研究の目的

腸内細菌叢の異常に伴う全身の免疫調整ネットワークの変調が SS の発症、病態の進展に関与しているヘルパー T（Th）細胞のバランスの異常を誘発する一因となり、病態形成に関与しているという仮説のもと、SS 患者、IgG4 涙腺唾液腺炎（IgG4-DS）の腸内細菌叢と局所のリンパ球浸潤のサブセットについて検討を行なった。

## 3. 研究の方法

### <対象>

SS 患者については 1999 年厚生省診断基準でシェーグレン症候群と診断された患者を、IgG4-DS については 2011 年 IgG4 関連疾患包括基準または涙腺唾液腺炎の臓器別診断基準で診断された患者を対象とし、検体採取を行ったもの上記 2 疾患の診断基準に至らなかった患者は「否定例」とした。また唾液腺検体の対照群としては、慢性唾液腺炎（粘液貯留嚢胞）患者の口唇腺病変、顎下腺は慢性唾液腺炎（唾石症）患者の顎下腺病変を用いた。腸内細菌叢については健常日本人のデータを用いることとした。

### <方法>

DNA マイクロアレイ解析には 60,000 probes の DNA chip を有する SurePrint G3 Human Gene Expression v2 8×60K Microarray Kit (Agilent Technologies) を使用し、Linear Models for Microarray Analysis package33 を用いて発現変動遺伝子 (differentially expressed gene: DEG) を選択した。対照群と比較して SS、IgG4-RD 群において発現上昇 (ratio  $\geq 4.0$ -fold かつ  $P < 0.05$ ) または減少 (ratio  $\leq 0.25$  かつ  $P < 0.05$ ) を認めた DEG を抽出した。

## 4. 研究成果

### 1) シェーグレン症候群（SS）の病変局所における T 細胞サブセット：

これまで、SS の口唇腺のサイトカインの発現については RT-PCR 法、リアルタイム RT-PCR 法、免疫組織化学染色法を用いて解析してきたが、今回は SS および慢性唾液腺炎（粘液貯留嚢胞）患者の口唇腺病変を用いて、DNA マイクロアレイ解析でサイトカイン、転写因子の解析を行った。

その結果、SS では T-bet (Th1 の

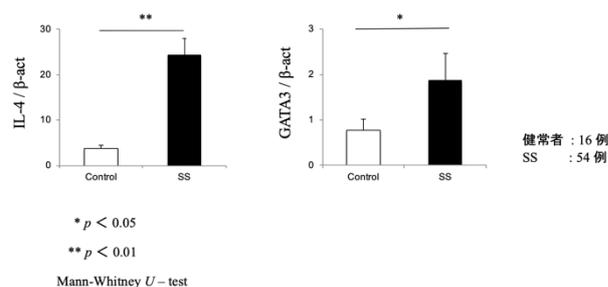


図1 シェーグレン症候群患者口唇腺における IL-4、GATA3 の発現

転写因子)、ROR $\gamma$ t (Th17の転写因子) およびGATA3 (Th2の転写因子) の発現が有意に亢進していた。特にGATA3およびIL-4 (Th2細胞が主に産生) のmRNA発現量は著明で(図1)、口唇腺のリンパ球浸潤程度(focus score)と有意な正の相関を示した。

Th1の転写因子であるT-bet、Th17の転写因子であるROR $\gamma$ tのmRNA発現量の亢進も認められたが、特にTh2の転写因子であるGATA3、Th2細胞が主に産生するIL-4のmRNA発現量は口唇腺のリンパ球浸潤程度と有意な正の相関を示す事から、Th2細胞はリンパ球浸潤(病態進展)に関与しており、診断および病勢のバイオマーカーとしても応用できることが示唆された。SSを単一疾患として腸内細菌叢の解析を行うのではなく、SSの病態進展に関与するリンパ球サブセット、特にTh2に関与するサイトカイン、転写因子の発現程度(発現亢進の前後)と腸内細菌叢の解析を行う必要であることがわかり、今後研究を進めていく

## 2) IgG4関連涙腺・唾液腺炎(IgG4-DS)の病変局所におけるT細胞サブセット:

1)と同様、IgG4-DSおよび慢性唾液腺炎(唾石症)患者の顎下腺病変を用いて、DNAマイクロアレイ解析でサイトカイン、転写因子の解析を行った。

その結果、IgG4-DSではBcl-6(濾胞性T(Tfh)細胞の転写因子)およびGATA3(Th2の転写因子)の発現が有意に亢進していた。特にBcl-6およびIL-21(Tfh細胞が主に産生)のmRNA発現量は、顎下腺のIgGに対するIgG4のmRNA発現量(図2)、顎下腺のIgG4陽性細胞数(図3)、および血清IgG4値と有意な正の相関を示した。

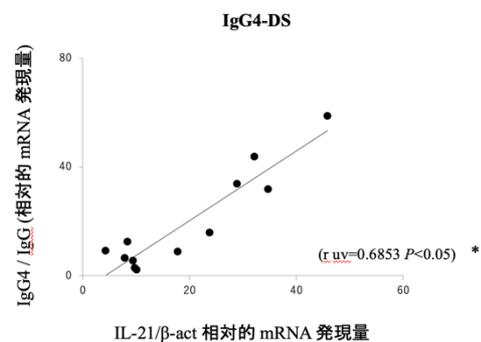


図2 IgG4関連涙腺・唾液腺炎患者顎下腺におけるIL-21, IgG4 mRNAの発現の関係

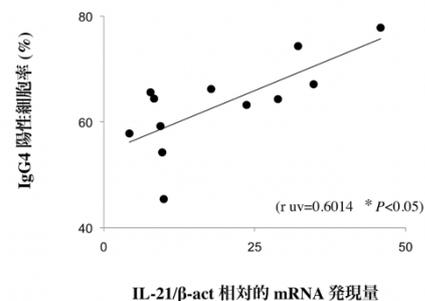


図3 IgG4関連涙腺・唾液腺炎患者顎下腺におけるIL-21 mRNA発現とIgG4陽性細胞率の関係

3) SSの口唇腺、IgG4-DSの顎下腺における異所性胚中心形成について:

IgG4-DSでは唾液腺局所に著明なびまん性リンパ球浸潤とともに主にB細胞が構成する異所性胚中心を認め、その周囲を取り囲むように著明な線維化を認める。一方、SSの口唇腺では導管周囲性にリンパ球が浸潤し、進行した症例では異所性胚中心を形成し導管の破壊を伴う。

2)で示したようにIgG4-DSにおける顎下腺でのTfh細胞の転写因子であるBcl-6とIL-21の有意な発現の上昇と顎下腺局所および血清IgG4の上昇の関係が示されたが、病理所見は異なるものの異所性胚中心を形成するSSとの比較を行った。

その結果、SSの口唇腺においてもBcl-6およびIL-21のmRNA発現は健常者に比較すると有意に上昇していたが、IgG4-DSの唾液腺ではさらに顕著であった(図4)。また、IgG4-DSではSSに比較して、胚中心形成の頻度、数が有意に多く、胚中心のサイズも有意に大きかった(図5)。

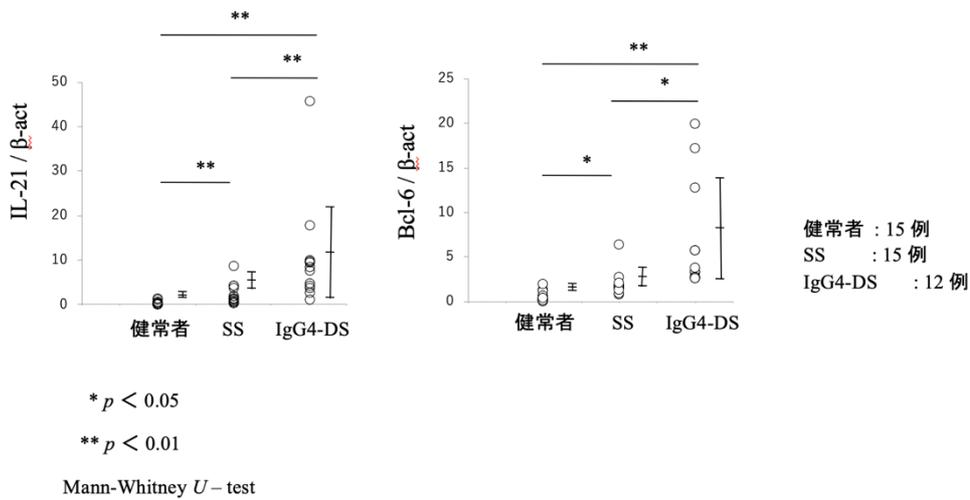
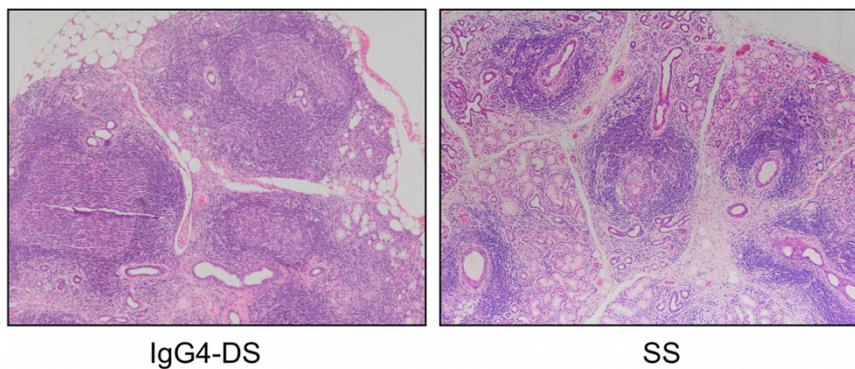


図4 シェーグレン症候群患者口唇腺、IgG4 関連涙腺・唾液腺炎患者顎下腺における IL-21, Bcl-6 の発現



胚中心形成	IgG4-DS	SS	P 値
発現頻度	12/20 (60%)	15/66 (22.7%)	$P < 0.05$
数 (/HPF)	$2.5 \pm 2.6$	$0.1 \pm 0.3$	$P < 0.05$
サイズ ( $\times 10^3 \mu\text{m}^2$ )	$68.1 \pm 29.4$	$31.2 \pm 21.9$	$P < 0.05$

図5 シェーグレン症候群患者口唇腺、IgG4 関連涙腺・唾液腺炎患者顎下腺における胚中心形成

IgG4-DS においては Th2 の転写因子である GATA3 の発現も有意に亢進しており、Th2 の関与も考えられるが、特に濾胞性 T (Tfh) 細胞の転写因子である Bcl-6、Tfh 細胞が産生する IL-21 は mRNA 発現の有意な上昇に加えて局所の IgG4 陽性細胞数、IgG4 mRNA の発現、血清の IgG4 値と有意な正の相関を示しており、Tfh 細胞は IgG4 産生 (病態形成) に関与していることが示唆された。

SS、IgG4-DS の両疾患ともに異所性胚中心の形成を認め、Th2 細胞、Tfh 細胞が疾患の病勢に関与すること明らかとなったが、病理組織像は異なることから、リンパ球浸潤が亢進し胚中心を形成する病態へ進展した SS と IgG4-DS での腸内細菌叢を健常者と比較することも今後の研究に組み入れていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	森山 雅文  (MORIYAMA MASAFUMI)  (20452774)	九州大学・歯学研究院・助教    (17102)	
研究分担者	梶岡 俊一  (KAJIOKA SYUNICHI)  (90274472)	九州大学・医学研究院・准教授    (17102)	