

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20934

研究課題名(和文) シェーグレン症候群における新規治療標的分子NR4A2とDPP4

研究課題名(英文) Novel therapeutic target molecules in Sjogren's syndrome: NR4A2 and DPP4

研究代表者

高橋 広行 (Takahashi, Hiroyuki)

筑波大学・附属病院・病院講師

研究者番号：10770745

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：シェーグレン症候群(SS)患者におけるNR4A2、DPP4の病因的意義を検討した。1) SS患者の口唇唾液腺(LSG)でNR4A2遺伝子発現はコントロールより有意に亢進したが、DPP4は有意差を認めなかった。免疫染色にてSS患者のLSGに浸潤したCD4陽性、IL-17産生細胞の核内にNR4A2の特異的な発現を認めた。2) SS患者の末梢血CD4+T細胞では健常者より、NR4A2遺伝子発現が有意に亢進し、Th17分化条件下におけるNR4A2核内発現率が有意に亢進した。Th17分化条件ではImportin阻害剤によりNR4A2核内発現率、IL-21 mRNA発現、IL-17産生細胞数が有意に減少した。

研究成果の概要(英文)：To clarify a role of NR4A2 and DPP4 in the pathogenesis of Sjogren's syndrome (SS), 1) I examined mRNA expression of NR4A2 and DPP4 in labial salivary glands (LSGs) of SS, IgG4-related disease (IgG4-RD) and healthy controls (HC) by qPCR and the protein expression in the LSGs by immunofluorescence staining (IF), and 2) performed functional analysis of the gene using peripheral CD4+ T cells of SS patients. 1) NR4A2 was significantly higher in LSGs of SS than controls, while DPP4 was not. IF revealed higher NR4A2 in CD4+ T cells and IL-17-producing cells in LSGs of SS compared with IgG4-RD. 2) Peripheral CD4+ T cells showed significantly increased NR4A2 mRNA and Th17 polarization in SS compared with HC. Nuclear NR4A2 in Th17-polarized CD4+ T cells was significantly higher in SS than in HC. Importazole, inhibiting nuclear NR4A2, suppressed Th17 polarization and IL-21 mRNA in CD4+ T cells under Th17-polarizing conditions. Thus, NR4A2 could contribute to enhanced Th17 polarization in SS.

研究分野：膠原病学

キーワード：シェーグレン症候群 Th17細胞

1. 研究開始当初の背景

シェーグレン症候群 (Sjögren's syndrome; SS) は、涙腺、唾液腺などの外分泌腺における慢性炎症と、組織障害を特徴とする自己免疫疾患である。その原因は未だ明らかにされておらず、根本的治療は存在しない。

SS患者の涙腺、唾液腺には導管、腺房周囲にCD4陽性T細胞を主体とする著明なリンパ球浸潤が認められ、腺組織の破壊と機能障害をもたらすと考えられている。これまで、SS患者、SSのモデルマウスにおいてTh1、Th2サイトカインが、唾液腺の病態形成に重要であることが示唆され (van Woerkom JM, et al. *Ann Rheum Dis* 2005;64:1474-9)、当研究室においても報告した (Iizuka M, et al. *Mod Rheumatol* 2013;23:614-616)。さらに、近年、SS患者の唾液腺におけるTh17細胞の存在も示された (Sakai A, et al. *J Immunol* 2008;181:2898-906)。SSのモデルマウスにおいても、IL-17あるいはTh17細胞がSS様病態の発症と、増悪に寄与することが示され (Lin X, et al. *Ann Rheum Dis* 2015;74:1302-10)、当研究室においても報告した (Iizuka M, et al. *Mod Rheumatol* 2015;25:158-60)。

また、SSと健常者の口唇唾液腺 (LSG) の遺伝子発現を、DNAマイクロアレイを用いて網羅的に解析した報告があり (Hjelmervik TO, et al. *Arthritis Rheum* 2005;52:1534-44)、当研究室においても報告した (Wakamatsu E, et al. *Ann Rheum Dis* 2007;66:844-5)。いずれの報告においても、SSのLSGでは炎症細胞浸潤を示唆する遺伝子の発現が、健常者のLSGに比べて上昇していた。しかし、いずれも対照が健常者であることから、その結果はLSGの炎症細胞浸潤に伴う、疾患に非特異的な発現の上昇をみている可能性がある。そこで、SSと同様にLSGに炎症を来すIgG4関連疾患 (IgG4-RD) のLSGと遺伝子発現を比較することで、SSに特異的な発現遺伝子を抽出できる可能性があると考えた。

IgG4-RDは、涙腺炎や唾液腺炎を合併し、高IgG4血症や腺組織へのIgG4陽性形質細胞の浸潤を特徴とするが、確立した自己抗体は存在しない。また、研究代表者が過去に報告したように (Takahashi H, et al. *Joint Bone Spine* 2014;81:331-6、Takahashi H, et al. *Rheumatology (Oxford)* 2015;54:1113)、ステロイドへの反応性がよいことや、多彩な臓器病変が検出されることなど、SSとは異なる臨床像を呈する。当研究室では、DNAマイクロアレイにより、IgG4-RDのLSGにおける遺伝子発現をSSと比較し、IgG4-RDで発現が上昇した遺伝子としてCCL18やLactotransferrinを同定し、IgG4-RDの病態形成への関与について報告した (Tsuboi H, et al. *Arthritis Rheumatol* 2014;66:2892-9)。

今回の研究においては、SSで発現が上昇し

た遺伝子に着目する。上記研究において、SSのLSGで発現が上昇した発現変動遺伝子として、1320遺伝子が同定された。このうち、ランク高位、発現量高値、T細胞機能と関連のある遺伝子に注目し、Validation候補遺伝子として、CXCL9、NR4A2、CD26 (DPP4)、SGK1、PDK1を抽出した。

このうち、NR4A2は、ナイーブCD4陽性T細胞においてIL-21の産生を介し、Th17細胞への分化を促進することが報告されている

(Raveney BJ, et al. *PLoS One* 2013;8:e56595)。また、CD26高発現CD4陽性T細胞は高いIL-17産生能を有することも報告されている (Bengsch B, et al. *J Immunol* 2012;188:5438-47)。以上より、SSの唾液腺局所において、NR4A2およびCD26がTh17細胞への分化を制御することで唾液腺炎の病態に関与する可能性を考え、SSにおける病因的役割を検討することとした。

2. 研究の目的

DNAマイクロアレイにより同定された、SS患者のLSGに特異的な発現変動遺伝子 (DEG) (NR4A2、CD26) の病因的意義を明らかにする。

① SS患者のLSGにおけるDEGの遺伝子発現解析、タンパク質発現解析、発現細胞の同定を行うことで、SS患者における唾液腺炎の免疫学的機序を検討する。

② SS患者の末梢血CD4陽性T細胞におけるDEGの発現解析および機能解析を行い、SSにおける病因的役割と、治療標的分子としての可能性を明らかにする。

3. 研究の方法

①-1 SS患者 (n=15)、IgG4-RD患者 (n=12)、健常者 (n=6) のLSGにおける、NR4A2、CD26を含むValidation候補遺伝子のmRNA発現を定量PCRにより比較した。ValidationされたDEGのうち、SSとの関連が報告されていない新規の遺伝子に着目した。

①-2 蛍光免疫染色を用い、SS患者のLSGにおけるDEGのタンパク質発現をIgG4-RD患者のLSGと比較し、発現細胞の同定を行った。

②-1 SS患者 (n=22) および健常者 (n=10) の末梢血CD4陽性T細胞を用い、DEGの発現解析を行った。

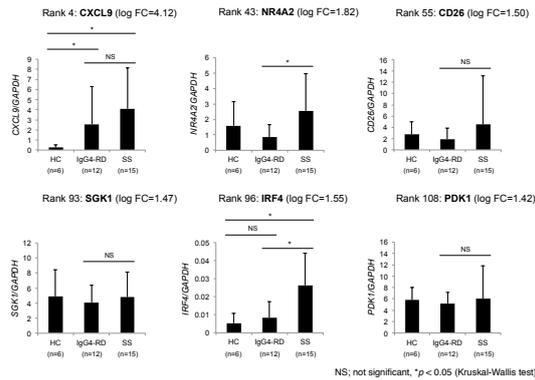
②-2 末梢血CD4陽性T細胞のTh17分化におけるDEGの機能解析を行った。

4. 研究成果

①-1 定量PCRによるValidationでは、CXCL9のmRNA発現はSSのLSGで健常者よりも有意に上昇していたが、SSとIgG4-RDに有意差を認めなかった。NR4A2のmRNA発現はSSのLSGでIgG4-RDよりも有意に上昇していた。CD26のmRNA発現はSSとIgG4-RDに有意差を認めなかった。SGK1のmRNA発現はSSとIgG4-RDに有意差を認めなかった。IRF4のmRNA発現はSSのLSGでIgG4-RDよりも有意に上昇し

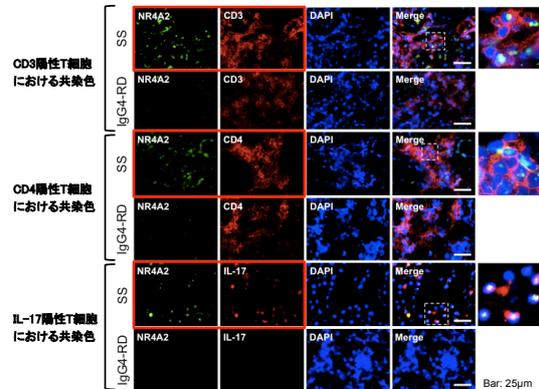
ていた。PDK1 の mRNA 発現は SS と IgG4-RD に有意差を認めなかった (図 1)。

図 1 定量 PCR による Validation



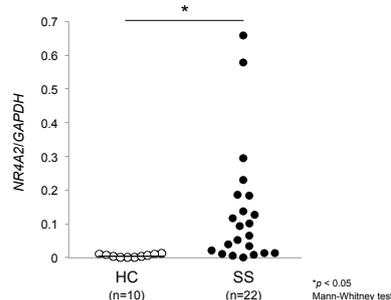
①-2 NR4A2 は SS との関連を示した既報がないことから、NR4A2 に着目し、SS との関連につき検討を進めた。蛍光免疫染色において、NR4A2 のタンパク質発現は SS の LSG において顕著に認められたが、IgG4-RD の LSG では認められなかった。そして、NR4A2 と、CD3、CD4、IL-17 の共染色において、NR4A2 の発現は SS の LSG に浸潤した CD3 陽性 T 細胞、CD4 陽性 T 細胞、IL-17 産生細胞に認められた。一方で、IL-17 非産生細胞では NR4A2 の発現がほとんど認められなかった。以上より、NR4A2 は SS の LSG に浸潤した Th17 細胞から主に産生されることが示唆された。そして、NR4A2 はこれらの細胞の核に局在した (図 2)。

図 2 LSG における NR4A2 のタンパク質発現



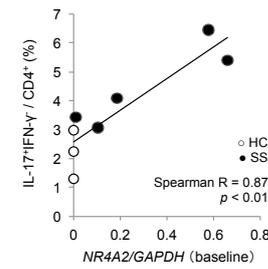
②-1 SS 患者 (n=22) の PBMC から分離された CD4 陽性 T 細胞において、NR4A2 の mRNA 発現は、健常者 (n=10) と比較し有意に上昇していた (図 3)。

図 3 末梢血 CD4 陽性 T 細胞における NR4A2 遺伝子発現



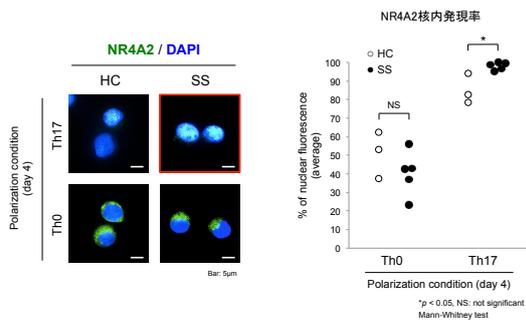
②-2-(1) 末梢血 CD4 陽性 T 細胞を Th17 分化条件下に 7 日間培養後、CD4 陽性 T 細胞中の IL-17+IFN- γ 細胞の割合 (%) は、SS 患者 (n=5, $4.50 \pm 1.41\%$) で健常者 (n=3, $2.18 \pm 0.84\%$) よりも有意に上昇した。一方、Th0 条件の培養後においては、両者に差は認められなかった。また、Th17 分化条件の培養後 7 日目における CD4 陽性 T 細胞中の IL-17+IFN- γ 細胞の割合 (%) は、培養前のベースラインにおける CD4 陽性 T 細胞の NR4A2 の mRNA 発現量と有意に正相関した (Spearman R=0.87) (図 4)。

図 4 NR4A2 発現量と誘導後 Th17 細胞数との相関



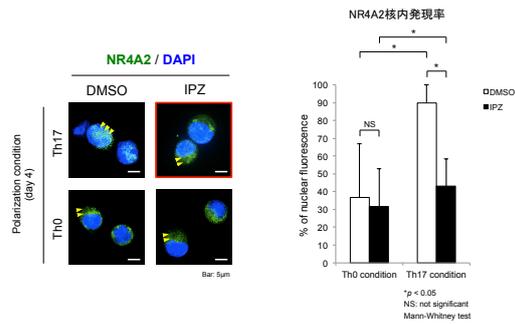
②-2-(2) ナイーブ CD4 陽性 T 細胞では、Th17 分化条件 (4 日目) において、NR4A2 は特異的に核内へ局在し、SS 患者では、Th17 分化誘導後の CD4 陽性 T 細胞における NR4A2 核内発現率 (98.1 \pm 2.0%) が、健常者 (85.1 \pm 8.1%) と比較し、有意に高値であった。一方、Th0 条件下の CD4 陽性 T 細胞における NR4A2 核内発現率は、SS 患者 (40.5 \pm 11.9%) と健常者 (51.2 \pm 12.6%) で差は認められなかった (図 5)。

図 5 SS 患者の Th17 分化誘導における NR4A2 の細胞内局在



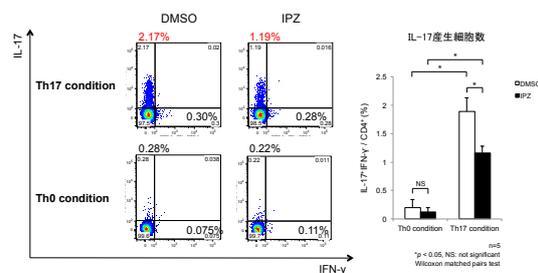
②-2-(3) ナイーブ CD4 陽性 T 細胞における NR4A2 の核局在は、Th17 分化条件下に Importin- β 特異的阻害剤 (Importazole; IPZ) により特異的に阻害された。Th17 分化条件 (4 日目) における NR4A2 の核内発現率はコントロール (DMSO) において 90.0 \pm 10.1%、IPZ において 43.1 \pm 15.1%であった (p<0.05)。一方、Th0 条件においては、IPZ により NR4A2 の細胞内局在に変化は認められず、NR4A2 の核内発現率はコントロール (DMSO) において 36.9 \pm 30.0%、IPZ において 31.7 \pm 21.0%であった (図 6)。

図 6 IPZ による NR4A2 の核移行阻害



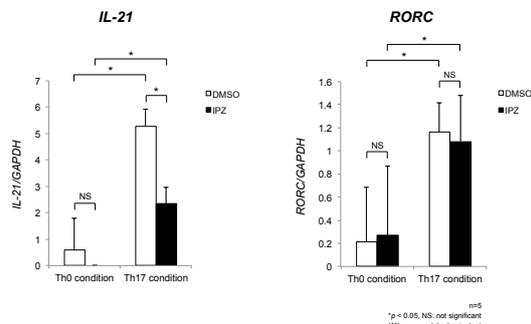
また、ナイーブ CD4 陽性 T 細胞を Th17 分化条件で培養した後 (4 日目) の CD4 陽性 T 細胞における IL-17+IFN- γ -細胞の割合 (%) は、IPZ により有意に抑制された (コントロール (DMSO) : $1.89 \pm 0.24\%$ 、IPZ : $1.16 \pm 0.12\%$)。一方、Th0 条件で培養後の CD4 陽性 T 細胞における IL-17+IFN- γ -細胞の割合 (%) は、IPZ により変化しなかった (コントロール (DMSO) : $0.20 \pm 0.14\%$ 、IPZ : $0.12 \pm 0.07\%$) (図 7)。

図 7 IPZ による Th17 分化誘導の変化



さらに、Th17 分化条件 (4 日目) では、ナイーブ CD4 陽性 T 細胞における IL-21 の mRNA 発現が IPZ により有意に抑制された。Th0 条件では IPZ により IL-21 の mRNA 発現は変化しなかった。一方、ナイーブ CD4 陽性 T 細胞における RORC の mRNA 発現は、Th17 分化条件、Th0 条件のいずれにおいても IPZ とコントロールで差は認められなかった (図 8)。

図 8 IPZ による Th17 関連遺伝子発現の変化



以上より、SS 患者では CD4 陽性 T 細胞における NR4A2 の発現と核局在が増強し、ROR γ t 非依存的に IL-21 発現が亢進することで、Th17 分化が促進され、SS の病態形成に関与す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 8 件)

1. Takahashi H, Tsuboi H, Yokosawa M, Asashima H, Hirota T, Kondo Y, Matsumoto I, Sumida T: Diffusion-weighted magnetic resonance imaging of parotid glands before and after abatacept therapy in patients with Sjögren's syndrome associated with rheumatoid arthritis: Utility to evaluate and predict response to treatment. *Mod Rheumatol* 28:300-307, 2018. (査読あり) doi: 10.1080/14397595.2017.1349234.
2. Sumida T, Azuma N, Moriyama M, Takahashi H, Asashima H, Honda F, Abe S, Ono Y, Hirota T, Hirata S, Tanaka Y, Shimizu T, Nakamura H, Kawakami A, Sano H, Ogawa Y, Tsubota K, Ryo K, Saito I, Tanaka A, Nakamura S, Takamura E, Tanaka M, Suzuki K, Takeuchi T, Yamakawa N, Mimori T, Ohta A, Nishiyama S, Yoshihara T, Suzuki Y, Kawano M, Tomiita M, Tsuboi H: Clinical practice guideline for Sjögren's syndrome 2017. *Mod Rheumatol* 28:383-408, 2018. (査読あり) doi: 10.1080/14397595.2018.1438093.
3. Ohyama A, Tsuboi H, Noma H, Terasaki M, Shimizu M, Toko H, Honda F, Yagishita M, Takahashi H, Asasahima H, Hagiwara S, Kondo Y, Matsumoto I, Sumida T: Associations between maternal clinical features and fetal outcomes in pregnancies of mothers with connective tissue diseases. *Mod Rheumatol* 2018. [Epub ahead of print] (査読あり) doi: 10.1080/14397595.2018.1452352.
4. Takahashi H, Tsuboi H, Asashima H, Hirota T, Kondo Y, Moriyama M, Matsumoto I, Nakamura S, Sumida T: cDNA microarray analysis identifies NR4A2 as a novel molecule involved in the pathogenesis of Sjögren's syndrome. *Clin Exp Immunol* 190:96-109, 2017. (査読あり) doi: 10.1111/cei.13000.
5. Iizuka-Koga M, Asashima H, Ando M, Lai C-Y, Mochizuki S, Nakanishi M, Nishimura T, Tsuboi H, Hirota T, Takahashi H, Masumoto I, Otsu M, Sumida T: Functional analysis of dendritic cells generated from T-iPS cells from CD4+ T cell clones of Sjögren's syndrome. *Stem Cell Reports* 8:1155-1163, 2017. (査読あり) doi: 10.1016/j.stemcr.2017.04.010.

6. Tsuboi H, Hagiwara S, Asashima H, Takahashi H, Hirota T, Umehara H, Kawakami A, Nakamura H, Sano H, Tsubota K, Ogawa Y, Takamura E, Saito I, Inoue H, Nakamura S, Moriyama M, Takeuchi T, Tanaka Y, Hirata S, Mimori T, Matsumoto I, Sumida T: Comparison of the performance of new ACR-EULAR classification criteria for primary Sjögren's syndrome with former sets of criteria in Japanese patients. *Ann Rheum Dis* 76:1980-1985, 2017. (査読あり)
doi: 10.1136/annrheumdis-2016-210758.
7. Tahara M, Tsuboi H, Segawa S, Asashima H, Iizuka M, Hirota T, Takahashi H, Kondo Y, Matsui M, Matsumoto I, Sumida T: ROR γ t antagonist suppresses M3 muscarinic acetylcholine receptor-induced Sjögren's syndrome-like sialadenitis. *Clin Exp Immunol* 187:213-224, 2017. (査読あり)
doi: 10.1111/cei.12868.
8. Hagiwara S, Tsuboi H, Honda F, Takahashi H, Kurata, I, Ohyama A, Yagishita M, Abe S, Kurashima Y, Kaneko S, Kawaguchi H, Takahashi H, Ebe H, Yokosawa M, Asashima H, Hirota T, Umeda N, Kondo Y, Matsumoto I, Sumida T: Association of anti-Ro/SSA antibody with response to biologics in patients with rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol* 26:857-862, 2016. (査読あり)
doi: 10.3109/14397595.2016.1153567.

[学会発表] (計 11 件)

1. 高橋広行: シェーグレン症候群患者の CD4 陽性 T 細胞における NR4A2 発現亢進と Th17 分化. 第 62 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2018.
2. Takahashi H: A potential role of NR4A2 overexpression in CD4+ T cells in the pathogenesis of Sjögren's syndrome. The 14th International Symposium on Sjögren's syndrome (Washington DC, USA), 2018.
3. Takahashi H: DNA microarray analysis identifies NR4A2 as a novel molecule involved in the pathogenesis of Sjögren's syndrome. American College of Rheumatology, Annual Meeting (San Diego, USA), 2017.
4. 高橋広行: DNA マイクロアレイによるシェーグレン症候群の唾液腺における遺伝子発現解析. 第 45 回日本臨床免疫学会総会、2017.
5. 高橋広行: シェーグレン症候群患者の CD4 陽性 T 細胞における NR4A2 発現亢進

と Th17 分化. 第 26 回日本シェーグレン症候群学会学術集会、2017.

6. Takahashi H: DNA microarray analysis identifies NR4A2 as a novel molecule involved in the pathogenesis of Sjögren's syndrome. The 7th East Asian Group of Rheumatology, 2017.
7. Takahashi H: DNA microarray analysis of labial salivary glands in patients with Sjögren's syndrome: comparison with IgG4-related disease. 第 61 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2017.
8. Takahashi H: DNA microarray analysis of labial salivary glands in patients with Sjögren's syndrome: comparison with IgG4-related disease. The 45th Annual Meeting of The Japan Society for Immunology, 2016.
9. 高橋広行: 関節リウマチ合併二次性シェーグレン症候群におけるアバタセプト治療前後の耳下腺 MRI 比較. 第 25 回日本シェーグレン症候群学会学術集会、2016.
10. 高橋広行: DNA マイクロアレイによるシェーグレン症候群の唾液腺における遺伝子発現解析. 第 25 回日本シェーグレン症候群学会学術集会、2016.
11. Takahashi H: DNA microarray analysis of labial salivary glands in patients with Sjögren's syndrome: comparison with IgG4-related disease. 第 60 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2016.

[図書] (計 1 件)

1. 高橋広行、他: 先端医学社「分子リウマチ治療」Vol. 10 No. 3、2017、58 ページ.

[産業財産権]

なし

[その他]

ホームページ等:

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/clinical-med/rheumatology/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者
高橋 広行 (TAKAHASHI, Hiroyuki)
筑波大学・附属病院・病院講師
研究者番号: 10770745

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし