

令和 4 年 4 月 21 日現在

機関番号：87301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K16210

研究課題名(和文) LncRNAが制御するシェーグレン症候群における唾液腺障害の病態解明

研究課題名(英文) LncRNA in labial salivary glands of Sjogren's syndrome patients

研究代表者

寶來 吉朗 (HORAI, Yoshiro)

独立行政法人国立病院機構(長崎医療センター臨床研究センター)・臨床研究センター・自己免疫研究室長

研究者番号：30646782

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)小唾液腺においてLncRNA NRONの著明な発現を浸潤細胞に認め、また導管への発現をSSとコントロール両方で認めた。SSの浸潤細胞巣でNFATc1の強陽性像を、SS、非SSの両方で導管に弱い陽性像を認めた。SS群においてNFATc1陽性/浸潤細胞面積比と浸潤細胞面積、NFATc1陽性/浸潤細胞面積比とフォーカススコアにそれぞれ正の相関を認めた。NFATc1とCD3の共陽性像は導管では殆ど認めないのに対し浸潤細胞表面では著明であり、これについては非SS群においてもSSと類似した所見を認めた。NFATc1とPIM-1の細胞質における共陽性像を浸潤細胞と導管で認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

LncRNAの発現及び機能解析は自己免疫疾患を含めた様々な病態に対する特異的な治療法に直結することが期待されている。本研究はSSの病変主座である小唾液腺におけるLncRNAと関連分子の局在を含めた発現解析、及びそれらの病態への関与を示す最初の報告であるため、今回の成果はSSにおける疾患特異的治療ターゲットの同定につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：The expressions of NRON and related substances were examined by in situ hybridisation, immunohistochemical analysis and immunofluorescence in labial salivary glands (LSGs) obtained from patients with Sjogren's syndrome (SS) and control subjects. The NRON expression in the nuclei of cell infiltration lesions of the SS patients were prominent. The NFATc1 expression was strong in the cytoplasm of infiltrating mononuclear cells and weak in ducts of both SS and controls. In SS, the NFATc1-positive area/infiltrating cell area was positively correlated with the infiltrating cell area and focus score. CD3/CD4 was expressed in infiltrating mononuclear cells, and PIM-1 colocalised with NFATc1 in the cytoplasm. These results suggest NRON along with NFATc1/PIM-1 in SS LSGs might participate in SS pathophysiology.

研究分野：リウマチ・膠原病内科学

キーワード：シェーグレン症候群 long non-coding RNA NRON NFATc1 PIM-1

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

シェーグレン症候群 (SS) は外分泌腺へのリンパ球浸潤による口腔・眼球乾燥症状が惹起され、病変局所に多様な炎症性・自己免疫性分子が発現する自己免疫疾患である。SS の治療として免疫抑制剤を含めた薬物療法は試みられているものの、その多くは非特異的療法であり、未だ SS の特異的治療法は確立していない。

Long non coding RNA (LncRNA) は 200 塩基以上の非翻訳性リボ核酸であり、近年細胞機能の調節や疾患発症における機能が解明されてきており、LncRNA と自己免疫疾患との関連についての報告も増加している。SS での LncRNA 発現解析の報告も増加しているが、病変の主座である唾液腺で LncRNA の局在を解析した報告は無い。

### 2. 研究の目的

LncRNA NRON (Non-coding RNA repressor of NFAT) は nuclear factor of activated T cells (NFAT) の細胞内局在に関与することでその活性を制御する。SS 唾液腺における NFAT 活性化の報告があることから NRON が SS の病態に関与している可能性が考えられる。本研究では NRON、NFATc1 及び NFATc1 の細胞内局在を制御するセリン/スレオニンキナーゼである Proviral integration site for Moloney murine leukemia virus (PIM)-1 の小唾液腺での発現解析を行い、SS 病態との関連について検討を行った。

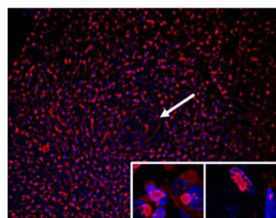
### 3. 研究の方法

SS の診断目的で口唇小唾液腺 (labial salivary glands, LSGs) 生検を施行した症例について NRON、NFATc1 及び PIM-1 の発現を含めた組織所見の解析を行った。SS の診断には 2002 年アメリカ-ヨーロッパ分類基準を用いた。乾燥症状から SS が疑われ口唇小唾液腺生検を施行したものの、上記分類基準を満たさなかった症例をコントロール群として用いた。

小唾液腺の病理学的診断目的に病理部へ提出、保管中の検体から *in situ* hybridization、及び免疫染色に供する FFPE 切片を作成した。NRON の発現については *in situ* hybridization による発現解析を行い、NFATc1 については免疫染色による発現解析を行った。また FFPE 組織用の切片とは別に、生検された口唇小唾液腺組織より唾液腺細胞を単離培養し、NFATc1、CD3、CD4 及び PIM-1 の増強/減弱及び局在を蛍光細胞染色で観察した。

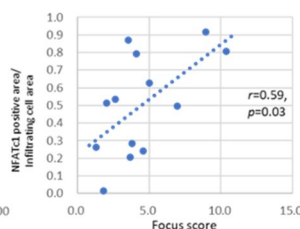
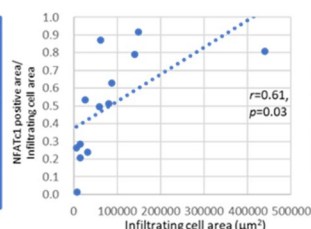
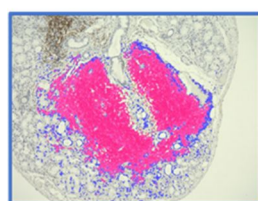
### 4. 研究成果

NRON の発現について *in situ* hybridization を用いた解析を行ったところ、SS では NRON の著明な発現を浸潤細胞に認めており、また導管への弱い発現を SS とコントロール両方で認めた。



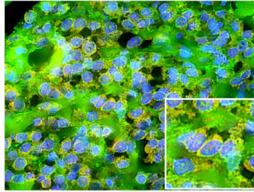
SS 小唾液腺における NRON 高発現  
(Red: NRON, Blue: nuclei)

次に、NFATc1 の発現について免疫染色による解析を行ったところ、SS の浸潤細胞巢で強い陽性像を認めた。また SS、コントロールの両方で導管に弱い陽性像を認めた。SS 症例の浸潤細胞面積、及び NFATc1 陽性細胞/浸潤細胞面積比をマイクロセルカウントメソッドを用いて算出し、フォーカススコア (FS)、血清 IgG 及び EULAR Sjogren's Syndrome Disease Activity Index (ESSDAI) との相関について解析を行ったところ、浸潤細胞面積と NFATc1 陽性細胞/浸潤細胞面積比、また NFATc1 陽性細胞/浸潤細胞面積比と FS との間に有意な正の相関を認めた。これらの所見からは浸潤細胞数及び浸潤細胞面積の両方が NFATc1 活性の調節に関連している可能性、また FS と呼吸器病変 (Respir Med 2018;137:95-102)、リンパ腫 (Ann Rheum Dis 2014;73:1537-40) との関連が報告されていることから、NFAT 活性が腺外病変に関連している可能性も考えられた。NFATc1 陽性細胞/浸潤細胞面積比と血清 IgG、血清 IgG と FS 及び NFATc1 陽性細胞/浸潤細胞面積比と ESSDAI との間には有意な相関を認めなかった。



NFATc1 陽性  
浸潤細胞面積/  
浸潤細胞面積比  
と浸潤細胞面積、  
FS との相関

NFATc1 と CD3 の発現に関して多重染色法を用いたマルチカラー解析を行ったところ、SS における NFATc1 と CD3 の共陽性像は導管では殆ど認めないのに対し浸潤細胞表面では著明であり、これについては非 SS 群においても SS と類似した所見を認めた。SS においては NFATc1 と CD4 に関する共陽性像を浸潤細胞に認めたのに対し、導管では認めなかった。SS における NFATc1 と PIM-1 の発現に関して同様に解析したところ、NFATc1 と PIM-1 の細胞質における共発現を浸潤細胞と導管、両方で認めた。これらの所見からは浸潤細胞が導管炎を起こしている可能性は否定的であること、また NRON 存在化では PIM-1 の NFATc1 活性化が抑制される可能性が考えられた。



浸潤細胞巢における NFATc1 と PIM-1 の共発現  
Green:NFATc1, Red:PIM-1, Blue:Nuclei

以上の所見より、SS 小唾液腺では NRON が高発現し、NFATc1 及び PIM-1 を介した SS の病態に関連していることが考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Horai Yoshiro, Nakamura Hideki, Shimizu Toshimasa, Nishihata Shinya, Iwamoto Naoki, Kuroki Tamotsu, Okano Shinji, Kawakami Atsushi	4. 巻 29
2. 論文標題 Increased Expression of the lncRNA NRON Along With NFATc1/PIM-1 in Labial Salivary Glands of Sjögren's Syndrome Patients	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology	6. 最初と最後の頁 734 ~ 740
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/PAI.0000000000000959	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yoshiro Horai, Hideki Nakamura, Toshimasa Shimizu, Naoki Iwamoto, Atsushi Kawakami
2. 発表標題 LncRNA NRON upregulation associates with clinical manifestations of Sjogren's syndrome by keeping NFATc1 and PIM-1 in the cytoplasm in labial salivary glands
3. 学会等名 第65回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 賣来 吉朗, 中村 英樹, 清水 俊匡, 西畑 伸哉, 岩本 直樹, 黒木 保, 岡野 慎士, 川上 純
2. 発表標題 シェーグレン症候群小唾液腺における lncRNA NRON及びNFATc1関連分子発現の解析
3. 学会等名 第29回日本シェーグレン症候群学会
4. 発表年 2021年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------