

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16137

研究課題名(和文)シェーグレン症候群におけるNR4A2を標的とした新規治療戦略の構築

研究課題名(英文)Development of novel therapeutic strategies targeting NR4A2 in Sjogren's syndrome.

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)様唾液腺炎を自然発症するROR γ t-TgマウスにおけるROR γ t antagonist (A213)の治療効果と、その作用メカニズムにおけるNr4a2の意義を明らかにするため、6週齢雌の同マウスにA213あるいはPBSを投与した。投与後の唾液量と唾液腺のfocus scoreはA213投与群で有意に改善した。頸部リンパ節(CLN)のCD4+CD25+Foxp3 $^{-}$ 細胞はA213投与群で有意に減少した。A213は同マウスのCLNにおけるエフェクターT細胞を抑制し、SS様唾液腺炎を改善させた。同マウスの胸腺におけるNr4a2の意義に着目し、さらなる解析を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々が開発したSSモデルマウスであるROR γ t-Tgを用い、その治療実験により、ROR γ tの唾液腺炎発症における役割と、唾液腺炎の制御において治療標的となる病因的な細胞集団を明らかにした。また、本研究代表者は、先行研究においてSS患者の病態とNr4a2の関連を初めて報告しており、本モデルマウスを用い、in vivoにおけるNr4a2の病因的役割を明らかにすることを目的とした。本研究では、本モデルマウスのin vivoにおける病態解析を深化させることができたことから、この成果をもとに、Nr4a2を基軸としたSSの病態解明を継続することで、SSの新規治療開発を目指すことができると考える。

研究成果の概要(英文)：Objective: To clarify the effectiveness of A213, a ROR γ t antagonist, and the role of Nr4a2 in the mechanism of action in T-cell-specific ROR γ t-transgenic mice under human CD2 promoter (ROR γ t-Tg mice) with Sjogren's syndrome (SS)-like sialadenitis. Methods: Six-week-old ROR γ t-Tg mice were administered orally of A213 or phosphate-buffered saline every three days for two weeks, and the saliva volume and the collected tissues were analyzed. Results: A213 significantly increased saliva volume and reduced mononuclear cell infiltration in salivary glands and whole population or both Foxp3 $^{+}$ and Foxp3 $^{-}$ cells of CD4+CD25 $^{+}$ cells in cervical lymph nodes (CLNs). There was no difference of Nr4a2 in splenic CD4 $^{+}$ T cells between the two groups. A213 reduced CD4+CD8 $^{+}$ cells in thymus. Conclusion: A213 could improve SS-like sialadenitis via suppression of CD4+CD25 $^{+}$ cells in CLNs. Further investigations are needed to elucidate the in vivo role of Nr4a2 especially in the aspect of the central tolerance.

研究分野：膠原病学

キーワード：シェーグレン症候群 T細胞

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、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、根本的治療は確立していない。

SS患者の涙腺、唾液腺には導管周囲に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。我々の研究室の先行研究により、SS患者、SSのモデルマウスにおいて、Th1、Th2、Th17細胞とそのサイトカインや、M3ムスカリン作動性アセチルコリン受容体などに対する自己抗体や自己反応性T細胞による免疫応答が、SSの病態形成に重要であることが示された(Naito Y, et al. *Ann Rheum Dis* 2006;65:269-71, Tsuboi H, et al. *Clin Exp Immunol* 2010;162:53-61, Iizuka M, et al. *J Autoimmun* 2010;35:383-9)。

また、申請者は先行研究(Takahashi H, et al. *Clin Exp Immunol* 2017;190:96-109)において、SS患者の口唇唾液腺(LSG)でNR4A2遺伝子発現が、SSと同様に唾液腺に炎症を来すIgG4関連疾患患者よりも亢進していることを見出し、SS患者のLSGに浸潤したCD4陽性T細胞の核内にNR4A2が特異的に発現していることを示した。そして、SS患者の末梢血CD4陽性T細胞においても、健常者よりNR4A2を有意に高発現していることを見出し、自己反応性T細胞において抗原刺激により誘導される可能性が考えられた。また、SS患者では、Th17分化条件におけるNR4A2核内発現が健常者よりも有意に亢進していた。ここに、NR4A2の核移行を阻害するimportin-β特異的阻害剤(importazole)を用いると、Th17分化条件におけるIL-21のmRNA発現、Th17細胞への分化傾向が有意に抑制されることを示した。以上より、SS患者において、NR4A2はCD4陽性T細胞における発現と核局在が亢進することでTh17分化を促進し、SSの病態形成に関与する可能性が示唆された。このことから、NR4A2はSSにおける新規治療の標的分子になりうる可能性が考えられた。

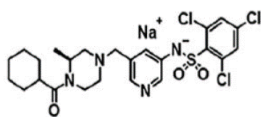
SSの病態形成におけるNR4A2の意義と、治療標的としての可能性をin vivoで検討するにあたり、当研究室で樹立したSSモデルマウスであるT細胞特異的ROR γ tトランスジェニックマウス(ROR γ t-Tg)が有用であると考えた。本モデルマウスは、リンパ組織におけるTh17形質の増強およびTregの減少、唾液腺におけるエフェクターCD4陽性T細胞の増加を特徴とする(Iizuka M, et al. *J Immunol* 2015;194:56-67)。本モデルマウスにおいて、唾液腺炎の病因的分子であるROR γ tを標的としたROR γ tアンタゴニスト(A213)の経口投与による治療実験を行い、その治療効果におけるNr4a2の役割を明らかにすることで、唾液腺炎の制御におけるNr4a2の治療標的としての可能性を検討することとした。

2. 研究の目的

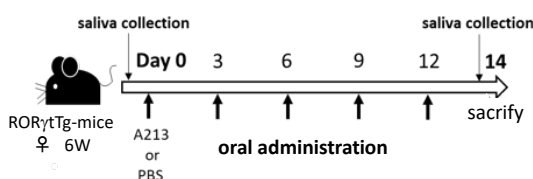
SSの唾液腺炎におけるNr4a2の病因的役割と、治療標的としての可能性を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

6週齢の雌ROR γ t-Tgに、A213(300mg/kg、10ul/g body weight)(図1)あるいはリン酸緩衝生理食塩水(PBS)(10ul/g body weight)(各N=5)を3日に1回、2週間経口投与した(図2)。



(図1) A213の構造式



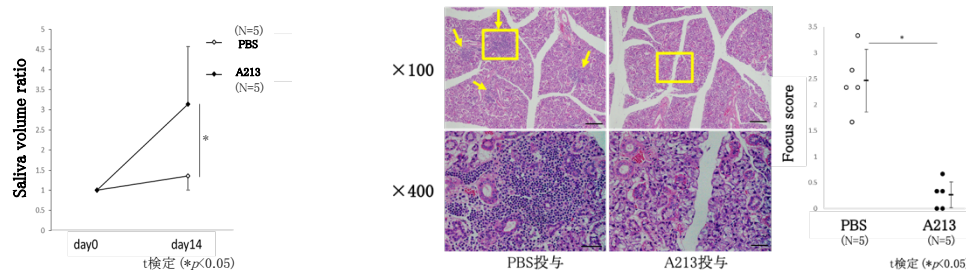
(図2) 投与スケジュール

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

- ① 治療前(day 0)および day 14 において、ピロカルピン(25mg/kg)皮下注射後 10 分間の唾液量を測定し、体重(g)で除した補正唾液量の day 0 に対する比を 2 群間で比較した。
- ② Day 14 に顎下腺を摘出し、パラフィン切片を作製後、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、focus score(4mm²あたりの focus(導管周囲の 50 個以上の単核球浸潤)数)を 2 群間で比較した。
- ③ Day 14 に末梢リンパ組織(脾臓、頸部リンパ節(CLN))を摘出し、フローサイトメリーにより、末梢リンパ組織の CD4+T 細胞における CD25、Foxp3 発現を 2 群間で比較した。
- ④ Day 14 に摘出した脾臓の CD4+T 細胞における Nr4a2 の mRNA 発現を定量 PCR により 2 群間で比較した。
- ⑤ Day 14 に胸腺を摘出し、フローサイトメリーにより胸腺の T 細胞分画を 2 群間で比較した。

4. 研究成果

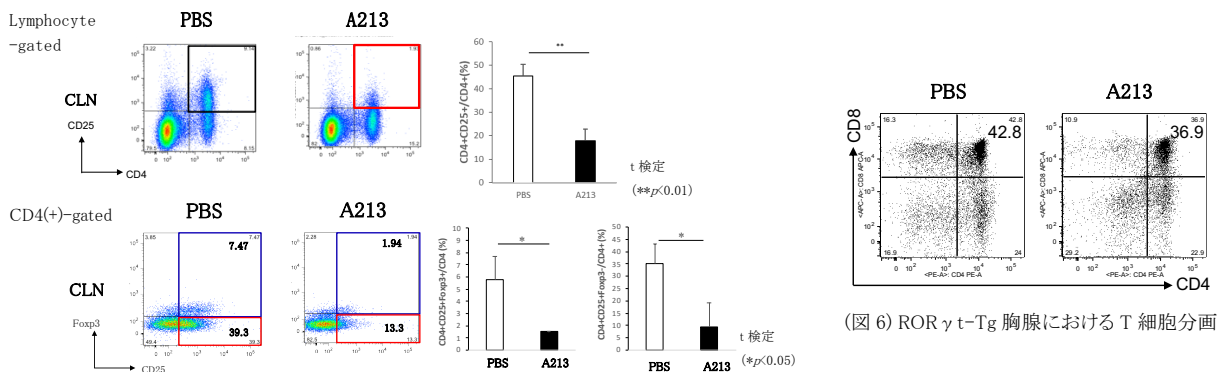
- ① Day 0 に対する day 14 の補正唾液量の比は、A213 投与群で有意に減少した(図 3)。
- ② Day 14 の唾液腺組織は、A213 投与群において単核球浸潤が减弱し、focus score は、A213 投与群で有意に低値であった(図 4)。



(図 3) ROR γ t-Tg 唾液変化量

(図 4) ROR γ t-Tg 唾液腺病理組織(Bar: 50 μ m)

- ③ CLN の CD4+T 細胞における CD25+細胞の割合は A213 投与群で有意に低下したが、脾臓では 2 群間に有意差はなかった。また、CLN の CD4+CD25+Foxp3+細胞、CD4+CD25+Foxp3-細胞の割合は、PBS 投与群と比較し A213 投与群で有意に減少したが、脾臓では同等であった(図 5)。
- ④ 脾臓 CD4+T 細胞における Nr4a2 発現は 2 群間で有意差はなかった。
- ⑤ 胸腺 CD4+CD8+(DP)細胞は A213 投与群で減少した(図 6)。



(図 5) ROR γ t-Tg CLN における CD4+CD25+細胞

(図 6) ROR γ t-Tg 胸腺における T 細胞分画

以上のように、A213 は、ROR γ t-Tg の CLN の CD4+CD25+細胞を減少させ、SS 様唾液腺炎を抑制したが、末梢リンパ組織における Nr4a2 への作用とその意義は明らかにならなかった。一方、胸腺では A213 投与により DP 細胞の apoptosis が促進されたことから、中枢性免疫寛容への作用が唾液腺炎の改善に寄与した可能性が示唆された。Nr4a2 は胸腺細胞の apoptosis を介した中枢性免疫寛容の獲得への関与が示されていることを踏まえ、ROR γ t-Tg を用い、胸腺の Nr4a2 における病態形成への役割を解析予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ono Yuko, Tsuboi Hiroto, Moriyama Masafumi, Asashima Hiromitsu, Kudo Hanae, Takahashi Hiroyuki, Honda Fumika, Abe Saori, Kondo Yuya, Takahashi Satoru, Matsumoto Isao, Nakamura Seiji, Sumida Takayuki	4. 巻 26
2. 論文標題 ROR t antagonist improves Sjogren's syndrome like sialadenitis through downregulation of CD25	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oral Diseases	6. 最初と最後の頁 766 ~ 777
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/odi.13255	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sato Ryota, Takahashi Hiroyuki, Terasaki Mayu, Okamoto Shota, Terasaki Toshihiko, Toko Hirofumi, Yagishita Mizuki, Hagiawara Shinya, Kondo Yuya, Tsuboi Hiroto, Matsumoto Isao, Sumida Takayuki	4. 巻 Online ahead of Print
2. 論文標題 Advantage of Magnetic Resonance Imaging in Detecting Tracheal Involvement and Evaluation of the Therapeutic Response in Relapsing Polychondritis With Asthma-Like Symptoms	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Rheumatology	6. 最初と最後の頁 Online
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/RHU.0000000000001264	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Terasaki M, Takahashi H, Sato R, Okamoto S, Terasaki T, Toko H, Yagishita M, Hagiwara S, Kondo Y, Tsuboi H, Matsumoto I, Sumida T	4. 巻 Online ahead of Print
2. 論文標題 Successful treatment with multitarget therapy of mycophenolate mofetil and tacrolimus for cyclophosphamide-resistant ANCA-associated pauci-immune glomerulonephritis developed independently of systemic lupus erythematosus.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Rheumatology	6. 最初と最後の頁 Online
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tsuboi Hiroto, Honda Fumika, Takahashi Hiroyuki, Ono Yuko, Abe Saori, Kondo Yuya, Matsumoto Isao, Sumida Takayuki	4. 巻 30
2. 論文標題 Pathogenesis of IgG4-related disease. Comparison with Sjogren's syndrome	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Modern Rheumatology	6. 最初と最後の頁 7 ~ 16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14397595.2019.1650694	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kudo Hanae, Tsuboi Hiroto, Asashima Hiromitsu, Takahashi Hiroyuki, Ono Yuko, Abe Saori, Honda Fumika, Kondo Yuya, Wakasa Yuhya, Takaiwa Fumio, Takano Makoto, Matsui Minoru, Matsumoto Isao, Sumida Takayuki	4. 巻 Online ahead of Print
2. 論文標題 Transgenic rice seeds expressing altered peptide ligands against the M3 muscarinic acetylcholine receptor suppress experimental sialadenitis-like Sjogren 's syndrome	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Modern Rheumatology	6. 最初と最後の頁 1~10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14397595.2019.1664368	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tsuboi Hiroto, Iizuka-Koga Mana, Asashima Hiromitsu, Takahashi Hiroyuki, Kudo Hanae, Ono Yuko, Honda Fumika, Iizuka Akira, Segawa Seiji, Abe Saori, Yagishita Mizuki, Yokosawa Masahiro, Kondo Yuya, Moriyama Masafumi, Matsumoto Isao, Nakamura Seiji, Sumida Takayuki	4. 巻 Online ahead of Print
2. 論文標題 Upregulation and pathogenic roles of CCL18-CCR8 axis in IgG4-related disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Modern Rheumatology	6. 最初と最後の頁 1~9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14397595.2019.1632061	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ohyama Ayako, Tsuboi Hiroto, Noma Hisashi, Terasaki Mayu, Shimizu Masaru, Toko Hirofumi, Honda Fumika, Yagishita Mizuki, Takahashi Hiroyuki, Asashima Hiromitsu, Hagiwara Shinya, Kondo Yuya, Matsumoto Isao, Sumida Takayuki	4. 巻 29
2. 論文標題 Associations between maternal clinical features and fetal outcomes in pregnancies of mothers with connective tissue diseases	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Modern Rheumatology	6. 最初と最後の頁 344~350
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14397595.2018.1452352	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi Hiroyuki, Tsuboi Hiroto, Yokosawa Masahiro, Asashima Hiromitsu, Hirota Tomoya, Kondo Yuya, Matsumoto Isao, Sumida Takayuki	4. 巻 28
2. 論文標題 Diffusion-weighted magnetic resonance imaging of parotid glands before and after abatacept therapy in patients with Sjogren 's syndrome associated with rheumatoid arthritis: Utility to evaluate and predict response to treatment	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Modern Rheumatology	6. 最初と最後の頁 300~307
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14397595.2017.1349234	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sumida Takayuki, Azuma Naoto, Moriyama Masafumi, Takahashi Hiroyuki, et al.	4. 巻 28
2. 論文標題 Clinical practice guideline for Sjögren's syndrome 2017	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Modern Rheumatology	6. 最初と最後の頁 383 ~ 408
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14397595.2018.1438093	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 小野由湖、高橋広行、坪井洋人、森山雅文、工藤華枝、本田文香、安部沙織、近藤裕也、松本功、中村誠司、住田孝之
2. 発表標題 唾液腺炎を自然発症するROR γ tトランスジェニックマウスに対するROR γ tアンタゴニストの効果と作用メカニズム
3. 学会等名 第63回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小野由湖、高橋広行、坪井洋人、森山雅文、浅島弘充、工藤華枝、安部沙織、近藤裕也、松本功、中村誠司、住田孝之
2. 発表標題 唾液腺炎を自然発症するROR γ tトランスジェニックマウスに対するROR γ tアンタゴニストの効果と作用メカニズム
3. 学会等名 第62回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高橋広行、坪井洋人、浅島弘充、近藤裕也、松本功、住田孝之
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第62回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takahashi H, Tsuboi H, Asashima H, Kudo H, Ono Y, Abe S, Kondo Y, Matsumoto I, Sumida T.
2. 発表標題 A potential role of NR4A2 overexpression in CD4+ T cells in the pathogenesis of Sjogren 's syndrome.
3. 学会等名 The 14th International Symposium on Sjogren 's syndrome (Washington DC, USA) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ono Y, Tsuboi H, Moriyama M, Asashima H, Kudo H, Takahashi H, Kondo Y, Matsumoto I, Nakamura S, Sumida T.
2. 発表標題 ROR t antagonist suppressed spontaneous sialadenitis in ROR t transgenic mice via inhibition of IL-17 production with increase of regulatory T cells.
3. 学会等名 The 14th International Symposium on Sjogren 's syndrome (Washington DC, USA) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高橋広行、坪井洋人、安部沙織、小野由湖、本田文香、安藤美樹、近藤裕也、松本功、大津真、住田孝之
2. 発表標題 シェーグレン症候群におけるM3R反応性Th1細胞由来T-iPS細胞を応用した治療戦略
3. 学会等名 第63回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋広行、坪井洋人、安部沙織、小野由湖、本田文香、安藤美樹、近藤裕也、松本功、大津真、住田孝之
2. 発表標題 シェーグレン症候群におけるM3R反応性Th1細胞由来T-iPS細胞を応用した治療戦略
3. 学会等名 第28回日本シェーグレン症候群学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小野由湖、高橋広行、坪井洋人、森山雅文、浅島弘充、工藤華枝、安部沙織、近藤裕也、松本功、中村誠司、住田孝之
2. 発表標題 唾液腺炎を自然発症するROR tトランスジェニックマウスに対するROR tアンタゴニストの効果と作用メカニズム
3. 学会等名 第28回日本シェーグレン症候群学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小野由湖、高橋広行、坪井洋人、森山雅文、浅島弘充、工藤華枝、安部沙織、近藤裕也、松本功、中村誠司、住田孝之
2. 発表標題 唾液腺炎を自然発症するROR tトランスジェニックマウスに対するROR tアンタゴニストの効果と作用メカニズム
3. 学会等名 第27回日本シェーグレン症候群学会学術集会
4. 発表年 2018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