

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08891

研究課題名(和文) シェーグレン症候群における病因T細胞と腸内細菌叢との関連の解析

研究課題名(英文) Analysis of the association between pathogenic CD4+T cells and microbiota in sialadenitis like Sjogren's syndrome.

研究代表者

飯塚 麻菜 (IIZUKA, Mana)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特任助教

研究者番号：80734821

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：シェーグレン症候群(Sjogren's syndrome :SS)は、唾液腺、涙腺などの外分泌腺に慢性炎症が起こり、外分泌腺が破壊される原因不明の臓器特異的自己免疫疾患である。標的臓器には、CD4+ T細胞が浸潤し、病態の初期形成およびその後の増悪に関与する。本研究では、SSモデルマウスを用いて、自己反応性CD4+ T細胞の機能およびその活性化に腸内細菌叢が関与することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SSは慢性唾液腺炎、涙腺炎を主徴とする臓器特異的自己免疫疾患であり、国の指定難病に選定されている。その発症機序は不明であり、確立した治療法はなく、対処療法に頼るのみである。本研究により、SSの発症に関わる自己反応性T細胞の機能および活性化機序が明らかとなり、新たな疾患特異的創薬への応用も期待される。

研究成果の概要(英文)：Sjogren's syndrome(SS) is a chronic autoimmune disease characterized by infiltration of lymphocytes into lacrimal and salivary glands, and clinically by dry eyes and dry mouth. There are unknown pathogenesis of SS. The most infiltrating lymphocytes in the salivary glands are autoreactive CD4+ T cells, which are involved in the initial phase of pathogenesis and exacerbation of sialadenitis.

In this study, we used SS model mice spontaneously developed sialadenitis like SS, in order to clarify the pathogenesis of sialadenitis. Here, we found that the involvement of the intestinal microbiota in the activation of autoreactive CD4+ T cells.

研究分野：免疫学

キーワード：シェーグレン症候群 自己免疫疾患 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 (Sjogren's syndrome; SS) は、慢性唾液腺炎、涙腺炎を主徴とする臓器特異的自己免疫疾患である。標的臓器の導管、腺房周囲には自己反応性 CD4+ T 細胞の著しいリンパ球浸潤が認められ、腺房の破壊や萎縮により乾燥症状が引き起こされる。これまで自己抗体の検索からいくつかの自己抗原の候補が示唆されているが、T 細胞が認識する自己抗原の多くは不明であり、その詳細な活性化機序は解析されていない。病態形成初期における浸潤 CD4+ T 細胞の活性化がその後の免疫応答を惹起することから、その活性化機序を解明し制御することは、疾患特異的治療法を開発する上で非常に有用である。

これまでの研究から、SS においては Th1 細胞が産生する IFN- $\gamma$ 、および Th17 細胞が産生する IL-17 が病態の増悪に関与することが報告されている。研究代表者らの報告においても、抗原特異的 CD4+ T 細胞による IFN- $\gamma$  産生は、唾液腺上皮細胞のアポトーシスを誘導することで病態形成に寄与する (Iizuka M, et al. Mod Rheumatol. 2013)、また、抗原特異的 IL-17 産生は、唾液腺浸潤 B 細胞を活性化させ、自己抗体の産生増加や異所性のリンパ濾胞形成に関与することを明らかにしてきた (Iizuka M, et al. Mod Rheumatol. 2015)。そこで、さらに SS の発症に関与する病因 CD4+ T 細胞サブセットについて同定を行うため、T 細胞特異的に T-bet および ROR $\gamma$ t を過剰発現させたトランスジェニック (Tg) マウスを作製した。解析の結果、T-bet Tg マウスの全身諸臓器において、病理学的異常は認められなかった。一方、ROR $\gamma$ t Tg マウスにおいて、唾液腺、涙腺においてのみ著明な細胞浸潤を認め、腺組織破壊に伴う腺分泌能の低下や SS 特異的自己抗体の検出など SS 様の病態を自然発症することを見出した (M.Iizuka, et al. J Immunol. 2015)。

### 2. 研究の目的

本研究では、自己免疫疾患において病因的役割が注目されている ROR $\gamma$ t を T 細胞特異的に過剰発現させた SS モデルマウスを用いて、これまで不明であった SS 発症における自己反応性 CD4+ T 細胞の機能および活性化機序について明らかにすることを目的として研究を行った。

### 3. 研究の方法

- (1) 病因細胞の同定を行うため、Tg マウスの唾液腺に浸潤するリンパ球分画をフローサイトメーターおよび免疫組織化学法により調べた。Tg マウスの唾液腺 (Salivary glands; SG) に浸潤した CD4+ T 細胞を T 細胞が欠損する CD3 欠損 (CD3 $^{-/-}$ ) マウスに移入し、病態を誘導するか否か解析を行った。
- (2) 抗生剤カクテル (アンピシリン、ネオマイシン、バンコマイシン、メトロニダゾール) を経口投与した CD3 $^{-/-}$  マウスに、Tg マウス唾液腺由来 CD4+ T 細胞を移入した。
- (3) SG CD4+ T CD3 $^{-/-}$  マウスの唾液腺に浸潤した CD4+ T 細胞のシングルセル TCR 解析を行った。CDR3 の偏りが認められた TCR をクローニングし、T 細胞株 (TG40) に遺伝子導入し、機能解析を行った。

### 4. 研究成果

- (1) Tg マウスの唾液腺には、CD4+ T 細胞および B 細胞の集積が確認された。病態初期には、CD4+ T 細胞を中心とする増殖が確認されたが、病態が進展するに伴い、B 細胞の増殖が認められ、これまでに報告されているヒト SS 病態と非常に類似していた。そこで、病態形成初期に浸潤してくる CD4+ T 細胞を Tg 由来唾液腺より単離し、CD3 $^{-/-}$  マウスに移入した結果、Tg マウスと同様の唾液腺炎を誘導することが明らかとなった。CD4+ T 細胞を移入した CD3 $^{-/-}$  マウス (SG CD4+ T CD3 $^{-/-}$ ) の唾液腺には、B 細胞の増殖も確認され、腺破壊による唾液分泌量の低下も確認された。CD3 $^{-/-}$  マウスにおいて、移入した CD4+ T 細胞の各リンパ節における解析を行ったところ、腸管膜リンパ節において有意に増殖していることが認められた。SG CD4+ T CD3 $^{-/-}$  マウスの腸管膜リンパ節より CD4+ T 細胞を単離し、定量 PCR 法にてサイトカイン産生を測定したところ、IFN- $\gamma$  および IL-17 発現が、有意に増加していることが明らかとなった。
- (2) SG CD4+ T CD3 $^{-/-}$  マウスの腸管膜リンパ節での病因 CD4+ T 細胞の有意な増殖を認めたことから、腸内細菌叢との関連について検討を行った。抗生剤カクテルを投与した CD3 $^{-/-}$  マウスに Tg マウス唾液腺由来 CD4+ T 細胞を移入したところ、腸管膜リンパ節での細胞増殖は確認されなかった。また、唾液腺へのリンパ球浸潤も阻害された。これらのことから、腸内細菌叢が病因 CD4+ T 細胞の活性化に関与していることが示唆された。
- (3) 唾液腺炎発症に関わる自己反応性 TCR を同定するため、SG CD4+ T CD3 $^{-/-}$  マウスの唾液腺に浸潤する CD4+ T 細胞の TCR 解析を行った。唾液腺よりシングルセルソーティングにより単離した TCR の配列を確認したところ、 $\alpha$ 鎖および $\beta$ 鎖において、CDR3 の偏りが認められ、オリゴクローナルに増殖していることが明らかとなった。増殖が認められたいくつかの TCR について、クローニングにより単離し、TG40 株に遺伝子導入した。TCR-TG40 株について、自己抗原反応性を確認するために、樹状細胞および唾液腺組織抽出液と共培養し

た。その結果、自己抗原に反応するいくつかの TCR クローンを確認した。これらのことから、唾液腺に集積する病因 CD4+ T 細胞は、何らかの特異的自己抗原を認識して増殖していることが明らかとなった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ito Minako, Komai Kyoko, Mise-Omata Setsuko, Iizuka-Koga Mana, Noguchi Yoshiko, Kondo Taisuke, Sakai Ryota, Matsuo Kazuhiko, Nakayama Takashi, Yoshie Osamu, Nakatsukasa Hiroko, Chikuma Shunsuke, Shichita Takashi, Yoshimura Akihiko	4. 巻 565
2. 論文標題 Brain regulatory T cells suppress astroglial and potentiate neurological recovery	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 246 ~ 250
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-018-0824-5	査読の有無 有
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 該当する
1. 著者名 Sakai Ryota, Komai Kyoko, Iizuka-koga Mana, Yoshimura Akihiko, Ito Minako	4. 巻 69
2. 論文標題 Regulatory T Cells: Pathophysiological Roles and Clinical Applications	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Keio Journal of Medicine	6. 最初と最後の頁 1 ~ 15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2302/kjm.2019-0003-0A	査読の有無 有
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 該当する
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 30
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 729 ~ 737
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 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 該当する
1. 著者名 Sakai Ryota, Ito Minako, Komai Kyoko, Iizuka-Koga Mana, Matsuo Kazuhiko, Nakayama Takashi, Yoshie Osamu, Amano Koichi, Nishimasu Hiroshi, Nureki Osamu, Kubo Masato, Yoshimura Akihiko	4. 巻 18
2. 論文標題 Kidney GATA3+ regulatory T cells play roles in the convalescence stage after antibody-mediated renal injury	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cellular and Molecular Immunology	6. 最初と最後の頁 1249 ~ 1261
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41423-020-00547-x	査読の有無 有
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 該当する

1. 著者名 Komai Kyoko, Ito Minako, Nomura Seitaro, Shichino Shigeyuki, Katoh Manami, Yamada Shintaro, Ko Toshiyuki, Iizuka-Koga Mana, Nakatsukasa Hiroko, Yoshimura Akihiko	4. 巻 12
2. 論文標題 Single-Cell Analysis Revealed the Role of CD8+ Effector T Cells in Preventing Cardioprotective Macrophage Differentiation in the Early Phase of Heart Failure	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2021.763647	査読の有無 有
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 該当する

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 飯塚麻菜、高橋智、松本功、住田孝之、吉村昭彦
2. 発表標題 CD4+ T細胞を軸としたシェーグレン症候群の病態形成機序の解明
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 Mana Iizuka, Satoru Takahashi, Isao Matsumoto, Takayuki Sumida, Akihiko Yoshimura
2. 発表標題 A role of pathogenic CD4+ T cells in the development of organ specific autoimmune disease like Sjogren 's syndrome
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mana Iizuka, Satoru Takahashi, Isao Matsumoto, Takayuki Sumida, Akihiko Yoshimura
2. 発表標題 Identified pathogenic autoantibodies to induce the development of sialadenitis
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会
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
---------	---------