

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08767

研究課題名(和文) シェーグレン症候群の分子機構と制御へのアプローチ

研究課題名(英文) Molecular mechanism and regulation in patients with Sjogren's syndrome

研究代表者

住田 孝之 (Sumida, Takayuki)

筑波大学・医学医療系・客員教授

研究者番号：00183054

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(SS)の発症機序において、病因細胞であるM3R反応性Th1細胞の抗原特異性を維持したまま、制御機能をもったTreg細胞へ機能チェンジする誘導分子を検索し、創薬化することを目的とした。その結果、M3R反応性Th1細胞からT-iPS細胞への作成、T-iPS細胞からDC細胞への分化誘導、T-iPS細胞からCD34+CD43+細胞への分化誘導に成功した。今後、T-iPS細胞からCD4+Treg細胞へ分化誘導することに成功できれば、SSの病因細胞であるM3R反応性Th1細胞を制御機能を持ったTreg細胞へ機能転換する分子を検索することができよう。

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(SS)は、ドライアイやドライマウスだけでなく全身の臓器病変を生じる自己免疫疾患である。全身の臓器病変に対する治療は、ステロイドや免疫抑制薬が主体であり、副作用として感染症、悪性腫瘍、生活習慣病、骨粗鬆症などを合併し、QOLの低下が起きてしまうことが問題となっている。本研究の意義は、SSの発症機序に基づいた治療戦略を開発するため、副作用のない疾患特異的な治療薬が創薬され患者さんのQOLの向上が期待されることである。

研究成果の概要(英文)：M3R reactive Th1 cells play a crucial role in the generation of Sjogren's syndrome(SS). In the present study, our object is to clarify the molecules which are able to change Th1 cells to Treg cells. We already generated several T-iPS cells from M3R reactive Th1 cells in patients with SS, induced DC cells from their T-iPS cells, and differentiated CD34+CD43+ progenitor stem cells from T-iPS cells in vitro. In future, we will differentiate CD34+CD43+ cells to Treg cells, and then elucidate the functional molecules which could change from Th1 cells to Treg cells. The candidate molecules should shed light on the new therapeutic approach to SS.

研究分野：膠原病学

キーワード：シェーグレン症候群 Th1細胞 Treg細胞 iPS細胞 ムスカリン作動性アセチルコリン受容体3 T細胞 抗原受容体 T細胞機能転換分子 T細胞機能転換分子

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

- (1) シェーグレン症候群(SS)は、口腔内乾燥感、乾燥性角結膜炎、関節炎を主症状とする全身の炎症性疾患であり、厚労省特定疾患の一つに認定されている免疫難病である。
- (2) 病因として各臓器に浸潤した CD4 陽性 T 細胞による自己免疫反応が注目されている。この自己反応性 T 細胞の抗原受容体 (TCR) 及び対応自己抗原を明らかにすることは、SS の発症機序を解明する上で重要である。申請者らは、SS 患者の各臓器浸潤 T 細胞の TCR 遺伝子及び対抗自己抗原に関して、分子免疫学的戦略を用いて以下の事実を明らかにしてきた。
- (3) 口唇唾液腺、涙腺、腎間質に浸潤した T 細胞は、特定の抗原を認識して抗原特異的に増殖している。
- (4) 口唇唾液腺浸潤 T 細胞が認識する対応自己抗原は、臓器非特異的自己抗原として SS-A52kD、HSP10/60、唾液腺特異的自己抗原として アミラーゼとムスカリン作働性アセチルコリン受容体 M3 (M3R) である。
- (5) SS 患者の約半数において、M3R を認識する IFN- γ を産生する Th1 細胞及び IL-17 を産生する Th17 細胞が存在する。
- (6) M3R ペプチドを M3R ノックアウトマウスに免疫し、その脾細胞を Rag1 ノックアウトマウスに移入することにより (M3R $^{-/-}$ Rag1 $^{-/-}$ マウス)、M3R 誘導自己免疫性唾液腺炎 (M3R induced sialadenitis, MIS) を発症するマウスモデルを樹立した。M3R $^{-/-}$ xIFN $^{-/-}$ Rag1 $^{-/-}$ マウス、M3R $^{-/-}$ xIL-17 $^{-/-}$ Rag1 $^{-/-}$ マウスを作成し、これらのマウスを用いて MIS を誘導した結果、IFN- γ 及び IL-17 がともに自己免疫性唾液腺炎発症に係わっている事を明らかにしてきた。
- (7) M3R 抗原の T 細胞エピートープが N 領域及び細胞外第一ドメインにあることを証明し、そのアナログペプチドを用いて MIS の抑制に成功した。
- (8) 以上の研究成果から、M3R 反応性 Th1 及び Th17 細胞が SS の発症に重要な役割を果たしている事を明らかにしてきた。

2. 研究の目的

本研究では、SS 患者から M3R 反応性 T 細胞 (Th1、Th17) を分離し、iPS 細胞化する (T-iPS)。次に T-iPS 細胞を *in vitro* で抑制性 T 細胞 (Treg) に分化誘導する。iPS 細胞を利用することにより同一 TCR を有する M3R 反応性 T 細胞の機能転換 (Th1、Th17 Treg 細胞) が可能である。Th1、Th17、Treg 細胞の発現遺伝子に関して網羅的に解析することにより Treg 細胞への機能転換分子を検索する。得られた分子の機能を *in vitro* における分化誘導系において、Th1 Treg 細胞、Th17 Treg 細胞への機能転換分子であることを確認し、分子自身あるいは誘導分子を対象とした発症機序に基づく新規創薬の開発を進める。

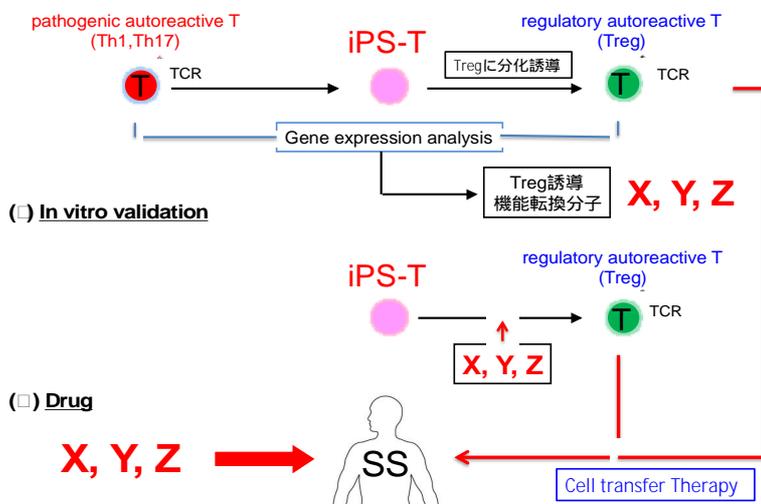
このように、本研究プロジェクトにおいては、SS 患者由来自己反応性 T 細胞を iPS 細胞化することにより、病気を誘導する T 細胞を、病気を抑制する制御性 T 細胞に機能転換する分子を検索し新規治療戦略を開発する。

本研究において、T-iPS 細胞を利用する最大のメリットは、SS の病因として重要な M3R 反応性 T 細胞の抗原受容体 (TCR) 遺伝子を T-iPS 細胞を介して保持することにより、同じ抗原特異性を有する T 細胞を対象として、細胞の機能転換分子の解析が可能となる点である。

3. 研究の方法

SS 患者末梢血単核球から Th1 細胞及び Th17 細胞を flowcytometry 法により single cell として分離し、M3R 抗原を用いて M3R 反応性 Th1 細胞クローン及び Th17 細胞クローンを作成する。樹立したクローンに対して山中 4 因子を用いて T-iPS 細胞を作成する。T-iPS 細胞から Treg 細胞へ分化誘導する条件を検討し Treg 細胞に分化誘導する。T-iPS 細胞から樹立した Treg 細胞の M3R 反応性及び TCR 遺伝子解析を行い、オリジナルの M3R 反応性 Th1 細胞及び Th17 細胞由来であることを検証する。Th1 細胞あるいは Th17 細胞クローンと、T-iPS 細胞を介して誘導分化した Treg 細胞を対象として DNA microarray 法を用いて、Th1 Treg 細胞、Th17 Treg 細胞への機能転換分子を検索する。

(I) Gene expression analysis



- (1) SS 患者抹消血単核球より M3R 反応性 Th1 細胞 (M3RTh1) 及び Th17 細胞 (M3RTh17) を flowcytometry により single cell として分離する。Auto-LCL 細胞 (Auto-lymphoblastoid cell line) を作成して feeder 細胞として使用する。M3R 抗原及び PHA を加えて Th1 細胞及び Th17 細胞クローンを in vitro において樹立する。それぞれのクローンにおける TCR 遺伝子配列を決定するために、TCR 鎖に関しては、23 個の V 特異的な 5' プライマーを作成し、C を 3' プライマーとして、family PCR 法で使用 V 鎖を確定した後に、シークエンス法により CDR3 領域の核酸塩基配列を解析する。TCR 鎖に関しては、30 個の V 特異的な 5' プライマーを用いて C 間で family PCR を施行し V 鎖を決定した後、シークエンス法により CD3 領域の核酸塩基配列を確定する。(筑波大学)
- (2) (1) で分離した M3RTh1 及び M3RTh17 細胞クローンから、山中 4 因子を用いて T-iPS 細胞 (T-iPSM3RTh1、T-iPSM3RTh17) を樹立する。細胞の維持方法は、MEF (マウス胚繊維芽細胞) を feeder 細胞として、リコンビナント bFGF を加えた DMEM 培地において培養する。(東京大学医科学研究所との共同研究)
- (3) (2) で樹立した T-iPSM3RTh1 及び T-iPSM3RTh17 細胞を in vitro において CD4+T 細胞に分化誘導する (T-iPSM3RTh1 Treg、T-iPSM3RTh17 Treg)。Feeder 細胞としては、C3H10T1/2 細胞を用い、その後、OP9-DL1 細胞を使用し、添加するサイトカインとしては、VEGF SCF + IL7+Fit3L 等を使用する。さらに、Treg 細胞への分化条件は conditioning を検討する必要があるが、基本的に、TCF- などを加えること、あるいは、Notch ligand を発現した OP9-DL1 細胞株上で T-iPS 細胞を培養し、TGF- + レチノイン酸等を追加する。以上の方法により樹立した T-iPS 細胞に関して、M3R 反応性及び TCR の遺伝子配列を確認する。(筑波大学、東京大学医科学研究所) [筑波大学より助教を派遣]
- (4) (3) で分化誘導した T-iPSM3RTh1 Treg 細胞と M3RTh1 細胞クローン間において、DNA array 法を用いて、Th1 Treg 細胞への機能転換分子を選定する。同様に、T-iPSM3RTh17 Treg 細胞と M3RTh17 細胞クローン間において、DNA array 法を用いて、Th17 Treg 細胞への機能転換分子を選定する。(筑波大学)
- (5) (4) で選定した Treg 細胞への機能転換分子あるいは誘導分子を用いて、M3RTh1 細胞クローン及び M3RTh17 細胞クローンが実際に Treg 機能細胞に分化する事を検証する。(筑波大学)
- (6) (5) で検証できた機能転換分子あるいは誘導分子に関して、創薬化を目指す。(筑波大学)

4. 研究成果

- (1) SS 患者 (HLA-A24, A31, DRB1 14:54, DRB1 15:02) 末梢血から M3R 反応性 Th1 細胞 (IFN-産生) をフローサイトメトリー法を用いて分離し、35 個のクローンを樹立した。
- (2) (1) で樹立した 5 個の Th1 細胞クローンに山中 4 因子をセンダイウイルスを用いて遺伝子導入し、8 個の T-iPS 細胞株を樹立した。
- (3) 樹立した T-iPS 細胞が有する TCR 遺伝子が、iPS 細胞化する前の Th1 細胞クローンと同一の再構成した TCRV 遺伝子、TCRV 遺伝子であることを sequence 法で確認した。

- (4) T-iPS 細胞から Sac 法を用いて CD34+細胞を誘導し、GM-CSF/M-CSF で 14 日、次に GM-CSF/IL-4 で 7 日刺激を加えることで DC 細胞への分化誘導に成功した(Stem Cell Reports 2017)。この細胞を用いることにより T-iSP 細胞の in vitro における分化誘導に使用可能となった。
- (5) T-iPS 細胞を in vitro で CD34+CD43+細胞に分子誘導し、NSG マウスに細胞移入することにより 60 日目のマウス末梢血においてヒト由来 CD4+T 細胞への分化を確認することができた。現在、その CD4+T 細胞の表現型などを解析中である。
- (6) T-iPS 細胞をマウス皮下に移植することにより teratoma を形成した。teratoma 内で分化した CD34+CD43+細胞を NSG マウスに細胞移入することで CD4+T 細胞への分化誘導を試みている。
- (7) 50%の SS 患者末梢血に M3R 反応性 Th17 細胞が存在することを ELI-SPOT 法で明らかにしてきた。M3R 反応性 Th17 細胞を in vitro において抗原と共に培養し、フローサイトメトリー法により分離することに成功した。今後、M3R 反応性 Th1 細胞と同様の方法で T-iPS 細胞を作成する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Takahashi H, Tsuboi H, Abe S, Honda F, Kondo Y, Matsumoto I, Sumida T	4. 巻 204
2. 論文標題 Humanized NOD/SCID/IL2r null mice exhibit functionally augmented human regulatory T cells associated with enzymatic up-regulation of H3K27me3 in comparison with humans	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Immunology	6. 最初と最後の頁 239 ~ 250
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cei.13583	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 -

1. 著者名 Abe Saori, Tsuboi Hiroto, Kudo Hanae, Asashima Hiromitsu, Ono Yuko, Honda Fumika, Takahashi Hiroyuki, Yagishita Mizuki, Hagiwara Shinya, Kondo Yuya, Matsumoto Isao, Sumida Takayuki	4. 巻 5
2. 論文標題 M3 muscarinic acetylcholine receptor reactive Th17 cells in primary Sjogren's syndrome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 e135982
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/jci.insight.135982	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 -

1. 著者名 Takahashi H., Tsuboi H., Abe S., Honda F., Kondo Y., Matsumoto I., Sumida T.	4. 巻 -
2. 論文標題 Humanized NOD/SCID/IL2r null mice exhibit functionally augmented human regulatory T cells associated with enzymatic up regulation of H3K27me3 in comparison with humans	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical & Experimental Immunology	6. 最初と最後の頁 239-250
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cei.13583	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7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 高橋広行, 坪井洋人, 浅島弘充, 安部沙織, 東光裕史, 本田文香, 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におけるM3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65回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安部沙織, 坪井洋人, 高橋広行, 萩原晋也, 近藤裕也, 松本功, 住田孝之
2. 発表標題 一次性感グレン症候群患者の末梢血中T細胞サブセットと臨床像との関連
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 2021年

1. 発表者名 安部沙織, 坪井洋人, 本田文香, 小野由湖, 高橋広行, 近藤裕也, 松本功, 住田孝之
2. 発表標題 シェグレン症候群患者末梢血中におけるM3ムスカリン作働性アセチルコリン受容体(M3R)反応性 Th17細胞の検出と臨床像との関連
3. 学会等名 第117回日本内科学会総会・講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Abe S, Tsuboi H, Honda F, Takahashi H, Kurata I, Ohyama A, Yagishita M, Hagiwara S, Kondo Y, Matsumoto I, Sumida T.
2. 発表標題 Detection and clinical significance of circulating M3 muscarinic acetylcholine receptor (M3R) reactive Th17 cells in patients with primary Sjogren's syndrome.
3. 学会等名 第64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 高橋広行, 坪井洋人, 安部沙織, 本田文香, 近藤裕也, 松本功, 住田孝之
2. 発表標題 シェ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64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 安部沙織, 坪井洋人, 本田文香, 高橋広行, 近藤裕也, 住田孝之, 松本功
2. 発表標題 シェーグレン症候群におけるM3ムスカリン作動性アセチルコリン受容体(M3R)反応性Th17細胞の臨床的意義
3. 学会等名 第48回日本臨床免疫学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Abe S, Tsuboi H, Honda F, Takahashi H, Matsumoto I, Sumida T.
2. 発表標題 M3 muscarinic acetylcholine receptor reactive Th17 cells in primary Sjogren ' s syndrome.
3. 学会等名 APLAR2020 (国際学会)
4. 発表年 2020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
---------	---------