

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：82610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08795

研究課題名(和文) NR4A2を介した自己反応性T細胞の制御によるシェーグレン症候群の治療戦略

研究課題名(英文) Therapeutic strategies for Sjogren's syndrome by NR4A2-mediated regulation of autoreactive T cells

研究代表者

高橋 広行 (Takahashi, Hiroyuki)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・膠原病科 医師

研究者番号：10770745

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)様唾液腺炎をきたすROR γ t-Tgマウスに、NR4A2アゴニストであるヒドロキシクロロキン(HCQ)、アモジアキンを腹腔内投与したが、制御性T細胞の誘導、唾液腺炎への治療効果は得られなかった。また、HCQが新規導入された維持治療中の全身性エリテマトーデス患者(n=45)を対象とし、多変量ロジスティック回帰分析によりHCQ有効性予測因子を検討したところ、HCQ導入時のCRP(OR 15.49)、抗SS-A抗体(OR 0.07)などが有意に抽出された。以上より、HCQ有効性は抗SS-A抗体存在下に獲得しにくく、SSの主たる治療戦略として位置付けることは難しいと考えられた。

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)の病因は未だ明らかになっておらず、根本治療が存在しない。本研究代表者は、先行研究においてSSの病態におけるNR4A2の関与を初めて報告し、新たな観点でSSの病態を明らかにしてきた。本研究では、疾患モデルとしてT細胞特異的ROR γ tトランスジェニックマウスを用い、NR4A2を標的としたSSの新規治療戦略としての可能性を検討したが、結果的にそれに結びつく知見は得られなかった。その理由としてROR γ t強制発現による非生理的なモデルであることなどが考えられた。NR4A2を介した自己反応性T細胞の制御に基づく治療戦略の構築を目指し、他の疾患モデルでのさらなる検証が必要と考える。

研究成果の概要(英文)：The NR4A2 agonist, hydroxychloroquine (HCQ) or amodiaquine, was administered intraperitoneally to ROR γ t-Tg mice with Sjogren's syndrome (SS)-like sialadenitis, failing to induce regulatory T cells and to have a therapeutic effect on sialadenitis. In addition, multivariate logistic regression analysis of predictors for HCQ efficacy in patients with systemic lupus erythematosus on maintenance therapy (n=45), in whom HCQ was initially introduced, revealed that CRP (odds ratio (OR) 15.49) and anti-SS-A antibody (OR 0.07) at the time of HCQ induction were significantly extracted. Thus, as HCQ efficacy was unlikely to be obtained under the presence of anti-SS-A antibodies, it could not be appropriate to position HCQ as major therapeutic strategy for SS.

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 NR4A2

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+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。本研究代表者は先行研究 ([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+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+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。

NR4A2 は CD4+T 細胞において Foxp3 発現を強く誘導し、制御性 T 細胞 (Treg) 分化を引き起こすことが示されている (Sekiya T, et al. *Nat Commun* 2011;2:269)。このことを踏まえ、本研究では SS における自己反応性 T 細胞の制御機構に着目し、SS における Treg での NR4A2 の挙動と病態における役割、治療標的としての可能性について明らかにすることを目的とした。

SS 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 (Iizuka M, et al. *J Immunol* 2015;194:56-67)。このマウスは、唾液腺炎を自然発症し、リンパ組織における Treg の減少が病態形成に重要であることが示されている。そのため、NR4A2 の作用を増強することで、Treg 分化を促進し、自己反応性 T 細胞の制御を介して治療できる可能性が考えられた。

NR4A2 の agonist として、ヒドロキシクロロキン (HCQ)、アモジアキン (AQ) などの抗マラリア薬が報告されている (Won HY, et al. *Sci Rep* 2017;5:16946, Hedy SA, et al. *Behav Brain Res* 2019;365:82-88)。DSS 腸炎モデルでは、AQ を投与することで、NR4A2 などの発現増加を介して Foxp3 発現が促進され、Treg が増加し、病態が改善することが示されている。

また、HCQ は、SS と同様に自己免疫疾患である全身性エリテマトーデス患者の治療において有効性が確立しており、国内外で広く使用されている。一方、SS では、本邦で保険適応は取得していないものの、海外で一部の患者において有効性が示唆されている。しかし、HCQ の自己免疫疾患における免疫学的作用機序の詳細は依然として不明である。そこで、SS などの自己免疫疾患に対する NR4A2 agonist としての免疫学的作用、治療戦略としての意義を明らかにする必要があると考えた。

2. 研究の目的

SS などの自己免疫疾患に対する HCQ の NR4A2 agonist としての免疫学的作用、およびその治療戦略としての意義を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) SS マウスモデルにおける HCQ、AQ の効果の検討

① 投与プロトコールと治療効果の解析

ROR γ t-Tg (6 週齢、メス) において、治療群は HCQ (40mg/kg) あるいは AQ (50mg/kg) を (各 N=3)、コントロール群はそれぞれと等量のリン酸緩衝食塩水 (PBS) を 3 日毎に腹腔内投与した (各 N=3)。投与開始 2 週後に顎下腺を摘出し、凍結切片を作製後、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行い、組織学

的にリンパ球浸潤の程度 (focus score) を比較した。

② 治療後のリンパ組織、顎下腺における CD4+T 細胞の解析

投与開始 2 週後に脾臓、頸部リンパ節、顎下腺を摘出し、組織分散後に magnetic-activated cell sorting (MACS) により CD4+T 細胞を分離し、定量 PCR を用いて治療群 (HCQ または AQ、各 N=3)、コントロール群 (各 N=3) における Foxp3 の mRNA 発現を比較した。

(2) 実臨床における HCQ 有効例の特徴 (HCQ 有効性予測因子の解析)

国立国際医療研究センター病院膠原病科において、2016 年 3 月から 2021 年 9 月までに皮疹、関節炎、倦怠感のいずれかに対して HCQ が新規導入された維持治療中 (プレドニゾロン (PSL) 10mg/日以下) の SLE 患者を対象とし、後方視的に以下について検討した。なお、SLE の診断は、米国リウマチ学会 1997 年改訂分類基準、あるいは Systemic Lupus International Collaborating Clinics による分類基準 (2012 年) を満たすことを要件とした。また、リストワイズ法により、解析項目のデータに欠損がある場合は対象から除外した。

- ① 年齢、性別、罹病期間、SLE による臓器病変 (腎炎、神経精神障害 (NPSLE)) の既往、HCQ 導入の主対象、HCQ 開始時の PSL 用量、抗 dsDNA 抗体、C3、CRP、抗 SS-A 抗体、抗 Sm 抗体、抗 RNP 抗体、HCQ 導入後 3 か月時点の治療効果 (医師全般評価による改善の有無を担当医の診療録記載より判定) を検討した。
- ② ①をもとに、患者背景を HCQ 無効例、有効例で比較した。
- ③ ①をもとに、ロジスティック回帰分析により HCQ 導入後 3 か月時点の有効性予測因子を抽出した。また、各因子間の variance inflation factors (VIF) を検討した。
- ④ ③において有意に抽出された予測因子について、 β 係数に基づき、予測因子の各カテゴリに点数を割り当てた。対象者ごとに各予測因子における点数を合計し、合計スコアの HCQ 導入後 3 か月時点の有効性予測能を評価するため receiver operating characteristic (ROC) 解析を行った。

4. 研究成果

(1)-① HCQ 投与 ROR γ t-Tg マウス (投与開始 2 週後) の顎下腺組織において、PBS 投与 ROR γ t-Tg マウスと同様に導管周囲にリンパ球浸潤を認め (図 1)、両者の focus score に有意差はなかった。また、AQ 投与 ROR γ t-Tg マウス (投与開始 2 週後) の顎下腺組織において、PBS 投与 ROR γ t-Tg マウスと同様に導管周囲にリンパ球浸潤を認め (図 2)、両者の focus score に有意差はなかった。

図 1 HCQ 投与マウス (投与 2 週) の顎下腺組織 (HE 染色)

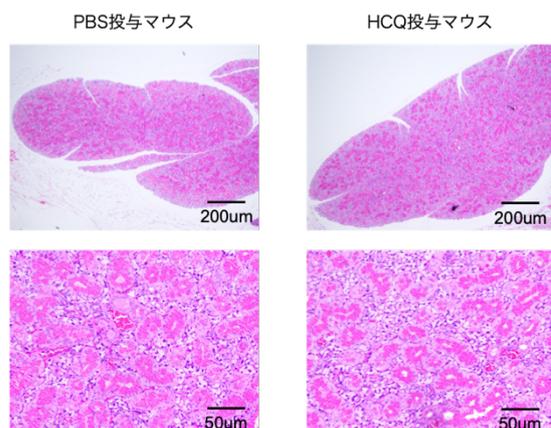
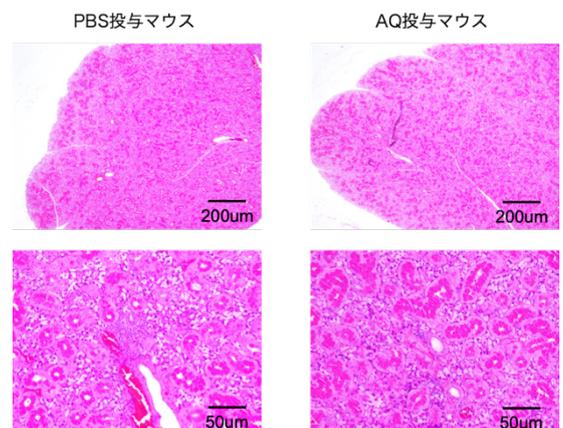


図 2 AQ 投与マウス (投与 2 週) の顎下腺組織 (HE 染色)



(1)-② HCQ 投与 ROR γ t-Tg マウス(投与開始 2 週後)の脾臓、頸部リンパ節、顎下腺 CD4+T 細胞における Foxp3 の mRNA 発現は、それぞれ PBS 投与 ROR γ t-Tg マウスと比較し、有意差がなかった。また、AQ 投与 ROR γ t-Tg マウス(投与開始 2 週後)の脾臓、頸部リンパ節、顎下腺 CD4+T 細胞における Foxp3 の mRNA 発現は、それぞれ PBS 投与 ROR γ t-Tg マウスと比較し、有意差がなかった。

このように、ROR γ t-Tg において唾液腺炎に対する HCQ、AQ 腹腔内投与の効果はみられなかった。また、HCQ、AQ 腹腔内投与によるリンパ組織(脾臓、頸部リンパ節)および顎下腺における CD4+T 細胞の Foxp3 発現に変化はみられなかったことから、ROR γ t-Tg においては、DSS 腸炎モデル(Won HY, et al. *Sci Rep* 2017;5:16946)と異なり、薬剤による Treg の増加が誘導されず、その結果として唾液腺炎の改善に至らなかったと考えられた。その理由として、炎症の標的臓器が異なることや、ROR γ t 強制発現による非生理的なモデルであることなどが考えられ、他の疾患モデルでのさらなる検証が必要と考えられた。

(2) HCQ 有効性予測因子の解析

① 当該期間中に HCQ が導入された維持治療中の SLE 患者として 45 例を同定し、HCQ 導入後 3 ヶ月時点の有効例は 17 例であった(表 1)。

年齢 (歳)	41.7 ± 15.1
罹病期間 (年)	8.6 ± 8.7
男女比	7 : 38
臓器病変 (既往)	
腎炎	19 例 (42.2%)
NPSLE	9 例 (20.0%)
HCQ 導入の主対象	
皮疹	17 例 (37.8%)
関節炎	16 例 (35.6%)
倦怠感	12 例 (26.7%)
HCQ 開始時	
PSL 用量 (mg/日)	5.1 ± 3.0
抗dsDNA抗体 (IU/mL)	15.2 ± 25.6
C3 (mg/dL)	87.2 ± 24.7
CRP (mg/dL)	0.30 ± 0.49
抗Sm抗体陽性	12 例 (26.7%)
抗SS-A抗体陽性	34 例 (75.6%)
抗RNP抗体陽性	21 例 (46.7%)
HCQ 有効例 (医師全般評価、3か月)	17 例 (37.8%)

② 両群間の重要臓器病変(腎炎、NPSLE)合併率や血清学的活動性指標に有意差はなかった。一方、年齢、HCQ 導入目的の内訳に有意差がみられた(表 2)。

表 2 HCQ 無効例と有効例の比較

	HCQ無効例 (n=28)	HCQ有効例 (n=17)	p
年齢 (歳)	45.5 ± 14.2	35.5 ± 15.1	0.01**
罹病期間 (年)	9.4 ± 9.4	7.4 ± 7.5	0.38 ^b
男女比	6 : 22	1 : 16	0.23 ^b
臓器病変 (既往)			
腎炎	12 例 (42.9%)	7 例 (41.2%)	1.00 ^b
NPSLE	6 例 (21.4%)	3 例 (17.6%)	1.00 ^b
HCQ 導入の主対象			
皮疹	7 例 (25.0%)	10 例 (58.8%)	0.03**
関節炎	10 例 (35.7%)	6 例 (35.3%)	1.00 ^b
倦怠感	11 例 (39.3%)	1 例 (5.9%)	0.02**
HCQ 開始時			
PSL 用量 (mg/日)	5.8 ± 2.3	3.9 ± 3.6	0.16*
抗dsDNA抗体 (IU/mL)	16.7 ± 29.8	12.8 ± 17.1	0.75*
C3 (mg/dL)	89.3 ± 26.0	83.8 ± 22.6	0.48*
CRP (mg/dL)	0.26 ± 0.45	0.37 ± 0.57	0.82 ^a
抗Sm抗体陽性	6 例 (21.4%)	6 例 (35.3%)	0.32 ^b
抗SS-A抗体陽性	24 例 (85.7%)	10 例 (58.8%)	0.07 ^b
抗RNP抗体陽性	13 例 (46.4%)	8 例 (47.1%)	1.00 ^b

^a Mann-Whitney検定、^b Fisherの直接確率検定、*p<0.05

③ 多変量解析により、HCQ 導入時の PSL 用量(オッズ比(OR) 0.65 (1mg/日増加毎)、95%信頼区間(CI) 0.42-0.99, p=0.04)、CRP(OR 15.49 (1mg/dL 上昇毎)、95%CI 1.02-234.56, p=0.04)、抗 SS-A 抗体(OR 0.07, 95%CI 0.01-0.65, p=0.02)が、HCQ 有効性予測因子として有意に抽出された。一方、抗 dsDNA 抗体、C3 は HCQ 有効性と有意に関連しないことが示された(表 3)。なお、全ての因子間にお

いて VIF<1.5 であり、多重共線性を認めなかった。

表 3 HCQ 有効性予測因子の抽出(単変量、多変量解析)

	単変量		多変量			
	OR	p	β	OR	95%CI	p
年齢 (歳)	0.95	0.04*	-0.07	0.93	0.86 - 1.01	0.09
罹病期間 (年)	0.97	0.46	0.05	1.05	0.91 - 1.21	0.50
性別 (男性/女性)	0.23	0.19	-2.79	0.06	0.00 - 3.42	0.17
PSL用量 (mg/日)	0.79	0.04*	-0.43	0.65	0.42 - 0.99	0.04*
抗dsDNA抗体 (IU/mL)	0.99	0.62	-0.02	0.98	0.91 - 1.05	0.58
C3 (mg/dL)	0.99	0.47	-0.03	0.97	0.93 - 1.02	0.30
CRP (mg/dL)	1.55	0.48	2.74	15.49	1.02 - 234.56	0.04*
抗Sm抗体陽性	2.00	0.31	1.69	5.43	0.44 - 67.67	0.19
抗SS-A抗体陽性	0.24	0.04*	-2.63	0.07	0.01 - 0.65	0.02*
抗RNP抗体陽性	1.03	0.97	-0.26	0.77	0.08 - 7.38	0.82

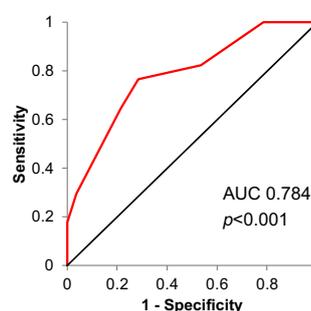
ロジスティック回帰分析、*p<0.05
OR: odds ratio, CI: confidence interval

④ 予測スコアと ROC 解析

③で有意に抽出された予測因子の β 係数に基づき、予測因子の各カテゴリに点数を割り当て(表 4)、合計スコアの ROC 解析を行った。ROC 曲線の area under the curve (AUC)は 0.784 (p<0.001)であり、予測スコアによる良好な HCQ 有効性予測能が示唆された(図 3)。また、予測スコア≥2 のとき、感度 76.5%、特異度 71.4%で HCQ 有効性を予測した。 図 3 ROC 曲線

表 4 予測スコア

PSL (mg/日)	CRP (mg/dl)	抗SS-A抗体	
≥7.5	0 <0.40	0 陽性	0
≥5	1 <0.80	1 陰性	3
≥2.5	2 <1.20	2	
>0	3 ≥1.20	3	
0	4		



以上のように、HCQ 有効性予測因子として抗 SS-A 抗体陰性が抽出され、抗 SS-A 抗体の存在が HCQ の作用に拮抗する可能性が考えられた。抗 SS-A 抗体は、TRIM21 による IRF5 などのユビキチン化を阻害し、I 型インターフェロン (IFN) 産生亢進に寄与する可能性が示唆されている (Verstappen GM, et al. *Nat Rev Rheumatol* 2021;17:333-348)。HCQ は、形質細胞様樹状細胞 (pDC) の Toll 様受容体 7/9 阻害を介して I 型 IFN 産生を抑制するが (Schrezenmeier E, et al. *Nat Rev Rheumatol* 2020;16:155-166)、IRF5 活性化を阻害できないことが示されており (Ban T, et al. *Nat Commun* 2021;12:4379)、上記結果の要因の一つとして考慮された。また、CRP 上昇が HCQ 有効性と関連し、抗 dsDNA 抗体や補体はそれと関連しなかったことから、維持治療中の SLE 患者において HCQ は IFN 産生亢進などの炎症を主体とした病態により適していると考えられた。

このように、臨床データからも、抗 SS-A 抗体存在下では HCQ 有効性を獲得しにくいことが示され、抗 SS-A 陽性 SLE 患者だけでなく、抗 SS-A 抗体が高頻度に検出される SS 患者においても主たる治療戦略として位置づけることは難しいと考えられた。また、HCQ は、自己抗体の産生亢進などの獲得免疫系の異常よりも、I 型 IFN 産生亢進など炎症を主体とした病態においてより有効性が高かったことから、前者への関与が想定される NR4A2 への HCQ の作用は限定的である可能性が示唆された。

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 0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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

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、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、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 高橋広行、秋山優弥、大山節子、山地実紗、原田拓弥、本村杏子、小林俊昭、山下裕之、金子礼志
2. 発表標題 維持治療中の全身性エリテマトーデス患者におけるヒドロキシクロロキン有効性予測因子の解析
3. 学会等名 第67回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2023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
---------	---------