

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：32661

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K18296

研究課題名(和文) 病原性T細胞に着目したシェーグレン症候群病態形成機序の解析

研究課題名(英文) Analysis of the role of pathogenic T cells in Sjogren's syndrome pathogenesis

研究代表者

井上 彰子 (Inoue, Akiko)

東邦大学・医学部・助教

研究者番号：40770475

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)：本研究では、シェーグレン症候群(SS)疾患モデルマウスを用いて、SS発症初期病態形成機構を解析した。SS様病態を呈したマウス頸部リンパ節T細胞ハイブリドーマを樹立した。CD4+CD8+ T細胞ハイブリドーマのT細胞受容体遺伝子を単離し、相補性決定領域(CDR)3の長さを解析した結果、野生型マウス頸部リンパ節T細胞受容体のCDR3よりも長さが短い傾向であった。胎生期T細胞分化では、分化時のTdT活性が低いため、成熟期T細胞に比べCDR3の長さが短い。以上よりSSモデルマウス唾液腺浸潤T細胞は、胎生期から新生仔初期に分化した細胞である可能性が示唆された。

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(Sjogren's syndrome; SS)の発症原因は不明で、特異的な治療法もまだ確立されていない。本研究で用いたシェーグレン症候群(SS)疾患モデルマウスは、ヒトSSの診断に用いられる抗SSA、抗SSBなどの自己抗体産生が上昇する以前に唾液腺、涙腺などの組織破壊と機能障害が始まる。また、生後4週齢のSS疾患モデルマウス唾液腺には既にT細胞浸潤が認められる。よってこのSS疾患モデルマウスを用いてSS発症初期に局所でT細胞が起こす免疫反応を明らかにできれば、SS発症初期に自己反応性T細胞の活性化を制御する方法を見出せる可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the pathogenesis of Sjogren's syndrome (SS) using a SS mouse model. We generated T cell hybridomas with cervical lymph node cells from the SS model mice and isolated the T cell receptor genes. We found that length of complementarity-determining region (CDR) 3 sequences in the TCR genes from the established hybridomas was shorter than T cells from cervical lymph nodes in WT mice. These results suggest that salivary gland-infiltrating T cells in SS model mouse are embryonic origin.

研究分野：耳鼻咽喉科免疫アレルギー

キーワード：シェーグレン症候群 病原性T細胞

### 1. 研究開始当初の背景

SS は、唾液腺、涙腺などの外分泌腺が特異的に破壊されるため、口腔、目の乾きにより著しく「生活の質」が低下する。しかしこの疾患の発症原因は不明で、特異的な治療も未だ確立されていない。これまでに、SS 患者検体を用いた発症機序の解析は行われている(Ogawa, N. et al. *Jpn. J. Clin. Immunol.*, 2005)。しかし、ヒト検体の場合、発症後かなりの時間が経過している場合や、服用薬剤の影響等もあり、ヒト検体のみでは、純粋に SS 発症機序を解明することは難しいと思われた。そこで、生後早期よりヒト SS 病態を呈する SS モデルマウスを用いて SS 発症機序の検討を行うこととした。

研究代表者が所属する研究室では、これまでに血球系細胞特異的に Special AT-rich sequence binding protein-1 (SATB1) を欠損する SATB1 コンディショナルノックアウト (SATB1cKO) マウスを解析し、SATB1 は免疫寛容成立に必須な遺伝子であることを明らかにした(Kondo, M. Tanaka Y. et al., *J. Immunol.*, 2016)。SATB1 は T 細胞の分化、機能にかかわる様々な遺伝子の発現制御を行っている核タンパクである (*Cell*, 1992, *Nature*, 2002)。

実際、SATB1cKO マウスは、生後 4 週齢より SS 様の乾燥症状を呈する (図 1)。さらに生後 9-10 週齢を過ぎると SS 特異的な自己抗体価が上昇し (図 2, 3)、ループス腎炎など、SLE 様の症状が

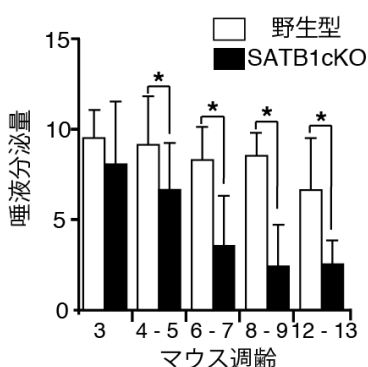


図 1: 唾液分泌量の変化

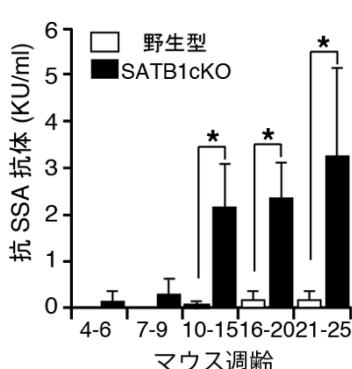


図 2: 抗 SSA 抗体量の変化

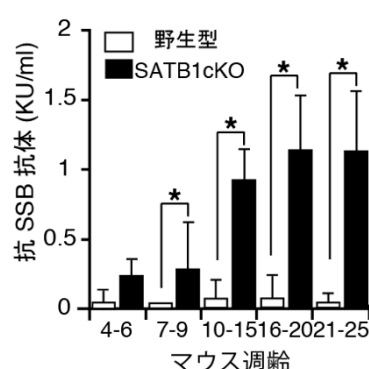


図 3: 抗 SSB 抗体量の変化

出現する。これらの知見から、SATB1cKO マウスはヒト SS のモデルマウスとして有用であると報告し(Tanaka, Y. Inoue A. et al., *J. Immunol.* 2017)、解析を進めていた。

また、研究代表者らは SATB1cKO マウスを用いたこれまでの検討において、以下のことを報告している。SATB1cKO マウス頸部リンパ節由来の T 細胞を、生まれつきリンパ球を欠損する Rag2<sup>-/-</sup>マウスに移入すると、SATB1cKO マウスと同じく、SS 様の唾液腺機能障害が誘導されるが、脾臓由来の T 細胞を移入しても唾液腺機能は障害されない (図 4, Tanaka, Y. Inoue A. et al., *J. Immunol.* 2017)。この結果より、SATB1cKO マウス頸部リンパ節には、唾液腺機能障害を発症させる病原性 T 細胞が存在することが明らかになった。

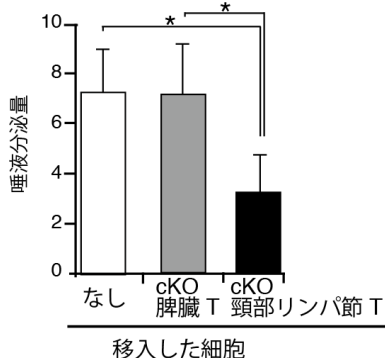


図 4: 頸部リンパ節 T 細胞移入による唾液分泌量の変化

ヒト SS 患者サンプルや、他のモデルマウスの検討から、SS は、T 細胞による組織破壊が発症のトリガーとなることが示唆されている。しかし、SS を発症させる病原性 T 細胞が、活性化されるメカニズムや、標的となる唾液腺に集積するメカニズムは未だ明らかとなっていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、免疫担当細胞をターゲットとした SS 特異的な治療法の開発を目指し、SS モデルマウスを用いて、SS の初期病態形成における病原性 T 細胞の活性化機構を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

Cre-loxP システムを用いて転写制御因子 SATB1 を血球系細胞特異的に欠損する SATB1<sup>f1/f1</sup> Vav-Cre<sup>+</sup>マウスを作製し、SS モデルマウス (SATB1cKO) として解析した。

これまでの検討から、SS を発症した SATB1cKO マウス頸部リンパ節には、病原性 T 細胞が存在することは明らかである (Tanaka, Y. Inoue A. et al., *J. Immunol.* 2017)。しかし CD4<sup>+</sup>T 細胞

または、CD8<sup>+</sup>T細胞のどちらがより病原性が高いのかは未だ明らかではない。SS様病態を呈したSATB1cKOマウス頸部リンパ節より、CD4<sup>+</sup>T細胞、またはCD8<sup>+</sup>T細胞をセルソーターにより分離し、各々をRag2<sup>-/-</sup>マウスに移入した。移入後、唾液腺分泌量の測定、唾液腺の病理組織的解析を適宜行い、唾液腺機能障害の程度、唾液腺の炎症の状態、さらに、唾液腺や局所リンパ節、その他の臓器への移入細胞浸潤について評価した。

また、唾液分泌機能障害を発症する前の生後3週齢から生後12週齢まで、SATB1cKOマウス腹腔内に抗CD4抗体、または抗CD8抗体を継続投与し、唾液腺分泌量と血清中のトリプトファン(Trp)-キヌレニン(KYN)代謝の測定を行った。

さらに、唾液分泌機能障害を発症したRag2<sup>-/-</sup>マウスの頸部リンパ節T細胞と、マウス胸腺腫細胞BW5147をポリエチレングリコール法により細胞融合させた。細胞融合したT細胞ハイブリドーマはHAT培地により選択し、細胞表面のCD4、CD8発現をフローサイトメトリーにより解析した。本研究では、SS様病態を呈するSATB1cKOマウス唾液腺に最も多く浸潤しているCD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>ダブルポジティブT細胞に着目した。CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>ダブルポジティブT細胞ハイブリドーマをセルソーターで分離しクローニング後、それらの細胞のT細胞受容体(TCR)を解析した。樹立したCD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>ダブルポジティブT細胞ハイブリドーマクローンから、TCR遺伝子を単離し、相補性決定領域(complementarity-determining region: CDR)3の長さを解析した。

#### 4. 研究成果

(1) SS様病態を呈したSATB1cKOマウス頸部リンパ節より分離した、CD4<sup>+</sup>T細胞、またはCD8<sup>+</sup>T細胞をRag2<sup>-/-</sup>マウスに移入した後、経時的に唾液分泌機能を測定した。その結果、CD4<sup>+</sup>T細胞、またはCD8<sup>+</sup>T細胞それぞれ単独での移入では、安定した唾液分泌機能障害は認められなかった。

(2) SATB1cKOマウスが唾液分泌機能障害を発症する生後3週齢から定期的に抗CD4抗体、または抗CD8抗体を継続投与し、唾液腺分泌量と血清中のTrp-KYN代謝の測定を行った。研究代表者らの検討により、生後3週齢からSATB1cKOマウスの唾液腺には、インターフェロン $\gamma$ (IFN $\gamma$ )<sup>+</sup>T細胞が集積し、産生されたIFN $\gamma$ は唾液腺組織において、必須アミノ酸の一つであるTrpをKYNに代謝する酵素Indoleamine 2,3-dioxygenase(IDO)の発現を誘導し、Trp-KYN代謝が亢進することが既に明らかになっている(*Int. J. Mol. Sci.* 2021)。抗CD4抗体投与によりCD4<sup>+</sup>T細胞を除去すると、唾液分泌障害は改善され、かつTrp-KYN代謝亢進は抑制された。一方、抗CD8抗体投与によるCD8<sup>+</sup>T細胞の除去では、唾液分泌障害の改善は軽度であったが、Trp-KYN代謝亢進は抗CD4抗体投与時と同様に抑制された。これらの結果は、SATB1cKOマウスにおけるSS発症には、CD4<sup>+</sup>または、CD8<sup>+</sup>の病原性T細胞による組織破壊が重要であることが示唆している。

(3) SATB1cKOマウスに唾液分泌機能障害を発症させる病原性T細胞についてより詳しく検討するために、SS様病態を呈したSATB1cKOマウス頸部リンパ節T細胞を移入し、唾液分泌機能障害を発症したRag2<sup>-/-</sup>マウスを用いて、T細胞ハイブリドーマを作製した。その結果、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>の3種のT細胞ハイブリドーマが得られた。SS様病態を呈するSATB1cKOマウス唾液腺には、CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>ダブルポジティブT細胞がCD4<sup>+</sup>T細胞、またはCD8<sup>+</sup>T細胞に比べて最も多く浸潤していることから、唾液腺を破壊する病原性T細胞はCD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>ダブルポジティブT細胞である可能性が示唆されている。そこで、CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>ダブルポジティブT細胞ハイブリドーマに焦点をあて、TCR遺伝子のCDR3の長さを解析した。その結果、CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>ダブルポジティブT細胞ハイブリドーマでは、野生型マウス頸部リンパ節T細胞TCRのCD3よりも、長さが短い傾向を示した。胎生期から新生仔初期のマウスでは、成熟過程にあるリンパ球のTerminal deoxynucleotidyl-transferase(TdT)発現が低く、V(D)J領域の遺伝子再構成時にNヌクレオチド付加が少ない。したがって、SS様病態を呈したSATB1cKOマウスの唾液腺に浸潤するT細胞は、胎生期から新生仔初期に分化した細胞が多く含まれている可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5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<br>松井 秀仁, 中島 一鴻, 島田 顕央, 藤川 桃紀, 大平 真也, 梶原 理子, 井上 彰子, 加藤 孝邦, 和田 弘太 | 4. 巻<br>95            |
| 2. 論文標題<br>Submental Island Flapが咽頭・皮膚・舌再建に有用であった4例                     | 5. 発行年<br>2023年       |
| 3. 雑誌名<br>耳鼻咽喉科・頭頸部外科   | 6. 最初と最後の頁<br>760-766 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>なし  | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>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<br>-             |

|  |                       |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名<br>金海 隆子, 井上 彰子, 由井 亮輔, 福生 瑛, 和田 弘太 | 4. 巻<br>96            |
| 2. 論文標題<br>頸部回旋を伴った心因性顔面痙攣の1症例             | 5. 発行年<br>2024年       |
| 3. 雑誌名<br>耳鼻咽喉科・頭頸部外科                      | 6. 最初と最後の頁<br>295-299 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>なし             | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>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<br>-             |

|  |                          |
|--|--------------------------|
| 1. 著者名<br>神山 和久, 井上 彰子                 | 4. 巻<br>24               |
| 2. 論文標題<br>研修医が身につけておきたい耳鼻咽喉科診察のキホン    | 5. 発行年<br>2023年          |
| 3. 雑誌名<br>レジデントノート増刊                   | 6. 最初と最後の頁<br>2934, 2944 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>なし         | 査読の有無<br>無               |
| オープンアクセス<br>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<br>-                |

|   |                          |
|---|--------------------------|
| 1. 著者名<br>Inoue Akiko, Tanaka Yuriko, Ohira Shinya, Matsuura Kentaro, Kondo Motonari, Wada Kota                             | 4. 巻<br>25               |
| 2. 論文標題<br>High CD4+ T-Cell/B-Cell Ratio in the Paranasal Sinus Mucosa of Patients with Eosinophilic Chronic Rhinosinusitis | 5. 発行年<br>2020年          |
| 3. 雑誌名<br>International Archives of Otorhinolaryngology   | 6. 最初と最後の頁<br>e416, e420 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1055/s-0040-1715587  | 査読の有無<br>有               |
| オープンアクセス<br>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<br>-                |

|  |                           |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Watanabe Yoshiyuki, Seto Yukiko, Oikawa Ritsuko, Nakazawa Takara, Furuya Hanae, Matsui Hidehito, Hosono Sachiko, Noike Mika, Inoue Akiko, Yamamoto Hiroyuki, Itoh Fumio, Wada Kota | 4. 巻<br>21                |
| 2. 論文標題<br>Mouthwash-Based Highly Sensitive Pyro-Genotyping for Nine Sexually Transmitted Human Papilloma Virus Genotypes  | 5. 発行年<br>2020年           |
| 3. 雑誌名<br>International Journal of Molecular Sciences  | 6. 最初と最後の頁<br>3697 ~ 3697 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.3390/ijms21103697   | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>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<br>-                 |

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Ohira Shinya, Matsuura Kentaro, Matsui Hidehito, Nakamura Mitsuto, Kamiyama Kazuhisa, Kajiwara Riko, Inoue Akiko, Wada Kota | 4. 巻<br>131             |
| 2. 論文標題<br>Anatomical Factors that Can Predict the Structure of Lamina Papyracea for Endoscopic Sinus Surgery                         | 5. 発行年<br>2020年         |
| 3. 雑誌名<br>The Laryngoscope  | 6. 最初と最後の頁<br>E19 ~ E25 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1002/lary.28644  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |

〔学会発表〕 計14件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>瀬戸由記子, 岡野 由実, 井上 彰子, 井関 琢哉, 関本龍太郎, 松島 康二, 和田 弘太 |
| 2. 発表標題<br>当科小児難聴外来受診児に関する検討                               |
| 3. 学会等名<br>第18回日本小児耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会                         |
| 4. 発表年<br>2023年  |

|                                    |
|------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>井上彰子, 井上なつき, 和田弘太, 澁谷和俊 |
| 2. 発表標題<br>東京高輪病院における外耳道真菌症の変遷     |
| 3. 学会等名<br>第67回日本医真菌学会総会・学術集会      |
| 4. 発表年<br>2023年                    |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>井上彰子, 金海隆子, 梶原理子, 大平真也, 細野祥子, 和田弘太, 澁谷和俊 |
| 2. 発表標題<br>透明耳漏からCandida aurisが検出された2症例             |
| 3. 学会等名<br>第240回日本耳鼻咽喉科頭頸部外科学会東京都地方部会学術講演会          |
| 4. 発表年<br>2023年                                     |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>金海隆子, 井上彰子, 加藤真帆, 関本龍太郎, 松島康二, 和田弘太 |
| 2. 発表標題<br>頸部回旋を伴う心因性顔面痙攣に心理療法が著効した1症例         |
| 3. 学会等名<br>第240回日本耳鼻咽喉科頭頸部外科学会東京都地方部会学術講演会     |
| 4. 発表年<br>2023年                                |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>田中ゆり子, 井上彰子, 有田道恒, 近藤元就           |
| 2. 発表標題<br>自己免疫疾患モデルマウスにおけるB細胞活性化機構の解析       |
| 3. 学会等名<br>Kyoto T Cell Conference 第32回 学術集会 |
| 4. 発表年<br>2023年                              |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>井上彰子, 神山和久, 藤川桃紀, 定本聡太, 井上なつき, 和田弘太, 澁谷和俊 |
| 2. 発表標題<br>2度の手術を要した慢性浸潤性副鼻腔真菌症の一症例                  |
| 3. 学会等名<br>第42回関東医真菌懇話会                              |
| 4. 発表年<br>2023年                                      |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Tanaka Y, Ise M, Naito T, Kuwabara T, Mashimo S, Inoue A, Kondo M    |
| 2. 発表標題<br>Elimination mechanism of B16 melanoma cells in autoimmune prone mice |
| 3. 学会等名<br>The 52nd Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology       |
| 4. 発表年<br>2024年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>田中ゆり子, 井上彰子, 近藤元就                |
| 2. 発表標題<br>シェーグレン症候群疾患モデルマウスにおけるB細胞活性化機構の解析 |
| 3. 学会等名<br>第30回 日本シェーグレン症候群学会学術集会           |
| 4. 発表年<br>2022年                             |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Tanaka Y, Inoue A, Naito T, Kuwabara T, Ise M, Kohwi-Shigematsu T, Kondo M |
| 2. 発表標題<br>Functional analyses of pathogenic T cells in autoimmune prone mice         |
| 3. 学会等名<br>The 51st Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology             |
| 4. 発表年<br>2022年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>田中ゆり子, 井上彰子, 近藤元就                 |
| 2. 発表標題<br>自己免疫疾患モデルマウス病原性T細胞による組織障害メカニズムの解析 |
| 3. 学会等名<br>Kyoto T cell conference 第30回学術集会  |
| 4. 発表年<br>2021年                              |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>田中ゆり子、井上彰子、近藤元就                        |
| 2. 発表標題<br>シェーグレン症候群疾患モデルマウス病原性T細胞による唾液腺組織障害機構の解析 |
| 3. 学会等名<br>第29回 日本シェーグレン症候群学会学術集会                 |
| 4. 発表年<br>2021年                                   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Yuriko Tanaka, Akiko Inoue, Taku Kuwabara, Taku Naito, Marii Ise, Motonari Kondo |
| 2. 発表標題<br>An early serum marker for Sjogren's syndrome in SATB1 deficient mice             |
| 3. 学会等名<br>The 50th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology                   |
| 4. 発表年<br>2021年   |

|                                     |
|-------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>井上彰子、大平真也                |
| 2. 発表標題<br>シェーグレン症候群における自己抗体産生機構の解明 |
| 3. 学会等名<br>第157回東邦医学会例会             |
| 4. 発表年<br>2021年                     |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Akiko Inoue, Yuriko Tanaka, Motonari Kondo, Hidehito Matsui, Takara Nakazawa, Shinya Ohira, Hiroshi Osafune, Kota Wada |
| 2. 発表標題<br>More severe ECRS patients produce more TSLP in the paranasal sinus mucosa  |
| 3. 学会等名<br>JSA/WAO Joint Congress 2020 (国際学会)   |
| 4. 発表年<br>2020年   |



〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|  | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(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 |
|---------|---------|
|---------|---------|