

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22791806

研究課題名(和文) シェーグレン症候群のT細胞系免疫異常におけるIL-18およびTh17の役割

研究課題名(英文) The role of IL-18 and Th17 cells in the T cell related immune system of Sjogren's syndrome

研究代表者

酒井 梓 (SAKAI, AZUSA)

東北大学・大学病院・医員

研究者番号：90463778

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト唾液腺組織ならびに同組織由来唾液腺細胞における炎症誘導性サイトカインであるIL-18、Th17関連サイトカインであるIL-17の発現とその機能について解析した。シェーグレン症候群患者の唾液腺腺房上皮細胞ではIL-18が発現し、浸潤するTリンパ球の多くがTh17細胞であること、さらにIL-18とIL-17の相互作用がヒト唾液腺細胞からサイトカインやケモカインの産生を誘導し唾液腺炎の発現に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this research was to investigate the pathogenesis of Sjogren's syndrome. The expression of IL-18 and IL-17 were detected in salivary glands of Sjogren's syndrome, and infiltrating T cells. IL-18 amplified the secretion of IL-8 and IL-6 induced by low amounts of IL-17 from primary salivary glands cells. The results suggest that IL-18 and Th17 cells are associated with the pathogenesis of Sjogren's syndrome.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：シェーグレン症候群 唾液腺

## 1. 研究開始当初の背景

シェーグレン症候群は他の多くの自己免疫疾患と同様に病因ならびに病態の発現機序の詳細は未だ不明である。従来、CD4 陽性 T 細胞には、細胞性免疫を担う 1 型ヘルパー T(Th1)細胞と、液性免疫を担う 2 型ヘルパー T(Th2)細胞が知られている。各種自己免疫疾患や炎症性疾患において、この Th1 と Th2 のアンバランスが疾患の病態を形成すると考えられてきた。しかしながら近年では、炎症性サイトカインの一つであるインターロイキン(IL)-17 を産生する CD4 陽性 T 細胞として同定された Th17 細胞がマウスを用いた実験的自己免疫性脊髄炎やコラーゲン誘発関節炎に関する研究により自己免疫反応の中心的な役割を果たしていることが明らかにされ、原因不明で難治性であった各種自己免疫疾患において疾病の予防および治療のターゲット分子として有望視されている。

また IL-18 は、活性化マクロファージの他、ケラチノサイトや腸管上皮細胞といった上皮系細胞など多くの臓器・組織に発現するサイトカインである。T 細胞系免疫システムにおいて、IL-12 存在下では Th1 サイトカインとして機能する一方で、IL-12 非存在下では Th2 サイトカインとして働くといった多様性を持つことが知られている。シェーグレン症候群患者の血清において濃度上昇を示すことから、本疾患の病態発現に関与しているとともに、Th17 ならびに IL-17 と関連している可能性が考えられる。これまで Th1 関連疾患であると考えられてきた本疾患が、Th1 のみならず Th17 の関与によって病態が発症する、いわゆる“Th17 関連疾患”であるという発想のもと本研究を遂行するに至った。

## 2. 研究の目的

シェーグレン症候群患者の唾液腺における病態発現機序はいまだ不明である。病態発現における Th17 細胞を含めた T 細胞系免疫システムの異常を解明し、本疾患の予防および治療方法を確立する。

## 3. 研究の方法

(1) 試料：唾液腺細胞株 AZA3, HSY, HSG-Q ならびに、シェーグレン症候群患者、唾液腺疾患のないボランティア、口腔乾燥症患者、慢性 GVHD 患者から得られた口唇腺組織を実験試料として用いた。口唇腺は下唇正中部に 1%キシロカイン麻酔液で浸潤麻酔後、10 mmの縦切開を入れ、周囲結合組織を剥離して摘出した。摘出後の組織は生理食塩水に保存後、ただちに PLP 固定あるいは細胞培養に用いた。

(2) 唾液腺細胞株 HSG-Q における IL-18 の発現の検討：HSG-Q を培養し、 $1 \times 10^6$  の 6 乗個あたり 200  $\mu$ l の lysis buffer (RIPA buffer+ protease inhibitor cocktail)を用いて溶解し、遠心分離後に得られた上清を Cell lysate としてものに含まれる IL-18 の発現についてウェスタンブロッティング法で検討を行った。

(3) 下唇小唾液腺組織からの初代培養細胞の分離：  
研究方法(1)によって得られた下唇小唾液腺組織は、Collagenase (Wako) を用いて細胞分散処理を施したのちに、培養器として collagen-1 コーティングした培養用フラスコ「スミロンセルタイト」(住友ベークライト) 培地として成長因子およびウシ血清を添加した Keratinocyte -SFM (Invitrogen) +5%FCS を用いて培養した。

(4) 下唇小唾液腺における免疫組織学的な検討：  
研究方法(1)によって得られた下唇小唾液腺組織は PLP 固定を行い、凍結切片を作製し免疫染色を行った。IL-18 および IL-17 の発現、次に IL-17 と IFN- $\gamma$ 、CD4、CD8 の発現を二重染色によってリンパ球のポピュレーションを検討した

(5) 唾液腺細胞株 AZA3, HSY の細胞表面に発現する IL-18 レセプターならびに IL-17 レセプターの発現をフローサイトメトリー法で検討した。

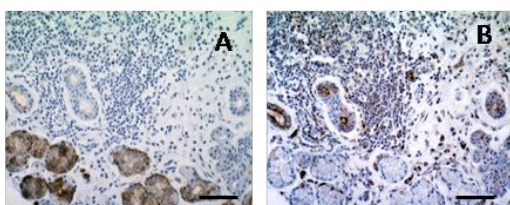
(6) 唾液腺細胞株 HSY における IL-18 および IL-17 の相互作用の検討：  
HSY を一晩培養したのち、recombinant IL-18 (0, 1, 10ng/ml) および recombinant IL-17 (0, 1, 10, 100ng/ml) を培地に添加し培養した。24 時間後に培養上清を回収し、上清中に含まれる IL-6 および IL-8 の濃度を ELISA 法(Human IL-6 OptEIA ELISA kit, BD Biosciences) (Human IL-8 OptEIA ELISA kit, BD Biosciences) を用いて測定した。

(7) ヒト唾液腺由来細胞における IL-18 および IL-17 の相互作用の検討：  
研究方法(1)(2)によって得られたヒト唾液腺由来細胞を用いて、recombinant IL-18 (0, 1, 10ng/ml) および recombinant IL-17 (0, 1, 10, 100ng/ml) を培地に添加し培養した。24 時間後に培養上清を回収し、上清中に含まれる IL-6 および IL-8 の濃度を ELISA 法(Human IL-6 OptEIA ELISA kit, BD

Biosciences) (Human IL-8 OptEIA ELISA kit, BD Biosciences) を用いて測定した。

#### 4. 研究成果

- (1) シェーグレン症候群の下唇小唾液腺下唇小唾液腺における IL-17 および IL-18 の発現：IL-18 はシェーグレン症候群患者の唾液腺の腺房細胞および導管内に、IL-17 は導管周囲への浸潤細胞および導管上皮細胞に明瞭に発現していた(下図)。



- (2) 比較対照群の健康なボランティア、唾液腺の導管周囲へのリンパ球浸潤を認めない口腔乾燥症患者、同じく口腔乾燥を呈する慢性 GVHD 患者における下唇小唾液腺では、シェーグレン症候群患者の唾液腺にみられるような IL-18 と IL-17 の著明な発現は認められなかった。

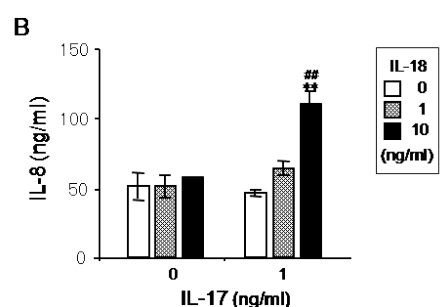
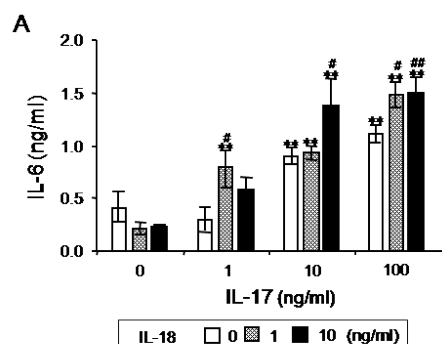
- (3) シェーグレン症候群患者の唾液腺にみられる浸潤細胞は CD4+T 細胞が主体であり、CD8+T 細胞もわずかに認められた。さらに IL-17 を発現する浸潤細胞の大多数は CD4+T 細胞であり、わずかではあるが CD8+T 細胞にも IL-17 の発現を認めた。

- (4) 唾液腺細胞株 AZA3 ならびに HSY には IL-18 および IL-17 のレセプターが発現していた。

- (5) IL-18 および IL-17 刺激をした場合の唾液腺細胞株 HSY からの IL-6、IL-8 の産生誘導を解析した。IL-18 単独では高濃度刺激でも HSY からの IL-6 の産生は誘導されず、IL-17 単独ではある濃度以上で IL-6 および IL-8 の産生が誘導された。IL-18 が低濃度でも存在する場合には、IL-17 が低濃度でも IL-6 および IL-8 の産生がみられ、その量は IL-18 および IL-17 の濃度依存的に相乗的に増加した(下図)。

- (6) IL-18 および IL-17 刺激をした場合のヒト唾液腺由来細胞からの IL-6、IL-8 の産生誘導を解析した。IL-18 と IL-17 で共刺激することによって、すべてのヒ

ト唾液腺由来細胞からの IL-8 産生は増加傾向を示した。しかしながら、IL-18 が IL-17 の IL-8 産生を増強させたドナーと、IL-17 と IL-18 の間に相乗関係がみられないドナーとがあった。



#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1件)

1. 酒井 梓、飯久保正弘、嶋田雄介、橋本直哉、熊坂 晃、佐々城 真、遠藤 雄、小嶋郁穂、庄司憲明、笹野高嗣  
東北大学病院歯科部門における外来患者の動向 臨床研修ならびに臨床教育に対する意識調査  
日本口腔診断学会雑誌、27: 8-12, 2014  
査読有

[学会発表](計 2件)

1. Ikuho Kojima, Maya Sakamoto, Iikubo Masahiro, Azusa Sakai, Yumiko Sugawara, Sizuko Satoh, Takashi Sasano. MRI of submandibular and sublingual glands in patients with Sjogren's syndrome and its diagnostic significance. Part 3: Diagnostic accuracy about high intensity spots on MR-sialography and heterogeneity of MR signal intensity.  
2013年11月2日、東京
2. Ikuho Kojima, Maya Sakamoto, Iikubo Masahiro, Azusa Sakai, Yumiko

Sugawara, Sizuko Satoh, Takashi Sasano. Diagnostic ability to detect high signal intensity spots on MR-sialography in patient with Sjogren's syndrome: Comparison between 3D and 2D methods  
2013年9月13日、東京

## 5 . 研究組織

研究代表者  
酒井 梓 (SAKAI, AZUSA)  
東北大学・大学病院・医員  
研究者番号： 90463778