様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　７ 年　 ５ 月 ２６ 日現在

機関番号：１７１０２
研究種目：挑戦的研究（開拓）
研究期間：2022～2024
課題番号：２２Ｋ１８４０１

研究課題名（和文）口腔扁平苔癬の創薬ターゲットの探索～病因T細胞と関連エンハンサーRNAの同定～

研究課題名（英文）Identification of Therapeutic Targets in Oral Lichen Planus: Pathogenic T Cells and Associated Enhancer RNAs

研究代表者
中村　誠司（Nakamura, Seiji）

九州大学・歯学研究院・特任教授

研究者番号：６０１８９０４０

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　19,800,000円

研究成果の概要（和文）：口腔扁平苔癬（OLP）は角化異常を伴う慢性炎症性の粘膜疾患であり、発症頻度が比較的高いにもかかわらず原因不明、難治性で、さらに、癌化する可能性があるために口腔潜在的悪性疾患とされているため、病因・病態解明による根治的な治療法の開発が求められている。そこで、OLPの罹患臓器に浸潤したリンパ球を分離採取し、シングルセル遺伝子発現解析を行うことで特異なT細胞の同定と、病変組織におけるT細胞の多重蛍光免疫染色法から病態形成に関わる特異なT細胞を同定し、さらにこのT細胞の転写因子の活性化に関わる上流のスイッチ遺伝子を同定することを目的とした。

研究成果の学術的意義や社会的意義
OLPは粘膜基底層に多数のリンパ球が浸潤する疾患であり、癌化する可能性があるために口腔潜在的悪性疾患とされている。その一方で、病態は未だ不明であり、治療法はステロイド含漱や塗布などの対症療法のみであった。そこで我々は、OLPの罹患臓器の病態解析により、治療標的となる特定の極めて特異なT細胞のサブセットを同定し、詳細な発症の分子機構を明らかにすると共に、新たな治療標的分子を明らかにすることを目的とした。

研究成果の概要（英文）：Oral lichen planus (OLP) is a chronic inflammatory mucosal disease characterized by abnormal keratinization. Despite its relatively high prevalence, its etiology remains unknown, it is resistant to treatment, and it is considered a potentially malignant disorder due to the risk of malignant transformation. Therefore, there is an urgent need to develop curative therapies through elucidation of its pathogenesis. To this end, the present study aims to isolate lymphocytes infiltrating the affected oral tissues of OLP patients and perform single-cell gene expression analysis to identify disease-specific T cells. Furthermore, by applying multiplex immunofluorescence staining to lesional tissues, we seek to identify T cell subsets involved in disease pathogenesis and to uncover upstream regulatory "switch" genes that activate the transcription factors driving these T cells.

研究分野：臨床免疫学

キーワード：口腔扁平苔癬　T細胞　エンハンサーRNA

※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（共通）

１．研究開始当初の背景

研究代表者は、長年に渡って口腔扁平上皮癌に対する抗腫瘍 T 細胞やシェーグレン症候群の発症に関わるT細胞に注目して研究を続け、近年ではIgG4関連疾患に注目し、罹患臓器に浸潤するT細胞について解析を行い、その病態形成と新規治療法への開発について多数報告してきた[1-9]。そこで今回は、口腔粘膜疾患の中で比較的高頻度でありながら、病因・病態が不明であり、難治性、さらには癌化の可能性もあるという、臨床的にも多くの課題があるOLPに注目し、その病因・病態を解明し、病因T細胞のスイッチ遺伝子を標的とした新たな治療法の開発を目指した。

これまで研究代表者らはOLPの病態解明を目指して、口腔粘膜上皮に浸潤するT細胞を解析し、特定のT細胞（アレルギーに関連するTh2 細胞）の浸潤が認められることまでは明らかにしてきた[7]。しかし、従前の研究では、浸潤するT細胞をシングルセルレベルで解析する技術が確立していなかったために限界があり、病因T細胞の同定やそのクローン増殖の有無については解析できていなかった。一方で、研究代表者はIgG4関連疾患の病態解明を行なっていた経緯があり、その研究の中で確立した罹患臓器に浸潤するT細胞のシングルセル解析技術を応用することができれば、OLPの病因T細胞を明らかにし、その免疫学的特異性に基づいた新規治療標的分子を明らかにすることが可能であると考えた。そして、OLPが潜在的悪性疾患であることも考慮し、口腔扁平上皮癌への癌化のプロセスや口腔扁平上皮癌の病態解明まで目指した。さらには、OLPや扁平上皮癌で新規に同定した病因T細胞のエンハンサーRNAを明らかにすることができれば、次世代のゲノム医療への応用が可能であるという研究構想に至った。

２．研究の目的

OLP は課題が多い口腔粘膜疾患であり、従前の研究手法では新規治療法の確立には至らなかったため、新規の着眼点による挑戦的研究が必要であった。本研究では、新規治療法の開発に繋げるために「病因を解明すること」が本研究の目的である。

３．研究の方法

代表者らの先行研究で確立した手法を応用して、OLP 患者の末梢血ならびに病理検体組織を用いて病因T細胞を同定する。また、この細胞を分離採取し、病因T細胞の活性化に関連する遺伝子のエンハンサーRNAを明らかにする。研究対象としては、類似疾患で口腔潜在的悪性疾患の一つである口腔白板症と口腔扁平上皮癌も対照として含め、癌化のプロセスとの関連についても検索する。

罹患臓器より全T細胞と全B細胞を分離採取し、全細胞サブセットを明らかにする。さらに、これらの細胞集団に特異な転写因子を明らかにし、その発現制御に関わる上流のスイッチ遺伝子を特定する。

(1) OLPの罹患臓器ならびに末梢血より、リンパ球を分離採取し、シングルセル遺伝子発現解析を行い病因特異的なT細胞サブセットを同定する。

(2)同定した特異なT細胞サブセットの上流の自然免疫にも着目し、その活性化機構の解明を行う。
(3)同定した特異なT細胞集団の転写因子の発現制御に関わるスイッチ遺伝子をNet-cage法にて明らかにする。

４．研究成果

第一に獲得免疫系のT細胞に着目した。OLPの罹患臓器からCD3+T細胞およびCD45+細胞を分離採取し、シングルセル遺伝子発現解析を行った。その結果、Th2、Th17、CD4+細胞傷害性T細胞、制御性T細胞（Treg）の特徴的な細胞集団を同定した。これらの細胞集団は、以前共同研究者である前原らが罹患臓器の多重蛍光免疫染色法で報告した細胞サブセットと同じ細胞サブセットであった[10]。以上の結果より、現在はTh17とTregについてその特徴的な転写因子の同定とスイッチ遺伝子の同定を進めている。

第二に、同定したT細胞のうち、Th17細胞に着目し、これらを活性化させる上流の自然免疫系の細胞集団に関しても研究を行った。まずはOLP患者3名から頬粘膜標本の正常上皮(NE)と病変上皮(LE)を選択的に抽出し、レーザーキャプチャーマイクロダイセクションにより病原性因子を同定した。カテプシンK(CTSK)は、DNAマイクロアレイによってLEの一般的なアップレギュレーション遺伝子の１つとして同定された。さ最近の研究では、CTSKが抗原提示細胞のToll様受容体9(TLR9)シグナル伝達を増強し、Th17細胞の分化につながることが示されており、上述のTh１７細胞の活性化に関わる可能性が示唆された。そこでTLR9の発現を詳細に検討したところ、主にCD123形質細胞様樹状細胞(pDC)と共局在していることが明らかになった。また細胞の刺激実験によりCD123pDCは、TLR9アゴニストCpG DNAによる刺激で、Th17関連サイトカイン(IL-6、IL-23、およびTGF-β)の産生を誘導することが明らかになった。さらに、シングルセルRNAシーケンシング解析により、TLR9陽性pDCは、TLR9陰性pDCと比較して、Th17細胞分化に関連する遺伝子で増強されることが明らかになった。以上より、in vivo/vitroの研究成果より、CTSKがTLR9シグナル伝達を介してCD123pDCのTh17関連産生を誘導し、OLPの病因を促進する可能性が示唆された[11]。

第三に、口腔扁平上皮癌の腫瘍微小環境に浸潤するT細胞にも着目し、これらの全T細胞のシングルセル遺伝子発現解析を行い特異なT細胞を同定し、ＯＬＰのT細胞と比較検討することで、癌化のプロセスに関わる特異なT細胞や扁平上皮癌の治療標的となるT細胞サブセットについて明らかにすることとした。口腔扁平上皮癌の罹患臓器に浸潤するCD3+T細胞を分離採取しシングルセル遺伝子発現解析を行い、さらにT細胞受容体のクローナリティ解析を行うことで、癌関連抗原にてクローナルに増殖する細胞集団の同定を行った。その結果、特徴的な細胞傷害性T細胞の集団と制御性T細胞の集団を同定した[12]。一部の成果は報告しているが、詳細な解析は現在行っているところである。さらに研究成果の一部については、2025年の口腔腫瘍学会総会で発表した。

1. Aoyagi R, Maehara T, Koga R, et al. Single-cell transcriptomics reveals granzyme K-expressing cytotoxic Tfh cells in tertiary lymphoid structures in IgG4-RD. *J Allergy Clin Immunol*. Aug 29 2023;doi:10.1016/j.jaci.2023.08.019

2. Chinju A, Moriyama M, Kakizoe-Ishiguro N, et al. CD163+ M2 Macrophages Promote Fibrosis in IgG4-Related Disease Via Toll-like Receptor 7/Interleukin-1 Receptor-

Associated Kinase 4/NF-κB Signaling. *Arthritis Rheumatol*. May 2022;74(5):892-901. doi:10.1002/art.42043

3. Ishiguro N, Moriyama M, Furusho K, et al. Activated M2 Macrophages Contribute to the Pathogenesis of IgG4-Related Disease via Toll-like Receptor 7/Interleukin-33 Signaling. *Arthritis Rheumatol*. Jan 2020;72(1):166-178. doi:10.1002/art.41052

4. Maehara T, Mattoo H, Ohta M, et al. Lesional CD4+ IFN-γ+ cytotoxic T lymphocytes in IgG4-related dacryoadenitis and sialoadenitis. *Ann Rheum Dis*. Feb 2017;76(2):377-385. doi:10.1136/annrheumdis-2016-209139

5. Munemura R, Maehara T, Murakami Y, et al. Distinct disease-specific Tfh cell populations in two different fibrotic diseases: IgG4-related disease and Kimura's disease. *J Allergy Clin Immunol*. May 11 2022;doi:10.1016/j.jaci.2022.03.034

6. Maehara T, Moriyama M, Kawano S, et al. Cytokine profiles contribute to understanding the pathogenic difference between Good syndrome and oral lichen planus: two case reports and literature review. *Medicine (Baltimore)*. Apr 2015;94(14):e704. doi:10.1097/md.0000000000000704

7. Yamauchi M, Moriyama M, Hayashida JN, et al. Myeloid dendritic cells stimulated by thymic stromal lymphopoietin promote Th2 immune responses and the pathogenesis of oral lichen planus. *PLoS One*. 2017;12(3):e0173017. doi:10.1371/journal.pone.0173017

8. Maehara T, Moriyama M, Nakashima H, et al. Interleukin-21 contributes to germinal centre formation and immunoglobulin G4 production in IgG4-related dacryoadenitis and sialoadenitis, so-called Mikulicz's disease. *Ann Rheum Dis*. Dec 2012;71(12):2011-19. doi:10.1136/annrheumdis-2012-201477

9. Kaneko N, Chen H, Perugino CA, et al. Cytotoxic CD8(+) T cells may be drivers of tissue destruction in Sjögren's syndrome. *Sci Rep*. Sep 14 2022;12(1):15427. doi:10.1038/s41598-022-19397-w

10. Maehara T, Kaneko N, Perugino CA, et al. Cytotoxic CD4+ T lymphocytes may induce endothelial cell apoptosis in systemic sclerosis. *J Clin Invest*. May 1 2020;130(5):2451-2464. doi:10.1172/jci131700

11. Miyahara Y, Chen H, Moriyama M, et al. Toll-like receptor 9-positive plasmacytoid dendritic cells promote Th17 immune responses in oral lichen planus stimulated by epithelium-derived cathepsin K. *Sci Rep*. Nov 7 2023;13(1):19320. doi:10.1038/s41598-023-46090-3

12. Chen H, Sameshima J, Yokomizo S, et al. Expansion of CD4+ cytotoxic T lymphocytes with specific gene expression patterns may contribute to suppression of tumor immunity in oral squamous cell carcinoma: single-cell analysis and in vitro experiments. *Front Immunol*. 2023;14:1305783. doi:10.3389/fimmu.2023.1305783

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計9件（うち査読付論文　9件／うち国際共著　2件／うちオープンアクセス　0件）

１．著者名 Koga Risako、Maehara Takashi、Aoyagi Ryuichi、Munemura Ryusuke、Murakami Yuka、Doi Atsushi、Kono Michihito、Yamamoto Hidetaka、Niiro Hiroaki、Kiyoshima Tamotsu、Tanabe Mika、Nakano Toshiaki、Matsukuma Yuta、Kawano Mitsuhiro、Stone John H.、Pillai Shiv、Nakamura Seiji、Kawano Shintaro	４．巻 153
２．論文標題 Granzyme K- and amphiregulin-expressing cytotoxic T cells and activated extrafollicular B cells are potential drivers of IgG4-related disease	５．発行年 2024年
３．雑誌名 Journal of Allergy and Clinical Immunology	６．最初と最後の頁 1095～1112
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jaci.2023.11.916	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 Allard-Chamard H、Kaneko N、Bertocchi A、Sun N、Boucau J、Kuo H、Farmer JR.、Perugino C、Mahajan VS.、Murphy SJ.H.、Premo K、Diefenbach T、Ghebremichael M、Yuen G、Kotta A、Akman Z、Lichterfeld M、Walker BD.、Yu XG.、Moriyama M、Maehara T、Nakamura S、Stone JH.、Padera RF.、Pillai S	４．巻 42
２．論文標題 Extrafollicular IgD-CD27-CXCR5-CD11c-DN3 B cells infiltrate inflamed tissues in autoimmune fibrosis and in severe COVID-19	５．発行年 2023年
３．雑誌名 Cell Reports	６．最初と最後の頁 112630～112630
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2023.112630	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 Maehara Takashi、Koga Risako、Nakamura Seiji	４．巻 59
２．論文標題 Immune dysregulation in immunoglobulin G4?related disease	５．発行年 2023年
３．雑誌名 Japanese Dental Science Review	６．最初と最後の頁 1～7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jdsr.2022.12.002	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 －

１．著者名 Aoyagi Ryuichi、Maehara Takashi、Koga Risako、Munemura Ryusuke、Tomonaga Tadashi、Murakami Yuka、Doi Atsushi、Yamamoto Hidetaka、Kiyoshima Tamotsu、Kawano Shintaro、Nakamura Seiji	４．巻 153
２．論文標題 Single-cell transcriptomics reveals granzyme K-expressing cytotoxic Tfh cells in tertiary lymphoid structures in IgG4-RD	５．発行年 2024年
３．雑誌名 Journal of Allergy and Clinical Immunology	６．最初と最後の頁 513～520.e10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jaci.2023.08.019	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 －

1．著者名 Chen Hu、Sameshima Junsei、Yokomizo Shiho、Sueyoshi Tomoki、Nagano Haruki、Miyahara Yuka、Sakamoto Taiki、Fujii Shinsuke、Kiyoshima Tamotsu、Guy Thomas、Nakamura Seiji、Moriyama Masafumi、Kaneko Naoki、Kawano Shintaro	4．巻 14
2．論文標題 Expansion of CD4+ cytotoxic T lymphocytes with specific gene expression patterns may contribute to suppression of tumor immunity in oral squamous cell carcinoma: single-cell analysis and in vitro experiments	5．発行年 2023年
3．雑誌名 Frontiers in Immunology	6．最初と最後の頁 1305783
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2023.1305783	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 －

1．著者名 Ogata Kenichi、Moriyama Masafumi、Kawado Tatsuya、Yoshioka Hiroki、Yano Aiko、Matsumura-Kawashima Mayu、Nakamura Seiji、Kawano Shintaro	4．巻 113
2．論文標題 Extracellular vesicles of iPS cells highly capable of producing HGF and TGF-β1 can attenuate Sj?gren's syndrome via innate immunity regulation	5．発行年 2024年
3．雑誌名 Cellular Signalling	6．最初と最後の頁 110980～110980
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cellsig.2023.110980	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 －

1．著者名 Kaneko, N., Sameshima, J., Kawano, S., Chikui, T., Mitsuyasu, T., Chen, Hu, Sakamoto, T., and Nakamura, S	4．巻 35
2．論文標題 Comparison of computed tomography findings between odontogenic keratocyst and ameloblastoma in the mandible: Criteria for differential diagnosis.	5．発行年 2023年
3．雑誌名 J. Oral Maxillofac. Surg. Med. Pathol.	6．最初と最後の頁 15-22
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 －

1．著者名 Hayashi, Y., Kimura, S, Yana, E., Yoshimoto, S., Saeki, A., Yasukochi, A., Hatakeyama, Y., Moriyama, M., Nakamura, S., Kimi, E., and Kawakubo-Yasukochi, T	4．巻 2
2．論文標題 Id4 modulates salivary gland homeostasis and its expression is downregulated in IgG4-related disease via miR-486-5p	5．発行年 2023年
3．雑誌名 Biochem. Biophys. Acta Mol. Cell Res.	6．最初と最後の頁 119404
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbamcr.2022.119404.	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 －

1．著者名 Miyahara Yuka、Chen Hu、Moriyama Masafumi、Mochizuki Keita、Kaneko Naoki、Haque A. S. M. Rafiul、Chinju Akira、Kai Kazuki、Sakamoto Mizuki、Kakizoe-Ishiguro Noriko、Yamauchi Masaki、Ogata Kenichi、Kiyoshima Tamotsu、Kawano Shintaro、Nakamura Seiji	4．巻 13
2．論文標題 Toll-like receptor 9-positive plasmacytoid dendritic cells promote Th17 immune responses in oral lichen planus stimulated by epithelium-derived cathepsin K	5．発行年 2023年
3．雑誌名 Scientific Reports	6．最初と最後の頁 19320
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-46090-3	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1件（うち招待講演　1件／うち国際学会　0件）

1．発表者名 中村誠司
2．発表標題 口腔科学・口腔外科学を志す後進の先生方へ　~失敗を恐れず、失敗から学べ~
3．学会等名 第56回NPO法人日本口腔科学会九州地方部会特別講演（退任記念講演）（招待講演）
4．発表年 2023年

〔図書〕　計5件

1．著者名 中村誠司	4．発行年 2023年
2．出版社 日本臨牀	5．総ページ数 8
3．書名 「最新の骨粗鬆症学（第２版）　－骨粗鬆症の最新知見－」	

1．著者名 前原　隆、宗村龍祐、古賀　理紗子、中村誠司	4．発行年 2023年
2．出版社 臨床免疫・アレルギー科	5．総ページ数 8
3．書名 IgG4関連疾患と木村病における疾患特異的な濾胞性T細胞.	

1．著者名 中村誠司	4．発行年 2023年
2．出版社 医歯薬出版	5．総ページ数 17
3．書名 口腔癌	

1．著者名 坂本瑞樹、金子直樹、森山雅文、前原　隆、中村誠司	4．発行年 2024年
2．出版社 臨床と病理	5．総ページ数 7
3．書名 B細胞とT細胞から紐解くIgG4関連疾患の病態形成メカニズム	

1．著者名 中村誠司	4．発行年 2023年
2．出版社 医学書院	5．総ページ数 12
3．書名 標準口腔外科学 第5版	

〔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
研究分担者	前原　隆 (Maehara Takashi) (10637333)	九州大学・歯学研究院・助教 (17102)	
研究分担者	森山　雅文 (Moriyama Masafumi) (20452774)	九州大学・大学病院・助教 (17102)	

６．研究組織（つづき）

	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
研究分担者	村川　泰裕 (Murakawa Yasuhiro) (50765469)	国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・チームリーダー (82401)	

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