

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659839

研究課題名(和文)新規自己免疫マーカーによるシェーグレン症候群の確定診断法および予後診断法の開発

研究課題名(英文)The development of new available autoimmune marker of Sjogren's syndrome for confirmed diagnosis and prognosis

研究代表者

新垣 理恵子 (ARAKAKI, Rieko)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：00193061

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)：生体の恒常性維持には外界からの異物・病原体の侵入を排除する免疫システムが必須であるが、この防御機構の破綻が自己免疫疾患を誘発する。現代の難病と言われる自己免疫疾患患者は年々増加し、世界中で多くの患者のQOLが低下しているにも関わらず、その診断法は限定的であり、病因論に基づいた診断技術の開発には至っていない。申請者らはシェーグレン症候群実験モデルの開発から始まり、シェーグレン症候群病態発症機構の解明をめざして研究を進めてきた。本研究では多くの実験的知見から得られたシェーグレン症候群発症の引き金となる重要分子を用いた新たな診断法を開発することを目的とした。

研究成果の概要(英文)：Autoimmune diseases occur due to autoimmune responses of an individual to self-antigens by the disturbance of self-tolerance. The autoimmune disease patients are increasing year by year, and the QOL decreases in the autoimmune diseases patients all over the world. However the diagnostic method based on an etiology of autoimmune disease has not been established. We have studied for mechanism of the onset of Sjogren's syndrome experimental model mice and serum, saliva and tear sample of the patients. We analyze the precise mechanism of the onset of Sjogren's syndrome, and developed the new available autoimmune marker for diagnosis and prognosis.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：自己免疫疾患 シェーグレン症候群 自己免疫マーカー 確定診断 予後診断

1. 研究開始当初の背景

(1) 現在の本邦におけるシェーグレン症候群の診断基準として生検病理組織検査、口腔検査、眼科検査、血清検査のうち2項目以上を満たすことが知られている。中でも生検病理組織検査に関しては精度の高い診断法とされているが、口唇から小唾液腺組織を採取する外科的侵襲が必要となり、患者への負担が大きい。また、採取された小唾液腺において実際の病態をすべて反映しているわけではない。唾液量や涙液量の測定に関してはシェーグレン症候群以外の疾患の鑑別はできない。さらに、血清自己抗体は罹患率との関係はあるが、その病勢、病態との相関はない。実際の診断では微妙な判定によってボーダーライン上の患者が存在することがある。したがって、客観性、病態との相関性、発症機序に基づいた適切な診断方法の確立が望まれている。

(2) 我々の研究室ではこれまでに、自己免疫疾患の病態解明に向けた以下の研究を推進してきた。

自己免疫疾患モデルの確立：ドライマウス、ドライアイを主徴とした唾液腺、涙腺を標的臓器とするシェーグレン症候群 (SS) の疾患モデルを確立した (*J Immunol* 153:1994)。

シェーグレン症候群の自己抗原の成立機構：SSモデルを用い臓器特異的自己抗原の一つが標的細胞のアポトーシスによって発現誘導されることを明らかにした (*Science* 276:1997, *Am J Pathol* 156:2000, *J Immunol* 169:2002, *Am J Pathol* 167:2005)。

自己免疫疾患発症における性ホルモンの役割：自己免疫疾患の多くは閉経期以降の女性に圧倒的に発症する事することから、性ホルモンと自己免疫発症に着目し、臓器細胞のアポトーシスにエストロゲン欠乏が重要な役割を果たすことを報告した (*Am J Pathol* 155:1999, *Am J Pathol* 163:2003)。さらに、エストロゲン欠乏により誘導される分子として *Retinoblastoma associate protein (RbAp) 48* を同定し (*Mol Cell Biol* 26:2006)。唾液腺、涙腺細胞特異的に RbAp48 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスはヒトシェーグレン症候群に極めて類似した自己免疫性病変を発症することを明らかにした (*J Exp Med* 205:2008)。

免疫トレランス不全と自己免疫疾患発症の関係：SSモデル、関節リウマチモデル及び炎症性腸疾患モデルなどを用いて、末梢T細胞の機能不全と自己免疫疾患の発症との関係を明らかにして来た (*J Immunol* 165:2000, *J Immunol* 167:2001, *Endocrinology* 145:2004, *Arthritis Rheum* 2004, *Blood* 110:2007, *J Immunol* 180:2008)。

(3) 様々な所見から得られた情報と自己免疫疾患における臓器特異性の決定に関する分

子機序は不明であり、さらに、それらの所見に基づいた診断法や治療法といった実際の臨床応用を目指した研究は未だ成果を得ていないのが現状である。自己免疫疾患の発症には、多数の因子が絡み合って引き起こされているからこそ、一つの分子発現の増減による診断にはリスクが伴う。「病名診断」ではなく「病態診断」を正確に行わなければその患者個人にあわせた適切な治療はできないと考えられる。

2. 研究の目的

生体の恒常性維持には外界からの異物・病原体の侵入を排除する免疫システムが必須であるが、この防御機構の破綻が自己免疫疾患を誘発する。現代の難病と言われる自己免疫疾患患者数は年々増加し、世界中で多くの患者のQOLが低下しているにも関わらず、その診断法は限定的であり、病因論に基づいた診断技術の開発には至っていない。申請者らはシェーグレン症候群実験モデルの開発から始まり、シェーグレン症候群病態発症機構の解明めざして研究を進めてきた。本研究ではシェーグレン症候群を中心に、標的臓器と免疫細胞を含めた全身の免疫システムを検討することにより自己免疫疾患の正確な診断法を開発することを目指す。疾患モデルを用いて病態の発症から進展に至る中で複数の疾患特異的分子を用いて病勢を比較検討することで、正確な診断に応用可能な「自己免疫マーカー」を選択し、さらに、他の自己免疫疾患モデルの「自己免疫マーカー」の動態を比較検討して疾患の特異性の向上を図る。現在用いられている自己免疫疾患の様々な診断検査法に加え、新たな「自己免疫マーカー」診断法を導入することにより精度の高い自己免疫の診断法の確立を目標に研究を進めたい。本研究はシェーグレン症候群の標的臓器である涙腺や唾液腺及び末梢免疫細胞における病態発症に関連する複数分子を「自己免疫マーカー」とし、この自己免疫マーカーを用いてその病態に即した正確な診断法の開発を目指す極めて斬新な研究である。

3. 研究の方法

(1) これまでに申請者らの研究により明らかにされた分子を中心に病態との関連性を詳細に検討して「自己免疫マーカー」となりうる分子を定量PCRや免疫染色で検討するとともに、標識抗体あるいはプロテアーゼ蛍光基質を用いたインビボイメージング応用の可能性も追求する。

(2) 患者サンプルを用いて「自己免疫マーカー」の応用の可能性を探求する。

4. 研究成果

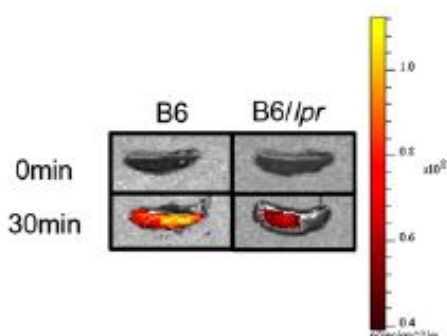
(1) これまでに申請者らの研究によりシェ

ーグレン症候群病態発症に関与することが明らかにされた主な分子をまとめたのが表1である。

	分子	病態
標的臓器	α -fodrin	自己抗原
	caspase	標的臓器アポトーシス
	Fas	組織破壊
	cathepsin	自己抗原プロセッシング
	estrogen	標的臓器アポトーシス
	RbAp48	標的臓器アポトーシス
	IFN- γ	MHC classII 誘導
	IL-18	Caspase 活性誘導
	MHC classII	異所性抗原提示
免疫細胞	FasL	末梢 T 細胞トランス
	MMP3	FasL 発現
	CCR7	胸腺での T 細胞トランス
	NF- κ B2	末梢 T 細胞の活性化
	AIRE	胸腺での自己抗原
	Foxp3	調節性 T 細胞

表1 シェーグレン症候群の唾液腺および免疫細胞における病態発症に関与する重要分子

末梢で活性化された自己反応性 T 細胞が排除されずに、自己反応性 T 細胞の成熟や自己反応性 B 細胞からの抗体産生によって自己免疫疾患が発症すると考えられる。シェーグレン症候群モデルマウスでは、唾液腺組織において Fas 発現が亢進し、唾液腺浸潤 T 細胞が Fas ligand (Fas-L) を高発現していることから、Fas-FasL を介した上皮のアポトーシスがシェーグレン症候群発症を引き起こすと考えられている。

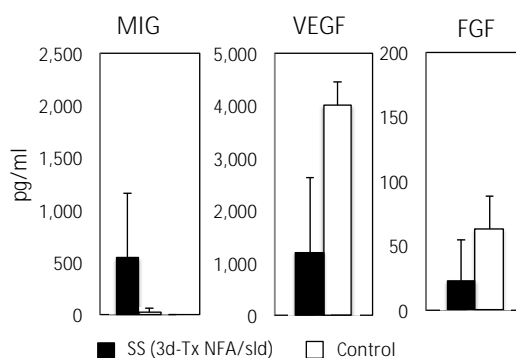


標識 B6 マウス T 細胞を B6/lpr マウスに移入 30 分後の脾臓 in vivo イメージング

FAS 遺伝子に突然変異を持つ B6/lpr マウスに正常 B6 マウスの T 細胞を移入すると、非常に速やかに移入された T 細胞が排除されるという現象を詳細に解析して、インターフェロン γ が T 細胞に Fas 発現を誘導し、ホストのマクロファージに高発現する FasL によって T 細胞が排除されるメカニズムを明らかにした (*J Immunol*, 2013, 190; 575-585)。自己

免疫疾患等の免疫応答異常の際の Fas 高発現 T 細胞の排除システムを新たな治療ターゲットとして期待するとともに、サイトフロメトリーや免疫染色で検出可能な Fas、FasL は有能な「自己免疫マーカー」に成り得ると考えている。

(2) 侵襲性が少なく入手しやすいサンプルとして唾液や涙液があげられるが、これらサンプルを用いてマルチプレックス法により 20 種類のサイトカインおよびケモカインを定量した。その結果シェーグレン症候群発症群では炎症性サイトカインである IL-1 の増加、逆に免疫抑制性サイトカインである IL-10 産生の減少を確認した。



さらにケモカインの中では Monokine Induced by Gamma-IFN chemokine (MIG, CXCL9) が発症群で優位に高値を示し、これまで提唱されている T 細胞浸潤によるシェーグレン症候群発症メカニズムをよく反映していた。さらにシェーグレン症候群発症群の分泌液中には Vascular endothelial growth factor (VEGF) および Fibroblast Growth Factor (FGF) の分泌が抑制されており、標的組織の機能障害程度を反映していると思われる。これらの傾向は涙液と唾液中に大きな差は認められなかったが、血清サンプルとは異なるものであった。また涙液中に分泌されている抗菌物質ラクtoferrin も病態に応じて分泌量が変動することを確認している。今後さらに「自己免疫マーカー」と成り得る涙液・唾液中の分子を検索し、病理診断あるいは予後診断に利用できる分子を追求する予定である。

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 4 件)

Akiko Yamada, Rieko Arakaki, Yasusei Kudo and Naozumi Ishimaru, Targeting IL-1 in Sjögren's syndrome., Expert Opinion on Therapeutic Targets, 査読有り、Vol.17, No.4, pp.393-401, 2013. doi:10.1517/14728222.2013.754427.

Ritsuko Oura, Rieko Arakaki, Akiko Yamada, Yasusei Kudo, Eiji Tanaka,

Yoshio Hayashi and Naozumi Ishimaru :
Induction of Rapid T Cell Death and Phagocytic Activity by Fas-Deficient Ipr Macrophages, *The Journal of Immunology*, 査読有り、 Vol.190, No.2, 578-585, 2013

doi: 10.4049/jimmunol.1103794

Takashi Izawa, Tomoyuki Kondo, Mie Kurosawa, Ritsuko Oura, Kazuma Matsumoto, Eiji Tanaka, Akiko Yamada, Rieko Arakaki, Yasusei Kudo, Yoshio Hayashi and Naozumi Ishimaru :
Fas-Independent T-Cell Apoptosis by Dendritic Cells Controls Autoimmune Arthritis in MRL/lpr Mice, *PLoS ONE*, 査読有り、 Vol.7, No.12, p.e48798, 2012.

doi: 10.1371/journal.pone.0048798.

Naozumi Ishimaru, Akiko Yamada, Takeshi Nitta, Rieko Arakaki, Martin Lipp, Yousuke Takahama and Yoshio Hayashi :
CCR7 with S1P1 signaling through AP-1 for migration of Foxp3+ regulatory T-cells controls autoimmune exocrinopathy, *The American Journal of Pathology*, 査読有り、 Vol.180, No.1, pp.199-208, 2012.

doi: 10.1016/j.ajpath.2011.09.027.

[学会発表](計 22 件)

新垣理恵子, Eye drop administration of rebamipide is effective to a dry eye symptom in a model mice of Sjogren's syndrome, 第 42 回日本免疫学会総会、2013 年 12 月 11 日~12 月 13 日、幕張メッセ(千葉県千葉市)

岩浅亮彦, Relationship between aromatase-related obesity and autoimmunity in Sjogren's syndrome, 第 42 回日本免疫学会総会、2013 年 12 月 11 日~12 月 13 日、幕張メッセ(千葉県千葉市)

黒澤実愛, A novel role of CXCR7 in controlling autoreactive T cells of a murine model for Sjogren's syndrome, 第 42 回日本免疫学会総会、2013 年 12 月 11 日~12 月 13 日、幕張メッセ(千葉県千葉市)

Yamada Koichi, in vivo effect of multi-wall carbon nanotubes on immune system, 6th International Symposium on Nanotechnology, Occupational and Environmental system, 2013 年 10 月 28 日~10 月 31 日名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

近藤智之, 自己免疫疾患モデルを用いた腫瘍免疫システムの解析、第 55 回日本歯科基礎医学会、2013 年 9 月 20 日~9 月 22 日、岡山コンベンションセンター、(岡山県岡山市)

Akiko Yamada, Deficient differentiation of Treg cells in a murine model of Sjogren's syndrome, 15th International

Congress of Immunology, 2013 年 8 月 22 日~8 月 27 日、Milano Congressi (Milan Italy)

岩浅亮彦, アロマターゼ遺伝子欠損マウスにおけるシェーグレン症候群要病変と肥満との関連、第 10 回四国免疫フォーラム、2013 年 6 月 22 日、徳島文理大学香川薬学部(香川県さぬき市)

新垣理恵子, シェーグレン症候群モデルを用いたレバミピド点眼薬によるドライアイの改善効果とその作用機序、第 102 回日本病理学会、2013 年 6 月 6 日~6 月 8 日、ロイトン札幌・さっぽろ芸文館(北海道札幌市)

山田安希子, シェーグレン症候群における制御性 T 細胞の機能解析、第 102 回日本病理学会、2013 年 6 月 6 日~6 月 8 日、ロイトン札幌・さっぽろ芸文館(北海道札幌市)

岩浅亮彦, アロマターゼ遺伝子欠損マウスにおける肥満とシェーグレン症候群病変との関連、第 102 回日本病理学会、2013 年 6 月 6 日~6 月 8 日、ロイトン札幌・さっぽろ芸文館(北海道札幌市)

新垣理恵子, An Effective Therapy of Ocular Lesions in a Murine Model for Sjogren's Syndrome by Eye Drop Administration of Rebamipide, 第 41 回日本免疫学会総会、2012 年 12 月 5 日~12 月 7 日、神戸ポートピアホテル(兵庫県神戸市)

岩浅亮彦, The dysfunction of the aromatase worsens the pathogenesis of Sjogren's syndrome, 第 41 回日本免疫学会総会、2012 年 12 月 5 日~12 月 7 日、神戸ポートピアホテル(兵庫県神戸市)

山田安希子, Functional defect of Foxp3+Treg cells in Sjogren's syndrome, 第 41 回日本免疫学会総会、2012 年 12 月 5 日~12 月 7 日、神戸ポートピアホテル(兵庫県神戸市)

新垣理恵子, エストロゲン欠乏に寄って増悪されるシェーグレン症候群病態への Th17 細胞の関与、第 54 回日本歯科基礎医学会総会、2012 年 9 月 7 日、奥羽大学(福島県郡山市)

山田安希子, シェーグレン症候群における制御性 T 細胞の役割、第 21 回日本シェーグレン症候群学会、2012 年 9 月 7 日、ウエスティン都京都ホテル(京都府京都市)

岩浅亮彦, シェーグレン症候群発症機序におけるアロマターゼの役割、第 31 回分子病理学研究会、2012 年 7 月 21 日、恵那峡グランドホテル(岐阜県岐阜市)

Yamada Akiko, Cathepsin L inhibition prevents murine autoimmune diabetes via suppression of CD8+T cell activity, 8th International Congress on Autoimmunity, 2012 年 5 月 9 日、Palacio de Exposiciones y Congresos de Granada

(Granada Spain)

Oura Ritsuko, Pathological Analysis of Autoimmunity in NF-B1KO/LPR mice, 8th International Congress on Autoimmunity, 2012年5月9日、Palacio de Exposiciones y Congresos de Granada (Granada Spain)

新垣理恵子、シェーグレン症候群モデルマウスを利用したレバミピド点眼投与による病態抑制機序の解明、第101回日本病理学会総会、2012年4月25日～4月27日、京王プラザホテル(東京都新宿区)

山田安希子、シェーグレン症候群における制御性T細胞の役割、第101回日本病理学会総会、2012年4月25日～4月27日、京王プラザホテル(東京都新宿区)

②1大浦律子、Fas分子を介したマクロファージによる末梢T細胞の維持機構、第101回日本病理学会総会、2012年4月25日～4月27日、京王プラザホテル(東京都新宿区)

②2石丸直澄、自己免疫疾患におけるCCR7を介した制御性T細胞のパトローリング機能、第101回日本病理学会総会、2012年4月25日～4月27日、京王プラザホテル(東京都新宿区)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新垣 理恵子 (ARAKAKI, Rieko)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・助教
研究者番号：00193061

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし