

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2017

課題番号：24689068

研究課題名(和文)多層オミックス解析に基づくシェーグレン症候群発症機序の解明

研究課題名(英文)Multi-omics analysis of induction mechanism of sjogren syndrome

研究代表者

山田 安希子(YAMADA, Akiko)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学系)・助教

研究者番号：70452646

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 19,500,000円

研究成果の概要(和文):シェーグレン症候群(SS)の発症機序は未だ明らかでない。本研究では制御性T細胞(Treg)を介したSSの発症機序を解析した。その結果、SSモデルマウス(SSモデル)では、エフェクター細胞に対するTregの割合がコントロールマウスに比べて低かった。また、Tregの増殖能、およびナイーブなT細胞からTregへの分化能もSSモデルで顕著な抑制が認められた。さらに、SSモデルのTregはIFN-gを著明に産生し、エフェクター細胞に類似したサイトカイン産生能を有することが明らかとなった。このようなTregの増殖能・分化能の異常や炎症性サイトカインを産生することがSSの発症に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文): Neonatal thymectomy in certain mouse strains is known to induce autoimmunity due to impaired functions of T cells, including Treg cells. The precise mechanism underlying the induction of autoimmunity by neonatal thymectomy remains unclear. We examined the functions of Treg cells by using a murine Sjogren syndrome model of NFS/sld mice that underwent neonatal thymectomy. The ratio of Treg cells to effector memory phenotype T cells in thymectomy mice was significantly lower than that of nonthymectomy mice. In addition, in vitro induction of peripherally induced Treg cells by TGF- β using naive T cells from Sjogren syndrome model mice was severely impaired. In addition, Treg cells in this Sjogren syndrome model exhibited an interferon- γ producing Th1-like phenotype that resembled effector T cells. In conclusion, these results suggest that abnormal expansion and differentiation of Treg cells and inflammatory cytokines produced by Treg cells contribute to the development of autoimmunity.

研究分野：免疫学、病理学

キーワード：自己免疫 シェーグレン症候群 制御性T細胞 多層オミックス解析

1. 研究開始当初の背景

免疫系は「自己」・「非自己」を識別するシステムであり、「自己」に対する免疫寛容を維持しつつ、「非自己」を排除する。免疫寛容が破綻すると、免疫細胞は自己組織を攻撃するようになり、自己免疫疾患の発症を誘起する。この発症に深く関与している免疫細胞画分の一つが、制御性 T 細胞 (Treg) である。Treg は、自己反応性 T 細胞を抑制的に制御する機能を有した細胞集団であり、この Treg の機能によって免疫寛容が維持されている。しかしながら、Treg に機能不全が生じると、免疫寛容の破綻を招き、様々な自己免疫疾患が発症する。そのため、自己免疫疾患に対して、Treg の機能を回復あるいは増強するという治療戦略は、非常に有効であると考えられている。この治療を実現するためには、まず「自己免疫疾患発症時の Treg で何が起きているのか？」という問題に対する分子レベルの解答を得ることが急務である。

2. 研究の目的

本研究では、自己免疫疾患の治療標的として最も有効であると考えられる Treg に焦点をあて、Treg の機能不全を介したシェーグレン症候群発症機序の解明を行い、Treg を対象とした新たな治療戦略の構築を目指す。

3. 研究の方法

トランスクリプトーム解析とプロテオーム解析による多層的なオミックス解析の実施により、Treg の機能不全を介したシェーグレン症候群発症機序について、分子レベルでの包括的な理解を行った。本研究では当教室で確立した SS モデルマウスを使用した。

(1) SS モデルの Treg の機能について詳細な解析を行った。

基本的な生化学的、分子生物学的解析に加え、共焦点顕微鏡解析やフローサイトメトリー解析による実験系を用いて Treg の機能解析を行った。In vitro で得られた結果については、in vivo で検証を行った。実験方法としては、SS モデルマウスあるいは健常マウスより単離した Treg を蛍光標識し、T 細胞を欠損した健常マウスに移入することで、in vivo における Treg の応答をフローサイトメトリーにてトレースした。

(2) SS モデルマウスと健常マウスの Treg について、マイクロアレイ解析を行った (トランスクリプトーム解析)。

マイクロアレイ法により、両 Treg 間における遺伝子発現の相違を網羅的に解析した。また、マイクロアレイ法で得られた結果については、リアルタイム PCR 解析によって検証した。

(3) SS モデルマウスと健常マウスの CD4 陽性 T 細胞について、定量的プロテオーム解析を実施した。

SS モデルと健常マウスの脾臓より CD4 陽性 T 細胞を分離し、TMT 標識を行った後、10 サ

プルを同時に測定し比較定量を行った。

4. 研究成果

まず、SS モデルマウスにおける Treg の数を調べたところ、SS モデルマウスの脾臓および頸部リンパ節の Treg 数は、健常マウスと比較して有意に少ないことが示された (Fig.1A)。さらにエフェクター細胞に対する Treg の割合についても SS モデルで

低かった。一方、炎症局所である唾液腺において Treg が実際に浸潤しているかどうかを確認したところ、エフェクター細胞とともに、Treg も浸潤していることが分かった (Fig.1B)。

次に Treg の機能について in vitro で解析を行った結果、SS モデルマウスの Treg はエフェクター細胞に対して、健常マウスと同様の抑制能を有することが明らかになった (Fig.2)。

さらに、Treg の増殖能について検討を行ったところ、SS モデルの Treg は健常マウスの Treg と比較して、著明に増殖能が抑制されていることが示された (Fig.3)。

また、Treg には胸腺で分化する nTreg のほかに、末梢で分化する iTreg も存在するため、iTreg についても細胞数を解析したところ、SS モデルでは有意に少ないことが分かった。さらに、in

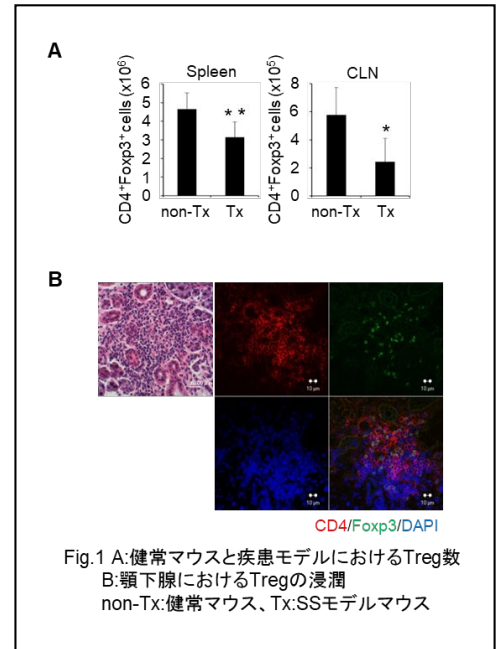


Fig.1 A: 健常マウスと疾患モデルにおける Treg 数
B: 顎下腺における Treg の浸潤
non-Tx: 健常マウス, Tx: SSモデルマウス

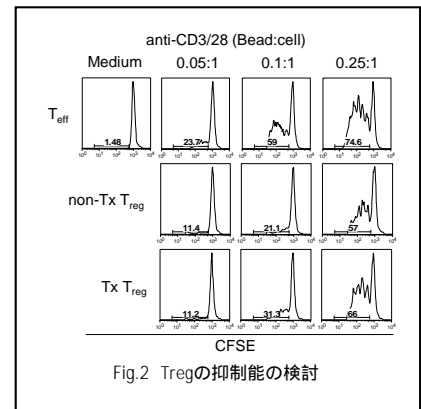


Fig.2 Tregの抑制能の検討

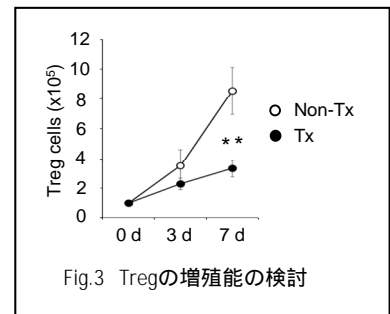


Fig.3 Tregの増殖能の検討

in vitro において、iTreg の分化能を調べた結果、SS モデルでは iTreg の分化能の顕著な抑制が認められた (Fig.4)。また、そのメカニズムとして、TGF β /Smad パスウェイが抑制されていることが示唆されることを明らかにした。

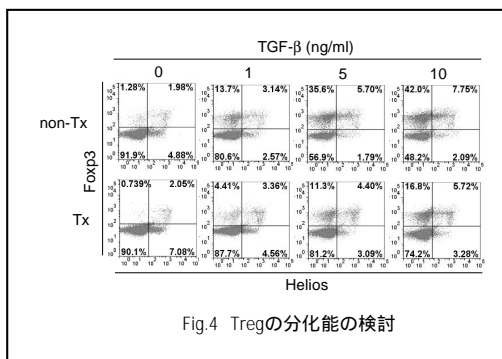


Fig.4 Tregの分化能の検討

Treg のサイトカイン産生能についても検討したところ、SS モデルの Treg は IFN γ を著明に産生し、エフェクター細胞に類似した性質を示すことが示された (Fig.5)。

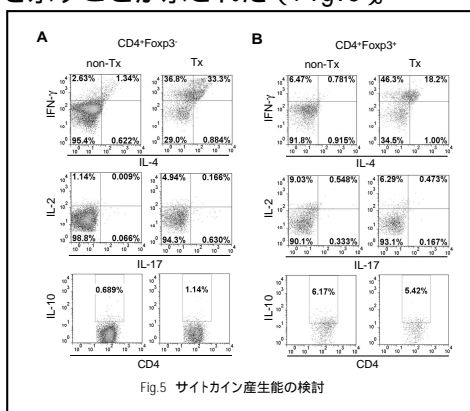


Fig.5 サイトカイン産生能の検討

したがって、SS モデルの Treg は、自身の増殖能および分化能が抑制されていることや、エフェクター細胞に類似したサイトカインを産生するといった性質を有しており、これらが、シェーグレン症候群の発症に関連していることが考えられる (Yamada et al, *Am J Pathol.* 2015 185(11):2886-2897)。

次に、SS モデルと健常マウスの CD4 陽性 T 細胞について、マイクロアレイ解析およびプロテオーム解析を実施した。これらの実験結果より、シェーグレン症候群の発症の誘起に関わることが予想される興味深い分子が明らかとなってきた。現在それらの標的分子について解析中である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 1 件)

- 1 Kurosawa M, Arakaki R, **Yamada A**, Tsunematsu T, Kudo Y, Sprent J, Ishimaru N. NF- B2 Controls Migratory Activity of Memory T Cells by Regulating Expression of CXCR4 in A Mouse Model of Sjögren's Syndrome. *Arthritis Rheumatol.* 2017(査読有)doi: 10.1002/art.40230

- 2 Ushio A, Arakaki R, Eguchi H, Hotta F, **Yamada A**, Kudo Y, Ishimaru N. Pathological Analysis of Ocular Lesions in a Murine Model of Sjögren's Syndrome. *Int J Mol Sci.* 2017 18(6): E1209 (査読有) doi: 10.3390/ijms18061209
- 3 Kujiraoka S, Tsunematsu T, Sato Y, Yoshida M, Ishikawa A, Tohyama R, Tanaka M, Kobayashi Y, Kondo T, Ushio A, Otsuka K, Kurosawa M, Saito M, **Yamada A**, Arakaki R, Nagai H, Nikai H, Takeuchi K, Nagao T, Miyamoto Y, Ishimaru N, Kudo Y. Establishment and characterization of a clear cell odontogenic carcinoma cell line with EWSR1-ATF1 fusion gene. *Oral Oncol.* 2017 (69):46-55 (査読有) doi: 10.1016/j.oraloncology.2017.04.003
- 4 **Yamada A**, Arakaki R, Saito M, Kudo Y, Ishimaru N. Dual Role of Fas/FasL-Mediated Signal in Peripheral Immune Tolerance. *Front Immunol.* 2017 5(8):403 (査読有) doi: 10.3389/fimmu.2017.00403
- 5 Yamamoto T, Ozono M, Watanabe A, **Yamada A**, The Functions of EMRE in Mitochondrial Calcium Uptake System, *Seikagaku*, 2017, 89(3), 453-457 (査読有) doi:10.14952/SEIKAGAKU.2017.890453
- 6 Saito M, Otsuka K, Ushio A, **Yamada A**, Arakaki R, Kudo Y, Ishimaru N. Unique Phenotypes and Functions of Follicular Helper T Cell and Regulatory T Cell in Sjögren's Syndrome. *Curr Rheumatol Rev.* 2017 (査読有) PMID:28124612
- 7 Yamamoto T, Yamagoshi R, Harada K, Kawano M, Minami N, Ido Y, Kuwahara K, Fujita A, Ozono M, Watanabe A, **Yamada A**, Terada H, Shinohara Y. Analysis of the structure and function of EMRE in a yeast expression system. *Biochim Biophys Acta.* 2016 1857(6):831-839 (査読有) doi: 10.1016/j.bbabi.2016.03.019
- 8 Tsunematsu T, Fujiwara N, Yoshida M, Takayama Y, Kujiraoka S, Qi G, Kitagawa M, Kondo T, **Yamada A**, Arakaki R, Miyauchi M, Ogawa I, Abiko Y, Nikawa H, Murakami S, Takata T, Ishimaru N, Kudo Y. Human odontogenic epithelial cells derived from epithelial rests of Malassez possess stem cell properties.

- Lab Invest* 2016 96(10):1063-1075 (査読有) doi: 10.1038/labinvest.2016.85
- 9 Yamada A, Arakaki R, Tsunematsu T, Yasusei K, Ishimaru N. A role of regulatory T cell in IBD. *World J Gastroenterol.* 2016 22(7):2195-2205(査読有) doi: 10.3748/wjg.v22.i7.2195
 - 10 Saito M, Arakaki R, Yamada A, Tsunematsu T, Kudo Y, Ishimaru N. Molecular mechanism of metal allergy. *Int J Mol Sci* 2016 17(2):E202 (査読有) doi: 10.3390/ijms17020202
 - 11 Kondo T, Tsunematsu T, Yamada A, Arakaki R, Saito M, Otsuka K, Kujiraoka S, Ushio A, Kurosawa M, Kudo Y, and Ishimaru N. Acceleration of tumor growth due to dysfunction in M1 macrophages and enhanced angiogenesis in an animal model of autoimmune disease. *Lab Invest* 2016 96(4):468-480 (査読有) doi: 10.1038/labinvest.2015.166
 - 12 Yamada A, Arakaki R, Tsunematsu T, Kudo Y, Hayashi Y, Ishimaru N. Impaired expansion of regulatory T cells in a neonatal thymectomy-induced autoimmune mouse model. *Am J Pathol.* 2015 185(11):2886-2897 (査読有) doi: 10.1016/j.ajpath.2015.07.007
 - 13 Tsunematsu T, Arakaki R, Yamada A, Ishimaru N, Kudo Y. The non-canonical role of Aurora-A in DNA replication. *Front in Oncol* 2015 (5):187 (査読有) doi: 10.3389/fonc.2015.00187.
 - 14 Iwasa A, Arakaki R, Honma N, Ushio A, Yamada A, Kondo T, Kurosawa E, Kujiraoka S, Tsunematsu T, Kudo Y, Tanaka E, Yoshimura N, Harada N, Hayashi Y, Ishimaru N. Aromatase controls Sjögren's syndrome-like lesions through monocyte chemotactic protein-1 in target organ and adipose tissue-associated macrophages. *Am J Pathol.* 2015 185(1):151-161. (査読有) doi: 10.1016/j.ajpath.2014.09.006
 - 15 Sugawara C, Takahashi A, Kawano F, Kudoh T, Yamada A, Ishimaru N, Hara K, Miyamoto Y. Neuroendocrine tumor in the mandible: a case report with imaging and histopathologic findings. *Oral Sug Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2015 119(1):e41-48.2014 (査読有) doi: 10.1016/j.oooo.2014.09.024
 - 16 Arakaki R, Yamada A, Kudo Y, Hayashi Y, Ishimaru N. Mechanism of activation-induced cell death of T cells and regulation of FasL expression. *Crit Rev Immunol.* 2014;34(4):301-314. (査読有) PMID:24941158
 - 17 Arakaki R, Eguchi H, Yamada A, Kudo Y, Iwasa A, Enkhmaa T, Hotta F, Mitamura-Aizawa S, Mitamura Y, Hayashi Y, Ishimaru N. Anti-inflammatory effects of rebamipide eyedrop administration on ocular lesions in a murine model of primary Sjögren's syndrome. *PLoS One.* 2014 9(5):e98390. (査読有) doi: 10.1371/journal.pone.0098390
 - 18 Ashrin MN, Arakaki R, Yamada A, Kondo T, Kurosawa M, Kudo Y, Watanabe M, Ichikawa T, Hayashi Y, Ishimaru N. A critical role for thymic stromal lymphopoietin in nickel-induced allergy in mice. *J Immunol.* 2014 192(9):4025-4031. (査読有) doi: 10.4049/jimmunol.1300276
 - 19 Yano K, Carter C, Yoshida N, Abe T, Yamada A, Nitta T, Ishimaru N, Takada K, Butcher GW, Takahama Y. Gimap3 and Gimap5 cooperate to maintain T-cell numbers in the mouse. *Eur J Immunol.* 2014 44(2):561-572. (査読有) doi: 10.1002/eji.201343750
 - 20 Yamada A, Arakaki R, Kudo Y, Ishimaru N. Targeting IL-1 in Sjögren's syndrome. *Expert Opin Ther Targets.* 2013 (4):393-401. (査読有) doi: 10.1517/14728222.2013.754427
 - 21 Oura R, Arakaki R, Yamada A, Kudo Y, Tanaka E, Hayashi Y, Ishimaru N. Induction of rapid T cell death and phagocytic activity by Fas-deficient lpr macrophages. *J Immunol.* 2013 190(2):578-585. (査読有) doi: 10.4049/jimmunol.1103794
- [学会発表](計40件)
1. 山田 安希子, 新垣 理恵子, 牛尾綾, 大塚邦紘, 黒澤 実愛, 工藤 保誠, 石丸 直澄, シェーグレン症候群における制御性T細胞の分化誘導メカニズムの解明, 第106回日本病理学会総会, 2017年
 2. Akiko Yamada, Rieko Arakaki, Aya Ushio, Takaaki Tsunematsu, Yasusei Kudo and Naozumi Ishimaru, Impaired Expansion of Regulatory T cells in a Murine model of Neonatal Thymectomy-induced Sjogrens Syndrome, 第45回日本免疫学会学術集会, 2016.
 3. Akiko Yamada, Aya Ushio, Rieko Arakaki, Yasusei Kudo and Naozumi Ishimaru, Impaired Expansion of Regulatory T cells in a Neonatal Thymectomy-induced Autoimmune Mouse Model, International Congress of Immunology, 2016
 4. 山田 安希子, 新垣 理恵子, 黒澤 実愛, 近藤 智之, 常松 貴明, 工藤 保誠, 林 良夫, 石丸 直澄, シェーグレン症候群の

発症における制御性 T 細胞の役割、日本病理学会会誌、2014

5. Akiko Yamada, Rieko Arakaki, Mie Kurosawa, Tomoyuki Kondo, Koichi Yamada, Yoshio Hayashi and Naozumi Ishimaru, Deficient differentiation of Treg cell in a murine model of Sjogren's syndrome, International Congress of Immunology, 2013.
6. 山田 安希子, 新垣 理恵子, 黒澤 実愛, 近藤 智之, 工藤 保誠, 石丸 直澄、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

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
徳島大学口腔分子病態学分野
http://www.tokushima-u.ac.jp/dent/research/sousei_kagaku/oral_medicine/illness_state/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 安希子 (YAMADA, Akiko)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教
研究者番号：70452646

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()