

令和元年6月7日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K11256

研究課題名(和文) 唾液を用いたシェーグレン症候群の診断および重症度分類法の確立

研究課題名(英文) Saliva as a potential tool for diagnosis and severity classification of dry mouth including Sjogren's syndrome.

研究代表者

大山 恵子(Ohyama, Keiko)

九州大学・大学病院・学術研究員

研究者番号：60740719

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：シェーグレン症候群(以下SS)は唾液腺や涙腺などの外分泌腺が特異的に障害を受ける臓器特異的自己免疫疾患であり、ドライマウスやドライアイを主症状とする。その診断方法に関しては複雑かつ侵襲性の高い検査も含まれるため、簡便かつ繰り返し行える検査法が必要である。そこで採取しやすく、何度も採取できる唾液に着目し、その成分を分析する事でSSの診断やその重症度分類を行うことを目標として研究を行った。

まずSS患者の唾液線組織を分析したところ、自己免疫疾患に関与する炎症性物質を誘発するTLR8というタンパクの有意な発現を認め、SSの発症に関与していることが示唆された。現在唾液中の発現に関しても研究中である。

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の診断方法に関しては専門機関でしかできない画像検査や口唇腺生検といった侵襲性の高い検査も含まれるため、簡便かつ繰り返し行える検査法が必要である。そこで採取しやすく、何度も採取できる唾液に着目し、その成分を分析する事で診断やその重症度分類を行うことを目標として研究を行った。

まずSS患者の唾液線組織を分析したところ、自己免疫疾患に関与する炎症性物質を誘発するTLR8というタンパクの有意な発現を認め、SSの発症に関与していることが示唆された。現在唾液中の発現に関しても研究中である。

研究成果の概要(英文)：Sjogren's syndrome (SS) is an organ-specific autoimmune disease in which the exocrine glands such as salivary glands and lacrimal glands are specifically damaged, and is mainly caused by dry mouth and dry eye. With regard to the diagnostic method, a complicated and highly invasive test is also included, so a simple and repeatable test method is required. Therefore, we focused on saliva that can be collected easily and collected many times, and conducted research with the goal of diagnosing SS and classifying its severity by analyzing its components.

First, analysis of the salivary gland tissue of SS patients showed significant expression of a protein called TLR8, which is involved in autoimmune diseases and induces inflammatory substances, and was suggested to be involved in the onset of SS. We are currently studying the expression in saliva.

研究分野：口腔免疫

キーワード：シェーグレン症候群 ドライマウス 唾液

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

シェーグレン症候群 (SS) は外分泌腺が特異的に障害される臓器特異的自己免疫疾患であり、ドライアイ・ドライマウスを主症状とする。病理組織学的には、導管周囲性の CD4 陽性ヘルパー T (Th) 細胞を主体としたリンパ球の浸潤とを特徴とする。SS 患者のほとんどが高齢の女性に発症し、その発症要因としては、加齢 (エストロゲンの枯渇) やウイルス感染 (EBV や HTLV-1) など諸説あるが、いまだ明らかにされていない。我々のこれまでの研究では、唾液腺に浸潤する Th 細胞に注目し、SS の発症・維持には Th1 や Th17 が、病態進展には Th2 や濾胞性 T 細胞 (Tfh) が関与していることを報告してきた (図 1)。

また、非侵襲的で繰り返し実施可能な SS の新しい診断と病態解析方法の試みとして、患者の唾液中のサイトカイン・ケモカイン濃度について検討した結果、唾液中のサイトカインの検索は、SS の診断に応用できる可能性が考えられ、さらに経時的に唾液を採取することにより、繰り返し行うことが困難な口唇腺生検に代わって、SS の病態把握にも有用であることが考えられた (図 2, 3)。

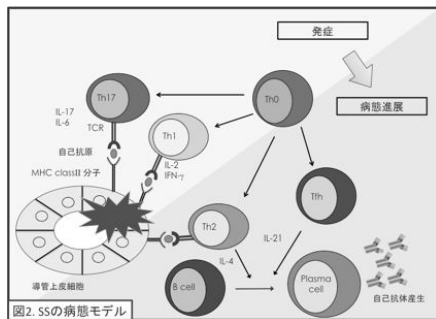


図 1. SS における疾患特異的 Th サブセット

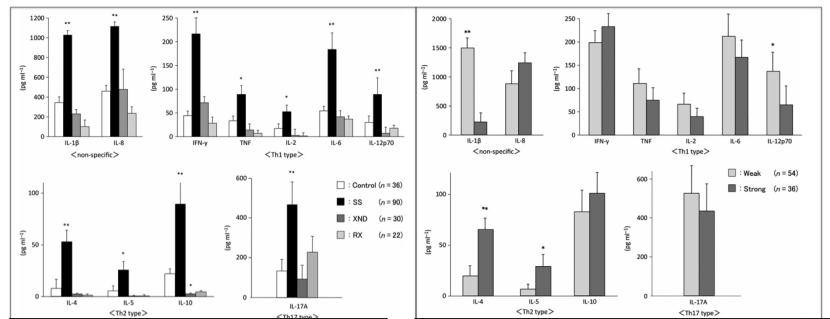


図 2. 唾液中のサイトカイン濃度 (患者別)

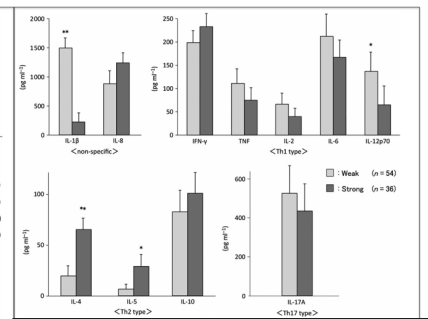


図 3. 唾液中のサイトカイン濃度 (SS のリンパ球浸

### 2. 研究の目的

近年、病原体認識センサーである Toll 様受容体 (TLR) が微生物由来の成分のみでなく内在性の分子も認識することが明らかとなり、Th 細胞などの獲得免疫だけではなく、自然免疫も自己免疫疾患の病態形成に寄与していることが報告されている。そこで本研究では、SS の発症や病態形成に関わる TLR 関連分子を網羅的に解析し、その発現細胞や機能に関して免疫学的検討を行い、最終的には SS の新しい診断方法の確立および重症度分類への応用することを目的とした。

### 3. 研究の方法

1) SS 患者の口唇腺を用いた病態発症に関与する分子の検索

(DNA マイクロアレイ法 Validation)

2) SS 患者の唾液中のサイトカインおよび 1) で検索した疾患関連分子の濃度の検索

(BDTM Cytometric Beads Array (CBA) flex system (Flow cytometry 法))

3) 唾液中濃度と SS の臨床所見 (唾液量、VAS、画像所見、血清学的所見など) との相関の有無

(診断および重症度への応用可能かの検証)

4) SS の治療 (免疫抑制剤) 前後における唾液中濃度の経時的変化

(BDTM CBA flex system (Flow cytometry 法) + ELISA 法)

5) 唾液中濃度と SS の臨床所見の経時的変化との相関の有無

(治療評価への応用可能かの検証)

#### 4. 研究成果

SS 患者および健常者のそれぞれ女性 3 例の口唇腺を用いた DNA マイクロアレイを行った結果、SS と健常者の 2 群間では明らかに発現の異なる遺伝子が多数存在しており、TLR 関連分子に着目すると、TLR1、TLR7、TLR8、TLR9、MyD88、IRF1、および IRF7 が有意な発現上昇を認めた。さらに症例数を増やして Validation を行った結果、TLR8 のみ mRNA 発現

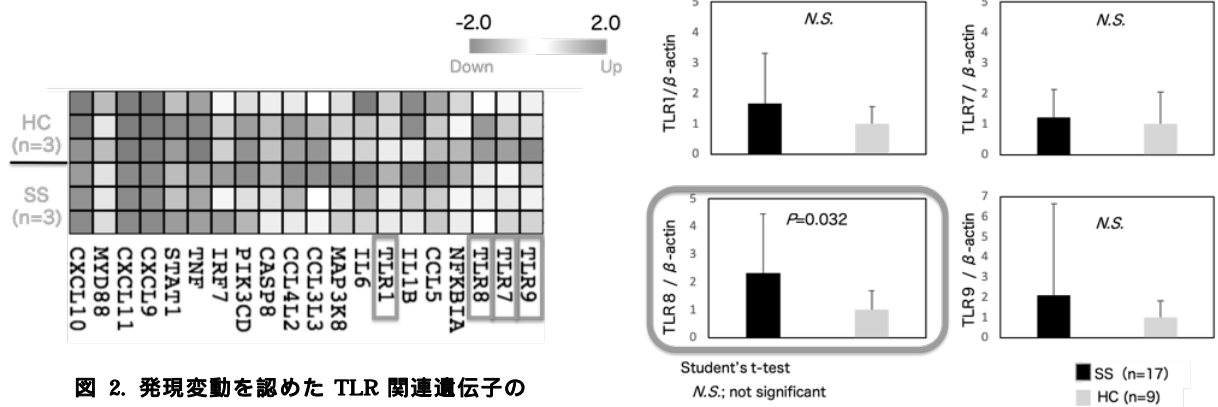


図 2. 発現変動を認めた TLR 関連遺伝子の

が有意に亢進していた ( $P < 0.05$ )。

図 3. Validation (real time PCR)

一般的に、TLR8 は樹状細胞や単球/マクロファージ、B 細胞に発現し、ウイルスや自己の RNA を認識して自然免疫に寄与し、自己免疫疾患の病態にも関与することが知られている。

そこで、これらの発現候補細胞マーカー (樹状細胞: CD123、CD11c、単球/マクロファージ: CD68、B 細胞: CD20) で蛍光二重免疫染色を行い、各細胞の TLR8 陽性率を半定量的に解析したところ、SS の口唇腺における主な TLR8 発現細胞は単球/マクロファージであった。

そこで、これらの発現候補細胞マーカー (樹状細胞: CD123、CD11c、単球/マクロファージ: CD68、B 細胞: CD20) で蛍光二重免疫染色を行い、各細胞の TLR8 陽性率を半定量的に解析したところ、SS の口唇腺における主な TLR8 発現細胞は単球/マクロファージであった。

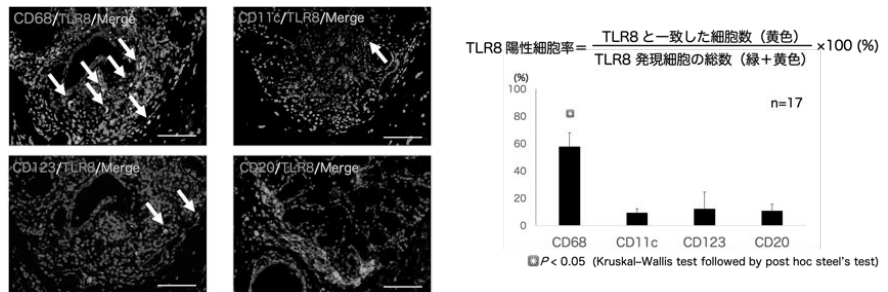


図 4. SS における TLR8 および TLR8 発現細胞の局在

さらに、TLR8<sup>+</sup> 単球/マクロファージの機能解析を目的に、ヒト単球細胞株 (U-937) に TLR8 を過剰発現もしくはノックアウトさせ、TLR8 アゴニスト (R848) で刺激実験を行った (図 5)。その結果、TLR8 アゴニスト刺激により、TLR8 シグナルを介して、TLR8<sup>+</sup> 単球/マクロファージは TNF- $\alpha$  の産生が亢進することが示唆された。なお TNF- $\alpha$  は、TLR8 シグナルを介して全身性関節炎の発症に関与すること、Th1 誘導型の炎症を引き起こすこと、また SS において唾液腺のアポトーシスに関与していることが知られている (図 6)。

【材料】ヒト単球株 (U-937)

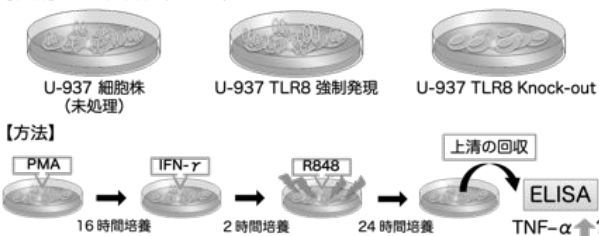


図 5. ヒト単球株を用いた R848 刺

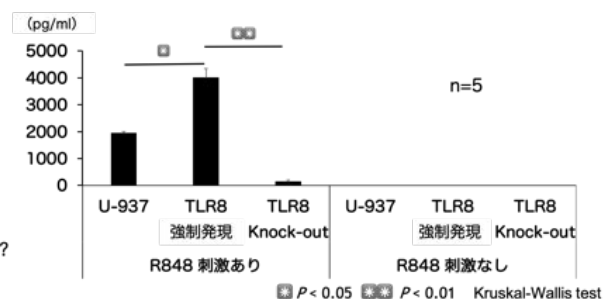


図 6. R848 刺激による TNF-

SSの発症要因とされるウイルス感染や慢性炎症（による蓄積した自己のRNA）はTLR8が認識すること、最近の研究ではTLR8がX染色体に優位なことから、TLR8はSSの発症に与ることが推察される。本研究の結果から、唾液腺に浸潤しているTLR8を発現する単球/マクロファージがTLR8刺激を介してTNF- $\alpha$ を産生して、Th1誘導型炎症

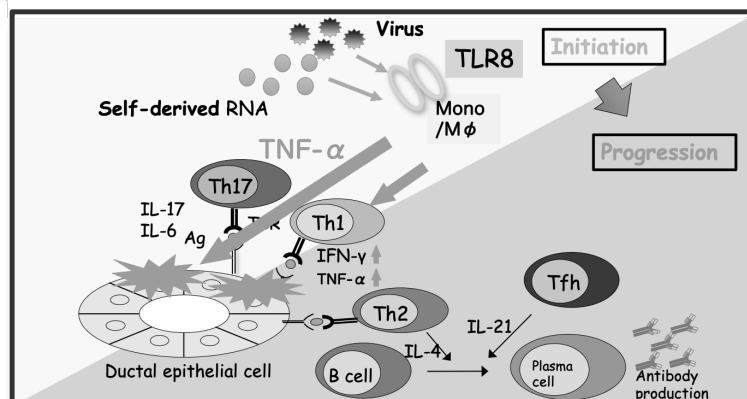


図7. SS疾患モデル：発症におけるTLR8陽性単球/マクロファージの関与

を引き起こし、唾液腺の破壊やアポトーシスを促進させることが示唆された（図7）。今後は、TLR8トランスジェニックマウス（東京大学医科学研究所との共同研究）を用いてTLR8を介したSSの発症機序の解明し、SSの新規診断マーカーとしてTLR8の有用性の検証（特に患者唾液に着目して）を行う予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

(1) 『Saliva as a potential tool for diagnosis of dry mouth including Sjögren's syndrome.』  
Ohyama K, Moriyama M (correspondence), Hayashida JN, Tanaka A, Maehara T, Ieda S, Furukawa S, Ohta M, Imabayashi Y, and Nakamura S. Oral Dis 21(2):224-31, doi: 10.1111/odi.12252.  
 2015 **Impact Factor (IF): 2.404**

(2) 『The diagnostic utility of submandibular gland sonography and labial salivary gland biopsy in IgG4-related dacryoadenitis and sialadenitis: its potential application to the diagnostic criteria.』 Mizuki Sakamoto, Masafumi Moriyama, Mayumi Shimizu, Akira Chinju, Keita Mochizuki, Ryusuke Munemura, Keiko Ohyama, Takashi Maehara, Kenichi Ogata, Miho Ohta, Masaki Yamauchi, Noriko Ishiguro, Mayu Matsumura, Yukiko Ohyama, Tamostu Kiyoshima, Seiji Nakamura (*Modern Rheumatology* January 7; 2019)

〔学会発表〕(計 8 件)

(1) 第11回 IgG4研究会 (2018/3/10 in 松本)

『IgG4関連疾患患者の口唇腺組織における臨床病態学的検討』

坂本 瑞樹、森山 雅文、大山 恵子、田中 昭彦、前原 隆、緒方 謙一、古川 祥子、太田 美穂、山内 昌樹、石黒 乃理子、Haque A. S. M. Rafiul、松村 万由、鎮守 晃、望月 敬太、林田 淳之介、中村 誠司

(2) 第14回国際シェーグレン症候群学会 (2018/4/18~21 in Washinton)

『DNA microarray analysis of labial salivary gland in Sjögren's syndrome indicates a role for innate immune responses in its pathogenesis via Toll like receptor 8,』

Mizuki Sakamoto, Masafumi Moriyama, Keiko Oyama, Akihiko Tanaka, Takashi Maehara, Sachiko Furukawa, Miho Ohta, Masaki Yamauchi, Noriko Ishiguro, Miho Ohta, Masaki Yamauchi, Haque A. S. M. Rafiul, Akira Chinju, Keita Mochizuki, Ryusuke Munemura Jun-Nosuke Hayashida, and Seiji Nakamura.

(3) The 59th Congress of Korean Association of Oral & Maxillofacial Surgeons (2018/4/26 ~28 in Seoul)

Best award on International Youth Session Presentation 受賞

『Involvement of innate immune responses in the pathogenesis of Sjögren ' s syndrome via Toll like receptor 8』

Mizuki SAKAMOTO, Masafumi MORIYAMA, Keiko OYAMA, Akihiko TANAKA, Takashi MAEHARA, Kenichi OGATA, Sachiko FURUKAWA, Miho OHTA, Masaki YAMAUCHI, Noriko ISHIGURO, Haque A. S. M. RAFIUL, Akira CHINJU, Keita MOCHIZUKI, Mayu MATSUMURA, Ryusuke MUNEMURA, Jun-Nosuke HAYASHIDA, and Seiji NAKAMURA

(4) 第 15 回日本口腔ケア学会総会・学術大会 (2018/4/28 - 29 in 福岡)

『M3 型ムスカリン受容体アゴニストの投与による唾液分泌機能の長期経時的変化についての検討』

坂本瑞樹、森山雅文、林田淳之介、大山恵子、田中昭彦、前原隆、緒方 謙一、山内昌樹、石黒乃理子、松村万由、鎮守晃、望月敬太、宗村龍祐、中村誠司

(5) 第 72 回口腔科学会学術集会 (2018/5/11-13 in 名古屋)

優秀ポスター賞 受賞

『シェーグレン症候群の病態形成における Toll 様受容体を介した自然免疫の関与』

坂本 瑞樹、森山 雅文、大山 恵子、田中 昭彦、前原 隆、緒方 謙一、古川 祥子、太田 美穂、山内 昌樹、石黒 乃理子、Haque A. S. M. Rafiul、鎮守 晃、望月 敬太、松村 万由、宗村 龍祐、林田 淳之將、中村 誠司

(6) 第 11 回 IgG4 研究会

優秀演題賞 受賞

『IgG4 関連涙腺・唾液腺炎の診断における口唇腺生検および超音波検査の有用性』

坂本 瑞樹、森山 雅文、清水 真弓、鎮守 晃、望月 敬太、宗村 龍祐、大山 恵子、前原 隆、緒方 謙一、太田 美穂、山内 昌樹、石黒 乃理子、松村 万由、中村 誠司

(7) The 60th Congress of Korean Association of Oral & Maxillofacial Surgeons

『CD68+ monocyte/macrophage via TLR8/TNF- signaling contributes to the pathogenesis of Sjögren ' s syndrome』

Mizuki SAKAMOTO, Masafumi MORIYAMA, Keiko OYAMA, Takashi MAEHARA, Kenichi OGATA, Miho OHTA, Noriko ISHIGURO, Haque A. S. M. RAFIUL, Akira CHINJU, Keita MOCHIZUKI, Mayu MATSUMURA, Ryusuke MUNEMURA, and Seiji NAKAMURA

(8) 第 73 回 口腔科学会学術集会

『M3型ムスカリン受容体アゴニストの長期投与による唾液分泌量の経時的変化と治療効果に関わる因子についての検討』

坂本瑞樹、森山雅文、林田淳之介、大山恵子、前原隆、緒方謙一、石黒乃理子、松村万由、鎮守晃、望月敬太、宗村龍祐、太田美穂、中村誠司

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：森山 雅文  
ローマ字氏名：Moriyama Masafumi  
所属研究機関名：九州大学  
部局名：歯学研究院  
職名：助教  
研究者番号(8桁)：20452774

研究分担者氏名：中村 誠司  
ローマ字氏名：Nakamura Seiji  
所属研究機関名：九州大学  
部局名：歯学研究院  
職名：教授  
研究者番号(8桁)：60189040

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：  
ローマ字氏名：

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、研究者個人に帰属されます。