

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 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：2015～2016

課題番号：15K15676

研究課題名(和文) エストロゲン関連分子を用いたシェーグレン症候群の特異的診断法の開発

研究課題名(英文) Development of diagnostic techniques specific for Sjogren's syndrome by estrogen-related molecules

研究代表者

石丸 直澄 (ISHIMARU, Naozumi)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学系)・教授

研究者番号：60314879

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：シェーグレン症候群(SS)をはじめとした自己免疫疾患の多くは閉経期以降の女性に発症することが知られており、エストロゲンが免疫システムに重大な影響を及ぼしているものと考えられている。本研究では、SSの病態発症に重要なエストロゲン関連因子を応用して、SSの新たな診断法の開発を目指すことを目標としている。エストロゲン関連分子の一つとしてRbAp48がSSの病理診断のマーカーになる可能性が示された。さらに、IGFBP5、CXCL10がエストロゲン関連因子として、SS患者の血清、唾液を用いて診断の指標になる可能性が考えられ、新たな自己免疫疾患の診断に有用であることが分かった。

研究成果の概要(英文)：It is well known that many autoimmune diseases including SS occur during postmenopausal stage in female, suggesting that estrogens largely influence immune system. The aim of this study is developing diagnostic techniques for SS by applying estrogen-related molecules which play key roles in the onset or development of SS. Retinoblastoma-associated protein 48 (RbAp48) was a key marker for pathological diagnosis of SS using histological specimens of SS patients. In addition, it is possible that insulin-growth factor-binding protein 5 (IGFBP5) and CXCL10 are also crucial molecules as estrogen-related molecules for diagnosis using sera and saliva of SS patients. Our results in this study will be linked with development of new diagnostic techniques for autoimmune diseases.

研究分野：病理学

キーワード：自己免疫疾患 シェーグレン症候群 エストロゲン 性ホルモン 診断

## 1. 研究開始当初の背景

シェーグレン症候群は日本では約 30 万人の患者が報告されている (2012 年厚労省)。さらに、ドライマウス、ドライアイを呈する非シェーグレン症候群患者を合わせると 100 万人を越えることも知られている。現在の日本の診断基準では、正しく診断できない症例が数多く存在している。また、平成 26 年度より指定難病に指定され、今後より効果的で精度の高い診断が要求されている。

唾液腺や涙腺などの外分泌腺を標的とするシェーグレン症候群では、90%以上が閉経期以降の女性に発症することが報告されており、エストロゲンなどの女性ホルモンが自己免疫疾患の発症に影響を及ぼしていることが知られているが、その詳細な機序は明らかにされていなかった。申請者はこれまでに、シェーグレン症候群 (Sjogren's syndrome: SS) のモデルマウスを確立し、その発症メカニズムの解析を多角的に行ってきた。さらに、エストロゲンを起点としてシェーグレン症候群の発症が制御されていることを明らかにしてきた。本研究では、エストロゲン関連因子を用いたシェーグレン症候群の精度の高い新規の診断法の開発を目指している。

## 2. 研究の目的

シェーグレン症候群 (SS) をはじめとした自己免疫疾患の多くは閉経期以降の女性に発症することが知られており、エストロゲンが免疫システムに重大な影響を及ぼしているものと考えられている。本研究では、申請者がすでに同定している SS の病態発症に重要なエストロゲン関連因子を応用して、SS の新たな診断法の開発を目指すことを目標としている。新たな病理組織検査あるいは臨床検査法の開発として、小唾液腺や血液に加え、脂肪組織、涙液あるいは唾液

におけるエストロゲン関連分子の検出による診断法の確立を目指す。疾患モデルや患者サンプルなどを効果的に使い、最新の研究手法を導入して、本研究を推進する予定である。ドライマウス・ドライアイに苦しむ多くの患者にとって、極めて有益な研究である。

## 3. 研究の方法

エストロゲンによって制御される複数の分子を用いて本研究を展開する。(1) シェーグレン症候群 (Sjogren's syndrome: SS) の新たな病理組織診断法の開発、(2) SS 疾患モデルを用いた血中ホルモン動態の解析、(3) 血中あるいは唾液中の分子を用いた SS の新たな臨床検査法の開発、(4) 新たな病理組織診断法及び血中・唾液中エストロゲン関連因子を用いた臨床検査法の確立を目指した研究計画である。疾患モデルおよび患者検体を用いて、病理学的手法あるいは生化学的手法に加え、最新のイメージング技術や分子生物学的な手法により、多角的なアプローチから本研究を進める予定である。最終的に臨床の現場において、精度の高い新たな診断法を開発することによって、SS 及びドライマウス・ドライアイを呈する疾患の治療方針を容易にすることが可能である。

## 4. 研究成果

SS の新たな診断法を確立するために、すでに当研究室で同定されている Retinoblastoma-associated protein (RbAp)48 を用いた病理組織診断の検討を実施した。その結果、閉経期以降の女性患者の中で、28.5% (8 名 / 28 名中) が生検小唾液腺組織の導管細胞に陽性所見を得る事ができた。その結果は文献で一部を報告しているが、今後さらに症例数を増やし、診断マーカーとしての有用性を確立する予

定である（論文準備中）

ホルモン関連分子の探索として、妊娠期のマウス胸腺を用いた遺伝子の網羅的解析により、insulin-growth factor-binding protein 5 (IGFBP5)を同定した（文献 ）。IGFBP5は胸腺組織のマクロファージに強く発現していることが判明した。IGFBP5はエストロゲンによって発現が制御され、血中にも検出が可能である。SSをはじめとした自己免疫疾患との関連性は今後探索を進める予定である。

SSの疾患モデルの一つであるアロマターゼ遺伝子ノックアウトマウスを用いた実験から、唾液腺細胞からMCP-1が強く分泌されることによって、標的臓器へのマクロファージ集簇の亢進が明らかになった。そこで、エストロゲンに関連するマクロファージが自己免疫疾患の発症に関与していることを報告した（文献 ）。

患者血清、唾液を用いた診断法の確立に関しては、唾液中タンパク質のケモカイン類を網羅的に検討した結果、SS患者ではCXCL10の高い発現が確認され、現在、SS患者における血中でのエストロゲンの変動とCXCL10の発現の相関性を検討している。

#### 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23件）

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(1209):1-13（査読有）

Kujiraoka S, Tsunematsu T, Sato Y, Yoshida M, 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）

Yamada K, Arakaki R, Yamada A, Kudo Y, Ishimaru N. Genetic and phenotypic changes of thymus tissue in mice during pregnancy. *J Oral Health Biosci*. 2017 in press（査読有）

Saito M, Otuska 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 in press（査読有）

Ushio A, Arakaki R, Yamada A, Saito M, Tsunematsu T, Kudo Y, Ishimaru N. Crucial roles of macrophages in the pathogenesis of autoimmune disease. *World J Immunol*. 2017 7(1):1-7（査読有）

Qi G, Liu J, Mi S, Tsunematsu T, Jin S, Shao W, Liu T, Ishimaru N, Tang T, Kudo Y. Aurora kinase inhibitors in head and neck cancer. *Curr Top Med Chem*. 2017 in press（査読有）

Yamada A, Arakaki R, Saito M, Kudo Y, Ishimaru N. Dual role of Fas/FasL-mediated signal in peripheral immune tolerance. *Front in Immunol*. 2017 8 (403) 1-10（査読有）

石丸直澄 環境因子と免疫トレランスの破綻 *臨床免疫・アレルギー科* 67 : 360-365, 2017（査読無し）

Izawa T, Arakaki R, Mori H, Tsunematsu T, Kudo Y, Tanaka E, Ishimaru N. The nuclear receptor AhR controls bone homeostasis by regulating osteoclast differentiation via the RANKL/c-Fos signaling axis. *J Immunol* 2016 197(12):4639-4650（査読有）

- Kudo Y, Tada H, Fujiwara N, Tada Y, Tsunematsu T, Miyake Y, Ishimaru N. Oral environment and cancer. *Genes Environ* 2016 38:13 (査読有)
- 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, Murakani 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)
- Qi G, Kudo Y, Tang B, Liu T, Jin S, Liu J, Zuo X, Mi S, Shao W, Ma X, Tsunematsu T, Ishimaru N, Zeng S, Tatsuka M, Shimamoto F. PARP6 acts as a tumor suppressor via downregulating Survivin expression in colorectal cancer. *Oncotarget*. 2016 7(14):18812-18824 (査読有)
- Sugawara C, Takahashi A, Kawano F, Kudo Y, Ishimaru N, Miyamoto Y. Intraoral ultrasonography of tongue mass lesions. *Dentomaxillofac Radiol*. 2016 45(5):20150362 (査読有)
- Yamada A, Arakaki R, Tsunematsu T, Kudo Y, Ishimaru N. Role of regulatory T cell in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2016 22(7):2195-2205(査読有)
- Saito M, Arakaki R, Yamada A, Tsunematsu T, Kudo Y, Ishimaru N. Molecular mechanisms of nickel allergy. *Int J Mol Sci*. 2016 17(2): e202 (査読有)
- Kondo T, Tsunematsu T, Yamada A, Arakaki R, Saito M, Otsuka K, Kujiraoka S, Ushio A, Kurosawa M, Kudo Y, Ishimaru N. Acceleration of tumor growth due to dysfunction in M $\phi$  macrophages and enhanced angiogenesis in an animal model of autoimmune disease. *Lab Invest* 2016 96(4):468-480 (査読有)
- 石丸直澄 ナノマテリアルと免疫システム 医学の歩み 259 : 241-246, 2016 (査読無)
- Tsunematsu T, Arakaki R, Yamada A, Ishimaru N, Kudo Y. The non-canonical role of Aurora-A in DNA replication. *Front Oncol* 2015 96(4):468-480 (査読有)
- Yamada A, Ushio 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)
- Yamano T, Nedjic J, Hinteberger M, Koser S, Pinto S, Gerdes N, Lutgens E, Ishimaru N, Busslinger M, Brors B, Kyewski B, Klein L. Intrathymic B cell licensing for Aire expression and T cell tolerance induction. *Immunity* 2015 42(6):1048-1061. (査読有)
- ⑳ Sano T, Iwashita M, Nagayasu S, Yamashita A, Shinjo T, Hashikata A, Asano T, Kushiyama A, Ishimaru N, Takahama Y, Nishimura F. Protection from diet-induced obesity and insulin resistance in mice lacking CCL19-CCR7 signaling. *Obesity* 2015 23(7):1460-1471. (査読有)
- ㉑ Shikama Y, Kudo Y, Ishimaru N, Funaki M. Possible involvement of palmitate in pathogenesis of periodontitis. *J Cell Physiol*. 2015 230: 2981-2989. (査読有)
- ㉒ Islam MN, Itoh S, Yanagita T, Sumiyoshi K, Hayano S, Kuremoto KI, Kurosaka H, Honjo T, Kawanabe N, Kamioka H, Sakai T, Ishimaru N, Taniuchi I, Yamashiro T. Runx/Cbfb signaling regulates postnatal

development of granular convoluted tubule in the mouse submandibular gland. Dev Dyn. 2015 244(3):488-496. (査読有)

[学会発表](計 20 件)

Masako Saito, Kunihiro Otsuka, Rieko Arakaki, Koichi Yamada, Naozumi Ishimaru Toxicological effect of peritoneal exposure to multi-walled carbon nanotubes on immune system. 第 45 回日本免疫学会総会 2016 年 12 月 6 日 沖縄コンベンションセンター(沖縄県・宜野湾市)

Kunihiro Otsuka, Masako Saito, Mie Kurosawa, Aya Ushio, Akiko Yamada, Rieko Arakaki, Yasusei Kudo, Naozumi Ishimaru. Analysis of follicular helper T cells in a mouse model for Sjögren's syndrome. 第 45 回日本免疫学会総会 2016 年 12 月 6 日 沖縄コンベンションセンター(沖縄県・宜野湾市)

Yamada Koichi, Arakaki Rieko, Ushio Aya, Kurosawa Emi, Otsuka Kunihiro, Saito Masako, Tsunematsu Takaaki, Yamada Akiko, Kudo Yasusei, Ishimaru Naozumi Immunological and toxicological effect of multi-wall carbon nanotubes by whole body inhalation exposure in B6 mice. 第 45 回日本免疫学会総会 2016 年 12 月 6 日 沖縄コンベンションセンター(沖縄県・宜野湾市)

Aya Ushio, Rieko Arakaki, Masako Saito, Akiko Yamada, Kunihiro Otsuka, Mie Kurosawa, Satoko Kujiraoka, Yasusei Kudo, and Naozumi Ishimaru Analysis of macrophages in the pathogenesis of a murine model for Sjögren's syndrome. 第 45 回日本免疫学会総会 2016 年 12 月 6 日 沖縄コンベンションセンター(沖縄県・宜野湾市)

梅田 将旭, 常松 貴明, 齋藤雅子, 山田 安希子, 新垣 理恵子, 工藤 保

誠, 石丸 直澄 : 口腔扁平上皮癌における Periostin スプライシングバリエーションの新たな役割, 第 27 回日本臨床口腔病理学会総会・学術大会, 2016 年 8 月 12 日 広島大学(広島県・広島市) 鯨岡 聡子, 工藤 保誠, 常松 貴明, 近藤 智之, 牛尾 綾, 大塚 邦紘, 山田 安希子, 新垣 理恵子, 石丸 直澄 : 顎骨中心性明細胞性腫瘍からの細胞株の樹立とその性状, 第 105 回日本病理学会総会, Vol.105, No.1, 2016 年 5 月 13 日 仙台国際センター(宮城県・仙台市)

常松 貴明, 工藤 保誠, 山田 安希子, 新垣 理恵子, 小川 博久, 上原 久典, 石丸 直澄, 常山 幸一 : 染色体パッセンジャー複合体タンパク質 Borealin のユビキチン分解の意義とその癌化への関与, 日本病理学会会誌, Vol.105, No.1, 548 頁, 2016 年 5 月 13 日 仙台国際センター(宮城県・仙台市)

新垣 理恵子, 常松 貴明, 山田 安希子, 齋藤 雅子, 工藤 保誠, 石丸 直澄 : 全身吸入暴露による多層化カーボンナノチューブの免疫システムへの影響, 第 105 回日本病理学会総会, Vol.105, No.1, 2016 年 5 月 12 日 仙台国際センター(宮城県・仙台市)

牛尾 綾, 齋藤 雅子, 山田 安希子, 大塚 邦紘, 黒澤 実愛, 鯨岡 聡子, 工藤 保誠, 石丸 直澄 : シェーグレン症候群モデルマウスの病態形成におけるマクロファージの役割, 第 105 回日本病理学会総会, Vol.105, No.1, 2016 年 5 月 12 日 仙台国際センター(宮城県・仙台市)

山ノ井 朋子, 青田 桂子, 高野 栄之, 可児 耕一, 松本 文博, 桃田 幸弘, 高瀬 奈緒, 宮本 由貴, 石丸 直

澄, 東 雅之 : シェーグレン症候群患者におけるセファランチンの作用機序の解明, 第70回日本口腔科学会学術集会, 2016年4月16日 福岡国際会議場 (福岡県・福岡市)

青田 桂子, 山ノ井 朋子, 可児 耕一, 高野 栄之, 桃田 幸弘, 松本文博, 石丸 直澄, 東 雅之 : Sjögren症候群唾液腺における IP-10 の発現制御機構, 第70回日本口腔科学会学術集会, 2016年4月16日 福岡国際会議場 (福岡県・福岡市)

Arakaki R, Kurosawa M, Otsuka K, Yamada A, Saito M, Tsunematsu T, Kudo Y, Ishimaru N. Analysis of function of macrophages in murine models of Sjögren's syndrome. 第44回日本免疫学会学術集会 2015年12月19日 札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市)

Saito M, Arakaki R, Otsuka K, Yamada K, Kudo Y, Ishimaru N. Biological effect of multi-walled carbon nanotubes on immune system. 第44回日本免疫学会学術集会 2015年12月18日 札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市)

Kurosawa M, Yamada A, Arakaki R, Saito M, Tsunematsu T, Kudo Y, Ishimaru N. Migratory activity of memory T cells in *aly/aly* mice. 第44回日本免疫学会学術集会 2015年12月18日 札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市) Ishimaru N. Molecular Pathogenesis of Autoimmunity~Sjögren's Syndrome~ Academy of Immunology and Microbiology Series Seminar Special Symposium 2015年10月28日 (Pohang, Korea)

Ishimaru N. Molecular Pathogenesis of Sjögren's Syndrome. 7<sup>th</sup> Meeting of Asian Society of Oral and Maxillofacial Pathology 2015年10月17日, (Taipei, Taiwan)

石丸直澄 シェーグレン症候群疾患モデルを用いた病態機序に関する多角的研究 第24回日本シェーグレン症候群学会総会 シェーグレン症候群学会賞受賞講演 2015年9月18日 京王プラザホテル (東京都・新宿区)

近藤智之、常松貴明、鯨岡聡子、牛尾綾、山田安希子、新垣理恵子、工藤保誠、石丸直澄 自己免疫疾患モデルを用いた腫瘍増殖制御機構の解明 第104回日本病理学会総会 2015年5月2

日 名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市)

牛尾綾、新垣理恵子、近藤智之、鯨岡聡子、常松貴明、山田安希子、工藤保誠、石丸直澄 Analysis of macrophages in the pathogenesis of a murine for Sjögren's syndrome 第104回日本病理学会総会 2015年5月1日 名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市)

新垣理恵子、常松貴明、山本安希子、工藤保誠、菅野純、石丸直澄 自己免疫疾患モデルマウスを利用した多層化カーボンナノチューブの免疫システムへの影響 第104回日本病理学会総会 2015年4月30日 名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市)

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.tokushima-u.ac.jp/dent/research/sousei\\_kagaku/oral\\_medicine/illness\\_station/](http://www.tokushima-u.ac.jp/dent/research/sousei_kagaku/oral_medicine/illness_station/)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石丸 直澄 (ISHIMARU, Naozumi)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・准教授  
研究者番号 : 60314879

(2) 研究分担者

新垣 理恵子 (ARAKAKI, Rieko)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・准教授  
研究者番号 : 00193061

(3) 研究分担者

工藤 保誠 (KUDO, Yasusei)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・准教授  
研究者番号 : 50314753

(3) 連携研究者

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