

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20882

研究課題名(和文) シェーグレン症候群における新規病因CD4+ T細胞の解析とその制御

研究課題名(英文) The analysis of pathogenic CD4+ T cells in mice model of Sjogren's syndrome

研究代表者

小賀 麻菜(飯塚麻菜)(Iizuka, Mana)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特任助教

研究者番号：80734821

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：シェーグレン症候群(Sjogren's syndrome)類似の病態を呈するモデルマウス(ROR γ t Tg)を用いて、CD4+ T細胞の病態への関与について検討した。本研究により、以下の事を明らかにした。病態の発症にはCD4+ T細胞が必須である、IL-2シグナルの抑制を介したTreg細胞の減少が病変局所のCD4+ T細胞の異常増殖に寄与する。本研究結果は、The Journal of Immunologyに掲載された。

研究成果の概要(英文)：To reveal the pathological role of CD4+ T cells, we used ROR γ t Tg mice, which have been found to spontaneously develop severe sialadenitis-like Sjogren's syndrome (SS). Our results demonstrated that both ROR γ t-overexpressed CD4+ T cells and reduced Treg cells via suppression of IL-2 induced phosphorylation of STAT5 might contribute to the development of SS-like sialadenitis. This research was reported by the journal of "The Journal of Immunology".

研究分野：免疫学

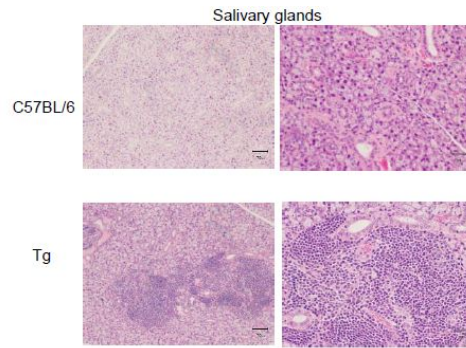
キーワード：自己免疫疾患

1. 研究開始当初の背景

シェーグレン症候群 (Sjögren's syndrome; SS) は、慢性唾液腺炎、涙腺炎を主徴とする臓器特異的自己免疫疾患である。標的臓器の導管、腺房周囲には自己反応性 $CD4^+$ T 細胞の著しいリンパ球浸潤が認められ、腺房の破壊や萎縮により乾燥症状が引き起こされる。病態形成初期における浸潤 $CD4^+$ T 細胞の活性化がその後の免疫応答を惹起することから、SS の発症に関わる病因 $CD4^+$ T 細胞を同定し制御することは、疾患特異的治療法を開発する上で非常に有用である。

申請者らはこれまでに、SS モデルマウスを用いて、以下の事を明らかにしている。抗原特異的 $CD4^+$ T 細胞による $IFN-\gamma$ 産生は、唾液腺上皮細胞のアポトーシスを誘導することで病態形成に寄与する (M.lizuka, et al. *Mod Rheumatol*, 3:614, 2013)。抗原特異的 IL-17 産生は、唾液腺浸潤 B 細胞を活性化させ、自己抗体の産生増加や異所性のリンパ濾胞形成に関与する (M.lizuka, et al. *Mod Rheumatol*, 1:158, 2015)。また、SS 患者においても、炎症唾液腺局所に Th1、Th17 関連分子の発現亢進が報告されており (T.Maehara, et al. *Clin Exp Immunol* 169(2):89, 2012)、病態の発症および進展に $CD4^+$ T 細胞の関与が示唆されている。申請者らはこれまでに、SS の発症に関与する病因 $CD4^+$ T 細胞サブセットについて更なる同定を行うため、T 細胞特異的に T-bet (Th1 マスター転写因子) および ROR γ t (Th17 マスター転写因子) を過剰発現させたトランスジェニック (Tg) マウスを解析した。解析の結果、T-bet Tg マウスの全身諸臓器において、病理学的異常は認められなかった。一方、ROR γ t Tg マウスにおいては、唾液腺、涙腺においてのみ著明な細胞浸潤を認め (図 1)、腺組織破壊に伴う腺分泌能の低下や SS 特異的自己抗体の検出など SS 様の病態を自然発症することを見出した。

[図 1]



2. 研究の目的

ROR γ t Tg マウスを用いて、SS の発症機序を明らかにする。

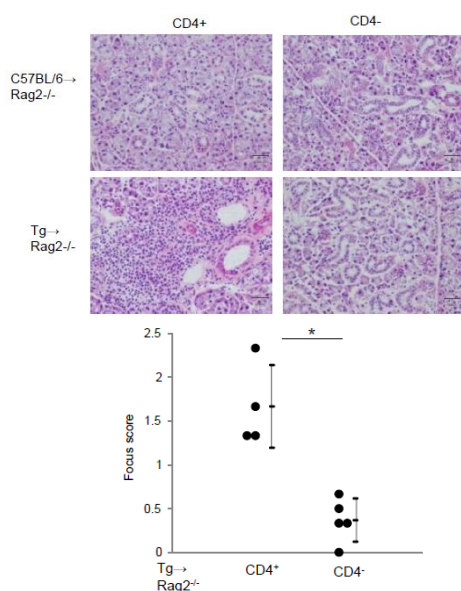
3. 研究の方法

(1) 免疫組織化学染色法およびフローサイトメトリーによる唾液腺浸潤細胞の解析。(2) 定量 PCR による T 細胞サブセット (Th17, Th1, Th2, Tfh) の解析。(3) $CD4^+$ T 細胞および $CD4^-$ 細胞を Rag2 $^{-/-}$ マウスに移入後 ($CD4^+ \rightarrow Rag2^{-/-}$, $CD4^- \rightarrow Rag2^{-/-}$)、唾液腺組織の病理学的検討。(4) $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ (Treg) 細胞数および Treg 細胞における IL-2 刺激後のリン酸化 STAT5 の発現解析。(5) Rag2 $^{-/-}$ マウスに Tg マウス由来エフェクター $CD4^+$ T 細胞と Treg 細胞を移入し、Treg 細胞の抑制能について組織学的検討を行った。

4. 研究成果

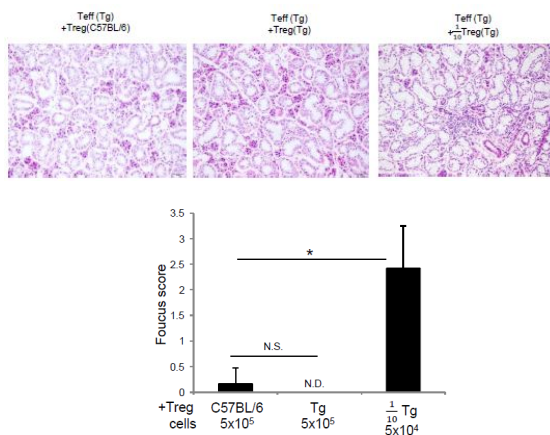
(1) 唾液腺浸潤細胞は主に $CD4^+$ T 細胞であり、週齢と共に B 細胞の著明な増加が認められた。(2) Th1、Th2、Th17、Tfh 細胞関連分子の有意な発現増加が認められた。(3) $CD4^+ \rightarrow Rag2^{-/-}$ マウスの唾液腺においてのみ、著明な単核球浸潤が認められた。(図 2)
(4) Treg 細胞数が有意に低下していた。Treg 細胞における IL-2 刺激後の STAT5 リン酸化は、著明な抑制が認められた。

[図 2]



(5) Tg マウス由来エフェクターCD4⁺ T 細胞と Treg 細胞を移入した Rag2^{-/-} マウスにおいて、唾液腺炎は認められなかった。しかし、移入 Treg 細胞数の減少により唾液腺炎発症を認めた。(図 3)

[図 3]



以上のことから、CD4⁺ T 細胞における ROR γ t の過剰発現および Treg 細胞数の減少が、SS 様の唾液腺炎発症に関与していることが示された。Treg 細胞数の減少において、IL-2 誘導によるリン酸化 STAT5 の抑制が、Foxp3 発現抑制を引き起こしている可能性が示唆された。

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 6 件)

- (1) Tahara M, Tsuboi H, Segawa S, Asashima H, lizuka M, Hirota T, Takahashi H, Kondo Y, Matsui M, Matsumoto I, Sumida T. ROR γ t antagonist suppresses M3 muscarinic acetylcholine receptor-induced Sjögren's syndrome-like sialadenitis. Clin Exp Immunol 187(2):213-224. 2017 (査読有)
- (2) Asashima H, Tsuboi H, Takahashi H, Hirota T, lizuka M, Kondo Y, Matsui M, Matsumoto I, Sumida T. The anergy induction of M3 muscarinic acetylcholine receptor-reactive CD4⁺ T cells suppresses experimental sialadenitis-like Sjögren's syndrome. Arthritis Rheumatol. 67(8):2213-2225. 2015 (査読有)
- (3) lizuka M, Tsuboi H, Matsuo N, Asashima H, Hirota T, Kondo Y, Iwakura Y, Takahashi S, Matsumoto I, Sumida T. A crucial role of ROR γ t in the development of spontaneous Sialadenitis-like Sjögren's syndrome. J Immunol. 194(1):56-67. 2015 (査読有)
- (4) Furukawa S, Moriyama M, Tanaka A, Maehara T, Tsuboi H, lizuka M, Hayashida J, Ohta M, Saeki T, Notohara K, Sumida T, Nakamura S. Polarized M2 macrophages contribute to fibrosis in IgG4-related dacryoadenitis and sialoadenitis, so-called Mikulicz's disease. Clin Immunol 156(1):9-18. 2015 (査読有)
- (5) lizuka M, Tsuboi H, Asashima H, Hirota T, Kondo Y, Matsui M, Matsumoto I, Sumida T. M3 muscarinic acetylcholine receptor reactive IL-17 producing T cells promotes development of Sjögren's syndrome like sialadenitis. Mod Rheumatol. 25(1):158-160. 2015. (査読有)

(6) Kondo Y, Yao Z, Tahara M, lizuka M,
Yokosawa M, Kaneko S, Segawa S, Tsuboi H,
Yoh K, Takahashi S, Matsumo I, Sumida T.:
Involvement of ROR γ t-overexpressing T cells
in the development of autoimmune arthritis in
mice. Arthritis Res Ther 17(1):105. 2015 (査
読有)

〔学会発表〕(計2件)

(1) 飯塚麻菜、坪井洋人、浅島弘充、廣田智
哉、高橋広行、近藤裕也、高橋智、松本功、
住田孝之 ROR γ t 過剰発現によるシェーグレ
ン症候群様唾液腺炎の発症機序 第2回 JCR
ベーシックリサーチカンファレンス, 東京大
学 (東京、文京区), 2015年10月2 - 3日

(2) lizuka M, Tsuboi H, Asashima H, Hirota H,
Takahashi H, Kondo Y, Takahashi S,
Matsumoto I, Sumida T. A pathological role of
ROR γ t in the development of sialadenitis like
Sjögren's syndrome. 13th International
Symposium on Sjogren's Syndrome Bergen
(Norway, Bergen), 2015年5月19 - 22日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小賀 麻菜(飯塚麻菜)(IIZUKA-KOGA
Mana)

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号: 80734821

(2) 研究分担者

なし

(3) 研究協力者

なし