

令和 2 年 7 月 1 日現在

機関番号：32710

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11463

研究課題名(和文)自己免疫性唾液腺炎における形態学的疾患特異的マーカーの検出とその応用

研究課題名(英文) Detection and application of morphologically disease-specific markers in autoimmune salivary gland inflammation

研究代表者

伊藤 由美 (Ito, Yumi)

鶴見大学・歯学部・講師

研究者番号：00176372

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)：自己免疫性唾液腺炎(シェーグレン症候群：SS)は、潜在的な患者数を含め相当数の罹患患者数があるにも関わらず、診断基準や治療方針の統一が未だ図れていない難病指定の疾患である。そこで本研究では、病態解明の重要性に着目し、病期・病態要因を把握する目的で、口唇腺生検材料343例に対し自己抗体や唾液量を含む臨床データを用いて組織障害の程度の数値化を行い再評価した。結果より口唇腺生検は、病態把握に極めて有用であることが確認された。SSは経時的な病態把握が重要となる疾患であることから、今後は非侵襲的かつ術者の経験に依存しない検査方法について検討する余地があると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SSの診断基準の改定が進められる中、多数の生検材料と臨床データを用いた病態解析に基づく診断基準の検討が急務となっている。研究代表者らの施設ではドライマウス外来患者数が6,000人にのぼり、300人を超えるSS患者を経験し、国内の歯科大学附属病院の中では極めて豊富な臨床データを有している。この環境はSSに関する学術的な臨床研究を行うのに適していると言える。また歯科大学という特色からドライマウス外来担当の専門医と口腔病理医という専門性の高い視点から診断を行っているため臨床データの正確性は高い。この豊富な臨床データの解析は、病態解明や診断基準の策定に大いに貢献できる極めて社会的意義の高い研究である。

研究成果の概要(英文)：Autoimmune sialadenitis (Sjögren's syndrome:SS) is an incurable disease, and there are a considerable number of patients including potential ones. However, we haven't obtained unified diagnostic criteria and treatment policy. In this study, we focused on the importance of clarifying the pathogenesis of SS, and in order to understand the stage and causes of SS, we reevaluated all of 343 cases which a biopsy of the labial salivary gland had been performed. Then we digitized the degree of the lesion of labial salivary gland tissue, using clinical data including autoantibodies and saliva flow. The labial salivary gland biopsies which are used in all diagnostic criteria are highly estimated for their usefulness in understanding pathological conditions and stage of disease. SS is a disease for which understanding the pathogenesis is important. Therefore, we should consider that we'll find less-invasive diagnostic method.

研究分野：病理診断

キーワード：シェーグレン症候群 診断基準 腺組織障害 唾液分泌量 血清検査 組織検査 口唇腺生検

様式 C - 19 , F - 19 - 1 , Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

自己免疫性唾液腺炎(シェーグレン症候群:SS)は口腔ならびに眼の乾燥を主徴とする自己免疫疾患であり、特に女性に多く発症する。SSにおける唾液分泌障害は、導管細胞にある自己抗原に対する自己のリンパ球の反応により、腺房細胞が障害されて引き起こされることが報告されている。これらの発生機序にはFas依存性アポトーシスが深く関与しており、Fas ligand陽性のCD4⁺T細胞によりアポトーシスが誘導され、さらにCD8⁺T細胞が接着因子を介した腺房細胞への接着により腺組織の破壊が引き起こされる。さらに近年、唾液分泌に関与するムスカリン受容体に対する自己抗体(抗M3抗体)が、SSでは健康人に比べて有意に高値を示すことが明らかとなり、組織障害以外の唾液分泌低下のメカニズムも報告されている。また様々な環境要因による酸化ストレスを介した唾液腺の機能不全が指摘されていることから、形態学的な障害の程度と分泌機能との整合性が問われている。加えて唾液分泌量と加齢変化との関連も未だに一定した見解が得られておらず、加齢変化とSSの障害性変化の鑑別が困難な症例も多い。これらの病態の多様性から、今なお解明されていない問題も数多く残されており、診断基準も国内外で改訂が繰り返されているのが現状である。SSの診断には、改定診断基準(厚生労働省研究班,1999年)(JPN基準)、アメリカ・ヨーロッパ基準(2002年)(AECG)、そして米国リウマチ学会/欧州リウマチ学会(ACR/EULAR)があり、AECGの基準をベースとしシェーグレン症候群国際登録ネットワーク(SICCA)とのコホート研究により新分類基準が発表された(2015年)。同年、我が国では指定難病に加わり、厚生労働省よりシェーグレン症候群診療ガイドライン2017年版が公開され、SSを取り巻く環境は大きく変化している。しかしながら診断基準の世界的な統一は図れておらず、実際にAECG基準では自覚症状の項目に加えて、血清学的検査あるいは組織検査のいずれかが陽性でなければならないのに対し、SICCA基準では、RFと抗核抗体を含めた血清学的検査、組織検査、眼科検査の3項目中2項目で診断が可能となっている。しかしながら乾燥性角結膜炎の評価方法が従来の検査法を用いていないことや画像検査が検討されていないことから、3つの基準の感度・特異度・正確度を算出した結果、JPN基準が他より優れていたことから、我が国では改定診断基準(JPN基準)が用いられている。現行の診断基準は、いずれも口唇腺生検と血清検査を共通項目として用いている。特に口唇腺生検は、導管細胞にある自己抗原に対する免疫応答により腺房細胞の障害が引き起こされるという考えに基づき、その有用性については従来までも多数報告されている。SICCAプロジェクトでは、口唇腺生検は診断のみならず病態を反映するものとして高く評価され、病態把握に最も有用な検査であるとして、統一した診断基準の策定のため1,783名の口唇腺生検を対象に大規模な調査が行われた。我が国では、SSが2015年に難病指定されたことを受け、診断基準に加え、病態ならびに重症度を経時的に把握することが急務となっている。

2. 研究の目的

難病指定疾患となった自己免疫性唾液腺炎(SS)は、潜在的な患者数を含め相当数の罹患者数があるにも関わらず、診断基準や治療方針の統一が未だ図れていない。現行で行われている3つの診断基準ではいずれも口唇腺生検と血清検査を基準として重視している。特に口唇腺生検は病態の把握にも有用であるとして高く評価されている。そこで本研究では、病態解明の重要性に着目し、病期・病態要因を把握することを目的に、口唇腺生検の再評価と組織変化の数値化評価を行った。さらに自己抗体や唾液分泌量を含む臨床データを用いて障害の程度の数値化評価を行い、診断ならびに病態把握の向上が期待される因子の解析を行った。

3. 研究の方法

研究対象

鶴見大学歯学部附属病院口腔機能診療科・ドライマウス専門外来を受診した患者6,000人の中から対象症例の抽出を行った。

まず全対象症例の臨床データの収集ならびに検体の整理を行い、さらにその得られた情報より、口唇腺生検を施行された症例、343例(SS群137例・非SS群206例)を抽出し、口唇腺生検の組織障害について再評価を行った。またこの時点で、採取検体が1個または検体総面積が4mm²以下のもの、また人為的挫滅が加わっているものは対象より除外した。その結果、183例(女性158名、男性25名、平均年齢62.4歳)の症例を組織学的再評価の対象とした。さらに臨床所見との相互的な解析を行う対象症例として、全ての検査データが揃っている症例32例を抽出した。

口唇腺生検材料の形態学的検索

(1)組織学的再評価

GreenSpan分類の再評価

判定 [陽性:Grade3,4 陰性:Grade0,1,2]

focus score (FS)の再評価

画像解析ソフト(Patholoscope)を用いて、面積を計測し正確なFSの算出を行う。

判定 [陽性:FS 1以上 /4mm² 陰性:FS 1未満 /4mm²]

組織障害の程度の数値化

- ・導管 拡張性変化・破壊性変化
- ・腺房 萎縮・消失

・腺組織全体 脂肪変性・線維化

・リンパ球浸潤の程度

判定(4段階)[0:変化なし 1:軽度 2:中等度 3:高度]

(2) 免疫組織化学的検索

ホルマリン固定,パラフィン包埋された切片を用い,以下の抗体を用いた免疫組織学的検索を行う。

組織構築に対する検索

S-100 抗体,抗 p63 抗体,抗 AE1/AE3 抗体,抗 SMA 抗体

浸潤リンパ球に対する検索

CD3 抗体,CD4 抗体,CD8 抗体,CD20 抗体,CD138 抗体,

炎症性変化に關与する因子の検討

CD68 抗体,IL-1 抗体,抗 IL-6 抗体,抗 CCL-22 抗体,抗 F4/80 抗体

アポトーシスに対する検討

Bcl-2 抗体,Bcl-2 抗体,Caspase-3 抗体

(3) フローサイトメトリー法によるリンパ球動態の確認

統計学的解析

(1) 組織障害に対する解析

4段階で数値化評価を行った障害性変化とFSとの関連因子の解析

(2) 自己抗体(抗SS-A抗体,抗SS-B抗体)の関連性の解析

組織障害の程度と抗SS-A抗体,抗SS-B抗体の陽性率を検討する。

(Mann-Whitney U test)

組織障害と抗SS-A抗体,抗SS-B抗体の力価との整合性の統計学的解析を行う。

(Steel-Dwassの多重比較検定)

なお唾液検体を用いたELISA法による抗M3抗体や酸化ストレスマーカーの検出ならびにマイクロアレイ法による網羅的解析は検体不備により検出できなかった。

4. 研究成果

口唇腺生検材料の形態学的検索

口唇腺生検検体183症例(女性158名,男性25名,平均年齢62.4歳)を対象に,組織障害の程度を再評価した結果,リンパ球の巣状浸潤を伴う導管では,導管内へのリンパ球の侵入が認められた。さらにリンパ球浸潤が高度に観察されるFS1の症例では,導管内へのリンパ球の侵入する所見も散見され,それに伴い導管上皮の多層化や基底膜構造の乱れが確認され,粘液が周囲間質内へと漏出する所見が観察された。一方,閉塞性病変等の非特異的な炎症性病態で特徴的にみられる導管上皮の菲薄化を伴う拡張性変化は,FS<1の症例では目立たなかった(図1)。また腺実質の萎縮・消失が目立つ症例では,障害性変化に伴い脂肪変性が認められ,脂肪変性が総面積の50%以上を占める症例も確認された。なお脂肪変性が面積の50%以上を占める症例は,いずれもSS-A抗体,SS-B抗体,ANA抗体,RA抗体すべて高値を示す症例であった。しかしながら脂肪変性が優位な症例は,腺組織の萎縮が目立つため,FSは低値となる傾向がある点は注意を要する。

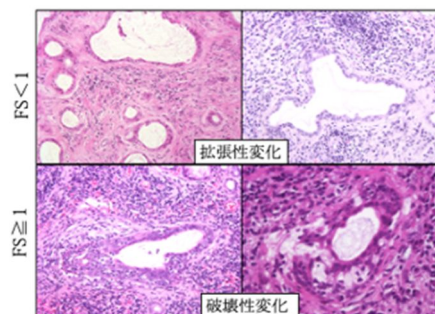


図1: 導管の形態学的変化

免疫組織学的検索

SS症例では,初期には導管内にCD3+T細胞がわずかに確認されるが,FSの高い症例では導管周囲にCD20+B細胞の浸潤が優位となり,導管内にも多数観察され,CD3+T細胞は極めてわずかに観察される程度であった。また形質細胞の前駆細胞であるCD138+も巣状浸潤部に散見された。なおフローサイトメトリー法を用いた検索においても,障害性変化の進行に伴い,CD3+T細胞からCD20+B細胞の割合が増加していることを確認した。またB細胞同様,bcl-2の発現が強く確認された。導管内へのリンパ球の侵入が目立つ領域では,上皮系マーカー(AE1/AE3)により導管

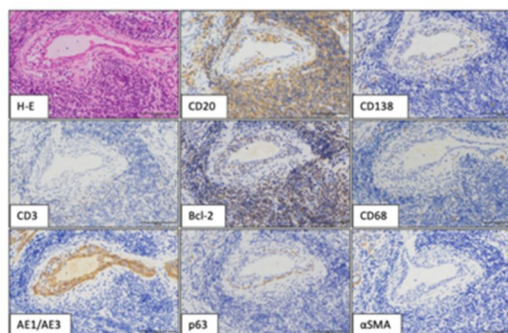


図2: SS症例の免疫組織化学的検索

上皮の破綻が確認され,筋上皮細胞(p63+)も消失していた。また導管を中心とした炎症巣内には,マクロファージ(CD68+)が散在性に確認された。一方,リンパ球浸潤部と隣接する領域にみられる腺房細胞は,p63, SMA陽性細胞が非SSと比較して著しい減少が確認されることから,腺房を取り巻く筋上皮細胞の減少を意味するものであり,唾液分泌への影響の1つとなっている

可能性が示唆された(図2)。

組織障害の程度と臨床所見の関連性の解析

組織障害の程度と唾液分泌量や抗 SS-A 抗体, 抗 SS-B 抗体との関連を明らかにすることを目的に検討を行ったところ, 刺激時ならびに安静時の唾液分泌量, 抗 SS-A 抗体, 抗 SS-B 抗体と組織障害の程度に相関関係が見出された(図3)。さらに重症度の検討のため, 導管の障害性変化と抗 SS-A 抗体価の関連性を解析した結果, 有意差が認められた。また FS と脂肪変性の間にも有意な相関関係が得られ, 面積の 50%以上を占める症例は, いずれも SS-A 抗体, SS-B 抗体, ANA 抗体, RA 抗体すべて高値を示すことから, 脂肪変性は SS の重症度の指標となる特徴的な所見の可能性が示唆された。なお唾液分泌量と年齢との間には相関関係は認められなかった。これらの結果を JPN の基準に基づいて診断したところ, SS と診断された症例は 80 例, そのうち抗 SS-A 抗体陽性症例は 59 例(74%), 組織判定も併せて陽性な症例は 45 例(76%)であった。以上の結果から, 唾液分泌量, 口唇腺生検, ならびに血清検査の感度と特異度を確認したところ, 唾液分泌量は感度が 98%と最も高いが, 特異度が 21%と著しく低いのに対し, 口唇腺生検と血清検査の感度はそれぞれ 78%と 74%, 特異度は両者共にそれぞれ 98%と 95%と極めて高く, 診断に有用な項目であることを確認した。

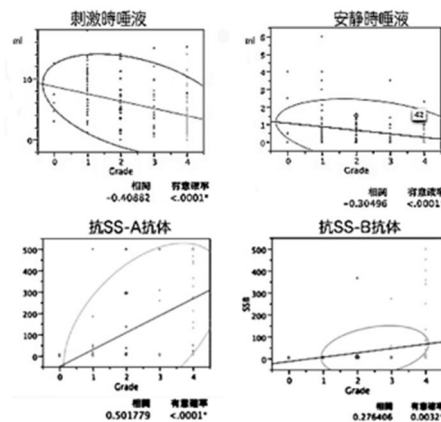


図3: 組織障害と臨床データの統計学的解析

SATB1 遺伝子欠損マウスにおける SS 発症機構の解析

SS の病態把握を目的として, Cre-loxP システムを用いて, 血球系細胞特異的に転写因子の 1 つである SATB1 (Special AT-rich sequence binding protein-1) を欠損するコンディショナルノックアウトマウスを作製し, 解析を行った。SATB1cKO マウスの顎下腺を 4, 12 週と経時的に観察したところ, 巣状を呈するリンパ球浸潤を認める炎症性変化が増大していることが確認された。また炎症巣に浸潤するリンパ球は, 4 週では CD4+, CD8+T 細胞が優位に観察されるが, 週齢が進むにつれて CD20+B 細胞の割合が増加してくることが確認された。これらの結果から, SATB1cKO マウスは SS のモデルマウスとして有用で有ると考えられた。さらに SATB1cKO マウス 4 週の時期にすでに炎症性サイトカインやケモカインの発現が始まっており, その範囲は週齢と共に広がっていた。なお同週齢野生型コントロールマウス唾液腺では, これらの炎症性サイトカインについては発現していない結果を得ている。またマクロファージ(F4/80+)も経時的に出現率が増加していることが確認された(図4)。

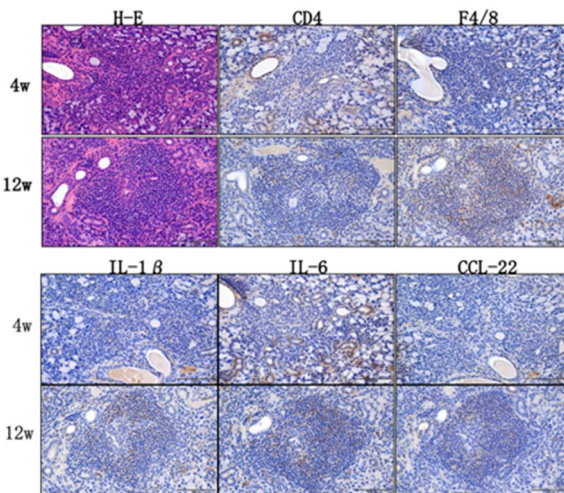


図4: SATB1cKO顎下腺に対する免疫染色結果

以上, 今回の組織障害と臨床データの解析から, 口唇腺生検が病態把握に極めて有用な手法であることが確認された。さらに組織障害の程度と自己抗体との関連性は, 両者間に相関関係が成り立つことから, 口唇腺生検と血清検査の併用は診断精度のみならず, 重症度の評価に有用な手法となるものと考えられた。また重症度の指標として, 脂肪変性が有用な所見であることが確認された。なお自己抗体が高値となる重症例では, B 細胞や形質細胞の前駆細胞が優位となっており, アポトーシス関連因子の増加が観察された。さらにマクロファージの出現も目立っているが, この遷延性の炎症性疾患へのマクロファージの関与は SATB1cKO マウスでも確認された。これらの結果から, SS の終末像として脂肪変性に至る経緯にはマクロファージが関与している可能性が強く示唆され, 特に炎症性変化に関与する M1 マクロファージに注目したい。

難治性疾患である SS 患者は, 重症度の推移を把握することが重要になるため, 長期的な経過観察が必要となる。今回の解析により, 口唇腺生検の有用性に加え, 血清試験を併せることは確定診断のみならず, 病態・病期の理解に極めて有用な手法であることが明らかとなった。しかしながら口唇腺生検の施行には観血的処置による侵襲は避けられず, 経時的な経過観察の中で定期的に行うには患者の負担が大きい。今後の展望として, 経時的な病態把握のために, 非侵襲的かつ検査技師の熟練度に依存することなく, 正確かつ反復可能な検査方法の発見が望まれる。近年,

唾液より病変部特有の代謝物を同定する分子組成分析の SERS (表面増強ラマン散乱: Surface Enhanced Raman Scattering) に注目が集まっている。実際に SS の診断に向けては, 耳下腺の SD-SWE (2次元せん断波エラストグラフィ Bモード: 2D-Shear Wave Elastography) を併用し, 腺組織の硬さに関する形態的情報を補うことで, SS 診断の有用性が高まるという統計的評価を得ている。ラマン分光測定においては, これまで用いられてきたフローサイトメトリーで用いる蛍光染色に生じる細胞毒性, 代謝物などの小さな生体分子の染色困難といったデメリットに対し, 光を当てただけで細胞内の生体分子を染色せずに測定することが可能などのメリットが多い。これは非侵襲型バイオプシーという将来の形への一歩となるのではないかと考える。

引用文献

- Tsuboi H. et al., Anti-M3 muscarinic acetylcholine receptor antibodies and Sjögren's syndrome. *Jpn J Clin Immunol.*,36(2):77-85,2013.
- Navazesh M. et al., Comparison of whole saliva flow rates and mucin concentrations in healthy caucasian young and aged adults. *J Dent Res.*,71(6):1275-8,1992.
- Fujibayashi T. et al., Revised Japanese Criteria for Sjögren's syndrome (1999): Availability and validity. *Mod Rheumatol.*,14(6):425-434,2004.
- Shiboski CH. et al., 2016 American college of rheumatology/ European league against rheumatism classification criteria for primary Sjögren's syndrome: A consensus and data-driven methodology involving three international patient cohorts. *Ann Rheum Dis.*,Jan;76(1): 9-16 2017.
- Shiboski SC, et al., American college of rheumatology classification criteria for Sjögren's syndrome:A data-driven, expert consensus approach in the Sjögren's international collaborative clinical alliance cohort. *Arthritis Care Res.*,Apr;64(4):475-487,2012.
- 住田孝之,シェーグレン症候群 診療ガイドライン,診断と治療社 2017 年版. 2017.
- Tsuboi H. et al., Validation of different sets of criteria for the diagnosis of Sjögren's syndrome in Japanese patients. *Mod Rheumatol.*, 23:219-225,2013.
- Daniels TE. et al., Associations between salivary gland histopathologic diagnoses and phenotypic features of Sjögren's syndrome among 1,726 registry participants. *Arthritis Rheum.*,Jul;63(7):2021-2030,2011.
- Shimoyama K. et al., Study of procedure of labial salivary gland biopsy in Sjögren's syndrome. *Jpn J Clin Immunol.*, 32(1):53-60,2009.
- Tanaka Y. et al., SATB1 conditional knockout results in Sjögren's syndrome in mice, *J Immunol.*,199:4016-4022,2017.
- Moisoiu V. et al., Combining surface-enhanced raman scattering (SERS) of saliva and two-dimensional shear wave elastography (2D-SWE) of the parotid glands in the diagnosis of Sjögren's syndrome. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.*, 235(5)118267:1-8,2020.
- Luciano N. et al., Advances in salivary gland ultrasonography in primary Sjögren's syndrome, *Clin Exp Rheumatol.*, 36 Suppl 114(5):159-164, 2018.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sumida Takayuki, Azuma Naoto, Moriyama Masafumi, Takahashi Hiroyuki, Asashima Hiromitsu, Honda Fumika, Abe Saori, Ono Yuko, Hirota Tomoya, Hirata Shintaro, Tanaka Yoshiya, Shimizu Toshimasa, Nakamura Hideki, Kawakami Atsushi, Sano Hajime, Ogawa Yoko, Tsubota Kazuo, Ryo Koufuchi, Saito Ichiro, Tsuboi Hiroto	4. 巻 28
2. 論文標題 Clinical practice guideline for Sjogren's syndrome 2017	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Modern Rheumatology	6. 最初と最後の頁 383 ~ 408
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/14397595.2018.1438093	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Tsuboi Hiroto, Hagiwara Shinya, Asashima Hiromitsu, Takahashi Hiroyuki, Hirota Tomoya, Noma Hisashi, Umehara Hisanori, Kawakami Atsushi, Nakamura Hideki, Sano Hajime, Tsubota Kazuo, Ogawa Yoko, Takamura Etsuko, Saito Ichiro, Inoue Hiroko, Nakamura Seiji, Moriyama Masafumi, Takeuchi Tsutomu, Sumida Takayuki	4. 巻 76
2. 論文標題 Comparison of performance of the 2016 ACR-EULAR classification criteria for primary Sjogren's syndrome with other sets of criteria in Japanese patients	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Annals of the Rheumatic Diseases	6. 最初と最後の頁 1980 ~ 1985
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1136/annrheumdis-2016-210758	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Ujjal K Bhawal, Fengzhu Zhang, Yuriko Tanaka, Yumi Ito, Motonari Kondo, Kazumune Arikawa, Koichi Hiratsuka
2. 発表標題 Sjogren's syndrome in SATB1 conditional knockout mice
3. 学会等名 第68回日本口腔衛生学会・総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	梁 洪淵 (Ryo Koufchi) (10298268)	鶴見大学・歯学部・講師 (32710)	
研究分担者	美島 健二 (Mishima Kenji) (50275343)	昭和大学・歯学部・教授 (32622)	
研究分担者	斎藤 一郎 (Saito Ichiro) (60147634)	鶴見大学・歯学部・教授 (32710)	