

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09610

研究課題名（和文）唾液腺免疫性疾患における腺機能障害に対する基礎的研究

研究課題名（英文）Basic Research on Glandular Dysfunction in Salivary Gland Immune Diseases

研究代表者

高野 賢一（Takano, Kenichi）

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：70404689

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：唾液腺における腺分泌機能には、腺管上皮機能が重要な役割を担っており、近年疾患との関連も明らかとなりつつある。本研究において、この腺分泌機能に關与する上皮バリアを制御するGBP-1の発現低下がみられ、分泌障害など臨床症状にもつながっていることが示唆された。さらに長期に渡る慢性炎症状態下でのTfh細胞の免疫寛容の潜在的なフィードバックループメカニズムが考えられたことから、新たな治療標的の可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

唾液腺における腺分泌機能には、腺管上皮機能が重要な役割を担っており、近年疾患との関連も明らかとなりつつあるが、局所上皮バリア機能制御については不明の点が多かった。本研究では、IgG4関連疾患をはじめとする唾液腺免疫性疾患における上皮バリア機能障害に起因する腺分泌機能障害を制御するメカニズムの一端を明らかとし、現在病態が不明で治療方法が極めて限定されている唾液腺免疫性疾患に関して基礎的知見を得ることができた。

研究成果の概要（英文）：The glandular secretion function in the salivary glands is significantly influenced by the function of the ductal epithelium, and its association with diseases has been increasingly recognized in recent years. In this study, it was suggested that the decreased expression of GBP-1, which regulates the epithelial barrier involved in this glandular secretion function, may lead to clinical symptoms such as secretion disorders. Furthermore, the potential feedback loop mechanism of immune tolerance by Tfh cells under chronic inflammatory conditions over a long period was considered, indicating the possibility of a new therapeutic target.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：唾液腺 IgG4関連疾患 シェーグレン症候群 上皮バリア

1. 研究開始当初の背景

唾液腺における腺分泌機能には、腺管上皮機能が重要な役割を担っており、近年疾患との関連も明らかとなりつつある。特に患者数が多い唾液腺免疫疾患である **IgG4** 関連疾患とシェーグレン症候群において、腺分泌機能維持に関与することが明らかとなっているが、不明な点が多い。局所のサイトカイン環境が大きく変化している唾液腺免疫性疾患では、上皮バリア機能に対して様々な影響がみられる。近年、局所上皮バリア機能制御に **guanylate binding protein-1 (GBP-1)** が関わっている可能性が示唆されており、唾液腺免疫性疾患における上皮バリア機能障害に起因する腺分泌機能障害を制御するメカニズムを明らかとしようと考えた。

2. 研究の目的

これまで **IgG4** 関連涙腺・唾液腺炎 (**IgG4-DS**) やシェーグレン症候群 (**SS**) の病態研究は、リンパ球やサイトカインに着目した免疫学的研究は盛んに行われており、われわれも **IgG4-DS** における濾胞ヘルパーT細胞 (**Tfh**) の局所病態形成における役割などを明らかにしてきた。しかし、疾患フェノタイプにも影響する腺管上皮バリア機能に関する研究は少なかった。そこで、代表的唾液腺免疫性疾患である **IgG4-DS** と **SS** において、唾液腺組織障害および分泌障害に関与する上皮バリア機能を制御する **GBP-1** の役割と新規治療標的としての可能性を探ることを目的とした。

3. 研究の方法

組織を用いた検討

頸部郭清で得られた正常唾液腺および疾患由来 (**IgG4-DS**, **SS**) ヒト唾液腺組織における **GBP-1** および **claudin**, **occluding**, **JAM-A** などのタイト結合関連分子に加え、これまでデータが不足している3細胞間タイト結合分子 (**LSR**, **tricellulin**) も加えて、**RT-PCR** 法、**Western blot** 法、免疫組織染色法を用いて検討し、検査データ等の臨床所見や組織学的所見との相関について解析した。

培養細胞を用いた検討

われわれはすでにヒト唾液腺腺管上皮細胞の培養系を確立しており、この培養ヒト唾液腺腺管上皮細胞を用いた細胞分子学的検討を行った。

1) 各種サイトカインの **GBP-1**・上皮バリアへの影響

正常唾液腺での **IFN γ** による **GBP-1** 発現誘導はすでに明らかにしたが、さらに **TNF α** , **IL-1 β** , **Th1** および **Th2** サイトカイン、制御性T細胞産生サイトカインを処置することにより、正常・**IgG4-DS**・**SS** 由来の3群における誘導変化の違いを検討した。同時にタイト結合関連分子 (**occludin**, **claudin-1**, **-4**, **-7**, **JAM-A**, **LSR**, **tricellulin**) の発現変化と、経上皮電気抵抗 (**TEER**) による上皮バリア機能の変化を調べた。

2) シグナル伝達経路の解析

GBP-1 に影響するシグナル伝達経路を明らかとする。**PKC** 経路のほか、タイト結合の発現変化に関与するとされる **MEK1/2**, **PI3K**, **JNK**, **ELF3** **SS** において病態に関与するとされる **Hippo** 経路、唾液腺形態形成に関与し、気道上皮ではバリア機能にも関与する **p63** 転写因子について、主に **siRNA** 法や各種インヒビターを用いてシグナル伝達経路について解析した。

3) **GBP-1 knockdown** による上皮バリアおよびサイトカインへの影響

GBP-1 を **knockdown** することで、タイト結合関連分子 (**occludin**, **claudin-1**, **-4**, **-7**, **LSR**, **Tricellulin**) の発現変化と上皮バリア機能の変化、各種サイトカイン (**TNF** 調節因子, **IL-1 β** , **Th1** および **Th2** サイトカイン, 制御性T細胞産生サイトカイン) 処置時の変化について、正常および疾患群において唾液腺腺管上皮細胞における **GBP-1** の役割の異同も含めて解析した。

マーカーとしての **GBP-1** の可能性

病勢と **GBP-1** に関連があるか、患者血清中の **GBP-1** を測定し、サクソンテストにより随時唾液腺分泌能を評価し、また組織における **GBP-1** 発現レベルと臨床所見との相関について解析した。

4. 研究成果

ヒト唾液腺腺管上皮細胞を、炎症性サイトカインである **IFN γ** 、**IL-1 β** 、**TNF α** および成長因子 **TGF- β** で処置したところ、**IFN γ** 、**IL-1 β** 、**TNF α** では **GBP-1** および上皮バリア機能を著しく増強し、**CLDN-7** だけでなく、3細胞間タイトジャンクション分子である **LSR** も誘導した。**GBP-1** の **siRNA** によるノックダウンでは、タイトジャンクション分子のエンドサイトーシスを誘導し、**IFN γ** または **TNF α** による処置で誘導された上皮バリア機能の増強に伴う **CLDN-7** および **LSR** の増加が抑制された。**PKC α** 阻害剤では、**GBP-1**、**CLDN-7** および **LSR** の発現が誘導さ

れ、上皮バリア機能が増強された。**IgG4-DS** 患者の唾液腺導管では、**IgG4** 陽性形質細胞の著しい浸潤が認められ、**GBP-1**、**CLDN-7** および **LSR** の発現は増加していた。すなわち、**GBP-1** は正常ヒト唾液腺導管上皮のバリア機能において重要な役割を果たし、**IgG4-DS** 疾患の導管上皮において防御的役割を果たす可能性があることが示された。

IgG4-DS における特定の **miRNA** に関して、標的遺伝子を探索した。**IgG4-DS** 患者 9 人、原発性シェーグレン症候群患者 3 人、コントロール 3 人の血清中 **miRNA** を解析し、**IgG4-DS** 患者で発現に著しい変動を示した **miRNA** を抽出した。その結果、血清中 **miR-125a-3p** および **miR-125b-1-3p** の発現レベルが **IgG4-DS** で上昇しており、影響を受けた顎下腺組織では、6 つの候補標的遺伝子 (グリピカン 4、フォークヘッドボックス C1、タンパク質チロシンリン酸ノンレセプタータイプ 3、ヒドロキシカルボン酸受容体 1、メジャーファシリテーター超家族ドメイン含有 11、および腫瘍関連カルシウムシグナル伝達体 2) が低発現であった。

T 濾胞性ヘルパー (**Tfh**) 細胞に着目した検討では、トランスクリプトーム解析により、**IgG4-RD** の病変部位におけるこれらの **DP-Tfh** 細胞が、**Eomes**、**CRTAM**、**GPR56**、グランザイムなどの細胞障害性 **CD8** 陽性 **T** 細胞特有の関連遺伝子、さらには **CD70** などを好発現していることがわかった。組織内リンパ球とさまざまな臨床的パラメーターとの関係を解析したところ、**DP-Tfh** 細胞のレベルが、**IgG4-RD** 患者における血清 **IgG4** レベルおよび局所の **IgG4** 陽性 (**IgG4+**) メモリー **B** 細胞 (**CD19+CD27+IgD-**) レベルと逆相関していた。さらに末梢ヘルパー **T** (**Tph**) 細胞について、治療開始前に採取した末梢血から分離した末梢血単核球を **CXCR3** と **CCR6** の発現に基づいて 3 つのサブセットに分類し解析したところ、**IgG4-DS** 患者では血液 **Tph2** 細胞の割合が増加した一方、血液 **Tph17** 細胞の割合は減少し、血液 **Tph2** 細胞の割合と血清 **IgG4** 値、血清 **IgG4/IgG** 比、**sIL-2R** 値、罹患臓器数との間に有意な正の相関関係が認められた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takano Kenichi, Kurose Makoto, Kamekura Ryuta, Kanda Masatoshi, Yamamoto Motohisa, Takahashi Hiroki	4. 巻 142
2. 論文標題 Tubarial gland involvement in IgG4-related diseases	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Acta Oto-Laryngologica	6. 最初と最後の頁 616～619
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/00016489.2022.2104368	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高野賢一, 亀倉隆太, 神田 真聡, 高橋 裕樹
2. 発表標題 IgG4関連疾患におけるTubarial glandsの臨床的意義
3. 学会等名 第30回日本シェーグレン症候群学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高野賢一, 村山公介, 亀倉隆太
2. 発表標題 Tubarial glandsの臨床的意義の検討
3. 学会等名 第123回日本耳鼻咽喉科頭頸部外科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高野賢一
2. 発表標題 IgG4関連疾患を知る
3. 学会等名 第3回日本歯放学会秋季大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高野賢一
2. 発表標題 IgG4関連疾患を究める
3. 学会等名 第35回日本口腔・咽頭科学会総会ならびに学術講演会
4. 発表年 2022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	小島 隆 (Kojima Takashi) (30260764)	札幌医科大学・医学部・教授 (20101)	
研究分担者	一宮 慎吾 (Ichimiya Shingo) (30305221)	札幌医科大学・医学部・教授 (20101)	
研究分担者	亀倉 隆太 (Kamekura Ryuta) (70404697)	札幌医科大学・医学部・講師 (20101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------