

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791992

研究課題名(和文) シェーグレン症候群のB細胞異常と唾液腺炎との関連

研究課題名(英文) The association between the sialoadenitis and the abnormality of B cells of patients with Sjogren's syndrome.

研究代表者

中川 靖子 (Nakagawa, Yasuko)

北海道大学・歯学研究科(研究院)・研究員

研究者番号：80451392

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：アダプター分子Act1はBAFFRやCD40と結合し、CD40L-BAFF刺激において抑制的に働きB細胞の過剰な活性化や自己抗体産生を制御していると考えられる。Act1KOマウスはシェーグレン症候群(SS)に類似した病態を示しAct1はSSのB細胞異常活性化に関与する可能性が考えられる。SS患者末梢血B細胞におけるAct1発現とSSの病態生理との関連を検討した。

健康人と比べSS群ではAct1発現が有意に低下、その発現量は血清IgG値と逆相関していた。このAct1発現低下がCD40-BAFFRシグナル経路を抑制、B細胞分化促進や自己抗体産生をもたらし、SSの病態形成に関与する可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：B cell hyper-activation is a predominant feature of Sjogren's syndrome (SS) related to production of autoantibodies. The adaptor molecule Act1 plays an important role in the homeostasis of B cells by attenuating CD40 and BAFFR signaling. Act1-deficient mice develop autoimmune manifestations similar to SS.

In this study, to investigate the role of Act1 in the pathogenesis of SS, we examined Act1 mRNA expression in B cells from patients with SS and discussed the association of Act1 with parameters and clinical manifestations of SS include sialoadenitis. We showed the low level of Act1 mRNA expression in patients with SS and reciprocal association of Act1 with serum IgG level. The MSG had low Act1 mRNA expression levels tended to be increased B cell and plasma cell infiltration. Diminished Act1 mRNA expression in SS may be associated with B cell hyperactivity and elevated immunoglobulin production in SS by uncontrolled B cell activation signal through CD40 and BAFFR.

研究分野：歯学

科研費の分科・細目：病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：シェーグレン症候群 B細胞 Act1

1. 研究開始当初の背景

(1) シェーグレン症候群 (Sjögren's syndrome ; 以下 SS) における B 細胞分化異常

SS 患者の末梢血 B 細胞では過剰な活性化や形質細胞への分化が認められ、抗 SS-A,B 抗体などの自己抗体の発現や高 γ グロブリン血症に結びつくと考えられている。これらの機序として、活性化 T 細胞からの CD40-CD40L を介した活性化や BAFF などの関与が指摘されており、B 細胞の分化異常が SS の病態に影響していることが示唆されているものの、SS の B 細胞活性化経路の亢進の原因についてはよくわかっていない。

(2) SS における唾液腺炎

SS の唾液腺病変部では、導管上皮細胞の増生・化生と上皮細胞間へのリンパ球の浸潤が認められる。初期の浸潤細胞は CD4 陽性 T 細胞が中心で、浸潤巣が大きくなると B 細胞が浸潤・増殖して濾胞様構造となる。リンパ濾胞の形成に伴ってリンパ球が増殖し、濾胞周辺の辺縁帯にリンパ球層が形成され、腺組織では長年にわたって炎症病変が慢性的に持続し、さらには腺以外の臓器にも病変が進展、一部にリンパ増殖性病変を発症するとされる。これらのことから、SS の唾液腺炎においても B 細胞の分化異常が影響している可能性が示唆されている。

(3) Act1 欠損マウスにおける SS 様所見

アダプター分子 NF- κ B activator 1 (Act1) は CD40 あるいは BAFF receptor (BAFFR) を介したシグナルによる B 細胞の分化および生存に対する抑制因子であり、SS の B 細胞異常活性化に関与する可能性が考えられる。Act1 欠損マウスにおいて、唾液分泌低下、眼および眼周囲の乾燥所見、顎下腺の腫脹および腺に付随するリンパ節の肥大といった SS に類似した臨床所見が観察される。さらに、成熟 B 細胞の増加、脾臓の肥大、germinal center の増大、高 γ グロブリン血症、脾臓髓

質における Ig 産生形質細胞の大量蓄積などの B 細胞活性化経路の異常が認められる。また、Act1 欠損マウス血清中には IgG 値の上昇が認められると共に、種々の自己抗体、すなわち抗 SS-A,B 抗体、抗 ssDNA 抗体、抗 dsDNA 抗体、抗ヒストン抗体、リウマトイド因子 (RF) が高力価で検出される。Act1 欠損マウスのこれらの所見より Act1 のヒトの SS の病態への関与が推測される。

2. 研究の目的

B 細胞の分化および生存を抑制する Act1 に着目し、SS 患者の末梢血 B 細胞および口唇腺における Act1 発現と SS の病態生理への関連を検討した。

3. 研究の方法

(1) 対象

北海道大学病院第 2 内科を受診し、1999 年厚生労働省シェーグレン症候群診断基準に基づき診断された SS 患者 55 人 (SS 群)、自己免疫疾患に罹患していない健常人 28 人 (control 群)、関節リウマチ患者 (RA 群) 18 人。研究対象者の人権擁護上の配慮、インフォームド・コンセントについては、ヘルシンキ宣言を遵守し、被験者の人権および利益の保護に配慮し研究を行った。なお、本研究は北海道大学病院自主臨床試験事務局の承認のもとで施行した (自 008-0152) 。

(2) cDNA の精製・発現量測定

対象者末梢血よりネガティブセレクションにて CD19 陽性 B 細胞を単離し、totalRNA の抽出後、逆転写反応を行い cDNA を精製した。Act1 mRNA 発現量を Real-time-PCR で半定量した。インターナルコントロールには GAPDH を用い、発現量は $\Delta\Delta$ CT 法にて求めた。

(3) 唾液腺免疫染色

対象者 SS 診断時に行った口唇生検時に採取した唾液腺を用いて免疫染色 (Act1、CD20、CD4/8、CD138、IgG) を行った。

(4) 解析

Act1mRNA 発現は健常人の一人を1としたときの相対比として表し、SS 群と健常群、RA 群の値を比較検討した。各群間の検定は Mann-Whitney の U 検定(片側)、臨床所見との相関解析は Spearman 順位相関(片側)を用い、SPSS 16.0(IBM)を用いて解析した。刺激唾液量測定はガーゼを2分間咀嚼したときに分泌される唾液量を測定するサクソテストを用いた。口唇生検病理像は同病棟の病理担当歯科医によって4mm²範囲内の浸潤リンパ球数を計測してスコア化したフォーカススコア法を用い、grade2以上の群とgrade1以下の2群間でAct1mRNA発現を Mann-Whitney の U 検定(片側)を用いて比較した。

4. 研究成果

(1) 末梢血 B 細胞における Act1mRNA 発現

SS 群の Act1mRNA 発現相対値の中央値は健常群(control 群)に比べ有意に低値を示し(P=0.021)、対照疾患の RA 群との比較においても有意に低値を示した(P=0.004)。また RA 群と健常群との間に Act1mRNA 発現相対値の有意差は認められなかった。

(2) Act1 発現と唾液腺炎との関連

現時点では統計的有意差は出ていないものの、Act1 発現の低い患者由来の口唇腺に B 細胞および形質細胞の浸潤が多くみられる傾向を認めている。

(3) Act1 発現と臨床所見との関連

SS 群において Act1 発現と刺激唾液量、口唇生検病理像、血液検査諸項目との関連を調べた。刺激唾液量・口唇生検病理像・抗 SS-A/SS-B 抗体値との相関は認められなかったが、血清 IgG 値との間に逆相関が認められた($r=-0.249$ ・ $p=0.04$)。なお、RA 群においては Act1mRNA 発現と血清 IgG 値との相関は認められなかった。

SS 患者 B 細胞における Act1mRNA 発現の低下により、CD40 あるいは BAFFR シグナル経路の抑制解除による B 細胞の活性化および形質細胞への過剰分化が促進され、自己抗体産生や高グロブリン血症などが生じ、SS の病態形成へとつながる可能性が考えられた。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

— Yasuko Nakagawa, Hiroshi Kataoka, Takashi Kurita, Kenji Oku, Toshiyuki Bohgaki, Olga Amengual, Shinsuke Yasuda, Tetsuya Horita, Tatsuya Atsumi, : The relation between the expression of Act1 mRNA in B cells and clinical manifestations with Sjögren's syndrome: 15th Asia Pacific League of Associations for Rheumatology (APLAR) Congress, King Hussein Bin Talal Convention Center, Dead Sea, Jordan, (2012.9.12)

〔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：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中川 靖子 (NAKAGAWA Yasuko)
北海道大学・大学院歯学研究科・学術研究
員
研究者番号：80451392

(2) 研究分担者

(なし)

研究者番号：

(3) 連携研究者

(なし)

研究者番号：