

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

シェーグレン症候群唾液腺上皮細胞における Toll-like receptor3 による
細胞死調節シグナルに関する研究

研究分担者 川上 純 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻展開医療科学講座
(第一内科) 教授
研究協力者 中村 英樹 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻展開医療科学講座
(第一内科) 講師
寶來 吉朗 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻展開医療科学講座
(第一内科) 大学院生

研究要旨

シェーグレン症候群 (SS) 小唾液腺組織における TLR3 下流分子のうち、p-FADD 以下の発現が欠如していた。一方、poly:IC による培養唾液腺上皮 (SGEC) 刺激では、これらの蛋白発現は明らかであった。EGF 刺激ライセートの抗体アレイの結果より、SS 唾液腺では細胞死を抑制する分子が関与していることが示唆された。

A. 研究目的

私たちはシェーグレン症候群 (SS) 唾液腺細胞死に拮抗する分子として PI3K-Akt 経路の関与、および Toll 様受容体 (TLR) 唾液腺組織での発現を報告した。また前年度までに SS 小唾液腺組織における TLR3 下流分子発現と、in vitro で TLR3 のリガンド poly:IC によって培養唾液腺上皮 (SGEC) 細胞死を誘導可能であり、TLR3 下流のアポトーシス誘導分子発現も検討してきた。

B. 研究方法

TLR3 の会合分子である TRIF やその下流シグナル (RIPK, FADD, caspase 8 など) の、SS および正常コントロール (NC) 口唇小唾液腺の組織での発現と、SGEC を用いた in vitro での発現に差が見られたため、SGEC を EGF 刺激したライセートの抗体アレイを行い、陽性コントロールに対する各分子のシグナル面積の比を数値化しアポトーシス関連分子発現を検討した。また、増加していた生存因子とリン酸化 Akt との共発現も二重蛍光染色にて検討した。

(倫理面への配慮)

口唇唾液腺の本研究への使用にあたっては、長崎大学病院臨床研究倫理委員会の承認を得ており、患者へのインフォームド・コンセント取得した症例のみ研究に参画している。

C. 研究結果

SS 小唾液腺組織で p-FADD/caspase-8 以下のシグナル減弱があり、一方 in vitro では、RIPK3/p-FADD/cleaved-caspases は増強していた。WB においても poly:IC 刺激後の SGEC ライセートの cleaved-caspase3 増加が観察された。SGEC を EGF で刺激した抗体アレイ (アポトーシスアレイ) では、anti-apoptotic な分子として幾つかの分子の増加が観察されたが、代表的なものとして HO-2 や HSP27 などの発現増加が観察された。また SGEC を EGF 刺激すると、蛍光免疫染色にてリン酸化 Akt と HO-2 および HSP-27 の共発現が観察された。

D. 考察

前年度までの検討で、SS 組織で TRIF および RIPK3 発現は見られたが、p-FADD/caspase-8 の発現が減弱したことにに関して、in vivo においては下流の細胞死シグナルが抑制されている可能性が示唆された。今回行った抗体アレイの結果からは、リン酸化 Akt 以外にも EGF 下流で SGEC で上昇する生存シグナルが複数個存在していることがあきらかとなった。さらに EGF で誘導される分子とリン酸化 Akt が共発現していることより、これらが共同で TLR3 誘導性アポトーシスに拮抗している可能性が示唆された。

E. 結論

SS 唾液腺組織 (in vivo) においては唾液腺組織の恒常性を維持するために、TLR3 による細胞死シグナルが入っても、これを阻止しようとする経路が関与していると思われる。今年度の研究からは、唾液腺より分泌される EGF で増強する PI3K-Akt 経路以外に同じく EGF で増強する HO-2 や HSP-27 など他の生存因子が細胞死バランスの調整に関与していると考えられる。

F. 健康危険情報

特記事項無し

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Nakamura H, Horai Y, Suzuki T et al.

TLR3-mediated apoptosis and activation of phosphorylated Akt in the salivary gland epithelial cells of primary Sjögren's syndrome patients. *Rheumatol Int*, 33:441-50, 2013.

2) Nakamura H, Horai Y et al. HTLV-I virological and histopathological analysis in 2 cases of anti-centromere antibody-seropositive Sjögren's syndrome *Mod Rheumatol*, 23:133-139, 2013

3) Nakamura H, Iwamoto N et al. A case of adult T-cell leukemia presenting primary Sjögren's syndrome like symptoms. *Int J Rheum Dis*, 16:489-492, 2013

2. 学会発表

1) 寶來吉朗他：シェーグレン症候群唾液腺における TLR3 誘導性アポトーシスにおける下流分子の発現について 日本シェーグレン症候群学会 2013 年 09 月

2) 吉村俊祐他：シェーグレン症候群を合併した視神経脊髄炎における唾液腺の組織学的検討 日本シェーグレン症候群学会 2013 年 09 月

3) Horai Y et al. Analysis of downstream molecular pathways of Toll-like receptor 3-induced apoptosis in the pathogenesis of Sjögren's syndrome. 12th International Symposium on Sjögren's syndrome October 2013

4) Nakamura H. HTLV-I infection and SS 12th International Symposium on Sjögren's syndrome October 2013

5) 中村英樹 シェーグレン症候群における HTLV-1 の関与 第 41 回日本臨床免疫学会総会 2013 年 11 月

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

シェーグレン症候群の病態形成に関わる T 細胞サブセットの解析に関する研究

研究分担者 中村 誠司 九州大学院歯学研究院 口腔顎顔面病態学講座（教授）
研究協力者 森山 雅文 九州大学院歯学研究院 口腔顎顔面病態学講座（助教）

研究要旨

われわれは従来、シェーグレン症候群(SS)の病態形成と T 細胞サブセットとの関連に注目してきたが、過去の研究結果から、Th2 細胞が SS の病態進展に関与していることを報告している。近年新しく同定された IL-33 が、その受容体である ST2 を介して Th2 細胞を活性化し、Th2 サイトカイン産生を誘導することが報告されている。

そこで本年度の研究では、SS の病態形成と血清中の IL-33 との関連について検討を行った。これらの結果より、血清 IL-33 値が高値の SS 患者では、唾液腺におけるリンパ球浸潤が強く、血清自己抗体値（抗 SS-A/B 抗体、抗核抗体）が高値であることから、血清 IL-33 の検索は SS の病態進展にモニターになることが示唆された。

A. 研究目的

シェーグレン症候群(SS)は、唾液腺などの外分泌腺が特異的に障害を受ける自己免疫疾患である。病理組織学的には導管周囲のリンパ球浸潤や腺房細胞の線維化を特徴とする。その病因・病態進展については、TM 細胞の関与が多数報告されているが、未だに不明な点が多い。過去の研究でわれわれは、SS の病態進展に Th2 が産生する IL-4 などのサイトカインが重要な役割をしていることを報告している。近年新しく同定された IL-33 は、受容体である ST2 を介して Th2 細胞を活性化し、Th2 サイトカイン産生を誘導するとされていることから、本年度の研究では血清 IL-33 と SS の臨床所見との関連について検討を行った。

B. 研究方法

SS 患者 16 例、健常者 15 例を対象とし、血清 IL-33 と臨床所見（年齢、性差、病脳期間、唾液腺におけるリンパ球浸潤程度、血清自己抗体値、唾液量など）との関連について検討を行った。

（倫理面への配慮）

本研究は生体材料を使用するため、主治医が説明文書を使用して患者に説明し、患者及び家族から書面で同意書を得る。解析結果の論文などでの公表に際しては、患者の個人を識別できる情報は公表しない。個人情報保護のため、検体は符号により匿名化し、符号を結びつける対応表および個人情報を実験責任者が厳重に保管する。

C. 研究結果

SS 患者は健常者と比較して、有意差はなかったものの、高値を示した。また SS 患者を口唇腺のリンパ球の浸潤程度で重度と軽度の 2 群に分けて検討を行ったところ、重度の症例で有意に高値であった。また、臨床

所見との関連について検討を行ったところ、年齢、性差、病脳期間、唾液量との間に相関は認めなかったものの、血清 IL-33 値が高かった SS 患者では、血清自己抗体値（抗 SS-A/B 抗体、抗核抗体）が高値であり、悪性リンパ腫や他の自己免疫疾患を併発しており、腺外症状を呈していた。

D. 考察

これらの結果より、血清 IL-33 の検索は SS の診断および病態進展のモニターに有用であることが示唆された。今後はさらに症例数を増やし、さらなる検討を行う予定である。

E. 結論

現在 SS の診断には多くの検査を要し、特に口唇腺・涙腺生検などは侵襲性が大きく、繰り返し行うことが困難である。この血清 IL-33 の検索は、SS の診断だけでなく、数少ない病態進展のモニターとして、臨床応用できる可能性が考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Moriyama M, Tanaka A, Maehara T, Furukawa S, Nakashima H, Nakamura S. T helper subsets in Sjögren's syndrome and IgG4-related dacryoadenitis and sialoadenitis: A critical review. J Autoimmun. in press, 2013.

2. 学会発表

1. 第12回九州シェーグレン症候群研究会 教育講演
「シェーグレン症候群の病態形成におけるThサブセットの関与」○森山雅文、田中昭彦、前原隆、古川祥子、林田淳之將、中村誠司 in 福岡 2013.5.18
2. 第10回口腔ケア学会 一般演題「唾液を用いたドライマウスの新しい診断方法および病態把握の試み」
○大山恵子、森山雅文、林田淳之將、篠崎昌一、田中昭彦、前原隆、家田晋輔、古川祥子、中村誠司
in 福岡 2013.6.22
3. 第22回日本シェーグレン症候群学会学術集会 シンポジウム「シェーグレン症候群の唾液腺における病態形成とT細胞サブセット」○中村誠司、森山雅文、田中昭彦、前原隆、古川祥子、家田晋輔、林田淳之將
in 大阪 2013.9.14
4. 12th International Symposium on Sjögren's Syndrome “Helper T subsets involved in the pathogenesis of localized autoimmune damage in Sjögren's syndrome” ○Seiji Nakamura, Masafumi Moriyama, et al. in Kyoto 2013.10.11
5. 12th International Symposium on Sjögren's Syndrome “Saliva as a potential tool for the diagnosis of dry mouth including Sjögren's syndrome” ○Keiko Ohyama, Masafumi Moriyama, Jun-Nosuke Hayashida, Akihiko Tanaka, Takashi Maehara, Shinsuke Ieda, Sachiko Furukawa, Yumi Imabayashi, Seiji Nakamura. in Kyoto 2013.10.11
6. 12th International Symposium on Sjögren's Syndrome “Imaging diagnosis for Sjögren's syndrome by scintigraphy - Comparison with sonography and sialography -” ○Mayumi Shimizu, Masafumi Moriyama, Kazutoshi Okamura, Toshiyuki Kawazu, Toru Chikui, Yukiko Ohyama, K Abe, Seiji Nakamura, Kazunori Yoshiura. in Kyoto 2013.10.11

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

シェーグレン症候群における口腔内病変と唾液中 EGF の関係に関する研究（3）
～ 3 年間の変化の評価～

研究分担者 佐野 統 兵庫医科大学医学部医学科 リウマチ・膠原病科 主任教授
研究協力者 東 直人 兵庫医科大学医学部医学科 リウマチ・膠原病科 講師

研究要旨

我々は平成 23、24 年度の本会議においてシェーグレン症候群（Sjögren's syndrome: SS）では進行に伴い唾液分泌量に加え唾液中 EGF 分泌量が低下し、唾液中 EGF 低下と口腔内 QOL 低下に強い関連性を認めたことに基づき、SS では唾液中 EGF 低下という「唾液の質」の低下が口腔内病変の修復の遷延化による口腔内病変の難治化や口腔内 QOL 低下と関連する可能性があることを提唱した。本年は同一 SS 患者における唾液中 EGF と口腔内 QOL の 3 年間の変化を評価した。その結果、SS 群では 3 年という短期間で口腔内 QOL スコアが増悪し、併行して唾液中 EGF 量が減少したが、唾液量に変化はなかった。非 SS 群ではそれらの変化はなく、SS における口腔内 QOL 低下と唾液中 EGF 減少という「唾液の質の低下」との関連性が示された。

A. 研究目的

シェーグレン症候群（Sjögren's syndrome: SS）患者では口腔乾燥症状に加え、口腔粘膜の萎縮、難治性口内炎、舌乳頭平低化などを生じ、口腔内の疼痛や強い不快感により quality of life (QOL) が著しく低下する。このような口腔内病変の形成は主に唾液分泌量の減少による口腔内クリアランスの低下に起因すると考えられている。しかし、唾液には種々の生理機能作用があり、その障害も病態形成に関与している可能性があると考えた。

Epidermal growth factor (EGF) は上皮細胞の細胞分裂と増殖を促進するサイトカインである。人体では主に唾液腺（特に耳下腺）と十二指腸のブルネル腺で産生され、口腔や消化管の粘膜保護作用や組織修復に促進的な役割を果たすとされる。

我々は平成 23、24 年度の本会議において SS では進行に伴い唾液分泌量に加え唾液中 EGF 分泌量が低下し、唾液中 EGF 低下と口腔内 QOL 低下に強い関連性を認めたことに基づき、SS では唾液量低下に唾液中 EGF 低下という「唾液の質」の低下が加わることで口腔内病変の難治化や口腔内 QOL の低下が増強する可能性があることを提唱した（Azuma N, Sano H, et al. Mod Rheumatol. (In press)）。

今回我々は同一 SS 患者における唾液中 EGF と口腔内 QOL の 3 年間の変化を評価した。SS 患者における唾液中 EGF の経時的変化を評価した報告はなく、SS の病態におけるその意義について検討し、加えて将来の治療介入の可能性を追求する。

B. 研究方法

（対象）

当科で継続診療中で、上記平成 23、24 年度報告研究

における対象（SS 40 人、非 SS（対照群）23 人）のうち 3 年間継続診療ができた SS 23 人、非 SS 14 人。SS 症例は本邦厚生省研究班による改訂診断基準（1999 年）およびアメリカ・ヨーロッパ基準（2002 年）をもとに満たす症例とした。また、口腔内病変の形成、唾液や EGF の分泌、口腔内 QOL に影響し得る要因を有する者（喫煙者、慢性アルコール中毒者、歯科処置中の者、SS 以外の病態のため口内炎などの口腔粘膜病変を有する者、抗パーキンソン薬・抗うつ薬・抗不安薬などを服用している者、コントロール不良の糖尿病に罹患している者、コントロール不良の逆流性食道炎に罹患している者、頭頸部悪性腫瘍の既往のある者、頭頸部に放射線照射を受けたことがある者）は除外した。

SS 群は原発性 SS（1° SS）が 14 人、続発性 SS（2° SS）が 9 人であり、2° SS における併存疾患の内訳は関節リウマチ（RA）3 人、全身性エリテマトーデス（SLE）3 人、全身性強皮症 2 人、混合性結合組織病 1 人であった。また、非 SS 群の内訳は RA 6 人、リウマチ性多発筋痛症 2 人、気管支喘息 1 人、再発性多発性軟骨炎 1 人、SLE1 人、皮膚筋炎 1 人、SAPHO 症候群 1 人、成人発症ステイル病 1 人であった。

（方法）

1）唾液採取および唾液中 EGF 測定：全症例で早朝起床直後（朝食後かつ内服薬服用前）に同一のチューインガム（フリーゾーンガム（ハイミント）；ロツテ、東京）を用いたガム試験で刺激下全唾液（ml/10 分）を採取した。この唾液試料を遠心分離して得られた上清を -80°C で凍結保存した。EGF 濃度の測定直前に融解後再度遠心分離して得られた上清を使用して、EGF 濃度を ELISA 法（Quantikine；R&D System, Minneapolis, MN）で測定した。

2）口腔内病変・QOL の定量的評価：口腔内病変・QOL の定量的評価法として、口腔内 QOL の指標として諸外

国で活用されている Oral Health Impact Profile (OHIP) の日本語版 (OHIP-J) を基に、SS の口腔内病変の評価において有用性が報告されている (Stewart CM, et al. J Am Dent Assoc. 139: 291-299, 2008) OHIP の簡易版である OHIP-14 による問診法を実施した。14 の質問項目に対する回答は、「まったくない」=0、「ほとんどない」=1、「時々」=2、「しばしば」=3、「いつも」=4 とそれぞれ数値化され、そのスコアを合算して値を口腔内 QOL スコアとして算出した (/56 点満点)。

3) 統計学的解析

ガム試験で得られた刺激下全唾液の質量 (ml/10 分)、唾液中 EGF 濃度と同総量および OHIP-14 による問診法で得られた口腔内 QOL スコアの関連性について統計学的解析を行った。数的データは平均±標準偏差 (SD) で示す。各群の比較には Mann-Whitney U 検定、Fisher 直接確立試験、Yates 補正カイ二乗検定、Wilcoxon の符号付順位検定を、相関は Spearman の順位相関係数を用い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

(倫理面への配慮)

18 才以上の同意が得られる SS 患者および対照群として非 SS 患者を対象とした。担当医が説明文書を基に患者に研究内容について十分な説明を行い、文書による同意を得る。20 才未満の患者では本人および代諾者の文書による同意を得る。原則として同意が得られた患者を対象とした研究であり、認知症や精神疾患などに罹患し、インフォームドコンセントが得られない者は含まない。また、18 才未満の者も対象としない。

同意が得られた者の臨床情報を収集し、患者名および患者 ID 番号と関連しない登録 ID 番号を付することで匿名化を行い、またそのデータはパスワード管理とし、パスワードは研究分担者と研究協力者が管理する。この登録 ID 番号化は連結可能匿名化であるが、登録 ID 以降の統計処理などにおいては患者の個人情報特定することは一切できないため患者の個人情報は最大限守られる。また、研究を完全に終了する場合 (引き継がれない場合) は、臨床情報を完全に削除する。その場合も既に匿名化はなされており、個人情報保護の点で問題はない。

本研究は診療時に得られた臨床情報とその解析による観察研究のみであり、患者に対して直接的不利益が及ぶことはない。費用面についてもガム試験、OHIP-14 問診票を用いた試験ともに費用は一切発生しない。唾液中 EGF の測定は当科で購入した測定キットおよび試験薬を用い、研究分担者または研究協力者が測定するため、これについても患者負担となる費用は一切発生しない。その他、SS に関する診療において必要とされる検査、治療についての患者負担費用は従来通り保険診療範囲内での支払いとなる。

なお、本研究は兵庫医科大学倫理委員会審査を受け、承認を得ている (第 758 号)。

C. 研究結果

SS 群は平均年齢が 59.5 ± 12.7 才 (38-83 才)、性別

は男性 2 人、女性 21 人、非 SS 群は平均年齢が 59.9 ± 15.2 才 (33-81 才)、性別は男性 4 人、女性 10 人であり、ともに有意差はなかった ($p=0.468$, $p=0.173$)。SS 群の平均罹病期間は 5.5 ± 3.9 年 (0.2-11 年) であった。

【1】SS 群では OHIP-14 スコアが 3 年後有意に高値 (口腔内 QOL が増悪) であった (10.2 ± 8.8 vs 12.6 ± 9.2 ; $p=0.040$)。3 年間で唾液量に変化はなかったが (8.1 ± 5.3 vs 7.4 ± 5.1 ml/10 分; $p=0.149$)、唾液中 EGF 量は有意に低下していた (10158.4 ± 9820.9 vs 8352.8 ± 7813.3 pg/10 分; $p=0.032$)。一方、非 SS 群では 3 年間で OHIP-14 スコア、唾液量、唾液中 EGF 量に変化はなかった (9.1 ± 6.8 vs 10.7 ± 9.4 ; $p=0.169$, 16.8 ± 6.7 vs 16.7 ± 6.0 ml/10 分; $p=0.628$, 13623.1 ± 9546.2 vs 11904.9 ± 6995.4 pg/10 分; $p=0.184$)。

【2】SS 群には様々な患者が混在しているので SS 群を本研究開始時の罹病期間と 3 年間の OHIP-14 スコア変化量により二群化した。

(1) 長期群 (罹病期間 6 年以上; $n=6$) では 3 年間で唾液量に変化はなかったが (3.6 ± 1.4 vs 3.3 ± 1.6 ml/10 分; $p=0.058$)、唾液中 EGF 量は有意に低下していた (3652.4 ± 4211.2 vs 1640.9 ± 1774.8 pg/10 分; $p=0.015$)。一方、早期群 (同 5 年以下; $n=7$) では 3 年間で唾液量、唾液中 EGF 量に変化はなかった (10.5 ± 7.0 vs 9.4 ± 5.4 ml/10 分; $p=0.306$, 15646.9 ± 12986.2 vs 13187.6 ± 9902.1 pg/10 分; $p=0.064$)。

(2) 増悪群 (3 年間で OHIP-14 スコアが増加; $n=14$) では 3 年間で唾液量と唾液中 EGF 量が有意に低下していた (8.0 ± 4.6 vs 6.8 ± 4.6 ml/10 分; $p=0.042$, 9548.6 ± 8063.6 vs 7724.2 ± 6901.4 pg/10 分; $p=0.048$)。一方、軽減群 (同減少; $n=8$) では 3 年間で唾液量、唾液中 EGF 量に変化はなかった (9.0 ± 6.3 vs 9.0 ± 5.9 ml/10 分; $p=1$, 12448.0 ± 12727.1 vs 10310.9 ± 9565.9 pg/10 分; $p=0.105$)。

【3】SS 群で本研究開始時に暫定的に重症群とした OHIP-14 スコアが 14 以上の患者群では 3 年間の同スコア変化量と唾液中 EGF 量変化率の間に強い負の相関を認めた ($r = -0.847$, $p=0.008$)。OHIP-14 スコア変化量と唾液量変化率との間には相関は見られなかった。

D. 考察

SS 群では 3 年という短期間で口腔内 QOL スコアが増悪し、併行して唾液中 EGF 量が減少したが、唾液量に変化はなかった。非 SS 群ではそれらの変化はなく、SS における口腔内 QOL 低下と唾液中 EGF 減少という「唾液の質の低下」との関連性が示された。この関連性は SS の罹病期間が長く、口腔内 QOL が低い患者群においてより顕著に認められた。これらより罹病期間の長期化に伴い口腔内病変の難治化や口腔内 QOL 低下を来す症例では口腔内への EGF の補充による粘膜面への付着によってそれらの改善が期待でき、新しい治療介入ポイントになり得ると考えられた。

E. 結論

SS では進行に伴い唾液中 EGF 量が低下し、この「唾液の質の低下」が口腔内 QOL の低下に関与することが示唆された。これは短期に進行し、罹病期間が長く、口腔内 QOL が低い症例程顕著であった。

F. 健康危険情報

該当事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Azuma N, Katada Y, Kitano S, Sekiguchi M, Kitano M, Nishioka A, Hashimoto N, Matsui K, Iwasaki T, Sano H. Correlation between salivary epidermal growth factor levels and refractory intraoral manifestations in patients with Sjögren' s syndrome Mod. Rheumatol. (in press)

2. 学会発表

該当事項なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

該当事項なし。

2. 実用新案登録

該当事項なし。

3. その他

該当事項なし。

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

エストロゲンによる EB ウイルス再活性化の制御に関する研究

研究分担者 斎藤一郎 鶴見大学歯学部病理学講座 教授
研究協力者 井上裕子 日本薬科大学薬学部生命医療薬学 准教授

研究要旨

Epstein-Barr virus (EB ウイルス) の再活性化はシェーグレン症候群をはじめとする自己免疫疾患の発症に関与している可能性が報告されており、その発症には女性優位の性差が認められる。本課題では、エストロゲンや女性ホルモン様作用を示す大豆イソフラボンが EB ウイルス再活性化を制御する可能性があるかについて検討を行った。ヒト唾液腺上皮細胞の HSY を用いてエストロゲン受容体 (ER) を介した EB ウイルス再活性化の指標である BZLF1 の転写活性化の制御について、BZLF1 遺伝子のプロモーターアッセイを行った。その結果、エストロゲン、大豆イソフラボンは TPA により活性化される BZLF1 プロモーター活性を抑制した。

A. 研究目的

Epstein-Barr virus (EB ウイルス) は健常人の大半が潜伏感染しており、その再活性化は、慢性疲労症候群、悪性腫瘍、シェーグレン症候群 (SS) をはじめとした自己免疫疾患の発症に関与していることが報告されており、昨年度までに、ダイオキシン類がダイオキシン受容体を介して EB ウイルスを再活性化し、シェーグレン症候群 (SS) 患者の唾液中に EB ウイルス再活性化およびダイオキシン受容体の標的遺伝子である CYP1A1 の転写活性を増強する因子が存在することを報告してきた。SS をはじめとした自己免疫疾患の発症には女性優位な性差が存在することからその発症にエストロゲンの関与が報告されていることから今年度はエストロゲンがエストロゲン受容体 (ER) を介して EB ウイルス再活性化を制御できるか否かについて検討を行った。

B. 研究方法

細胞はヒト唾液腺上皮細胞株の HSY を用いた。ER を介した検討を行うため、ER 発現レンチウイルスベクターを作成し、HSY 細胞に遺伝子導入後、恒常的に ER を発現した HSY 細胞株を得た。EB ウイルスの再活性化の検討は、EB ウイルス再活性化に必須な遺伝子である BZLF1 のプロモーターをルシフェラーゼ遺伝子に連結したレポータープラスミド (Zp221-Luc) を用いて行った。ER 発現 HSY 細胞に Zp221-Luc を遺伝子導入し、リガンドとしてエストロゲンに加えてエストロゲ

ン様作用を示す大豆イソフラボンのダイゼインおよびゲネステインを用いた。リガンド添加 24、48 時間後に細胞を回収し、その溶解液を得てルシフェラーゼアッセイを行った。

C. 研究結果

HSY 細胞に ER レンチウイルスベクターを感染させ、恒常的に ER を発現する細胞株を得た。この細胞に Zp221-Luc を遺伝子導入し、TPA および n-butyl を加えると Zp221-Luc 活性の増強を認めた。この条件下でエストロゲンを添加し、Zp221-Luc 活性を測定したところ、添加 24 時間に TPA/n-butyl による活性増強が顕著に抑制していることが確認できた。さらに、エストロゲン作用を示す植物エストロゲンのダイゼイン、ゲネステインを用いて同様の検討を行った結果、これらについても、リガンド添加後 24 時間でエストロゲン同様に Zp221-Luc 活性の顕著な抑制が認められた。更に、EB ウイルス感染 B 細胞株の Akata 細胞を用いた検討でも、エストロゲンは Akata 細胞からの BZLF1 遺伝子発現を抑制することが Western Blot により確認できた。

D. 考察

今回は、EB ウイルス再活性化のモデルとして、既知の再活性化因子である TPA/n-butyl を用いて検討を行った。TPA による BZLF1 遺伝子発現の様式は非常に複雑で様々なセカンドメッセンジャーや

転写因子が関わっている事が知られているが、エストロゲンや大豆イソフラボンはERを介してTPAによるBZLF1遺伝子の転写活性化を抑制したことが明らかとなった。昨年度までに、ダイオキシン類によるBZLF1遺伝子転写活性化について報告してきたが、ダイオキシン類はダイオキシン受容体を介した転写活性化のみならず、ERを介した転写活性化も誘導することが知られていることから、エストロゲンおよびダイオキシンによるERを介したEBウイルス再活性化の相互作用について更なる検討が必要である。

E. 結論

エストロゲンおよび大豆イソフラボンは唾液腺上皮細胞において、EBウイルスの再活性化を抑制することが確認できた。このことから、更年期以降の女性に多く発症するSSではエストロゲン量の急激な低下によりEBウイルス再活性化を制御できず、SS発症の一旦となる可能性が推測され、これに対して大豆イソフラボンはエストロゲン様作用を示し、EBウイルス再活性化を抑制することで、EBウイルス再活性化を介したSS発症に予防的に作用する可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Okamoto MR, Kamoi M, Yamachika S, Tsurumoto A, Imamura T, Yamamoto K, Kadomatsu S, Saito I, Maeda N, Nakagawa Y. Efficacy of Fungiflora Y staining for the diagnosis of oral erythematous candidiasis. *Gerodontology*.30:220-225, 2013.
2. Tsuboi H, Hagiwara S, Asashima H, Umehara H, Kawakami A, Nakamura H, Sano H, Tsubota K, Ogawa Y, Takamura E, Saito I, Inoue H, Nakamura S, Moriyama M, Takeuchi T, Tanaka Y, Hirata S, Mimori T, Matsumoto I, Sumida T. Validation of different sets of criteria for the diagnosis of Sjogren's syndrome in Japanese patients. *Modern rheumatology / the Japan Rheumatism Association*.23:219-225, 2013.
3. Yamamura Y, Yamada H, Sakurai T, Ide F, Inoue H, Muramatsu T, Mishima K, Hamada Y, Saito I. Treatment of salivary gland hypofunction by transplantation with dental pulp cells. *Archives of oral biology*.58:935-942, 2013.

4. Kimori H, Yamamoto K, Yamachika S, Tsurumoto A, Kamikawa Y, Sasao M, Morito M, Saito I, Ohshima T, Maeda N, Nakagawa Y. Factors associated with the presence of atrophic tongue in patients with dry mouth. *Gerodontology*. 2013.
5. Tsuboi H, Asashima H, Takai C, Hagiwara S, Hagiya C, Yokosawa M, Hirota T, Umehara H, Kawakami A, Nakamura H, Sano H, Tsubota K, Ogawa Y, Takamura E, Saito I, Inoue H, Nakamura S, Moriyama M, Takeuchi T, Tanaka Y, Hirata S, Mimori T, Yoshifuji H, Ohta A, Matsumoto I, Sumida T. Primary and secondary surveys on epidemiology of Sjogren's syndrome in Japan. *Modern rheumatology / the Japan Rheumatism Association*. 2013.

2. 学会発表

1. 第13回抗加齢医学会「カロリー制限による唾液分泌能改善効果の分子機構の解明」 井上裕子、美島健二、清水孝彦、村松敬、伊藤由美、梁洪淵、井出文雄、川島素子、坪田一男、斎藤一郎 2013
2. 第13回抗加齢医学会 ケルセチンによる唾液分泌機能亢進の可能性の検討 高橋絢子、井上裕子、梁洪淵、伊藤由美、村松敬、斎藤一郎 2013
3. 第101回日本病理学会 カロリー制限による唾液分泌能改善効果の分子機構の解明 井上裕子、美島健二、清水孝彦、村松敬、伊藤由美、梁洪淵、井出文雄、斎藤一郎 2013
4. 第101回日本病理学会 唾液分泌障害に対するケルセチンの効果の検討 高橋絢子、井上裕子、美島健二、伊藤由美、梁洪淵、櫻井孝、井出文雄、斎藤一郎 2013
5. 12th International symposium on Sjogren's syndrome [Aryl Hydrocarbon Receptor-Mediated Induction of Epstein-Barr Virus Reactivation as a Risk Factor for Sjogren's Syndrome] Hiroko Inoue, Ichiro Saito 2013

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
なし。
2. 実用新案登録
なし。
3. その他
特になし。

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

免疫性重症ドライアイの発症と進展機序の解明に関する研究

研究分担者 坪田一男 慶應義塾大学 医学部 眼科 教授
研究協力者 小川葉子 慶應義塾大学 医学部 眼科 特任准教授

研究要旨

シェーグレン症候群類似のドライアイを呈するマウスモデルにおける涙腺の免疫応答と加齢的变化について研究し、重症ドライアイを呈するマウスモデルの涙腺に老化マーカーや酸化ストレスマーカーを発現する炎症細胞の浸潤を認め、免疫ブロット法や蛍光免疫染色の方法を組み合わせ、老化細胞はマクロファージであることを見出した。臨床面では、倫理申請承認後、シェーグレン症候群症例 11 例の遺伝子解析の検体を集積し研究班のゲノム解析センターへお送りした。シェーグレン症候群症例の診断時期、治療内容などの臨床背景について data を収集した。

A. 研究目的

近年、ドライアイの眼表面および涙腺には酸化ストレスが亢進し涙腺の機能不全をきたすことが報告されている (Kojima T, Am J Pathol, 2012)。そこで、シェーグレン症候群類似のドライアイを呈するマウスモデルにおける涙腺の免疫応答と加齢的变化について追究し、その病態を解明することを目的とした。

臨床では、シェーグレン症候群について遺伝子解析を進めることで、難治性疾患である疾患群の診療を向上させることを目的とした。

B. 研究方法

B10. D2 (H-2d) マウスの骨髄細胞と脾臓細胞を、放射線照射後の BALB/c (H-2d) レシピエントマウスに移植し慢性 GVHD モデルを作成した (Zhang Y, J Immunol. 2002)。皮膚、肺、小腸、涙腺、唾液腺にシェーグレン症候群涙腺組織所見に酷似した早期炎症細胞浸潤を認めるモデルを作成した。BALB/c 野生型若年マウス (8 週齢)、BALB/c 野生型老齢マウス (102 週齢)、重症ドライアイマウスモデルの涙腺を用いて、各群の涙腺について蛍光染色を含む免疫組織学的検討と超微形態を含めた病理組織学的検討を行い特に涙腺に浸潤している炎症細胞の老化マーカー p16, 酸化ストレスマーカーの発現の有無、と発現細胞の種類および局在の検討をした。さらに、免疫ブロットを用いて慢性 GVHD をはじめとする各群の涙腺の酸化ストレス発現状態を検討

した。

ゲノム解析研究では疾患感受性遺伝子の検索のためシェーグレン症候群症例より同意の得られた症例の血液検体を収集し筑波大学ゲノム研究センターへお送りした。それぞれの症例について臨床的背景を調査した。

(倫理面への配慮)

涙腺生検検体における研究については、慶應義塾大学医学部 倫理委員会 課題名 「ドライアイにおける涙腺、角結膜、血液および涙液の病態解析」により承認を得ている。

遺伝子解析については 「全身性エリテマトーデスおよびその類縁疾患における遺伝子解析」により承認を得ている。

慶應義塾大学医学部動物実験ガイドラインの諸規定に従い動物福祉の精神の沿った、科学的な動物実験が行われるよう配慮している。動物実験のプロトコルを作成して、学内の動物実験委員会の承認を得ている。(承認番号 09152)

C. 研究結果

涙腺組織には、過剰な線維化、炎症性細胞浸潤を道メタ。シェーグレン症候群類似のドライアイを呈するマウスモデルの涙腺における炎症細胞には老化マーカー P16 を発現する炎症性細胞が浸潤し、発症早期に涙腺中等度導管毛細血管付近に酸化ストレスマーカーを発現するマクロファージが浸潤していた。浸潤しているマクロファージは MHC

class II, および CD40 を発現し CD154 陽性 T 細胞と相互作用をしていた。涙腺全体の Western blotting では老齢マウス涙腺と同様に、重症ドライアイマウスモデルで酸化ストレスマーカーが上昇していた。酸化ストレスの発現が亢進している細胞をそれぞれの免疫担当細胞のマーカーで検索すると CD68 陽性マクロファージであることが確かめられた。

ゲノム関連解析では 11 例の症例について臨床背景は全例女性であり、一次性シェーグレン症候群 6 例 二次性シェーグレン症候群 5 例であった。抗セントロメア抗体陽性例が 1 例、抗リン脂質抗体陽性例が 1 例認められた。

D. 考察

マクロファージはドライアイ涙腺において抗原提示細胞として働き、サイトカイン、ケモカイン等による線維芽細胞の組織への浸潤の引き金となりその一部は老化マクロファージが関与している可能性が考えられた。T 細胞との相互作用により炎症が発症、遷延化していくと考えられた。老化マクロファージが持続的に存在し、慢性炎症による臓器不全に至りドライアイの進展に寄与している可能性が考えられた。

ゲノム解析センターでのゲノム関連解析により、今後シェーグレン症候群特異的な診断、治療の向上に役立つ可能性が高いと考えられた。

E. 結論

ドライアイマウスモデルの検討より、シェーグレン症候群様の免疫原性の重症ドライアイの発症と遷延化にマクロファージの老化が関与することが推察された。

F. 健康危険情報

特記すべきものなし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ogawa Y, Kim SK, Dana R, Clayton J, Jain S, Rosenblatt MI, Perez VL, Shikari H, Riemens A, Tsubota K. International chronic ocular graft-vs-host-disease (GVHD) consensus group: Proposed diagnostic criteria for chronic GVHD (Part I). *Sci Rep*. 2013 Dec;3:3419.
2. Kawai M, Ogawa Y, Shimmura S, Ohta S, Suzuki T, Kawamura N, Kuwana M, Kawakami Y, Tsubota K. Expression and localization of aging

markers in lacrimal gland of chronic graft-versus-host disease. *Sci Rep* 2013 Aug; 3: 2455

4. Yaguchi S, Ogawa Y, Shimmura S, Kawakita T, Hatou S, Satofuka S, Nakamura S, Imada T, Miyashita H, Yoshida S, Yaguchi T, Ozawa Y, Mori T, Okamoto S, Kawakami Y, Ishida S, Tsubota K. Angiotensin II type 1 receptor antagonist attenuates lacrimal gland, lung, and liver fibrosis in a murine model of chronic graft-versus-host disease. *PLoS ONE*. 2013 Jan; 8(6): e64724.
 5. Tsuboi H, Hagiwara S, Asashima H, Umehara H, Kawakami A, Nakamura H, Sano H, Tsubota K, Ogawa Y, Takamura E, Saito I, Inoue H, Nakamura S, Moriyama M, Takeuchi T, Tanaka Y, Hirata S, Mimori T, Matsumoto I, Sumida T. Validation of different sets of criteria for the diagnosis of Sjögren's syndrome in Japanese patients. *Mod Rheumatol*. 2013 Mar;23(2):219-25.
 6. Ogawa Y, Tsubota K. Review Article. Dry eye disease and inflammation. *Inflamm Regen*. 2013 Nov; 33 (5): 238-48.
 7. 小川 葉子. 「13. 眼表面疾患とドライアイ 慢性移植片対宿主病とドライアイ」専門医のための眼科診療クオリファイ 19 ドライアイスペシャリストへの道 中山書店 372-5. 2013/11/05.
 8. 谷口紗織, 小川 葉子, 坪田一男. 「7. コアメカニズムの考え方と治療 眼鏡による治療」専門医のための眼科診療クオリファイ 19 ドライアイスペシャリストへの道 中山書店 256-7. 2013/11/05.
 9. 小川 葉子, 坪田一男. 「特集 Clinical Science シェーグレン症候群：最新の知見 シェーグレン症候群とドライアイ」炎症と免疫 先端医学社 437-442. 2013/08/20.
 10. 小川 葉子. 「ドライアイ 外来で診る 眼科疾患 慶應義塾大学薬学部 51-70. 2013/07.
- ##### 2. 学会発表
1. 小川 葉子. シンポジウム 1 シェーグレン症候群の臓器病変と腺病変の最前線 炎症とドライアイ. 第 22 回日本シェーグレン症候群学会学術集会. 大阪. 2013/9/13-9/14.
 2. 鴨居瑞加, 小川 葉子, 中村 滋, 村戸ドール,

永井俊弘, 小幡博人, 伊藤正孝, 川北哲也, 岡田保典, 河上 裕, 榛村重人, 坪田一男. 涙腺上皮細胞における分泌顆粒の過剰な貯留は VDT 作業者の非シェーグレンタイプドライアイに関連する. 第 22 回日本シェーグレン症候群学会学術集会 大阪 2013/9/13-9/14

3. 稲葉隆明, 久恒智博, 川北哲也, 佐々木恭正, 小川 葉子, 御子柴克明, 坪田一男. ムスカリン性アセチルコリン受容体欠損マウスの涙液分泌. 第 18 回シェーグレン症候群セミナー 東京 2013/05/25

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

特記すべきものなし。

2. 実用新案登録

特記すべきものなし。

3. その他

特記すべきものなし。

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

シェーグレン症候群培養唾液腺上皮細胞におけるケモカイン、サイトカイン発現解析

研究分担者	梅原久範	金沢医科大学医学部血液免疫内科	教授
研究協力者	田中真生	金沢医科大学医学部血液免疫内科	准教授
研究協力者	河南崇典	金沢医科大学医学部血液免疫内科	講師
研究協力者	杉本直俊	金沢大学医学部生理学第一	准教授

研究要旨

シェーグレン症候群(SS)の病態は、唾液腺・涙腺組織へのリンパ球のホーミングと活性化、それに伴う腺細胞のアポトーシスの誘導といった複数の因子の複合的、連鎖的な作用によって形成されている。その過程には、局所で産生されるケモカイン、サイトカインおよび浸潤細胞と組織構成細胞との相互作用が重要である。組織中の様々な細胞と、複合する相互作用をシンプルに解析するため、SS および non-SS 由来ヒト口唇小唾液腺培養細胞を用い、SS における慢性炎症の継続に中心的な役割を果たす IFN γ と、その誘導により産生されるケモカインおよびサイトカインについて検討を行った。SS 唾液腺培養上皮細胞では、免疫調節性サイトカインである TGF- β 産生能が non-SS 細胞に比べ低下し、IFN γ 刺激による IP-10, Mig, IL-6 の過剰産生が引き起こされることを明らかにした。この IL-6 産生亢進/TGF- β 産生能低下による Treg 細胞/Th17 細胞への分化のバランスの偏りが、唾液腺局所での炎症を持続させている一因となっている可能性が推察された。

A. 研究目的

シェーグレン症候群(SS)の病態は、唾液腺・涙腺組織へのリンパ球のホーミングと活性化、それに伴う腺細胞のアポトーシスの誘導といった複数の因子の複合的、連鎖的な作用によって形成されている。その過程には、局所で産生されるケモカイン、サイトカインおよび浸潤細胞と組織構成細胞との相互作用が重要である。IFN γ は、リンパ球上に HLA-DR や BAFF、CD80、CD86 や CXCR3 などの発現を誘導し、導管上皮細胞に IP-10(CXCL10) と Mig(CXCL9) の発現を誘導することにより、CXCR3 陽性活性化T細胞を導管周囲に集簇させる。本研究では、SS および non-SS 由来ヒト口唇小唾液腺培養細胞を用い、SS における慢性炎症の継続に中心的な役割を果たす IFN γ と、その誘導により産生されるケモカインおよびサイトカインについて検討を行った。

B. 研究方法

ヒト唾液腺由来の初代培養細胞と、継代を行った細胞の経時的な遺伝子発現の変化、細胞の表面抗原解析、ヒト唾液腺培養上皮細胞の IFN γ 刺激下での細胞増殖、アポトーシスを解析した。また、

SS もしくは non-SS 由来唾液腺培養上皮細胞を、IFN γ の存在および非存在下にて培養し、培養上清中の IP-10、Mig、I-TAC のケモカインおよび IL-6、TGF- β のサイトカインを ELISA 法にて測定した。

C. 研究結果

- ① SS また non-SS 由来唾液腺培養上皮細胞を解析した結果、表面抗原解析では、上皮系マーカー、機能分子ともに両者間において著変はなかった。遺伝子の発現動態も両者間に著変を認めなかった。
- ② IFN γ 刺激によるヒト唾液腺培養上皮細胞の細胞増殖、アポトーシスには特段の差は認められなかった。
- ③ IFN γ により IP-10、Mig、I-TAC の T 細胞遊走性ケモカインが誘導され、タンパク質産生量は non-SS に比較して増大していた。
- ④ IFN γ 刺激によるサイトカイン産生において、IL-6 と TGF- β の同時解析を行ったところ、SS 唾液腺培養上皮細胞による IL-6 産生の亢進、および TGF- β の産生低下を認めた。

D. 考察

SS 唾液腺培養上皮細胞と non-SS 唾液腺培養上皮細胞によるケモカインおよびサイトカイン産生

能を検討した結果、SS 唾液腺培養上皮細胞の IFN γ 刺激に対する過剰反応性および TGF- β の産生能低下が認められた。SS 唾液腺培養上皮細胞は、免疫調節性サイトカインである TGF- β 産生能が non-SS 細胞に比べて低下しているため、IFN γ 刺激による IP-10, Mig, IL-6 の過剰産生をもたらしている可能性が示唆された。また、ナイーブヘルパーT細胞からの Treg 細胞/Th17 細胞への分化は、IL-6 と TGF- β により調整されている。すなわち、IL-6 は、本来 TGF- β で誘導される Treg 特異的転写因子 Foxp3 の発現を抑制し、ナイーブヘルパーT細胞から Treg の分化を抑制する。SS 唾液腺培養上皮細胞の IL-6 産生亢進/TGF- β 産生能低下は、Treg 細胞/Th17 細胞への分化のバランスに関与し、唾液腺局所での炎症を持続させている一因となっている可能性が考えられる。

E. 結論

SS 唾液腺培養上皮細胞では、免疫調節性サイトカインである TGF- β 産生能が、non-SS 細胞に比べて低下しているため、IFN γ 刺激による IP-10, Mig, IL-6 の過剰産生が引き起こされる。この IL-6 産生亢進/TGF- β 産生能低下による Treg 細胞/Th17 細胞への分化のバランスの偏りが、唾液腺局所での炎症を持続させている一因となっている可能性が推察された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ito K, Yamada K, Mizushima I, Azumi M, Fujii H, Mizotomi K, Matsumura M, Hayashi K, Yamagishi M, Umehara H, Yamaguchi Y, Nagata M, Kawano M. Henoch-Schönlein purpura nephritis in a patient with IgG4-related disease: a possible association, *Clin. Nephrol.*, 79: 246-52. 2013.
2. Tsuboi H, Asashima H, Takai C, Hagiwara S, Hagiya C, Yokosawa M, Hirota T, Umehara H, Kawakami A, Nakamura H, Sano H, Tsubota K, Ogawa Y, Takamura E, Saito I, Inoue H, Nakamura S, Moriyama M, Takeuchi T, Tanaka Y, Hirata S, Mimori T, Yoshifuji H, Ohta A, Matsumoto I, Sumida T. Primary and secondary surveys on epidemiology of Sjögren's syndrome in Japan, *Mod. Rheumatol.*, in press, 2013.
3. Chen Y, Sun W, Gao R, Su Y, Umehara H, Dong L, Gong F. The role of high mobility group box chromosomal protein 1 in rheumatoid arthritis, *Rheumatology (Oxford)*, 52: 1739-1747. 2013.
4. Dong L, Chen Y, Masaki Y, Okazaki T, Umehara H. Possible mechanisms of lymphoma development in Sjögren's syndrome, *Curr. Immunol. Rev.*, 9: 13-22. 2013.
5. Tsuboi H, Hagiwara S, Asashima H, Umehara H, Kawakami A, Nakamura H, Sano H, Tsubota K, Ogawa Y, Takamura E, Satio I, Inoue H, Nakamura S, Moriyama M, Takeuchi T, Tanaka Y, Hirata S, Mimori T, Matsumoto I, Sumida T. Validation of different sets of criteria for the diagnosis of Sjögren's syndrome in Japanese patients, *Mod. Rheumatol.*, 23: 219-225. 2013.
6. Sugimoto N, Matsuzaki K, Ishibashi H, Tanaka M, Sawaki T, Fujita Y, Kawanami T, Masaki Y, Okazaki T, Sekine J, Koizumi S, Yachie A, Umehara H, Shido O. Upregulation of aqiaaporin expression in the salivary glands of heat-acclimated rats, *Sci Rep*, in press, 2013.
7. Stone J.H., Chan J.K.C., Deshpande V, Okazaki K, Umehara H, Zen Y. IgG4-related disease, *J. Rheumatol.*, 2013 (2013), Article ID 532612, 2013.
8. Fujita Y, Fujii T, Mimori T, Sato T, Nakamura T, Iwao H, Nakajima A, Miki M, Sakai T, Kawanami T, Tanaka M, Masaki Y, Fukushima T, Okazaki T, Umehara H. Deficient Leptin Signaling Ameliorates Systemic Lupus Erythematosus Lesions in MRL/Mp-Faslpr Mice. *J Immunol.* 192(3): 979-84. 2013.
9. Umehara H, Okazaki K, Masaki Y, Kawano M, Yamamoto M, Saeki T, Matsui S, Yoshino T, Nakamura S, Kawa S, Hamano H, Kamisawa T, Shimosegawa T, Shimatsu A, Nakamura S, Ito T, Notohara K, Sumida T, Tanaka Y, Mimori T, Chiba T, Mishima M, Hibi T, Tsubouchi H, Inui K, Ohara H and A. J. I. team "Comprehensive Diagnostic Criteria (CDC criteria) for IgG4-related disease (IgG4-RD), 2011." *Mod. Rheum.* 22(1): 21-30.2012
10. Umehara H, Okazaki K, Masaki Y, Kawano M, Yamamoto M, Saeki T, Matsui S, Sumida T, Mimori T, Tanaka Y, Tsubota K, Yoshino T,

- Kawa S, Suzuki R, Takegami T, Tomosugi N, Kurose N, Ishigaki Y, Azumi A, Kojima M, Nakamura S, Inoue D and the Research Program for Intractable Disease by Ministry of Health, Labor and Welfare (MHLW) Japan G4 team. "A Novel Clinical Entity, IgG4-Related Disease (IgG4RD) - General Concept and Details-." *Mod Rheum* 22(1): 1-14.2012
11. Umehara H. "A new clinical entity: IgG4-related disease (IgG4-RD) discovered in the 21st century." *Intern Med* 51(8): 821-822. 2012.
 12. Ito K, Yamada K, Mizushima I, Aizu M, Fujii H, Mizutomi K, Matsumura M, Hayashi K, Yamagishi M, Umehara H, Yamaguchi Y, Nagata M, and Kawano M. Henoch-Schonlein purpura nephritis in a patient with IgG4-related disease: A possible association. *Clin Nephrol*, (accession number 22841022) 2012.
 13. Shiboski, S, Shiboski C, Criswell L, Baer A, Challacombe S, Lanfranchi H, Schiødt M, Umehara H, Vivino F, Zhao Y, Dong Y, Greenspan D, Heidenreich A, Helin P, Kirkham B, Kitagawa K, Larkin G, Li M, Lietman T, Lindegaard J, McNamara N, Sack K, Shirlaw P, Sugai S, Vollenweider C, Whitcher J, Wu A, Zhang S, Zhang W, Greenspan J, Daniels T and f. t. S. s. I. C. C. Alliance "American College of Rheumatology Classification Criteria for Sjogrens Syndrome: A Data-Driven, Expert Consensus Approach in the Sjogren's International Collaborative Clinical Cohort." *Arthritis Care & Research* 64(4): 475-487.2012
 14. Murakami, K, Tanaka M, Usui T, Kawabata D, Shiomi A, Iguchi-Hashimoto M, Shimizu M, Yukawa N, Yoshifuji H, Nojima T, Ohmura K, Fujii T, Umehara H, and Mimori T. "Follistatin-related protein/follistatin-like 1 evokes an innate immune response via CD14 and toll-like receptor 4." *FEBS Lett* 586(4): 319-324. 2012.
 15. Mizushima, I, Yamada K, Fujii H, Inoue D, Umehara H, Yamagishi M, Yamaguchi Y, Nagata M, Matsumura M and Kawano M. "Clinical and histological changes associated with corticosteroid therapy in IgG4-related tubulointerstitial nephritis." *Mod Rheumatol* DOI 10.1007/s10165-011-0589-2. 2012
 16. Malladi, A. S., Sack K. E., Shiboski S. C., Shiboski C. H., Baer A. N., Banushree R., Dong Y, Helin P, Kirkham B. W., Li M., Sugai S, Umehara H, Vivino F. B., Vollenweider C. F., Zhang W, Zhao Y, Greenspan J. S., Daniels T. E. and Criswell L. A. "Primary Sjogren's syndrome as a systemic disease: a study of participants enrolled in an international Sjogren's syndrome registry." *Arthritis Care Res (Hoboken)* 64(6): 911-918. 2012.
 17. Kawanami T, Sawaki T, Sakai T, Miki M, Iwao H, Nakajima A, et al. Skewed production of IL-6 and TGFβ by cultured salivary gland epithelial cells from patients with Sjögren's syndrome. *PLoS One*. 2012; 7(10):e45689. doi: 10.1371/journal.pone.0045689.
 18. Sugimoto N, Shido O, Matsuzaki K, Ohno-Shosaku T, Hitomi Y, Tanaka M, et al. Cellular heat acclimation regulates cell growth, cell morphology, mitogen-activated protein kinase activation, and expression of aquaporins in mouse fibroblast cells. *Cell Physiol Biochem*. 2012; 30(2):450-7. doi: 10.1159/000339038.
 19. Taniguchi M, Kitatani K, Kondo T, Hashimoto-Nishimura M, Asano S, Hayashi A, et al. Regulation of autophagy and its associated cell death by "sphingolipid rheostat": reciprocal role of ceramide and sphingosine 1-phosphate in the mammalian target of rapamycin pathway. *J Biol Chem*. 2012; 287(47):39898-910. doi: 10.1074/jbc.M112.416552.
 20. Fukushima T, Sato T, Nakamura T, Iwao H, Nakajima A, Miki M, et al. Daily 500 mg Valacyclovir Is Effective for Prevention of Varicella Zoster Virus Reactivation in Patients with Multiple Myeloma Treated with Bortezomib. *Anticancer Res*. 2012 Dec;32(12):5437-40.
 21. Stone JH, Khosroshahi A, Deshpande V, Chan JK, Heathcote JG, Aalberse R, et al. Recommendations for the nomenclature of IgG4-related disease and its individual organ system manifestations. *Arthritis Rheum*. 2012 Oct;64(10):3061-7. doi: 10.1002/art.34593.
 22. Okazaki K, Umehara H. Are Classification Criteria for IgG4-RD Now Possible? The Concept of IgG4-Related Disease and Proposal of Comprehensive Diagnostic Criteria in Japan. *Int J Rheumatol*. 2012;2012:357071. doi: 10.1155/2012/357071.

23. Asano S, Kitatani K, Taniguchi M, Hashimoto M, Zama K, Mitsutake S, et al. Regulation of cell migration by sphingomyelin synthases: sphingomyelin in lipid rafts decreases responsiveness to signaling by the CXCL12/CXCR4 pathway. *Mol Cell Biol.* 2012;32(16):3242-52.doi:10.1128/MCB.00121-12.
24. Deshpande V, Zen Y, Chan JK, Yi EE, Sato Y, Yoshino T, et al. Consensus statement on the pathology of IgG4-related disease. *Mod Pathol.* 2012;25(9):1181-92.doi:10.1038/modpathol.2012.72.
25. Fukushima T, Kawabata H, Sawaki T, Satoh T, Nakamura T, Iwao H, et al. Low-dose cytarabine plus aclarubicin for patients with previously untreated acute myeloid leukemia or high-risk myelodysplastic syndrome ineligible for standard-dose cytarabine plus anthracycline. *Anticancer Res.* 2012 Apr;32(4):1347-53.
26. Masaki Y, Kurose N, Yamamoto M, Takahashi H, Saeki T, Azumi A et al. Cutoff Values of Serum IgG4 and Histopathological IgG4+ Plasma Cells for Diagnosis of Patients with IgG4-Related Disease. *Int J Rheumatol.* 2012;2012:580814. doi: 10.1155/2012/580814.

2. 学会発表

- ・ H. Umehara : Overview and CDC criteria for IgG4-related disease (IgG4-RD), 12th International Symposium on Sjögren's Syndrome, (Kyoto, '13.10).
- ・ T. Kawanami, T. Takata, H. Iwao, Y. Masaki, H. Shimizu, T. Sato, T. Nakamura, A. Nakajima, M. Miki, Y. Fujita, M. Tanaka, T. Fukushima, T. Okazaki, H. Umehara : Proteomics analysis in IgG4-related disease, 12th International Symposium on Sjögren's Syndrome, (Kyoto, '13.10).
- ・ A. Nakajima, Y. Masaki, T. Nakamura, T. Kawanami, H. Shimizu, T. Sato, H. Iwao, M. Miki, T. Sakai, Y. Fujita, M. Tanaka, T. Fukushima, T. Okazaki, H. Umehara : Analysis of CLC and MS4A3 gene expression in periorbital blood mononuclear cells from patients with IgG4-related disease, 12th International Symposium on Sjögren's Syndrome, (Kyoto, '13.10).
- ・ 梅原久範 : シェーグレン症候群国際統一基準について, 第24回日本臨床口腔病理学会総会・学術

大会, (東京, '13.08).

- ・ 梅原久範 : Overview と IgG4-RD 包括診断基準, 第57回日本リウマチ学会総会・学術集会, (京都, '13.04).
- ・ 梅原久範 : IgG4 関連疾患発見の経緯と概念, 第86回日本内分泌学会学術総会, (仙台, '13.04).
- ・ 河南崇典, 高田尊信, 岩男 悠, 正木康史, 佐藤智美, 中村拓路, 中島章夫, 三木美由貴, 藤田義正, 田中真生, 福島俊洋, 岡崎俊朗, 梅原久範 : IgG4 関連疾患の疾患特異的に変動するタンパク質群の網羅解析, 第57回日本リウマチ学会総会・学術集会 / 第22回国際リウマチシンポジウム, (京都, '13.04).
- ・ 河南崇典, 梅原久範 : IgG4 関連疾患の疾患特異的に変動するタンパク質群の網羅解析, 第34回日本炎症・再生医学会, (京都, '13.07).
- ・ 河南崇典, 高田尊信, 岩男 悠, 正木康史, 清水啓智, 佐藤智美, 中村拓路, 中島章夫, 三木美由貴, 藤田義正, 田中真生, 福島俊洋, 岡崎俊朗, 梅原久範 : IgG4 関連疾患の疾患特異的に変動するタンパク質群の網羅解析, 第22回日本シェーグレン症候群学会学術集会, (大阪, '13.09).

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

出願番号 : 特願 2010-194326

発明者 : 梅原久範、正木康史、友杉直久、石垣靖人「IgG4 関連疾患診断用マーカー及びその利用」

出願番号 : 特開 2011-188958 (特願 2010-056779)

発明者 : 梅原久範、杉本直俊、紫藤治「シェーグレン症候群及びドライマウスの治療器並びにドライアイの治療器」

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

シェーグレン症候群の診断におけるドライアイ検査の診断精度の検討

研究分担者氏名 高村悦子 東京女子医科大学医学部医学科眼科 准教授
研究協力者 小島原典子 同 公衆衛生学第二 准教授
篠崎和美 同 眼科 講師

研究要旨

シェーグレン症候群(SS)に対する診断精度の高いドライアイの検査があれば、その検査結果からSSの診断が予測できる可能性がある。今回、シェーグレン症候群の診断に適したドライアイの検査法を検討するために、東京女子医科大学眼科外来の初診患者でドライアイの自覚症状を有する患者を対象に、自覚症状アンケート、ドライアイ検査、血液検査、ドライマウス検査、生検病理検査について2013年7月から前向き観察研究を行った。ドライアイの検査は涙液の検査として、シルマー試験 I 法、涙液膜破壊時間 (BUT) の評価を行い、シェーグレン症候群の診断に適したドライアイの検査法を検討した。2013年7月から12月の観察期間中の初診患者でドライアイおよび全身検査が施行されたものは34例（女性31例、男性3例、平均58.1±13.5歳）であった。膠原病の合併が11例にみられた。34例中ドライアイの確定例は20例、疑い例は13例であった。厚生省改定診断基準でシェーグレン症候群(SS)と診断できるドライアイ患者は12例あり、シルマー値の平均は、SSで3.5±4.64mm、シェーグレン症候群以外 (non-SS) では7±3.42mmであった。12例中シルマーテスト5mm以下（陽性）は9例（90%）であった。10mm以上を呈した3例は、血液検査、唾液腺生検でSSと診断されたが、ドライアイの検査では、BUTは5秒以下、角結膜染色スコアは陽性であった。今後は、シェーグレン症候群の病態を反映する涙液分泌型ドライアイの診断における角結膜染色、涙液検査の適切な評価法を検討することが必要である。

A. 研究目的

シェーグレン症候群（以下、SS）の診断基準作成の難しさは、多臓器に多くの特徴的な病変を呈するため、診断する診療科が、全身状態については、内科、ドライマウスについては、歯科、口腔外科、耳鼻科、ドライアイについては眼科と異なることが挙げられる。現在、SSの診断基準としては、アメリカ・ヨーロッパ改定分類基準 (AECG) (2002年)、厚生省改定診断基準 (JPN) (1999年)、アメリカリウマチ学会分類基準 (ACR) (2012年) があるが、どの診療科を受診したかにより、解析集団の偏りや、診断のために採用された検査項目の違いが生じ、結果が異なる可能性も否定できない。また、本邦のドライアイの診断基準に採用されている検査が、SSの診断基準のドライアイに関する項目にすべて採用されているわけではなく、SSの診断に適したドライアイの検査がどれなのか、十分に検

討されているとは言えない。しかし、SSに対する診断精度の高いドライアイの検査があれば、その検査結果からSSの診断が予測できる可能性がある。今回、SSの診断に適したドライアイの検査法を検討するために、眼科を受診したドライアイ患者に対し、既存の診断基準 (AECG, JPN, ACR) に含まれる項目を含めたいくつかの検査を行い、SSの確定診断に必要なドライアイ検査の検討を行った。

B. 研究方法

東京女子医科大学眼科外来の初診患者でドライアイの自覚症状を有する患者を対象に、自覚症状アンケート、ドライアイ検査、血液検査、ドライマウス検査、生検病理検査について2013年7月から前向き観察研究を行った。対象は年齢が20歳以上、ドライアイ以外の結膜炎患者および検査期間にコンタクトレンズ装用が中止で

きない患者は除外した。ドライアイの検査は涙液の検査として、シルマー試験 I 法、涙液膜破壊時間 (BUT)、TSAS (tear stability analysis system) による rBUT の評価を行った。角結膜上皮障害の評価はフルオレセイン染色を用いブルーフリーフィルターで観察し、van Bijsterveld score の方法に準じ、耳側球結膜、角膜、鼻側球結膜の染色程度を (0 : 無染色、1 : 軽度、2 : 中等度、3 : 重度) に分類し、合計 9 点満点で評価した。シルマーテストにおいて左右に差がある場合は低い値を評価し、BUT、TSAS、DR-1 及び角結膜染色の値はシルマーテストで評価した側を評価した。ただし、シルマーテストに左右差がない場合は BUT、TSAS、DR-1 は低い値を評価し、角結膜染色は高い値を評価した。血液検査は抗 SS-A/Ro 抗体、抗 SS-B/La 抗体、抗核抗体、リウマチ因子を行った。ドライマウスの自覚症状を有する場合は、耳鼻科にて唾液分泌量 (ガム試験)、唾液腺造影、唾液腺シンチグラフィ、唾液腺の生検病理組織検査を行った。ドライアイの診断は、ドライアイ研究会 (2006 年) の診断基準に基づき、自覚症状、涙液検査 (シルマーテスト I 法 5mm 以下または BUT 5 秒以下)、角結膜染色検査 (フルオレセイン、ローズベンガル、リサミングリーンいずれかの染色で van Bijsterveld score 3 以上) について、すべて陽性のものを確定例、いずれか 2 つ陽性のものを疑い例とした。自覚症状については、ドライアイ QOL 質問票 (DEQS: Dry Eye-related Quality of life Score) を用い、「目の症状」に関する 6 項目、目がゴロゴロする (異物感)、目が乾く、目が痛い、目が疲れる、まぶたが重い、目が赤くなる、について、外来受診までの 1 週間にこれらの症状があったものを「自覚症状あり」とした。ACR 基準におけるドライアイの評価は、フルオレセイン染色 (ブルーフリーフィルター使用) により角結膜染色の程度と角膜所見の特徴 (3 点満点) を加味して行った。

C. 研究結果

2013 年 7 月から 12 月の観察期間中に受診した初診患者でドライアイの検査が施行されたものは 49 例で、そのうち全身検査が施行されたものは 34 例 (女性 31 例、男性 3 例、年齢 22 歳~83 歳、平均 58.1±13.5 歳) であった。膠原病の合併が 11 例 (関節リウマチ 8 例、強皮症 3 例、SLE1 例) にみられた。また、その他の全身疾患として甲状腺機能亢進症 1 例、橋本病 1 例、

原発性胆汁性肝硬変が 1 例みられた。34 例中ドライアイの確定例は 20 例、疑い例は 13 例であった。1 例はドライアイの自覚症状はあったが、ドライアイの検査所見は陰性であった。全身検査の結果とあわせ、JPN 基準で SS と診断できるドライアイ患者は 12 例あり、シルマー値の平均は、SS で 3.5±4.64mm、シェーグレン症候群以外 (non-SS) では 7±3.42mm であった。12 例中シルマーテスト 5mm 以下 (陽性) は 9 例 (90%) で、3 例は 10mm 以上を呈したが、血液検査、唾液腺生検で SS と診断された。角結膜染色スコアは全例 3 点以上であり、SS では 5±4.1、non-SS では 2.55±1.63 であった。一方、ACR 基準では 15 例が SS と診断でき、これらの角結膜染色スコアは全例で陽性、シルマーテスト陽性は 8 例 (53.3%) であった。角結膜染色スコア 3 以上でシルマーテストが 6mm 以上を呈した JPN 基準の SS 患者 3 例、ACR 基準の SS 患者 7 例において、BUT は 5 秒以下であった。JPN 基準で non-SS と診断された 22 例のうち角結膜染色スコアが 3 以上を占めずものは 11 例あり、ここには、ACR 基準で SS と診断されるものが 4 例含まれていた。ACR 基準の non-SS19 例のうち角結膜染色スコア 3 以上は 8 例であった。またこの 19 例において JPN 基準で SS と診断できるものは 1 例あった。JPN 基準の SS12 例のうち、ドライアイの項目は陰性で他の項目で診断されたものが 3 例あった。一方、ACR 基準の SS15 例はすべてドライアイの項目は陽性であった。

D. 考察

ドライアイの自覚症状を有する患者に対する前向き観察研究によりシェーグレン症候群 (SS) のドライアイの検査法を検討した。JPN 基準に採用されているシルマーテストは検査時の刺激や検査室の環境などが結果に影響を及ぼすことがあり再現性が低いことは以前から指摘されている。今回の症例の中には、シルマーテストのみ陰性 (6mm 以上) であったため、角結膜の染色が陽性であっても JPN 基準のドライアイの項目が陰性と評価された症例があった。しかし、これらの症例において、本邦のドライアイ診断基準に涙液検査として採用されている BUT 検査ではドライアイであることを示しており、今後はドライアイの検査項目のうち涙液に関連する検査法に妥当性、検査法の再検討していく必要があると思われる。角結膜の染色は SS のドライアイにおいて早期から観察される所見

であるが、JPN 基準で採用されているローズベンガル染色は日常診療ではほとんど使用されていない染色法である。また、フルオレセイン染色による角膜所見の観察が蛍光色素試験として採用されているが、最近では、ドライアイ診断基準にも採用されているように、ブルーフリーフィルターを用いたフルオレセイン染色により角結膜同時に評価することが可能となっている。SS のドライアイを診断するためには、日常診療で簡便におこなえる検査を取り入れることも重要と思われる。

3. その他

なし

E. 結論

シェーグレン症候群のドライアイ検査において角結膜染色スコアの重要性が示唆された。今後は、シェーグレン症候群の病態を反映する涙液分泌型ドライアイの診断における角結膜染色、涙液検査の適切な評価法を検討することが必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

高村悦子 シンポジウム2 眼科からみたシェーグレン症候群の診断基準 第22回日本シェーグレン症候群学会学術集会 2013年9月14日 大阪

坪井洋人、梅原久範、川上純、佐野 統、坪田一男、小川葉子、高村悦子、斎藤一郎、井上裕子、中村誠司、竹内 勤、田中良哉、三森経世、松本 功、住田孝之 シンポジウム2 日本人シェーグレン症候群患者の診断における3つの診断基準の比較 第22回日本シェーグレン症候群学会学術集会 2013年9月14日 大阪

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

シェーグレン症候群患者に関する全国疫学調査（一次調査、二次調査）

研究分担者 坪井洋人 筑波大学医学医療系内科

（膠原病・リウマチ・アレルギー）講師

研究協力者 萩原晋也¹、浅島弘充¹、松本功¹、梅原久範²、川上純²、中村英樹²、佐野統²、坪田一男²、小川葉子²、高村悦子²、斉藤一郎²、井上裕子²、中村誠司²、森山雅文²、竹内勤²、田中良哉²、平田信太郎²、三森経世²、吉藤元²、太田晶子²、住田孝之^{1,2}

1 筑波大学医学医療系内科（膠原病・リウマチ・アレルギー）

2 自己免疫疾患に関する調査研究班拡大 SS 分科会

研究要旨

本邦におけるシェーグレン症候群（Sjögren's syndrome ; SS）の頻度、病型、診断および分類基準の満足度、治療の現状を明らかにするため、本研究班拡大 SS 分科会において、2011 年度に SS に関する全国疫学調査（一次調査、二次調査）を実施し、2012 年度中に調査票の回収を終了した。2013 年度は一次調査、二次調査の結果を集計し、解析を行った。一次調査では、全国の医療機関の 14095 診療科（内科 7999、眼科 2391、耳鼻咽喉科 2011、膠原病内科 936、口腔外科 758）より、病床数毎（100 床未満：5%、100-199 床：10%、200-299 床：20%、300-399 床：40%、400-499 床：80%、500 床以上：100%）、大学病院：100%、膠原病内科：100%の抽出率により無作為に調査対象診療科を合計 4729 診療科抽出した。これらの調査対象診療科に往復はがきを送付し、2010 年 1 年間に受診した SS 患者数および二次調査への協力の可否について調査を行った。一次調査の結果から、本邦における SS 患者数は 68,483 人と算出された。

次に一次調査において二次調査への協力の同意が得られた 214 診療科（内科 56、眼科 33、耳鼻咽喉科 25、膠原病内科 51、口腔外科 49）に、二次調査票を送付した。調査票を用いて、SS 患者症例毎の年齢、性別、病型（一次性、二次性）、腺外病変、厚生省改訂診断基準（JPN）（1999 年）、アメリカ・ヨーロッパ改訂分類基準（AECG）（2002 年）、アメリカリウマチ学会分類基準（ACR）（2012 年）の満足度、治療内容に関して情報を収集した。二次調査では 98 診療科から 2195 例の SS 患者の調査票を回収した。平均年齢は 60.8±15.2 歳、男性/女性の比率は 1/17.4、病型は一次性/二次性 SS が 58.5%/39.2%、一次性 SS のうち腺型/腺外型は 69.1%/24.7%（不明 6.2%）であった。JPN 基準の満足度は 53.8%、AECG 基準は 47.7%、ACR 基準は 49.6%であった。ステロイドは 34.3%（752/2195 例）、免疫抑制薬は 16.3%（358/2195 例）、生物学的製剤は 3.1%（68/2195 例）、唾液分泌刺激薬は 31.7%（695/2195 例）で投与されていた。

SS に関する全国疫学調査（一次調査、二次調査）により、本邦における SS の頻度、病型、腺外病変、診断および分類基準の満足度、治療の現状が明らかとなった。これらの結果は、今後の SS の重症度分類や診療ガイドラインの策定において、有用な情報になると考えられる。

A. 研究目的

シェーグレン症候群（Sjögren's syndrome ; SS）は唾液腺炎・涙腺炎を主体とする自己免疫疾患であるが、ドライマウス・ドライアイ以外にも、全身倦怠感、関節痛、筋痛、消化器症状、異常感覚、うつ状態等の幅広い臨床症状を呈する。そのため、SS 患者は膠原病内科・眼科・口腔外科・耳鼻咽喉科だけでなく、

総合診療科・整形外科・消化器内科・神経内科・精神科等のさまざまな診療科を受診する可能性がある。さらに、複数の分類基準・診断基準（本邦では厚生省改訂診断基準（the revised Japanese Ministry of Health criteria for the diagnosis of SS; JPN）（1999 年）、アメリカ・ヨーロッパ改訂分類基準（the American-European Consensus Group