

筑波大学

博士（医学）学位論文

cDNA microarray analysis identifies NR4A2  
as a novel molecule involved in the pathogenesis  
of Sjögren's syndrome

(cDNA マイクロアレイにより同定されたシェーグレン症候群  
における新規疾患関連遺伝子 NR4A2 の解析)

2017

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

高橋 広行

# 目次

1. 研究背景 .....	5
2. 目的 .....	8
3. 方法 .....	9
3.1. 対象 .....	9
3.2. cDNA マイクロアレイ .....	9
3.3. 定量 PCR による validation .....	10
3.4. 蛍光免疫染色によるタンパク質発現の検討 .....	11
3.5. 末梢血 CD4 陽性 T 細胞における NR4A2 の mRNA 発現 .....	12
3.6. 末梢血 CD4 陽性 T 細胞の Th17 分化条件における培養 .....	12
3.7. Th17 分化誘導下の NR4A2 のタンパク質発現と細胞内局在 .....	14
3.8. Th17 分化条件における importazole を用いた NR4A2 の核内移行阻害 ...	15
3.9. 統計解析 .....	16
4. 結果 .....	17
4.1. 患者背景 .....	17
4.2. cDNA マイクロアレイ .....	17
4.3. 定量 PCR による validation .....	18
4.4. 蛍光免疫染色によるタンパク質の発現解析 .....	19
4.5. SS 患者の末梢血 CD4 陽性 T 細胞における NR4A2 遺伝子発現 .....	19
4.6. SS 患者末梢血 CD4 陽性 T 細胞の Th17 分化条件における培養 .....	20
4.7. Th17 分化誘導における NR4A2 のタンパク質発現と細胞内局在 .....	20
4.8. IPZ による CD4 陽性 T 細胞における NR4A2 の核内移行阻害 .....	21
5. 考察 .....	22

6. 結論 .....	28
7. 略語 .....	29
8. 謝辞 .....	31
9. 参考文献 .....	32
10. 図表 .....	37

# 1. 研究背景

シェーグレン症候群 (Sjögren's syndrome: SS) は、唾液腺、涙腺の慢性炎症と組織障害を特徴とする原因不明の全身性自己免疫疾患であり、唾液および涙液分泌の低下によるドライマウス、ドライアイといった乾燥症状がみられる[1]。SS 患者の外分泌腺における病理組織では、導管周囲に CD4 陽性 T 細胞を中心としたリンパ球浸潤がみられ、腺破壊を伴う[2]。

SS 患者と健常者の口唇唾液腺 (labial salivary gland: LSG) の遺伝子発現を cDNA マイクロアレイを用いて網羅的に解析した報告は複数存在する[3, 4]。いずれの報告においても、SS 患者の LSG では免疫グロブリン、ヒト白血球抗原 (human leukocyte antigen: HLA)、T 細胞受容体 (T cell receptor: TCR)、インターフェロン誘導遺伝子といった単核球浸潤に伴う遺伝子発現の上昇が示されている[3, 4]。しかし、これらの研究では、いずれも対照が LSG に炎症を伴わない健常者であることから、その結果は炎症に伴う非特異的な発現の上昇をみている可能性があると考えられる。

一方、SS と同様に、IgG4 関連疾患 (IgG4-related disease: IgG4-RD) は、種々の臓器の腫瘍形成、血清 IgG4 の上昇、病変組織の IgG4 陽性形質細胞浸潤と線維化を特徴とし、唾液腺炎、涙腺炎を高頻度に合併する疾患である。その病因は不明であるが、SS と比較し、IgG4-RD では自己抗体の関与を示すエビデンスは少なく、両者は免疫学的に病態が異なることが示唆されている。さらに、IgG4 関連唾液腺炎、涙腺炎といった IgG4 関連ミクリッツ病は、副腎皮質ステロイド治療へ良好な反応を示すのに対し、SS の唾液腺炎や涙腺炎は奏効しにくいことが特徴であり、臨床的な差異もみられる[5]。一方、IgG4 関連唾液腺炎の病理組織では、特徴的な IgG4 陽性形質

細胞の著明な浸潤に加えて、CD4 陽性 T 細胞も存在するとされる[6]。

そこで、SS と同様に LSG に炎症を来す IgG4-RD の LSG と遺伝子発現を比較することで、SS に特異的な発現遺伝子を抽出できる可能性があると考え、cDNA マイクロアレイを用いて、両者の遺伝子発現を網羅的に比較することにした。

当研究室の先行研究で坪井らは、既に IgG4-RD と SS の LSG における遺伝子発現を比較し、報告している[7]。IgG4-RD の LSG において発現が上昇した発現変動遺伝子 (differentially expressed gene: DEG) に着目し、解析が行われた[7]。本研究においては、SS の LSG において発現が上昇した DEG に着目し、SS の病態に特異的に関与する遺伝子につき検討を行った。

近年、SS の病態形成における T helper cell type 17 (Th17) 細胞の役割が注目されている[8-12]。SS 患者の唾液腺のリンパ球浸潤部位において、Th17 細胞が優位な分画であることが示されている[8, 9]。また、インターロイキン 17 (interleukin-17: IL-17) あるいは Th17 細胞が SS 様唾液腺炎の発症と増悪に寄与する可能性が示されている[10-12]。以上より、本研究では SS の唾液腺において発現が上昇した遺伝子と、Th17 細胞の機能的関連に着目した。

本研究で着目した nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2 (NR4A2) は、核内受容体である NR4A ファミリーに属するアイソフォームである[13, 14]。NR4A タンパクは、他の核内受容体ファミリーと同様に、N 末端からリガンド非依存的転写活性化ドメイン、DNA 結合ドメイン (DNA-binding domain: DBD)、ヒンジ領域ドメイン、リガンド結合ドメイン (ligand-binding domain: LBD) の各ドメインから構成される[13]。NR4A タンパクは LBD にリガンドが結合しなくても標的遺伝子に対する転写活性化能を有し、DBD が標的遺伝子のプロモーター領域に結合することで、転

写因子として標的遺伝子の発現を制御する[14]。また、NR4A2は、DBDに核局在化シグナル（nuclear localization signal: NLS）を、LBDに核外輸送シグナル（nuclear export signal: NES）をもち、これらのバランスにより細胞内局在が決定されることが考えられる[13]。

Th17関連遺伝子のうちNR4A2は、IL-21の産生を介してIL-23受容体の発現を促進し、Th17分化に関与する重要な分子であることが示されている[15]。さらに、実験的自己免疫性脳脊髄炎（experimental autoimmune encephalomyelitis: EAE）の動物モデルにおいて、NR4A2特異的 siRNA を生体内に投与すると、CD4陽性T細胞のIL-17産生が特異的に抑制され、臨床症状が改善したことから、NR4A2はTh17分化の促進を介し、EAEの病態形成に重要な役割を果たしていることが示唆された[15, 16]。さらに、NR4A2の転写活性化機序として、核内移行が重要であることが報告されている[13]。その他に、他分子との協調的な転写活性化機序や、small ubiquitin-like modifier (SUMO) 化などによるNR4A2の転写活性化機序が報告されている[17, 18]。

## 2. 目的

本研究は、cDNA マイクロアレイを用いて SS 患者と IgG4-RD 患者の LSG における遺伝子発現を網羅的に比較し、SS の病態に特異的に関与する遺伝子とその機能を明らかにすることを目的とした。第一に、SS 患者と IgG4-RD 患者の LSG を用いて cDNA マイクロアレイ、定量 PCR による validation、タンパク質発現の解析を行った。第二に、SS 患者の末梢血 CD4 陽性 T 細胞を用いて遺伝子発現解析、Th17 分化における機能解析を行った。

### 3. 方法

#### 3.1. 対象

本研究はヘルシンキ宣言を遵守し、実施した。また、本研究は筑波大学附属病院倫理審査委員会による承認を得た（承認番号：H24-164）。全ての対象者から、本研究へ参加する前にインフォームド・コンセントを得た。SS患者は、旧厚生省SS改訂診断基準（1999年）[19]およびアメリカリウマチ学会SS分類基準（2012年）[20]を満たした。一方、IgG4-RD患者は、IgG4関連疾患包括診断基準（2011年）[21]を満たした。いずれの対象者も免疫抑制治療を受けたことのない者であった。健常者をSS患者に対する健常コントロール（healthy control: HC）として採用した。なお、膠原病やリウマチ性疾患を含む慢性疾患や、悪性腫瘍の既往歴がなく、薬物治療を受けていない者を健常者と定義した。cDNAマイクロアレイにおいては、粘液嚢胞と同時に摘出された、その周囲の正常なLSGをHCとして採用した。HCを含む全てのサンプルは、対象者からインフォームド・コンセントを得たあとに採取された。

#### 3.2. cDNA マイクロアレイ

GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array (Affymetrix) を用い、SS患者 (n=5、全例女性)、IgG4-RD患者 (n=5、全例女性)、HC (n=3、全例女性) のLSGにおける遺伝子発現をcDNAマイクロアレイにより解析した。なお、対象者を女性のみに限定したのは、SS患者の約95%が女性であるからである[22]。上記の対象者から摘出したLSGは、RNAlater (Invitrogen) 溶液中に保存した。Total RNAはRNeasy Kit (Qiagen) を用いて抽出し、cDNA合成を行った上でcDNAマイクロアレイ解析に

用いた。全てのマイクロアレイデータは Minimum Information About a Microarray Experiment (MIAME) に準拠し、MIAME 準拠データベースである、the National Center for Biotechnology Information Gene Expression Omnibus へ登録した (GEO Series accession number: GSE40568)。得られたマイクロアレイデータは、Factor Analysis for Robust Microarray Summarization (FARMS) アルゴリズムにより正規化した。そして、SS と IgG4-RD のペアワイズ比較を行い (false discovery rate (FDR) < 0.05)、rank products 法により DEG を抽出した。本研究においては、SS で発現が上昇した DEG に着目した。

### 3.3. 定量 PCR による validation

定量 PCR により SS で発現が上昇した DEG の validation を行った。Validation 候補遺伝子として、①順位 150 位以内、②FDR<0.0001、③log [fold change (FC)]>1.00、④SS 患者における群内の分散が小さく、⑤T 細胞の活性化や制御との関連が報告されている DEG を抽出した。cDNA マイクロアレイに用いたサンプルとは異なる、HC (n=6)、SS 患者 (n=15)、IgG4-RD 患者 (n=12) から採取された LSG より、ISOGEN (Nippon gene) 法を用いて total RNA を抽出後、cDNA synthesis kit (Takara Bio) を用い、cDNA の合成を行った。なお、SS 患者は旧厚生省 SS 改訂診断基準 (1999 年) [19]およびアメリカリウマチ学会 SS 分類基準 (2012 年) [20]を、IgG4-RD 患者は IgG4 関連疾患包括診断基準 (2011 年) [21]を満たし、HC は SS 患者、IgG4-RD 患者と年齢および性別をマッチングした。そして、7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) および SYBR Green PCR kit (Takara Bio) を用い、定量 PCR により各サンプルにおける validation 候補遺伝子の mRNA 発現を比較した。なお、

定量 PCR には各遺伝子に特異的な既製のプライマー (Takara Bio) を用いた。また、human-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を内在性コントロールとした。

### 3.4. 蛍光免疫染色によるタンパク質発現の検討

次に、IgG4-RD と比較し、SS の LSG で発現の上昇が validation された遺伝子のうち、これまでに SS との関連が報告されていない新規の遺伝子に着目し、検討を進めた。SS、IgG4-RD の LSG における遺伝子のタンパク質発現につき、間接免疫蛍光染色により比較した。クリオスタットにより作製した、SS、IgG4-RD の LSG 凍結切片につき、0.05% Tween 20 含有リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffered saline: PBS) で各 5 分間 5 回洗浄後、5% ウシ血清アルブミン含有 PBS により 30 分間室温でブロッキングを行った。その後、切片は標的タンパク質に対する一次抗体 (ウサギ抗 NR4A2 抗体 (Santa Cruz, sc-991) (使用濃度 : 2 µg/mL) を用い、4°C で一晚反応を行った。つづいて、切片を再び 0.05% Tween 20 含有 PBS で各 5 分間 5 回洗浄し、蛍光標識二次抗体 (Alexa Fluor® 488 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (Invitrogen, A-11034)) (使用濃度 : 20 µg/mL) を用い、室温で 30 分間反応を行った。なお、切片は、CD3 あるいは CD4 に対する一次抗体 (BioLegend, 317302; BioLegend, 317402) と蛍光標識二次抗体 (Invitrogen, A-11030)、IL-17 に対する一次抗体 (Santa Cruz, sc-7927) と Zenon labeling kit (Invitrogen, Z-25304) をそれぞれ用い、共染色を行った。その後、切片を再び 0.05% Tween 20 含有 PBS で各 5 分間 5 回洗浄後、diamidino-2-phenylindole (DAPI) (BioLegend) により細胞核を染色した。最後に Fluorescent Mounting Medium (Dako) により封入を行い、組織における蛍光を

BZ-X710 (Keyence) により観察し、目的タンパク質 (NR4A2) の蛍光強度を比較した。

### 3.5. 末梢血 CD4 陽性 T 細胞における NR4A2 の mRNA 発現

旧厚生省 SS 改訂診断基準 (1999 年) [19]およびアメリカリウマチ学会 SS 分類基準 (2012 年) [20]を満たした SS 患者 (n=22)、年齢および性別をマッチングした HC (n=10) より 10mL 採血を行い、Ficoll-Hypaque gradient (GE Healthcare) を用いてヘパリン化した静脈血から末梢血単核細胞 (Peripheral blood mononuclear cell: PBMC) を分離した。PBMC を抗ヒト CD4 マイクロビーズ (Miltenyi Biotec, 130-045-101) で磁気標識し、autoMACS Pro cell separator (Miltenyi Biotec) を用いて CD4 陽性 T 細胞を分離した。得られた CD4 陽性 T 細胞の純度が 97%以上であることを確認し、使用した。そして、各対象の CD4 陽性 T 細胞における、validation された遺伝子 (NR4A2) の mRNA 発現につき、前述の方法で定量 PCR により比較した。

### 3.6. 末梢血 CD4 陽性 T 細胞の Th17 分化条件における培養

旧厚生省 SS 改訂診断基準 (1999 年) [19]およびアメリカリウマチ学会 SS 分類基準 (2012 年) [20]を満たした SS 患者 (n=5)、年齢および性別をマッチングした HC (n=3) の PBMC より、前述の通り autoMACS Pro cell separator を用いて CD4 陽性 T 細胞を単離した。末梢血 CD4 陽性 T 細胞を X-VIVO15 ゲンタマイシン含有無血清培地 (Lonza, 04-418Q) に懸濁し、48 穴プレートに  $1.0 \times 10^5$  cells / well (X-VIVO15 : 500 $\mu$ L / well) の細胞数で播種した。そして、後述の方法で Th17 分化

条件、Th0 条件（中立条件）下に培養を行った。本項の実験では、4 日目に各 well の半量培地交換を行い、7 日目に細胞を回収した。なお、回収 6 時間前に、phorbol myristate acetate (50 ng/mL)、ionomycin (0.5 µg/mL)、GolgiStop (eBioscience) を添加した。回収した細胞は、Fixation/Permeabilization solution (eBioscience) を用いて固定および透過処理を行った。その後、PE 標識抗 IL-17 抗体 (BioLegend, 512305)、APC 標識抗 interferon-γ (IFN-γ) 抗体 (BioLegend, 502512) を用い、細胞内染色を行った。サンプルは BD FACSVerse (BD Biosciences) を用いて解析し、そのデータを FlowJo software (Tree Star) により分析した。そして、CD4 陽性 T 細胞中の IL-17<sup>+</sup>IFN-γ 細胞の割合 (%) と培養開始前（ベースライン）における NR4A2 の mRNA 発現量につき、相関解析を行った。

なお、各培養条件は以下の通りに設定した。Th17 分化条件では、抗 CD3 抗体 (R&D, MAB100) を 1 µg/mL にてプレートに固相化後、培地に抗 CD28 抗体 (R&D, MAB342) : 1 µg/mL、human recombinant IL-2 (R&D) : 10 IU/mL、human recombinant TGF-β1 (R&D) : 5 ng/mL、human recombinant IL-1β (eBioscience) : 12.5 ng/mL、human recombinant IL-6 (eBioscience) : 25 ng/mL、human recombinant IL-21 (eBioscience) : 25 ng/mL、human recombinant IL-23 (eBioscience) : 25 ng/mL、抗 IFN-γ 抗体 (eBioscience, 16-7318-81) : 2 µg/mL、抗 IL-4 抗体 (eBioscience, 16-7048) : 2 µg/mL を各終濃度にて添加した。Th0 条件では、抗 CD3 抗体を 1 µg/mL にてプレートに固相化後、培地に抗 CD28 抗体 : 1 µg/mL、human recombinant IL-2 : 10 IU/mL、抗 IFN-γ 抗体 : 2 µg/mL、抗 IL-4 抗体 : 2 µg/mL を各終濃度にて添加した。また、後述の Th1 分化条件では、抗 CD3 抗体を 1 µg/mL にてプレートに固相化後、培地に抗 CD28 抗体 : 1 µg/mL、human recombinant IL-2 : 50 IU/mL、human

recombinant IL-12 (eBioscience) : 80 ng/mL、抗 IL-4 抗体 : 4 µg/mL を各終濃度にて添加した。

### 3.7. Th17 分化誘導下の NR4A2 のタンパク質発現と細胞内局在

対象者(SS患者、健常者)のPBMCをAPC標識抗CD4抗体(BioLegend, 317416)、FITC標識抗CD45RA抗体(BioLegend, 304106)、PE標識抗CD25抗体(BioLegend, 302606)で染色し、MoFlo XDP(Beckman Coulter)を用いて末梢血ナイーブCD4陽性T細胞(CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CD45RA<sup>+</sup>細胞)を分離した。分離した末梢血ナイーブCD4陽性T細胞を前述した方法でTh17分化条件、Th0条件、Th1分化条件下に培養し、細胞を回収後、Smear Gell(Genostaff)を用いてスライドガラスに塗抹した。塗抹した細胞は、4%パラホルムアルデヒドにより30分間室温で固定および透過処理を行った。塗抹標本は、ウサギ抗NR4A2抗体(Santa Cruz, sc-991)(使用濃度:1 µg/mL)を用いて4°Cで一晩反応を行った後、前述の方法と同様に、Alexa Fluor® 488標識ヤギ抗ウサギIgG抗体(Invitrogen, A-11034)(使用濃度:20 µg/mL)を用いて染色を行い、DAPIによる核染色を行った。観察にはBZ-X710を用い、細胞におけるAlexa Fluor 488を検出した。なお、露光時間を倍率200倍では1/5秒に、1000倍では1/15秒に設定し、観察条件の統一を図った。そして、BZ-X analyzer(Keyence)を用い、Alexa Fluor 488の蛍光強度を定量化した。

第一に、健常者(n=3)のナイーブCD4陽性T細胞をTh17分化条件、Th0条件下に培養し、各時点における個々の細胞全体のNR4A2の蛍光強度をBZ-X analyzerを用いて定量化し(倍率200倍)、NR4A2のタンパク質発現の経時的変化を検討した。

第二に、健常者(n=3)のナイーブCD4陽性T細胞をTh17分化条件、Th0条件、

Th1 分化条件で培養したときの NR4A2 の細胞内局在（培養 4 日目）を比較した。倍率 1000 倍の観察視野に含まれる個々の細胞において、BX-Z analyzer により自動抽出された DAPI 染色領域内の NR4A2 蛍光強度を、細胞全体の NR4A2 蛍光強度で除した値を核内発現率（%）として自動算出し、各培養条件で比較した。

第三に、SS 患者（n=5）、年齢および性別をマッチングした健常者（n=3）のナイーブ CD4 陽性 T 細胞を Th17 分化条件、Th0 条件下に 4 日間培養後、前述の方法により NR4A2 核内発現率を自動算出し、SS 患者と健常者で NR4A2 核内発現率の平均を比較した。

### 3.8. Th17 分化条件における importazole を用いた NR4A2 の核内移行阻害

Importin- $\beta$  は、importin- $\alpha$  と複合体を形成し、NLS を有する NR4A2 などのタンパク質の核内輸送を媒介する[13, 23]。Importin- $\beta$  特異的阻害剤である、importazole (IPZ) は importin- $\beta$  によって媒介される核内輸送系を阻害することのできる低分子化合物であり[24]、これを用いて検討を進めた。

第一に、健常者（n=5）の PBMC より前述の方法でナイーブ CD4 陽性 T 細胞を分離し、Th17 分化条件、Th0 条件の培養下に IPZ (Sigma-Aldrich) の効果を検討した。IPZ は、終濃度 15 $\mu$ M にて細胞回収の 6 時間前に添加した。また、コントロールの well には dimethyl sulfoxide (DMSO) を同量添加した。細胞は培養 4 日目に回収した。回収した細胞は、前述の方法により塗抹標本を作製し、NR4A2 核内発現率（%）を自動算出した。同時に、回収した細胞は、前述の方法により IL-17、IFN- $\gamma$  の細胞内染色を行い、フローサイトメトリーによる解析を行った。

第二に、健常者 (n=5) の末梢血ナイーブ CD4 陽性 T 細胞を Th17 分化条件、Th0 条件下に培養し、前述の通りに IPZ あるいは DMSO を添加後、培養 4 日目に細胞を回収し、IL-21、retinoic acid receptor-related orphan receptor C (RORC) の mRNA 発現を定量 PCR により検討した。

### 3.9. 統計解析

全ての数値は、原則的に平均±標準偏差で記載した。検定は両側検定を用い、結果は  $p<0.05$  であるときに統計学的に有意であると定義した。Mann-Whitney 検定、Kruskal-Wallis 検定は、それぞれ 2 群、あるいは 3 群以上の対応のない連続変数を比較するときに用いた。一方、Wilcoxon の符号順位検定は、対応のある 2 群間比較に用いた。2 つの連続変数の相関解析では、Spearman の順位相関係数を用いて評価を行った。

## 4. 結果

### 4.1. 患者背景

平均年齢は、SS 患者 (n=5) で  $33.0 \pm 8.4$  歳、IgG4-RD 患者 (n=5) で  $58.2 \pm 2.6$  歳、HC (n=3) で  $42.0 \pm 21.3$  歳であり、全例女性であった。また、全例で免疫抑制治療の治療歴はなかった。

SS 患者では、全例で抗 SS-A 抗体が陽性であり、2 例で抗 SS-B 抗体が陽性であった。SS 患者の LSG における Greespan 分類は、全例で grade 3 であった。また、一次性 SS は 3 例、二次性 SS は 2 例であった。SS の疾患活動性指標として用いられる、欧州リウマチ学会 (European League against Rheumatism: EULAR) による EULAR Sjögren's syndrome disease activity index (ESSDAI) は  $12.0 \pm 7.8$  であった。

IgG4-RD 患者では、血清 IgG4 値が  $521.6 \pm 29.9$ mg/dL であった。臓器病変として、全例でミクリッツ病が認められ、2 例で膵病変が明らかとなった。IgG4-RD 患者の LSG における IgG4 陽性形質細胞数/IgG 陽性形質細胞数の比 (%) は、 $78.4 \pm 6.6\%$  であった。

### 4.2. cDNA マイクロアレイ

SS 患者の LSG において、IgG-RD と比較し発現が上昇したプローブセットとして 1785 個を、発現が低下したプローブセットとして 1771 個を同定した (FDR<0.05)。それぞれ 1320 遺伝子、1321 遺伝子に対応し、DEG として同定した (表 1)。ウェブツール DAVID・QuickGO を用いたエンリッチメント解析では、IgG4-RD と比較し、SS で高発現したプローブセット中に有意に濃縮された GO term (FDR 補正による  $p$

値< 0.0001) として、protein glycosylation、immune response、antigen processing and presentation of peptide antigen via major histocompatibility complex (MHC) class I、Golgi vesicle transport、cotranslational protein targeting to membrane、endoplasmic reticulum unfolded protein response、response to virus が示された。一方、IgG4-RD と比較し、SS で発現が低下したプローブセット中に有意に濃縮された GO term として、wound healing、response to inorganic substance、skeletal system development、muscle organ development、heart development、angiogenesis、cell morphogenesis involved in differentiation、cell projection organization、muscle contraction、extracellular matrix organization、actin cytoskeleton organization、cell-matrix adhesion、regulation of cell migration、regulation of cell-substrate adhesion、positive regulation of cell adhesion、regulation of cell proliferation、enzyme linked receptor protein signaling pathway、regulation of inflammatory response、translational elongation が示された。

### 4.3. 定量 PCR による validation

サンプル提供者の年齢は、SS 患者群で  $51.8 \pm 18.3$  歳、IgG4-RD 患者群で  $60.5 \pm 13.0$  歳、健常者群で  $60.5 \pm 16.3$  歳であり、各群間に有意差はなかった。方法で述べた条件を満たす、次の 6 つの DEG を validation 候補遺伝子として抽出した：chemokine (C-X-C motif) ligand 9 (CXCL9) (4 位、log FC=4.12)、NR4A2 (43 位、log FC=1.82)、CD26 (Dipeptidyl peptidase-4: DPP4) (55 位、log FC=1.50)、serum and glucocorticoid-regulated kinase 1 (SGK1) (93 位、log FC=1.47)、interferon regulatory factor 4 (IRF4) (96 位、log FC=1.55)、phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK1)

(108位、log FC=1.42)。定量PCRによる validation では、CXCL9 の mRNA 発現は SS の LSG で健常者よりも有意に上昇していたが、SS と IgG-RD に有意差を認めなかった (図 1)。NR4A2 の mRNA 発現は SS の LSG で IgG4-RD よりも有意に上昇していた (図 2)。CD26 の mRNA 発現は SS と IgG4-RD に有意差を認めなかった (図 3)。SGK1 の mRNA 発現は SS と IgG4-RD に有意差を認めなかった (図 4)。IRF4 の mRNA 発現は SS の LSG で IgG4-RD よりも有意に上昇していた (図 5)。PDK1 の mRNA 発現は SS と IgG4-RD に有意差を認めなかった (図 6)。

#### 4.4. 蛍光免疫染色によるタンパク質の発現解析

Validation された DEG のうち、NR4A2 は SS との関連を示した既報がないことから、NR4A2 に着目し、SS との関連につき検討を進めた。蛍光免疫染色において、NR4A2 のタンパク質発現は SS の LSG において顕著に認められたが、IgG4-RD の LSG では認められなかった。そして、NR4A2 と、CD3、CD4、IL-17 の共染色において、NR4A2 の発現は SS の LSG に浸潤した CD3 陽性 T 細胞 (図 7)、CD4 陽性 T 細胞 (図 8)、IL-17 産生細胞 (図 9) に認められた。一方で、IL-17 非産生細胞では NR4A2 の発現がほとんど認められなかった (図 9)。以上より、NR4A2 は SS の LSG に浸潤した Th17 細胞から主に産生されることが示唆された。そして、NR4A2 はこれらの細胞の核に局在した。

#### 4.5. SS 患者の末梢血 CD4 陽性 T 細胞における NR4A2 遺伝子発現

SS 患者 (n=22) の PBMC から分離された CD4 陽性 T 細胞において、NR4A2 の mRNA 発現は、健常者 (n=10) と比較し有意に上昇していた (図 10)。

#### 4.6. SS 患者末梢血 CD4 陽性 T 細胞の Th17 分化条件における培養

Th17 分化条件の培養後において、CD4 陽性 T 細胞中の IL-17<sup>+</sup>IFN- $\gamma$  細胞の割合 (%) は、SS 患者 (n=5, 4.50 $\pm$ 1.41%) で健常者 (n=3, 2.18 $\pm$ 0.84%) よりも有意に上昇した (図 11A, B)。一方、Th0 条件の培養後においては、両者に差は認められなかった (図 11A, B)。また、Th17 分化条件の培養後における CD4 陽性 T 細胞中の IL-17<sup>+</sup>IFN- $\gamma$  細胞の割合 (%) は、培養前のベースラインにおける CD4 陽性 T 細胞の NR4A2 の mRNA 発現量と有意に正相関した (Spearman R=0.87, p<0.01) (図 12)。

#### 4.7. Th17 分化誘導における NR4A2 のタンパク質発現と細胞内局在

ナイーブ CD4 陽性 T 細胞では、Th17 分化条件、Th0 条件において NR4A2 のタンパク質発現が経時的に有意な増加を示した (図 13A, B)。一方、全ての時点において、NR4A2 の発現は Th17 分化条件、Th0 条件の両者で差が認められなかった (図 13A, B)。また、Th17 分化条件 (培養 4 日目) では、NR4A2 は特異的に核内へ局在したが、Th1 分化条件、Th0 条件 (培養 4 日目) では、NR4A2 は主に細胞質に局在した (図 14A)。ナイーブ CD4 陽性 T 細胞における NR4A2 の核内発現率は、Th17 分化条件 (82.6 $\pm$ 5.35%) において Th1 分化条件 (33.5 $\pm$ 5.96%)、Th0 条件 (37.6 $\pm$ 21.9%) よりも有意に高値だった (図 14B)。さらに、SS 患者では、Th17 分化誘導後の CD4 陽性 T 細胞における NR4A2 核内発現率 (98.1 $\pm$ 2.0%) が、健常者 (85.1 $\pm$ 8.1%) と比較し、有意に高値であった (図 15A, B)。一方、Th0 条件下の CD4 陽性 T 細胞における NR4A2 核内発現率は、SS 患者 (40.5 $\pm$ 11.9%) と健常者 (51.2 $\pm$ 12.6%) で差は認められなかった (図 15A, B)。

#### 4.8. IPZ による CD4 陽性 T 細胞における NR4A2 の核内移行阻害

ナイーブ CD4 陽性 T 細胞における NR4A2 の核局在は、Th17 分化条件において IPZ により特異的に阻害された (図 16A)。Th17 分化条件における NR4A2 の核内発現率はコントロール (DMSO) において  $90.0 \pm 10.1\%$ 、IPZ において  $43.1 \pm 15.1\%$  であった ( $p < 0.05$ ) (図 16B)。一方、Th0 条件においては、IPZ により NR4A2 の細胞内局在に変化は認められず (図 16A)、NR4A2 の核内発現率はコントロール (DMSO) において  $36.9 \pm 30.0\%$ 、IPZ において  $31.7 \pm 21.0\%$  であった (図 16B)。さらに、ナイーブ CD4 陽性 T 細胞を Th17 分化条件で培養した後の CD4 陽性 T 細胞における IL-17<sup>+</sup>IFN- $\gamma$  細胞の割合 (%) は、IPZ により有意に抑制された (コントロール (DMSO) :  $1.89 \pm 0.24\%$ 、IPZ :  $1.16 \pm 0.12\%$ ) (図 17A, B)。一方、Th0 条件で培養後の CD4 陽性 T 細胞における IL-17<sup>+</sup>IFN- $\gamma$  細胞の割合 (%) は、IPZ により変化しなかった (コントロール (DMSO) :  $0.20 \pm 0.14\%$ 、IPZ :  $0.12 \pm 0.07\%$ ) (図 17A, B)。また、Th17 分化条件では、ナイーブ CD4 陽性 T 細胞における IL-21 の mRNA 発現が IPZ により有意に抑制された (図 18)。Th0 条件では IPZ により IL-21 の mRNA 発現は変化しなかった (図 18)。一方、ナイーブ CD4 陽性 T 細胞における RORC の mRNA 発現は、Th17 分化条件、Th0 条件のいずれにおいても IPZ とコントロールで差は認められなかった (図 19)。

## 5. 考察

本研究では、SS の病態に関与する遺伝子を同定するために、SS 患者と IgG4-RD 患者の LSG を用いて cDNA マイクロアレイを行った。IgG4-RD の LSG は、SS と同様にリンパ球浸潤を伴う炎症を来すことから、これを比較対照とすることで SS の LSG に発現する疾患に特異的な発現遺伝子を抽出できる可能性があると考えた。SS 患者の LSG で発現が上昇した DEG セットには、エンリッチメント解析により、抗原プロセッシングや抗原提示といった免疫学的なプロセスに関連する GO term が濃縮されることが示され、これらが SS の特徴を反映していると考えられた。本研究では、cDNA マイクロアレイの validation 解析に、SS で発現が上昇した遺伝子を選択し、検討を進めた。これは、発現亢進による遺伝子の”gain of function”効果が SS の病態形成に関与している可能性があり、それが治療標的になり得ると考えたからである。一方、IgG4-RD と比較し SS で発現が低下した遺伝子は選択しなかった。これは、SS と同様に、IgG4-RD において発現が亢進し、その病態形成においてより重要な役割を果たす遺伝子である可能性が考えられたからである。SS の病態形成において、T 細胞が最も重要な役割を果たすとされることから、本研究では特に T 細胞機能との関連に着目し、SS で発現が上昇した DEG から validation 候補遺伝子を抽出した。CD4 陽性 T 細胞は、SS と IgG4-RD のいずれの LSG においても多くの浸潤がみられるとされることから[1, 6]、SS で発現が上昇した T 細胞に関連する DEG は、SS の LSG に浸潤した CD4 陽性 T 細胞において主に発現し、その機能に関与する可能性を考えた。そして、validation 候補遺伝子の中から、オーファン核内受容体である NR4A2 が SS の LSG で高発現する遺伝子として同定され、SS の病態形成における役割につ

いて検討を進めることとした。

第一に、SS 患者の LSG と末梢血中の CD4 陽性 T 細胞における NR4A2 発現を検討した。まず、LSG の蛍光免疫染色の結果から、SS において IgG4-RD よりも LSG 中の CD4 陽性 T 細胞における NR4A2 の発現が高いことがわかった。NR4A2 は CD4 陽性 T 細胞において、TCR 刺激により誘導されることが過去に報告されている[25]。したがって、SS の LSG に浸潤した CD4 陽性 T 細胞における NR4A2 の発現亢進は、LSG 局所における TCR 反応性の亢進によると考えられる。特に LSG の自己抗原への反応性を有する CD4 陽性 T 細胞が集族している可能性が考えられる。さらに、SS 患者の末梢血 CD4 陽性 T 細胞においても NR4A2 の発現亢進がみられた。同様の結果が、多発性硬化症 (multiple sclerosis: MS) 患者の末梢血 T 細胞でも報告されている[16]。MS の疾患マウスモデルである EAE においても、病変の主座である中枢神経系に浸潤した T 細胞の NR4A2 発現が上昇した後に、末梢血 T 細胞の NR4A2 発現上昇が認められている[15, 16]。これは、中枢神経系において自己抗原が含まれるミエリンを貪食した抗原提示細胞 (antigen presenting cell: APC) が、末梢血へ移行し、末梢血 T 細胞を活性化した結果である可能性が考察されている。したがって、SS 患者においても、末梢血 CD4 陽性 T 細胞の NR4A2 発現亢進は、病原性 T 細胞を活性化しうる自己抗原を提示した APC が唾液腺など炎症局所から末梢血へ移行した結果である可能性が考えられる。一方、MS 患者の全血、PBMC において NR4A2 の発現低下がみられたとする逆の報告もある[26, 27]。しかし、前述の報告や本研究とは発現解析の対象とした細胞分画が異なることから、両者の結果は矛盾するものではないと考える。さらに、NR4A2 のヘテロノックアウトマウスでは EAE の表現型が増悪するとの報告も存在し[28]、これも CD4 陽性 T 細胞における NR4A2 の発現亢進が

EAE の病態形成に関与することを示した前述の報告と一見矛盾するように思われる。しかし、他の報告では、CD4 陽性 T 細胞において選択的に NR4A2 が欠損した、CD4 特異的 NR4A2 コンディショナルノックアウトマウスにおいて、EAE の急性期症状が改善することが示されている[29]。このように、EAE において NR4A2 の欠損が CD4 陽性 T 細胞に限定されると、CD4 陽性 T 細胞における NR4A2 の病因的役割が明確になる。

第二に、SS 患者の LSG と末梢血を用い、NR4A2 発現と Th17 細胞の関連を検討した。LSG の蛍光免疫染色の結果から、NR4A2 は Th17 細胞において産生され、その発現は SS に特異的であることがわかった。このことから、SS 患者の唾液腺炎において、NR4A2 は Th17 細胞の活性化に関与する分子である可能性が考えられた。さらに、NR4A2 を高発現する SS 患者の末梢血 CD4 陽性 T 細胞では、Th17 分化条件における Th17 細胞への分化傾向が健常者よりも亢進し、ベースラインの NR4A2 発現量と分化誘導後の Th17 細胞数は有意に正相関した。このことから、NR4A2 は SS 患者の CD4 陽性 T 細胞における Th17 分化に関与し、その発現亢進が Th17 細胞への分化亢進の一因となっている可能性が考えられた。

第三に、Th17 分化における NR4A2 の細胞内局在の意義について検討した。本研究により、NR4A2 は Th17 分化条件において CD4 陽性 T 細胞の核内に局在することが示された。一方、Th0 条件や Th1 分化条件では、細胞質に局在した。これらの結果から、NR4A2 は Th17 分化条件において核内へ移行し、CD4 陽性 T 細胞における転写因子として機能する可能性が示唆された。癌細胞における NR4A2 の細胞内局在を検討した報告が存在する[30]。NR4A2 は活性化すると膀胱癌の増殖を抑制されるとされるが[31]、その発現が細胞質に局在すると腫瘍の進展が促進される[30]。しかし、

T細胞における NR4A2 の細胞内局在を示した報告はない。NR4A2 は NLS と NES の両方をそのタンパク質分子内に有すると報告されている[13]。NLS が importin- $\alpha$  へ結合し、importin- $\alpha/\beta$ 1 と複合体を形成することで、積み荷タンパク質の核内輸送が媒介される。一方、NES は exportin と結合し、複合体を形成することで、積み荷タンパク質の核外輸送が媒介される[13]。NLS と NES の両方を有するタンパク質の場合、その細胞内局在は、importin による核内輸送系と exportin による核外輸送系のバランスにより決定されると考えられる。これらの観点から、Th17 分化条件において、NR4A2 が CD4 陽性 T 細胞の核内へ局在するのは、importin による核内輸送系が優位になるためと考えられる。さらに、IPZ を用いて NR4A2 の核内移行を阻害することで、CD4 陽性 T 細胞の Th17 分化における NR4A2 の核内移行の役割について検討を行った。IPZ は、Th17 分化条件において Th17 分化と IL-21 発現を顕著に抑制した。cNLS Mapper を用いた解析によると[32]、既知の Th17 関連分子（ROR $\gamma$ 、STAT3、IRF4、c-maf）や、他のヘルパーT細胞サブセットや制御性 T 細胞に関連した他の転写因子（T-bet、GATA3、Bcl6、Foxp3）には機能的な典型的 NLS は同定されないことから、少なくとも Th17 分化条件において、IPZ は NR4A2 の核内移行に対する選択的な抑制効果を有する可能性が考えられた。IL-21 は Th17 細胞の増殖、安定化に関与するサイトカインであり[33]、本研究の結果から、NR4A2 の核内移行は、IL-21 発現の促進を介して Th17 分化に寄与する可能性が示唆された。IL-21 遺伝子のプロモーター領域に NR4A2 が結合しうる Nur-response element（NurRE）や NGFI-B response element（NBRE）が存在することを示した知見はないが、Th17 分化において IL-21 発現を促進する c-maf の発現上昇が、siRNA を用いた NR4A2 のノックダウンにより阻害されることを示した報告がある[15]。このように、NR4A2 と IL-21 を

結びつける間接的なシグナル経路が存在する可能性があると考えられた。また、IL-21 は Th17 細胞のマスター転写因子である retinoic acid receptor-related orphan receptor  $\gamma$ t (ROR $\gamma$ t) とは独立したシグナル経路により制御されることが示唆されている[34]。本研究では、IPZ を用いて CD4 陽性 T 細胞における NR4A2 の核内移行を阻害しても、RORC の発現は変化しなかった。このことから、NR4A2 は ROR $\gamma$ t 非依存的に Th17 細胞における IL-21 発現を制御している可能性が示唆された。

第四に、SS 患者の CD4 陽性 T 細胞における NR4A2 の細胞内局在を検討した。SS 患者では、LSG に浸潤した CD4 陽性 T 細胞と同様に、Th17 分化誘導した末梢血 CD4 陽性 T 細胞においても NR4A2 の核内発現は亢進した。SS 患者では、NR4A2 発現亢進が IL-21 産生を促進し、Th17 分化が増強されるプロセスにおいて、importin による核内輸送系の亢進が NR4A2 の転写活性化に重要な役割を果たすと考えられた。

このように、NR4A2 は TCR 刺激により誘導され、Th17 分化誘導環境によって CD4 陽性 T 細胞の核内に局在する。そして、CD4 陽性 T 細胞における NR4A2 の核局在化は ROR $\gamma$ t 非依存的に IL-21 発現を促進し、Th17 分化に関与すると考えられた。SS 患者では、CD4 陽性 T 細胞における NR4A2 の発現と核局在が亢進し、Th17 分化の促進に寄与すると考えられた (図 20)。

SS 患者の中樞神経病変はしばしば MS に類似し、両者の臨床像は重複することがある[35, 36]。T 細胞における NR4A2 の発現亢進は、SS と MS に共通する病因を説明できる可能性がある。siRNA により CD4 陽性 T 細胞における NR4A2 をノックダウンすると、EAE の病態は抑制され、治療がしえたことから[15]、SS においても治療標的分子となる可能性がある。NR4A2 を標的とした治療戦略のうち、IPZ を用いた核内輸送系の阻害は SS の治療において有用なアプローチとなる可能性があるが、

今後 SS の動物モデルを用いた実験を行い、IPZ の in vivo での効果を明らかにする必要があると考える。

## 6. 結論

SS 患者において、NR4A2 は CD4 陽性 T 細胞における発現と核局在が亢進することで Th17 分化を促進し、SS の病態形成に関与する可能性が示唆された。また、これは SS の病態における NR4A2 の役割を示した初めての報告である。

## 7. 略語

SS: Sjögren's syndrome

LSG: labial salivary gland

TCR: T cell receptor

IgG4-RD: IgG4-related disease

DEG: differentially expressed gene

Th17: T helper cell type 17

IL-17: interleukin-17

NR4A2: nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2

DBD: DNA-binding domain

LBD: ligand-binding domain

NLS: nuclear localization signal

NES: nuclear export signal

EAE: experimental autoimmune encephalomyelitis

HC: healthy control

FDR: false discovery rate

FC: fold change

GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

PBS: phosphate buffered saline

DAPI: diamidino-2-phenylindole

PBMC: peripheral blood mononuclear cell

IFN- $\gamma$  : interferon- $\gamma$

IPZ: importazole

DMSO: dimethyl sulfoxide

RORC: retinoic acid receptor-related orphan receptor C

EULAR: European League against Rheumatism

ESSDAI: EULAR Sjögren's syndrome disease activity index

MHC: major histocompatibility complex

CXCL9: chemokine (C-X-C motif) ligand 9

SGK1: serum and glucocorticoid-regulated kinase 1

IRF4: interferon regulatory factor 4

PDK1: phosphoinositide-dependent kinase 1

MS: multiple sclerosis

APC: antigen presenting cell

ROR $\gamma$ t: retinoic acid receptor-related orphan receptor  $\gamma$ t

## 8. 謝辞

本研究と論文作成にあたり、多くのご指導を賜りました住田孝之先生（筑波大学医学医療系内科（膠原病・リウマチ・アレルギー）教授）、松本功先生（筑波大学医学医療系内科（膠原病・リウマチ・アレルギー）准教授）、坪井洋人先生（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）に心から感謝申し上げます。

また、**cDNA** マイクロアレイの実施にあたりご協力をいただきました中井雄治先生（弘前大学食料科学研究所教授）、阿部啓子先生（東京大学大学院農学生命科学研究科教授）に深謝いたします。

また、検体の提供にご協力を頂きました筑波大学附属病院の患者様方、ならびにスタッフの皆様に感謝いたします。

## 9. 参考文献

1. Nocturne G, Mariette X. Advances in understanding the pathogenesis of primary Sjögren's syndrome. *Nat Rev Rheumatol* 2013;9:544-556.
2. Christodoulou MI, Kapsogeorgou EK, Moutsopoulos HM. Characteristics of the minor salivary gland infiltrates in Sjögren's syndrome. *J Autoimmun* 2010;34:400-407.
3. Hjelmervik TO, Petersen K, Jonassen I, et al. Gene expression profiling of minor salivary glands clearly distinguishes primary Sjögren's syndrome patients from healthy control subjects. *Arthritis Rheum* 2005;52:1534-1544.
4. Wakamatsu E, Nakamura Y, Matsumoto I, et al. DNA microarray analysis of labial salivary glands of patients with Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 2007;66:844-845.
5. Umehara H, Okazaki K, Masaki Y, et al. A novel clinical entity, IgG4-related disease (IgG4-RD): general concept and details. *Mod Rheumatol* 2012;22:1-14.
6. Moriyama M, Tanaka A, Maehara T, et al. T helper subsets in Sjögren's syndrome and IgG4-related dacryoadenitis and sialoadenitis: a critical review. *J Autoimmun* 2014;51:81-88.
7. Tsuboi H, Nakai Y, Iizuka M, et al. DNA microarray analysis of labial salivary glands in IgG4-related disease: comparison with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheumatol* 2014;66:2892-2899.
8. Sakai A, Sugawara Y, Kuroishi T, et al. Identification of IL-18 and Th17 cells in salivary glands of patients with Sjögren's syndrome, and amplification of IL-17-mediated secretion of inflammatory cytokines from salivary gland cells by IL-18. *J Immunol* 2008;181:2898-2906.

9. Katsifis GE, Rekka S, Moutsopoulos NM, et al. Systemic and local interleukin-17 and linked cytokines associated with Sjögren's syndrome immunopathogenesis. *Am J Pathol* 2009;175:1167-1177.
10. Nguyen CQ, Yin H, Lee BH, et al. Pathogenic effect of interleukin-17A in induction of Sjögren's syndrome-like disease using adenovirus-mediated gene transfer. *Arthritis Res Ther* 2010;12:R220.
11. Karabiyik A, Peck AB, Nguyen CQ. The important role of T cells and receptor expression in Sjögren's syndrome. *Scand J Immunol* 2013;78:157-166.
12. Lin X, Rui K, Deng J, et al. Th17 cells play a critical role in the development of experimental Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 2015;74:1302-1310.
13. García-Yagüe ÁJ, Rada P, Rojo AI, et al. Nuclear import and export signals control the subcellular localization of Nurr1 protein in response to oxidative stress. *J Biol Chem* 2013;288:5506-5517.
14. Han YF, Cao GW. Role of nuclear receptor NR4A2 in gastrointestinal inflammation and cancers. *World J Gastroenterol* 2012;18:6865-73.
15. Raveney BJ, Oki S, Yamamura T. Nuclear receptor NR4A2 orchestrates Th17 cell-mediated autoimmune inflammation via IL-21 signalling. *PLoS One* 2013;8:e56595.
16. Doi Y, Oki S, Ozawa T, et al. Orphan nuclear receptor NR4A2 expressed in T cells from multiple sclerosis mediates production of inflammatory cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:8381-8386.
17. Galleguillos D, Vecchiola A, Fuentealba JA, et al. PIASy represses the transcriptional activation induced by the nuclear receptor Nurr1. *J Biol Chem* 2004;279:2005-2011.
18. Martinat C, Bacci JJ, Leete T, et al. Cooperative transcription activation by Nurr1

and Pitx3 induces embryonic stem cell maturation to the midbrain dopamine neuron phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:2874-2879.

19. Fujibayashi T, Sugai S, Miyasaka N, et al. Revised Japanese criteria for Sjögren's syndrome (1999): Availability and validity. *Mod Rheumatol* 2004;14:425-434.
20. Shiboski SC, Shiboski CH, Criswell L, et al.; Sjögren's International Collaborative Clinical Alliance (SICCA) Research Groups. 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 (Hoboken)* 2012;64:475-487.
21. Umehara H, Okazaki K, Masaki Y, et al. Comprehensive diagnostic criteria for IgG4-related disease (IgG4-RD), 2011. *Mod Rheumatol* 2012;22:21-30.
22. Tsuboi H, Asashima H, Takai C, et al. Primary and secondary surveys on epidemiology of Sjögren's syndrome in Japan. *Mod Rheumatol* 2014;24:464-470.
23. Christie M, Chang CW, Róna G, et al. Structural biology and regulation of protein import into the nucleus. *J Mol Biol* 2016;428:2060-2090.
24. Soderholm JF, Bird SL, Kalab P, et al. Importazole, a small molecule inhibitor of the transport receptor importin- $\beta$ . *ACS Chem Biol* 2011;6:700-708.
25. Sekiya T, Kashiwagi I, Inoue N, et al. The nuclear orphan receptor Nr4a2 induces Foxp3 and regulates differentiation of CD4<sup>+</sup> T cells. *Nat Commun* 2011;2:269.
26. Achiron A, Grotto I, Balicer R, et al. Microarray analysis identifies altered regulation of nuclear receptor family members in the pre-disease state of multiple sclerosis. *Neurobiol Dis* 2010;38:201-209.
27. Gilli F, Navone ND, Perga S, et al. Loss of braking signals during inflammation: a

- factor affecting the development and disease course of multiple sclerosis. *Arch Neurol* 2011;68:879-888.
28. Montarolo F, Perga S, Martire S, et al. Nurr1 reduction influences the onset of chronic EAE in mice. *Inflamm Res* 2015;64:841-844.
  29. Raveney BJ, Oki S, Hohjoh H, et al. Eomesodermin-expressing T-helper cells are essential for chronic neuroinflammation. *Nat Commun* 2015;6:8437.
  30. Inamoto T, Czerniak BA, Dinney CP, Kamat AM. Cytoplasmic mislocalization of the orphan nuclear receptor Nurr1 is a prognostic factor in bladder cancer. *Cancer* 2010;116:340-346.
  31. Inamoto T, Papineni S, Chintharlapalli S, et al. 1,1-Bis(3'-indolyl)-1-(p-chlorophenyl)methane activates the orphan nuclear receptor Nurr1 and inhibits bladder cancer growth. *Mol Cancer Ther* 2008;7:3825-3833.
  32. Kosugi S, Hasebe M, Tomita M, et al. Systematic identification of cell cycle-dependent yeast nucleocytoplasmic shuttling proteins by prediction of composite motifs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:10171-10176.
  33. Liu SM, King C. IL-21-producing Th cells in immunity and autoimmunity. *J Immunol* 2013;191:3501-3506.
  34. Nurieva R, Yang XO, Martinez G, et al. Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature* 2007;448:480-483.
  35. Delalande S, de Seze J, Fauchais AL, et al. Neurologic manifestations in primary Sjögren syndrome: a study of 82 patients. *Medicine (Baltimore)* 2004;83:280-291.
  36. Kurne A, Isikay IC, Karlioguz K, et al. A clinically isolated syndrome: a challenging entity: multiple sclerosis or collagen tissue disorders: clues for

differentiation. *J Neurol* 2008;255:1625-1635.

## 10. 図表

表 1 シェーグレン症候群患者の口唇唾液腺において IgG4 関連疾患患者と比較し発現が上昇した発現変動遺伝子（上位 110 位）

Rank	Log FC	Gene Symbol	Rank	Log FC	Gene Symbol
1	5.88	IFI6	52	1.57	OAS2
2	4.86	IGHM	53	1.55	CCDC15
3	3.57	IFI44L	54	1.75	HLA-B
4	4.12	CXCL9	55	1.50	DPP4 (CD26)
5	3.43	ISG15	56	1.53	DNAJB9
6	3.15	CMPK2	59	1.75	SAMD9L
7	3.21	STAT1	60	1.56	FAM107B
8	3.11	S100P	62	1.39	SLC1A4
9	2.91	MX1	64	1.77	TAP1
11	3.07	IGHD	65	1.42	CXCL2
12	2.57	IFI44	66	1.61	PSMB8
13	3.01	CXCL10	68	1.37	LGALS3BP
15	2.82	CXCL11	70	1.93	IGKV4-1 /// IGKV4-1
16	2.83	IFI27	71	1.76	IGH /// IGHA1 /// IGHA2 /// IGHG1 /// IGHG2 /// IGHG3 /// IGHM /// IGHV4-31
18	2.50	XAF1	73	1.36	EIF2AK2
20	2.52	IFIT1	76	1.49	GGTA1P
21	2.10	CA2	77	1.32	LOC645638
22	2.36	HERC6	81	1.37	OAS3
24	2.10	OAS1	82	1.34	MANF
25	2.44	DDX60	83	1.28	LDLR
26	2.33	RSAD2	84	1.85	IGKV2-28 /// IGKV2D-28 /// IGKV2D-28
27	2.57	FOS	88	1.23	HERC5
32	2.07	PSAT1	89	1.19	FAM46A
33	2.30	IGLV3-19 /// IGLV3-19	90	1.78	IGK /// IGKC
34	2.15	LAMP3	92	1.66	---
35	2.01	EPSTI1	93	1.47	SGK1
36	2.17	EGR1	94	1.27	APOL6
37	2.64	MALAT1	96	1.55	IRF4
38	2.12	PARP9	99	1.72	LOC100505989
39	2.26	SLAMF7	100	1.24	SLC31A2
41	2.01	IFIT3	101	1.16	KCTD14 /// NDUFC2-KCTD14
42	1.74	IRF9	103	1.17	MSMO1
43	1.82	NR4A2	105	1.70	PSMB9
44	1.62	INSIG1	106	1.44	CXCL13
45	2.01	RGS1	107	1.73	PSPH
47	1.66	GNAS	108	1.42	PDK1
48	1.83	UBE2L6	109	1.53	DUSP1
49	2.03	IGLJ2 /// IGLJ2 /// IGLJ3 /// IGLJ3 /// IGLV3-1 /// IGLV3-1	110	1.23	DNAJC10

FC: fold change.

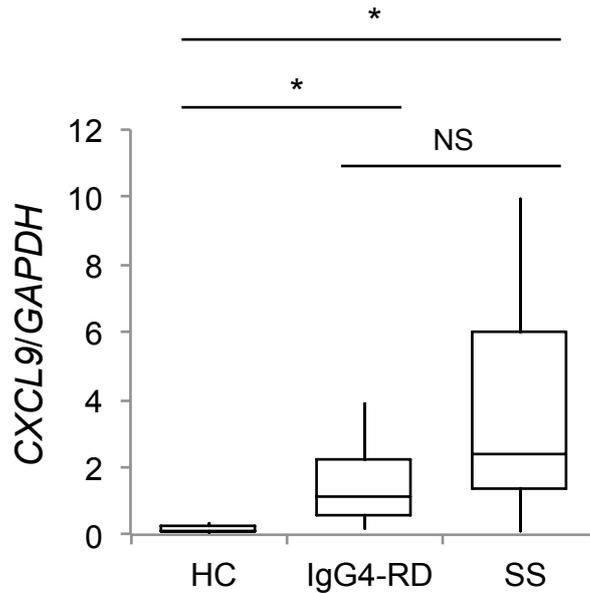


図 1 定量 PCR による validation : 口唇唾液腺 (labial salivary gland: LSG) における chemokine (C-X-C motif) ligand 9 (CXCL9) の mRNA 発現

健常者 (healthy control: HC) (n=6)、IgG4 関連疾患 (IgG4-related disease: IgG4-RD) 患者 (n=12)、シェーグレン症候群 (Sjögren's syndrome: SS) 患者 (n=15) の LSG における CXCL9 の mRNA 発現を定量 PCR により比較した。SS 患者、IgG4-RD 患者の LSG では、それぞれ HC よりも CXCL9 の mRNA 発現が有意に上昇していたが、SS 患者と IgG4-RD 患者に有意差は認められなかった。

NS: not significant. \* $p < 0.05$  (Kruskal-Wallis 検定による)

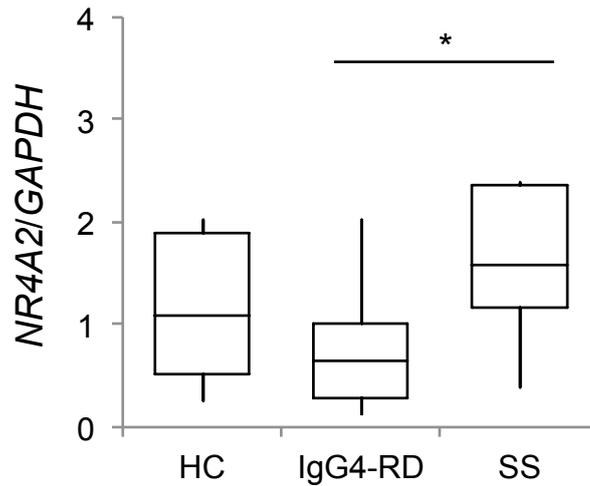
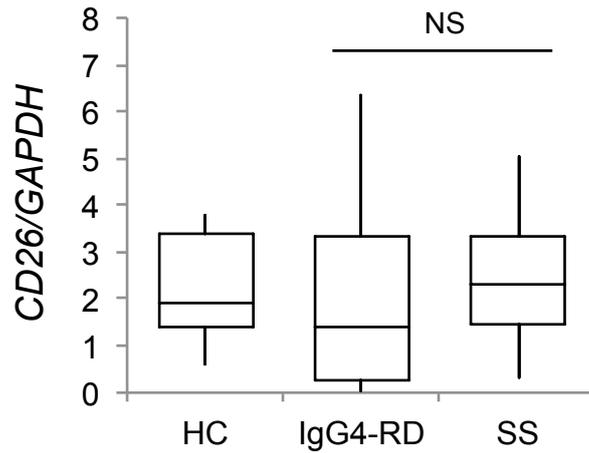


図 2 定量 PCR による validation : 口唇唾液腺 (labial salivary gland: LSG) における nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2 (NR4A2) の mRNA 発現

健常者 (healthy control: HC) (n=6)、IgG4 関連疾患 (IgG4-related disease: IgG4-RD) 患者 (n=12)、シェーグレン症候群 (Sjögren's syndrome: SS) 患者 (n=15) の LSG における NR4A2 の mRNA 発現を定量 PCR により比較した。SS 患者の LSG では、IgG4-RD 患者よりも NR4A2 の mRNA 発現が有意に上昇していた。

\* $p < 0.05$  (Kruskal-Wallis 検定による)



**図 3** 定量 PCR による validation : 口唇唾液腺 (labial salivary gland: LSG) における CD26 (dipeptidyl peptidase-4: DPP4) の mRNA 発現

健常者 (healthy control: HC) (n=6)、IgG4 関連疾患 (IgG4-related disease: IgG4-RD) 患者 (n=12)、シェーグレン症候群 (Sjögren's syndrome: SS) 患者 (n=15) の LSG における CD26 の mRNA 発現を定量 PCR により比較した。SS 患者と IgG4-RD 患者の LSG における CD26 の mRNA 発現に有意差は認められなかった。

NS: not significant. (Kruskal-Wallis 検定による)

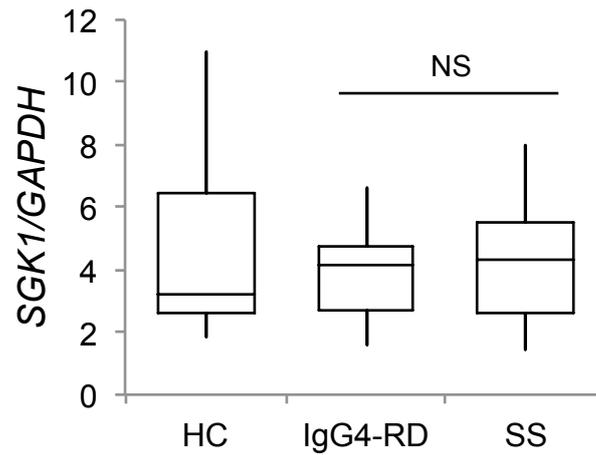


図 4 定量 PCR による validation : 口唇唾液腺 (labial salivary gland: LSG) における serum and glucocorticoid-regulated kinase 1 (SGK1) の mRNA 発現  
 健常者 (healthy control: HC) (n=6)、IgG4 関連疾患 (IgG4-related disease: IgG4-RD) 患者 (n=12)、シェーグレン症候群 (Sjögren's syndrome: SS) 患者 (n=15) の LSG における SGK1 の mRNA 発現を定量 PCR により比較した。SS 患者と IgG4-RD 患者の LSG における SGK1 の mRNA 発現に有意差は認められなかった。

NS: not significant. (Kruskal-Wallis 検定による)

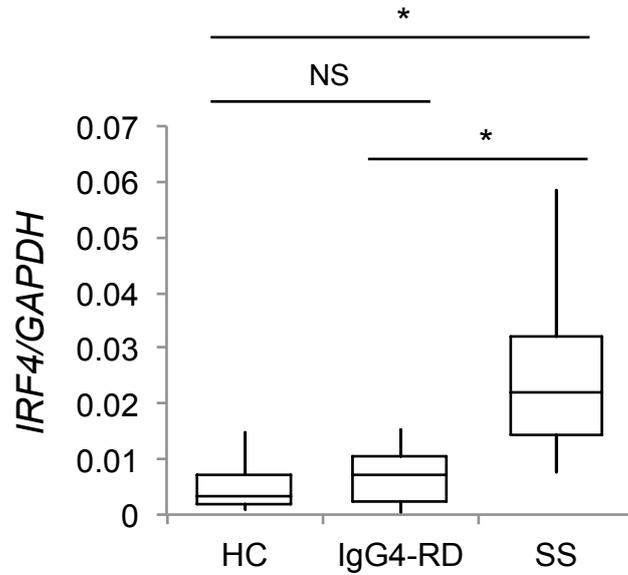
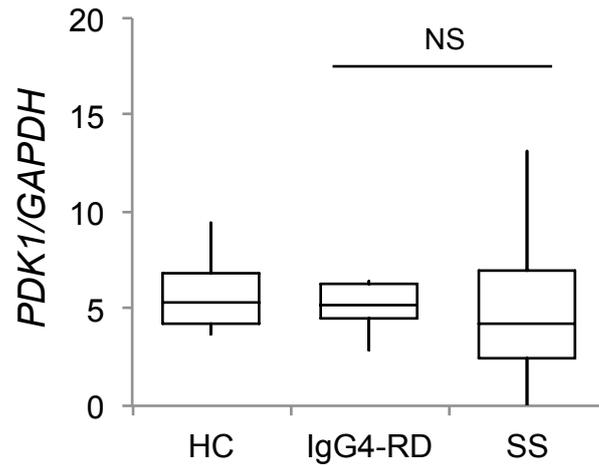


図 5 定量 PCR による validation : 口唇唾液腺 (labial salivary gland: LSG) における interferon regulatory factor 4 (IRF4) の mRNA 発現

健常者 (healthy control: HC) (n=6)、IgG4 関連疾患 (IgG4-related disease: IgG4-RD) 患者 (n=12)、シェーグレン症候群 (Sjögren's syndrome: SS) 患者 (n=15) の LSG における IRF4 の mRNA 発現を定量 PCR により比較した。SS 患者の LSG では、IgG4-RD 患者、HC よりも IRF4 の mRNA 発現が有意に上昇していた。

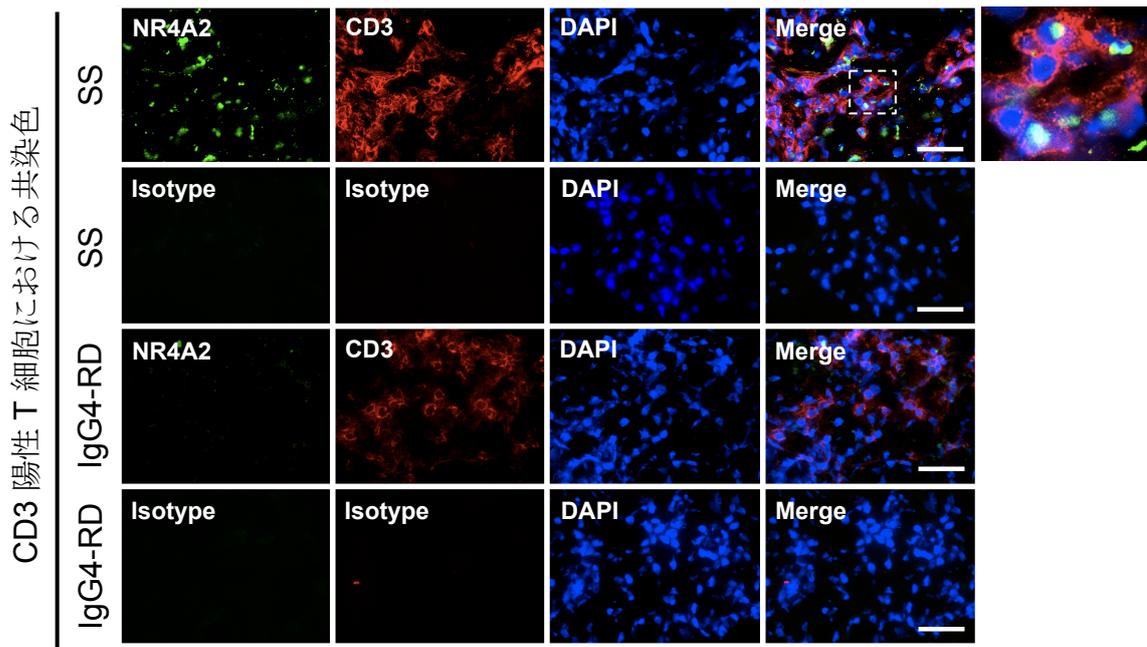
NS: not significant. \* $p < 0.05$  (Kruskal-Wallis 検定による)



**図 6 定量 PCR による validation : 口唇唾液腺 (labial salivary gland: LSG) における phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK1) の mRNA 発現**

健常者 (healthy control: HC) (n=6)、IgG4 関連疾患 (IgG4-related disease: IgG4-RD) 患者 (n=12)、シェーグレン症候群 (Sjögren's syndrome: SS) 患者 (n=15) の LSG における PDK1 の mRNA 発現を定量 PCR により比較した。SS 患者と IgG4-RD 患者の LSG における PDK1 の mRNA 発現に有意差は認められなかった。

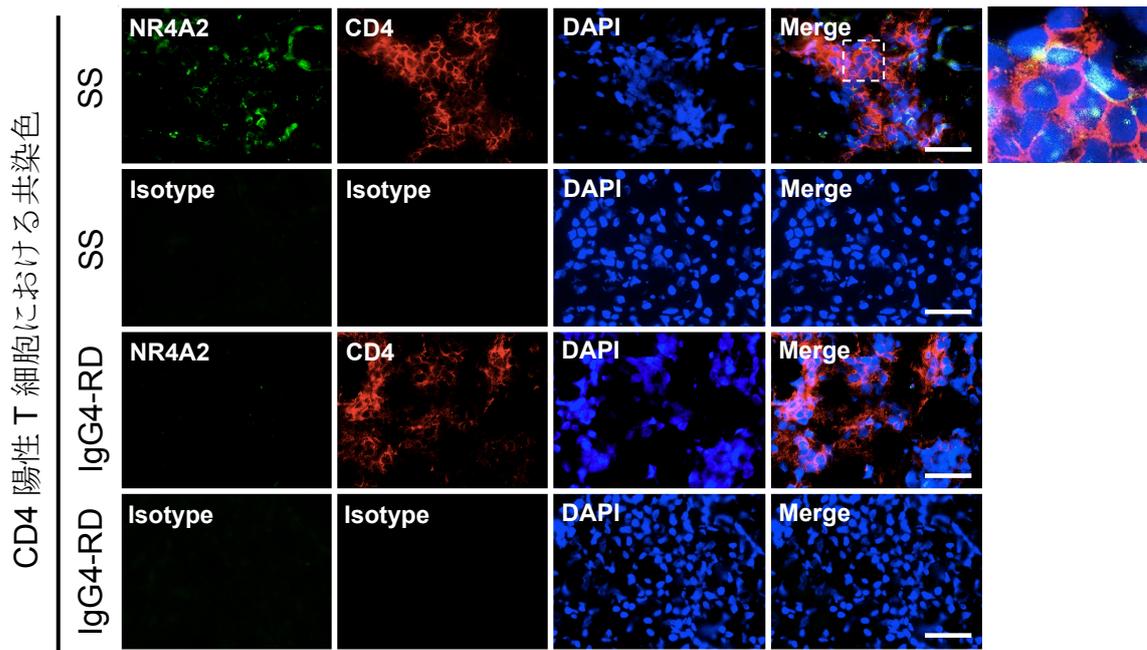
NS: not significant. (Kruskal-Wallis 検定による)



**図 7** 口唇唾液腺 (labial salivary gland: LSG) の蛍光免疫染色 : NR4A2、CD3  
 シェーグレン症候群 (Sjögren's syndrome: SS) 患者と IgG4 関連疾患 (IgG4-related  
 disease: IgG4-RD) 患者の LSG 切片を用い、NR4A2 と CD3 の二重染色を行った。  
 NR4A2 は、SS 患者の LSG に浸潤した CD3 陽性 T 細胞の核内において特異的に発  
 現がみられた。

破線で囲まれた領域につき、右に拡大図を示した。

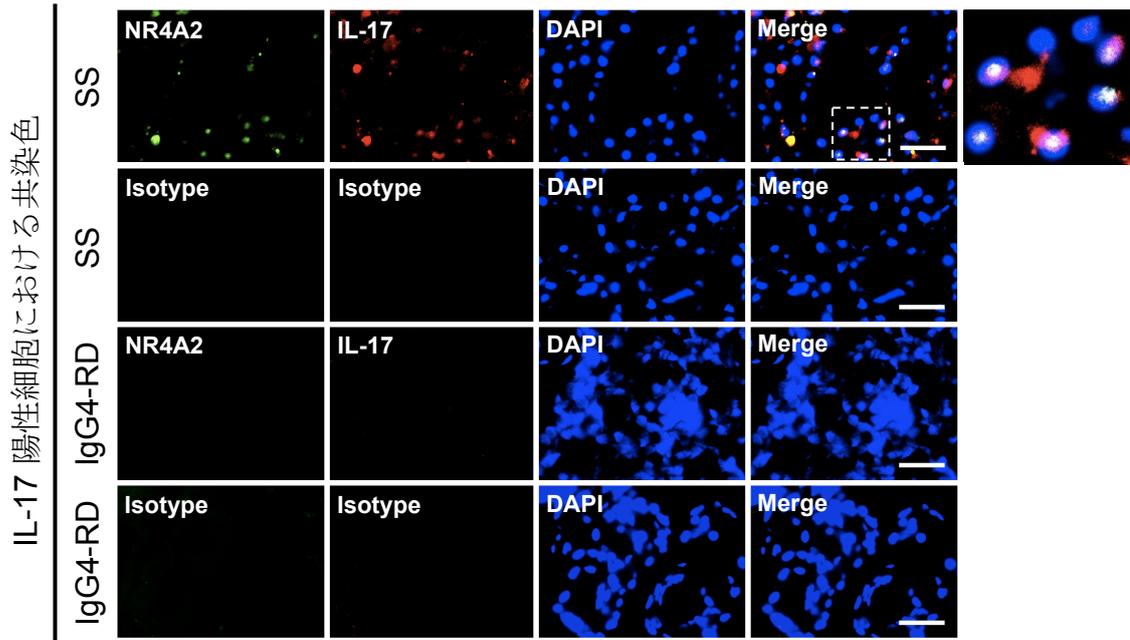
Scale bar = 25  $\mu$ m. DAPI: diamidino-2-phenylindole.



**図 8** 口唇唾液腺 (labial salivary gland: LSG) の蛍光免疫染色 : NR4A2、CD4  
 シェーグレン症候群 (Sjögren's syndrome: SS) 患者と IgG4 関連疾患 (IgG4-related  
 disease: IgG4-RD) 患者の LSG 切片を用い、NR4A2 と CD4 の二重染色を行った。  
 NR4A2 は、SS 患者の LSG に浸潤した CD4 陽性 T 細胞の核内において特異的に発  
 現がみられた。

破線で囲まれた領域につき、右に拡大図を示した。

Scale bar = 25  $\mu$ m. DAPI: diamidino-2-phenylindole.



**図 9** 口唇唾液腺 (labial salivary gland: LSG) の蛍光免疫染色 : NR4A2、IL-17  
 シェーグレン症候群 (Sjögren's syndrome: SS) 患者と IgG4 関連疾患 (IgG4-related  
 disease: IgG4-RD) 患者の LSG 切片を用い、NR4A2 と IL-17 の二重染色を行った。  
 NR4A2 は、SS 患者の LSG に浸潤した IL-17 産生細胞の核内において特異的に発現  
 がみられた。

破線で囲まれた領域につき、右に拡大図を示した。

Scale bar = 25  $\mu$ m. DAPI: diamidino-2-phenylindole.

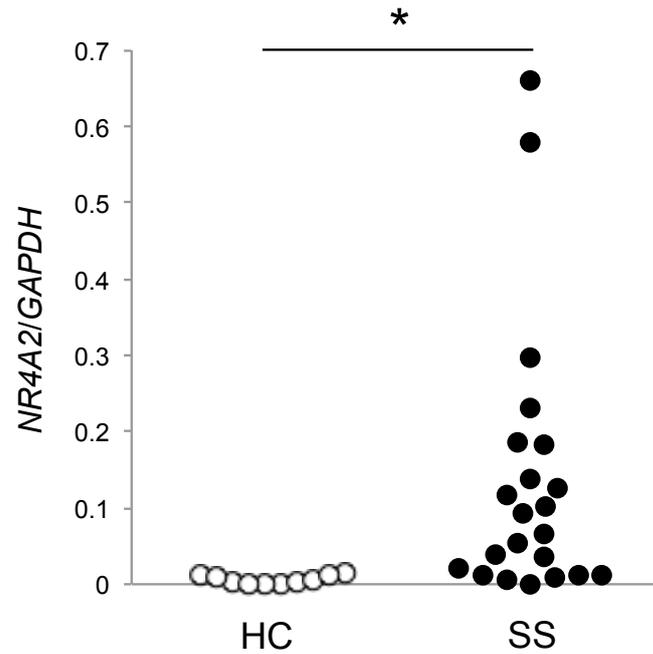
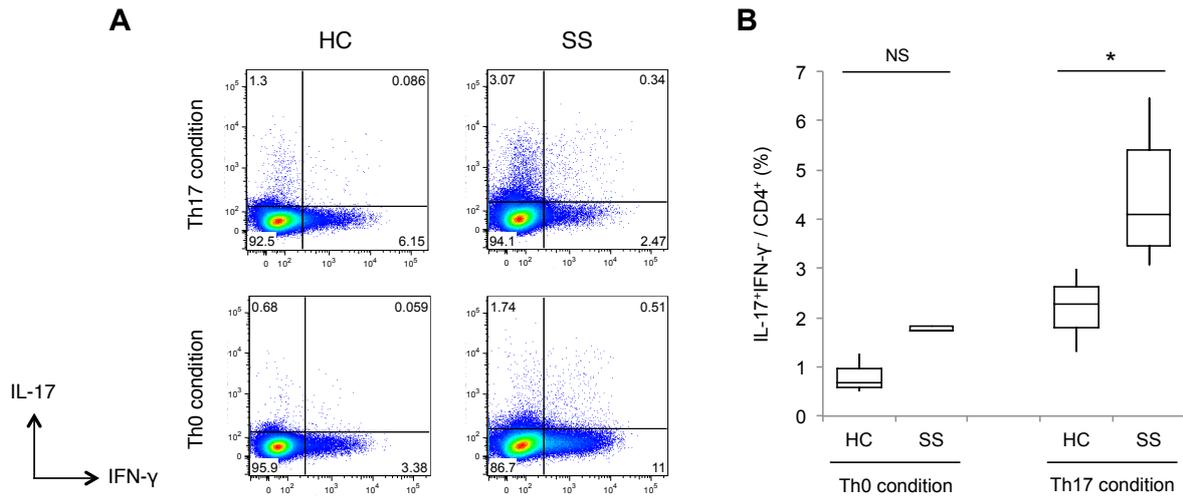


図 10 末梢血 CD4 陽性 T 細胞における NR4A2 の mRNA 発現

健常者 (healthy control: HC) (n=10)、シェーグレン症候群 (Sjögren's syndrome: SS) 患者 (n=22) の末梢血 CD4 陽性 T 細胞における NR4A2 の mRNA 発現を定量 PCR により比較した。SS 患者の末梢血 CD4 陽性 T 細胞では、NR4A2 の mRNA 発現が HC よりも有意に上昇していた。

\* $p < 0.05$  (Mann-Whitney 検定による)



**図 11 末梢血 CD4 陽性 T 細胞の Th17 分化誘導**

健常者 (healthy control: HC) (n=3)、シェーグレン症候群 (Sjögren's syndrome: SS) 患者 (n=5) の末梢血 CD4 陽性 T 細胞を Th17 分化条件、Th0 条件で 7 日間培養後、フローサイトメトリーにより IL-17、IFN- $\gamma$  発現を検討した。

**A** : HC、SS 患者の末梢血 CD4 陽性 T 細胞を Th17 分化条件、Th0 条件で 7 日間培養後、フローサイトメトリーにより CD4 陽性 T 細胞ゲートにおける IL-17、IFN- $\gamma$  発現を比較した (代表的な症例のドットプロット図)。

**B** : Th17 分化条件、Th0 条件で培養後の CD4 陽性 T 細胞中の IL-17<sup>+</sup>IFN- $\gamma$  細胞の割合 (%) を HC (n=3) と SS 患者 (n=5) で比較した。SS 患者において、Th17 分化誘導後の CD4 陽性 T 細胞における IL-17<sup>+</sup>IFN- $\gamma$  細胞の割合 (%) は HC よりも有意に高値であった。一方、Th0 条件では両者に有意差を認めなかった。

NS: not significant. \* $p$ <0.05 (Mann-Whitney 検定による)

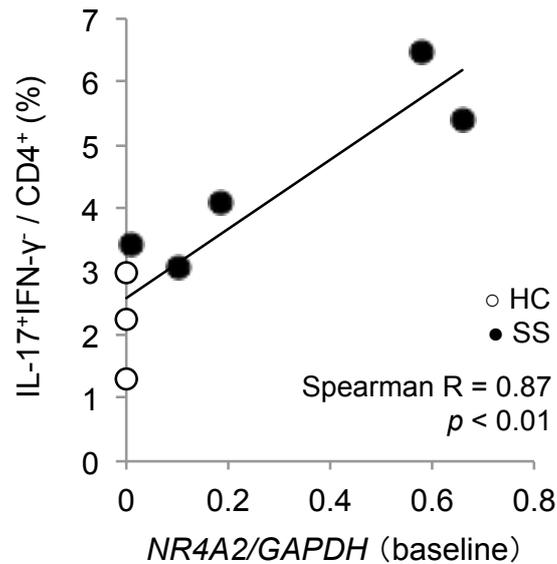


図 12 ベースラインにおける NR4A2 の mRNA 発現量と Th17 分化誘導後の IL-17 産生細胞数との相関

健常者 (healthy control: HC) (n=3)、シェーグレン症候群 (Sjögren's syndrome: SS) 患者 (n=5) の末梢血 CD4 陽性 T 細胞を Th17 分化誘導した後の CD4 陽性 T 細胞における IL-17<sup>+</sup>IFN- $\gamma$  細胞の割合 (%) とベースラインの CD4 陽性 T 細胞における NR4A2 の mRNA 発現量につき、相関解析を行った。両者には有意な正相関がみられた (Spearman R=0.87)。

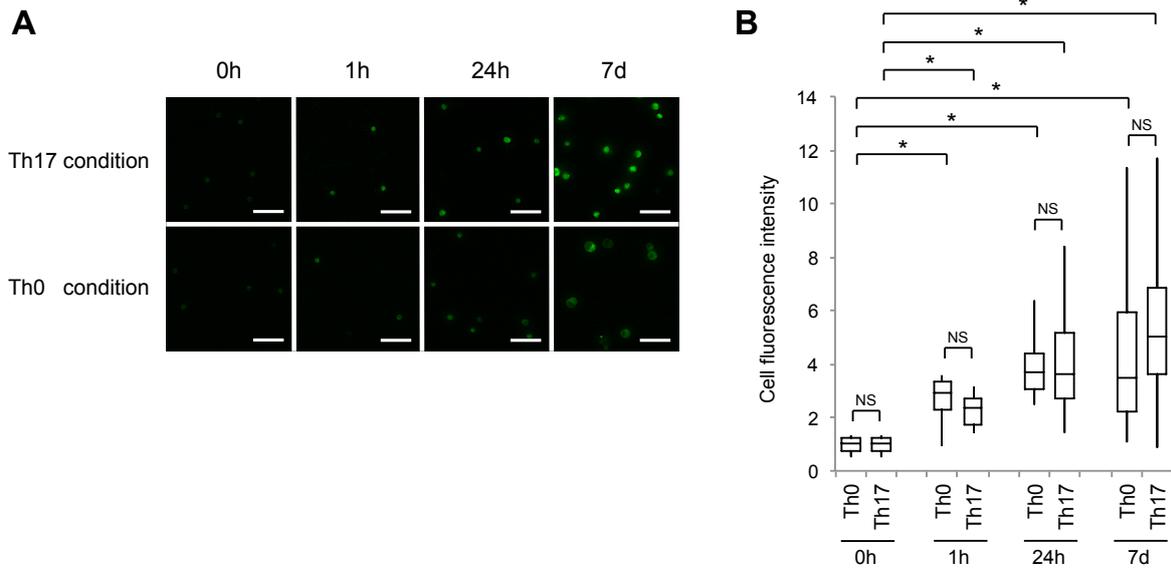


図 13 Th17 分化誘導における NR4A2 のタンパク質発現

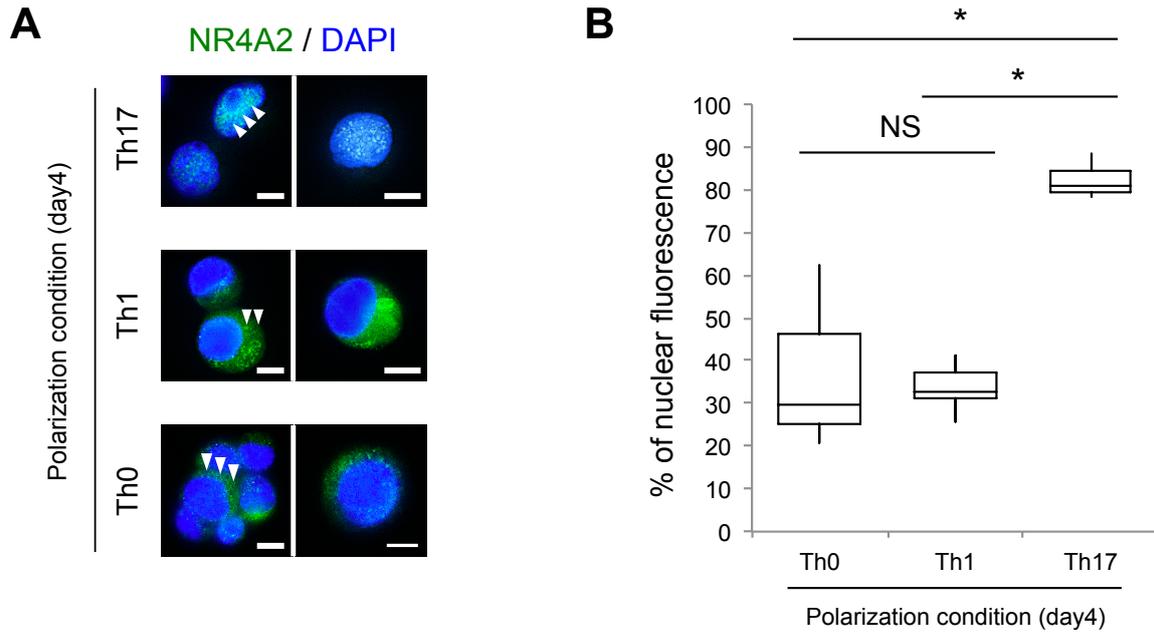
ナイーブ CD4 陽性 T 細胞（健常者）を Th17 分化条件、Th0 条件で培養したときの NR4A2 のタンパク質発現の推移を蛍光免疫細胞染色により検討した（全て倍率 200 倍、露光時間 1/5 秒で観察した）。

**A** : Th17 分化条件、Th0 条件の各時間における NR4A2 の蛍光免疫細胞染色を比較した。

Scale bar = 25  $\mu$ m.

**B** : Th17 分化条件、Th0 条件の各時間における NR4A2 の蛍光強度を BZ-X analyzer（Keyence）を用いて定量化し、比較した。Th17 分化条件、Th0 条件のいずれにおいても、NR4A2 のタンパク質発現は 0h と比較し、経時的に有意な増加を示した。一方、各時間において Th17 分化条件と Th0 条件に差は認められなかった。

NS: not significant. \* $p < 0.05$ （Mann-Whitney 検定による）



**図 14 Th17 分化誘導における NR4A2 の細胞内局在**

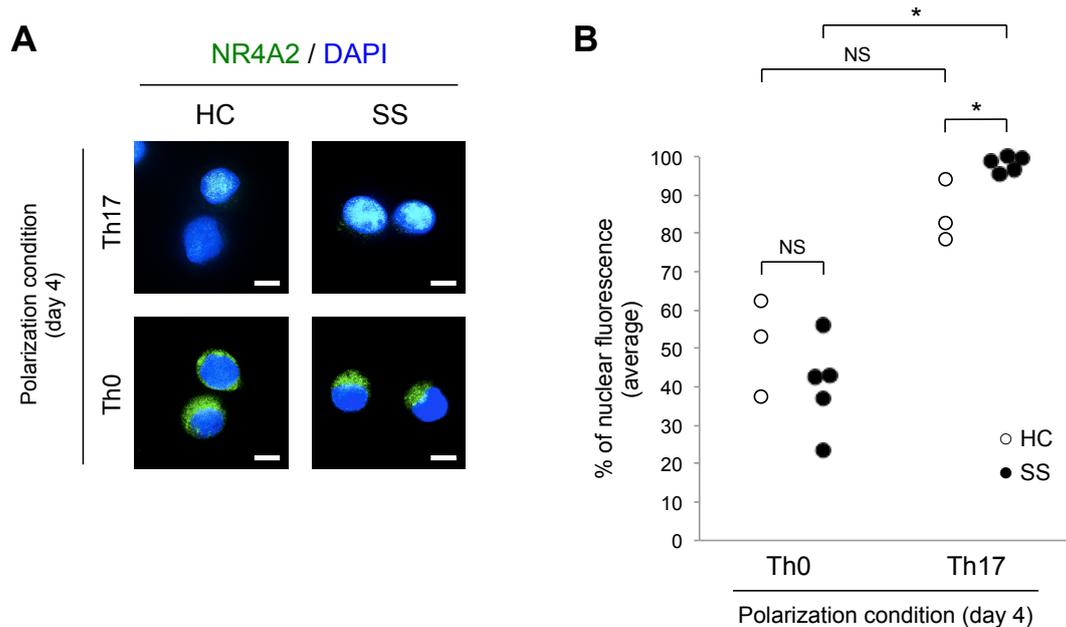
ナイーブ CD4 陽性 T 細胞（健常者）を Th17 分化条件、Th1 分化条件、Th0 条件で培養したときの NR4A2 の細胞内局在（培養 4 日目）を蛍光免疫細胞染色により検討した（全て倍率 1000 倍、露光時間 1/15 秒で観察した）。

**A** : Th17 分化条件、Th1 分化条件、Th0 条件（培養 4 日目）における NR4A2 の蛍光免疫細胞染色を比較した。Th17 分化条件において、特異的に NR4A2 の核内への局在が認められた。▲は NR4A2 の発現部位を示す。

DAPI: diamidino-2-phenylindole. Scale bar = 5  $\mu$ m.

**B** : Th17 分化条件、Th1 分化条件、Th0 条件（培養 4 日目）における NR4A2 の核内発現率（%）を BZ-X analyzer（Keyence）を用いて自動定量化し、比較した。Th17 分化条件において、Th1 分化条件、Th0 条件と比較し、NR4A2 の核内発現率が有意に亢進した。

NS: not significant. \* $p$ <0.05（Kruskal-Wallis 検定による）



**図 15 SS 患者の Th17 分化誘導における NR4A2 の細胞内局在**

健常者 (healthy control: HC) (n=3)、シェーグレン症候群 (Sjögren's syndrome: SS) 患者 (n=5) のナイーブ CD4 陽性 T 細胞を Th17 分化条件、Th0 条件で培養したときの NR4A2 の細胞内局在 (培養 4 日目) を蛍光免疫細胞染色により検討した (全て倍率 1000 倍、露光時間 1/15 秒で観察した)。

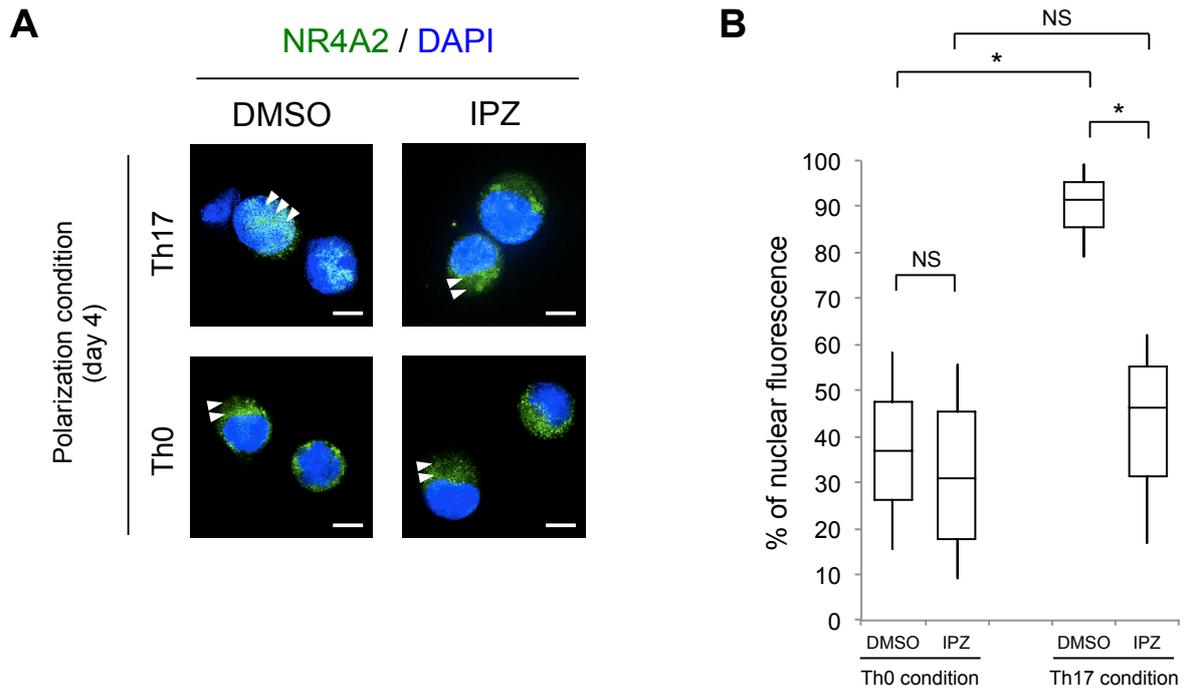
**A** : Th17 分化条件、Th0 条件 (培養 4 日目) における NR4A2 の蛍光免疫細胞染色を HC、SS 患者で比較した。

DAPI : diamidino-2-phenylindole. Scale bar = 5  $\mu$ m.

**B** : Th17 分化条件、Th0 条件 (培養 4 日目) における NR4A2 の核内発現率 (%) を HC (n=3)、SS 患者 (n=5) で比較した。SS 患者では、Th17 分化条件における NR4A2 の核内発現率が HC と比較し有意に亢進した。

なお、HC と SS 患者の比較は Mann-Whitney 検定により行い、Th17 分化条件と Th0 条件の比較は Wilcoxon の符号順位検定により行った。

NS: not significant. \* $p$ <0.05



**図 16 Importazole (IPZ) による NR4A2 の核内移行阻害**

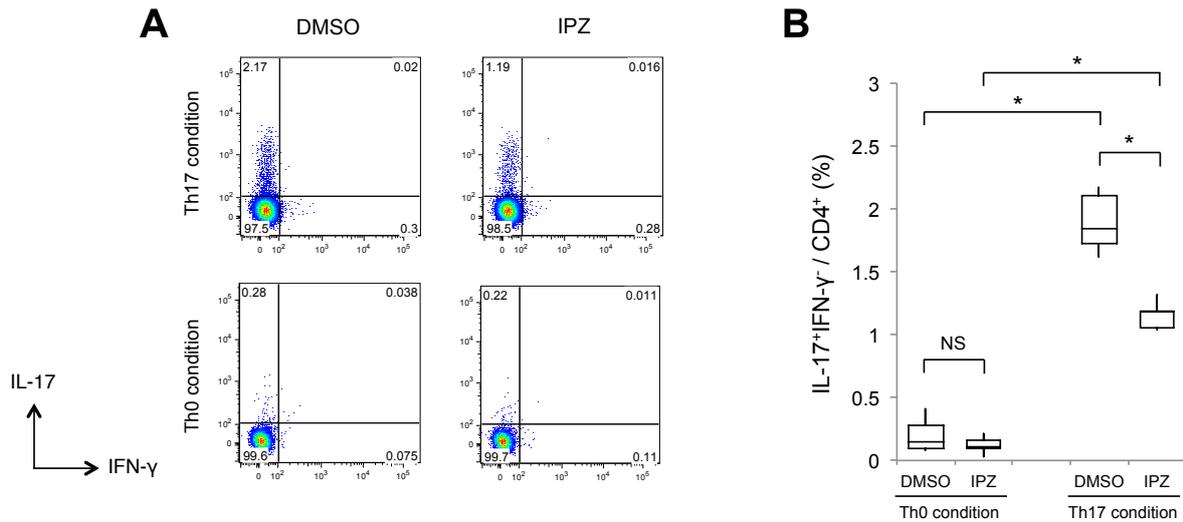
ナイーブ CD4 陽性 T 細胞 (健常者) を Th17 分化条件、Th0 条件で培養し、dimethyl sulfoxide (DMSO) (コントロール) または IPZ を添加したときの NR4A2 の細胞内局在 (培養 4 日目) を蛍光免疫細胞染色により検討した (全て倍率 1000 倍、露光時間 1/15 秒で観察した)。

**A** : Th17 分化条件、Th0 条件において、DMSO または IPZ を添加したときの NR4A2 の蛍光免疫細胞染色 (培養 4 日目) を比較した。▲は NR4A2 の発現部位を示す。

DAPI: diamidino-2-phenylindole. Scale bar = 5  $\mu$ m.

**B** : Th17 分化条件、Th0 条件において、DMSO または IPZ を添加したときの NR4A2 の核内発現率 (%) (培養 4 日目) を自動定量化し、比較した。Th17 分化条件において、NR4A2 の核内発現率は IPZ により有意に抑制された。

NS: not significant. \* $p$ <0.05 (Mann-Whitney 検定による)



### 図 17 Importazole (IPZ) による Th17 分化誘導の変化

ナイーブ CD4 陽性 T 細胞 (健康者: n=5) を Th17 分化条件、Th0 条件で培養し、dimethyl sulfoxide (DMSO) (コントロール) または IPZ を添加したときの IL-17、IFN- $\gamma$  発現 (培養 4 日目) につき、フローサイトメトリーを用いて検討した。

**A**: Th17 分化条件、Th0 条件において、DMSO または IPZ を添加し、フローサイトメトリーにより CD4 陽性 T 細胞ゲートにおける IL-17、IFN- $\gamma$  発現 (培養 4 日目) を比較した (代表的な症例のドットプロット図)。

**B**: Th17 分化条件、Th0 条件において、DMSO または IPZ を添加し、CD4 陽性 T 細胞における IL-17<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> 細胞の割合 (%) (培養 4 日目) を比較した。Th17 分化条件において、CD4 陽性 T 細胞中の IL-17<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> 細胞の割合 (%) は IPZ により有意に抑制された。一方、Th0 条件では有意な変化を認めなかった。

NS: not significant. \* $p$ <0.05 (Wilcoxon の符号順位検定による)

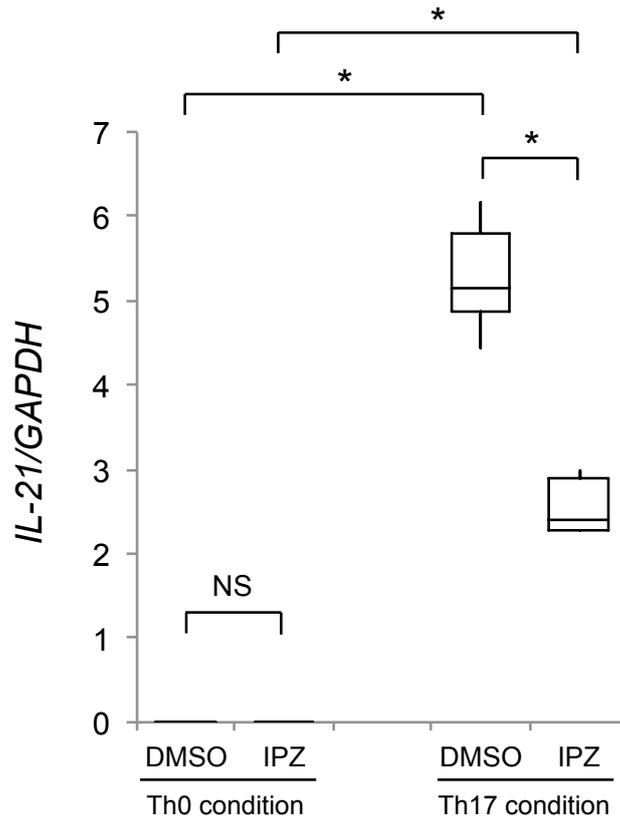


図 18 Importazole (IPZ) による IL-21 の mRNA 発現の変化

ナイーブ CD4 陽性 T 細胞 (健康者: n=5) を Th17 分化条件、Th0 条件で培養し、dimethyl sulfoxide (DMSO) (コントロール) または IPZ を添加したときの IL-21 の mRNA 発現 (培養 4 日目) につき、定量 PCR を用いて比較した。Th17 分化条件では、ナイーブ CD4 陽性 T 細胞における IL-21 の mRNA 発現は IPZ により有意に抑制された。一方、Th0 条件では有意な変化を認めなかった。

NS: not significant. \* $p < 0.05$  (Wilcoxon の符号順位検定による)

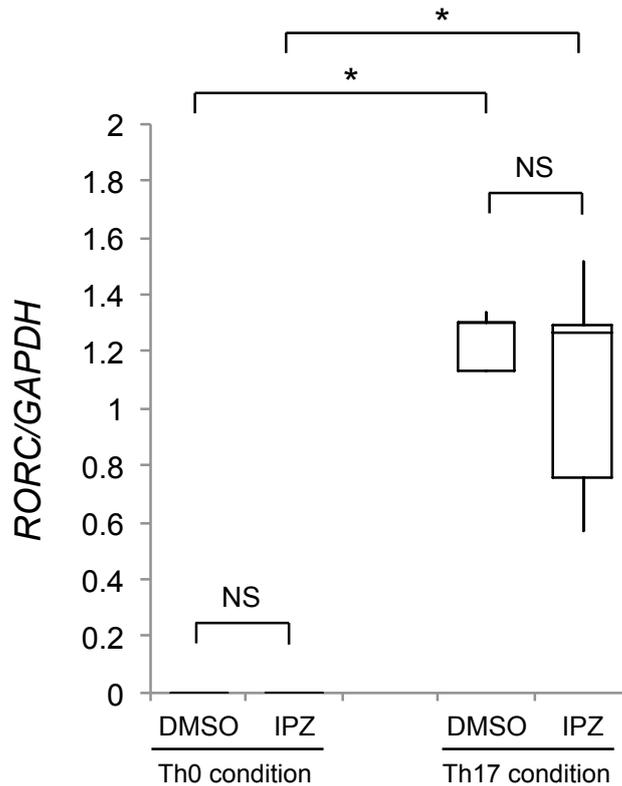


図 19 Importazole (IPZ) による RORC の mRNA 発現の変化

ナイーブ CD4 陽性 T 細胞 (健常者: n=5) を Th17 分化条件、Th0 条件で培養し、dimethyl sulfoxide (DMSO) (コントロール) または IPZ を添加したときの RORC の mRNA 発現 (培養 4 日目) につき、定量 PCR を用いて比較した。Th17 分化条件、Th0 条件のいずれにおいても、ナイーブ CD4 陽性 T 細胞の RORC の mRNA 発現は IPZ により有意な変化を認めなかった。

NS: not significant. \* $p < 0.05$  (Wilcoxon の符号順位検定による)

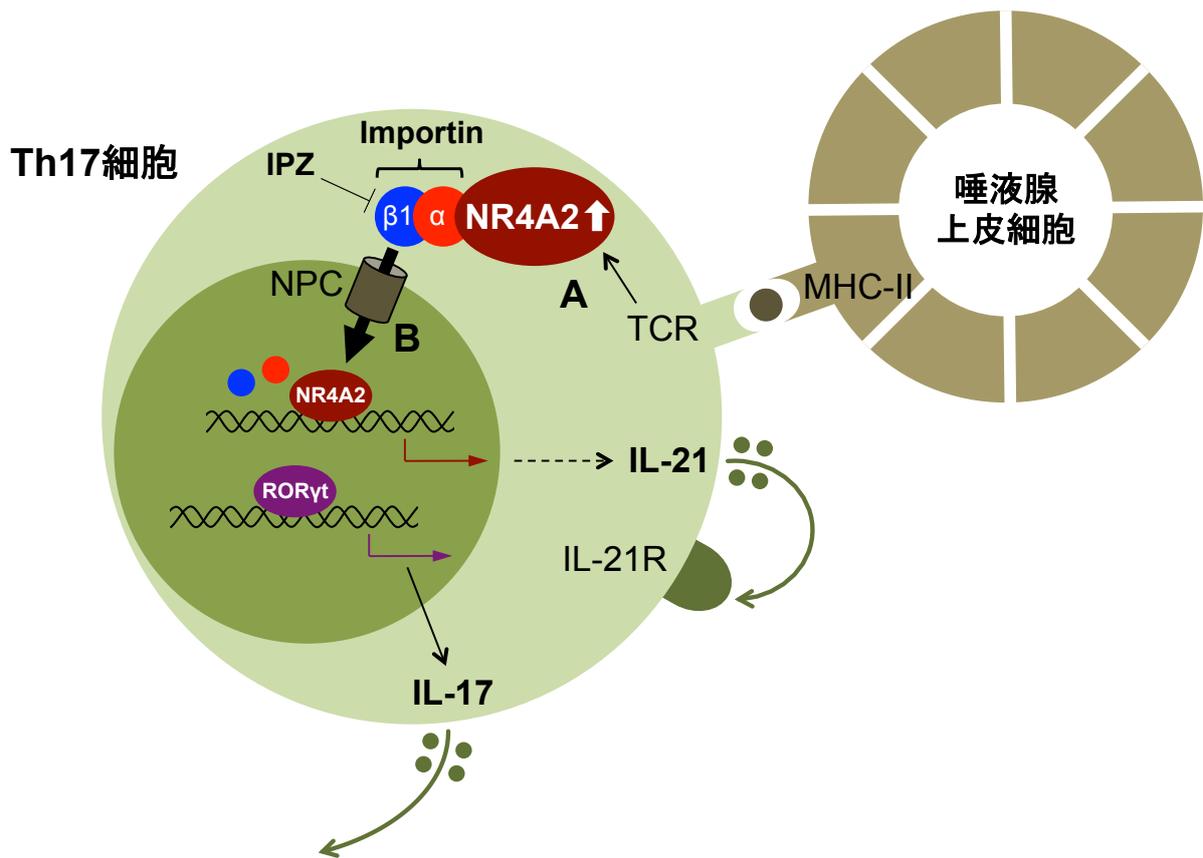


図 20 シェーグレン症候群 (Sjögren's syndrome: SS) の病態形成における NR4A2 の役割 (模式図)

NR4A2 は T 細胞受容体 (T cell receptor: TCR) 刺激により誘導され、Th17 誘導サイトカイン存在下に CD4 陽性 T 細胞の核内に局在する。そして、CD4 陽性 T 細胞における NR4A2 の核局在化は retinoic acid receptor-related orphan receptor  $\gamma$ t (ROR $\gamma$ t) 非依存的に IL-21 発現を促進し、Th17 分化に関与すると考えられる。SS 患者では、CD4 陽性 T 細胞における NR4A2 の発現 (A) と核局在 (B) が亢進し、Th17 分化の促進に寄与すると考えられた。

MHC-II: major histocompatibility complex class II. IPZ: importazole. NPC: nuclear pore complex.