

氏名	高橋 広行
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	博甲第 8706 号
学位授与年月	平成 30年 3月 23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	人間総合科学研究科
学位論文題目	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)
主査	筑波大学教授 博士 (医学) 武川 寛樹
副査	筑波大学准教授 博士 (医学) 齋藤 慎二
副査	筑波大学准教授 博士 (医学) 臼井 丈一
副査	筑波大学准教授 博士 (医学) 加治 優一

論文の内容の要旨

高橋広行氏の博士学位論文は、シェーグレン症候群 (SS) の新規疾患関連遺伝子 NR4A2 を、cDNA マイクロアレイ・定量 PCR を用いて同定し、同遺伝子が CD4 陽性 T 細胞における発現ならびに核への局在を亢進することで Th17 分化を促進することを調べた研究である。その要旨は以下の通りである。

(目的)

著者は、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)患者の口唇唾液腺 (labial salivary gland : 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ている。

(対象と方法)

著者は、SS 患者 (n=5)、IgG4-RD 患者 (n=5)、健常者 (n=3)から採取された LSG の遺伝子発現を、cDNA マイクロアレイを用いて解析し、rank products 法により発現変動遺伝子 (differentially expressed gene : DEG) (false discovery rate (FDR) <0.05) を抽出している。次いで、SS 患者の LSG で発現が上昇した DEG のうち、①順位 150 位以内、②FDR<0.0001、③log [fold change]>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 validation 候補遺伝子として抽出し、SS 患者 (n=15)、IgG4-RD 患者 (n=12)、健常者 (n=6)の LSG か

ら抽出した RNA を用いて定量 PCR による validation を行っている。そして Validation された DEG のうち、SS との関連が報告されていない新規の遺伝子に着目した。さらに著者は、蛍光免疫染色を用い、SS 患者の LSG における DEG のタンパク質発現を IgG4-RD 患者の LSG と比較すると共に、SS 患者および健常者の末梢血 CD4 陽性 T 細胞に対して、DEG の機能解析を行っている。

(結果)

著者は IgG4-RD と比較し、SS で発現が上昇した DEG として 1320 遺伝子を抽出している。Validation 候補遺伝子として chemokine (C-X-C motif) ligand 9 (CXCL9)、nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2 (NR4A2)、CD26、serum and glucocorticoid-regulated kinase 1 (SGK1)、interferon regulatory factor 4 (IRF4)、phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK1) を抽出している。このうち NR4A2 と IRF4 は、SS 患者の LSG において IgG4-RD 患者よりも発現が有意に高く、さらに NR4A2 は、SS との関連が報告されていない新規の遺伝子であった。SS 患者では IgG4-RD と比較し、LSG に浸潤した CD4 陽性 T 細胞、IL-17 産生細胞の核内において、NR4A2 のタンパク質発現を特異的に認めている。SS 患者の末梢血 CD4 陽性 T 細胞は、健常者より NR4A2 を有意に高発現し、Th17 分化誘導後における CD4 陽性 T 細胞中の IL-17+IFN- γ 細胞の割合 (%) が有意に亢進していることが分かった。また、ベースラインの NR4A2 発現量は、Th17 分化誘導後における CD4 陽性 T 細胞中の IL-17+IFN- γ 細胞の割合と有意に正相関した。CD4 陽性 T 細胞における NR4A2 のタンパク質発現は、Th17 分化条件、Th0 条件のいずれにおいてもベースラインと比較し有意に増加したが、各時点において両者に差を認めなかった。一方、Th17 分化条件 (day 4) では、Th0 条件、Th1 分化条件と比較し、特異的に NR4A2 の核内への局在を認めている。さらに、SS 患者では、Th17 分化条件 (day 4) における NR4A2 核内発現率 (%) が健常者よりも有意に亢進していることを確認している。Th17 分化条件 (day 4) では importin- β 特異的阻害剤 (importazole) により NR4A2 核内発現率は有意に低下し、IL-21 の mRNA 発現、CD4 陽性 T 細胞中の IL-17+IFN- γ 細胞の割合が有意に減少したことを明らかにしている。

(考察)

著者は、NR4A2 は T 細胞受容体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と考察している。また CD4 陽性 T 細胞における NR4A2 の核局在化は IL-21 発現を促進し、Th17 分化に関与することが分かった。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。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ことを明らかにしている。

審査の結果の要旨

(批評)

本研究は、SS 患者において高発現する新規発現変動遺伝子を探索した研究である。cDNA マイクロアレイにて抽出し、さらに条件絞込みにより 6 つの候補遺伝子を著者は選択した。その後、定量 PCR により、NR4A2 と IRF4 を候補遺伝子として選択した。前者は SS との関連が報告されていない遺伝子であり、さらなる解析を進めた。まず本研究の優れている点は、従来の報告では SS 患者と健常者を比

較した探索がほとんどであるが、著者はさらに IgG4-RD 患者との比較も加え、より SS 特異的関連遺伝子を探索した点である。この方法により、新規の NR4A2 をターゲットにすることができた。次いで著者は末梢血 CD4 陽性 T 細胞において、IL-17 産生細胞の核内で NR4A2 が特異的に発現していることを確認した。Th17 分化条件下で Th0、Th1 分化条件に比べ、NR4A2 核内への局在を確認したことは大切な所見である。一方、IPZ によりその発現は有意に抑制されることも示した。SS 患者の新規疾患関連遺伝子とその作用を検討した本研究は大変重要であり、高く評価される。

平成 30 年 1 月 11 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。