

シェーグレン症候群の B 細胞における 転写因子 E2A・Id3 の発現異常

学位論文内容の要旨

【背景】シェーグレン症候群(以下 SS)は、外分泌腺に対する自己免疫反応により腺組織の破壊と機能障害により生じる眼・口腔などの乾燥症状を主症状とし、同時に抗 SS-A・SS-B 抗体などの自己抗体産生や高ガンマグロブリン血症が認められる自己免疫疾患である。

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、悪性リンパ腫、特に B 細胞リンパ腫に進展すると考えられている。

また、導管上皮と腺房細胞、浸潤リンパ球の一部にアポトーシスに陥った細胞が認められ、腺破壊にアポトーシスを介した細胞障害の関与が示唆されている。

SS の血液検査所見の特徴には、血沈亢進、高ガンマグロブリン血症や抗核抗体、抗 SS-A・SS-B 抗体、リウマトイド因子などの多彩な自己抗体の産生が認められる。また、末梢血 B 細胞では、過剰な活性化、メモリー B 細胞の減少および形質細胞への過剰分化が認められている。

B 細胞の異常活性化と形質細胞への過剰分化の原因についてはいくつかの知見があり、活性化 T 細胞からの CD40L-CD40 を介した活性化や、B 細胞における Bcl-2 などの過剰発現、最近では BAFF/BLys などの関与も示唆されている。これらの知見より、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る。

B 細胞の分化に関与する転写因子には PU.1、EBF、Pax-5、E2A などがある。E2A は helix-loop-helix (HLH) 型転写因子で、活性化 B 細胞をメモリー B 細胞や形質細胞に分化させる役割を担っている。

Id3 は、核内蛋白で細胞の分化、細胞周期のコントロール、アポトーシスに重要な役割を果たしている Id (inhibitor of DNA binding) 蛋白のひとつであり、E2A と結合する一方で塩基性領域を欠くために DNA と結合できない。これにより Id3 は E 蛋白の DNA 結合を阻害して、E2A によるリンパ球分化を抑制する役割を果たしている。

最近 Id3 欠損マウスにおいて、涙腺および唾液腺組織にリンパ球浸潤が認められること、血清中に抗 SS-A および抗 SS-B 抗体が検出されること、Id3 欠損マウス由来の骨髓細胞、T 細胞を同系の放射線照射したマウスに移植すると SS 様の病態が誘導されることが示され、SS の病態モデルと考えられた。そこで、E2A および E2A の機能を阻害する核蛋白 Id3 に

着目し、SS患者の末梢血におけるId3およびE2Aの発現の検討を行った。

【方法】SS患者34人(男性4人、女性30人;平均年齢54.7歳)の末梢血よりCD19陽性B細胞を分離し、E2AおよびId3 mRNAの発現量を半定量real-time PCRにて調べ、健常人(男性7人、女性28人;平均年齢44.9歳)と比較した。また、対照疾患として関節リウマチ(以下RA)9名(男性2名、女性7名;平均年齢60.4歳)全身性エリテマトーデス(以下SLE)9名(男性2名、女性7名;平均年齢37.8歳)においても同様の検討を行った。

【結果】SS群は健常群と比較し、Id3の中央値(範囲)は健常群1.78(0.26~6.80)、SS群0.63(0.06~3.97)で有意に低値を示した($p=0.0002$)。対照疾患群ではSLEが中央値(範囲)0.62(0.17~1.20)で健常群に対して有意に低値を示した($p=0.0005$)。一方、E2Aの中央値(範囲)は健常群0.73(0.13~2.23)、SS群0.76(0.11~3.58)で有意差は見られなかった。

SS群全34例中、乾燥を主症状とする1次性SSが18名、関連疾患の合併がみられた2次性SSが16名であった。合併疾患の内訳はRAが7例、SLEが5例、RAとSLE両方が4例だった。この分類に基づいて、各群のId3mRNAの相対的発現量を比較したが、1次性SS群と2次性SS群との間において、Id3発現量に有意差は認められなかった。

臨床症状においては、血沈と唾液腺造影所見でId3mRNA発現との相関が見られた。

【考察】SS患者由来B細胞においてB細胞分化を阻害する核内蛋白をコードするId3遺伝子の発現を検討したところ、健常群と比較し有意に低下していた。これにより、SS患者においてId3のE2A抑制作用が減弱してB細胞の分化が促進され、メモリーB細胞の減少、B細胞の活性化および形質細胞の過剰分化を生じると考えられた。

また、Id3発現量と唾液腺造影所見との間に、逆相関が認められ、Id3発現低下によるB細胞分化異常が唾液腺炎や腺破壊に関与する可能性が示唆された。

対照疾患群においては、SLE群においてId3発現の低下が見られたが、RA群では有意差はみられなかった。SLEはSSと同様にB細胞の分化亢進がみられる疾患であり、自己免疫疾患におけるB細胞の分化異常に共通した機序として、Id3の発現異常が存在する可能性が考えられた。

末梢において、B細胞は濾胞に局在する濾胞B細胞と辺縁帯に局限して存在する辺縁帯B細胞に分かれる。Id3とE2AのバランスがE2A優位になっている場合は濾胞B細胞へ、Id3優位になっている場合は辺縁帯B細胞への分化が促進される。したがって、SS群でのId3発現の低下は濾胞B細胞増殖を促進し、抗体産生細胞への分化および胚中心の形成を促進すると考えられる。

今回の研究で、我々は初めてヒトのSSでもId3発現の低下を認めた。何らかの原因によってId3の発現が低下しE2AとId3のバランスが破綻すると、B細胞分化の異常促進およびクラススイッチの進行、形質細胞の増加が生じ唾液腺炎の慢性化をきたしていると考えられる。E2A・Id3を制御する機構はいまだ不明であるが、E2A・Id3の発現バランスの制御は新たなSSの治療法になる可能性がある。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 井 上 農 夫 男
副 査 教 授 北 川 善 政
副 査 教 授 進 藤 正 信
副 査 教 授 小 池 隆 夫 (医学研究科)

学 位 論 文 題 名

シェーグレン症候群の B 細胞における 転写因子 E2A・Id3 の発現異常

審査は、審査担当者全員の出席の下に行われた。最初に申請者より提出論文の概要が説明され、その後、申請者に対し提出論文とそれに関連した学科目について口頭試問が行われた。以下に、論文の要旨と審査の内容を述べる。

シェーグレン症候群（以下 SS）は、外分泌腺に対する自己免疫反応によって生じる腺組織の破壊と機能障害により、眼・口腔などにおこる乾燥症状を主症状とし、同時に抗 SS-A・SS-B 抗体などの自己抗体産生や高ガンマグロブリン血症が認められる自己免疫疾患である。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。また、末梢血 B 細胞では、過剰な活性化、メモリー B 細胞の減少および形質細胞への過剰分化が認められており、B 細胞の分化異常が SS の病態に影響するとされている。B 細胞の分化に関与する転写因子の一つに E2A がある。E2A は helix-loop-helix (HLH) 型転写因子で、活性化 B 細胞をメモリー B 細胞や形質細胞に分化させる役割を担っている。また、E2A の阻害蛋白である Id3 は E 蛋白の DNA 結合を阻害して、E2A によるリンパ球分化を抑制する役割を果たしている。近年 Id3 欠損マウスにおいて、涙腺および唾液腺組織にリンパ球浸潤が認められること、血清中に抗 SS-A および抗 SS-B 抗体が検出されること、Id3 欠損マウス由来の骨髓細胞、T 細胞を同系の放射線照射したマウスに移植すると SS 様の病態が誘導されることから、Id3 欠損マウスは SS の病態モデルと考えられている。そこで、本研究は Id3 と E2A に着目し、SS 患者の末梢血における Id3 と E2A の発現異常について検討したものである。

SS 患者の末梢血より CD19 陽性 B 細胞を分離し、E2A および Id3 mRNA の発現量を半定量 real-time PCR にて調べ、健常人と比較した。また、対照疾患として関節リウマチ（以下 RA）全身性エリテマトーデス（以下 SLE）においても同様の検討を行った。

その結果、SS 群は健常群と比較し、Id3 は有意に低下していることを明らかにした。一方、E2A には有意差は見られなかった。このことより、SS 患者において、Id3 の E2A 抑制

作用が減弱して B 細胞の分化が促進され、メモリー B 細胞の減少、B 細胞の活性化および形質細胞の過剰分化を生じると推定した。また、末梢において、Id3 と E2A のバランスが E2A 優位になっている場合は濾胞 B 細胞へ、Id3 優位になっている場合は辺縁帯 B 細胞への分化が促進される。したがって、SS 群での Id3 発現の低下は濾胞 B 細胞増殖を促進し、抗体産生細胞への分化および胚中心の形成を促進すると考えた。対照疾患群においては、SLE 群が健常群に対して Id3 は有意に低値を示したが、RA 群では有意差はみられなかった。SLE は SS と同様に B 細胞の分化亢進がみられる疾患であり、自己免疫疾患における B 細胞の分化異常に共通した機序として、Id3 の発現異常が考えられる。臨床症状においては、Id3 発現量と唾液腺造影 Stage との間に逆相関が認められることから、Id3 発現低下による B 細胞分化異常が唾液腺炎や腺破壊に関与すると考えた。

本研究は、ヒトの SS において Id3 発現が低下していることを初めて明らかにした。また、何らかの原因によって Id3 の発現が低下し E2A と Id3 のバランスが破綻すると、B 細胞分化の異常促進およびクラススイッチの進行、形質細胞の増加が生じ唾液腺炎の慢性化につながることを示唆した。現在、E2A と Id3 とのバランスを制御する機序は明らかにされていないが、今後、この点を解明することにより SS に対する新たな治療法を開発できると考えている。

論文について概要が説明された後、各審査員より、本研究の背景、方法、結果、考察および関連の研究について質問がなされた。論文提出者は、①Id3 の発現と SS の重症度に関連はあるか、②局所における Id3 の発現を調べることができるか、③SS における局所臓器特性と全身性臓器非特異性をどのように考えるかなどいずれの質問に対しても明確かつ的確に回答し、さらに今後の研究についても発展的な将来展望を示した。

試問の結果、本論文はヒトの SS において Id3 発現が低下していることを明らかにした点において新規性が高く、今後の歯科医学の発展にも大きく貢献すると評価した。さらに、学位申請者は、本研究を中心とした専門分野はもとより、関連分野についても十分な学識を有していることを審査員一同が認めた。

よって、学位申請者は博士(歯学)の学位を授与される資格を有するものと認めた。