

シェーグレン症候群の病態形成における CXCL10 の役割

青田桂子、山ノ井朋子、可児耕一、東 雅之

Role of CXCL10 in pathogenesis of Sjögren's syndrome

Keiko Aota, Tomoko Yamanoi, Koichi Kani, Masayuki Azuma

徳島大学大学院 医歯薬学研究部 口腔内科学分野

Department of Oral Medicine, Tokushima University Graduate School
of Biomedical Sciences

Abstract

Sjögren's syndrome (SS) is a common autoimmune disease characterized by the destruction of acinar structure by marked lymphocytic infiltrates in the salivary and lacrimal glands, resulting in sicca symptoms. Gene expression profiling of lip salivary glands (LSGs) shows that C-X-C motif chemokine 10 (*CXCL10*) expression is upregulated in patients with primary SS (pSS). *CXCL10* and its receptor, C-X-C receptor 3 (*CXCR3*), contribute to the pathogenesis of SS. We investigated the clinical significance of *CXCL10* and *CXCR3* in the autoimmune lesions of pSS and the molecular mechanisms of *CXCL10* upregulation in the salivary gland cells. *CXCL10* showed particularly intense staining in LSG ductal cells from pSS patients. *CXCR3* expression was detected primarily in CD163⁺ macrophages. The number of *CXCR3*⁺CD163⁺ macrophages was inversely correlated with the severity of LSG inflammatory lesions. Our *in vitro* experiments demonstrated that human salivary gland ductal (NS-SV-DC) cells produced higher levels of *CXCL10* than acinar (NS-SV-AC) cells. Furthermore, NS-SV-DC and NS-SV-AC cells had different regulators of *CXCL10* enhancement: interferon (IFN)- γ had more potential than IFN- α , tumor necrosis factor (TNF)- α , and interleukin (IL)1- β in the induction of *CXCL10* production in NS-SV-DC cells, whereas TNF- α had the potential to induce *CXCL10* production in NS-SV-AC cells. Our results suggest that *CXCL10* overexpression in salivary glands is mainly caused by IFN- γ -stimulated salivary gland ductal cells. The enhanced production of *CXCL10* by ductal cell IFN- γ results in the migration of

CXCR3⁺ immune cells. CXCL10 plays an important role in SS pathogenesis, and CXCL10 regulation may be useful in the treatment of SS patients.

Key word: Sjögren's syndrome (シェーグレン症候群)、C-X-C motif chemokine 10 (CXCL10)、interferon-gamma (IFN- γ)

緒言

シェーグレン症候群 (Sjögren's syndrome: SS) は、涙腺や唾液腺などの外分泌腺を標的とする自己免疫疾患で、眼球乾燥および口腔乾燥を主症状とする。SS は、遺伝因子や加齢、性ホルモン、感染症などの環境因子を背景に標的臓器と免疫担当細胞、そしてこれらが産生するサイトカイン、ケモカインとの複雑なクロストークにより病態が形成される免疫学的指定難病である。病理組織学的には、涙腺や唾液腺において導管周囲の著明なリンパ球浸潤、腺房の萎縮や消失、小葉内および小葉間質の線維化、脂肪変性などを認める。浸潤リンパ球は、病期の初期は CD4 陽性 T 細胞が優位で、病期の進展に伴い CD8 陽性 T 細胞や B 細胞が優位となり、さらに形質細胞やマクロファージ、樹状細胞などさまざまな免疫担当細胞が集簇するようになる。

近年の網羅的遺伝子解析により、SS 唾液腺においてインターフェロン (interferon: IFN) 関連分子の過剰発現と CXC ケモカインである CXCL10 (別名: IFN- γ -induced protein 10, IP-10) の過剰発現が明らかとなっている¹⁾。CXCL10 は古くから SS 唾液腺において導管で産生され、T 細胞遊走に関与すると報告されていた²⁾ が、詳細な分子メカニズムについては明らかにならなかった。本総説では、SS 唾液腺病態形成における CXCL10 の役割について、これまで著者らが行ってきた SS 患者口唇腺の病理組織学的解析と不死化正常ヒト唾液腺細胞株³⁾ を用いた *in vitro* の解析を中心に概説する。

CXCL10

ケモカインは 8~14 kDa 程度の分泌蛋白質で、白血球やリンパ球の遊走を誘導し、急性あるいは慢性的の炎症性疾患における病態形成プロセスに重要な役割を果たしている。N 末端側にある 2 アミノ酸の形成するモチーフにより、CXC と CC の 2 つのメジャーなサブファミリーに分類される。CXC サブファミリーである CXCL10 は 1985 年に IFN 誘導性遺伝子の 1 つとしてクローニングされた⁴⁾。98 残基の前駆体蛋白質、77 残基の成熟蛋白質からなり、分子量は 8.7 kDa である。遺伝子座は 4q21.1 で、CXCL9 (別名: Mig) や CXCL11

(別名: I-TAC) とミニクラスターを形成している^{5,6)}。CXCL10 の産生細胞は、単球・マクロファージ、線維芽細胞、血管内皮細胞、上皮細胞など各臓器の様々な細胞とされる。CXCL10 の受容体は CXC chemokine receptor 3 (CXCR3) で、CXCL9、CXCL11 と共通の受容体である。CXCR3 は、Th1 細胞、NK 細胞、単球・マクロファージ、B 細胞、樹状細胞などの免疫担当細胞や、血管内皮細胞、腎メサンギウム細胞、ミクログリア、アストロサイト、ニューロン、プルキンエ細胞などに発現している⁷⁾。CXCL9、CXCL10、CXCL11 は主に IFN- γ によって誘導され、主作用は Th1 免疫反応の場に CXCR3 発現細胞を遊走させ、Th1 免疫反応を促進させることである⁸⁾。また、CXCL9 と CXCL10 は血管新生を抑制し一部の腫瘍に対して抗腫瘍効果を有する⁹⁾。

CXCL10 とシェーグレン症候群

SS 唾液腺におけるケモカイン発現の研究は 1998 年に macrophage inflammatory protein (MIP)-1 α (別名: CCL3)、MIP-1 β (別名: CCL4)、Interleukin (IL)-8、regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES、別名: CCL5) の高発現が報告¹⁰⁾ されて以降、口唇腺の免疫組織化学的解析や唾液腺組織からの RT-PCR 法を用いて CXCL12、CXCL13、CCL18、CCL19 などの高発現が報告され¹¹⁻¹³⁾、2002 年に SS 口唇腺における CXCL9、CXCL10²⁾、2004 年に CXCL11 の高発現が初めて報告された¹⁴⁾。小川らは、SS 唾液腺の導管細胞に CXCL9、CXCL10、CXCL11 が強く発現していること、導管周囲の集簇した免疫担当細胞のほとんどが CD3 陽性 T 細胞であること、さらに耳下腺初代培養細胞を用いて、唾液腺細胞で CXCL9、CXCL10、CXCL11 の発現を誘導するサイトカインは IFN- γ であることを報告した^{2,14)}。続いて長谷川らは、SS モデルマウスである MRI/lpr マウスの顎下腺では CXCL9、CXCL10、CXCL11 が有意に増加しており、MRL/lpr マウスに CXCL10 アンタゴニストを投与すると早期顎下腺炎における単球浸潤が有意に減少することを報告した¹⁵⁾。その後、一次性 SS (primary SS: pSS) 病態形成には I 型 IFN が重要な役割を果たすとの報告が相次いだ¹⁶⁻¹⁸⁾。一

方で、I型IFN関連分子はSS末梢血で過剰発現を認めるが、SS小唾液腺ではII型IFN関連分子の過剰発現が明らかとなり¹⁹⁾、I型IFNとII型IFNは異なる表現型でSS病態形成に関与している可能性が示唆された。

近年、マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子解析がさかんに行われるようになり、pSS口唇腺を用いた多くのデータがGene Expression Omnibus (GEO) に登録されている。2019年GEO登録の190人のSS患者と32人のコントロール患者の比較の結果、SS患者で過剰発現を認めた遺伝子のほとんどがIFN関連遺伝子で、そのなかにCXCL10も含まれていた¹⁾ (表1)。このようにCXCL10はIFN関連遺伝子とともにSSの病因や病態形成に中心的な役割を果たしていると考えられる。

表1 The top 10 up-regulated genes identified in the gene expression microarray study of 190 SS patients and 30 controls.

Gene	LogFC	P.Value
IFI27	2.979257	3.37E-07
RSAD2	2.177534	4.20E-08
IFI44L	2.175133	5.84E-08
IFI44	1.724777	1.26E-08
LAMP3	1.702514	9.52E-08
ISG15	1.584807	1.71E-07
CXCL10	1.533126	1.42E-08
EPSTI1	1.532429	7.80E-10
DNAPT6	1.48339	3.19E-07
IFIT1	1.477969	1.34E-06

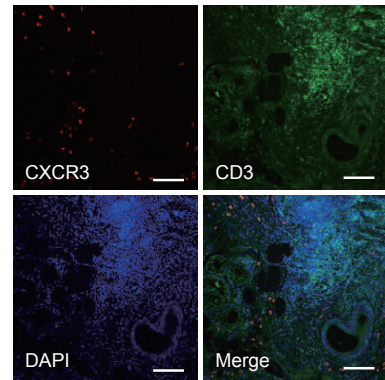
文献1より引用

SS唾液腺におけるCXCL10の役割

著者らは、SSの病態形成におけるCXCL10の役割を明らかにすることを目的に、SS患者口唇腺におけるCXCL10およびCXCR3の発現細胞を検索し、SS病期との関係を解析した。さらに、当科で樹立した不死化正常ヒト唾液腺細胞株³⁾を用いて、CXCL10の発現分子メカニズムおよび機能に関して唾液腺の構成細胞別に研究を行い詳細に解析した。これまでSS唾液腺に関する研究は、主に器官培養系とこれより得られた初代培養細胞を用いて行われてきた。この場合、得られる結果は唾液腺という臓器の総合反応としてとらえるこ

とができるが、唾液腺を構成する各細胞の現象を把握することはできなかった。本研究で用いた細胞株は、ヒト正常顎下腺を初代培養後、SV40 origin-defective mutant DNAをトランスフェクションし、形態的相違を指標とし3種類の細胞株をクローニングし、特異的細胞マーカーであるアミラーゼ、ミオシン、セクレタリーコンポーネント、

A



B

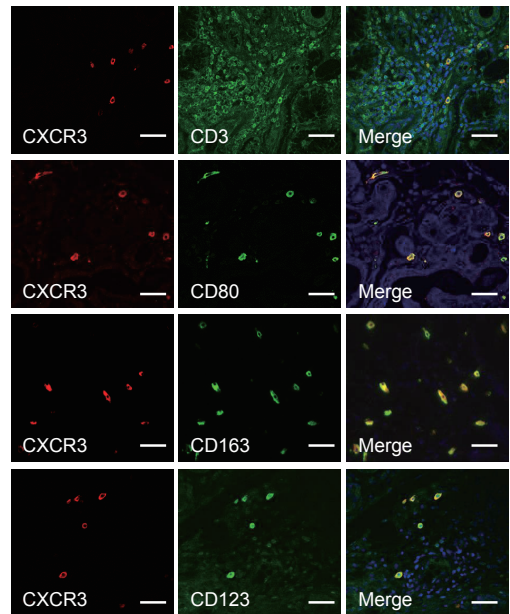


図1 pSS患者口唇腺の免疫組織化学染色像 (A) CXCR3は導管周囲の集簇リンパ球の周りの免疫担当細胞に発現している。CXCR3 (赤)、CD3陽性T細胞 (緑)、核 (青)。Scale bar=100 μ m。(B) CD3陽性T細胞でのCXCR3発現はわずかで、CD163陽性M2マクロファージの大部分にCXCR3発現を認める。CD80陽性M1マクロファージ、CD123陽性形質細胞様樹状細胞にもCXCR3発現を認めるが全体として細胞数は少ない。Scale bar=50 μ m。(文献21より引用)

68 kDa サイトケラチンの発現を調べ、腺房細胞株 (NS-SV-AC)、導管細胞株 (NS-SV-DC)、筋上皮細胞株 (NS-SV-MC) を樹立したものである³⁾。

pSS 患者22例の口唇腺を用いた免疫組織化学的解析では、Tarpley らの分類²⁰⁾ を用いてリンパ球浸潤の程度により患者を Grade 1 ~ 4 に分類した。CXCL10 と CXCR3 の二重蛍光免疫組織化学染色法で検索したところ、CXCL10 は各 Grade でコントロールと比較し導管に強く発現していた²¹⁾。一方、CXCR3 は導管細胞や腺房細胞に発現はなく、集簇リンパ球の周りの免疫担当細胞に強く発現していた (図 1 A)。そこで、各種細胞マーカーを用いて二重蛍光免疫組織化学染色法にて CXCR3 陽性細胞を探索したところ、導管周囲に集簇している CD3 陽性 T 細胞での CXCR3 発現はわずかであったが、大部分の CD163 陽性 M2 マクロファージに CXCR3 の発現を認めた²¹⁾ (図 1 B)。それ以外に、CD80 陽性 M1 マクロファージや CD123 陽性形質細胞様樹状細胞にも CXCR3 発現を認めしたが、これらの細胞は集簇細胞数自体が少なかった²¹⁾。CXCR3 発現率が高かった CD163 陽性細胞を Grade 別にカウントし、SS 病期と CXCR3 陽性 CD163 陽性細胞数との相関関係を調べた。スピアマン順位相関係数検定では、CXCR3 陽性 CD163 陽性 M2 マクロファージ数と Grade には強い負の相関関係を示した²¹⁾ (図 2)。つまり、リンパ球浸潤が少ない病期初期には CXCR3 陽性 M2 マクロファージは多く、炎症病態が進むとともに CXCR3 陽性 M2 マクロファージは減少した。このことは、SS 唾液腺において CXCR3 陽性 M2 マクロファージは抗炎症性にも作

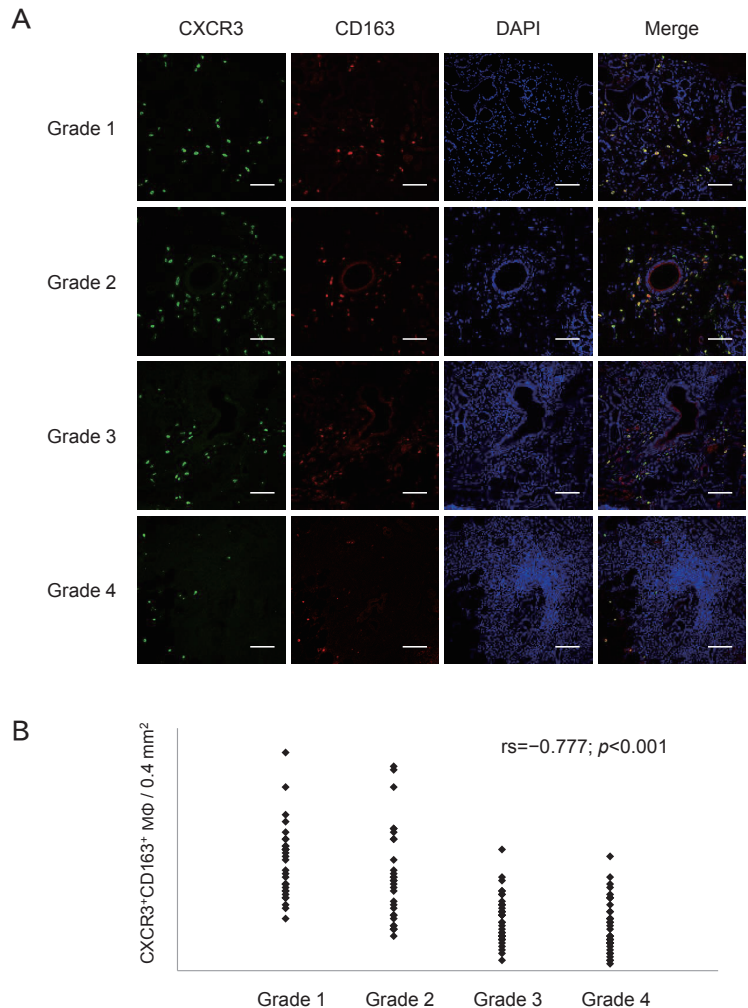


図 2 pSS 患者口唇腺における CXCR3 陽性 CD163 陽性 M2 マクロファージと病気の関係

(A) pSS 患者口唇腺では、病期が進展するに伴い CXCR3 陽性 CD163 陽性細胞数が減少する。Scale bar=100 μ m。(B) pSS の病期と CXCR3 陽性 CD163 陽性細胞数には強い負の相関関係を認める ($p < 0.001$)。(文献 21 より引用)

用している可能性があると考えられた。

次に、SS 口唇腺の導管上皮で CXCL10 が過剰発現する分子メカニズムを不死化正常ヒト唾液腺細胞株を用いて解析した。SS 発症のきっかけは未だ解明できていないが、SS 病態形成には免疫担当細胞由来の IFN- α 、IFN- γ 、TNF- α 、IL-1 β などのサイトカインの関与が報告されている^{19, 22-24)}。そこで、正常ヒト唾液腺腺房細胞 (NS-SV-AC) と導管細胞 (NS-SV-DC) にこれらのサイトカインを加え、CXCL10 mRNA および蛋白質発現を調べた。CXCL10 mRNA は導管細

胞 (NS-SV-DC) で IFN- γ 刺激により著明な発現上昇を認めたが、IFN- α 、TNF- α 、IL-1 β 刺激では発現上昇を認めなかった²⁵⁾ (図 3A)。また、CXCR3 ligand である CXCL9、CXCL11 も CXCL10 と同様 IFN- γ 刺激でのみ発現上昇を認めることが明らかとなった²⁵⁾。タンパク質レベルで解析すると IFN- γ 刺激により導管から CXCL10 が著明に分泌された (図 3B)。これらの結果は、SS 末梢血では I 型 IFN 関連分子が有意であるが、SS 小唾液腺では II 型 IFN 関連分子が有意に作用するという報告¹⁹⁾ と合致する。一方、腺房細胞 (NS-SV-AC) では導管細胞 (NS-SV-DC) に比べると少ないものの、TNF- α 刺激で CXCL10 mRNA および蛋白質の発現誘導を認めた²⁵⁾ (図 3)。

導管細胞 (NS-SV-DC) での CXCL10 過剰産生を導くシグナル経路を解析した結果、IFN- γ により JAK-STAT 経路および NF- κ B 経路の両シグナルが活性化され、CXCL10 発現が上昇することが明らかとなった²⁵⁾。一方、腺房細胞 (NS-SV-AC) では、TNF- α により NF- κ B 経路が活性化され CXCL10 発現が上昇することが明らかとなった²⁵⁾。つまり、SS 唾液腺において CXCL10 産生に重要な役割を果たしているのは導管細胞で、IFN- γ が Key cytokine であると考えられた。

不死化正常ヒト唾液腺細胞株を用いた migration assay では、IFN- γ で刺激を受けた導管細胞 (NS-SV-DC) は Jurkat T 細胞およびヒト単球/マクロファージの細胞株である THP-1 細胞を有意に集簇させた²⁶⁾。この結果より、IFN- γ で刺激を受けた導管細胞は CXCL10 を産生・分泌することにより CXCR3 陽性免疫担当細胞をリク

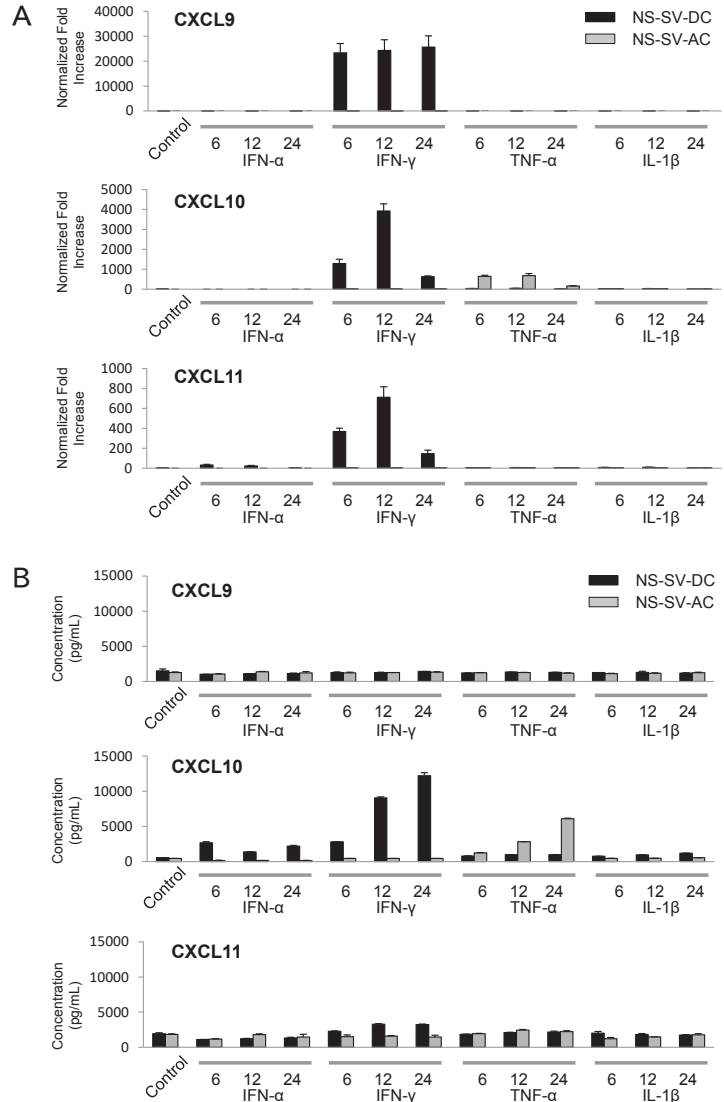


図 3 不死化正常ヒト唾液腺導管細胞 (NS-SV-DC) と腺房細胞 (NS-SV-AC) における CXCL9、CXCL10、CXCL11 発現
IFN- γ 刺激により NS-SV-DC で CXCL10 mRNA 発現が上昇し、CXCL10 タンパク質の産生・分泌も上昇する。(A) RT-qPCR (B) ELISA (文献²⁵より引用)

ルートさせる機能を有していると考えられた。

おわりに

以上より、SS 唾液腺では IFN- γ 刺激により導管細胞で JAK-STAT シグナル経路が活性化され、CXCL10 の過剰産生が生じることが判明した。導管細胞で産生・分泌された CXCL10 は CXCR3 陽性免疫担当細胞をリクルートさせ、炎症病態を形成していくと考えられる (図 4)。SS 病期の初期

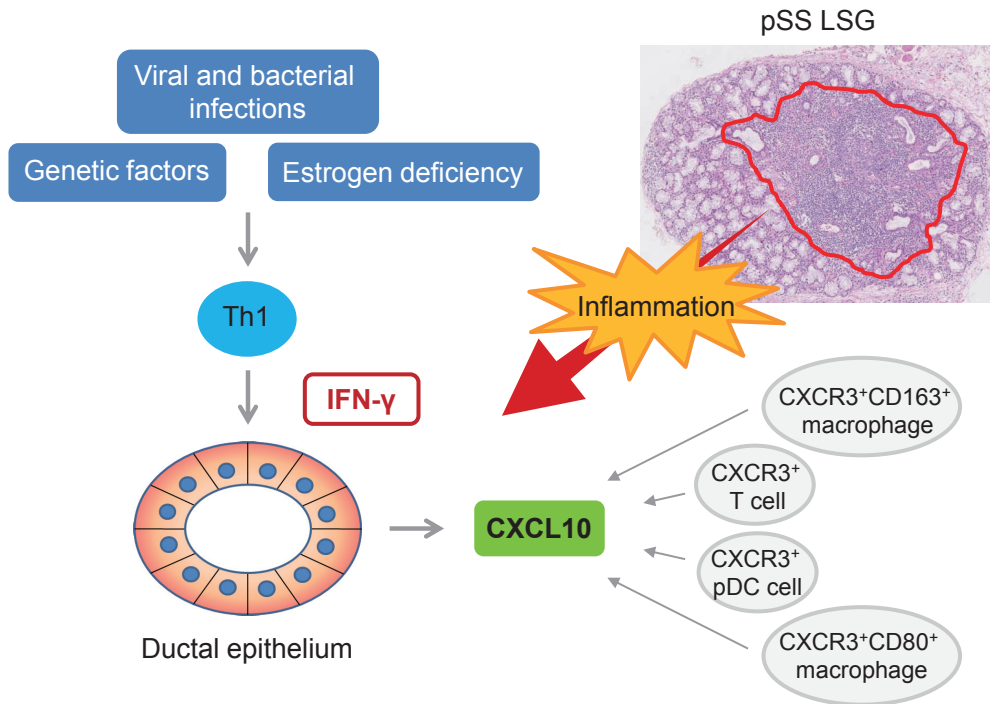


図4 pSS 唾液腺の炎症病態形成のメカニズム

pSS 唾液腺では IFN- γ 刺激により導管細胞で JAK-STAT シグナル経路が活性化され、CXCL10 の過剰生産が生じる。導管細胞で産生・分泌された CXCL10 は CXCR3 陽性免疫担当細胞をリクルートさせ、炎症病態を形成していくと考えられる。

では CXCR3 陽性 M2 マクロファージが多く、病期の進展に伴い CXCR3 陽性 M2 マクロファージは減少することより、CXCL10-CXCR3 は炎症作用だけでなく抗炎症作用も有している可能性がある。

近年、サイトカインや細胞表面抗原などをターゲットにした生物学的製剤による関節リウマチの治療の進歩は著しく、特に抗 TNF 抗体、抗 IL-6 受容体抗体は関節リウマチ治療に一大革命をもたらした。一方で、pSS では種々の生物学的製剤を用いた大規模臨床試験が世界的に実施されてきたが、腺病変の改善には至らず現時点で治療法は確

立されていない。2017 年に関節リウマチ治療薬として承認された JAK 阻害薬は、JAK/STAT シグナルを制御することにより SS 唾液腺における CXCL10 過剰発現を抑制し、SS 唾液腺の炎症病態を改善できると考えられる。JAK 阻害薬の SS 新規治療薬としての可能性が期待される。

謝辞

本研究は JSPS 科研費（課題番号：19K10311）の助成を受けたものです。

本総説を執筆する機会を与えてくださった口腔組織培養学会役員の皆様に厚く感謝申し上げます。

参考文献

- 1) Yao, Q., Song, Z., et al.: Identifying key genes and functionally enriched pathways in Sjögren's syndrome by weighted gene co-expression network analysis. *Front Genet*, 10: Article 1142, 2019.
- 2) Ogawa, N., Ping, L., et al.: Involvement of the interferon- γ -induced T cell-attracting chemokines, interferon- γ -inducible 10-kd protein (CXCL10) and monokine induced by interferon- γ (CXCL9), in the salivary gland lesions of patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum*, 46: 2730-2741, 2002.
- 3) Azuma, M., Tamatani, T., et al.: Immortalization of normal human salivary

- gland cells with duct-, myoepithelial-, acinar-, or squamous phenotype by transfection with SV40 ori- mutant deoxyribonucleic acid. *Lab Invest*, 69: 24–42, 1993.
- 4) Luster, A.D., Unkeless, J.C., et al.: Gamma-interferon transcriptionally regulates an early-response gene containing homology to platelet proteins. *Nature*, 315: 672–676, 1985.
 - 5) Zlotnik, A., Yoshie, O., et al.: The chemokine and chemokine receptor superfamilies and their molecular evolution. *Genome Biol*, 7: 243, 2006.
 - 6) Nomiya, H., Osada, N., et al.: The evolution of mammalian chemokine genes. *Cytokine Growth Factor Rev*, 21: 253–262, 2010.
 - 7) Liu, L., Callahan, M.K., et al.: Chemokine Receptor CXCR3: An Unexpected Enigma. *Curr Top Dev Biol*, 68: 149–181, 2005.
 - 8) Lacotte, S., Brun, S., et al.: CXCR3, Inflammation, and Autoimmune Diseases. *Ann N Y Acad Sci*, 1173: 310–317, 2009.
 - 9) Strieter, R.M., Burdick, M.D., et al.: CXC chemokines in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev*, 16: 593–609, 2005.
 - 10) Cuello, C., Palladinetti, P., et al.: Chemokine expression and leucocyte infiltration in Sjögren's syndrome. *Br J Rheumatol*, 37: 779–783, 1998.
 - 11) Amft, N., Curnow, S.J., et al.: Ectopic expression of the B cell-attracting chemokine BCA-1 (CXCL13) on endothelial cells and within lymphoid follicles contributes to the establishment of germinal center-like structures in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum*, 44: 2633–2641, 2001.
 - 12) Xanthou, G., Polihronis, M., et al.: "Lymphoid" chemokine messenger RNA expression by epithelial cells in the chronic inflammatory lesion of the salivary glands of Sjögren's syndrome patients: possible participation in lymphoid structure formation. *Arthritis Rheum*, 44: 408–418, 2001.
 - 13) Salomonsson, S., Larsson, P., et al.: Expression of the B cell-attracting chemokine CXCL13 in the target organ and autoantibody production in ectopic lymphoid tissue in the chronic inflammatory disease Sjögren's syndrome. *Scand J Immunol*, 55: 336–342, 2002.
 - 14) Ogawa, N., Kawanami, T., et al.: Expression of interferon-inducible T cell alpha chemoattractant (CXCL11) in the salivary glands of patients with Sjögren's syndrome. *Clin Immunol*, 112: 235–238, 2004.
 - 15) Hasegawa, H., Inoue, A., et al.: Antagonist of interferon-inducible protein 10/CXCL10 ameliorates the progression of autoimmune sialadenitis in MRL/lpr mice. *Arthritis Rheum*, 54: 1175–1183, 2006.
 - 16) Mavragani, C.P., Crow, M.K.: Activation of the type I interferon pathway in primary Sjögren's syndrome. *J Autoimmun*, 35: 225–231, 2010.
 - 17) Vakaloglou, K.M., Mavragani, C.P.: Activation of the type I interferon pathway in primary Sjögren's syndrome: an update. *Curr Opin Rheumatol*, 23: 459–464, 2011.
 - 18) Hall, J.C., Baer, A.N., et al.: Molecular subsetting of interferon pathways in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheumatol*, 67: 2437–2446, 2015.
 - 19) Nezos, A., Gravani, F., et al.: Type I and II interferon signatures in Sjögren's syndrome pathogenesis: Contributions in distinct clinical phenotypes and Sjögren's related lymphomagenesis. *J Autoimmun*, 63: 47–58, 2015.
 - 20) Tarpley, Jr, T.M., Anderson, L.G., et al.: Minor salivary gland involvement in Sjögren's syndrome. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 37: 64–74, 1974.
 - 21) Aota, K., Yamanoi, T., et al.: Inverse correlation between the number of CXCR3⁺ macrophages and the severity of inflammatory lesions in Sjögren's syndrome

- salivary glands: A pilot study. *J Oral Pathol Med*, 47: 710–718, 2018.
- 22) Fox, R.I., Kang, H.I., et al.: Cytokine mRNA expression in salivary gland biopsies of Sjögren's syndrome. *J Immunol*, 152: 5529–5532, 1994.
- 23) Nocturne, G., Mariette, X.: Advances in understanding the pathogenesis of primary Sjögren's syndrome. *Nat Rev Rheumatol*, 9: 544–556, 2013.
- 24) Yamada, A., Arakaki, R., et al.: Targeting IL-1 in Sjögren's syndrome. *Expert Opin Ther Targets*, 17: 393–401, 2013.
- 25) Aota, K., Kani, K., et al.: Distinct regulation of CXCL10 production by cytokines in human salivary gland ductal and acinar cells. *Inflammation*, 41: 1172–1181, 2018.
- 26) Aota, K., Yamanoi, T., et al.: Cepharanthine inhibits IFN- γ -induced CXCL10 by suppressing the JAK2/STAT1 signal pathway in human salivary gland ductal cells. *Inflammation*, 41: 50–58, 2018.