

令和 2 年 6 月 26 日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2019

課題番号：15K20268

研究課題名(和文)新規シェーグレン症候群モデル「TRAF6 欠損マウス」の病態基盤解析と治療開発

研究課題名(英文)TRAF6-deficient mice display dry eye like Sjogren's syndrome

研究代表者

中野 聡子 (SATOKO, NAKANO)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：20593809

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：関節炎、唾液腺など全身性に自己免疫疾患類似の重篤な炎症を生じる「TRAF6欠損マウス」の眼病変を世界で初めて評価した研究である。TRAF6欠損マウスは、涙腺に強い炎症細胞浸潤、分泌上皮萎縮を認め、涙液分泌量が低下していた。角膜は著しい扁平上皮過形成を生じ、上皮下には強い炎症細胞浸潤がみられ、角膜内皮側に多数の血管新生を認めた。TRAF6欠損マウスの網羅的遺伝子解析、角膜免疫染色において、ヒトシェーグレン症候群患者と同様に扁平上皮細胞特異的タンパク質(Smal Iproline-rich protein1B)の著しい発現を認めた。また、これらの病変が加齢により重症化することを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現代日本ではパソコンやスマートフォン使用者の3人に1人はドライアイ所見を有し、800～2,200万人のドライアイ患者がいるとされる。ドライアイの原因としては年齢、性別、目の使い過ぎ、乾燥、コンタクトレンズ、喫煙などの環境・一般因子があげられる一方、自己免疫疾患であるシェーグレン症候群を基礎疾患に持つ場合、特に強いドライアイ所見を呈する。今まで適切な動物モデルがなかったが、本研究で、関節炎、唾液腺炎などを有する「TRAF6欠損マウス」がシェーグレン症候群類似のドライアイを呈することが判明し、新規モデル動物として役立つ可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：TNF Receptor-Associated Factor 6(TRAF6) is a cytoplasmic adaptor protein that is necessary for the activation of dendritic cells in response to Toll-like TNF Receptor-Associated Factor 6(TRAF6) mediates the signaling from the members of the TNF receptor and the TLR/IL-1R superfamilies. Because it is a T cell-intrinsic negative regulator required for the maintenance of immune homeostasis, genetically engineered T cell-specific TRAF6-deficient mice show multiorgan inflammatory disease such as sialadenitis. By gene expression microarray analysis, immunohistochemistry and clinical findings, our study showed that TRAF6-deficient mice also display dry eye like Sjogren's syndrome.

研究分野：眼科学

キーワード：TRAF6 ドライアイ

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Toll 様受容体が病原体を検知すると、細胞内シグナル伝達分子である TRAF6 を介して転写因子 NF- κ B を活性化、免疫応答を惹起する。TRAF6 は、Toll 様受容体を介する自然免疫シグナルの伝達因子であり、T 細胞では炎症を制御する。TRAF6 欠損 T 細胞は内因性リガンドの刺激を受けて常に活性化、炎症を引き起こし深刻な病態をもたらす。TRAF6 欠損マウスは、関節炎、唾液腺など全身性に自己免疫疾患類似の重篤な炎症を生じるが、これまで眼病変は評価されていなかった。本研究では TRAF6 欠損マウスの眼病変を世界で初めて評価する研究であり、TRAF6 欠損マウスについて、ドライアイ新規モデル動物としての可能性を眼科学的視点から探索し、その病態形成の分子基盤を解明する。また、本疾患モデルマウスの発症機構を解析し分子機構の鍵となる因子を解明することで、自己免疫介在性重症ドライアイ治療の標的分子を同定する。

2. 研究の目的

現代日本ではパソコンやスマートフォン使用者の 3 人に 1 人はドライアイ所見を有し、800～2,200 万人の患者がいるとされ、国民病となっている。重篤なドライアイの原因の 1 つとして、自己免疫疾患であるシェーグレン症候群があるが、自己免疫介在性重症ドライアイの評価に使用できる適切な動物モデルがなかった。唾液腺炎などのシェーグレン症候群類似の炎症を有する「TRAF6 欠損マウス」の眼病変を評価し、新規動物モデルとして確立することを目的とした。TRAF6 と眼科所見との関連を検証することで、ヒト重症ドライアイの病態解明に繋がると期待される。

3. 研究の方法

自己免疫介在性ドライアイでは、眼表面炎症と扁平上皮化生が密接に関与しているとされる。TRAF6 欠損マウスの自己免疫介在性重症ドライアイ病態・全身病変の鍵となる因子を解明するため、TRAF6 欠損マウスの角膜・涙液・涙腺病変の網羅的遺伝子解析、免疫染色を行い、加齢による病態の経時的評価を行った。

本研究班は、大分大学眼科学講座と感染予防医学講座との連携研究である。

4. 研究成果

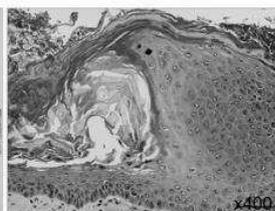
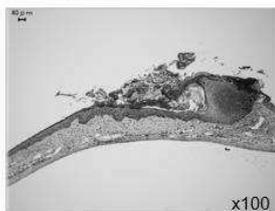
(1) 涙腺病変の評価

TRAF6 欠損マウスは、シェーグレン症候群などの自己免疫介在性ドライアイ疾患患者と同様、涙腺に強い炎症細胞浸潤、分泌上皮萎縮を認め、野生型マウスと比較して、涙液分泌量が低下していた。

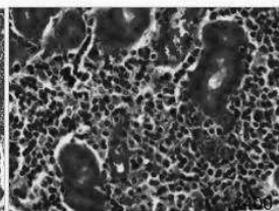
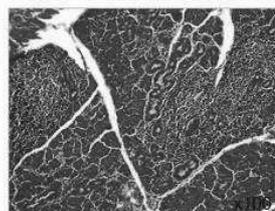
(2) 角膜病変の評価

欠損マウス角膜は著しい扁平上皮過形成を生じ、上皮下には強い炎症細胞浸潤がみられ、角膜内皮側に多数の血管新生を認めた。扁平上皮分化初期には、扁平上皮細胞特異的タンパク質(Small proline-rich protein 1B,以下 SPRR1B)が分泌され、扁平上皮の角化が生じることが知られているが、TRAF6 欠損マウスの網羅的遺伝子解析において、ヒトシェーグレン症候群患者と同様に SPRR1B の著しい発現を認めた(表 1)。網羅的遺伝子解析の結果は、角膜免疫染色、リアルタイム PCR でも確認された。

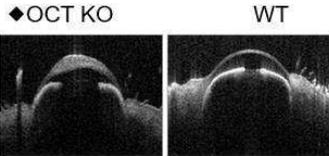
◆ Cornea



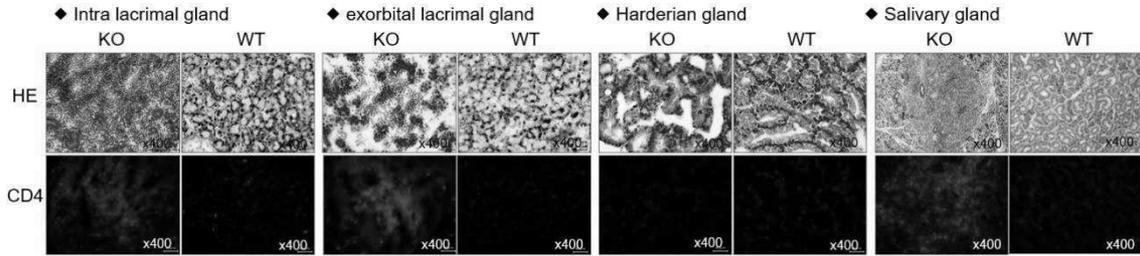
◆ Intra lacrimal gland



Corneal erosion, squamous cell hyperplasia, inflammatory cells infiltration, and angiogenesis were observed in the cornea of KO mice. Many inflammatory cells infiltrated in the ILG and ELG.

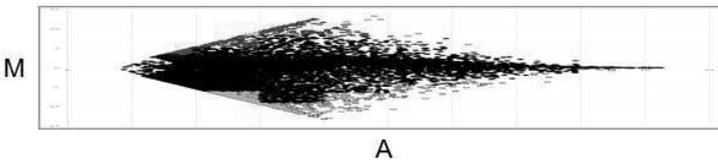


◆ OCT KO WT
 KO mice cornea with hyperplasia is thicker than that of wild type.



◆ Intra lacrimal gland ◆ exorbital lacrimal gland ◆ Harderian gland ◆ Salivary gland
 HE CD4
 Many CD4⁺ T lymphocytes infiltration in the ILG, ELG and salivary gland of the KO mice.

◆ MA plot (8 months old, KO and WT, n=3, Z-score $\geq \pm 2.0$)



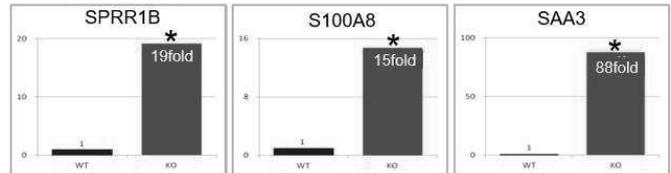
Up-regulation in KO; 840 genes, Down-regulation in KO; 456 genes

◆ Up-regulated genes in KO mice

SYMBOL	DESCRIPTION
<i>SPRR1B</i>	small proline-rich protein 1B
<i>S100A8</i>	S100 calcium binding protein A8
<i>KRTDAP</i>	keratinocyte differentiation associated protein
<i>SPRR2D</i>	small proline-rich protein 2D
<i>SAA3</i>	serum amyloid A 3 (Saa3)
<i>SPRR2F</i>	small proline-rich protein 2F
<i>SPRR3</i>	small proline-rich protein 3
<i>SPRR2H</i>	small proline-rich protein 2H
<i>TFF1</i>	trefoil factor 1
<i>CRYGS</i>	crystallin, gamma S
<i>SPRR2A2</i>	small proline-rich protein 2A2
<i>GP2</i>	glycoprotein 2
<i>LOR</i>	loricrin
<i>MUC5B</i>	mucin 5
<i>DYNAP</i>	dynactin associated protein
<i>IL1B</i>	interleukin 1 beta
<i>TFF1</i>	trefoil factor 1
<i>RPTN</i>	repetin
<i>CRYBB2</i>	crystallin
<i>IRG1</i>	immunoresponsive gene 1

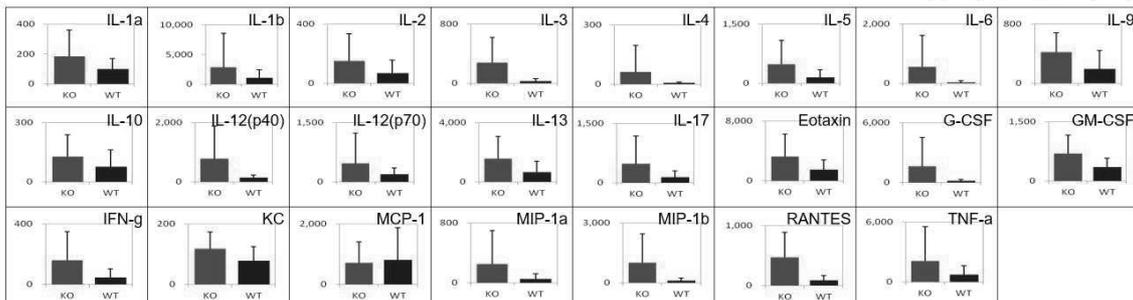
◆ Quantitative RT-PCR

■ WT ■ KO WT=1, * p<0.05 (n=7)



◆ Bio-Plex Pro™ Mouse Cytokine 23-plex Assay

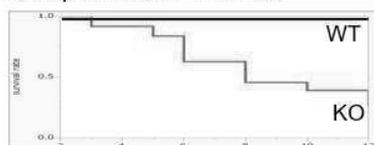
(pg/ml) ■ KO ■ WT (n=24)



(3) 加齢に伴う重症化

加齢による病態の経時的評価を行った。TRAF6 欠損マウスは、非常に重篤な角膜ドライアイ病変・涙腺病変を有するが、この病変は出生時には認めず、加齢と共に徐々に進行し、生後約半年で重症化していた。以上から、明確かつ短期間にドライアイ重症化の分子機構を明らかにでき、さらにその結果をもとにした新規治療標的分子の探索に使用できる可能性が示唆された。

◆Kaplan-Meier method



我々の検討の結果、TRAF6 欠損マウスは唾液腺の炎症のみならず、涙腺・角膜の著しい炎症を有しており、自己免疫介在性ドライアイ疾患の新規モデル動物として役立つことが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----