

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H03003

研究課題名(和文) Toll様受容体を標的としたシェーグレン症候群の新規治療戦略

研究課題名(英文) Novel therapeutic strategies for Sjogren's syndrome targeting Toll-like receptors.

研究代表者

森山 雅文(Moriyama, Masafumi)

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号：20452774

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：近年、自己免疫疾患の病態形成には獲得免疫だけでなく、Toll様受容体(TLR)を介した自然免疫が関与することが示唆されている。本研究ではシェーグレン症候群(SS)におけるTLRの発現に注目し、新たなTLR関連分子の同定と機能解析を行った。その結果、TLR8のみがSSの唾液腺で発現が亢進しており、主な発現細胞は単球/マクロファージであった。ヒト単球細胞株にTLR8を過剰発現させ、TLR8アゴニストで刺激実験を行うと、有意にTNF- $\alpha$ の産生が亢進していた。の結果から、TLR8による刺激を介して活性化した単球/マクロファージがTNF- $\alpha$ を産生することで、SSの発症に関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現時点ではSSの根治的治療はいまだなく、対症療法のみである。一部の自己免疫疾患では分子標的治療薬が開発され、良好な治療成績が報告されているが、SSでは有効性が低い。これは、SSの病態には様々なサイトカインが関与していることが原因の一つとして推察される。よって本研究により、TLRといった免疫機構の上流の分子を制御することが可能となれば、SSによる腺外症状やドライマウスの改善に寄与できる。

研究成果の概要(英文)：Recent studies suggest that Toll like receptors (TLRs) play an important role in the initiation of autoimmune diseases. In this study, we addressed to identify the disease-associated TLR related molecules in Sjogren's syndrome (SS), and then examined both expression and function of those molecules. DNA microarray and PCR validated the up-regulation of TLR8 in SS compared with chronic sialadenitis. TLR8 is reported to recognize viral RNA and self-RNA and promote the innate immune responses via TNF- $\alpha$  production. Immunofluorescence double staining and flow cytometry analysis confirmed that the expression of TLR8 almost merged with that of the monocyte/macrophage marker CD68. In vitro examination of human monocyte cell line (U937) by stimulation of TLR8 agonist, concentration of TNF- $\alpha$  in TLR8 knock-in U937 was significantly higher than that in untreated U937 and TLR8 KO U937. In conclusion, TLR8+ monocyte/macrophage via TNF- $\alpha$  secretion might be involved in the pathogenesis of SS.

研究分野：口腔外科学

キーワード：シェーグレン症候群 Toll様受容体 単球/マクロファージ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

シェーグレン症候群 (SS) は 2015 年より厚労省の「指定難病」に認定され、歯科を受診する患者も年々増加している。病理組織学的には導管上皮へのリンパ球浸潤を特徴とし、病態進展とともに高グロブリン血症や悪性リンパ腫などの腺外症状が出現することがあるため、リンパ増殖性病変とも称されるが、病因・病態についてはいまだ不明な点が多い。われわれは従来、SS の唾液腺に浸潤するヘルパーT (Th) サブセットに着目し、唾液腺から産生されるサイトカインと Th 細胞の選択的遊走に關与するケモカインの発現パターンから、SS の発症と病態維持には Th1 と Th17 が、病態進展には Th2 と濾胞性ヘルパーT (Tfh) 細胞が重要であることを見出した。

しかし、なぜ SS に Th サブセットの偏りがあるかは明らかにされていない。近年、病原体センサーである Toll 様受容体 (TLR) 特 に TLR7~TLR9 が炎症などによって生じる自己由来の傷害関連分子パターン (DAMP) を認識することにより、Th 細胞の活性化や選択的遊走が促進され、自己免疫疾患の発症に關与していることを報告されている。SS では TLR との關連についての報告はほとんどないが、唾液腺は外来刺激 (ウイルス・細菌感染) により炎症をきたしやすい臓器であり、SS でも TLR が DAMP を認識して病態 (発症) に關与している可能性が十分に考えられる。

自己免疫疾患の治療については、従来ステロイドが第一選択薬として用いられてきたが、最近では分子標的薬が開発され、関節リウマチ (RA) などの一部の自己免疫疾患では良好な治療成績を得ている。しかし、SS では多種の Th サイトカインが病態に關わるため、治療効果が限定的であり、新たな側面 (標的分子) からの治療戦略が求められている。

### 2. 研究の目的

SS は唾液腺や涙腺などの外分泌腺が障害される臓器特異的自己免疫疾患であり、前述の通り、その発症・病態形成には Th 細胞が重要な役割を果たしていることが示唆されている。近年、ステロイドに代わる新規治療薬として、炎症性サイトカイン (IL-6 や TNF- $\alpha$ ) を標的とした生物学的製剤が開発され、一部の自己免疫疾患では良好な治療効果が得られているが、SS に対する効果は限定的である。その理由として、SS の病態形成には Th 細胞から産生される多種のサイトカインが關与しており、単一のサイトカインを阻害しても病態進展を止めることができないことが推察される。

そこで本研究では、Th 細胞などの獲得免疫を制御している病原体センサーの TLR に注目して、SS における発現と機能を解析し、サイトカイン産生を制御する上流の TLR を標的とした治療の確立を目指す。

### 3. 研究の方法

SS 患者の唾液腺組織および末梢血単核球 (PBMC) における TLR ファミリー (TLR1~TLR10) の発現とその発現細胞を検討した。発現亢進を認めた TLR については、蛍光二重染色法を行い、発現亢進していた TLR ファミリーの発現候補細胞の陽性率を半定量的に解析した。さらに、発現細胞の細胞株を用いて、刺激実験を行い、培養上清中の下流分子 (炎症性サイトカイン) の濃度を測定した。最後に、ヒト TLR Tg マウスを作製し、表現型 (特に唾液腺の病理評価) を検索した。

### 4. 研究成果

SS における TLR の発現に注目し、病態形成に關わる新たな TLR 關連分子の同定のため、DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子解析を行った。SS と健常唾液腺 (HC) の口唇腺における TLR 關連遺伝子の発現の違いを視覚化するために、ヒートマップを用いた (図 1)。その結果、SS では、TLR1、TLR7、TLR8、および TLR9 の遺伝子発現の亢進を認めた。

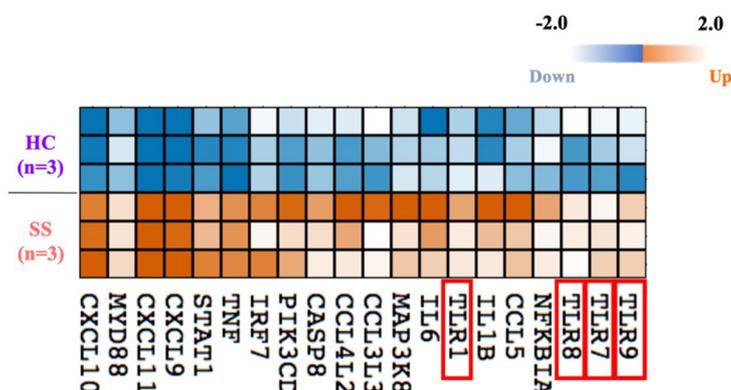


図 1. 口唇腺において発現変動を認めた TLR 關連遺伝子の heatmap

次に、DNA マイクロアレイより発現量の変動が示唆されたこれらの遺伝子について、real-time PCR 法を用いて口唇腺での mRNA 発現量の差を検証した。各群間で、候補分子の相対的 mRNA 発現量を比較した。その結果、SS 群の口唇腺では、HC 群と比較して TLR8 のみ mRNA 発現が有意に亢進していた。

さらに、SS の口唇腺における TLR8 の発現と局在を確認するために、免疫組織化学染色を行った。さらに TLR8 発現細胞を同定するために、一般に TLR8 を発現すると報告されている単球/マクロファージ、樹状細胞 (DC) として B 細胞と、TLR8 の分布を比較した。単球/マクロファージのマーカーとして CD68、DC のマーカーとして CD11c (骨髄由来 DC) と CD123 (形質細胞様 DC)、B 細胞のマーカーとして CD20 を用いた。その結果、SS 患者の口唇腺では、TLR8 はリンパ球浸潤部に強い発現を認め、CD68 および CD11c の発現パターンと類似していた。そのため、蛍光二重染色法を行い、TLR8 の発現候補細胞の陽性率を半定量的に解析したところ、SS の口唇腺においては、単球/マクロファージ (CD68 陽性細胞) が最も割合が高かった。

TLR8 は、樹状細胞、単球/マクロファージ、および B 細胞に発現するとされ、2 量体を形成し、ウイルス由来の一本鎖 RNA を認識して、自然免疫反応を引き起こすことが知られている。最近の研究では、TLR8 は慢性炎症などにより蓄積した自己由来の一本鎖 RNA も認識することが明らかになっている。そこで、単球/マクロファージの機能解析を目的に、ヒト単球細胞株 (U-937) に TLR8 を過剰発現もしくはノックアウトさせ、TLR8 アゴニスト (R848) で刺激実験を行った (図 2)。その結果から、TLR8 アゴニスト刺激により TLR8 を介して TLR8+ 単球/マクロファージは TNF- $\alpha$  の産生が亢進することが示唆された (図 3)。

【材料】ヒト単球株 (U-937)



【方法】

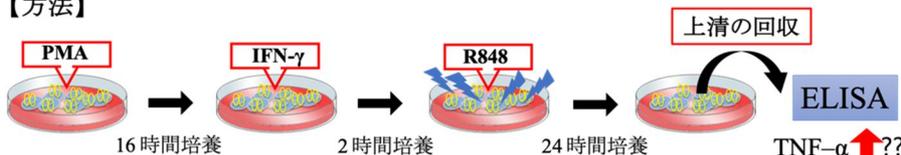


図 2. TLR8 陽性単球の機能解析 (材料および方法)

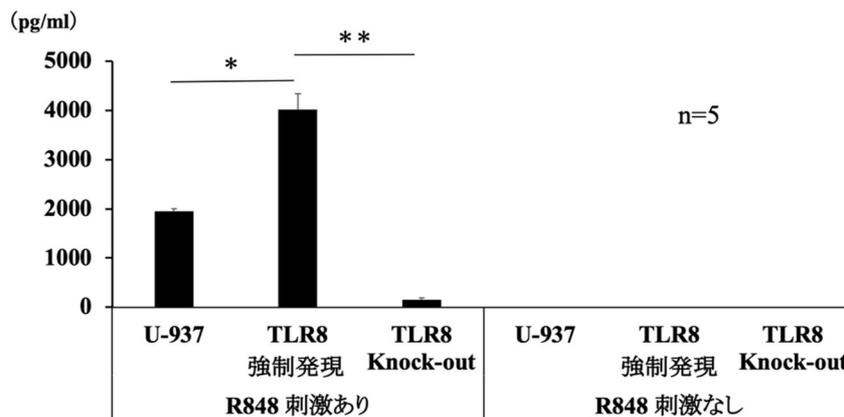


図 3. TNF- $\alpha$  産生能の比較

東京大学医科学研究所との共同研究によりすでにヒト TLR7 Tg マウスを作製しており、TLR7 アゴニストによる刺激実験では、血清 IgG1 (ヒトの IgG4 に相当) の上昇、唾液腺・膵臓・肺のリンパ球浸潤および線維化の亢進を認め、SS の類似疾患である IgG4 関連疾患の表現型を呈していたため、本研究ではヒト TLR8Tg マウスの作製を試みたが、TLR8 トランスジェニックマウスは致死性であり、モデルマウスとしての利用は困難であった。そのため、SS 患者の唾液腺組織を用いて scRNA-seq 解析を行い、TLR8 の発現細胞とサイトカイン産生を確認した。その結果、TLR8 の発現細胞は主にマクロファージであり、TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカインの産生亢進を認めた。

この TNF- $\alpha$  は、Th1 誘導型の炎症を引き起こすことや SS においては唾液腺のアポトーシスに関与していることが知られている。また、TLR8 が認識する一本鎖 RNA は、SS の発症要因とされているウイルス感染や慢性炎症で蓄積されることや TLR8 が X 染色体に優位に発現していることから、TLR8 が SS の病態にも関与していることが推察される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Ishiguro Noriko, Moriyama Masafumi, et al.	4. 巻 72
2. 論文標題 Activated M2 Macrophages Contribute to the Pathogenesis of IgG4 Related Disease via Toll like Receptor 7/Interleukin 33 Signaling	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Arthritis & Rheumatology	6. 最初と最後の頁 166 ~ 178
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/art.41052	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Maehara Takashi, Munemura Ryusuke, Shimizu Mayumi, Kakizoe Noriko, Kaneko Naoki, Murakami Yuka, Masafumi Moriyama, Kiyoshima Tamotsu, Kawano Shintaro, Nakamura Seiji	4. 巻 98
2. 論文標題 Tissue-infiltrating immune cells contribute to understanding the pathogenesis of Kimura disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Medicine	6. 最初と最後の頁 e18300 ~ e18300
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MD.00000000000018300	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ono Yuko, Tsuboi Hiroto, Moriyama Masafumi, Asashima Hiromitsu, Kudo Hanae, Takahashi Hiroyuki, Honda Fumika, Abe Saori, Kondo Yuya, Takahashi Satoru, Matsumoto Isao, Nakamura Seiji, Sumida Takayuki	4. 巻 -
2. 論文標題 ROR t antagonist improves Sjogren's syndrome like sialadenitis through downregulation of CD25	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oral Diseases	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/odi.13255	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sakamoto Mizuki, Moriyama Masafumi, Shimizu Mayumi, Chinju Akira, Mochizuki Keita, Munemura Ryusuke, Ohyama Keiko, Maehara Takashi, Ogata Kenichi, Ohta Miho, Yamauchi Masaki, Ishiguro Noriko, Matsumura Mayu, Ohyama Yukiko, Kiyoshima Tamotsu, Nakamura Seiji	4. 巻 30
2. 論文標題 The diagnostic utility of submandibular gland sonography and labial salivary gland biopsy in IgG4-related dacryoadenitis and sialadenitis: Its potential application to the diagnostic criteria	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Modern Rheumatology	6. 最初と最後の頁 379 ~ 384
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14397595.2019.1576271	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tsuboi Hiroto, Iizuka-Koga Mana, Asashima Hiromitsu, Takahashi Hiroyuki, Kudo Hanae, Ono Yuko, Honda Fumika, Iizuka Akira, Segawa Seiji, Abe Saori, Yagishita Mizuki, Yokosawa Masahiro, Kondo Yuya, Moriyama Masafumi, Matsumoto Isao, Nakamura Seiji, Sumida Takayuki	4. 巻 -
2. 論文標題 Upregulation and pathogenic roles of CCL18-CCR8 axis in IgG4-related disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Modern Rheumatology	6. 最初と最後の頁 1~9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14397595.2019.1632061	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Furusho Katsuhiko, Shibata Takuma, Sato Ryota, Fukui Ryutaro, Motoi Yuji, Zhang Yun, Saitoh Shin-ichiroh, Ichinohe Takeshi, Moriyama Masafumi, Nakamura Seiji, Miyake Kensuke	4. 巻 31
2. 論文標題 Cytidine deaminase enables Toll-like receptor 8 activation by cytidine or its analogs	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 167~173
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxy075	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Maehara Takashi, Moriyama Masafumi, Nakamura Seiji.	4. 巻 107
2. 論文標題 Pathogenesis of IgG4-related disease: a critical review	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Odontology	6. 最初と最後の頁 127-132
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10266-018-0377-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Furusho Katsuhiko, Shibata Takuma, Sato Ryota, Fukui Ryutaro, Motoi Yuji, Zhang Yun, Saitoh Shin-ichiroh, Ichinohe Takeshi, Moriyama Masafumi, Nakamura Seiji, Miyake Kensuke	4. 巻 31
2. 論文標題 Cytidine deaminase enables Toll-like receptor 8 activation by cytidine or its analogs	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 167~173
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxy075	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sakamoto Mizuki, Moriyama Masafumi, Shimizu Mayumi, Chinju Akira, Mochizuki Keita, Munemura Ryusuke, Ohyama Keiko, Maehara Takashi, Ogata Kenichi, Ohta Miho, Yamauchi Masaki, Ishiguro Noriko, Matsumura Mayu, Ohyama Yukiko, Kiyoshima Tamotsu, Nakamura Seiji	4. 巻 in press
2. 論文標題 The diagnostic utility of submandibular gland sonography and labial salivary gland biopsy in IgG4-related dacryoadenitis and sialadenitis: Its potential application to the diagnostic criteria	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Modern Rheumatology	6. 最初と最後の頁 1~6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14397595.2019.1576271	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sumida Takayuki, Azuma Naoto, Moriyama Masafumi, 他32名	4. 巻 28
2. 論文標題 Clinical practice guideline for Sjogren 's syndrome 2017	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Modern Rheumatology	6. 最初と最後の頁 383 ~ 408
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14397595.2018.1438093	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Mizuki Sakamoto, Masafumi Moriyama, Noriko Ishiguro, and Seiji Nakamura
2. 発表標題 TLR8+CD68+monocyte/macrophage contribute to the pathogenesis of Sjogren 's syndrome via TNF- secretion.
3. 学会等名 KOB International Symposium 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mizuki Sakamoto, Masafumi Moriyama, Noriko Ishiguro, and Seiji Nakamura
2. 発表標題 CD68+ monocyte/macrophage contributes to the pathogenesis of Sjogren 's syndrome via TLR8/TNF- signaling
3. 学会等名 The 60th Korean Association of Oral & Maxillofacial Surgeons (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mizuki SAKAMOTO, Masafumi MORIYAMA, Keiko OYAMA, Akihiko TANAKA, Takashi MAEHARA, Kenichi OGATA, Sachiko FURUKAWA, Miho OHTA, Masaki YAMAUCHI, Noriko ISHIGURO, Haque A. S. M. RAFIUL, Akira CHINJU, Keita MOCHIZUKI, Mayu MATSUMURA, Ryusuke MUNEMURA, Jun-Nosuke HAYASHIDA, and Seiji NAKAMURA
2. 発表標題 Involvement of Toll like receptor 8 in the pathogenesis of Sjogren ' s syndrome
3. 学会等名 The 59th Annual Congress of Korean Association of Oral and Maxillofacial Surgeons ( 国際学会 )
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mizuki SAKAMOTO, Masafumi MORIYAMA, Keiko OYAMA, Akihiko TANAKA, Takashi MAEHARA, Kenichi OGATA, Sachiko FURUKAWA, Miho OHTA, Masaki YAMAUCHI, Noriko ISHIGURO, Haque A. S. M. RAFIUL, Akira CHINJU, Keita MOCHIZUKI, Mayu MATSUMURA, Ryusuke MUNEMURA, Jun-Nosuke HAYASHIDA, and Seiji NAKAMURA
2. 発表標題 TLR8+CD68+ monocyte/macrophage contributes to the pathogenesis of Sjogren ' s syndrome.
3. 学会等名 第 66 回 国際歯科研究学会日本部会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 森山 雅文、中村 誠司	4. 発行年 2018年
2. 出版社 診断と治療社	5. 総ページ数 268
3. 書名 シェーグレン症候群の診断と治療マニュアル 改訂第3版	

〔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
研究 分担 者	中村 誠司  (Nakamura Seiji)  (60189040)	九州大学・歯学研究院・教授    (17102)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	三宅 健介  (Miyake Kensuke)  (60229812)	東京大学・医科学研究所・教授    (12601)	
研究分担者	坪井 洋人  (Tsuboi Hiroto)  (80580505)	筑波大学・医学医療系・講師    (12102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関