

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08919

研究課題名(和文) シェーグレン症候群におけるTLRを介した単球活性化分子機構の解明と治療標的の探索

研究課題名(英文) Elucidation of molecular mechanisms of monocyte activation through TLR signaling in Sjögren's syndrome.

研究代表者

池田 由美 (Ikeda, Yumi)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・研究員

研究者番号：70826156

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は指定難病であるシェーグレン症候群(SS)の組織傷害における単球の活性化が寄与する病態解明と新規治療標的の探索を目的とする。研究代表者らはSS患者末梢血単球でのBAFF受容体(BR3)発現亢進が患者臨床指標と相関し、BR3を介したBAFFによる単球の活性化がSS病態に寄与する可能性を示した。本研究では単球におけるBR3発現亢進の分子機構を明らかにするため、TLRに着目し、ヒト単球由来細胞株や末梢血単球を用いてBR3発現へ関与するTLRシグナルの詳細解明を試みた。その結果患者単球でのTLR4経路の複数のシグナル分子のリン酸化が健常人と比較して亢進しており病態と関連することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究代表者らのこれまでの研究成果より、単球におけるTLR発現亢進に起因したBR3発現異常が単球を活性化しSS患者の病変部位の組織障害を引き起こすという独自の仮説に基づく病態解明の取り組みは新規治療標的の探索を可能にし、極めて独自性、新規性、創造性が高いと考える。本研究の成果はSS病態形成機序の解明に伴う、新たな治療標的タンパク質の探索及び同定につながり、標的タンパク質の作用を制御する化合物はSS根治的治療薬のシーズとなり得る。よって本研究は学術的に有意義であるばかりでなく、根治治療薬の存在しない免疫難病分野への新規治療薬の提供という点において社会的貢献度も高い。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to clarify the regulatory mechanisms of elevated expression of BAFF receptor(BR3) in monocytes and search novel therapeutic targets for Sjogren's syndrome (SS). In our previous study, we found that BR3 expression was elevated in peripheral SS monocytes and that elevation was correlated with clinical parameters of patients. It has been reported that signaling pathways via TLRs are involved in onset and/or development of SS and that monocytes expressing TLRs play a crucial role in the pathogenesis of the disease. In this study, we focused on TLR4 and investigated possible involvement of signaling pathways of TLR4 in enhanced expression of BR3 in human monocytes. As a results, we found that TLR4 expression was elevated in SS monocytes and phosphorylation of several TLR4 signaling molecules were upregulated by LPS stimulated monocytes These findings suggest that these molecules may be involved in the pathogenesis of SS.

研究分野：分子生物学

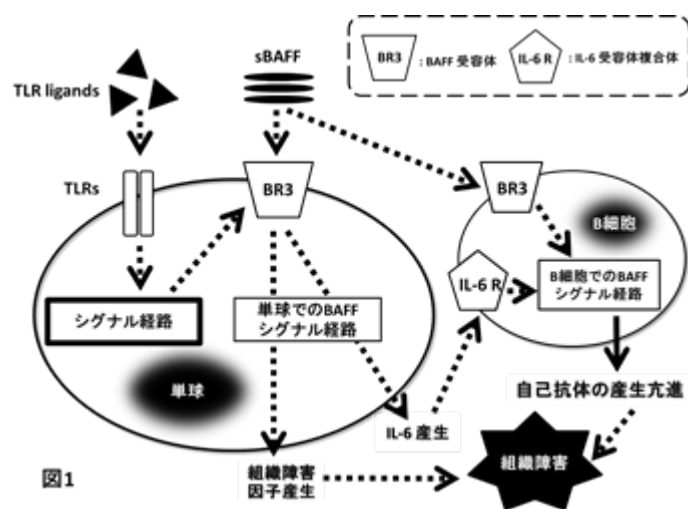
キーワード：シェーグレン症候群 単球 Toll様受容体

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) は指定難病と定められた自己免疫疾患である。SS の主な症状は炎症性細胞が涙腺や唾液腺などに浸潤することが起因となり分泌腺組織を障害し起こる乾燥性角結膜炎や慢性唾液腺炎などである。これらの症状は患者の QOL を大いに損なうが、組織障害の機序の詳細が未だ不明であるため、対症療法は行われているものの根治的治療法の確立には至っていない。

これまでの研究代表者の研究から SS 患者の末梢単球では BAFF 受容体 (BR3) が高発現していること (Yoshimoto, K et al Arthritis Res Ther, 2011)、BAFF 刺激単球から IL-6 や MMP など B 細胞の活性化や組織障害に関与する分子の産生が亢進し、その産生量は単球における BR3 発現率と相関していることを見出した (Yoshimoto K. et al. Annal Rheum Dis Suppl 2018)。このような SS に特異的に起こる単球の BR3 発現亢進に着目し、単球が関与した組織障害機序の解明を通じた新規治療標的の探索を行うことは SS の根治的治療薬開発につながると考えられる。そこで研究代表者らは単球における BR3 発現亢進機構を明らかにすることは SS の病態解明にも繋がり、新規治療標的を見出すことを可能にすると着想した。これまで SS の発症にはウイルス感染の関与や病変部位での TLR 発現や炎症性サイトカインの発現亢進が報告されており、研究代表者らは単球における自然免疫システムの活性化が B 細胞の機能亢進や組織障害に関与し、病態形成に関わると考えた。さらに申請者らは予備的検討により、SS 患者の末梢単球において健常人単球と比較していくつかの TLR の発現が亢進していることを見出した。これらの結果より、



TLR の発現亢進および TLR を通じたシグナル伝達を阻害することで単球における BR3 発現亢進が抑制され、BAFF による単球の活性化が抑制される可能性があると考えた。これらの知見に基づき、TLR のシグナル伝達を介した BR3 発現上昇が起因となる SS 単球の活性化により産生された組織障害因子や単球により活性化された B 細胞が組織障害を引き起こすという仮説を立てた (図 1)。

本研究で明らかとなる単球での BR3 発現亢進機構の詳細は新たな治療標的の探索同定にもつながると考えられる。

2. 研究の目的

研究代表者らは SS 患者の単球において B 細胞活性化因子 (BAFF) の受容体である BAFF 受容体 (BR3) の発現が亢進していること、この単球での異常が B 細胞の IgG 産生亢進に寄与していること、BAFF 刺激 SS 単球により組織障害に関与するマトリックスメタロプロテアーゼの産生が亢進されることを世界で初めて突き止めた。これらの研究成果は SS 単球の BAFF による BR3 を介した活性化が病態形成において極めて重要な役割を担っており単球上の BR3 は有望な治療標的であることを強く示唆している。このため単球に特化した BR3 発現亢進機構を解明することは新規治療標的を見出し、新規治療薬開発への橋渡しとなる。本研究は単球での BR3 発現亢進機構の詳細を明らかにし、単球が関与する涙腺、顎下腺の組織障害機序の解明を通じた新規治療標的の探索を行うことを目的としている。

3. 研究の方法

(1) ヒト単球由来細胞株 THP-1 を用いた BR3 発現亢進に関与する TLR の探索

① TLR1 から TLR9 までのアゴニスト刺激による THP-1 における BR3 発現と IL-6 産生の検討

THP-1 細胞を次の TLR アゴニスト存在下で 4 日間培養し、細胞における BR3 発現と IL-6 産生について、FACS 法と ELISA 法によりそれぞれ検討した。

TLR アゴニストは下記のとおりである。

TLR1/2 : Pam3CSK4、TLR3 : Poly(I:C)、TLR4 : LPS、TLR5 : Flagellin、TLR6/2 : FSL1
TLR7 : Imiquimod、TLR8 : ssRNA40/LyoVec、TLR9 : ODN2006

② TLR4 刺激による CD16 発現と BR3 発現誘導と MyD88 阻害剤による抑制

THP-1 を LPS (10 μ /ml) および MyD88 阻害剤 (TAK-242) 存在下・非存在下で培養し、CD16、BR3 および IL-6 産生について FACS 法あるいは ELISA 法によりそれぞれ測定した。

③ LPS 刺激 THP-1 での TLR シグナル経路分子 (MyD88 pIRAK4) の発現検討

THP-1 を LPS (10 μ g/ml) で 10 分刺激後、細胞よりタンパク質を抽出し、細胞内の MyD88 およびリン酸化 pIRAK4 発現についてウェスタンブロッティング法により検討した。

(2) SS 患者および健常人末梢血単球における TLR4、BR3 および関連分子の発現検討

- ① 末梢血単球での TLR4 BR3 MyD88 遺伝子発現の検討
 SS 患者、健常人の末梢血を用いて、単球の 3 サブセット (CD14++CD16-:classical monocyte, CD14++CD16+:intermediate monocyte, CD14+CD16+:non-classical monocyte) ごとでの BR3 および TLR4 発現について FACS 法を用いて検討した。FACS 法による解析には VioBlue 標識抗ヒト CD16 抗体、PE 標識抗ヒト BR3 抗体、PE-Cy7 標識抗ヒト CD14 抗体、APC 標識抗ヒト TLR4 抗体を用いた。
- ② 末梢血中の単球サブセットにおける BR3 TLR4 発現相関
 SS 患者末梢血単球サブセットにおける BR3 および TLR4 発現の相関関係について Pearson's correlation analysis により解析した。
- ③ LPS 刺激末梢血単球を用いたシグナル分子の探索
 SS 患者および健常人末梢血より CD14 マイクロビーズ (Miltenyi Biotech) を用いて、autoMACS separator (Miltenyi Biotech) により単球を分離した。細胞に LPS (10 μg/ml) で 10 分刺激を加え、タンパク質を抽出し、細胞内の TLR4 シグナル経路関連分子 (MyD88 IRAK4 IKKa/b TAK-1 TRAF6 NF-κB) についてウェスタンブロッティング法を用いて発現解析を行った。IRAK4 IKKa/b TAK-1 NF-κB についてはリン酸化分子を解析した。

4. 研究成果

(1) ヒト単球由来細胞株 THP-1 における BR3 発現に関わる TLR の探索

①THP-1 細胞を TLR1 から 9 までのアゴニスト存在下で培養後、細胞における BR3 発現と L-6 産生について FACS 法および ELISA 法でそれぞれ検討した (図 2、図 3)。これらの結果により TLR4 アゴニスト (LPS) が THP-1 における BR3 発現、IL-6 産生誘導作用が強いことがあきらかとなった。

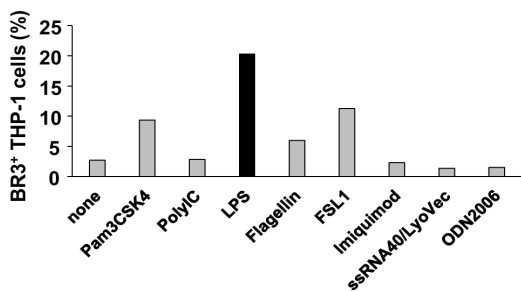


図2：THP-1におけるTLRアゴニストによるBR3発現誘導作用

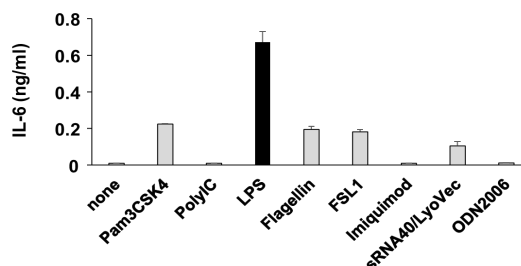


図3：THP-1からのTLRアゴニストによるIL-6産生誘導作用

②THP-1 に対し、LPS 刺激を加えると CD16 陽性分画が増加し、その分画において BR3 発現が亢進していることが明らかとなった (図 4)。さらに THP-1 を LPS 存在下で TLR4 シグナル経路に関わる MyD88 阻害活性を有する TAK-242 を添加したところ、THP-1 での BR3 発現への抑制作用が認められた (図 5)。これらの結果より LPS 刺激による BR3 発現亢進は TLR4 シグナル経路を介した可能性が示唆された。

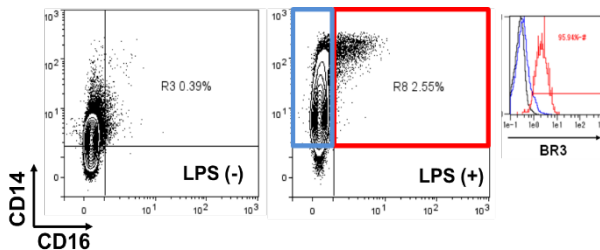


図4：LPS刺激THP-1におけるCD16およびBR3発現亢進

③LPS 刺激を受けた THP-1 における TLR4 シグナル分子の発現についてウェスタンブロッティング法を用いて検討した。TLR4 シグナル経路は図 6 に示す分子が関与していることが報告されている。MyD88 は TLR4 に会合するアダプター分子で、その下流で IRAK4 などの分子のリン酸化によりシグナル伝達が成されるとされる。そこで、MyD88 阻害剤 (TAK-242) 存在下で LPS 刺激 (10 分) を受けた THP-1 について MyD88 およびリン酸化 IRAK4 の発現を検討した。その結果で、LPS 刺激を受けた THP-1 では IRAK4 のリン酸化が亢進し、MyD88 発現とともに TAK-242 により抑制されることが明らかとなった (図 7)。

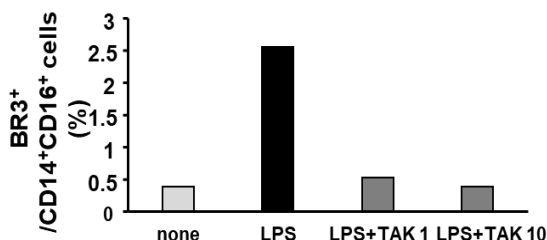
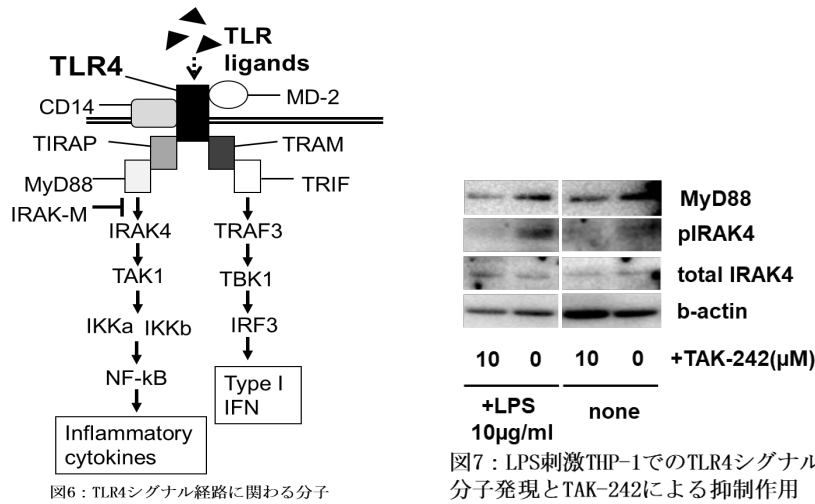


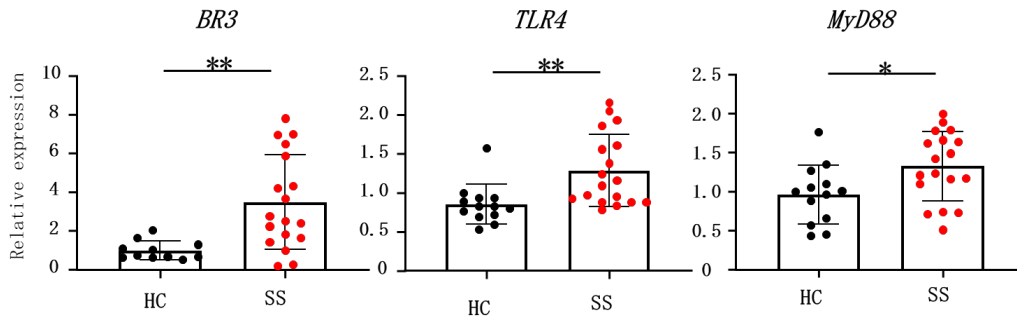
図5：LPS刺激THP-1におけるBR3発現に対するTLR4阻害剤の抑制作用



(2) SS 患者および健常人末梢血単球における TLR4、BR3 および関連分子の発現検討

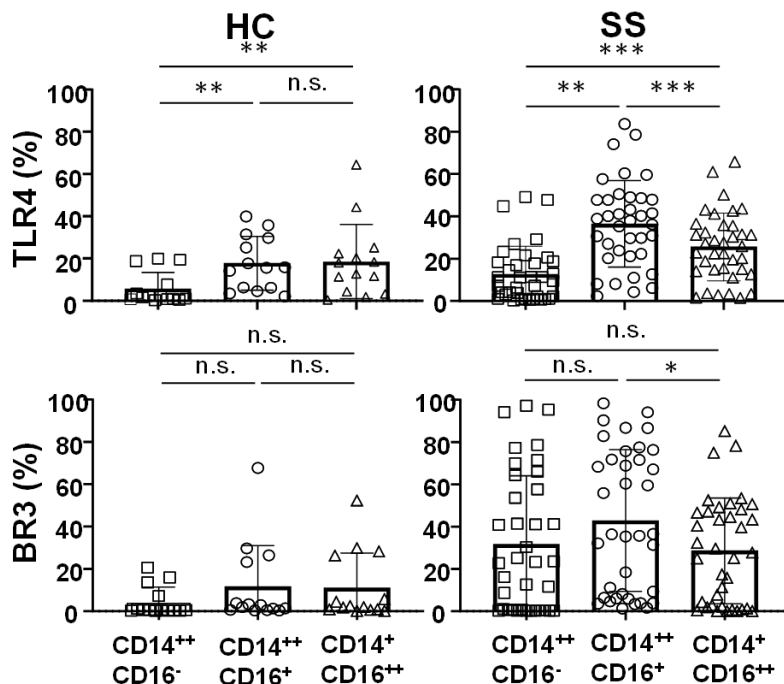
①SS 患者および健常人末梢血単球における TLR4、BR3、MyD88 の遺伝子発現解析

末梢血より CD14 マイクロビーズを用いて単離した単球より RNA を抽出し、定量 PCR 法を用いて TLR4、BR3 および TLR4 に会合するアダプター分子である MyD88 について定量 PCR 法を用いて発現解析を実施した。その結果、SS 患者末梢血単球での TLR4、BR3、MyD88 とも健常人よりも有意な発現亢進が認められた (図 8)。



②SS 患者および健常人末梢血単球サブセットでの TLR4 および BR3 発現

SS 患者および健常人末梢血単球の 3 サブセット (CD14⁺⁺CD16⁻: classical monocyte、CD14⁺⁺CD16⁺: intermediate monocyte、CD14⁺CD16⁺: non-classical monocyte) ごとでの BR3 および TLR4 発現について FACS 法を用いて検討した。その結果、TLR4 および BR3 とも CD14⁺⁺CD16⁺: intermediate monocyte において顕著な発現亢進があることが明らかとなった (図 9)。



③SS 患者末梢血単球 intermediate monocyte での TLR4 と BR3 発現相関

FACS 法を用いて解析した SS 患者末梢血 intermediate monocyte における TLR4 と BR3 発現には有意な正の相関を認めることが明らかとなった (図 10)。この結果より、BR3 発現には TLR4 発現の関与がある可能性が示唆された。相関解析には Pearson's correlation analysis を用いた。

④LPS 刺激末梢血単球を用いたシグナル分子の探索

TLR4 経路の活性化のため末梢血単球に LPS 刺激を加え、細胞における TLR4 シグナル分子の発現についてウェスタンブロッティング法を用いて解析した。その結果 SS 患者末梢血単球では LPS 刺激により MyD88、リン酸化 IRAK4、リン酸化 IKK α /b、リン酸化 TAK1、TRAF6、リン酸化 NF- κ Bp65 分子発現が健常人と比較して亢進していることが明らかとなった (図 11)。これらの結果は SS 患者末梢血単球では TLR4 発現亢進による単球の活性化が惹起され、BR3 発現につながる可能性を示唆している。

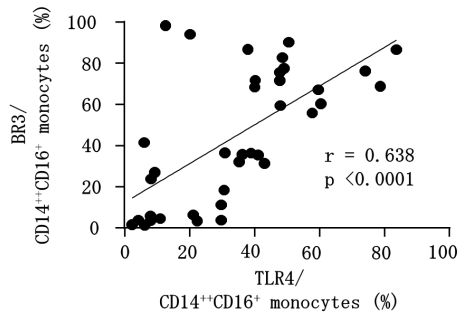


図10: SS患者末梢血単球intermediate monocyteでの TLR4およびBR3発現の相関

以上の本研究の成果より、SS 患者末梢血単球では TLR4 および BR3 発現が亢進しており、TLR4 を介する刺激により、単球が活性化し、BR3 発現が亢進する可能性が示唆された。

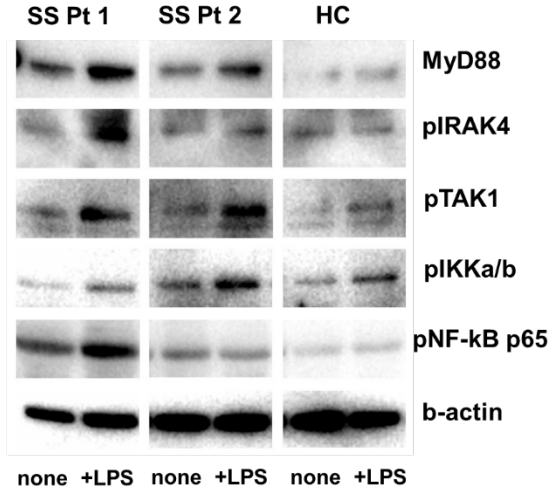


図11: LPS刺激末梢血単球でのTLR4シグナル分子発現

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yoshimoto Keiko, Suzuki Katsuya, Takei Eriko, Ikeda Yumi, Takeuchi Tsutomu	4. 巻 22
2. 論文標題 Elevated expression of BAFF receptor, BR3, on monocytes correlates with B cell activation and clinical features of patients with primary Sjogren's syndrome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Arthritis Research & Therapy	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） 10.1186/s13075-020-02249-1	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16件（うち招待講演 0件／うち国際学会 4件）

1. 発表者名 池田由美、吉本桂子、鈴木勝也、武井江梨子、竹内 勤
2. 発表標題 原発性シェーグレン症候群患者末梢血単球ではTLR4シグナル経路の活性化がBAFF受容体発現亢進に寄与する
3. 学会等名 第65回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉本桂子、鈴木勝也、池田由美、武井江梨子、竹内 勤
2. 発表標題 原発性シェーグレン症候群患者末梢血単球におけるBAFFシグナルとイオンチャンネルのクロストーク機構の解析
3. 学会等名 第65回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 峯岸恵美、田中祐樹、吉本桂子、池田由美、大友耕太郎、鈴木勝也、竹内 勤
2. 発表標題 病態モデルマウスを用いた全身性エリテマトーデスにおけるB細胞異常に関する解析
3. 学会等名 第65回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中祐樹、峯岸恵美、吉本桂子、池田由美、大友耕太郎、鈴木勝也、竹内 勤
2. 発表標題 全身エリテマトーデス病態モデルマウスにおけるT細胞機能異常に関する検討
3. 学会等名 第65回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yumi Ikeda, Keiko Yoshimoto, Katsuya Suzuki, Eriko Takei, Tsutomu Takeuchi
2. 発表標題 Activation of signaling pathways of Toll-like receptor 4 promotes expression of BAFF receptor, BR3 in CD14+CD16+ human monocytes.
3. 学会等名 23rd APLAR Asia-Pasific League of Associations of Rheumatology Congress (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Keiko Yoshimoto, Katsuya Suzuki, Yumi Ikeda, Eriko Takei, Tsutomu Takeuchi
2. 発表標題 BAFF-BAFF receptor, BR3, axis is involved in activation of monocytes via NF-kB pathways and assists B cell activation in patients with primary Sjogren 's syndrome.
3. 学会等名 23rd APLAR Asia-Pasific League of Associations of Rheumatology Congress (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 池田由美、吉本桂子、鈴木勝也、武井江梨子、竹内 勤、金子 祐子
2. 発表標題 原発性シェーグレン症候群患者末梢血単球でのBAFF受容体発現亢進におけるTLR4シグナルの関与
3. 学会等名 第8回JCRベーシックリサーチカンファレンス
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yumi Ikeda, Keiko Yoshimoto, Katsuya Suzuki, Eriko Takei, Tsutomu Takeuchi
2. 発表標題 Signaling pathways via Toll-like receptor 4 are involved in enhanced expression of BAFF receptor in CD14+CD16+ human monocytes.
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Keiko Yoshimoto, Katsuya Suzuki, Yumi Ikeda, Eriko Takei, Tsutomu Takeuchi
2. 発表標題 Possible involvement of the voltage-gated sodium channel 1.7 in activation of BAFF signaling in monocytes of patients with primary Sjogren ' s syndrome.
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 池田由美、吉本桂子、鈴木勝也、武井江梨子、竹内 勤
2. 発表標題 原発性シェーグレン症候群患者末梢血単球でのBAFF受容体発現亢進にはTLR4シグナル経路が関与する
3. 学会等名 第29回日本シェーグレン症候群学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉本桂子、鈴木勝也、池田由美、武井江梨子、竹内 勤
2. 発表標題 シェーグレン症候群末梢血単球でのBAFF誘導IL-6産生機構におけるNav1.7チャンネルの関与
3. 学会等名 第29回日本シェーグレン症候群学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 池田由美、吉本桂子、鈴木勝也、武井江梨子、竹内 勤
2. 発表標題 原発性シェーグレン症候群患者末梢血単球ではTLR4シグナル経路の活性化がBAFF受容体発現亢進に寄与する
3. 学会等名 第64回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉本桂子、鈴木勝也、武井江梨子、池田由美、竹内 勤
2. 発表標題 原発性シェーグレン症候群患者末梢血単球でのBAFF受容体発現亢進はB細胞活性化および臨床的特徴に關与する
3. 学会等名 第64回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yumi Ikeda, Keiko Yoshimoto, Katsuya Suzuki, Eriko Takei, Tsutomu Takeuchi
2. 発表標題 Signaling pathways via Toll-like receptor 4 are involved in elevated expression of BAFF receptor in monocytes.
3. 学会等名 22nd Asia-Pacific League of Associations for Rheumatology Congress
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Keiko Yoshimoto, Yumi Ikeda, Katsuya Suzuki and Tsutomu Takeuchi
2. 発表標題 Elevated expression levels of the voltage-gated sodium channel 1.7 and BAFF receptor in peripheral monocytes contribute to activation of monocytes of patients with primary Sjögren's syndrome.
3. 学会等名 Immunology 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Keiko Yoshimoto, Katsuya Suzuki, Yumi Ikeda, Eriko Takei, Tsutomu Takeuchi
2. 発表標題 ELEVATED EXPRESSION OF BAFF-RECEPTOR IN PERIPHERAL MONOCYTES PROMOTES B CELL ACTIVATION AND CORRELATES WITH CLINICAL MANIFESTATIONS OF PRIMARY Sjögren's Syndrome.
3. 学会等名 EULAR 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔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
研究分担者	吉本 桂子 (Yoshimoyo Keiko) (20383292)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・研究員 (32612)	

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
---------	---------