

令和 6 年 5 月 25 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K10311

研究課題名（和文）JAK/STATシグナル制御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 strategy for Sjogren's syndrome targeting JAK/STAT signal regulation

研究代表者

青田 桂子（AOTA, Keiko）

徳島大学・病院・准教授

研究者番号：70437391

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）：シェーグレン症候群（以下SS）は、唾液腺や涙腺などの外分泌腺を標的とする免疫学的指定難病で、現時点では確立された治療法はない。研究代表者はSS患者口唇腺でケモカインCXCL10が過剰発現していることに着目し、唾液腺細胞を用いた研究を行った結果、IFN 刺激により導管細胞がJAK/STATシグナルを介してCXCL10を産生し、Tリンパ球が集簇することを見出した。そして、関節リウマチ治療薬であるJAK阻害薬がSS唾液腺におけるCXCL10の産生を抑制し、Tリンパ球の集簇を制御することを明らかにした。本研究によりJAK阻害薬がSS唾液腺の炎症病態を改善する治療薬となりうることを証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、JAK1/2選択的阻害薬バリシチニブがSS唾液腺の炎症病態を改善する治療薬となりうることを証明した。SS患者口唇腺と唾液腺細胞を用いて分子機構まで証明したことは学術的価値がある。SS唾液腺の炎症病態の改善は、腺房構造の破壊を阻止することにつながり、唾液産生・分泌が回復すると見込まれる。ドライマウスの改善は口腔機能低下症の予防にもつながり、SS患者のQOLの著しい改善に寄与する。さらに、JAK阻害薬は生物学的製剤と異なり低分子化合物であるため、経口投与可能であること、低薬価であることから、医療経済的な側面からも社会的意義がある。

研究成果の概要（英文）：Sjogren's syndrome (SS) is a chronic autoimmune disease targeting salivary and lacrimal glands, and there is currently no established treatment. The researchers focused on the chemokine CXCL10, which is overexpressed in the labial glands of SS patients, and conducted study using salivary gland cells. Our results suggested that Janus kinase (JAK) inhibitor suppressed IFN-induced CXCL10 expression and attenuated immune-cell chemotaxis by inhibiting JAK/STAT signaling, suggesting its potential as a therapeutic strategy for SS.

研究分野：口腔内科学

キーワード：シェーグレン症候群 ケモカイン JAK/STATシグナル

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

シェーグレン症候群 (Sjögren's syndrome, 以下 SS) は、唾液腺、涙腺などの外分泌腺を標的とする自己免疫疾患である。近年の網羅的ゲノム解析により SS においても疾患関連遺伝子群が同定され、SS を対象とする分子標的薬 (生物学的製剤) を用いた大規模な臨床研究が実施されている。しかしながら、腺外症状の改善を認めても腺症状 (乾燥症状) の改善は困難であり、効果的な治療法は未確立のままである。この背景には、標的臓器、免疫システム、性ホルモンの複雑なクロストークにより病態が形成される SS では、単一分子を標的とすることに限界があると考えられる。このためこれまでと異なるアプローチによる治療法の構築が必要であった。

2013 年、関節リウマチ治療薬としてサイトカイン刺激による細胞内シグナルを特異的に抑制する低分子キナーゼ阻害薬である Janus kinase (JAK) 阻害薬が本邦で初めて承認され、現在その適応は潰瘍性大腸炎、乾癬、アトピー性皮膚炎に拡大されている。JAK 阻害薬は低分子化合物であるため (1) 経口投与可能であること、(2) 低薬価であることから注目されている。JAK/STAT (signal transducers and activators of transcription) シグナル経路は多くのサイトカインやホルモンの細胞内シグナル伝達を担っている。サイトカインを標的とした生物学的製剤 (抗 TNF 抗体、抗 IL-6 受容体抗体) は、関節リウマチの治療に一大革命をもたらしたが、これらが単一分子を標的とするのに対して、JAK 阻害薬はさまざまなサイトカインの細胞内シグナル伝達を阻害することが可能な薬剤であり、SS 治療の単一標的の限界というこれまでの課題を突破できるものと考えられた。

これまでに研究代表者は、SS 患者サンプルを用いた網羅的遺伝子解析により SS の病態形成に深く関与する疾患関連遺伝子としてケモカイン CXCL10 を同定し、その過剰産生に至る分子生物学的メカニズムの研究を行ってきた。その結果、主に IFN- γ 刺激により JAK/STAT シグナル経路を介して唾液腺導管細胞が著明に CXCL10 を産生し、CXCR3⁺ T 細胞および CXCR3⁺ マクロファージをリクルートさせることを明らかにした。この先行研究に基づいて、研究代表者は JAK/STAT シグナルを制御することにより、唾液腺導管細胞での CXCL10 過剰産生を抑制し、SS 唾液腺における炎症病変を制御できるのではないかと着想した。

2. 研究の目的

本研究では、JAK 阻害薬が SS 唾液腺の炎症病態を改善させるかを検証し、新規 SS 治療薬となりうるかを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 口唇腺サンプル

徳島大学病院生命科学・医学系研究倫理審査委員会の承認を得て (承認番号 2802)、一次性 SS (pSS) 患者 15 例と健常者 5 例から口唇腺を採取し、ホルマリン固定ののちパラフィンで包埋し切片を作製した。

(2) 免疫組織化学染色

pSS 患者口唇腺における JAK1、JAK2、リン酸化 JAK1、リン酸化 JAK2 の発現と局在を免疫組織化学染色法で解析した。

(3) MTT assay

JAK 阻害薬が唾液腺細胞の増殖に及ぼす影響を MTT assay で解析した。

(4) Real-Time Quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR)

JAK 阻害薬が唾液腺導管細胞での IFN- γ 誘導性 CXCL10 mRNA 発現に及ぼす影響を RT-qPCR で解析した。

(5) Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

JAK 阻害薬が唾液腺導管細胞での IFN- γ 誘導性 CXCL10 蛋白質産生に及ぼす影響を ELISA で解析した。

(6) Western Blot Analysis

JAK 阻害薬が唾液腺導管細胞での IFN- γ 誘導性 STAT リン酸化に及ぼす影響を Western Blot Analysis にて解析した。

(7) Cell Migration Assay

JAK 阻害薬が IFN- γ 誘導性 T 細胞の遊走性に及ぼす影響を Cell Migration Assay にて解析した。

4. 研究成果

(1) pSS 患者口唇腺における JAK1、JAK2、リン酸化 JAK1、リン酸化 JAK2 の発現

われわれはこれまでに報告がなかった pSS 患者口唇腺における JAK1、JAK2、リン酸化 JAK1、リン酸化 JAK2 の発現を免疫組織化学染色法にて解析した (図 1)。JAK1 は導管での発現を認

めたが、腺房ではほとんど発現を認めなかった。リン酸化 JAK1 は導管での発現は JAK1 と同程度であったが、腺房では基底側に発現を認めた。一方 JAK2 は、導管および腺房での発現は JAK1 と比較して弱かった。リン酸化 JAK2 は導管での発現が著しく亢進し、導管周囲に集簇しているリンパ球にも強い発現を認めた。また、腺房基底側での発現も認めた。この結果から、SS 口唇腺では JAK1 と JAK2 のリン酸化は亢進し、JAK1 と JAK2 を分子標的にすることにより導管細胞からの CXCL10 産生の抑制効果と、免疫細胞の活性化抑制効果が期待できると推察された。そこで、JAK1/JAK2 選択的阻害薬であるバリシチニブを用いて、*in vitro* の解析を行った。

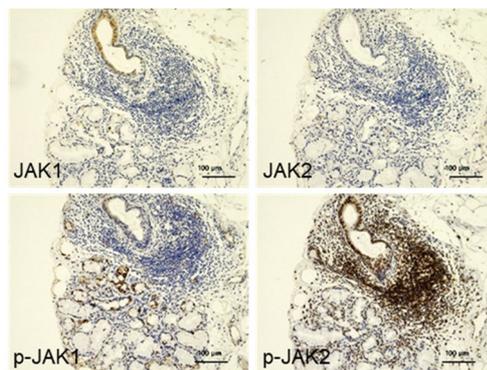


図1 免疫組織化学染色

(2) バリシチニブが唾液腺導管細胞の増殖に及ぼす影響

バリシチニブの至適濃度を決定するために唾液腺導管細胞株(NS-SV-DC)を用いて MTT assay を行った。バリシチニブを 10~5000 nM の濃度で培養液に添加し 3 日間培養したが、NS-SV-DC の増殖率が低下することはなく、各濃度で増殖率に有意差は認めなかった。

(3) バリシチニブが唾液腺導管細胞での IFN- γ 誘導性 CXCL10 発現に及ぼす影響

バリシチニブが NS-SV-DC における IFN- γ 誘導性 CXCL10 発現に及ぼす影響を RT-qPCR および ELISA にて解析した。NS-SV-DC 培養液にバリシチニブを添加することにより IFN- γ 誘導性 CXCL10 mRNA 発現および CXCL10 蛋白質産生は有意に抑制された(図 2)。バリシチニブの CXCL10 抑制効果は濃度依存性であることが明らかになった。

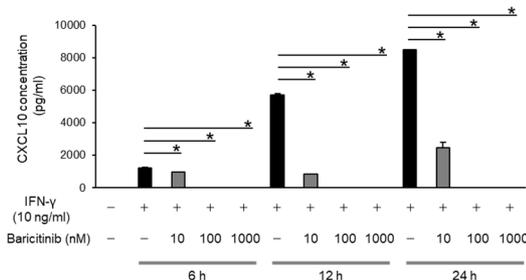


図2 バリシチニブによる IFN- γ 誘導性 CXCL10 蛋白質産生の抑制効果

(4) バリシチニブが唾液腺導管細胞での IFN- γ 誘導性 STAT リン酸化に及ぼす影響

バリシチニブが IFN- γ による JAK-STAT シグナルに及ぼす影響を Western blotting にて解析した。NS-SV-DC 培養液に IFN- γ を添加すると 5 分後より STAT1、STAT3 のリン酸化は起こるが、バリシチニブを加えることで STAT1 および STAT3 のリン酸化は減弱した。これよりバリシチニブは、NS-SV-DC において JAK1、JAK2 を競合的に阻害する結果、STAT1 と STAT3 のリン酸化を抑制し、IFN- γ のシグナル伝達を遮断することで核内での CXCL10 の転写ならびに蛋白質合成、分泌を制御すると考えられた。

(5) バリシチニブが IFN- γ 誘導性 T 細胞の遊走性に及ぼす影響

プレートに NS-SV-DC 細胞を播種し、IFN- γ を添加し 24 時間培養後、培養上清をフィーダートレイにうつし、Migration chamber に Jurkat T cell を加え 37 で 24 時間培養した。フィーダートレイに遊走した Jurkat T cell を蛍光標識し、蛍光マイクロプレートリーダーにて測定した。バリシチニブを添加することより IFN- γ 刺激導管細胞への Jurkat T cell の遊走は有意に抑制された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 Aota Keiko, Kani Koichi, Ono Shinji, Naniwa Kohei, Momota Yukihiro, Fukui Makoto, Ishimaru Naozumi, Azuma Masayuki	4. 巻 -
2. 論文標題 Activation of Janus kinase 2 contributes to the autoimmune pathology in the salivary glands of patients with Sjogren's syndrome	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Oral Science International	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） 10.1002/osi2.1241	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Supriya Shakya, Ushikoshi-Nakayama Ryoko, Yamazaki Tomoe, Omagari Daisuke, Aota Keiko, Inoue Hiroko, Matsumoto Naoyuki, Saito Ichiro	4. 巻 72
2. 論文標題 Effects of polyphenols in non-centrifugal cane sugar on saliva secretion: in vitro and in vivo experiments and a randomized controlled trial	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition	6. 最初と最後の頁 171 ~ 182
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3164/jcbn.22-114	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 青田桂子, 可児耕一	4. 巻 31
2. 論文標題 シェーグレン症候群新規治療薬としてのJAK阻害薬の可能性	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 口腔組織培養学会誌	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takamatsu Koki, Tanaka Junichi, Katada Ryogo, Azuma Kotaro, Takakura Ikuko, Aota Keiko, Kamatani Takaaki, Shirota Tatsuo, Inoue Satoshi, Mishima Kenji	4. 巻 409
2. 論文標題 Aging-associated stem/progenitor cell dysfunction in the salivary glands of mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Experimental Cell Research	6. 最初と最後の頁 112889 ~ 112889
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.yexcr.2021.112889	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Aota Keiko, Yamanoi Tomoko, Kani Koichi, Ono Shinji, Momota Yukihiro, Azuma Masayuki	4. 巻 44
2. 論文標題 Inhibition of JAK-STAT Signaling by Baricitinib Reduces Interferon- γ -Induced CXCL10 Production in Human Salivary Gland Ductal Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Inflammation	6. 最初と最後の頁 206 ~ 216
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10753-020-01322-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計5件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 青田桂子、可児耕一、西田真理、福場真美、浪花耕平、桃田幸弘
2. 発表標題 JAK阻害薬バリシチニブは唾液腺導管細胞のIFN- γ 誘導性CXCL10発現を抑制する
3. 学会等名 第59回日本口腔組織培養学会総会・学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 青田桂子、可児耕一、桃田幸弘、石丸直澄、東 雅之
2. 発表標題 シェーグレン症候群唾液腺におけるJAKsの発現解析
3. 学会等名 第76回日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 青田桂子、山ノ井朋子、可児耕一、桃田幸弘、東 雅之
2. 発表標題 シェーグレン症候群新規治療薬としてのJAK阻害薬の可能性
3. 学会等名 第75回日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 青田桂子、可児耕一、桃田幸弘、石丸直澄、東 雅之
2. 発表標題 シェーグレン症候群唾液腺におけるJAK1およびJAK2の発現解析
3. 学会等名 第66回日本口腔外科学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 青田桂子、山ノ井朋子、可児耕一、東 雅之
2. 発表標題 JAK阻害薬バリシチニブは唾液腺細胞のIFN-誘導性CXCL10を抑制する
3. 学会等名 第65回日本口腔外科学会・学術集会
4. 発表年 2020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

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