

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K19165

研究課題名(和文)カテプシンKに注目した口腔扁平苔癬の上皮-樹状細胞ネットワーク機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of epithelial-dendritic cell network mechanism in oral lichen planus focusing on Cathepsin K

研究代表者

山内 昌樹 (Yamauchi, Masaki)

九州大学・歯学研究院・共同研究員

研究者番号：60805282

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)：ヒトPBMCからpDCを抽出し、(pDCのみ)、(pDC+TLR9アゴニスト)、(+CTSK)、(+CTSK阻害薬)でそれぞれ刺激、培養し、Th17関連サイトカイン産生量を比較すると、(+)でそれらの発現が優位に亢進していた。OLP組織からCD45で免疫細胞を抽出しRNA-seqを行ったところ、TLR9はpDCで強い発現を認めた。パスウェイ解析の結果、TLR9+pDCではTh17への分化経路やT細胞の活性化経路が上昇していた。以上より、CTSKがTLR9を介してpDCのTh17関連サイトカイン産生を促進し、Th17への分化が活性化され、OLPの病態形成を促進している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、口腔扁平苔癬(OLP)の病態形成における上皮-樹状細胞ネットワーク機構を解明することで、最終的には新規標的分子治療の確立を目指すものである。

臨床的にはOLPは局所へのステロイド塗布が第一選択薬であるが、ステロイドに対し抵抗性を持つ症例や再発する症例も少なくない。そのため、OLPの発症・病態進展の抑制が重要であり、ステロイドに代わる新たな治療が望まれている。本研究で期待できる成果は、OLP病変局所の粘膜上皮や間質がそれぞれ特異的に発現している新規関連分子を解析することで、それらを標的とする新規標分子治療へ展開できる可能性があり、極めて有意義な研究である。

研究成果の概要(英文)：pDCs were extracted from human PBMCs, stimulated with (1) (pDC only), (2) (pDC + TLR9 agonist), (3) ((2) + CTSK), and (4) ((3) + CTSK inhibitor) and cultured. Comparing the amount of Th17-related cytokine production, their expression was predominantly enhanced in (3). When immune cells were extracted from OLP tissue by CD45 and RNA-seq was performed, TLR9 was strongly expressed in pDC. Pathway analysis revealed that the TLR9+ pDCs had elevated Th17 differentiation pathways and T cell activation pathways. These results suggest that CTSK promotes TLR9-mediated production of Th17-related cytokines in pDCs, activates Th17 differentiation, and promotes pathogenesis of OLP.

研究分野：口腔外科学

キーワード：口腔扁平苔癬 カテプシンK TLR9 Th17 樹状細胞

### 1. 研究開始当初の背景

OLP は初期口腔癌への悪性転化が認められるため、その発症・病態進展の抑制が重要である。われわれは OLP の病態進展において、Th1/2 バランスと樹状細胞の関与に着目し、その病態進展には上皮由来の胸腺間質性リンパ球新生因子 (TSLP) が関与していることを明らかにした。そこで本研究では、先行実験で上皮からの発現亢進を認めたカテプシン K に注目し、OLP における上皮-樹状細胞間のネットワーク機構の解明を目的に、病変上皮を選択的に抽出し、DNA マイクロアレイにて疾患関連分子を同定する。最終的にはそれらの分子を標的とした治療戦略の確立を目指す。

### 2. 研究の目的

本研究では、口腔扁平苔癬(OLP)に関連する分子を laser microdissection(LMD)法と DNA マイクロアレイを用いて抽出し、さらに TissueFAXS などを用いて、OLP の病態形成における上皮-樹状細胞ネットワーク機構を解明することで、最終的には新規標的分子治療の確立を目指すものである。臨床的には OLP は局所へのステロイド塗布が第一選択薬であるが、ステロイドに対し抵抗性を持つ症例やステロイドが奏功しても中断すると再発する症例も少なくない。そのため、OLP の発症・病態進展の抑制が重要であり、ステロイドに代わる新たな治療が望まれている。本研究で期待できる成果は、OLP 病変局所の粘膜上皮や間質がそれぞれ特異的に発現している新規関連分子を解析することで、それらを標的とする新規標分子治療へ展開できる可能性があり、極めて有意義な研究である。

### 3. 研究の方法

本研究の目的は、DNA マイクロアレイにより抽出した OLP 関連分子をもとに、OLP の病態形成における上皮-樹状細胞ネットワーク機構を解明することで、最終的には新規標的分子治療の確立を目指す。本年度は以下の研究を行う予定である。

1. OLP の病変上皮における疾患関連分子の同定 (LMD 法 □ DNA マイクロアレイ □ validation) 一般に、ヒトの組織で DNA マイクロアレイを行う際、遺伝子の個体差が大きい。そのため、患者・健常者間で遺伝子発現を正確に比較することは困難である。そこで本研究の先行実験として、OLP 患者(3例)の生検材料から病変上皮と正常上皮(同一症例)を LMD 法にて採取し、この2つの組織を DNA マイクロアレイにて比較検討を行った。その結果、3例とも発現上昇を認めた遺伝子のうち、Th 細胞の活性化に関わる分子として「カテプシン K」が抽出された。カテプシン K はシステインプロテアーゼの1つで、破骨細胞から産生され、1型コラーゲンの分解(つまり骨吸収)を促進することが知られている。しかし近年、カテプシン K は破骨細胞以外の上皮細胞、樹状細胞、マクロファージにも発現しており、Th17 誘導型の炎症にも関与していることが示唆されている。現在、その発現・局在を検索しているが、OLP 病変局所のみならず上皮内および基底膜直下の浸潤炎症細胞層にカテプシン K の発現を認めた。そこで本研究では、このカテプシン K に注目して、症例数をさらに増やして、OLP の病変局所における発現と局在および臨床所見(悪性化の頻度や病型)との関連について、最新の機器である TissueFAXS(定量化)を用いて検討を行う予定である(validation)。

### 4. 研究成果

LMD 法により OLP 病変上皮を選択的に抽出し、DNA マイクロアレイによる疾患関連分子の網羅的解析を行った。それにより発現上昇を認めた遺伝子(76 遺伝子)のうち、Th 細胞活性化に関連する分子として「カテプシン K(CTSK)」を見いだした。これまでの研究で、CTSK は、OLP 病変局所では粘膜上皮内と上皮直下の浸潤炎症細胞にて強い発現を認めたが、他の類似粘膜疾患(過角化症、上皮性異形成)では上皮直下の浸潤炎症細胞にのみ僅かな発現を認めることが明らかとなった。また、CTSK は pDC 細胞膜上にある TLR9 を標的分子としているため、TLR9 についても検索を行ったところ、OLP の病変部で強い発現を認め、OLP の病変部では、TLR9 の主な発現細胞は pDC であることが明らかとなった。また、TLR9 は CTSK を認識して IL-6 や IL-23 を産生し Th17 細胞を活性化するため、ヒト

PBMC から pDC を抽出し、pDC のみ、pDC+TLR9 アゴニスト、pDC+TLR9 アゴニスト+CTSK、pDC+TLR9 アゴニスト +CTSK+CTSK 阻害薬でそれぞれ刺激、培養し、Th17 関連サイトカイン(IL-6,IL-17,TGF- $\beta$ )の産生量を比較した。その結果、他の群と比較して pDC+TLR9 アゴニスト+CTSK で優位にそれらの発現が亢進していた。また、OLP 患者の組織から CD45 で免疫細胞を抽出し RNA-seq を行ったところ、TLR9 は pDC で強い発現を認めた。さらに、パスウェイ解析を行ったところ、TLR9+pDC では、Th17 への分化の経路や T 細胞の活性化の経路が上がってきていた。これらの結果より CTSK は TLR9 を介して pDC の Th17 関連サイトカインの産生を促進し、それによって Th0 の Th17 への文化を活性化され、OLP の病態形成を促進している可能性があることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 森山 雅文
2. 発表標題 口腔扁平苔癬の病態形成に関わるヘルパー T細胞と活性化機構
3. 学会等名 第30回日本口腔内科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮原 佑佳
2. 発表標題 OLP上皮由来カテプシンKは形質様樹状細胞によるTh17免疫応答を促進する
3. 学会等名 第67回公益社団法人 日本口腔外科学会総会
4. 発表年 2022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
---------	---------