

令和 6 年 5 月 22 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08320

研究課題名(和文) 全身性強皮症におけるTLR7およびTLR9の役割についての解析

研究課題名(英文) Analysis of the role of TLR7 and TLR9 in systemic sclerosis

研究代表者

小林 忠弘 (Kobayashi, Tadahiro)

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号：20746383

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではToll-like receptor (TLR) 7欠損マウスおよびTLR9欠損マウスのブレオマイシン誘発強皮症モデルを用いて、全身性強皮症におけるTLR7およびTLR9の役割を検討した。TLR7欠損マウスでは肺の線維化が軽減し、TLR9欠損マウスでは皮膚の線維化が増悪したことから、TLR7は全身性強皮症の肺病変形成に促進的に関与し、TLR9は全身性強皮症の皮膚病変形成に抑制的に関与していることが示された。また、全身性強皮症の病態においては形質細胞様樹状細胞の増殖にTLR7が促進的に関与し、M1マクロファージの増殖にはTLR7が抑制的に関与していることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によってTLR7は全身性強皮症の肺病変の形成に促進的に関与している可能性が示された。すなわち、TLR7を抑制する薬剤(TLR7阻害薬)を全身性強皮症患者に投与することで、全身性強皮症による肺病変を改善できる可能性がある。本研究を基盤として、今後のさらなる研究としてTLR7阻害薬をブレオマイシン誘発強皮症モデルマウスに投与することで肺や皮膚の線維化病変が改善するかを評価する必要性が見出された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the role of TLR7 and TLR9 in systemic sclerosis using bleomycin-induced scleroderma models in Toll-like receptor (TLR) 7-deficient and TLR9-deficient mice. Lung fibrosis was reduced in TLR7-deficient mice, and skin fibrosis was exacerbated in TLR9-deficient mice. These results indicate that TLR7 is involved in promoting the formation of lung lesions in systemic sclerosis, and TLR9 is involved in suppressing the formation of skin lesions in systemic sclerosis. Splenocytes from TLR7-deficient mice had a decreased proportion of plasmacytoid dendritic cells (pDCs) and an increased proportion of M1 macrophages. These results indicate that TLR7 is involved in promoting pDC proliferation and inhibiting M1 macrophage proliferation in the pathology of systemic scleroderma.

研究分野：自己免疫疾患

キーワード：全身性強皮症 プレオマイシン誘発強皮症モデル Toll-like receptor 7 Toll-like receptor 9

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

全身性強皮症は皮膚および内臓諸臓器の障害と線維化を特徴とする自己免疫疾患であり、皮膚硬化に加えて消化管の線維化による逆流性食道炎や消化管通過障害、肺の線維化による間質性肺炎、脈管の線維化による肺高血圧症といった様々な病態をきたす。その治療はステロイドおよび免疫抑制剤の全身投与や対症療法が主体であり、根本的な治療法は確立されていない。これまでの研究により、その病態として免疫担当細胞、血管内皮細胞、線維芽細胞が複雑に相互作用することで線維芽細胞が活性化され膠原線維が過剰に産生されると考えられており、その過程で Th2/Th17 サイトカイン (IL-4、IL-6、IL-13、IL-17) が重要であることが示されている。近年、自然免疫に重要な役割を有する Toll-like receptor (TLR) も全身性強皮症の病態に関連していることが示されている。TLR はヒトでは 10 種類が同定されており (TLR1 ~ TLR10)、マウスでは 12 種類が同定されている (TLR1 ~ TLR9、TLR11 ~ TLR13)。これらはマクロファージ・樹状細胞・NK 細胞といった自然免疫の担当細胞のみならず、獲得免疫の担当細胞である T 細胞および B 細胞、ひいては線維芽細胞・血管内皮細胞・血小板にも発現している。全身性強皮症患者の末梢血単核細胞では TLR7 の発現が亢進しており、指尖潰瘍との相関関係が認められている。さらに全身性強皮症患者の T 細胞および B 細胞では TLR9 の発現も亢進しており、こちらは皮膚の線維化との相関関係が認めら

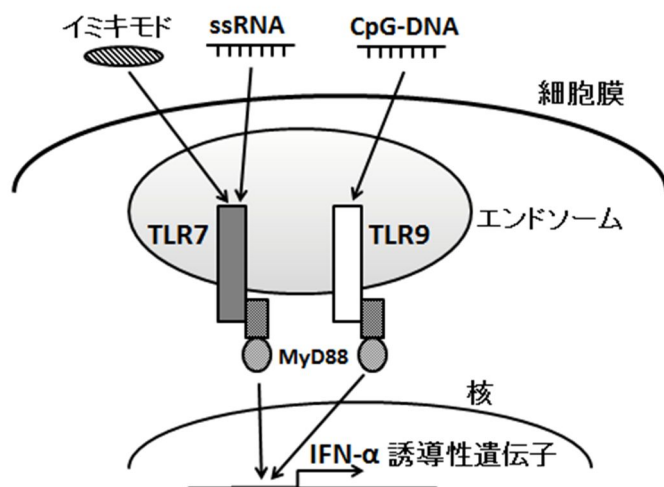


図 1 : TLR7 および TLR9 を介する IFN- α の産生

イミキモドは樹状細胞やマクロファージの TLR7 に結合することで IFN- α や TNF- α といった炎症性サイトカインの産生を促進させる。さらに TLR7 はウイルスの一本鎖 RNA (single-stranded RNA : ssRNA) も認識することが示されている。TLR9 のリガンドは非メチル化シトシングアニンヌクレオチド (CpG) -DNA であり、細菌やウイルスのゲノム DNA に特徴的な配列として知られる。DNA ウイルスである herpes simplex virus-2 (HSV-2) は TLR9 を介して形質細胞様樹状細胞 (plasmacytoid dendritic cell : pDC) を刺激し IFN- α 産生を誘導することが示されている。このようなメカニズムから、自己免疫性疾患では DNA もしくは RNA を含む免疫複合体が TLR7 および TLR9 のリガンドとして IFN- α の産生に関与すると考えられており、全身性強皮症の疾患特異抗体である抗トポイソメラーゼ抗体は RNA との免疫複合体を形成し、抗セントロメア抗体は DNA との免疫複合体を形成することで TLR7 および TLR9 のリガンドとして機能すると推測されている。

2. 研究の目的

全身性強皮症モデルであるブレオマイン誘発強皮症マウスを用いて、全身性強皮症における TLR7 および TLR9 の役割を解析する。

ている。このように全身性強皮症と TLR7 および TLR9 には密接な関連性が確認されているが、TLR7 および TLR9 が全身性強皮症の病態においてどのような役割を有しているのかは解明されていない。TLR7 および TLR9 は細胞内のエンドソーム膜に発現しており、細胞内に取り込まれたリガンドを認識することで IFN- α の産生に関与している (図 1)。TLR7 のリガンドとして抗ウイルス活性や抗腫瘍効果を有する合成化合物であるイミダゾキノリン誘導体 (イミキモド) が知られており、

3. 研究の方法

(1) プレオマイシン誘発強皮症モデルマウスについて

8-10週齢の野生型マウス (Balb/c) Toll-like receptor (TLR)7 欠損マウス、TLR9 欠損マウスの背部皮下にそれぞれプレオマイシン溶液 (1mg/mL) 300 μ L を 4 週間、隔日で皮下注射した。その後にマウスの皮膚・肺組織・脾臓を採取した。

(2) 皮膚の線維化について

プレオマイシン誘発強皮症モデルマウスから採取した皮膚を用いて、Hematoxylin-Eosin 染色、Masson Trichrome 染色、免疫組織染色にて線維化の程度や浸潤細胞数を評価した。

(3) 肺の線維化について

プレオマイシン誘発強皮症モデルマウスから採取した肺組織を用いて、Hematoxylin-Eosin 染色、Masson Trichrome 染色、免疫組織染色にて線維化の程度を評価した。評価方法については Ashcroft Score を用いた。

(4) 脾臓細胞のフローサイトメトリーについて

プレオマイシン誘発強皮症モデルマウスから脾臓を採取し、脾臓細胞を single-cell suspension としたうえで形質細胞様樹状細胞 (plasmacytoid dendritic cell : pDC) (CD11c⁺B220⁺PDCA-1⁺)、M1 マクロファージ (CD11b⁺F4/80⁺CD86⁺)、M2 マクロファージ (CD11b⁺F4/80⁺CD206⁺) の割合についてそれぞれ解析した。

(5) 統計学的解析について

すべてのデータは平均 \pm 標準誤差 (SEM) で示した。2 群間の比較では t 検定を用い、3 群間以上の比較では多重比較検定 (ANOVA) を用いて評価した。

4. 研究成果

(1) 皮膚の病理組織について

プレオマイシン誘発強皮症モデルマウスの皮膚組織を Hematoxylin-Eosin 染色および免疫染色 (α -SMA) にて検討した。この結果、皮膚の厚さに関しては野生型マウスと TLR7 欠損マウスの間に有意差はなかったが、TLR9 欠損マウスでは野生型マウスに比べて厚くなっていた。免疫染色では、TLR9 欠損マウスにおいて単位面積あたりに存在する α -SMA 陽性細胞が TLR7 欠損マウスに比べて増加していた (図 2)。

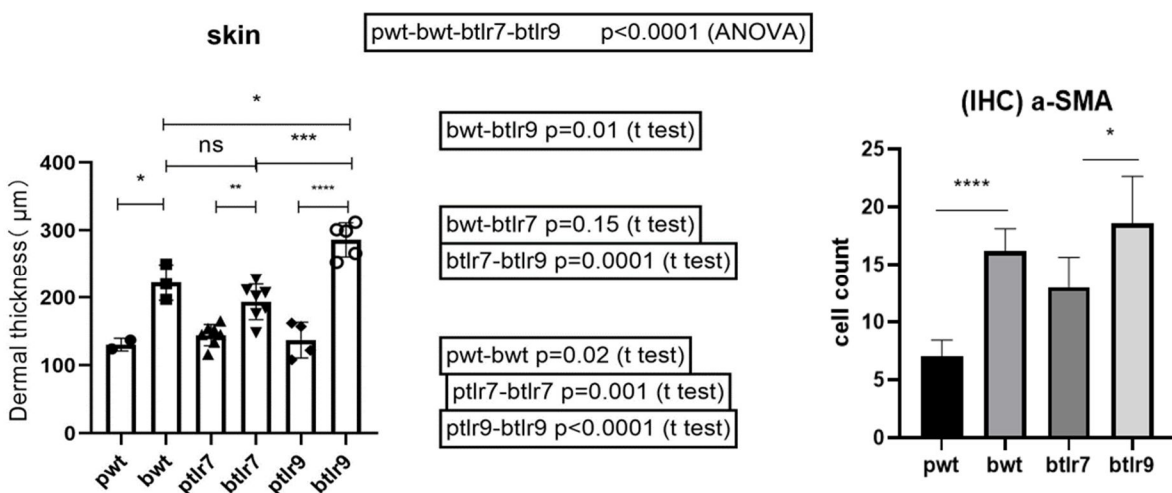


図 2: プレオマイシン誘発強皮症モデルマウスにおける皮膚の厚さ (左) および単位面積あたりにける α -SMA 陽性細胞数 (右)

(2) 肺の病理組織について

プレオマイシン誘発強皮症モデルマウスの肺組織を Hematoxylin-Eosin 染色およびマッソントリクローム染色にて検討し、Ashcroft Score にて評価した。その結果、野生型マウスと TLR9 欠損マウスに有意差はなかったが、TLR7 欠損マウスでは野生型マウスに比べて有意に線維化の程度が軽度であった（図 3）。

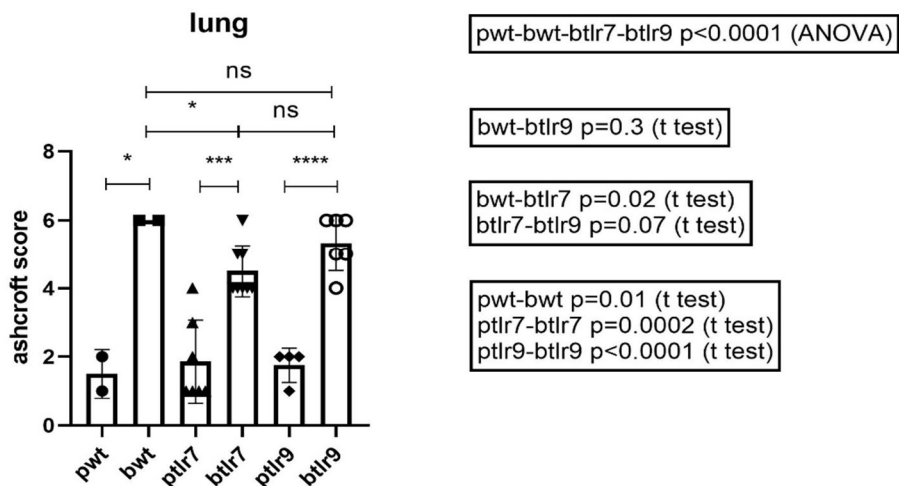


図 3：プレオマイシン誘発強皮症モデルマウスにおける肺の線維化（Ashcroft Score にて評価）

(3) 脾臓における制御性 T 細胞および Th17 細胞について

フローサイトメトリーで脾臓における制御性 T 細胞 ($CD4^+CD25^+FoxP3^+$) および Th17 細胞 ($ROR\ \gamma^+IL23R^+CD4^+$) について解析した。この結果、野生型マウス・TLR7 欠損マウス・TLR9 欠損マウスの 3 群間ではいずれにおいても有意差は認めなかった（図 4、5）。

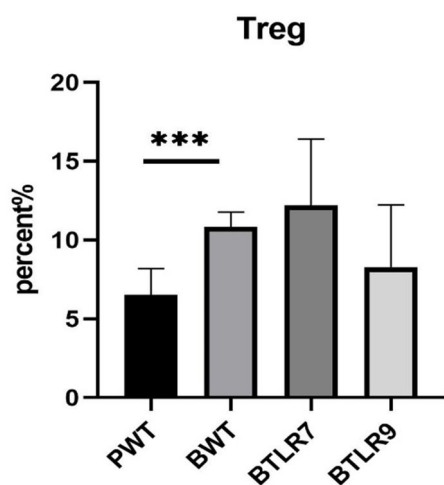


図 4：プレオマイシン誘発強皮症モデルマウスの脾臓における制御性 T 細胞 ($CD4^+CD25^+FoxP3^+$) の割合

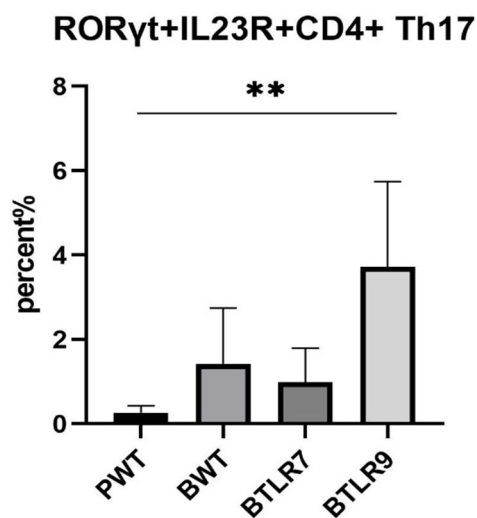


図 5：プレオマイシン誘発強皮症モデルマウスの脾臓における Th17 細胞 ($ROR\ \gamma^+IL23R^+CD4^+$) の割合

(4) 皮膚における樹状細胞および脾臓における形質細胞様樹状細胞 (plasmacytoid dendritic cell : pDC) について

プレオマイシン誘発強皮症モデルマウスの皮膚を免疫組織化学染色 ($CD11c$) で評価したところ、TLR7 欠損マウスでは野生型マウスおよび TLR9 欠損マウスに比べて $CD11c$ 陽性樹状細胞数が減少していた。野生型マウスと TLR9 欠損マウスでは、 $CD11c$ 陽性樹状細胞数に有意差は認めなかった（図 6）。脾臓細胞をフローサイトメトリーで評価したところ、TLR7 欠損マウスでは野生型マウスに比べて pDC ($CD11c^+B220^+PDCA-1^+$) の割合が低下していた。TLR9 欠損マウスにおいては野生型マウスおよび TLR7 欠損マウスに比べて pDC の割合に有意差は

認めなかった(図7)。

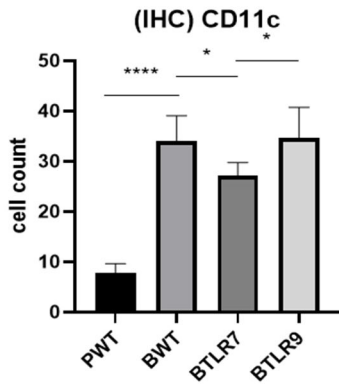


図6: プレオマイシン誘発強皮症モデルマウスの皮膚における CD11c 陽性細胞数

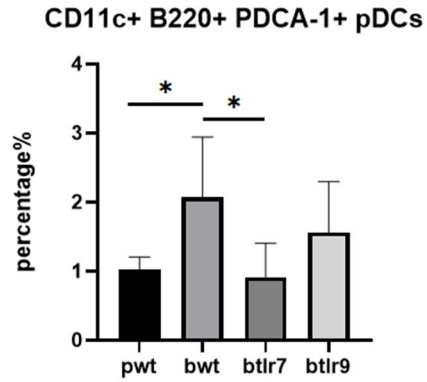


図7: プレオマイシン誘発強皮症モデルマウスの脾臓における pDC (CD11c+B220+PDCA-1+) の割合

(5) 脾臓における M1 および M2 マクロファージについて

脾臓細胞をフローサイトメトリーで評価したところ、TLR7 欠損マウスでは野生型マウスおよび TLR9 欠損マウスに比べて M1 マクロファージ (CD11b⁺F4/80⁺CD86⁺) の割合が増加していた。野生型マウスと TLR9 欠損マウスには M1 マクロファージの割合に有意差は認めなかった(図8)。M2 マクロファージ (CD11b⁺F4/80⁺CD206⁺) に関しては、TLR9 欠損マウスにおいて TLR7 欠損マウスと比べて割合が増加していた。野生型マウスと TLR7 欠損マウスでは M2 マクロファージの割合に有意差は認めなかった(図9)。

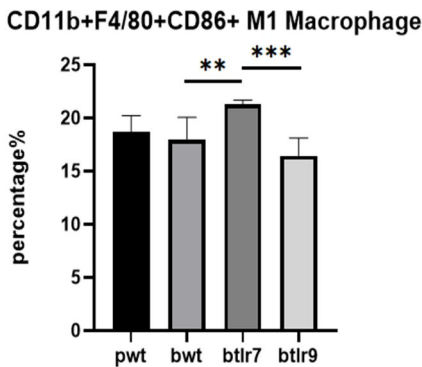


図8: プレオマイシン誘発強皮症モデルマウスの脾臓における M1 マクロファージの割合

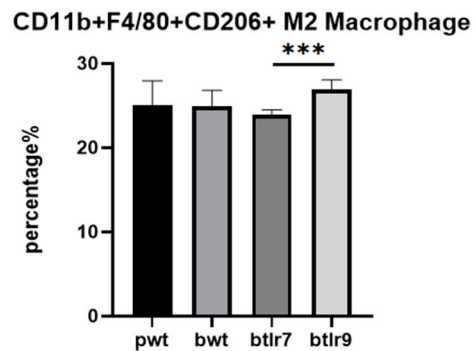


図9: プレオマイシン誘発強皮症モデルマウスの脾臓における M2 マクロファージの割合

(5) まとめ

プレオマイシン誘発強皮症モデルにおいて、TLR7 欠損マウスでは野生型マウスに比べて肺の線維化が軽減し(図3)、TLR9 欠損マウスでは野生型マウスに比べて皮膚の線維化が増悪したことから(図2)、TLR7 は全身性強皮症の肺病変形成について促進的に関与しており、TLR9 は全身性強皮症の皮膚病変形成について抑制的に関与している可能性が示された。プレオマイシンを投与した TLR7 欠損マウスおよび TLR9 欠損マウスの脾臓では、野生型マウスと比較して制御性 T 細胞および Th17 細胞のポピュレーションに変化がなかったことから(図4、5)、全身性強皮症の病態に関して TLR7 および TLR9 とこれらの細胞には関連性が低いことが示された。プレオマイシンを投与した TLR7 欠損マウスの脾臓では、pDC が野生型マウスと比べて減少し(図7)、M1 マクロファージが増加していたことから(図8)、全身性強皮症の病態において pDC の増殖に TLR7 が促進的に関与しており、M1 マクロファージの増殖には抑制的に関与していることが示された。

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

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