

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08475

研究課題名（和文）自己免疫疾患におけるホスホリパーゼD4の臨床応用の探索

研究課題名（英文）Investigation for clinical application of phospholipase D4 in autoimmune diseases

研究代表者

秋月 修治（Akizuki, Shuji）

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：50626637

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,700,000円

研究成果の概要（和文）：ホスホリパーゼD4（PLD4）は関節リウマチなどの疾患感受性遺伝子であり、エキソヌクレアーゼとして細胞内でTLR7、TLR9経路を抑制する。他方で、ヒト血漿中に細胞外PLD4が高濃度に存在する可能性が示唆されている。本研究で可溶性PLD4の定量を試みたが、抗ヒトPLD4抗体が哺乳類細胞由来PLD4を認識しないことが分かった。そこで、HEK293T細胞を用いたウェスタンブロットで抗体の反応性を確認し、可溶性PLD4を作成しELISAの陽性対照としたが、ELISAでは反応が確認できなかった。引き続き、抗体種を変更してELISA系樹立を試み、免疫疾患のバイオマーカーとしての可能性を追究している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

関節リウマチ、全身性エリテマトーデスを含む膠原病性疾患の病態は依然として未知が多い。本研究課題は膠原病性疾患の遺伝的原因を起点とし、同定された新規の疾患感受性遺伝子の1つであり、DNA/RNAヌクレアーゼであるホスホリパーゼD4に着目し、疾患の原因から臨床応用への展開を目的とした。核酸代謝障害はこれら疾患の病態形成の上流を形成すると考えられているが、バイオマーカー、治療標的としては未確立である。本研究課題を通じ、核酸代謝を標的とした臨床応用の基盤となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Phospholipase D4 (PLD4) is a susceptibility gene for diseases such as rheumatoid arthritis and functions as an exonuclease that suppresses the TLR7 and TLR9 pathways intracellularly. On the other hand, extracellular PLD4 is present at high concentrations in human plasma, suggesting that abnormalities in extracellular nucleic acid metabolism may contribute to autoimmune diseases. In 2022, an attempt was made to quantify soluble PLD4 using ELISA, but it was found that the anti-human PLD4 antibody did not recognize PLD4 derived from mammalian cells. Therefore, the antibody's reactivity was confirmed using a Western blot with HEK293T cells, and soluble PLD4 was created as a positive control for ELISA, but no reaction was detected in the ELISA. Continuing efforts are being made to establish a quantification system for soluble PLD4 by changing the antibody type, exploring its potential as a biomarker for autoimmune diseases.

研究分野：臨床免疫学

キーワード：ホスホリパーゼD4 全身性自己免疫疾患

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膠原病は発病原因や病態過程が依然として未解明であり、根治法のない慢性疾患である。本研究課題は膠原病のゲノム研究(GWAS)を起点とし、同定された疾患原因遺伝子の中で機能未知のホスホリパーゼ D4 (PLD4) に着目した。PLD4 は申請者の所属する研究室が全身性エリテマトーデス、関節リウマチ、全身性強皮症の遺伝要因であることを報告している。また PLD4 のナンセンス変異マウスの解析から、PLD4 がヒト、マウスの生物種を超え自己免疫疾患の発病に関与することを示した。近年、PLD4 が DNA および RNA 分解活性を有するヌクレアーゼであることが報告され、ツール様受容体 9 (TLR9) のシグナルを負に制御することが示されている。本研究課題では自己免疫疾患における PLD4 の機能意義を追究し、臨床応用への展開を目的とした。

2. 研究の目的

A. 血漿中遊離型 PLD4 の定量

PLD4 は細胞膜貫通領域を有し、細胞膜、エンドソームに局在する。他方で予備検討では他の PLD ファミリー(PLD1, 2, 5, 6)と異なり血漿中に細胞外 PLD4 の存在が示唆される。また、PLD4 とホモロジーの高い PLD3 はカテプシンで切断され遊離型として存在することが既知である。これらの知見は膜型 PLD4 が切断され可溶型 PLD4 を遊離する可能性を示唆する。本研究項目では血漿中遊離型 PLD4 を定量し、自己免疫疾患患者の疾患バイオマーカーとして応用を目的とした。

B. 患者末梢血の免疫担当細胞における PLD4 発現プロファイルの計測

PLD4 の発現プロファイルや機能をヒトの免疫担当細胞で検討した報告はない。申請者の予備検討では、PLD4 のトランスクリプトはヒト B 細胞、マクロファージ、樹状細胞に偏在し、T 細胞で発現がみられなかった。本項目では、健常者、膠原病患者の末梢血単核球における PLD4 の発現様式を検討した。更に患者の各種免疫担当細胞における発現様式と臨床像を比較し、疾患診断や病勢指標への応用の可能性を目的とした。

3. 研究の方法

A. 血漿中遊離型 PLD4 の定量

はじめに ELISA 系で用いる抗 PLD4 ポリクローナル抗体の適正を確認するため、大腸菌および哺乳細胞 (HEK293) 発現系で作出したリコンビナント PLD4 を用いてウェスタンブロット法により抗体の抗原特異性を確認した。次に ELISA プレートに抗 PLD4 ポリクローナル抗体を固相化し、大腸菌および哺乳細胞 (HEK293) 発現系で作出したリコンビナント PLD4 を陽性対照としてサンドイッチ ELISA 系の樹立を試みた。

B. 患者末梢血の免疫担当細胞における PLD4 発現プロファイルの計測

健常者、及び全身性自己免疫疾患患者の末梢血単核球細胞を密度勾配遠心法 (Ficoll) で単離の後、CD3 陽性 T 細胞、CD19 陽性 B 細胞、CD16 陽性単球、CD11c 陽性樹状細胞をセルソーター (BD FACSMelody™) で分取し、各細胞亜分画における PLD4 のトランスクリプトを定量 PCR 法 (SYBR Green) により計測した。

4. 研究成果

A. 血漿中遊離型 PLD4 の定量

抗 PLD4 ポリクローナル抗体はウェスタンブロット法でリコンビナント PLD4 を特異的に検出した。同抗体を ELISA プレートに固相化し、はじめに大腸菌発現系で作出したリコンビナント PLD4 を標準とした結果、定量的に計測された。他方でヒト血漿検体では段階希釈法で定量性が確認されなかった。原因とし、使用した抗ヒト PLD4 抗体が哺乳類細胞由来 PLD4 を認識しない可能性を挙げた。そのため、PLD4 を遺伝子導入した HEK293T の細胞溶解液を用いウェスタンブロットを実施の結果、抗ヒト PLD4 抗体と哺乳動物細胞発現 PLD4 に反応性が確認された。そこで、使用した抗体が 3 次構造を保持する PLD4 を検出しうるか検証するため、膜貫通領域を欠損した可溶型ヒト PLD4 (sPLD4) を HEK293T を用いて作出し ELISA 系の陽性対照とした。結果、ウェスタンブロット法で抗ヒト PLD4 ポリクローナル抗体で作出した sPLD4 を認識することが確認された一方で、ELISA 系では確認されなかった。そのため、ELISA 系の用いた抗体がネーティブフォーム PLD4 と反応性を有しないと判断した。現在、ELISA 系で用いる抗体を変更し、引き続き遊離型 PLD4 の定量系樹立に向けて検討を継続中である。

B. 患者末梢血の免疫担当細胞における PLD4 発現プロファイルの計測

健常者、及び全身性自己免疫疾患患者の末梢血単核球細胞において、PLD4 のトランスクリプトは B 細胞、単球、樹状細胞で高発現する一方で、T 細胞では検出感度以下であった。また、健常者、及び全身性自己免疫疾患患者の比較において各細胞集団における PLD4 トランス

クリプトの発現量については両群間に有意な差異は確認されなかった。従って、PLD4 は疾患の有無で細胞内発現に量的差異がみられないと考えられた。今後、疾患によるタンパク発現量や細胞内分布やヌクレアーゼとしての機能的差異について検討を継続する。

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