

令和 5 年 6 月 24 日現在

機関番号：17301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20905

研究課題名(和文) T細胞Secretome解析を用いた全身性エリテマトーデスの病態制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the pathogenic mechanisms of Systemic Lupus Erythematosus using T cell Secretome analysis

研究代表者

梅田 雅孝 (Umeda, Masataka)

長崎大学・病院(医学系)・助教

研究者番号：20750053

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は自己免疫疾患である全身性エリテマトーデス(SLE)患者T細胞に特異的に認められる細胞表面および細胞外蛋白の環境変化を新たに確立したSecretome解析を用いて網羅的に解析することである。Secretome解析においてはSPECS法で分離した蛋白をLC-MS/MSで解析することで、培養中に新規にT細胞より生成・分泌された蛋白のみを網羅的に解析可能とする。活動性SLE患者4名及び健常者4名(性別・年齢マッチ)のCD4+T細胞を分離培養し、培養上清中のSecretome解析を完遂し、蛋白質ライブラリーの作成に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回作成した蛋白質ライブラリーより健常者およびSLE患者の試料間差異成分の同定に成功している。今後これらの蛋白に関してELISAなどにより培養上清における発現検証を行う。検出された蛋白に関する機能解析を行うことで、これまで発見されていないSLEにおける新規治療ターゲットを解明することが可能と考えられる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to comprehensively analyze the environmental changes of cell surface and extracellular proteins that are specifically observed in T cells from patients with systemic lupus erythematosus (SLE), an autoimmune disease, using the newly established Secretome analysis. The secretome analysis is a method to comprehensively analyze only the proteins newly generated and secreted from T cells in culture by analyzing the proteins isolated by the SPECS method using LC-MS/MS. CD4+ T cells from 4 patients with active SLE and 4 healthy subjects (sex- and age-matched) were isolated and cultured, and secretome analysis of the culture supernatants was completed to create a protein library.

研究分野：リウマチ・膠原病内科学分野

キーワード：全身性エリテマトーデス T細胞

1. 研究開始当初の背景

我々のこれまでの研究では CD52^{low}CD4⁺ T 細胞が SLE 患者末梢血で増加し臨床的重症度に関与していることや (Clin Immunol. 2018 Feb;187:50-57. 筆頭著者: 研究代表者梅田) T 細胞に発現している a disintegrin and metalloproteinase (ADAM)9 が TGF- β 1 の活性化に関与することで Th17 細胞分化を促進し自己免疫疾患の病態形成に関与すること (PNAS. 2021. In press. 筆頭著者: 研究代表者梅田) を報告しており、T 細胞表面および周囲の環境を調整する因子が SLE 病態形成に担う役割の重要性を解明してきた。これら T 細胞表面および周囲の環境を調整する因子は Epigenetics な要素であり、近年発展を遂げている genomics や transcriptomics の手法を用いても十分に理解することは困難である。そこで我々は細胞表面や周囲の環境変化を検出する手法として用いられる新規の Secretome 解析を用いることで、これまで発見されていない SLE における新規治療ターゲットを解明することが可能と考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は(1)SLE 患者 T 細胞に特異的に認められる細胞表面および細胞外蛋白の環境変化を新たに確立した Secretome 解析を用いて網羅的に解析すること、及び、(2)これら新規に同定された蛋白の役割もしくは同蛋白を分解や切断する因子を同定することで新たな SLE 病態制御機構を明らかにすることとしている。

本研究は Secretome の SLE における特異的な異常を検出することで、まだ知られていない T 細胞機能の制御機構の解明を目指している。これらが明らかになれば、SLE の新たな病態制御因子の発見ならびにそれをういた治療法に繋がる。よって、本研究は既存の検査・治療法では解決できない SLE 診療の諸問題に多大な利益をもたらす可能性を秘めていると考えられる。

3. 研究の方法

本研究では、T 細胞表面より切断および分泌される蛋白を解析するために SPECS (Secretome protein enrichment with click sugars) という方法を用いる (EMBO J. 2012 Jun 22;31(14):3157-68.)。既存の Secretome 解析では培養液に使用する FBS に大量に含まれる蛋白が LC-MS/MS (液体クロマトグラフ質量分析計) を行う際のバックグラウンドノイズとして検出され精度が低下することが問題であった。SPECS 法では、糖アナログである ManNAz を細胞培養に加えることで新規に合成された蛋白が糖鎖蛋白として修飾される。この ManNAz 含有の糖鎖を化学反応でビオチン化した後に、ストレプトアビジン-ビオチン結合を利用して、培養液中に新規に生成された蛋白のみを分離する。これら SPECS 法で分離した蛋白を LC-MS/MS で解析することで、培養中に新規に T 細胞より生成・分泌された蛋白のみを網羅的に定量評価することが可能となる。申請者は primary CD4⁺T 細胞を解析するための SPECS 法のプロトコルを予備実験で確立している。

性別・年齢・人種が同じ SLE 患者および健康人のペアから採取した末梢血より磁気ビーズで CD4⁺T 細胞を分離、ManNAz を添加した上で、抗 CD3/CD28 抗体で刺激を加え培養する。培養上清中の分泌蛋白を上記 SPECS 法で分離し解析を行う。

上記方法により SLE 患者において CD4⁺T 細胞からの分泌が増加もしくは低下している蛋白を同定する。これらの蛋白のうち、SLE の病態に関与することが報告されている既知の分子を除いたものをリスト化する。これらの分子の培養上清中の濃度を、ELISA や Western blot を用いて、Validation を行う。

上記解析で同定された分子、もしくはその分子を細胞正面から切断するもしくは分泌を促進する分子の T 細胞機能への役割を明らかにする。

CRISPR/Cas9 システムを用いて Primary CD4⁺T 細胞において当該分子をノックダウンさせる、もしくは overexpression vector を用いて強制発現させる。または同分子の recombinant protein を用いた共培養を行う。これらの条件下により CD4⁺T 細胞の分化能の変化 (Th1, Th17, Treg など) やサイトカイン産生能、増殖能、および生存率などの機能変化を評価する。機能に変化があったものに関しては、同条件下での細胞内シグナルや転写因子の変化など、メカニズムの解明も行う。

さらに in vivo における同定された分子の生体内での役割を明らかにするため、自己免疫疾患モデルを用いた解析も行う予定とする。

4. 研究成果

活動性 SLE 患者 4 名及び健常者 4 名（性別・年齢マッチ）の CD4+T 細胞を分離培養し、培養上清中の Secretome 解析を完遂し、蛋白質ライブラリーの作成に成功した。今回作成した蛋白質ライブラリーより健常者および SLE 患者の試料間差異成分の同定に成功している。今後これらの蛋白に関して ELISA などにより培養上清における発現検証を行う。本研究の根幹を成す Secretome 解析に必要な蛋白精製カラムの供給に関して COVID-19 流行下において滞っており物品が到着したのが 2021 年度末となったため、研究の進行が遅れ機能解析までには至っていないが、今後、検出された蛋白に関する機能解析を行うことで、これまで発見されていない SLE における新規治療ターゲットを解明することが可能と考えられる。

また metalloproteinase に関わる研究としてループス腎炎中の腎組織中の α disintegrin and metalloproteinases 9 (ADAM9) の発現や TGF- β 1 の活性化、繊維化への影響に関する研究も並行して行っており、研究期間中に新たにループス腎炎患者由来の尿検体中の ADAM9 濃度が上昇していることを ELISA により解明し、またループス腎炎の尿細管において ADAM9 の発現が亢進していることを解明した。これらの結果は日本リウマチ学会・米国リウマチ学会で口演での発表を行い、Arthritis & Rheumatology に投稿し major revision となっている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Origuchi Tomoki, Umeda Masataka, Koga Tomohiro, Kawashiri Shin-ya, Iwamoto Naoki, Ichinose Kunihiro, Tamai Mami, Tsukada Toshiaki, Miyashita Taiichiro, Iwanaga Nozomi, Horai Yoshiro, Arima Kazuhiko, Aramaki Toshiyuki, Ueki Yukitaka, Eguchi Katsumi, Kawakami Atsushi	4. 巻 2
2. 論文標題 Comparison of complications during 1-year follow-up between remitting seronegative symmetrical synovitis with pitting edema syndrome and elderly-onset rheumatoid arthritis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Immunological Medicine	6. 最初と最後の頁 1~7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/25785826.2022.2046307	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 Hisada Ryo, Yoshida Nobuya, Orite Seo Yeon K., Umeda Masataka, Burbano Catalina, Scherlinger Marc, Kono Michihito, Krishfield Suzanne, Tsokos George C.	4. 巻 7
2. 論文標題 Glutaminase 2 Promotes Interleukin 2 Production in CD4+ T cells by Supporting Antioxidant Defense	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Arthritis & Rheumatology	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/art.42112	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 Tsukamoto Yutaka, Umeda Masataka, Muto Yuko, Sugimoto Takashi, Yamauchi Momoko, Ando Koji, Ariyoshi Koya	4. 巻 26
2. 論文標題 Severe Anemia Due to Cold Agglutinin Syndrome in a COVID-19 Patient with IgM Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance Successfully Treated with Corticosteroids	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Internal Medicine	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) 10.2169/internalmedicine.8647-21	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 Fujita Yuya, Fukui Shoichi, Umeda Masataka, Tsuji Sosuke, Iwamoto Naoki, Nakashima Yoshikazu, Horai Yoshiro, Suzuki Takahisa, Okada Akitomo, Aramaki Toshiyuki, Ueki Yukitaka, Mizokami Akinari, Origuchi Tomoki, Watanabe Hiroshi, Migita Kiyoshi, Kawakami Atsushi	4. 巻 13
2. 論文標題 Clinical Characteristics of Patients With IgG4-Related Disease Complicated by Hypocomplementemia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	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) 10.3389/fimmu.2022.828122	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 Umeda Masataka, Kawano Hiroaki, Endo Yushiro, Takatani Ayuko, Koga Tomohiro, Ichinose Kunihiro, Nakamura Hideki, Mukaino Akihiro, Higuchi Osamu, Nakane Shunya, Maeda Takahiro, Kawakami Atsushi	4. 巻 6
2. 論文標題 Intravenous cyclophosphamide treatment for systemic lupus erythematosus with severe autonomic disorders confirmed by head-up tilt table test: A case series	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Modern Rheumatology Case Reports	6. 最初と最後の頁 47～51
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/mrcr/rxab027	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 Sumiyoshi Remi, Koga Tomohiro, Furukawa Kaori, Umeda Masataka, Yamamoto Kazuko, Mori Ryoichi, Kawakami Atsushi	4. 巻 233
2. 論文標題 A case of tocilizumab-refractory idiopathic multicentric Castlemans disease successfully treated with sirolimus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical Immunology	6. 最初と最後の頁 108887～108887
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.clim.2021.108887	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 Koga Tomohiro, Furukawa Kaori, Migita Kiyoshi, Morimoto Shimpei, Shimizu Toshimasa, Fukui Shoichi, Umeda Masataka, Endo Yushiro, Sumiyoshi Remi, Kawashiri Shin-ya, Iwamoto Naoki, Ichinose Kunihiro, Tamai Mami, Origuchi Tomoki, Maeda Takahiro, Yachie Akihiro, Kawakami Atsushi	4. 巻 23
2. 論文標題 Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and tumor necrosis factor- in combination is a useful diagnostic biomarker to distinguish familial Mediterranean fever from sepsis	5. 発行年 2021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/s13075-021-02644-2	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 Matsumoto Haruki, Fujita Yuya, Matsuoka Naoki, Temmoku Jumpei, Yashiro-Furuya Makiko, Asano Tomoyuki, Sato Shuzo, Watanabe Hiroshi, Suzuki Eiji, Tsuji Sosuke, Fukui Shoichi, Umeda Masataka, Iwamoto Naoki, Kawakami Atsushi, Migita Kiyoshi	4. 巻 23
2. 論文標題 Serum checkpoint molecules in patients with IgG4-related disease (IgG4-RD)	5. 発行年 2021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/s13075-021-02527-6	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 Takatani Ayuko, Nakamura Hideki, Furukawa Kaori, Endo Yushiro, Umeda Masataka, Shimizu Toshimasa, Nishihata Shin ya, Kitaoka Kyoko, Nakamura Tatsufumi, Kawakami Atsushi	4. 巻 9
2. 論文標題 Inhibitory effect of HTLV 1 infection on the production of B cell activating factors in established follicular dendritic cell like cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Immunity, Inflammation and Disease	6. 最初と最後の頁 777 ~ 791
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/iid3.432	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 Umeda Masataka, Yoshida Nobuya, Hisada Ryo, Burbano Catalina, Orite Seo Yeon K., Kono Michihito, Kyttaris Vasileios C., Krishfield Suzanne, Owen Caroline A., Tsokos George C.	4. 巻 118
2. 論文標題 ADAM9 enhances Th17 cell differentiation and autoimmunity by activating TGF- 1	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	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) 10.1073/pnas.2023230118	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2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Masataka Umeda, Abhigyan Satyam, Nobuya Yoshida, Rhea Bhargava, Ryo Hisada, Simin Jamaly, Caroline Owen and George Tsokos
2. 発表標題 Hypoxia Promotes the Expression of ADAM9 by Tubular Epithelial Cells Which Enhances TGF- 1 Activation and Promotes Tissue Fibrosis in Lupus Nephritis
3. 学会等名 American College of Rheumatology Convergence 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 梅田雅孝, George C. Tsokos
2. 発表標題 尿管上皮細胞におけるADAM9はTGF- 1活性化を介してループス腎炎の繊維化に関与する
3. 学会等名 第49回日本臨床免疫学会総会
4. 発表年 2021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			
米国	Harvard Medical School			