

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591084

研究課題名（和文） シェーグレン症候群新規治療薬としてのBAFFシグナル阻害物質の探索

研究課題名（英文） Search for BAFF signaling inhibitors as novel drugs for the treatment of Sjögren's syndrome.

研究代表者

吉本 桂子 (YOSHIMOTO KEIKO)

慶應義塾大学・医学部・研究員

研究者番号：20383292

研究成果の概要（和文）：本研究はシェーグレン症候群（SS）根本的治療を目指した薬剤開発のため、B細胞活性化因子であるBAFFおよびBAFFシグナル分子を標的とした治療薬探索を目的とする。まず薬剤探索用の培養細胞を用いたin vitroモデルを確立した。さらに本モデルを用いてBAFF-BAFF受容体結合により惹起されたBAFFシグナル伝達系を解析することが可能となり、その結果JAK3、IKK α 、IKK β などの因子が単球におけるBAFFシグナルを介したIL-6過剰産生に関与することが明らかになった。これらの結果はSS病態形成における単球の重要性とBAFFシグナル関連分子が新たなSS治療の標的となる可能性を示唆するものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Aiming at development of new disease-modifying drugs for Sjögren's syndrome (SS), we established an in vitro model for the screening of compounds that inhibit signal transduction triggered by a B cell activating factor, BAFF. This model enabled us to analyze BAFF signaling pathway in monocytes that play a role in the development of SS. The results of our research revealed that such molecules as JAK3, IKK α and IKK β were involved in BAFF-induced overproduction of IL-6 by monocytes. These data indicate not only the significance of monocytes in the pathogenesis of SS, but also the possibility that BAFF-signaling pathway is a therapeutic target of drug discovery for SS.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー内科学

キーワード：膠原病学 サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

シェーグレン症候群（以下SS）は難病に指定されている自己免疫疾患の一種である。主な症状は唾液腺や涙腺を代表とする外分泌腺の障害による慢性唾液腺炎や乾燥性角結膜炎、あるいは関節炎、慢性甲状腺炎、間質性肺炎、原発性胆汁性肝硬変症など、多彩な

症状が出現する。このような症状は患者のQOLを著しく害する上、病態形成の機序が未だに不明であり、対症療法は行われているものの根治療は困難であり、その開発が強く求められている。

SS患者の組織において起こる炎症反応の詳細なメカニズムは不明であるが、他の自己免

疫疾患と同様、異常に活性化されたB細胞からの自己抗体産生が主な原因と考えられている。実際、SS患者の血中では抗核抗体、リウマトイド因子、抗SS-A抗体、抗SS-B抗体などの自己抗体が高値である。従ってB細胞から産生される自己抗体などの抗体産生機構を制御できればSSの根治療法の開発につながる可能性がある。

SS組織での炎症反応のメカニズムとして、免疫担当細胞(単球、マクロファージ、T細胞、B細胞)が異常に活性化されており、その活性化機構に、B細胞活性化因子であるBAFF(B cell stimulating factor belonging to TNF superfamily)が強く関与しており、炎症組織におけるBAFFの機能を阻害することが新しい治療法につながるのではないかと考えられる。

2. 研究の目的

本研究はシェーグレン症候群(SS)の根本治療薬開発に向け、B細胞を活性化する因子であるBAFFを標的分子とした新しい治療薬の探索を行うことを目的としている。

3. 研究の方法

(1)BAFF標的分子探索の目的のため、*in vitro*におけるBAFF-BAFF受容体結合モデルを作製し、励起される細胞内シグナル伝達経路の解明とその阻害剤の探索を行う。

具体的には、ヒト単球由来細胞株THP-1、およびSS患者末梢単球のBAFF存在下培養系を用いて、シグナル励起に伴うリン酸化蛋白質の検出を試みる。

(2)SS患者の炎症組織、主に涙腺を対象として、産生亢進されたBAFFが炎症病変を誘導しているという仮説に示す反応が起きているかどうかを検討する。具体的には患者涙腺における炎症部位に浸潤している細胞の同定およびBAFF、BAFFシグナル関連分子発現を免疫染色法を用いて検討する。

4. 研究成果

(1)培養細胞を用いた*in vitro*モデルの確立とその応用

*in vitro*におけるBAFF-BAFF受容体結合モデル確立のため、ヒト単球由来細胞株THP-1を用いてBAFFがBAFF受容体に結合することにより励起されるシグナル解析を試みた。IFN γ により刺激されたTHP-1ではBAFF受容体(BR3)発現が亢進し、このBR3にBAFFが結合することにより、THP-1からのIL-6産生が誘導されることが明らかとなった。この培養系に様々な阻害剤(JNK阻害剤、p38MAPkinase阻害剤、JAK2阻害剤、JAK3阻害剤)を添加し、BAFF誘導型IL-6産生に対する各種阻害剤の影響を検討したところ、JAK3阻害剤に顕著なIL-6産生抑制

作用を有することが明らかとなった。さらにリアルタイムPCRおよびウェスタンブロッティング法を用いて、IFN γ 刺激THP-1細胞にBAFFを作用させた際、JAK3発現誘導およびJAK3リン酸化誘導が認められることを見出し、JAK3がBAFFシグナル経路に関与していることを示唆する結果を得た。BAFF受容体との会合が認められている分子の報告は少なく、確認されれば極めて重要な事象となる。

(2)SS患者単球を用いた標的分子探索

前述の結果を踏まえシェーグレン症候群患者末梢単球にBAFF刺激を加え、IL-6産生が亢進した細胞を用いて、JAK3発現を検討した。その結果、シェーグレン症候群患者末梢単球において無刺激でもJAK3リン酸化が亢進しており、BAFF刺激によりJAK3リン酸化が更に亢進することが明らかとなった。またBAFF刺激による患者末梢単球からのIL-6産生はJAK3阻害剤により強く抑制されることが判明した(図1)。

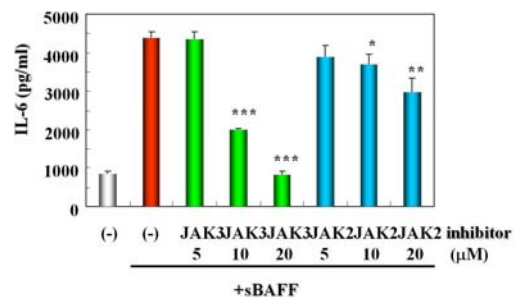


図1: JAK阻害剤による患者末梢単球からのIL-6産生阻害

このような現象が実際に病変組織で起こっているかどうかを検討するため、シェーグレン症候群患者涙腺組織を用いて、BAFFおよびBAFFR発現を免疫組織染色を用いて検討した。その結果、リンパ球浸潤の認められた組織ではBAFF発現はCD4T細胞およびB細胞、CD11c陽性細胞(単球、マクロファージ)に発現しており、BAFF受容体はB細胞およびCD11c陽性細胞に発現していることが判明した。これらの結果より、組織においてもBAFF-BAFFRによるシグナル伝達が起こっている可能性が示唆された。

(3)SS患者単球のBAFFシグナル解析

これまでの結果より、BAFF-BAFFR結合により惹起されるシグナルの病態形成における重要性を証明するため、SS患者末梢単球におけるBR3発現およびBAFFシグナル経路の異常の解析とBR3発現が病態形成に及ぼす影響を検討した。その結果BAFF刺激SS患者末梢単球ではJAK3リン酸化が亢進されることが明らかとなった(図2)。

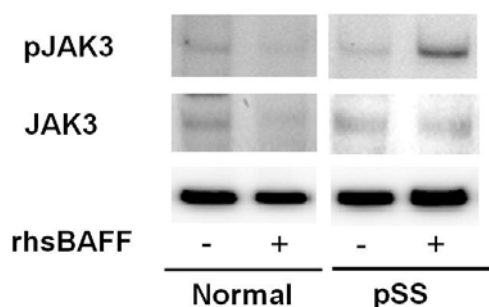


図2: 患者末梢単球での JAK3 のリン酸化亢進

さらに SS 患者末梢単球において IKK α 、IKK β のリン酸化が亢進されていることも明らかとなった。

一方、SS 患者末梢単球における BR3 発現率と単球からの BAFF 誘導型 IL-6 産生量には強い相関があり、また患者血中 IgG 量とも正の相関があることが明らかとなった。これらの結果より、SS 患者末梢単球において BR3 の発現が亢進し、それに BAFF が結合することにより JAK3、IKK α 、 β が活性化され IL-6 産生を誘導し、B 細胞からの IgG 産生に影響を与えていることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

①Yoshimoto K., Tanaka M., et al. (全 11 名、筆頭著者) Regulatory mechanisms for the production of BAFF and IL-6 are impaired in monocytes of patients of primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Research and Therapy*, 査読有、13(5)、2011、doi: 10.1186/ar3493、R170

②吉本桂子、自己免疫疾患の病態形成における mTOR の関与について、月刊リウマチ科、査読無、46(1)、2011、67-71

<http://www.kahyo.com/item/R201107-461>

③Takeuchi T, Suzuki K, Kondo T, Yoshimoto K, Tsuzaka K. CD3 ζ defects in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*. 査読有、2012 Apr;71 Suppl 2:i78-81. doi: 10.1136/annrheumdis-2011-200641.

[学会発表] (計 17 件)

①Yoshimoto K., et al. Aberrant expression of BAFF receptor (BR3) in peripheral monocytes of patients with primary Sjögren's syndrome impacts abnormal activation of BAFF signaling through IKK-alpha and IKK-beta. *American College of Rheumatology Annual Meeting 2012*, 2012 Nov 10th, ワシントンDC, 米国

②Yoshimoto K., et al. JAK3 is involved in

BAFF-mediated abnormal production of IL-6 by peripheral monocytes of patients with primary Sjögren's syndrome. *Cytokines 2012*, 2012 Sep 12th, ジュネーブ、スイス

③吉本桂子、シェーグレン症候群患者末梢単球における BAFF シグナル異常の解析、第 21 回日本シェーグレン症候群学会、2012 年 9 月 7 日、京都

④Yoshimoto K., et al. BAFF signaling is abnormally regulated through JAK pathways in monocytes with primary Sjögren's syndrome. *EULAR 2012*, 2012 Jun 8th, ベルリン、ドイツ

⑤Yoshimoto K., et al. JAK-STAT pathways are involved in the BAFF signaling of peripheral monocytes of patients with primary Sjögren's syndrome. *Immunology 2012*, 2012 May 8th, ボストン、米国

⑥吉本桂子、JAK-STAT pathways may be involved in enhanced production of IL-6 by BAFF in human monocytes. 第 56 回日本リウマチ学会、2012 年 4 月 21 日、東京

⑦Yoshimoto K., et al. Possible involvement of JAK3 pathway in production of IL-6 induced by BAFF in peripheral monocytes of patients with primary Sjögren's syndrome, 第 40 回日本免疫学会総会学術集会、2011 年 11 月 29 日、千葉

⑧Yoshimoto K., et al. Abnormalities in a JAK-STAT pathway are involved in the aberrant production of IL-6 by BAFF-stimulated peripheral monocytes of patients with primary Sjögren's syndrome. *American College of Rheumatology*, 2011 Nov 8th, シカゴ、米国

⑨Yoshimoto K., et al. Possible involvement of JAK3 pathway in production of IL-6 induced by BAFF in human monocytes. 4th East Asian Group of Rheumatology, 2011 Oct 15th, 東京

⑩Yoshimoto K., et al. REGULATION OF IL-6 PRODUCTION INDUCED BY SOLUBLE BAFF IN MONOCYTES OF PATIENTS WITH PRIMARY SJÖGREN'S SYNDROME, 11th International Symposium for Sjögren's syndrome, 2011 Sep 29th, アテネ、ギリシャ

⑪吉本桂子、シェーグレン症候群患者末梢単球からの IL-6 産生と BAFF シグナルの関与、第 20 回日本シェーグレン症候群学会、2011 年 9 月 10 日、金沢

⑫吉本桂子、ヒト単球からの BAFF 誘導型 IL-6 産生における JAK 経路の関与、第 55 回日本リウマチ学会総会学術集会、2011 年 7 月 20 日、神戸

⑬Yoshimoto K., et al. A JAK3 pathway may be involved in the production of IL-6 by human monocytes stimulated with BAFF.

Immunology 2011、2011 May 15th、サンフランシスコ、米国

⑭吉本桂子、シェーグレン症候群患者の末梢単球およびT細胞における BAFF産生異常機構と病態形成への関与、第19回日本シェーグレン症候群学会、2010、2010年9月10日、舞浜市

⑮吉本桂子、ヒト単球からのBAFF誘導型IL-6産生機構の解明、第75回日本インターフェロン・サイトカイン学会、2010、2010年6月26日、北九州市

⑯吉本桂子、シェーグレン症候群患者末梢単球におけるBAFFシグナル異常の解析、シェーグレンセミナー 2010、2010年6月5日東京

⑰Yoshimoto K., et al. Up-regulated signaling pathway triggered by sBAFF may induce aberrant production of IL-6 in monocytes of the patients with Sjögren's Syndrome. Immunology 2010, 2010 May 8th ボルチモア、米国

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉本 桂子 (YOSHIMOTO KEIKO)
慶應義塾大学・医学部・研究員
研究者番号：20383292

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

竹内 勤 (TAKEUCHI TSUTOMU)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号：50179610