

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：32620

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K24003

研究課題名(和文) 全身性エリテマトーデスにおける単球系とマクロファージの役割の解明

研究課題名(英文) Roles of monocytes and macrophages in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus

研究代表者

野村 篤史(Nomura, Atsushi)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・非常勤助教

研究者番号：60851201

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：全身性エリテマトーデス(SLE)の病態にTLR7のシグナル伝達異常が関与することが知られているが、発症に至るメカニズムは明らかではない。本研究ではTLR7のアゴニストであるイミキモドの長期的な経皮塗布によって発症するSLEモデルマウスを用いて、発症に至るメカニズムを単球に注目し解析した。古典的単球であるLy6Chi単球は局所で反応し刺激によりIFN $\gamma$ の遺伝子発現を増加した。一方で非古典的単球であるLy6Clo単球は特異的に接着因子の発現を増加し腎へ浸潤しやすいことがわかった。このように、それぞれの単球は異なる役割で病態に関与していると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によりSLE病態において単球のもつ異なる役割を明らかにした。古典的単球と非古典的単球のそれぞれが病期や臓器ごとで異なる働きをしていることへの理解は病態の理解を促進する。これまでにSLEの治療薬としては単球を標的にしたものはなく、単球が関与した病態を考慮した治療法の開発へとつながることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Although mounting evidence indicate the importance of aberrant toll-like receptor 7 (TLR7) signal in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus (SLE), the mechanism of disease progression is still to be clarified.

Imiquimod (IMQ) -induced lupus model was used to analyze the lupus mechanism related to monocytes. Ly6Chi monocytes responded at the local stimulated site and had higher expression of IFN $\gamma$  upon stimulation. Ly6Clo monocytes had tendency to infiltrate to the kidneys. Thus, we clarified the different features of Ly6Chi and Ly6Clo monocytes in IMQ-induced lupus mice.

研究分野：免疫学

キーワード：全身性エリテマトーデス TLR7 イミキモド 単球 マクロファージ ループス腎炎

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年の分子標的治療の発展により、関節リウマチなど一部の自己免疫疾患では完全寛解も可能になったが、同じ自己免疫疾患である全身性エリテマトーデス(SLE)において、完全寛解は現実的な目標となっていない。SLEの病態には獲得免疫系の重要性が明らかではあるが、現在までのところ獲得免疫系をターゲットとした治療の効果は限定的であり、自然免疫系も含めた病態の解明が必要である。SLEにおいて自然免疫系シグナルの受容体である Toll 様受容体 7(TLR7)の関与が注目され TLR7 からのシグナルの異常は病態に関与すると考えられているが、発症に至る詳細なメカニズムは明らかではない。単球は TLR7 の刺激によって反応する細胞であり、血中から組織に移行するとマクロファージや樹状細胞に分化し病態の慢性化に関わる細胞であるため、これらの細胞は治療標的として有望である可能性がある。実際に、ヒトの SLE では末梢血において CD16<sup>+</sup>の単球が増加するとの報告があり、腎炎組織においても同細胞の浸潤が確認されている。マウスの SLE モデルでもヒト疾患と同様に、CD16<sup>+</sup>単球に相当する Ly6C<sup>lo</sup> 単球の増加がみられることから、マウスモデルでの単球系とマクロファージの機能の解明からヒト疾患の応用へとつなげられるのではないかと考えられた。

### 2. 研究の目的

本研究では TLR7 を発現する自然免疫細胞である単球や単球から分化したマクロファージの役割を解明するとともに、疾患発症に関連する分子機構を同定することを目的とした。SLE 病態発症における単球の変化やマクロファージへの分化の鍵となるマーカーを同定し、単球系を標的とした疾患制御方法の開発へとつなげることを目的とした。

### 3. 研究の方法

上記の目的を達成するため、次のような研究を計画した。

マウスの実験は TLR7 アゴニストであるイミキモドを長期経皮塗布することによって SLE 様病態を発症するモデルを用いておこなった。

(1)イミキモド誘発 SLE モデルにおける、末梢血の単球と腎組織の単球様細胞の網羅的遺伝子発現解析

(2)蛍光標識を用いた細胞移植・移入による、生体内での単球分化の追跡と阻害

(3)単球の SLE 病態発症における役割とマクロファージとの関連の解析

(4)Ly6C<sup>hi</sup> 単球と Ly6C<sup>lo</sup> 単球の役割の解析

(5)マウス研究で得られた知見のヒト単球を用いた解析

### 4. 研究成果

(1)イミキモド誘発 SLE モデルにおける、末梢血の単球と腎組織の単球様細胞の網羅的遺伝子発現解析

イミキモドを塗布しないコントロールマウスとイミキモドを長期塗布し SLE 病態を誘発したマウスから血中の古典的単球である Ly6C<sup>hi</sup> 単球と非古典的単球である Ly6C<sup>lo</sup> 単球、SLE 病態の腎組織において増加する単球様細胞(Ly6C<sup>lo</sup> 単球様細胞)をソーティングにより分取し、RNA-seq 解析によって網羅的に遺伝子発現解析を行った。SLE 病態を誘発されたマウスでは Ly6C<sup>lo</sup> 単球においてインテグリンなどの接着分子の遺伝子発現が上昇していた。このことから Ly6C<sup>lo</sup> 単球様細胞が腎組織に多くみられる要因として Ly6C<sup>hi</sup> 単球に比して Ly6C<sup>lo</sup> 単球が臓器へ浸潤しやすいことが想定された。また腎の Ly6C<sup>lo</sup> 単球様細胞は血中の Ly6C<sup>lo</sup> 単球と比してマクロファージ関連遺伝子の発現が上昇していたことから、末梢血から Ly6C<sup>lo</sup> 単球が特異的に腎に浸潤し、単球様細胞を経てマクロファージに分化するというメカニズムが想定された。

(2)蛍光標識を用いた細胞移植・移入による、生体内での単球分化の追跡と阻害

体細胞すべてが蛍光を発するマウスである GFP マウスの骨髄細胞を通常のマウスに移植し、単球の分化を追跡した。GFP 陽性細胞の骨髄移植のみを行ったマウスでは腎の単球様細胞やマクロファージは末梢血の細胞との入れ替わりは起こらないが、イミキモド塗布により SLE 病態を誘発することによって腎の単球様細胞やマクロファージは GFP 陽性細胞に置き換わることから、イミキモドによって SLE 病態を誘発されたマウスの末梢血の単球は腎組織へと浸潤しやすいと

考えられた。ドナーマウスの末梢血と脾臓から単球を分離し蛍光標識の後、レシピエントマウスに移入すると、SLE 病態を誘発されたマウスから採取した単球はコントロールマウスから採取された単球と比べて腎組織に浸潤しやすく、特に Ly6C<sup>lo</sup> 単球の移入によって浸潤が多くみられた。RNA-seq 解析において Ly6C<sup>lo</sup> 単球で遺伝子発現上昇がみられた接着分子であるインテグリンに関して、抗インテグリン抗体の投与により単球浸潤の阻害が可能であるか試みたが有意な結果は得られなかった。

### (3) 単球の SLE 病態発症における役割とマクロファージとの関連の解析

上記を踏まえて腎の単球様細胞とマクロファージの遺伝子発現解析を定量的 PCR によって行った。SLE 病態を誘発されたマウス腎の単球様細胞ではマクロファージ関連遺伝子の発現は低い一方で、炎症性サイトカインである IL-6 や Ly6C<sup>lo</sup> 単球の遊走に関与すると考えられるケモカインである CCL5 の遺伝子発現が高く、単球様細胞はマクロファージよりもより炎症に関連した細胞であると考えられた。一方でコントロールマウスの腎におけるマクロファージは非炎症性サイトカインの IL-10 の遺伝子発現が高く、ケモカインである CXCL-13 の遺伝子は SLE 病態を誘発されたマウスのマクロファージに発現が高くみられたことから、SLE 病態においてマクロファージは単球由来の細胞に置き換わり、炎症病態に関与しているものと考えられた。

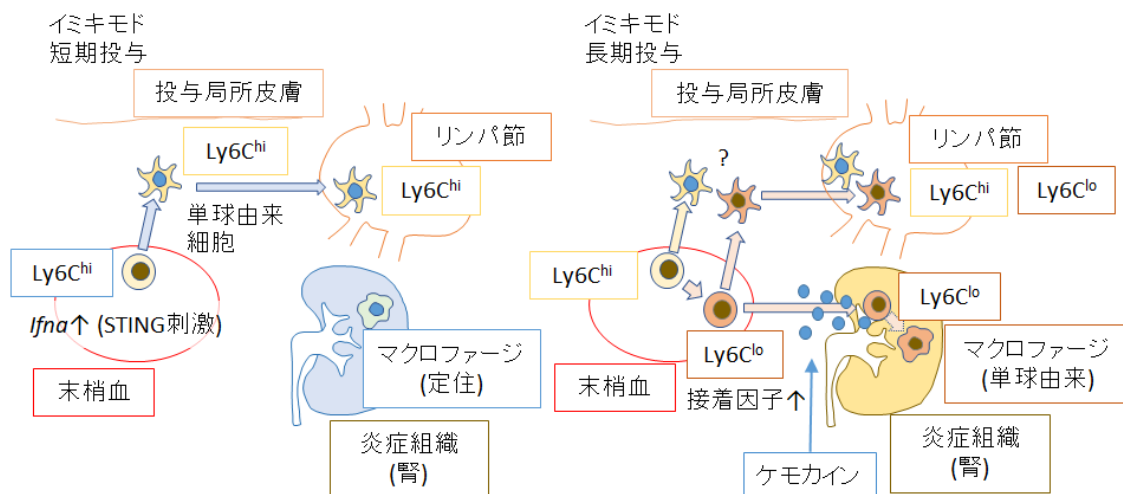
### (4) Ly6C<sup>hi</sup> 単球と Ly6C<sup>lo</sup> 単球の役割の解析

前述のように SLE 病態を誘発されたマウスでは末梢血の Ly6C<sup>lo</sup> 単球と腎組織での Ly6C<sup>lo</sup> 単球様細胞が増加し腎の炎症病態に関わっていると考えられた一方で、Ly6C<sup>hi</sup> 単球は塗布局所と局所のリンパ節で増加した。Ly6C<sup>hi</sup> 単球は DNA のセンサーである stimulator of interferon genes (STING) の刺激によってインターフェロンの遺伝子発現を著明に上昇させた一方で Ly6C<sup>lo</sup> 単球では発現上昇がみられなかったことから、Ly6C<sup>hi</sup> 単球の Ly6C<sup>lo</sup> 単球とは異なる侵害局所での役割が示唆された。

### (5) マウス研究で得られた知見のヒト単球を用いた解析

当初はヒト単球を用いた研究への展開を計画していたが、研究期間中の実施はできなかった。

以上よりマウスの SLE 病態において Ly6C<sup>hi</sup> 単球は病態初期の炎症や自己抗体産生に関わり、Ly6C<sup>lo</sup> 単球は病態後期の臓器障害に関わること、また Ly6C<sup>lo</sup> 単球は臓器に浸潤し病態に関与するマクロファージへと分化することが示唆された(図)。今後はヒト疾患へと展開した単球の役割の解明によって病態理解や新規治療薬への発展へとつなげていきたい。



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 野村篤史、能登大介、村山豪、千葉麻子、三宅幸子
2. 発表標題 Analysis in the origin and functions of TLR7+Ly6Clo monocyte-like cells which increase in the imiquimod-induced lupus model
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野村篤史、千葉麻子、三宅幸子
2. 発表標題 イミキモド誘発全身性エリテマトーデスモデルにみられるToll-like receptor 7陽性単球様細胞
3. 学会等名 第47回日本臨床免疫学会総会
4. 発表年 2019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
---------	---------