

令和元年6月13日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05511

研究課題名(和文) シェーグレン症候群発症におけるマクロファージの重要性

研究課題名(英文) The role of macrophages in the pathogenesis of Sjogren's syndrome

研究代表者

新垣 理恵子 (ARAKAKI, Rieko)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・准教授

研究者番号：00193061

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：近年、炎症誘導性M1マクロファージや組織修復・免疫抑制を誘導して炎症を終結させるM2マクロファージ等、マクロファージの多様性が注目されている。本研究では、シェーグレン症候群(SS)モデルマウスの唾液腺には少なくとも2種類のマクロファージが存在することを見出し、それぞれ異なる機能を有していることを明らかにした。これらの唾液腺マクロファージからSS発症に伴って産生されるケモカインの一つとしてCCL22を同定し、SSモデルマウスへの抗CCL22抗体投与がシェーグレン症候群病態を改善することを明らかとし、唾液腺へのT細胞浸潤阻止を目的としたSS特異的な治療法開発の可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自然免疫においてマクロファージは代表的な貪食細胞であるが、近年、マクロファージの活性化状態には多様性があり、炎症誘導性のM1マクロファージや組織修復・免疫抑制を誘導して炎症を終結させるM2マクロファージ等が存在することが明らかになってきた。しかし自己免疫疾患におけるマクロファージの役割を明らかにした報告は少ない。炎症初期から後期まで多種多様に与するマクロファージの動態を明らかにすることは、自己免疫疾患発症の機序解明に大いに役立つはずである。また本研究は、SSのみならず他の自己免疫疾患や慢性炎症に起因する疾患に応用できると考えられ、多くの慢性炎症疾患の治療法開発に繋がることを期待している。

研究成果の概要(英文)：Macrophages are critical regulators of immune response and serve as a link between innate and acquired immunity. Using a murine model for Sjogren's syndrome (SS), we investigated the role of tissue-resident macrophages in the onset and development of autoimmunity. Two unique populations of CD11b high and CD11b low resident macrophages were observed in the target tissue of the SS model. PCR array analysis of chemokines revealed effective production of CCL22 by the CD11b high macrophages. CCL22 upregulated the migratory activity of CD4+T cells. Moreover, administration of anti-CCL22 antibody suppressed autoimmune lesions in the SS model. In conclusion, CCL22-producing tissue-resident macrophages controls autoimmune lesions via autoreactive T cells in the SS model. These results suggest that specific chemokines and their receptors may serve as novel therapeutic targets for SS.

研究分野：免疫学

キーワード：自己免疫疾患 シェーグレン症候群 マクロファージ 組織常在型マクロファージ ケモカイン ccl22

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 自己免疫疾患シェーグレン症候群(SS)の主徴であるドライマウス・ドライアイは唾液腺・涙腺での慢性炎症による組織障害により引き起こされる。しかし自己免疫疾患 SS の発症メカニズムは解明されておらず、その治療方法も確立されていないのが現状である。近年、慢性炎症は、がん、自己免疫疾患、循環器疾患など様々な病気の基盤病態として捉えられるようになってきた。慢性炎症には種々の免疫細胞や各種臓器の実質細胞などの多様な細胞が関与しており、この複雑な病態を系統的に理解することが重要であるが、複雑な自己免疫疾患発症の分子基盤を理解し、新しい治療法を導くために、病態の起始、進展、増悪といった過程にそれぞれ関与すると予測されるマクロファージに焦点をあてた解析は重要である。

(2) 申請者らはこれまで SS 発症メカニズム解明と治療法の開発を目指して、モデルマウスを中心に多角的にアプローチしてきた。SS 発症には活性化された自己反応性 T 細胞が病態発症・進展に関わること (*Am. J. Pathol.* 156: 1557, 2000, *J. Immunol.* 169: 1050, 2002)、生後 3 日目の胸腺摘出した SS モデルマウス (3d-Tx NFS/sld) における制御性 T 細胞の特徴と SS 発症における重要性について明らかにした (*Am. J. Pathol. in press* 2015)。また標的臓器の上皮細胞においてはエストロゲン欠乏依存的にアポトーシスが誘導され自己免疫病変発症に密接に関連していることを明らかにした (*Science* 276: 604, 1997, *Am. J. Pathol.* 155: 173, 1999, *Am. J. Pathol.* 167: 1051, 2003, *Endocrinol.* 145: 2384, 2004)。唾液腺特異的にエストロゲン欠乏依存的アポトーシスを誘導する因子として Retinoblastoma associated protein 48 (RbAp48) を同定し (*Mol. Cell. Biol.* 26: 2924, 2006)、唾液腺特異的 RbAp48 発現トランスジェニック (Tg) マウスによる新たな SS モデルマウスの確立に成功した (*J. Exp. Med.* 205: 2915, 2008)。エストロゲン欠乏依存的唾液腺アポトーシスが誘導される際に、プラズマサイトイド樹状細胞 (pDC) を介した異所性 MHC クラス II 発現が SS 発症に関与することを明らかにした (*Am. J. Pathol.* 174: 1715, 2009)。またエストロゲン合成酵素であるアロマトラーゼを欠損したマウスが SS 様病態を発症には脂肪組織、唾液腺周囲へのマクロファージ浸潤が関与することを報告した (*Am J Pathol*, 185: 151, 2015)。

2. 研究の目的

(1) マクロファージは炎症の発症から収束に至るまで様々な様式で炎症に関わっている。動脈硬化のような慢性疾患においてもアポトーシス等で誘導された自己由来成分や病原体成分がマクロファージに認識され、炎症反応が惹起される。マクロファージはアポトーシス細胞を貪食除去することによって恒常性を維持しようとするが、この病態初期に関与するマクロファージは、M1 マクロファージと呼ばれる。一方で炎症後期には炎症修復のために創傷治癒・組織修復に関与するマクロファージは M2 マクロファージと呼ばれる。SS 発症におけるマクロファージの関与を明らかにした報告はなく、申請者らは種々の要因によりアポトーシスを起こした上皮細胞を除去するためのマクロファージの唾液腺への浸潤が SS 発症・進展に重要な起点であると考え、病態の初期からマクロファージの動態を観察してその役割・重要性を明らかにすることを目的とする。

(2) 慢性炎症を基盤とした多くの疾患の中から SS 発症におけるマクロファージを中心に解析を進めるために、リウマチや動脈硬化等で先行している研究結果を参考に、SS 発症に関わるマクロファージの分化状態を病態進行に合わせて検討する。標的臓器である唾液腺にマクロファージを呼び寄せるケモカイン、マクロファージが唾液腺で産生するサイトカインやケモカイ

ンを同定し、T細胞や上皮細胞へ与える影響を見極めることによって、SS発症機序解明を目指す。

3. 研究の方法

シェーグレン症候群(SS)発症におけるマクロファージの動態を追求するにあたり、使用するSSモデルマウスには、申請者らの研究室で樹立・確立した生後3日目に胸腺摘出(3d-Tx)を施したNFS/sldマウスを使用する。

(1) 唾液腺マクロファージのマーカー探索

マクロファージの分化マーカーは最近、刻々と報告されており、脾臓や肺胞マクロファージでもサイトフローメトリー解析での発現パターンが異なっている。SSに關与するマクロファージなので、実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)におけるミクログリアや、腸におけるマクロファージの報告等を参考にして、最も適した、出来れば細胞表面マーカーをサイトフローメーターにより探索・決定した。

(2) 唾液腺マクロファージの確認・同定

SS発症時の唾液腺に存在するマクロファージは骨髄や血中から浸潤してきているのか、常在マクロファージがその場で増殖しているのか(あるいはその両方)なのかを決定するために、GFP発現SSモデルマウスから調製した骨髄マクロファージをX線照射したSSモデルマウスに移入することによって、SS発症時のマクロファージ集積が骨髄由来細胞の浸潤によるものなのかどうかを検討した。

(3) 唾液腺マクロファージのケモカイン・ケモカイン受容体発現

浸潤メカニズム解析のために唾液腺マクロファージが産生するケモカインや発現するケモカイン受容体を市販のケモカインPCRアレイを用いて検索した。

(4) 唾液腺マクロファージが産生するケモカインによる遊走能測定

マウス脾臓CD4陽性T細胞を精製して、ケモタキシスチャンバーを用いて遊走能を測定した。

(5) 抗ケモカイン(抗CCL22抗体)投与

SSモデルマウスにCCL22抗体を10週間投与して、病態を顎下腺への炎症細胞浸潤を指標にスコア化して評価した。

4. 研究成果

(1) SSモデルマウスの唾液腺マクロファージ

査読有,モデルマウスを使用して、SSの標的臓器である唾液腺組織中のマクロファージの動態を解析し、SS発症に呼応して標的臓器の唾液腺中にF4/80陽性マクロファージが増加することを見出した。さらに唾液腺マクロファージをフローサイトメーターで種々のマーカーについて

検討した結果、図1に示すように唾液腺は少なくともF4/80⁺CD11b^{low}とF4/80⁺CD11b^{high}の表現型を示す2種類のマクロファージが存在することが明らかになった。CD11b^{high}のマクロファージはCX3CR1の発現が高く、常在性マクロファージの特徴をより強く示していた。またFITC beadsに対する貪食能も、CD11b^{high}マクロ

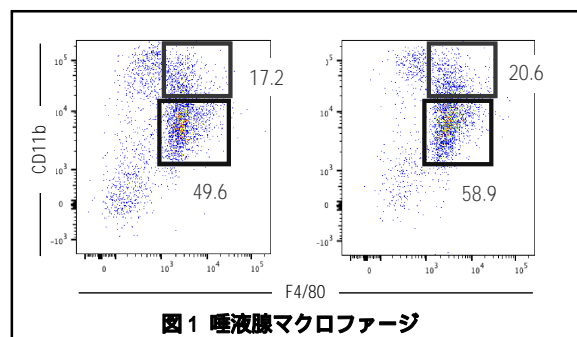


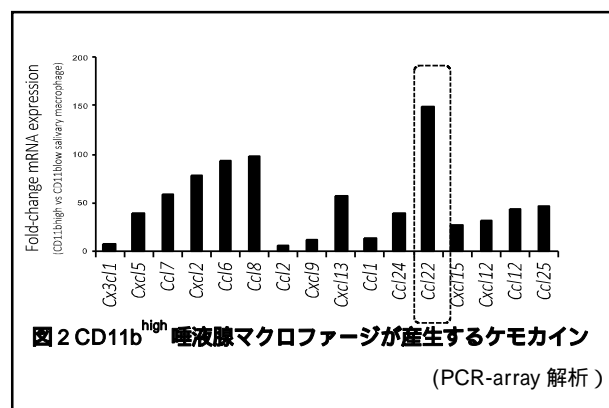
図1 唾液腺マクロファージ

ファージがより強い貪食能を示した。さらにGFP発現骨髄由来単球を移入したところ、1ヶ月に顎下腺に浸潤してきたGFP発現マクロファージはCD11b^{low}の表現系を示すことが明らかとな

り、CD11b^{high}唾液腺マクロファージとCD11b^{low}マクロファージは由来が異なることが推察され、SS 発症初期に浸潤してくる CD11b^{low}マクロファージは骨髄由来であり、CD11b^{high}唾液腺マクロファージは唾液腺常在型のマクロファージであると考えられた。

(2) F4/80^{high}CD11b^{low}唾液腺マクロファージが産生するケモカイン

次に唾液腺マクロファージが産生するケモカインを市販の PCR アレイにより検索したところ、CD11b^{high}マクロファージが非常に多くのケモカインを産生していることが明らかとなり、中でも特に CCL22 (macrophage-derived chemokine; MDC)の発現が高かったので、このケモカインに焦点をあてて解析を進めた(図2)。SS モデルマウスの組織において脾臓や肝臓に比較して顎下腺において優位に CCL22 発現が上昇しており、また顎下腺に浸潤してT細胞は CCL22 受容体 (CCR4) をコントロール群に比較して優位に強発現していた。遊走実験により、CCL22 によって SS モデルマウスの T 細胞がより優位に遊走されることを確認した。



(3) CCL22 抗体投与による SS 治療効果

以上の結果から顎下腺への T 細胞の浸潤を阻害できれば、T 細胞による組織障害を止めることが可能なので、抗 CCL22 抗体を SS モデルマウスに投与した。結果、顎下腺へのリンパ球浸潤が優位に減少しており、治療効果を期待できることが明らかとなった。

(4) ヒト患者における CCL22 産生

SS 患者唾液中には CCL22 が増加するという報告が既にあるが、患者 HE 切片を用いて CCL22 産生マクロファージが SS 患者において優位に増加することを明らかにした。

今後さらに、唾液腺マクロファージの病態と呼応させて動態の解析や、顎下腺への T 細胞浸潤に關与するマクロアージから産生されるケモカイン等を詳細な解析によって、それぞれのマクロファージの病態発症への關与を明らかにし、病態発症におけるマクロファージの重要性という新たな方向性から SS 発症機序解明に貢献できると考えている。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 11 件)

Iwasa T, Afroz S, Inoue M, Arakaki R, Oshima M, Raju R, Waskitho A, Inoue M, Baba O, Matsuka Y. IL-10 and CXCL2 in trigeminal ganglia in neuropathic pain. *Neurosci Lett*. 査読有, 2019, 703:132-138, doi:10.1016/j.neulet.2019.03.031.

Afroz S, Arakaki R, Iwasa T, Oshima M, Hosoki M, Inoue M, Baba O, Okayama Y, Matsuka Y. CGRP Induces Differential Regulation of Cytokines from Satellite Glial Cells in Trigeminal Ganglia and Orofacial Nociception. *Int J Mol Sci*. 査読有, 2019, 20:1-20, doi:10.3390/ijms20030711.

Ushio A, Arakaki R, Otsuka K, Yamada A, Tsunematsu T, Kudo Y, Aota K, Azuma M, Ishimaru N. CCL22-Producing Resident Macrophages Enhance T Cell Response in Sjogren's Syndrome. *Front Immunol*. 査読有,2018, 8:1-15, doi:10.3389/fimmu .2018.02594.

Otsuka K, Yamada K, Taquahashi Y, Arakaki R, Ushio A, Saito M, Yamada A, Tsunematsu T, Kudo Y, Kanno J, Ishimaru N. Long-term polarization of alveolar macrophages to a profibrotic phenotype after inhalation exposure to multi-wall carbon nanotubes. *PLoS One*. 査読有, 2018, 13:1-18, doi:10.1371/journal.pone.0205702.

Saito M, Otsuka K, Ushio A, Yamada A, Arakaki R, Kudo Y, Ishimaru N. Unique Phenotypes and Functions of Follicular Helper T Cells and Regulatory T Cells in Sjögren's Syndrome. *Curr Rheumatol Rev*. 査読有, 2018,14:239-245, doi: 0.2174/1573397113666170125122858.

Izawa T, Arakaki R, Ishimaru N. Role of Fas and RANKL Signaling in Peripheral Immune Tolerance. *J of Clin Cell Immunol*. 査読有, 2017, 8:1-4, doi:10.4172/2155-9899.1000512.

Ushio A, Arakaki R, Eguchi H, Hotta F, Yamada A, Kudo Y, Ishimaru N. Pathological Analysis of Ocular Lesions in a Murine Model of Sjogren's Syndrome. *International Journal of Molecular Sciences*. 査読有, 2017, 18:1209-1209, doi:10.3390/ijms18061209.

Kujiraoka S, Tsunematsu T, Sato Y, Yoshida M, Ishikawa A, Tohyama R, Tanaka M, Kobayashi Y, Kondo T, Ushio A, Otsuka K, Kurosawa M, Saito M, Yamada A, Arakaki R, Miyamoto Y, Ishimaru N, Kudo Y. Establishment and characterization of a clear cell odontogenic carcinoma cell line with EWSR1-ATF1 fusion gene. *J oral oncology*. 査読有, 2017, 69:46-55, doi:10.1016/j.oraloncology.2017.04.003

Kurosawa M, Arakaki R, Yamada A, Tsunematsu T, Kudo Y, Sprent J, Ishimaru N. NF- B2 Controls the Migratory Activity of Memory T Cells by Regulating Expression of CXCR4 in a Mouse Model of Sjögren's Syndrome. *Arthritis Rheumatol*. 査読有, 2017, 69:2193-2202. doi: 10.1002/art.40230.

Yamada A, Arakaki R, Saito M, Kudo Y, Ishimaru N. Dual Role of Fas/FasL-Mediated Signal in Peripheral Immune Tolerance. *Frontiers in Immunology*. 査読有, 2017, 8:1-10, doi: 10.3389/fimmu.2017.00403.

Izawa T, Arakaki R, Mori H, Tsunematsu T, Kudo Y, Tanaka E, Ishimaru N. The Nuclear Receptor AhR Controls Bone Homeostasis by Regulating Osteoclast Differentiation via the RANK/c-Fos Signaling Axis. *J Immunol*. 査読有, 2016, 197:4639-4650, doi: 10.4049/jimmunol.1600822

[学会発表](計 5 件)

Rieko Arakaki, Shinichiro Nakayama, Aya Ushio, Kunihiro Otsuka, Satoshi Kisoda, Takaaki Tsunematsu, Akiko Yamada, Yasusei Kudo, Naozumi Ishimaru. The role of the cleaved form IL-33 in pathogenesis of Sjogren's syndrome (SS). *The 47th Annual meeting of the Japanese society for Immunology*. 2018.

Rieko Arakaki, Aya Ushio, Kunihiro Ohtsuka, Yasusei Kudo and Naozumi Ishimaru. NF-kB2 Controls the Migratory of Memory T cells to the Target Tissues in a Mouse Model of

Sjogren's Syndrome by Regulating Expression of CXCR4. *11th International Congress of Autoimmunity*, Lisbon, 2018.

新垣 理恵子, 牛尾 綾, 大塚 邦紘, 工藤 保誠, 石丸 直澄. 全身吸入暴露による多層化カーボンナノチューブの肺胞マクロファージへの影響. *日本病理学会会誌*, 2018年

新垣 理恵子, 山田 耕一, 齋藤 雅子, 大塚 邦紘, 山田 安希子, 常松 貴明, 工藤 保誠, 菅野 純, 石丸 直澄. Chronic influence of Multi-walled carbon nanotubes (MWCNT) on immune system. *第106回日本病理学会総会*, 2017年.

Rieko Arakaki, Kohichi Yamada, Aya Ushio, Mie Kurosawa, Kunihiro Ohtsuka, Masako Saito, Takaaki Tsunematsu, Akiko Yamada, Yasusei Kudo and Naozumi Ishimaru. Immunological and toxicological effect of multi-wall carbon nanotubes by whole body inhalation exposure in B6 mice. *第45回日本免疫学会学術集会*, 2016.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：山田 安希子

ローマ字氏名：(YAMADA, Akiko)

所属研究機関名：徳島大学

部局名：大学院医歯薬学研究部(歯学域)

職名：助教

研究者番号(8桁)： 70452646

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。