

令和 3 年 5 月 18 日現在

機関番号：33703

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09561

研究課題名(和文) 自己免疫性唾液腺炎の司令塔：MyD88依存的シグナルによる三次リンパ組織形成機構

研究課題名(英文) The commander of autoimmune sialadenitis: regulatory mechanisms of tertiary lymphoid tissue formation by MyD88-dependent signaling

研究代表者

引頭 毅 (Into, Takeshi)

朝日大学・歯学部・教授

研究者番号：10360918

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：シェーグレン症候群(SS)等でみられる自己免疫性唾液腺炎(AS)では、リンパ球浸潤を伴う慢性炎症に起因する腺組織破壊により唾液分泌が障害され、摂食能や口腔感染防御能が低下する。我々はSSモデルマウスを用い、自然免疫を制御する受容体群のアダプター分子として知られるMyD88遺伝子を欠失させたところ、リンパ球浸潤の発生頻度が減少し、唾液腺障害が抑制されることを見出した。ASにおけるMyD88の役割について詳細な解析を行い、三次リンパ組織形成に関わる機構ならびに病因的遺伝子群の同定において重要な成果を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では我々が樹立したMyD88欠損SSモデルマウスを用い、種々の分子生物学的実験から、MyD88のASにおける役割、ならびにASの制御において標的となりうる病因的遺伝子群が明らかになった。SSでは関節リウマチや全身性エリテマトーデスなどの自己免疫疾患と比較して免疫抑制薬などによる治療法が確立しておらず、本研究結果から、SSにおける原因療法を基軸とした新しい治療法の確立へと繋がる可能性があり、学術的意義ならびに社会的意義は高いと思われる。

研究成果の概要(英文)：In autoimmune sialadenitis (AS), which is found in the autoimmune diseases such as Sjogren's syndrome (SS), salivary secretion is impaired due to destruction of the glandular tissues caused by chronic inflammation accompanied by lymphocyte infiltration, ultimately leading to reduction in the abilities of feeding and oral protection against infections. We found that deletion of the gene of MyD88, which serves as an adapter molecule for the innate immune receptors, in SS model mice resulted in reduction of the frequency of lymphocyte infiltration in salivary glands and salivary gland dysfunction. Our experimental results revealed the pathological role of MyD88 in AS, which are involved in tertiary lymphoid tissue formation, and a series of etiologic candidate genes in AS manifestation.

研究分野：口腔免疫学、口腔微生物学

キーワード：自己免疫性唾液腺炎 自然免疫 シェーグレン症候群 リンパ球浸潤 MyD88

1. 研究開始当初の背景

自己免疫性唾液腺炎 (autoimmune sialadenitis ; AS) は自己免疫の機序で唾液腺組織にリンパ球浸潤と組織破壊がもたらされる疾患である。原発性 Sjögren 症候群のように原発性に発症する場合や、全身性エリテマトーデス (SLE) や関節リウマチ、IgG4 関連疾患に関連して二次的に発症する場合もある。腺組織破壊による唾液分泌低下により口腔乾燥、咀嚼・嚥下障害、齲蝕や歯周病、口腔感染症の発症が起こり、患者の QOL は著しく低下してしまう。

AS に関する種々多様な研究が国内外で進められており、病態形成やリスクファクターに関して理解が進んでいる。一方、病態の多様性や発症機序の複雑性から、未だ唾液腺が侵される正確な原因の特定にまでは至っておらず、一刻も早い解明が望まれている。

AS で認められる組織破壊は無秩序なリンパ球浸潤によるものではない。実際の病巣では本来の唾液腺組織では認められない高内皮細静脈 (high endothelial venule ; HEV) やリンパ管の形成が認められる。これら脈管はリンパ球の輸出入や自己抗原の運搬を担うと考えられている。また種々のストローマ細胞が出現し、浸潤してきた B 細胞と T 細胞は区画化される。濾胞樹状細胞も観察され、ナイーブ T 細胞への抗原提示が行われて自己抗原に対する免疫応答が誘導される。また B 細胞濾胞が形成されるとともに、胚中心が見られることもある。このような組織構成の変化は、二次リンパ組織の新生機構と酷似していることから、「三次リンパ組織」や「異所性リンパ組織」の名称でもよばれる。

AS 研究では、AS に類似した症候が現れる疾患モデルマウスが重要視される。特に近交系マウスは遺伝的背景が均一で確実に症候が現れるため、病態形成の時系列をモニタリングする上で有用である。また同マウスを背景として遺伝子改変マウスを作出できる強みもある。多くの AS モデルが存在するが、特に AS と類似するのは「NOD マウス」と「B6/lpr マウス」である。前者は Sjögren 症候群の病態、後者は SLE の病態に類似し、いずれも AS 以外の全身症候も現れる。原因遺伝子の異なる複数のモデルマウスの使用は、病態形成における共通原因を特定する上で非常に有用と考えられる。

研究代表者はこれまで、自然免疫応答を誘導するシグナル伝達分子 MyD88 に関する様々な研究を展開してきた。MyD88 は、微生物の構成成分を認識する受容体群である Toll 様受容体 (TLR) や炎症性サイトカイン IL-1 を感知する IL-1 受容体に会合し、下流のシグナル伝達経路を活性化して NF- κ B などの転写因子を活性化するアダプター分子である。研究代表者は MyD88 遺伝子欠損マウスを使用し、唾液腺での抗菌因子 (SLPI、S100A8、ラクトトランスフェリン) やホスホリルコリン特異的 IgM 抗体の産生に MyD88 が必要であることを見出した。MyD88 依存的シグナルは口腔を含め、全身の感染防御機構において重要な役割を果たしている。

研究代表者は AS における MyD88 の役割に大きな興味を抱き、上記 2 種の AS モデルマウスで MyD88 遺伝子を欠失させた個体を作出したところ、いずれでも唾液腺におけるリンパ球浸潤や組織破壊といった病態がみられないことが分かった (未公表データ)。MyD88 欠損マウスでは、HEV やリンパ管形成等も起こっておらず、MyD88 はリンパ球の浸潤のみならず、三次リンパ組織の形成そのものに関与する可能性が考えられた。その後研究代表者が蓄積してきたエビデンスから、MyD88 依存的シグナル伝達経路は AS の病態形成において司令塔として中心的役割を果たす可能性が高いと考えている。

本来、正常な唾液腺組織は無菌的であり、当然炎症反応も誘導されていない。微生物を感知する TLR や炎症性サイトカインを感知する IL-1 受容体のシグナル伝達を担う MyD88 とその下流のシグナル伝達機構がいったい何故、どのような機構により AS の病態形成に関与することになるのだろうか？ 未知のメカニズムが働いているのだろうか？

2. 研究の目的

本研究の目的は、AS の病態形成における MyD88 依存的シグナルの司令塔としての役割を、AS モデルマウスを利用して三次リンパ組織形成の観点から分子生物学的に解析し、AS の原因解明を図ることである。本研究は疾患モデルマウスを利用した基礎研究ではあるが、目標は疾患の原因解明であり、成果を広く国民や社会に還元できる可能性を考慮すれば、高い研究意義が備わっていると思われる。本研究の背景にあるのは研究代表者が独自に蓄積してきた実験データとエビデンスであり、学術的独創性を有している。本研究課題では後述のように、細分化した小課題を設定し、各課題を遂行していくことで統合的に目的が達成できるよう研究計画を設定した。各課題では、AS モデルマウスと MyD88 遺伝子欠損 AS モデルマウスの対照実験が行われ、様々な手法を用いながら三次リンパ組織の形成機構の解明にチャレンジしていくことになる。以上、本研究課題は未開の研究領域の開拓を行いながら、疾患の原因を追究する基盤研究課題であり、成果や知見を国民・社会に広く還元することを目指しており、研究意義、独創性、創造性ともに、プライオリティーが備えられている。

3. 研究の方法

(1) AS モデルマウス

本研究では AS モデルマウスとして NOD マウスならびに B6/lpr マウスを使用した。AS モデルマ

ウスと MyD88 遺伝子欠損 AS モデルマウスとの差異を解析するが、後者は AS の陰性コントロールに相当するため、種々の対照実験を行うことで様々なエビデンスの取得が可能である。これらのマウスから採取、分離された唾液腺や所属リンパ節、分離細胞を使用して対照実験を行った。対照実験にあたり、以下の小課題を設定して、各々を遂行、達成していくことにより、総合的解釈から目標達成を目指した。

(2) 遺伝子発現・構成細胞の見地からみた三次リンパ組織形成の時系列の解明
AS モデルマウスの唾液腺組織内に形成される三次リンパ組織を 5~10 週令まで週ごとに解析し、さらに MyD88 遺伝子欠損 AS モデルマウスとの差異を見出すことにより三次リンパ組織形成の時系列の詳細を以下の方法により解明していく。

- DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析による AS 関連遺伝子の特定
- DNA マイクロアレイで特定された AS 関連遺伝子の発現様式等の解析
- 組織から採取した細胞のフローサイトメトリーによる細胞種特定とその特徴の解析

(3) 透明化組織における三次リンパ組織可視化による病態形成機序の解明
(2)の小課題と関連して、唾液腺のどこで、どのような変化とともに三次リンパ組織形成が開始され始めるのかを組織透明化法により透明化した唾液腺組織を用いて三次元的に解析する。

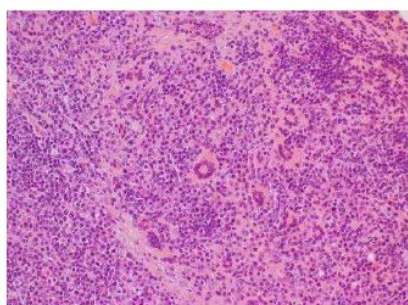
- リンパ球、HEV とリンパ管に関連したマーカーを用いた免疫組織学的解析
- リンパ球ホーミングに関わるケモカイン (CCL19・CXCL13) の免疫組織学的解析
- (2)で特定された AS 関連変移遺伝子の免疫組織学的解析

(4) 三次元培養系における組織の刺激応答性と活性化されるシグナル伝達経路の解明
マトリゲル中で三次元培養した唾液腺組織を用いることで生体に近い環境を再現し、三次リンパ組織形成にどのような外部刺激が関与するのかを特定する。リンパ組織形成性サイトカインの他、TNF スーパーファミリー系サイトカイン、種々の微生物由来成分などで刺激し、HEV とリンパ管のマーカー遺伝子の発現を調べ、MyD88 の欠損により発現が上昇しなくなる因子を特定する。また、その刺激により MyD88 下流でどのようなシグナル伝達が活性化され、マーカー遺伝子の発現に至るのかを特定していく。

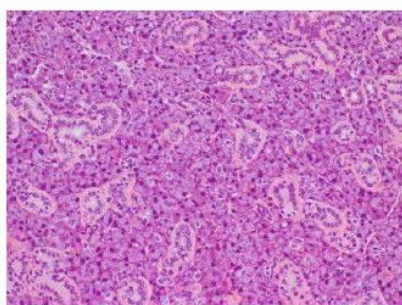
4. 研究成果

B6/lpr マウスはリンパ球の異常増殖を伴い、全身性エリテマトーデス様症候を自然発症する系統であり、唾液腺の腫脹とびまん性のリンパ球浸潤を伴って AS を発症する。本マウスで MyD88 を欠失させると、リンパ球の異常増殖は改善され、AS は認められなくなった(下図上段)。一方、NOD マウスは 1 型糖尿病様症候とともに巣状リンパ球浸潤を認める AS を発症するモデルマウスであるが、顕著なリンパ球異常増殖や唾液腺腫脹は認めない。本マウスで MyD88 を欠失させても、AS の症候は顕著に改善された(下図下段)。これらの結果は少なくとも、リンパ球異常増殖に関連した AS の誘導機序とともに、これとは関連しない機序にも MyD88 が関与することを示唆している。

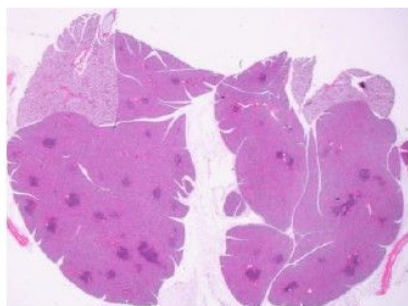
野生型 B6/lpr の顎下腺組織



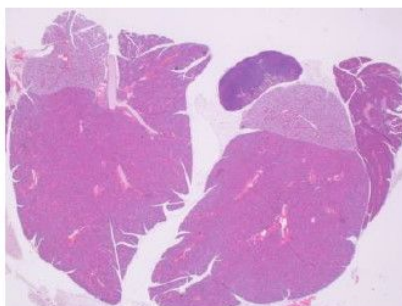
MyD88欠損 B6/lpr の顎下腺組織



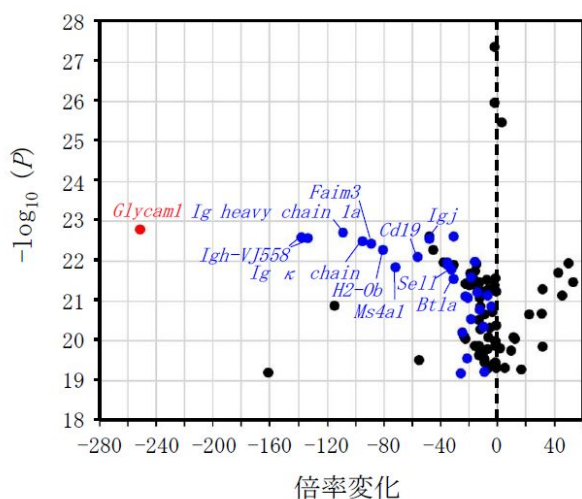
野生型 NOD の唾液腺組織



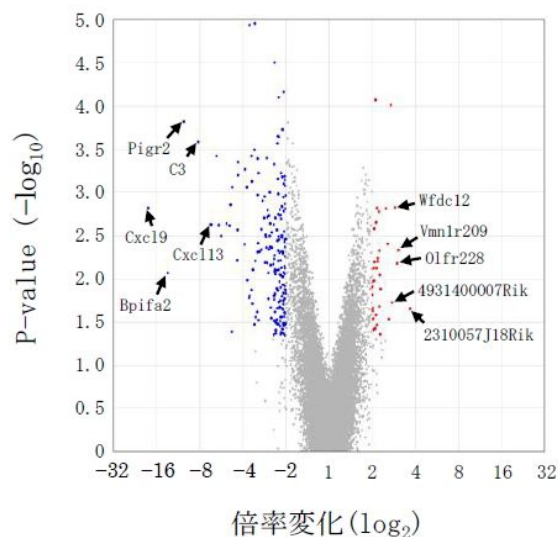
MyD88欠損 NOD の唾液腺組織



そこで正常な C57BL/6 マウスの唾液腺組織を用い、MyD88 欠失によるリンパ球異常増殖とは関連しない遺伝子発現の変化をマイクロアレイによる網羅的解析により調べたところ、高内皮細静脈 (HEV) に特異的な遺伝子 *Glycam1* や他の HEV に関連した遺伝子の発現が MyD88 欠失により減少することが分かった (下図)。実際、NOD マウスの唾液腺では異所性の HEV 形成が進行しており、これに伴って GlyCAM-1 の他、三次リンパ組織の形成やリンパ新生に関わる CCL19 や CXCL13 などのリンパ球走化性ケモカインの発現が増加していたが、MyD88 を欠失させるとこれらの発現は認められなくなった。また、顎下腺組織の免疫染色による解析を行ったところ、濾胞ヘルパー T 細胞、胚中心 B 細胞ならびに濾胞樹状細胞の出現頻度が MyD88 欠損マウスにおいて減少していることがわかった。以上より AS の病態形成では、MyD88 依存的シグナルが HEV の形成を誘導し、それに続いて異所性にリンパ組織の形成が誘導される可能性が示唆された。さらに、唾液腺組織内における濾胞樹状細胞数や濾胞ヘルパー T 細胞数の減少をもたらし、MyD88 依存的シグナルが SS におけるリンパ濾胞や胚中心の形成に直接的に関与している可能性を示唆している。



次に NOD マウスならびに MyD88 遺伝子欠損 NOD マウスの唾液腺から抽出した RNA を用い、マイクロアレイによる網羅的解析を行った。まずデータセット解析により、MyD88 依存的な発現変動遺伝子 (DEG) を 230 種特定したが、このうち 196 種は MyD88 遺伝子欠損により発現が抑制される遺伝子であった (下図)。DEG のうち発現レベルの差が大きかった *Cxcl9*, *Bpifa2*, *C3*, *Lcn2* などはヒト Sjögren 症候群関連遺伝子として既に報告されているもののアナログ遺伝子であった。さらにマイクロアレイデータは、GO エンリッチメント解析、KEGG パスウェイ解析、STRING データベース解析、および INTERFEROME データベース解析に使用した。GO エンリッチメント解析の結果、ほとんどの DEG は、免疫学的プロセスに関与している遺伝子であると特定された。また KEGG パスウェイ解析により、DEG には全身性エリテマトーデスや関節リウマチなどの自己免疫疾患に関与する遺伝子が含まれていることが示された。さらに INTERFEROME データベース解析により、DEG には *Gbp2*, *Gbp3*, *Gbp4*, *Gbp7*, *Gbp11*, *Igtp*, *Irgm2*, *Iigp1*, *Ifitm2*, *Ifitm3*, *Irf9149* など 140 種類にもおよびインターフェロン (IFN) 調節遺伝子が含まれていることが明らかになった。以上、MyD88 は、NOD マウスの唾液腺における IFN 関連の免疫病理学的プロセスに関連する特定の遺伝子の発現に関与していることが明らかになった。この結果は、SS の症状における MyD88 依存性自然免疫シグナル伝達の役割を理解するために重要であると思われる。



さらに、培養細胞においてサイトカインLT₁によって誘導されるHEV関連遺伝子発現は、MyD88欠損によって発現が失われることを見出した。この結果は、ASにおけるMyD88の新しい役割を示すものと思われるが、その後研究期間や研究資金の制約がありあまり進展しなかったため、詳細については将来的に解明を目指していきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Into T, Niida S, Shibata KI	4. 巻 8
2. 論文標題 MyD88 signaling causes autoimmune sialadenitis through formation of high endothelial venules and upregulation of LT receptor-mediated signaling	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 14272
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-32690-x	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 Horie T, Inomata M, Into T	4. 巻 2018
2. 論文標題 OmpA-Like Proteins of Porphyromonas gingivalis Mediate Resistance to the Antimicrobial Peptide LL-37	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Pathogens	6. 最初と最後の頁 2068435
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2018/2068435	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 Inomata M, Horie T, Into T	4. 巻 13
2. 論文標題 OmpA-like proteins of Porphyromonas gingivalis contribute to serum resistance and prevent Toll-like receptor 4-mediated host cell activation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0202791
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0202791	査読の有無 無
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 Megumi Inomata, Toshi Horie, Takeshi Into	4. 巻 12
2. 論文標題 Effect of the Antimicrobial Peptide LL-37 on Gene Expression of Chemokines and 29 Toll-like Receptor-Associated Proteins in Human Gingival Fibroblasts Under Stimulation With Porphyromonas Gingivalis Lipopolysaccharide	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Probiotics Antimicrob Proteins	6. 最初と最後の頁 64-72
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12602-019-09600-2	査読の有無 無
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 Kataoka H, Saeki A, Hasebe A, Shibata K, Into T	4. 巻 9
2. 論文標題 Naringenin suppresses Toll-like receptor 2-mediated inflammatory responses through inhibition of receptor clustering on lipid rafts	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Food Science & Nutrition	6. 最初と最後の頁 963-972
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/fsn3.2063	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 Kataoka H, Mori T, Into T	4. 巻 70
2. 論文標題 Citrobacter koseri stimulates dendritic cells to induce IL-33 expression via abundant ATP production	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Medical Microbiology	6. 最初と最後の頁 3
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1099/jmm.0.001303	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 Mori T, Kataoka H, Into T	4. 巻 63
2. 論文標題 Effect of Myd88 deficiency on gene expression profiling in salivary glands of female non-obese diabetic (NOD) mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences	6. 最初と最後の頁 S1349
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.job.2021.04.003	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 -

〔学会発表〕 計13件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 引頭 毅、猪俣 恵、堀江 俊、安部雅世
2. 発表標題 MyD88依存的シグナルは高内皮細静脈の形成を介して自己免疫性唾液腺炎を誘導する
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Into T., Inomata, M., and Abe M.
2. 発表標題 MyD88 signaling causes formation of high endothelial venules to develop autoimmune sialadenitis
3. 学会等名 The JADR 2018/ 66th Japanese Division Meeting 2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Inomata, M., Abe M, and Into T.
2. 発表標題 Outer membrane proteins of Porphyromonas gingivalis are involved in the resistance to antimicrobial peptides
3. 学会等名 The JADR 2018/ 66th Japanese Division Meeting 2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Abe M, Inomata, M., and Into T.
2. 発表標題 The antimicrobial peptide LL-37 exerts regulatory effects on expression of Toll-like receptor-associated genes in human gingival fibroblasts
3. 学会等名 The JADR 2018/ 66th Japanese Division Meeting 2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 引頭 毅、堀江 俊、猪俣 恵
2. 発表標題 Porphyromonas gingivalisの外膜糖タンパク質は抗菌ペプチドLL-37への抵抗性を有する
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会（札幌）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Inomata M. and Into T.
2. 発表標題 Involvement of P2X7 receptor in chemokine production and cytotoxicity induced by the antimicrobial peptide LL-37 in human gingival fibroblasts
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会（東京）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Saeki A., Into T., Hasebe A., Suzuki T. and Shibata K.
2. 発表標題 IL-1 release by living macrophages in response to mycoplasmal lipoproteins and lipopeptides
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会（東京）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Inomata M. and Into T.
2. 発表標題 Role of P2X7 in LL-37-induced chemokine production and cytotoxicity in gingival fibroblasts
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会（名古屋）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Saeki A., Into T., Hasebe A. and Shibata K.
2. 発表標題 Activation of NLRP3 inflammasome by mycoplasmal lipoproteins/lipopeptides only through the TLR2-mediated signals in murine macrophages
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会（名古屋）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Inomata, M, and Into T
2. 発表標題 The antimicrobial peptide LL 37 forms a complex with DNA from periodontopathic bacteria and exerts osteoclast inducing activity
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Mori T, Kataoka H, Into T
2. 発表標題 A role of MyD88 signaling in lymphoid follicle formation in the salivary gland of NOD mice
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kataoka H., Mori T., Into T
2. 発表標題 Citrobacter koseri induces IL-33 production in dendritic cells through ATP
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kataoka H., Mori T., Into T
2. 発表標題 Analysis of IL-33-inducing activity of Citrobacter koseri in dendritic cells
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
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
---------	---------