

令和 4 年 5 月 20 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08898

研究課題名(和文) マスト細胞を介したシェーグレン症候群唾液腺炎メカニズム解析と治療への応用

研究課題名(英文) Mast cells can produce transforming growth factor b1 and promote tissue fibrosis during the development of Sjogren's syndrome-related sialadenitis

研究代表者

海江田 信二郎 (Kaieda, Shinjiro)

久留米大学・医学部・准教授

研究者番号：20330798

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：マスト細胞はシェーグレン症候群唾液腺炎症部位において有意な数の増多を認め、唾液分泌能と負の相関を認めた。マスト細胞・線維芽細胞の共培養実験やmast cell-conditioned mediumを用いた線維芽細胞培養実験を行いマスト細胞由来TGF- β 1が線維芽細胞のType1 collagen産生亢進を介し組織線維化へ寄与することを明らかにした。また蛍光免疫染色を用い、シェーグレン症候群唾液腺炎症部位でマスト細胞はTGF- β 1のcell sourceであることを明らかにした。これらの研究成果よりマスト細胞はTGF- β 1産生を介し組織線維化促進的に作用し、唾液分泌能低下へ寄与することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

シェーグレン症候群は唾液や涙液分泌が障害され慢性的に乾燥症状が持続し、QOLが低下する難治性疾患である。唾液腺炎症を抑制する根本治療は確立されておらず対症療法が主となっている。本研究ではマスト細胞が唾液腺炎症部位で増殖し、TGF- β 1を産生を介して線維芽細胞によるコラーゲン線維産生を促進することを明らかにした。シェーグレン症候群においてマスト細胞およびTGF- β 1を阻害することで組織線維化を抑制し唾液分泌能低下を軽減させる新規治療法の確立が期待される。

研究成果の概要(英文)：This study investigated the associations of mast cells with immune-mediated inflammation and fibrosis in patients with primary Sjogren's syndrome (pSS). Mast cell numbers in labial salivary glands were significantly greater in pSS than in control individuals. In salivary glands from patients with pSS, mast cell number was significantly correlated with fibrosis extent; moreover, mast cells were located near fibrous tissue and expressed TGF- β 1. Col1a and TGF- β 1 mRNAs were upregulated in cocultured fibroblasts and HMC-1 cells, respectively. Fibroblasts cultured in HMC-1 conditioned medium exhibited upregulation of Col1a mRNA; this was abrogated by TGF- β 1 neutralizing antibodies. Mast cell numbers were elevated in patients with pSS-related sialadenitis; these cells were located near fibroblasts and expressed TGF- β 1. TGF- β 1 could induce collagen synthesis in fibroblasts, which might contribute to fibrosis.

研究分野：リウマチ膠原病内科

キーワード：シェーグレン症候群 マスト細胞 唾液腺炎 組織線維化 TGF

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

シェーグレン症候群は、唾液腺や涙腺などの外分泌腺にリンパ球が浸潤し、それに伴い腺組織が特異的に障害を受ける自己免疫性疾患であり、眼および口腔乾燥症を主症状とする。病理組織学的所見では小葉内導管周囲のリンパ球浸潤に加え、小葉内および小葉間質の線維化や脂肪変性が認められる。自己抗体や免疫複合体の形成および臓器に浸潤した自己反応性リンパ球の存在により、自己免疫が病因として考えられる。しかし、その発症機序に未解明な部分が多く、根本治療は未だ確立されていない。近年唾液腺炎に対して B 細胞および共刺激分子をターゲットとしたリツキシマブやアバタセプトの治療効果が報告されているが、さらなる治療標的分子の同定が必要である。

マスト細胞は気管支喘息などのアレルギー性疾患の発症に中心的な役割を果たすことが知られている。その一方で関節リウマチや全身性強皮症などの慢性炎症を来し組織線維化へ至る自己免疫性疾患においてその数の増加が報告され、病態への関与が報告されている。(Am Rev Respir Dis.;148:80-86,1993, Arthritis Rheum.;30:130-137,1987)。われわれはシェーグレン症候群および Sicca 症候群の小唾液腺生検組織において tryptase 陽性マスト細胞はシェーグレン症候群において有意にその数の増多を認めることを確認した。またマスト細胞数と Saxon's test において有意に逆相関を認め、唾液分泌低下への関与が示唆された。Focus score とマスト細胞数の有意な相関は認めなかったが、唾液腺組織線維化病理スコア (Clin Exp Rheumatol.1;16:63-65,1998) とマスト細胞数の有意な相関を認め、唾液腺炎における炎症 (リンパ球浸潤) よりも組織線維化への関与があきらかになった。さらにマスト細胞は EVG 染色陽性線維化病変部近傍で増殖し、線維芽細胞と密接な位置関係を示し、線維芽細胞機能修飾を介した線維化への関与が推測される。しかし、これまでマスト細胞のシェーグレン症候群に伴う唾液腺炎への病態関与について詳細は明らかにされていない。マスト細胞は唾液腺線維化部位で増殖し

- 線維芽細胞の線維化促進機能的サブセットへの分化誘導
- 線維芽細胞の活性化 (線維化促進因子および I・III 型コラーゲン産生亢進) に作用し、線維化促進に重要な役割を果たす作業仮説に至り本研究を立案した。

2. 研究の目的

マスト細胞は線維芽細胞の機能修飾を介して線維化病変促進的に作用し、唾液腺炎へ関与する作業仮説に至った。唾液腺炎に対する根本治療は確立されておらず、その発症抑制が困難である現状から、本研究で炎症後に誘導される唾液腺線維化抑制を介した新規治療法の確立を研究目標とした。本研究でマスト細胞の唾液腺炎病態関与メカニズムが明らかになれば、masitinib による直接的なマスト細胞活性化抑制やその関連因子を標的とした治療応用が期待される。

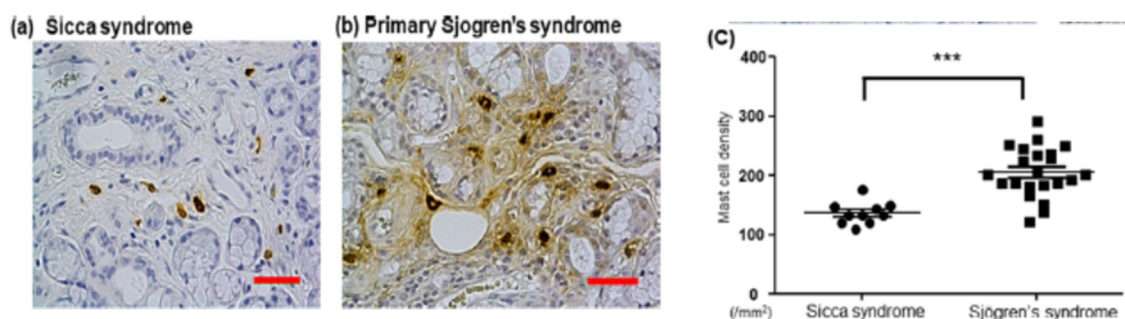
3. 研究の方法

シェーグレン症候群および Sicca 症候群症例における小唾液腺組織においてマスト細胞特異的トリプターゼ染色を行いマスト細胞数の評価を行った。マスト細胞数と唾液分泌量との相関や病理組織学検索により focus score や組織線維化スコアとマスト細胞数との関連性について検討した。

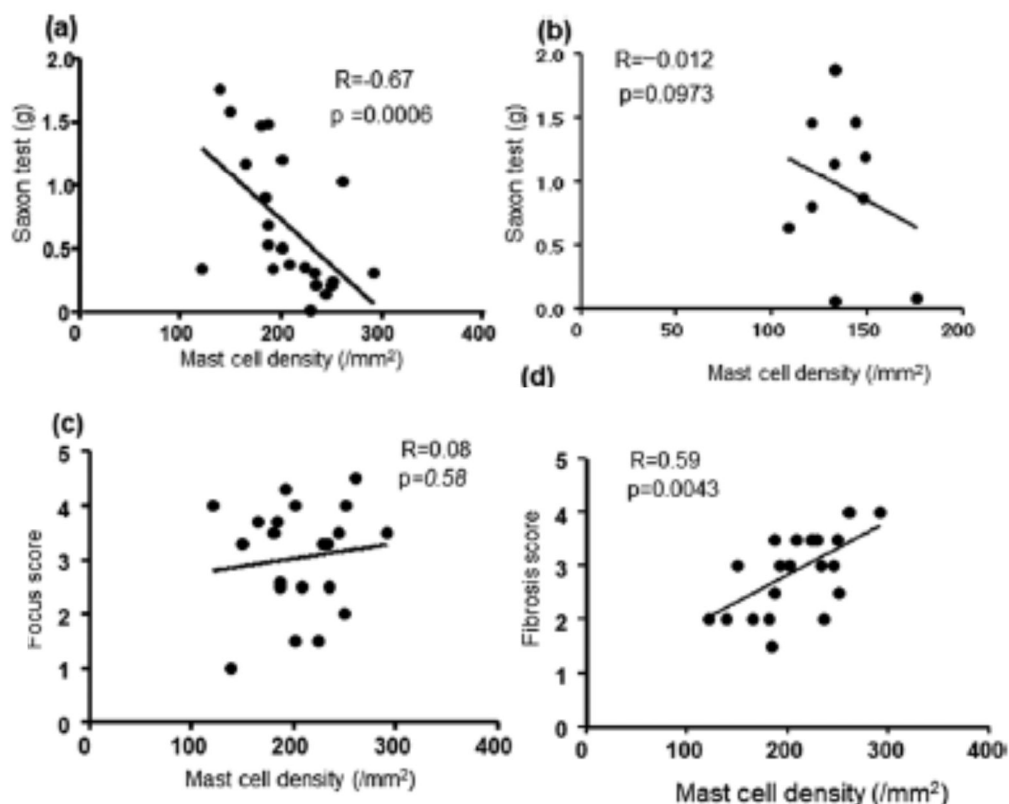
小唾液腺組織の線維化病変評価については EVG 染色を行った。線維芽細胞は Vimentin 抗体を用いた蛍光免疫染色により同定した。In vitro 実験によりマスト細胞と線維芽細胞との機能的関連性を調べるため Human mast cell line-1 (HMC-1) と線維芽細胞の共培養実験を行いマスト細胞による線維芽細胞の機能修飾について検討した。マスト細胞由来可溶性因子の線維芽細胞機能修飾について検討するため mast cell-conditioned medium を作成した。HMC-1 細胞をヒトリコンビナント IL-33 および SCF で 24 時間刺激し、2 回洗浄後さらに刺激した HMC-1 細胞培養を 24 時間行い回収した培養液を mast cell-conditioned medium として線維芽細胞培養へ使用した。マスト細胞由来 TGF の機能解析のため TGF 中和抗体を用い mast cell-conditioned medium を用いた線維芽細胞実験を行った。マスト細胞がシェーグレン症候群唾液腺炎において TGF 1 の cell source になり得るか、トリプターゼおよび TGF 1 の蛍光免疫染色を行った。

4. 研究成果

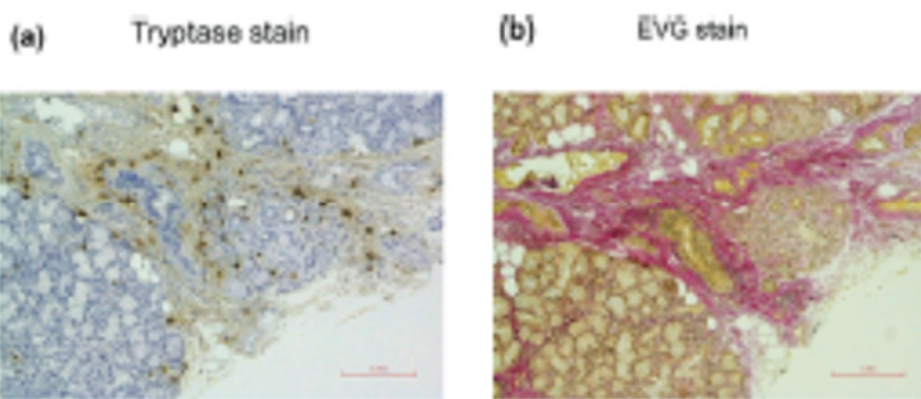
小唾液腺病理組織検体を用い、マスト細胞特異的 tryptase 染色を行った。Sicca 症候群(下図 a)と比較し、シェーグレン症候群 小唾液腺病理組織において(下図 b)マスト細胞の有意な数の増多を認めた(下図 c)。



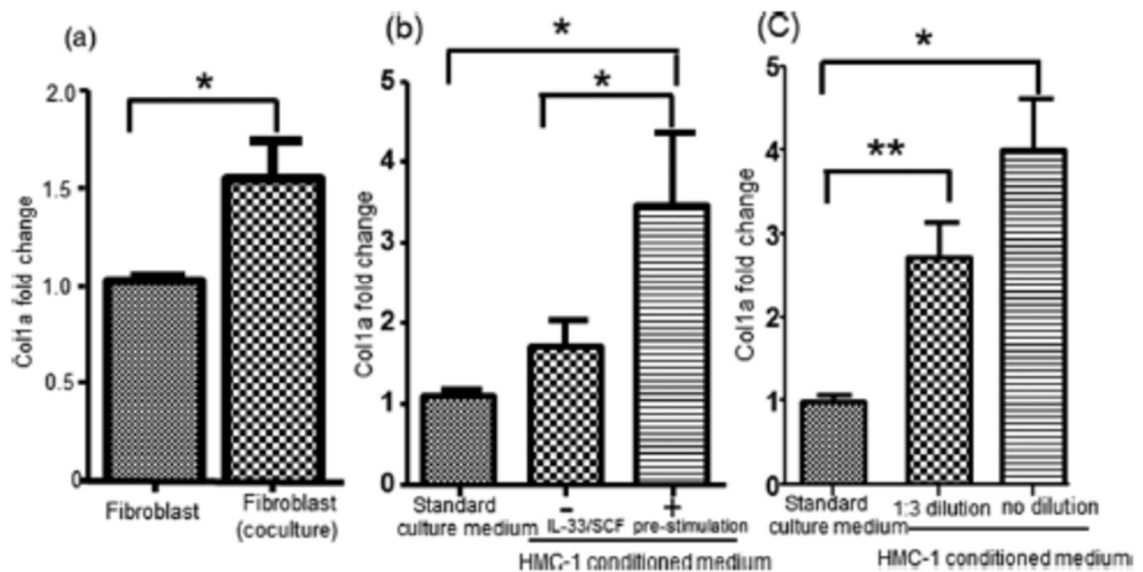
マスト細胞数はシェーグレン症候群症例においてサクソンテスト結果と有意に逆相関を示していたためマスト細胞数の増多は唾液分泌能低下へ寄与することが推測された(下図 a)。Sicca症候群ではマスト細胞数と唾液分泌能との相関は認めなかった(下図 b)。マスト細胞数と唾液腺炎 Focus score と相関は認めなかった(下図 c)。しかし唾液腺組織線維化病理組織スコアと有意な相関を認め、唾液腺炎症よりも組織線維化病態への関与が示唆された(下図 d)。



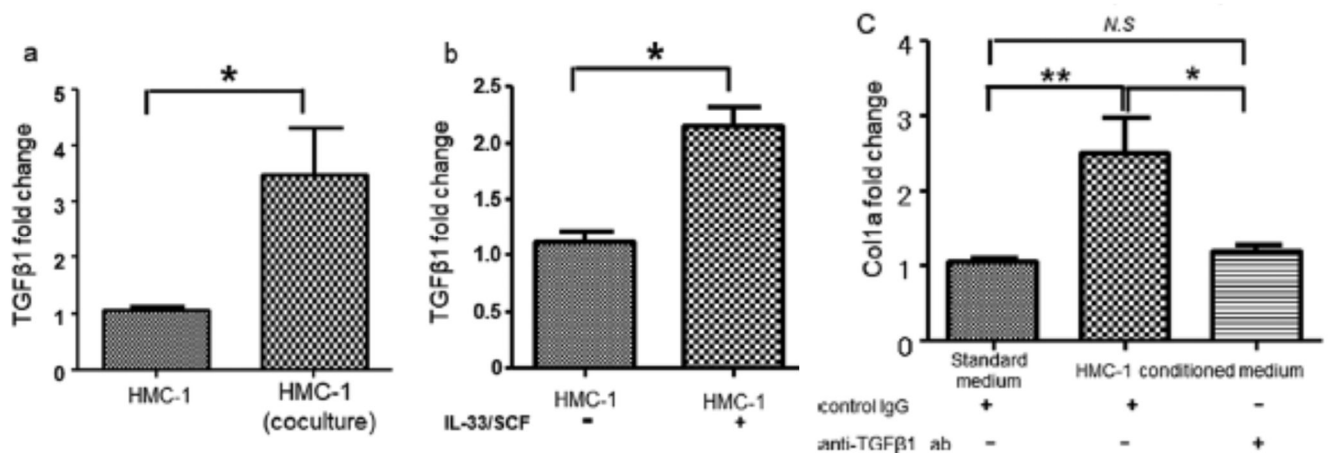
マスト細胞の唾液腺炎部における分布について免疫染色を行いマスト細胞特異的トリプターゼ染色(下図 a)と線維化病変同定のため EVG 染色(下図 b)を行った。マスト細胞は線維化部位近傍で増殖を認め、さらに Vimentin 陽性線維芽細胞近位に位置することが明らかとなった。そのためマスト細胞の線維芽細胞の機能修飾を介した組織線維化寄与メカニズムについて検討を行った。



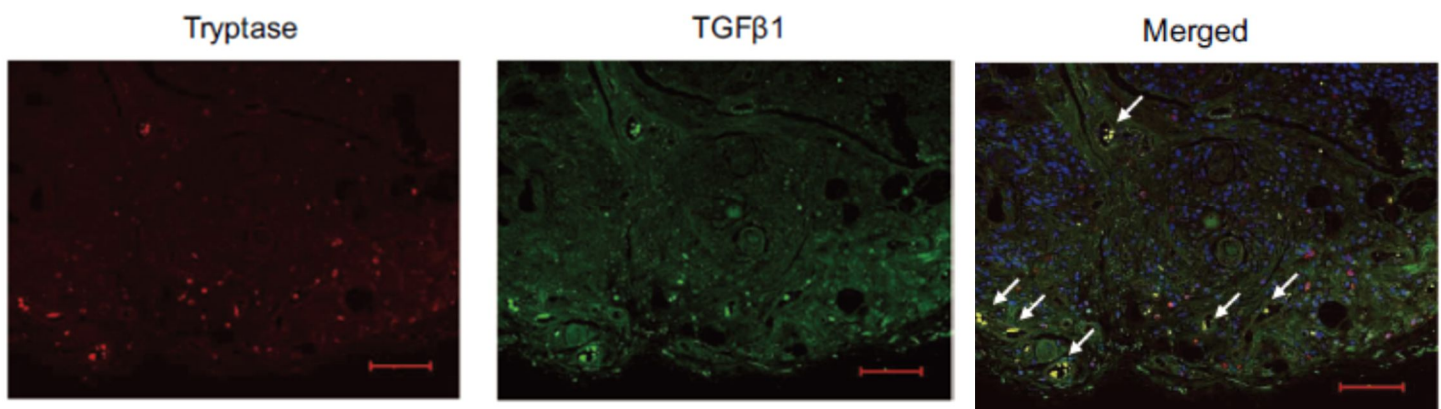
In vitro 実験で HMC-1 とヒト肺線維芽細胞を用いてマスト細胞の線維芽細胞機能修飾を介した組織線維化メカニズムの解析を行った。HMC-1 と線維芽細胞の共培養実験を行い、マスト細胞は線維芽細胞の Type I collagen 責任遺伝子 (Col1a) の発現を有意に上昇させることを RT-PCR 法で確認した(下図 a)。また HMC-1 を IL-33 および SCF で 24 時間刺激後得られた mast cell-conditioned medium で線維芽細胞を刺激すると無刺激で得られた mast cell conditioned medium や通常の培養液を用い培養を行った線維芽細胞群と比較し Col1a 遺伝子は有意に上昇を認めた(下図 b)。また mast cell-conditioned medium のその希釈倍率に逆相関して線維芽細胞の Col1a 遺伝子の発現は有意に上昇し、マスト細胞由来可溶性因子が線維芽細胞のコラーゲン線維 (Type I Collagen) 産生促進的に作用することを明らかにした(下図 c)。



HMC-1 細胞は線維芽細胞との共培養や IL-33 SCF 刺激で TGF β 1 mRNA の有意な発現上昇を認めため (下図 a,b) マスト細胞由来 TGF β 1 の線維芽細胞 collagen 産生への関与について TGF 中和抗体を用い検討を行った。Mast cell-conditioned medium による線維芽細胞培養実験で TGF β 1 中和抗体を用いたところ線維芽細胞の Col1a 遺伝子発現上昇は有意に阻害された(下図 c)。これらの結果からマスト細胞由来 TGF β が線維芽細胞の collagen 産生に寄与して唾液腺組織線維化へ促進的に作用することが推測された。



シェーグレン症候群唾液腺炎症部においてマスト細胞が TGF β 1 の cell source となりうるか mast cell tryptase と TGF β 1 の蛍光 2 重免疫染色を行った。Tryptase 染色と TGF β 1 蛍光組織免疫染色を行いマスト細胞は TGF β 1 陽性であることを確認した (下右図; tryptase/TGF β 1 陽性細胞)。



我々は本研究の実験結果からマスト細胞の産生する TGF- β 1 が線維芽細胞 Type I collagen 産生を促進しシェーグレン症候群随伴唾液腺炎組織線維化に寄与し唾液分泌能低下へ関与することを明らかにした。この研究成果は 2021 年 シェーグレン症候群学会(題名:シェーグレン症候群における唾液腺炎に対するマスト細胞の関与)および 2021 年アメリカリウマチ学会年次総会(ACR 2021)(題名:Mast Cells Contribute to the Development of Lung Fibrosis via Inducing Myofibroblast Differentiation by TGF- β 1 Production)で発表を行った。最終的に Modern Rheumatology 誌に責任著者として論文発表を行った(**Kaieda S et al. Mast cells can produce transforming growth factor β 1 and promote tissue fibrosis during the development of Sjogren's syndrome-related sialadenitis. Mod Rheumatol. 2021 in press.**)。

本研究では

a) 線維芽細胞の線維化促進機能的サブセットへの分化誘導

b) 線維芽細胞の活性化(線維化促進因子および I・III 型コラーゲン産生亢進)

マスト細胞が作用し、線維化促進に重要な役割を果たす作業仮説に対して研究を行った。仮説 b) に関してはそのメカニズムを解析し、成果を論文発表することが可能であった。仮説 a) に関してはシェーグレン症候群唾液腺炎症組織線維化部位で α -smooth muscle actin 陽性筋線維芽細胞の増多は認めずマスト細胞の線維芽細胞筋線維芽細胞分化の唾液腺炎組織線維化メカニズムの関与のついては詳細は検討できていない。しかしわれわれは本研究においてシェーグレン症候群随伴間質性肺炎において肺線維化部位でマスト細胞および筋線維芽細胞の増多を認め、この 2 細胞が近位に位置することを確認している、マスト細胞は唾液腺炎と異なる作用機序で間質性肺炎障害において線維化促進的に作用する可能性を認めた。間質性肺炎障害におけるマスト細胞の組織線維化メカニズム解析も今後すすめて行く予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 4件）

| | |
|---|------------------------|
| 1. 著者名 Fujimoto K, Hidaka Y, Koga T, Kaieda S, Yamasaki S, Nakashima M, Hoshino T, Yamamoto K, Nishikomori R, Ida H | 4. 巻 in Press |
| 2. 論文標題 MEFV E148Q variant is more associated with familial Mediterranean fever when combined with other non-exon 10 MEFV variants in Japanese patients with recurrent fever | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Modern Rheumatology | 6. 最初と最後の頁 in Press |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14397595.2021.1880534 | 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 Fujiwara Y, Ohnishi K, Horlad H, Saito Y, Shiraiishi D, Takeya H, Yoshii D, Kaieda S, Hoshino T, Komohara Y. | 4. 巻 25 |
| 2. 論文標題 CD163 deficiency facilitates lipopolysaccharide-induced inflammatory responses and endotoxin shock in mice | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Clinical Translational Immunology | 6. 最初と最後の頁 e1162 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cti2.1162 | 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 Kaieda S, Koga T, Yamada K, Ida H | 4. 巻 in Press |
| 2. 論文標題 Share Epstein-Barr Virus-Related Lymphoproliferative Disorders-Associated Polymyositis in a Patient With Rheumatoid Arthritis | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Clinical Rheumatology | 6. 最初と最後の頁 in Press |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 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 Kaieda S, Gono T, Masui K, Nishina N, Sato S, Kuwana M | 4. 巻 15 |
| 2. 論文標題 Evaluation of usefulness in surfactant protein D as a predictor of mortality in myositis-associated interstitial lung disease. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 PLoS One | 6. 最初と最後の頁 e0234523 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0234523. | 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 Fujimoto K, Hidaka Y, Koga T, Kaieda S, Yamasaki S, Nakashima M, Hoshino T, Ida H | 4. 巻 59 |
| 2. 論文標題 Clinical and Genetic Analysis of 22 Japanese Patients with Familial Mediterranean Fever: An Examination of MEFV and 10 Other Genes Related to Autoinflammatory Syndromes. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Internal Medicine | 6. 最初と最後の頁 1373-1378 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.3778-19. | 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 海江田信二郎 | 4. 巻 63 |
| 2. 論文標題 肥満細胞は関節リウマチの疾患活動性と関連し自己抗体産生に寄与する | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 リウマチ科 | 6. 最初と最後の頁 325-328. |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 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 海江田信二郎 | 4. 巻 83 |
| 2. 論文標題 関節炎におけるマスト細胞の関与 | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 久留米医学会雑誌 | 6. 最初と最後の頁 124-127 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 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 海江田信二郎 | 4. 巻 63 |
| 2. 論文標題 肥満細胞は関節リウマチの疾患活動性と関連し自己抗体産生に寄与する | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 リウマチ科 | 6. 最初と最後の頁 325-328 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 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 Nouno T, Okamoto M, Ohnishi K, Kaieda S, Tominaga M, Zaizen Y, Ichiki M, Momosaki S, Nakamura M, Fujimoto K, Fukuoka J, Shimizu S, Komohara Y, Hoshino T. | 4. 巻 11 |
| 2. 論文標題 Elevation of Pulmonary CD163 + and CD204 + Macrophages Is Associated With the Clinical Course of Idiopathic Pulmonary Fibrosis Patients | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Thoracic Disease | 6. 最初と最後の頁 4005-4017 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21037/jtd.2019.09.03. | 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 Nakamura M, Okamoto M, Fujimoto K, Ebata T, Tominaga M, Nouno T, Zaizen Y, Kaieda S, Tsuda T, Kawayama T, Hoshino T | 4. 巻 7 |
| 2. 論文標題 A Retrospective Study of the Tolerability of Nintedanib for Severe Idiopathic Pulmonary Fibrosis in the Real World | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Annals of Translational Medicine | 6. 最初と最後の頁 262-270 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21037/atm.2019.05.33. | 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 Yoshida Y, Kaieda S, Furuta T, Ida H | 4. 巻 58 |
| 2. 論文標題 Juxta-vertebral Lesions Associated With Granulomatosis With Polyangiitis | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Internal Medicine | 6. 最初と最後の頁 2587-2588 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.2903-19. Epub 2019 May 22 | 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 Ito S, Tahara N, Hirakata S, Kaieda S, Tahara A, Maeda-Ogata S, Bekki M, Sugiyama Y, Honda A, Igata S, Kuromatsu R, Nakashima O, Fukumoto Y | 4. 巻 in press |
| 2. 論文標題 Signal Intensity of Superb Micro-Vascular Imaging Associates With the Activity of Vascular Inflammation in Takayasu Arteritis | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Nuclear Cardiology | 6. 最初と最後の頁 in press |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12350-019-01665-4. Online ahead of print. | 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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 Shinjiro Kaieda ¹ , Kyoko Fujimoto ¹ and Hiroaki Ida |
| 2. 発表標題 Mast Cells Contribute to the Development of Sialadenitis Associated with Sjogren's Syndrome via Inducing Tissue Fibrosis by TGF Production |
| 3. 学会等名 2020 American College of Rheumatology annual meeting (国際学会) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|----------------------------------|
| 1. 発表者名 海江田信二郎 |
| 2. 発表標題 シェーグレン症候群に対するマスト細胞の関与 |
| 3. 学会等名 第63回日本リウマチ学会総会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Shinjiro Kaieda, Takahisa Gono, Kenichi Masui, Naoshi Nishina, Shinji Sato and Masataka Kuwana |
| 2. 発表標題 Surfactant Protein D as a Useful Predictor for Mortality in Myositis-associated Interstitial Lung Disease: A Dimorphic Model Based on anti-MDA5 Antibody |
| 3. 学会等名 2019 ACR/ARP Annual Meeting (国際学会) |
| 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 |
|-------|---------------------------|-----------------------|----|
| 研究分担者 | 星野 友昭 | 久留米大学・医学部・教授 | |
| | (Hoshino Tomoaki) | | |
| | (00261066) | (37104) | |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|