

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K17445

研究課題名（和文）シェーグレン症候群唾液腺におけるTLR7シグナル活性および機能解析

研究課題名（英文）TLR7 Signaling Activity and Functional Analysis in Salivary Glands with Sjogren's Syndrome

研究代表者

清水 俊匡（Shimizu, Toshimasa）

長崎大学・病院（医学系）・助教

研究者番号：40770467

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：シェーグレン症候群(SS)の病態における自然免疫の役割が注目されている。SSの唾液腺上皮細胞に対してToll-like receptor (TLR)7のリガンド刺激で、I型インターフェロン活性シグナルに加え、MHC class Iの発現増強、またSSの自己抗原の一つであるRo52の発現増強を認めた。さらにMHC class Iを介した抗原提示の際に必要なMHC class I peptide-loading complexの構成蛋白の発現増強をSSの唾液腺組織中の導管上皮、またTLR7リガンド刺激後の唾液腺上皮細胞で確認した。以上からTLR7シグナル活性が抗原提示に関わることが示唆された。

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の病態に関する免疫機構の異常はいまだ不明な点が多く、十分な治療薬も存在しない。T細胞、B細胞異常などの獲得免疫異常が中心と考えられていた中で、その上流機構にあたる自然免疫の関与を多くに本疾患の炎症の主座である唾液腺を用いて検討した。その点で本検討はシェーグレン症候群の免疫活性の多くに発症早期の機序の解明の一助になると考える。

研究成果の概要（英文）：The role of innate immunity in the pathogenesis of Sjogren's syndrome (SS) has attracted attention. The study showed that stimulation of salivary gland epithelial cells of SS by Toll-like receptor (TLR) 7 ligands enhanced the expression of MHC class I and Ro52, one of SS autoantigens. In addition, the expression of the MHC class I peptide-loading complex, which is necessary for MHC class I-mediated antigen presentation, was enhanced in the epithelium of salivary gland tissues in SS and in salivary gland epithelial cells after TLR7 ligand stimulation. These results suggested that TLR7 signaling was involved in antigen presentation.

研究分野：リウマチ・膠原病内科学

キーワード：シェーグレン症候群 TLR7

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(SS)は涙腺および唾液腺の慢性炎症によるドライアイ、ドライマウスを主症状とし、また全身の臓器病変を合併しうる自己免疫疾患である。SSにおいて唾液腺局所に浸潤している細胞の多くはT細胞およびB細胞であり、また抗SS-A/Ro抗体をはじめとした自己抗体が産生されることから獲得免疫主体の免疫異常が病態形成の中心と考えられていたが、種々のウイルス感染などの環境因子が免疫異常を惹起する可能性が示唆されていること、またI型インターフェロン(IFN)活性の病態への関与が報告されており、自然免疫系の病態への関与も注目されてきている。

我々は自然免疫系の活性に関与する病原体センサーの中心の一つであり、I型IFN活性に関与するToll-like receptors(TLRs) 7-9のSS唾液腺における機能を解析してきた。

その結果、SSの唾液腺ではTLR7-9のうちTLR7優位の発現を導管上皮と浸潤細胞(特に形質細胞様樹状細胞(pDC)およびB細胞)に認め、導管上皮とpDCにおいてはI型IFN活性につながるTLR7の下流シグナルの発現を認めることを明らかにした。SS唾液腺におけるTLR7の活性、I型IFN活性がどのようにSSの唾液腺炎病態に影響を与えるか、そのシグナル解析をおこなうこととした。

2. 研究の目的

SSにおけるTLR7シグナル活性とその機能を解明していくことを目的とした。SSにおける唾液腺標本また唾液腺培養上皮細胞を用いて機能解析をおこなうことでよりその病態解明に迫ることができると考えた。

3. 研究の方法

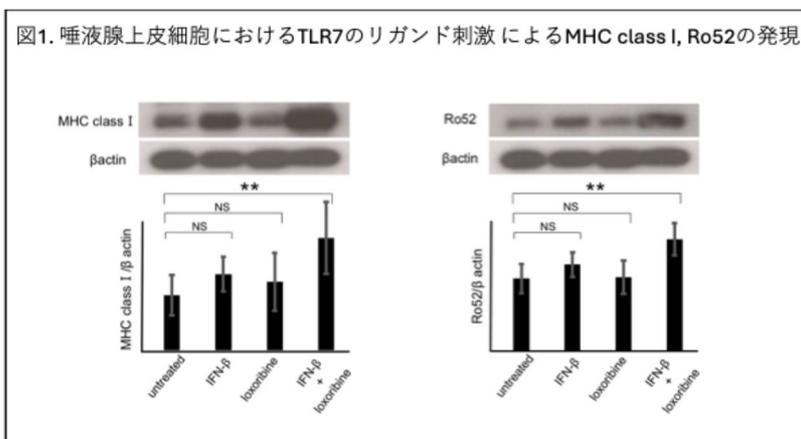
SSと口腔乾燥症状を認めるが、SSと診断されない患者をコントロールとした。

唾液腺組織中の浸潤細胞および導管上皮の蛋白発現を免疫染色で確認した。

SS患者から採取した小唾液腺より培養した培養唾液腺上皮細胞を用いて、TLR7アゴニストで刺激後の蛋白発現の挙動を免疫細胞染色、ウェスタンブロットまたはSimple Western system (WES)で確認した。

4. 研究成果

SS唾液腺上皮細胞に対してTLR7のリガンド刺激をおこなったところ、MHC class Iの発現増強、またSSにみられる自己抗体の一つである抗SS-A/Ro抗体の対応抗原であるRo52の発現増強をウェスタンブロットで確認した(図1)。くわえて免疫細胞染色でもSS唾液腺上皮細胞中で同様にこれらの発現増強を認めた(図2)。SS症例の唾液腺組織の導管上皮においてもこれら蛋白の発現増強を認めた。さらに



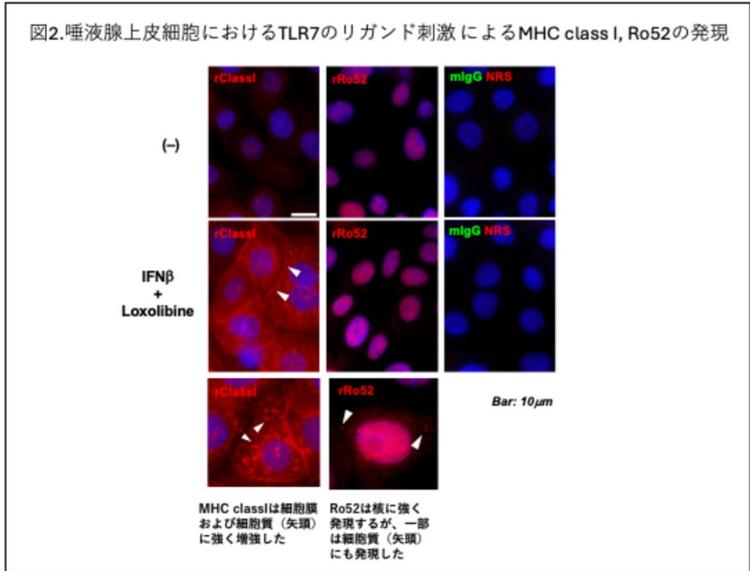
Ro52 は唾液腺上皮細胞中 MHC class I で免疫沈降して得られた蛋白ライセート中でも TLR7 刺激後発現増強していた (図 3)。

抗原提示細胞に発現する MHC class I を介して抗原ペプチドは T 細胞等の免疫細胞に抗原提示され、免疫応答が活性化される。上記結果より TLR7 シグナル活性が自己抗原の発現増強を引き起こし、その抗原提示を促し、獲得免疫活性を引き起こす可能性を考慮し次の検討にすすめた。

TLR7 刺激で抗原提示をすすめるか確認するため、抗原ペプチドが MHC class I と結合する際に必要な MHC class I peptide-loading complex (PLC)の形成を認めるかどうかを確認した。その結果、唾液腺上皮細胞において、TLR7 刺激後に PLC の発現増強を認めた。SS の唾液腺組織の導管上皮でも PLC の発現増強を認めた (図 4)。

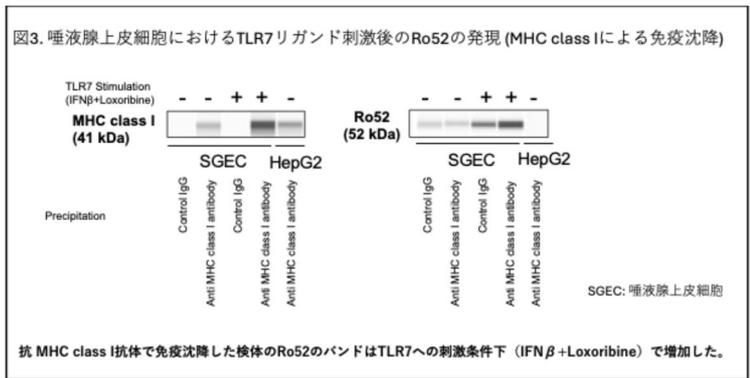
以上の検討をおこなった。今後 MHC class I を介して提示されるペプチド断片の詳細検討、また抗原提示先であると考えられる CD8 陽性 T 細胞の機能解析に関して進めていき病態解明に努めたいと考える。

図2.唾液腺上皮細胞におけるTLR7のリガンド刺激によるMHC class I, Ro52の発現



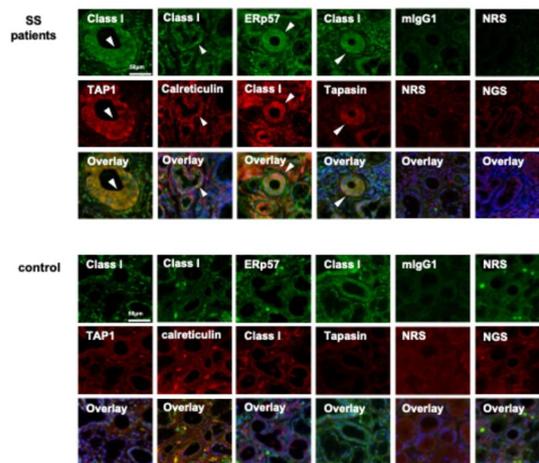
MHC class Iは細胞膜および細胞質(矢頭)に強く増強した
Ro52は核に強く発現するが、一部は細胞質(矢頭)にも発現した

図3.唾液腺上皮細胞におけるTLR7リガンド刺激後のRo52の発現(MHC class IIによる免疫沈降)



抗 MHC class I抗体で免疫沈降した検体のRo52のバンドはTLR7への刺激条件下 (IFNβ + Loxoribine) で増加した。

図4.唾液腺におけるMHC class I peptide-loading complex (PLC) の形成



SS患者の唾液腺導管上皮ではMHC class I発現増強上皮にPLC (TAP1, calreticulin, Tapasin)を形成する蛋白の発現増強を認めた

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shimizu Toshimasa, Nakamura Hideki, Kawakami Atsushi	4. 巻 22
2. 論文標題 Role of the Innate Immunity Signaling Pathway in the Pathogenesis of Sjogren ' s Syndrome	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3090 ~ 3090
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22063090	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------