

令和 5 年 4 月 10 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2022

課題番号：20K23085

研究課題名（和文）IgG4関連疾患におけるIRAK4を介した線維化のメカニズムについての解析

研究課題名（英文）Analysis about the mechanism of fibrosis via IRAK4 in the IgG4-related disease

研究代表者

鎮守 晃（Chinju, Akira）

九州大学・大学病院・医員

研究者番号：00876542

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）：本研究の目的は、IgG4関連疾患の線維化に關与する自然免疫担当細胞を活性化させる分子を同定・解析することにより、その発症や病態進展のメカニズムを解明し、最終的には新規標的分子治療の確立を目指すことであった。IgG4関連疾患の線維化に關与する自然免疫担当細胞としてTLR7を発現したCD163陽性M2マクロファージを同定し、その下流シグナル伝達経路として、IRAK4-NFκBシグナル経路が刺激誘導されることを明らかにしてきた。それにより線維化促進サイトカインを産生し、IgG4関連疾患に特徴的な線維化が促進され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

これまでの報告では、IgG4関連疾患の病態形成にTLR7が關与しているという報告はあったが、特に線維化においては、どのようなメカニズムで発症および病態進展を生じるかは不明な点が多かった。本研究では、TLR7を発現したCD163陽性M2マクロファージがリガンド刺激を受けることにより、その下流シグナル経路であるIRAK4-NFκBシグナルが刺激誘導され、線維化関連サイトカインを産生し、線維化を強く促進をすることを明らかとし、これまでに報告がない未知の結果を得ることができた。さらに、このシグナル経路を標的とした治療法の開発といった新たな視点を獲得することができた。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study elucidated mechanism of fibrosis in IgG4-related disease by identification innate immunity molecules and establish the new target molecules treatment. I identified the CD163-positive M2 macrophage which expressed TLR7 and the downstream signal IRAK4-NFκB signaling with activate fibrosis in IgG4-related disease.

研究分野：口腔外科

キーワード：IgG4関連疾患 TLR7 IRAK4 NFκB

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

われわれはこれまでに IgG4-RD の病態形成に TLR7 が強く関与していることを明らかにしてきた。この TLR7 はヒトとマウスでは機能が異なることが知られているため、ヒト TLR7 をノックインし、マウス TLR7 をノックアウトしたヒト TLR7 トランスジェニック (TG) マウスを製作し、解析を行った。その結果、血清 IgG1 値 (ヒト IgG4 に相当) の高値や病変局所へのリンパ球浸潤および線維化を認めることを明らかにしてきた。しかし、その作用機序については不明な点が多く、特に IgG4-RD の臓器障害に関わる線維化についてはさらなる解析が必要であった。そこで先行研究では、線維化に関与する TLR7 下流分子を同定するためにヒト TLR7 TG マウスの顎下腺を用いて DNA マイクロアレイを行い、IgG4-RD 患者と共通して発現上昇を認めた分子として IRAK4 (IL-1 受容体随伴性キナーゼ (IL-1 receptor associated kinase 4)) を抽出した。また、IgG4-RD では IRAK4 の mRNA 発現量が有意に高く、免疫組織化学染色法でも病変局所において IRAK4 の強い発現を認めた。さらに TLR7 下流シグナル経路の検討を目的にヒト PBMC から CD163+M2 マクロファージ (Mφ) を抽出し、TLR7 アゴニストおよび IRAK4 阻害剤を用いて解析を行った。TLR7 アゴニスト刺激により IRAK4、NFκB の mRNA 発現量は有意に上昇しており、培養上清中の IL-1β、TGF-β の濃度は有意に高かった一方、IRAK4 阻害剤によりそれらは有意に低下していた。本研究で注目している IRAK4 は、TLR がリガンド刺激を受けることで活性化され、炎症性サイトカイン産生を誘発すると考えられており、IL-1 や TGF-β などを産生することにより線維化に強く関与することが知られている。このように、本研究は従来の研究成果および臨床経験をもとに着想したもので、IgG4-RD における線維化の詳細なメカニズムや世界初の IgG4-RD モデルマウスに関する研究は未だ報告されておらず、独自の視点に立った極めて独創的なものである。

2. 研究の目的

IgG4 関連疾患 (IgG4-RD) は、高 IgG4 血症や著明な IgG4 陽性形質細胞浸潤を特徴とする全身性の疾患であり、臨床的には著しい線維化によって罹患臓器の機能不全を呈することが知られている。近年、IgG4-RD の病態形成に自然免疫が強く関与していることが示唆されており、我々も自然免疫に重要な病原体認識センサーである Toll 様受容体 (TLR) に注目して研究を進めてきた。その結果、ヒト TLR7 トランスジェニックマウスでは、IgG4-RD の好発臓器 (顎下腺・膵臓) において線維化が顕著に亢進していることが明らかとなった。しかし、その表現型がどのような機序で発現するのかについては不明であったため、本研究では TLR7 下流分子に注目して IgG4-RD における線維化のより詳細なメカニズムを解析するとともに、その線維化促進分子を標的とした新規治療法の確立を目指すことを目的とする。

3. 研究の方法

DNA マイクロアレイでの解析 (研究背景の再確認)

IgG4-RD 患者組織でのバリデーション

PBMC からの IRAK4 + CD163 + 細胞の抽出と機能解析

(セルソーティング、培養上清のサイトカインアッセイ)

本研究では IgG4-RD 患者の顎下腺組織から IRAK4+CD163+細胞をソーティングし、TLR7 アゴニスト刺激および IRAK4 阻害剤を用いた培養を行うとともに、シグナル伝達経路の検討を行った。

IRAK4 + CD163 + 細胞における線維化能の解析

(線維芽細胞との共培養実験)

上記により抽出された IRAK4 + CD163 + 細胞と線維芽細胞 (MRC-5 細胞株) を共培養し、線維芽細胞の活性化・増殖能について解析する。

免疫組織化学染色での定量解析

(蛍光多重染色、フローサイトメトリー)

IgG4 関連疾患患者の組織を用いて蛍光多重染色を行い、TissueFAXs による定量的解析を行った。

4. 研究成果

IRAK4 は TLR7 の下流分子であり、NFκB による線維化促進サイトカイン (IL-33、IL-1、TGF-β) を誘発し、炎症や線維化に関与することが知られている。本研究の結果としては、まず DNA マイクロアレイにて、健常者と IgG4 関連疾患患者および TG マウスと KO マウスを比較検討し、共通して発現亢進を認めた分子として IRAK4 を抽出し、免疫組織化学染色でのバリデーションも行い、研究背景に見られるものを再確認した。その上で TLR7 下流シグナル経路の検討を行うために、*in vitro* にて CD163 陽性 M2 マクロファージを分離培養し、TLR7 アゴニスト刺激実験および IRAK4 阻害剤による阻害実験を行い、有用なシグナル経路を抽出することができた。その結果から、唾液腺病変に浸潤した TLR7 を発現した CD163 陽性 M2 マクロファージが TLR7 リガンド刺激により、TLR7-IRAK4-NFκB シグナル経路を誘導し、線維化促進サイトカインを産生することで、IgG4-RD に特徴的な線維化を大いに促進している可能性が示唆された。これらの報告は未だ

されておらず、本研究の結果として明らかとすることができた。また、このシグナルデンタル経路を標的とした治療法の開発といった新たな視点を得ることができた。

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 Akira Chinju, Masafumi Moriyama, Noriko Kakizoe-Ishiguro, Hu Chen, Yuka Miyahara, A. S. M. Rafiul Haque, Katsuhiro Furusho, Mizuki Sakamoto, Kazuki Kai, Kotono Kibe, Sachiko Hatakeyama-Furukawa, Miho Ito-Ohta, Takashi Maehara, and Seiji Nakamura	4. 巻 Vol. 74, No. 5, May 2022,
2. 論文標題 CD163+ M2 Macrophages Promote Fibrosis in IgG4-Related Disease Via Toll-like Receptor 7/Interleukin-1 Receptor Associated Kinase 4/NF-κB Signaling	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Arthritis & Rheumatology	6. 最初と最後の頁 892, 901
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/art.42043	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鎮守晃
2. 発表標題 M2マクロファージはTLR7/IRAK4シグナルを介してIgG4関連疾患の線維化に関与する。
3. 学会等名 日本口腔外科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鎮守晃
2. 発表標題 IgG4 関連疾患において M2 マクロファージは Toll 様受容体 7/IRAK4 シグナルを介して IL-1 誘導型炎症を惹起する」
3. 学会等名 日本口腔科学会
4. 発表年 2020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
---------	---------