

## 研究題目 自然免疫を基盤とした慢性難治性唾液腺疾患の新規治療戦略

### 研究組織

研究代表者：森山 雅文（九州大学病院 顎口腔外科）

共同研究者：石丸 直澄（徳島大学先端酵素学研究所）

研究分担者：緒方 謙一（九州大学病院 顎口腔外科）

金子 直樹（九州大学大学院歯学研究院 口腔顎顔面病態学講座）

### 【1】研究の概要

#### [1-1]本研究の目的・概要

IgG4 関連疾患 (IgG4-RD) の唾液腺病変は慢性難治性であり、その病態形成にはヘルパーT細胞やB細胞などの獲得免疫が関与していることが知られているが、最近の研究では病原体センサーである Toll 様受容体 (TLR) を介した自然免疫の活性化もその発症に重要な役割を果たしていることが示唆されている。

われわれは IgG4-RD の唾液腺病変における TLR ファミリーの発現を網羅的に解析し、TLR の中でも特に核酸シグナルセンサーである Toll 様受容体 7 (TLR7) が病変局所で強い発現を認め、その主な発現細胞が CD163 陽性 M2 マクロファージであることを明らかにした。さらに、マウス自身の TLR7 を欠失させ、ヒト TLR7 強発現させた (huTLR7 Tg/mTlr7 KO) マウスを製作し、その表現型についても検討を行った。その結果、huTLR7 Tg/mTlr7 KO マウスは、IgG4 関連疾患の好発部位である顎下腺、膵臓、および肺におけるリンパ球浸潤と線維化は有意に亢進しており、さらに血清 IgG1 (ヒトの IgG4 に相当) の上昇を認めたことから、IgG4-RD に類似していることが示唆された。

そこで本研究では、唾液腺病変での TLR7 の主な発現細胞である M2 マクロファージに注目し、IgG4-RD の特徴である IgG4 過剰産生と線維化との関連について、サイトカインアッセイや共培養実験 (B 細胞や線維芽細胞) を行い、TLR7 による発症メカニズムの解明を目指す。

#### [1-2]研究の方法・経過

#### 病変局所の M2 マクロファージが発現する TLR7 関連分子の網羅的解析

IgG4-RD の特徴である著明な線維化や IgG4 過剰産生には M2 マクロファージが TLR7 シグナルを介して疾患特異的に関与していることが示唆されることから、IgG4-RD 患者と唾石症患者の顎下腺病変から M2 マクロファージ (CD11b<sup>+</sup>CD163<sup>+</sup>) をセルソーターにてソーティングし、DNA マイクロアレイにて発現遺伝子の網羅的解析を行い、TLR7 に関連する発現変動遺伝子を抽出して、バリデーションを行う。

#### TLR7 刺激による M2 マクロファージの線維化の機序解明 -in vitro-

次に IgG4-RD 患者および健常者から抽出した M2 マクロファージを分離・培養して、本疾患の臓器障害の主たる原因である「著明な線維化」の機序を明らかにする。具体的には、患者・健常者の PBMC から抽出した TLR7 刺激後の M2 マクロファージの培養上清とヒト線維芽細胞 (MRC-5 細胞) を共培養して、前述の IL-1 $\beta$  や PDGF に注目して、線維芽細胞の形態学変化や活性能を鏡検や細胞増殖アッセイ (MTT 法) などで検討する。

### 【2】研究成果

#### [2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

TLR7 アゴニスト (R848) にて刺激した huTLR7 Tg/mTlr7 KO マウスおよび IgG4 関連疾患と慢性顎下腺炎 (CS) 患者の顎下腺を用いて DNA マイクロアレイを行い、共通に発現上昇を認めた TLR7 関連分子を抽出した。その結果、共通して発現上昇を認めた TLR7 下流分子として IRAK4 (Interleukin-1 receptor-associated kinase 4) が抽出され、主な発現細胞は CD163 陽性 M2 M マクロファージであった。

そこで、ヒト末梢血単核球から CD163 陽性 M2 マクロファージを分離培養して TLR7 アゴニスト (loxoribine) による刺激実験を行い、細胞内 TLR7 下流分子の発現および培養上清中の線維化促進サイトカイン (IL-33、IL-1 $\beta$ 、TGF- $\beta$ ) の濃度の測定を行った。その結果、刺激群において無刺激群と比較し IRAK4、NF $\kappa$ B の mRNA の有意な発現上昇を認め (図 1)、培養上清中の IL-33、IL-1 $\beta$ 、TGF- $\beta$  の濃度も有意に高かった (図 2)。

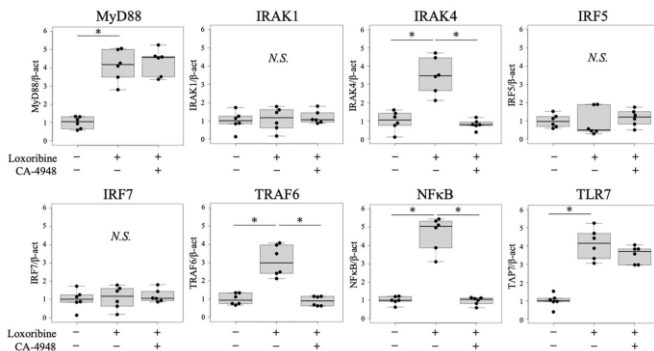


図 1. TLR7 下流分子の mRNA 発現量

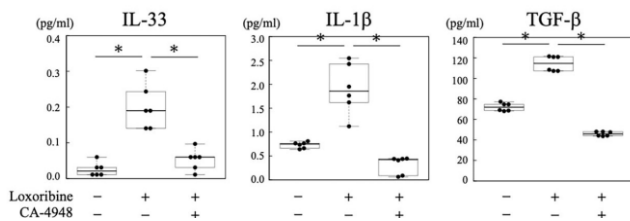


図 2. 線維化因子の培養上清中濃度

[2-2] 本共同研究による波及効果及び今後の発展性

IgG4-RD の治療薬としては、グルココルチコイドが第一選択薬であり著効するが、5 年以上の長期経過では約 4 割の患者で再発することが報告されている。また、ステロイドの長期投与は、糖尿病や骨粗鬆症などの合併症も引き起こすため、新たな治療薬の開発が世界的に望まれている。米国では B 細胞を標的とした分子標的治療薬 (リツキシマブ) の治験が行われているが、効果が限定的であるのが現状である。

本研究により、臓器障害の原因となっている線維化に関わる分子 (TLR7 や IRAK4) を抽出したが、今後はそれらの分子を標的としたグルココルチコイドに代わる IgG4-RD の新規治療法開発に取り組む予定である。

### 【3】主な発表論文等

[3-1] 論文発表

1. Hayashi Y, Kimura S, Yano E, Yoshimoto S, Saeki A, Yasukochi A, Hatakeyama Y,

Moriyama M, et al. Id4 modulates salivary gland homeostasis and its expression is downregulated in IgG4-related disease via miR-486-5p. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 1870(2):119404, 2023.

2. Ogata K, Moriyama M, et al. The Therapeutic Potential of Secreted Factors from Dental Pulp Stem Cells for Various Diseases. *Biomedicines.* 10(5):1049, 2022.
3. Chinju A, Moriyama M, et al. CD163<sup>+</sup> M2 macrophages promote fibrosis in IgG4-related disease via TLR7/IRAK4/NF- $\kappa$ B signaling. *Arthritis Rheumatol.* 74(5):892-901, 2022.
4. Nishikori A, Nishimura MF, Nishimura Y, Notohara K, Satou A, Moriyama M, et al. Investigation of IgG4-positive cells in idiopathic multicentric Castleman disease and validation of the 2020 exclusion criteria for IgG4-related disease. *Pathol Int.* 72(1):43-52, 2022
5. 森山 雅文、中村 誠司 「リウマチ科 第 68 巻第 3 号 12 月号」 宮坂 信之 編：IgG4 関連疾患における自然免疫応答の役割 262-268 頁、科学評論社、2022

[3-2] 学会発表

1. 厚生労働科学研究補助金 難治性疾患政策研究事業 自己免疫疾患研究班・全身性強皮症研究班・強皮症・皮膚線維化疾患の診断基準・重症度分類・診療ガイドライン・疾患レジストリに関する研究班合同共催「医療講演会」口腔乾燥の対処法 ～知って欲しいシェーグレン症候群の口腔症状～ ○森山 雅文 2022.9.7～10.6 Web 開催 オンデマンド配信
2. 第 14 回 日本 IgG4 関連疾患学会・学術集会 シンポジウム 3 「画像診断の進歩」IgG4 関連涙腺・唾液腺炎の診断における顎下腺超音波検査の有用性 ～Mimicker との鑑別～ ○森山 雅文 2023.3.5 金沢

[3-3] 成果資料等

該当なし

### 【4】今後の課題等

今後の課題、その他等

新規治療薬の開発には動物実験が不可欠であるため、徳島大学 (石丸研究室) が有している唾液腺炎モデルマウスを用いて、世界初の IgG4-RD モデルマウスの樹立を目指す。