

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20597

研究課題名(和文)アロマターゼ遺伝子欠損マウスにおけるシェーグレン症候群様病変と肥満との関連

研究課題名(英文)Relationship between aromatase-related obesity and autoimmunity in Sjogren's syndrome.

研究代表者

岩浅 亮彦 (IWASA, Akihiko)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学系)・助教

研究者番号：90746025

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、エストロゲン産生に異常をきたすアロマターゼ遺伝子欠損(ArKO)マウスを用い、エストロゲン産生異常が自己免疫病変へ及ぼす影響について検討を行った。ArKOマウスでは涙腺、唾液腺にシェーグレン症候群様の慢性炎症所見が観察され、さらに、内臓脂肪量が増加している事が分かった。また内臓脂肪中のマクロファージの増加、特に炎症性マクロファージ(M1マクロファージ)が増加していることが明らかとなった。これらのことから、エストロゲン産生異常による肥満が、全身の慢性炎症状態を惹起し、自己免疫病変の病態形成に大きく影響している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The mechanism by which estrogen deficiency influences autoimmunity is unknown. Aromatase is a converting enzyme from androgens to estrogens. In the present study, we used female aromatase gene knockout (ArKO) mice as a model of estrogen deficiency to investigate the molecular mechanism that underlies the onset and development of autoimmunity. Histological analyses showed that inflammatory lesions in the lacrimal and salivary glands of ArKO mice increased with age. Expression of mRNA encoding proinflammatory cytokines and monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) increased in white adipose tissue (WAT) of ArKO mice and was significantly higher than that in wild-type mice. Moreover, an increased number of inflammatory M1-macrophages was observed in WAT and salivary glands of ArKO mice. These results suggest that adiposity in the target organ may disrupt peripheral immune tolerance leading to the development of autoimmunity.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：慢性炎症

1. 研究開始当初の背景

自己免疫疾患の多くは多因子疾患であり、様々な発症要因が複雑に関与していることから、必ずしも疾患特異的ではない診断、および対症療法による治療が行われているのが現状であり、本疾患の病態の解明ならびに根治的治療法の開発が重大な研究課題である。それらの自己免疫疾患の大半が、女性優位に発症することが知られている。外分泌腺である涙腺、唾液腺を標的とするシェーグレン症候群も、その罹患患者のうち95%以上が女性であるといわれ、特に閉経期以降の女性に好発する自己免疫疾患である。その主症状はドライアイやドライマウスであり、さらに口腔内の乾燥に伴う舌乳頭の萎縮や、齲蝕の多発、味覚異常、摂食嚥下障害など、多くの口腔症状を引き起こし、患者のクオリティオブライフを低下させる(図1)。

図1:シェーグレン症候群患者で見られる眼・口腔内の乾燥症状



ドライアイ

ドライマウス

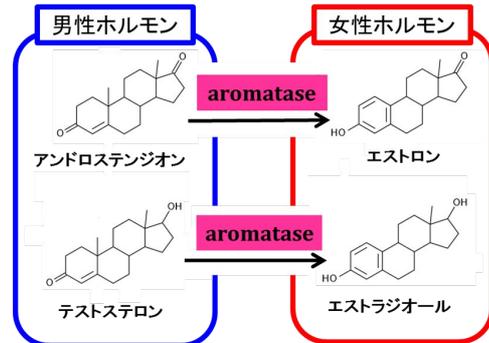
従来、閉経期前後におけるエストロゲン産生量の変化が免疫システムの維持に影響を与え、自己免疫疾患の発症に関与しているものと考えられてきたが、特定の臓器が自己免疫反応の標的となる詳細な分子メカニズムについては不明である。

これまでにシェーグレン症候群の疾患モデルマウスにおいて、卵巣摘出によるエストロゲン欠乏状態が免疫細胞の機能障害をもたらすと同時に、標的臓器である唾液腺にFas 依存性のアポトーシスの亢進を誘導することにより、唾液腺における自己免疫病態の増悪をもたらすことが報告されている。また、正常な C57BL/6 マウスにおいて卵巣摘出術を施すと、摘出後 2、3 週間に限り、シェーグレン症候群の標的臓器である唾液腺細胞にアポトーシスが誘導され、SS の自己抗原の一つとして知られている -フォドリンの分断化が一過性に観察されることなどが明らかにされている。さらに、自己免疫疾患の多くが閉経期前後の女性を中心に発症することから抗エストロゲン作用により誘導される遺伝子の同定が進められ、シェーグレン症候群の標的上皮細胞にエストロゲン欠乏によって発現が誘導される遺伝子として細胞周期関連因子である Retinoblastoma-associated protein 48 (RbAp48) 遺伝子が報告されている。In vitro の培養ヒト唾液腺細胞を用いた系で RNA 干渉法により RbAp48 を抑制するとアポトーシス能が低下し、さらに、RbAp48 遺伝子トランスジェニックマウスにて涙腺、唾液腺に限局する自己免疫性病変が観察さ

れることが報告されている。

アロマターゼは、エストロゲンを合成するために必要なステロイド代謝酵素であり(図2)、ヒトにおいては、生殖器や、脳、脂肪組織、骨などに広く局在しており、多様な生理機能に関わっている。

図2:アロマターゼの働き



アロマターゼ遺伝子が欠損したアロマターゼ遺伝子欠損マウスは、ヒトでのエストロゲン産生能の低下した状態が再現されており、エストロゲンが免疫システムに及ぼす影響を理解するための有用な動物モデルとして知られている。Shim らは、アロマターゼ遺伝子欠損マウスにおいてB細胞の分化促進あるいは活性化亢進による自己抗体の産生を介した自己免疫反応により、シェーグレン症候群様の炎症性病変が唾液腺に認められることを報告している¹⁾。しかしながら、アロマターゼ欠損によるエストロゲン欠乏状態が、シェーグレン症候群の標的臓器である涙腺、唾液腺に自己免疫性病態を引き起こす詳細な分子メカニズムについては不明なままであった。

そこで、我々は、アロマターゼ遺伝子欠損マウスにおける肥満と涙腺・唾液腺でのシェーグレン症候群様の自己免疫病変との関連性に焦点を当てて、アロマターゼ遺伝子欠損マウスを用いて、内臓脂肪中の慢性炎症状態の解析およびシェーグレン症候群様病変の病態解析を行い、以下のことを明らかにした。

・アロマターゼ遺伝子欠損マウスにおける病理組織学的解析

アロマターゼ遺伝子欠損マウスの涙腺および唾液腺における病理組織学的解析を行ったところ、12~18 か月齢のアロマターゼ遺伝子欠損マウスでは涙腺、唾液腺の両方でシェーグレン症候群様の広範なリンパ球浸潤と腺房細胞の破壊を認めた。

・アロマターゼ遺伝子欠損マウスにおける内臓脂肪量の解析

9~12 週齢のアロマターゼ遺伝子欠損マウスでは、健常マウスと比較して、アロマターゼ遺伝子欠損マウスでは、体重の増加とともに、内臓脂肪である白色脂肪が有意に増加していることを認めた。

・アロマターゼ遺伝子欠損マウス内臓脂肪におけるマクロファージ関連因子、およびサイトカインの遺伝子発現解析

アロマターゼ遺伝子欠損マウスの内臓脂肪における遺伝子発現を解析の結果、アロマターゼ遺伝子欠損マウス内臓脂肪での monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)、および F4/80、TLR-4、NF- κ B の発現の亢進を認めた。

・アロマターゼ遺伝子欠損マウス唾液腺における MCP-1 の遺伝子発現解析および血清中 MCP-1 量の解析

アロマターゼ遺伝子欠損マウスと健常マウスの唾液腺における MCP-1 の遺伝子発現量の解析を行ったところ、アロマターゼ遺伝子欠損マウスの唾液腺で有意に MCP-1 の発現が上昇し、血清中の MCP-1 量についてもアロマターゼ遺伝子欠損マウスで、有意に高い値を示した。

これらの所見から、アロマターゼ遺伝子欠損マウスの脂肪組織では、肥満により MCP-1 の発現亢進を認め、唾液腺においても MCP-1 の発現が亢進しており、シェーグレン症候群様の自己免疫病変の増悪に関与していることを明らかにした(Am J Pathol 2014)。

しかしながら、アロマターゼの欠損が MCP-1 の発現亢進にどのように関与しているのか、また涙腺・唾液腺内での MCP-1 の発現亢進がシェーグレン症候群様の炎症病変にどのように影響を与えているのかについての詳細は不明であることから、本研究を着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、エストロゲン欠乏による肥満状態を示し、唾液腺にシェーグレン症候群様の炎症性病変が報告されているアロマターゼ遺伝子欠損マウスを用いて、アロマターゼ欠損によるエストロゲン欠乏状態と、それによる肥満が、涙腺・唾液腺にシェーグレン症候群病変を引き起こす詳細な分子メカニズムについて明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) アロマターゼ遺伝子欠損マウスの涙腺・唾液腺におけるシェーグレン症候群様病変の病態解析

アロマターゼ遺伝子欠損マウス涙腺における MCP-1 の遺伝子発現量について解析を行い、アロマターゼ遺伝子欠損マウスの内臓脂肪で遺伝子発現の上昇を認めた F4/80、TLR-4、NF- κ B ならびに、炎症性の M1 マクロファージが産生するとされる炎症性サイトカイン (IL-1、IL-6、IFN- γ 、TNF- α など) や、抗炎症性の M2 マクロファージが産生するといわれる抗炎症性サイトカイン (IL-10、TGF- β など) の涙腺・唾液腺での遺伝子発現量について、リアルタイム RT-PCR で遺伝子発現解析を行った。

(2) シェーグレン症候群モデルマウスへのアロマターゼインヒビター投与による脂肪組織および涙腺・唾液腺における影響についての解析

シェーグレン症候群モデルマウスである生

後 3 日目に胸腺摘出術を行った NFS/sld マウスに、アロマターゼインヒビターの腹腔内投与を行い、アロマターゼインヒビター投与群と非投与群間での体重および内臓脂肪量、内臓脂肪中および涙腺・唾液腺における MCP-1、F4/80、TLR-4、NF- κ B、IL-1、IL-6、IFN- γ 、TNF- α などの遺伝子発現、病理組織学的解析を行った。

4. 研究成果

(1) アロマターゼ遺伝子欠損マウスの涙腺・唾液腺におけるシェーグレン症候群様病変の病態解析

アロマターゼ遺伝子欠損マウスの涙腺における MCP-1 の遺伝子発現量について解析を行ったところ、優位に高い値を示した。また、アロマターゼ遺伝子欠損マウスの内臓脂肪で遺伝子発現の上昇を認めた F4/80、TLR-4、NF- κ B ならびに、炎症性サイトカイン (IL-1、IL-6、IFN- γ 、TNF- α)、抗炎症性サイトカイン (IL-10、TGF- β) の涙腺・唾液腺での遺伝子発現量について、リアルタイム RT-PCR で遺伝子発現解析を行ったところ、両組織において、高い発現量を示し、シェーグレン症候群の標的臓器である涙腺・唾液腺では、脂肪組織と類似した MCP-1 の発現上昇によって慢性炎症状態となっていることが明らかとなった。

(2) シェーグレン症候群モデルマウスへのアロマターゼインヒビター投与による脂肪組織および涙腺・唾液腺における影響についての解析

生後 3 日目に胸腺摘出術を行った NFS/sld マウスのアロマターゼインヒビター投与群では、非投与群と比較して、体重あたりの内臓脂肪量は増加しており、内臓脂肪中におけるマクロファージ関連因子および炎症性サイトカイン (MCP-1、F4/80、TLR-4、NF- κ B、IL-1、IL-6、IFN- γ 、TNF- α) の有意な遺伝子発現の上昇を認めた。さらに、涙腺・唾液腺においても同様に MCP-1、F4/80、TLR-4、NF- κ B、IL-1、IL-6、IFN- γ 、TNF- α の遺伝子発現の有意な上昇が確認された。逆に、抗炎症性サイトカインである IL-10、TGF- β については有意な発現量の低下を認めた。加えて、病理組織学的解析にて、アロマターゼインヒビター投与群では、涙腺および唾液腺におけるシェーグレン症候群様病態の増悪傾向を認め、アロマターゼの低下が肥満を誘導し、慢性炎症状態を惹起してシェーグレン症候群様病態に直接的に関与していることが確認できた。

< 引用文献 >

1) Shim GJ, Warner M, Kim HJ, Andersson S, Liu L, Ekman J, Imamov O, Jones ME, Simpson ER and Gustafsson JA: Aromatase-deficient mice spontaneously develop a lymphoproliferative autoimmune disease resembling Sjogren's syndrome. Proc Natl Acad Sci USA 101, 1994,

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計2件)

(1) Takehiro Shinohara, Takashi Izawa, Akiko Mino, Hiroki Mori, Akihiko Iwasa, Toshihiro Inubushi, Yu Yamaguchi and Eiji Tanaka, Hyaluronan metabolism in overloaded temporomandibular joint, Journal of Oral Rehabilitation, 査読有、Vol.43, No.12, 2016年、pp.921—928、DOI: 10.1111/joor.12443

(2) Takashi Izawa, Hiroki Mori, Takehiro Shinohara, Akiko Mino, Islamy Rahma Hutami, Akihiko Iwasa and Eiji Tanaka, Rebamipide attenuates mandibular condylar degeneration in a murine model of TMJ-OA by mediating a chondroprotective effect and by downregulating RANKL-mediated osteoclastogenesis, PLoS ONE, 査読有、Vol.11, No.4, 2016年、p.e0154107、DOI: 10.1371/journal.pone.0154107

〔学会発表〕(計10件)

(1) Islamy Rahma Hutami, Takashi Izawa, Hiroki Mori, Takehiro Shinohara, Akiko Mino, Akihiko Iwasa and Eiji Tanaka, Fas/S1P1 signaling controls temporomandibular joint subchondral bone remodeling in autoimmune-arthritis., 95th General Session & Exhibition of the IADR, 2017年3月22-25日、San Francisco (USA)

(2) Hiroki Mori, Takashi Izawa, Takehiro Shinohara, Akiko Mino, Minami Sato, Natsuko Hichijo, Akihiko Iwasa, Islamy Rahma Hutami and Eiji Tanaka, Effect of Rebamipide administration on TMJ-OA model mouse., 95th General Session & Exhibition of the IADR, 2017年3月22-25日、San Francisco (USA)

(3) 岩浅 亮彦, 森 浩喜, 井澤 俊, 篠原 丈裕, 三野 彰子, 佐藤 南, 堀内 信也, 田中 栄二, 不正咬合患者における顎関節症の臨床統計学的調査, 第29回日本顎関節学会総会・学術大会, 2016年7月17-18日、湯本富士屋ホテル(神奈川県足塚下郡箱根町)

(4) 篠原 丈裕, 井澤 俊, 岩浅 亮彦, 森 浩喜, 三野 彰子, 犬伏 俊博, 田中 栄二, 変形性顎関節症モデルマウス下顎頭におけるヒアルロン酸代謝機構の役割, 第29回日本顎関節学会総会・学術大会 2016年7月17~18日、湯本富士屋ホテル(神奈川県足塚下郡箱根町)

(5) 佐藤 博子, 井澤 俊, 森 浩喜, 岩浅 亮彦, 木内 奈央, 堀内 信也, 田中 栄二, Le Fort III型骨延長術後に上下顎骨移動術を施行したApert症候群の1例, 第59回中・四国矯正歯科学会大会, 2016年7月6~7日、高知県立県民文化ホール(高知県高知市)

(6) 三野 彰子, 井澤 俊, 篠原 丈裕, 森 浩喜,

森 博世, 岩浅 亮彦, 田中 栄二, マウス下顎頭軟骨の形成, 維持における HIF-1 α の機能解析, 第74回日本矯正歯科学会大会, 2015年11月18~20日、福岡国際会議場・マリンメッセ(福岡県福岡市)

(7) 森 浩喜, 井澤 俊, 三野 彰子, 岩浅 亮彦, 内田 玲子, 田中 栄二, S1P/Smad3 シグナルクロストークを介した変形性顎関節症の病態メカニズムの解明, 第74回日本矯正歯科学会大会, 2015年11月18~20日、福岡国際会議場・マリンメッセ(福岡県福岡市)

(8) 井澤 俊, 森 浩喜, 篠原 丈裕, 三野 彰子, 塩田 智子, 犬伏 俊博, 岩浅 亮彦, 田中 栄二, 変形性顎関節症モデルマウスにおけるレパミピドの治療効果の検討, 第74回日本矯正歯科学会大会, 2015年11月18~20日、福岡国際会議場・マリンメッセ(福岡県福岡市)

(9) 吉永 薫, 渡邊 佳一郎, 中村 瑠里, 佐藤 南, 三井 なおみ, 天知 良太, 岩浅 亮彦, 堀内 信也, 黒田 晋吾, 田中 栄二, 歯科矯正用アンカースクリューの導入による診断内容の変化~抜歯・非抜歯および抜歯部位の判定に関する検討~, 第58回中・四国矯正歯科学会大会, 2015年7月12日、サンポートホール高松(香川県高松市)

(10) 井澤 俊, 森 浩喜, 篠原 丈裕, 岩浅 亮彦, 田中 栄二, 変形性顎関節症モデルマウスにおけるレパミピドの治療効果の検討, 第28回日本顎関節学会総会・学術大会, 2015年7月4-5日、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

岩浅 亮彦 (IWASA, Akihiko)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教
研究者番号: 90746025

(4)研究協力者

田中 栄二 (TANAKA, Eiji)
井澤 俊 (IZAWA, Takashi)
佐藤 南 (SATO, Minami)