

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：83903

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K17037

研究課題名(和文) シェーグレン症候群モデルマウスでの女性ホルモン低下と加齢による疾患発症機序の解明

研究課題名(英文) analysis of autoimmune disease caused by aging and sex hormones in a mouse model of sjogrens syndrome

研究代表者

黒澤 実愛 (Kurosawa, Mie)

国立研究開発法人国立長寿医療研究センター・口腔疾患研究部・研究員

研究者番号：70815802

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)：女性ホルモン低下と加齢によるシェーグレン症候群の発症機序解明を目的とする。メスのマウスでは加齢とともに老化関連T細胞が二次リンパ組織で増加し、唾液腺に多く集積していた。加齢変化によって唾液腺上皮細胞から細胞の遊走に関与するCXCL13が産生され、CXCL13-CXCR5を介して唾液腺に老化関連T細胞が集積する可能性が示唆された。

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(SS)は外分泌腺を標的とする自己免疫疾患であり、中高年以降の女性に多く発症する。SSは単独の因子によって起こるものではなく、性ホルモンのアンバランスや加齢による変化という身体的に大きな変化がどのようにしてSSの病態形成に関与するのかわからない。そのため、加齢変化によって発症するSSやその他の自己免疫疾患などの病態解明の新たな一歩となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Our objective was to elucidate the roles of aging and sex hormones in the pathogenesis of Sjogren's syndrome. Senescence-associated CD4+ T (SA-T) cell numbers increase in secondary lymphoid organs with age. SA-T cells infiltrated the salivary glands (SG) of aged female mice. CXCL13 was more strongly expressed in the epithelial cells of the SG with age. TEM from aged mice demonstrated higher in vitro migratory activity toward CXCL13 than TEM from young mice. This study revealed that SA-T cells infiltrate the SG via CXCL13-CXCR5.

研究分野：免疫学、病理学

キーワード：シェーグレン症候群 細胞老化 免疫老化

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生物には非自己である外来の細菌などから身を守るために様々な免疫システムが備わっており、自己と非自己を厳格に区別しているが、免疫システムの異常によって自己の組織や細胞を攻撃する事で臓器障害を来す病気が自己免疫疾患である。シェーグレン症候群(SS)は唾液腺や涙腺など外分泌腺を標的組織として免疫細胞が浸潤し、各組織の腺房細胞を破壊する事でドライアイや口腔乾燥症などが発生する自己免疫疾患である。SSは歯周病や発音障害などが発生するため患者のQOLが著しく低下するが、対症療法が現在の治療法であり、根本的な治療法の確立が望まれている。

SSの患者数は閉経期以降の女性に多い事から、女性ホルモンに関する研究が多く行われている。エストロゲン生成に関与するアロマトラーゼを欠損したマウスではコントロールマウスと比較して皮下脂肪における脂肪細胞の肥大化と、加齢とともに免疫細胞が唾液腺に浸潤する(Iwasa A, et al. *Am J Pathol.* 2015)。また、若齢で高脂肪食を負荷した(HFD)マウスでは血中のエストロゲンが低下しており、脂肪細胞の肥大化が見られ(Guo H et al. *Endocrinology.* 2012)、老齢マウスでは閉経によってエストロゲン産生量が低下し、内臓脂肪の増加が見られる。そのため、エストロゲン産生量の低下及び脂肪細胞の肥大化が口腔乾燥症に関与する可能性がある。しかし、加齢変化はエストロゲン及び内臓脂肪の変化だけでなく、細胞老化などの影響も考えられる。特に加齢に伴い senescence-associated secretory phenotype (SASP)によって血中の炎症性サイトカイン濃度が上昇するなど全身的な変化が見られる。免疫細胞においても細胞老化が見られ、加齢とともに二次リンパ組織において老化関連 T (SA-T)細胞が増加する事が報告されており(Sato K et al. *J Immunol.* 2017)、SA-T細胞は慢性炎症や腫瘍の転移などに関与すると言われている。そのため、エストロゲンの低下及び加齢による細胞老化と免疫老化に焦点をあてて口腔乾燥症の発症メカニズムを解明する事は重要である。

### 2. 研究の目的

SSは中高年の女性に多い事から、加齢及びエストロゲン低下に関与している可能性がある。しかし、加齢による身体的変化は様々であり、唾液腺における細胞老化や免疫老化による影響を検討する必要がある。そのため、老齢マウスと、エストロゲン低下及び内臓脂肪が肥大化した若齢マウス、若齢でSSを発症するSSモデルマウスを比較する事で加齢変化による口腔乾燥症の発症機序を明らかにする事を目的とする。

### 3. 研究の方法

C57BL/6の若齢マウス(生後8週)と老齢マウス(生後20ヶ月)を用いて解析し、卵巣摘出(OVX)マウスは生後4週で摘出し、処置後1ヶ月と3ヶ月で解析した。高脂肪食を負荷した(HFD)マウスは生後4週から2ヶ月間高脂肪食を負荷した。シェーグレン症候群モデルマウスである *aly/aly* マウスは生後10週で解析し、コントロールマウスとして *aly/+* マウスを用いた。

#### (1)刺激時唾液量測定

刺激時唾液量測定のため、麻酔後に副交感神経作動薬としてピロカルピンを腹腔から投与した。唾液は末梢血採取用のリングキャップスで採取、測定した。

#### (2)凍結切片及び蛍光免疫染色

組織学的な検討を行うために、唾液腺として顎下腺を各マウスから採取及び凍結し、肺は4%ホルマリンで固定後、スクロース置換した後に凍結した。各組織を7µmの厚さで切り出し、HE染色及び蛍光免疫染色を行った。

#### (3)免疫細胞の解析

免疫細胞の細胞分画を検討するために、唾液腺及び二次リンパ組織として脾臓、頸部リンパ節を分散し、免疫細胞を単離してフローサイトメトリーで解析した。

#### (4)唾液腺及び肺の上皮細胞におけるケモカイン等の発現検討

唾液腺の上皮細胞における各因子の発現を検討するために、各マウスから摘出した唾液腺をコラゲナーゼやヒアルロニダーゼ等を用いて分散し、Miltenyiのmouse CD326 (EpCAM)マイクロビーズでEpCAM陽性の上皮細胞を回収、解析した。また、*in vitro*における唾液腺上皮細胞に対するエストロゲンシグナルの影響を検討するために、唾液腺から上皮細胞を単離し、初代培養した。

#### (5)ケモカインに対する遊走応答

ケモカインに対する遊走応答を検討するために、各マウスの脾臓からCD4陽性T細胞を単離し、遊走実験を行った。遊走したCD4陽性T細胞の細胞分画に関する解析はフローサイトメトリーで検討した。

### 4. 研究成果

#### (1)唾液腺及び免疫細胞の解析

##### 老齢マウス

若齢マウスと比較して老齢マウスの刺激時唾液量は減少しており、唾液腺のHE染色にて多くの免疫細胞が集積していた。唾液腺を採取し、唾液腺に集積している免疫細胞を検討するために、フローサイトメトリーで解析したところ、CD4陽性T細胞では抗原による活性化を受けていないナイーブT細胞よりも活性化したメモリーT細胞が唾液腺に多く集積していた。また、老齢マウ

スの唾液腺には SA-T 細胞が多く集積しており、オスと比較してメスの老齢マウスで有意に SA-T 細胞の細胞数が増加していた。

#### SS モデルマウス

SS モデルマウスである *aly/aly* マウスは NF- B2 経路に点変異を有し、若齢で唾液腺及び涙腺に免疫細胞の浸潤が見られる。*aly/aly* マウスは先天的なリンパ節欠損が見られるため、二次リンパ組織として脾臓を解析すると、コントロールマウスと比較して SA-T 細胞が増加しており、唾液腺においても SA-T 細胞が多く浸潤していた。

#### OVX マウス

卵巣摘出によって内臓脂肪の増加がみられたが、OVX マウスにおける刺激時唾液量はコントロールマウスと比較して有意な差は見られなかった。また、唾液腺に免疫細胞の集積は見られず、CD4 陽性 T 細胞を検討すると、脾臓やリンパ節ではコントロールマウスと比較して SA-T 細胞の増加は見られなかった。

#### HFD マウス

HFD マウスではコントロールマウスよりも体重及び内臓脂肪が増加しており、刺激時唾液量はコントロールマウスより減少したが、有意な差は見られなかった。HFD マウスの内臓脂肪において SA-T 細胞が集積する事が報告されている(Shirakawa K et al. *J Clin Invest.* 2016)が、唾液腺に免疫細胞の集積は見られず、二次リンパ組織においても SA-T 細胞の増加は見られなかった。

以上をまとめると(図 1)、若齢マウスにおけるエストロゲン産生量の低下や内臓脂肪の増加では唾液腺への CD4 陽性 T 細胞の集積及び刺激時唾液量の有意な減少、二次リンパ組織における SA-T 細胞の増加は見られなかった。一方で、老齢マウス及び SS モデルマウスでは二次リンパ組織における SA-T 細胞の増加及び、

	老齢マウス	SSモデルマウス	OVXマウス	HFDマウス
加齢	↑	-	-	-
唾液量	↓	↓	±	±
エストロゲン	↓	正常	↓	↓
内臓脂肪	↑	正常	↑	↑
唾液腺への CD4陽性T細胞集積	+	+	-	-
脾臓における SA-T細胞の増加	+	+	-	-

図 1 実験で使したマウスの比較

唾液腺における SA-T 細胞の集積、刺激時唾液量の減少が見られた。そのため、唾液腺における CD4 陽性 T 細胞の集積により唾液腺実質細胞が破壊される事によって唾液量が減少する可能性と、唾液腺に CD4 陽性 T 細胞が集積する際には二次リンパ組織における SA-T 細胞の増加が重要である可能性が示唆された。また、オスよりもメスの老齢マウスでは SA-T 細胞が二次リンパ組織で増加したが、OVX マウスでは SA-T 細胞が増加しない事から、エストロゲンの低下は老齢マウスにおける SA-T 細胞増殖を促進するが、SA-T 細胞の分化にはエストロゲンは関与しない可能性が示唆された。

#### (2)唾液腺上皮細胞における細胞老化の影響

唾液腺上皮細胞の細胞老化による影響を検討するために老齢マウスの唾液腺から上皮細胞マーカーである EpCAM 陽性上皮細胞を単離した。DNA マイクロアレイの結果、若齢マウスよりも老齢マウスの唾液腺上皮細胞でケモカインの一つである CXCL13 発現が上昇していた。また、リアルタイム PCR にて老化マーカーである p16 発現が老齢マウスで有意に上昇していた。一方、老齢マウスの肺では免疫細胞の集積は少ないため、肺の上皮細胞を単離し、リアルタイム PCR で各因子の発現を解析すると、p16 発現は老齢マウスで有意に上昇していたが、CXCL13 発現は老齢マウスと若齢マウスでは有意な差は見られなかった。そのため、上皮細胞の細胞老化による CXCL13 発現の亢進は唾液腺特異的である可能性が示唆された。

*in Vitro* 実験として若齢マウスから単離した唾液腺の初代培養上皮細胞では p16 mRNA 発現が上昇し、エストロゲン受容体のアンタゴニストであるフルベストラントによって CXCL13 mRNA 発現が有意に上昇した。また、エストロゲン産生量が低下する OVX マウスでは唾液腺における CXCL13 mRNA 発現はコントロールマウスと有意な差は見られなかった。

以上の結果から、唾液腺上皮細胞では p16 発現亢進するとともに、エストロゲンシグナルが低下する事によって CXCL13 発現が上昇する可能性が示唆された。

#### (3)CXCL13-CXCR5 による細胞遊走の検討

SA-T 細胞は CXCR5 を発現する事が報告されている事から、CD4 陽性 T 細胞における CXCR5 発現をフローサイトメトリーで検討すると、SA-T 細胞を含むメモリー T 細胞では若齢マウスよりも老齢マウスで CXCR5 発現が上昇していたが、ナイーブ T 細胞では CXCR5 の発現は見られなかった。CXCR5 は CXCL13 の受容体であるため、CXCL13 に対する遊走能を検討した結果、老齢マウスではナイーブ T 細胞よりもメモリー T 細胞の細胞遊走が亢進しており、メモリー T 細胞では

若齢マウスと比較して老齢マウスで細胞遊走が有意に亢進していた。そのため、CXCL13-CXCR5 を介して SA-T 細胞は唾液腺に集積している可能性がある。

#### (4) オステオポンチン受容体発現の検討

SA-T 細胞は炎症に関与するオステオポンチンを産生することから、オステオポンチン受容体である CD44 の発現を唾液腺上皮細胞で検討すると、若齢マウス及び老齢マウスでは差は見られなかった。そのため、老齢マウスにおける唾液腺上皮細胞でのオステオポンチンが何らかの作用を持つ可能性があるが、現在検討中である。

以上の結果から、唾液腺上皮細胞における細胞老化及びエストロゲンの低下によって CXCL13 発現が上昇し、CXCR5 を発現する SA-T 細胞が集積する可能性が示唆された。また、SA-T 細胞から産生されるオステオポンチンが唾液腺上皮細胞に発現している CD44 を介して慢性炎症に関与している可能性が事から、唾液腺上皮細胞に対するオステオポンチンの機能に関する検討を今後の検討課題とする。

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 Yosuke Shikama, Mie Kurosawa, Masae Furukawa, Naozumi Ishimaru, Kenji Matsushita.	4. 巻 11(19)
2. 論文標題 Involvement of Adiponectin in Age-Related Increases in Tear Production in Mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Aging (Albany NY) .	6. 最初と最後の頁 8329-8346
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18632/aging.102322.	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6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 四釜洋介、黒澤実愛、山田（古川）匡恵、松下健二
2. 発表標題 口腔粘膜におけるIL-29の抗真菌および抗ウイルス作用：臨床応用の可能性.
3. 学会等名 第61回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 四釜洋介、黒澤実愛、松下健二
2. 発表標題 IL-29は口腔粘膜上皮細胞においてRIG-I発現誘導を介し抗ウイルス活性を増強する.
3. 学会等名 第24回日本エンドトキシン・自然免疫研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 M. Kurosawa, M. Furukawa, K. Matsushita, Y. Shikama.
2. 発表標題 Senescence-associated T-lymphocytes Accumulate in the Submandibular Glands of Aged Mice
3. 学会等名 97th General Session of the IADR (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 黒澤実愛、古川匡恵、松下健二、四釜洋介
2. 発表標題 唾液腺上皮の細胞老化及び免疫老化が唾液腺機能に与える影響:老齡マウスおよびモデルマウスを用いた解析
3. 学会等名 第28回日本シェーグレン症候群学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 黒澤実愛、古川匡恵、松下健二、四釜洋介
2. 発表標題 免疫老化及び細胞老化による唾液腺へのSA-T細胞集積メカニズムの解析
3. 学会等名 第38回分子病理学研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 黒澤実愛、古川匡恵、松下健二、四釜洋介
2. 発表標題 加齢およびエストロゲンシグナル欠乏は唾液腺における老化関連T細胞集積を促進する
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会
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
---------------------------	-----------------------	----