

機関番号：16101

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390479

研究課題名 (和文) エストロゲン欠乏が関与する自己免疫疾患発症機構の解析

研究課題名 (英文) Effect of estrogen deficiency on the development of autoimmune diseases

研究代表者

新垣 理恵子 (ARAKAKI RIEKO)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：00193061

研究成果の概要 (和文)：自己免疫疾患は免疫調節のバランスがくずれ、自己に対して免疫応答を引き起こしてしまう疾患である。このような自己免疫疾患の大きな特徴はその殆どが加齢に伴って発症し、閉経期以降の女性に優位に発症することであり、自己免疫疾患発症に性ホルモンの影響が大きいと考えられる。申請者らは、最も女性優位に発症するシェーグレン症候群を代表的疾患として位置づけ、女性ホルモンと自己免疫疾患発症との関わりを解明することを目的とした。

研究成果の概要 (英文)：Although a number of autoimmune diseases are known to develop in postmenopausal women, the mechanisms by which estrogen deficiency influences autoimmunity remain unclear. We show that estrogen deficiency induces apoptotic cells and enhances the inflammatory lesion, plasmacytoid dendritic cells and Th17 cells in the salivary glands of NOD mice. Estrogen deficiency may play a possible role for gender-based autoimmunity in postmenopausal women.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,200,000	2,160,000	9,360,000
2009年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2010年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
年度			
年度			
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：自己免疫疾患・シェーグレン症候群・性差・エストロゲン・Th17細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 多因子疾患とされる自己免疫疾患は病因が不明のため疾患特異的な治療法が存在しない。一般に、自己免疫疾患の発症に女性優位の性差がみられることは古くから知られているが、その発症とエストロゲン欠乏に関連する分子基盤については不明である。有効な治療法の開発にとってその詳細な分子メカニズムの解明が不可欠とされている。自

己免疫疾患の中でもシェーグレン症候群 (SS) は最も女性に多く発症する疾患であり (95%以上)、閉経期前後の女性を中心に高頻度に発症する。

(2) 我々のグループでは従来から疾患モデルを用いて自己免疫疾患 (SS、関節リウマチ、I型糖尿病) の発症とエストロゲン欠乏との関連性について検討を加えてきた (*Am. J.*

Pathol. 155: 173, 1999; *Am. J. Pathol.* 163:1481, 2003; *Endocrinol.* 145:2384, 2004)。現在までに、エストロゲン欠乏が生体内でT細胞機能障害を誘導すると同時に、唾液腺アポトーシスに伴う自己抗原 α -フオドリリン(*Science* 276:604, 1997; *J. Immunol.* 169:1050, 2002)の分断化を促進することによって唾液腺や涙腺の自己免疫病変の発症に密接に関連している可能性を実験的に明らかにした。最近、エストロゲン欠乏に依存して唾液腺アポトーシスが誘導されることからその責任分子の同定を試み、ヒト唾液腺細胞に特異的に発現する因子としてRetinoblastoma associated protein 48 (RbAp48)を見出している(*Mol. Cell. Biol.* 26:2924, 2006)。

2. 研究の目的

エストロゲン欠乏が関与する自己免疫疾患発症の分子機序の解明という極めて重要な研究課題に対して、最も女性優位に発症するSSを代表的疾患として位置づけ、その目的達成のためにシェーグレン症候群モデルマウス、卵巣摘出マウス、RbAp48 トランスジェニックマウスを用いてエストロゲン欠乏と自己免疫疾患発症との関連性を分子レベルで解明することによって疾患特異的な新規治療法の開発をめざすことを本申請課題の目的とした。標的臓器である唾液腺細胞にはエストロゲン欠乏によりアポトーシスが誘導されることを報告しているが、さらにエストロゲン欠乏により浸潤してくるT細胞や樹状細胞のサブセットやその機能について解析を加え標的臓器と免疫担当細胞の両側面からエストロゲン欠乏による自己免疫疾患発症メカニズム解明にアプローチする。

3. 研究の方法

(1) C57BL/6(B6)マウスに卵巣摘出を施してエストロゲン欠乏状態を誘導し、顎下腺・涙腺における異所性主要組織適合抗原クラス II(MHCII)発現細胞を検索しその抗原提示能を検討して自己免疫疾患発症における役割を検討する。

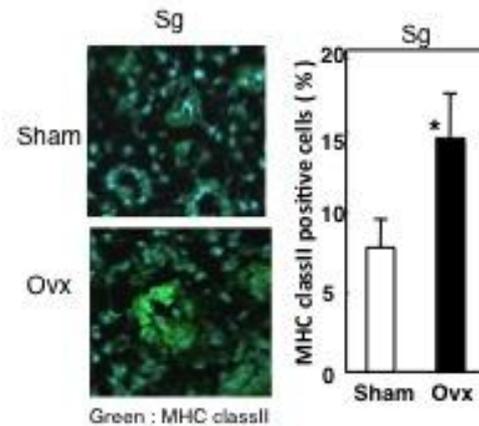
(2) SSモデルマウスに卵巣摘出を施し、炎症細胞浸潤程度の憎悪を確認する。

(3) 卵巣摘出SSモデルマウスの標的臓器に浸潤してくるT細胞のサブセット解析を行う

(4) 自己免疫疾患に強く関与することが示されているTh17細胞がエストロゲン欠乏により誘導されるかどうかを検討する。

4. 研究成果

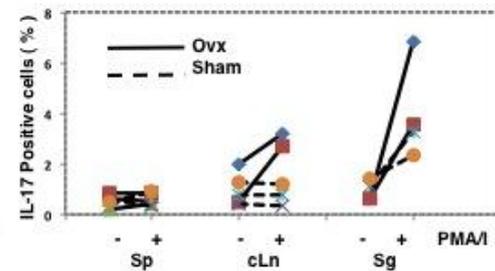
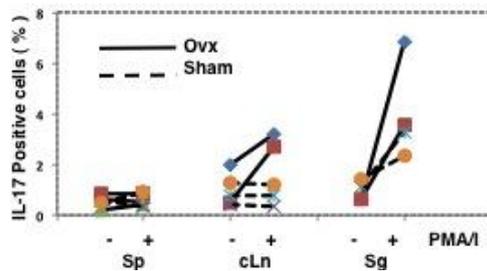
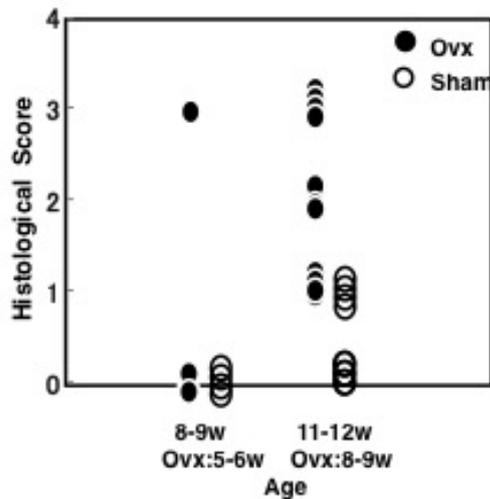
(1) 卵巣摘出 B6 マウスでは顎下腺・涙腺組織でのアポトーシスの増大と共に MHCII 発現上昇を認めた。この異所性 MHCII 発現上昇はアポトーシス誘導タイムコースと一致して卵巣摘出3週後にピークに達し、その後は減少傾向がみられた。



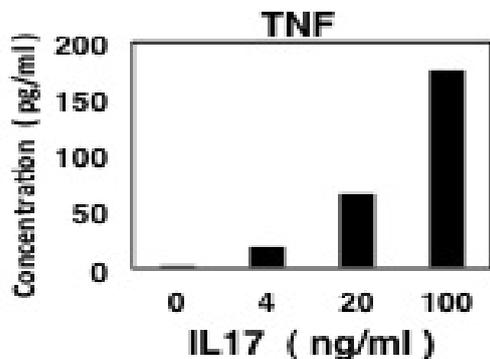
エストロゲン欠乏に依存して顎下腺に誘導される異所性 MHCII の多くは B220 を発現する plasmacytoid dendritic cell (pDC)であることを見だし、顎下腺から調整した pDC は抗原提示能を有しており、アポトーシス唾液腺細胞を貪食して IL-10 等のサイトカインを産生することを明らかとした。従ってエストロゲン欠乏によるシェーグレン症候群などの自己免疫疾患病態進展において樹状細胞その中でも pDC が重要な役割を担うことが示唆された。

(2) 卵巣摘出 B6 マウスでは、アポトーシスや樹状細胞による MHCII 発現の増強が見られたが、これらは卵巣摘出後3週目にピークを迎え、その後減少し、炎症細胞の浸潤を見ることはない。そこでエストロゲン欠乏における局所での T 細胞や B 細胞の病態を解析するために SS モデルマウスを利用した。SS モデルマウスとしてよく知られている NOD マウスは雌において8週頃から唾液腺への炎症細胞浸潤が始まり、11週頃には8割以上の個体に炎症浸潤を観察することができる。そこで8週目に NOD マウスに卵巣摘出を施し、唾液腺への炎症細胞浸潤の程度を観察したのが次ページの図である。予想どおり卵巣摘出を NOD マウスに施してエストロゲン欠乏を誘導すると炎症細胞の浸潤はその時期が早くなると同時にその程度も増強されることが確認された。当講座で見いだした生後3日目胸腺摘出 NFS/*sId*モデルマウスにおいても同様の結果がえられた。エストロゲン欠乏に依存して唾液腺に浸潤してきた細胞は SS の病

態に一致してその大部分が CD4 陽性 T 細胞であることも確認した。



IL-17を産生する Th17 細胞は炎症や自己免疫疾患に関与することが明らかにされた比較的新しい T 細胞サブセットであるが、多くの研究報告がなされている。エストロゲン欠乏



により脾臓では Th17 細胞に大きな変化は認

められないが、頸部リンパ節、唾液腺において優位に Th17 細胞の増加が認められた。実際に卵巣摘出により血清中および唾液腺ホモジネート中には優位に IL-17 が増加していた。局所で産生された IL-17 は唾液腺細胞から TNF などの炎症性サイトカインを誘導することも確認した。以上の結果からエストロゲン欠乏は T 細胞の Th17 への分化誘導を促進して SS 発症に関与していることが示唆された。標的臓器への Th17 細胞誘導機序解明はシェーグレン症候群治療につながる可能性があると考えられる。

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 8 件)

1. Yamada A, Ishimaru N, Arakaki R, Katunuma N, Hayashi Y.: Cathepsin L inhibition prevents murine autoimmune diabetes via suppression of CD8(+) T cell activity. PLoS One. 5:e12894. 2010. (査読有)

2. Arakaki R, Ishimaru N, Hayashi Y.: Immunotherapeutic targets in estrogen deficiency-dependent Sjögren's syndrome-related manifestations. Immunotherapy. 2:339-346. 2010. (査読無)

3. Ishimaru N, Nitta T, Arakaki R, Yamada A, Lipp M, Takahama Y, Hayashi Y.: In situ patrolling of regulatory T cells is essential for protecting autoimmune exocrinopathy: PLoS ONE. 5:e8588. 2010. (査読有)

4. Ishimaru N, Takagi A, Kohashi M, Yamada A, Arakaki R, Kanno J, Hayashi Y.: Neonatal exposure to low-dose 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin causes autoimmunity due to the disruption of T cell tolerance. J Immunol. 182:6576-86. 2009 (査読有)

5. Arakaki R, Nagaoka A, Ishimaru N, Yamada A, Yoshida S, Hayashi Y.: Role of plasmacytoid dendritic cells for aberrant class II expression in exocrine glands from estrogen-deficient mice of healthy background. Am J Pathol. 5:1715-24. 2009 (査読有)

6. Hayashi Y, Arakaki R, Ishimaru N: Salivary gland and autoimmunity. J Med

Invest. 56 :185-91. 2009 (査読有)

7. Ishimaru N, Arakaki R, Yoshida S, Yamada A, Noji S, Hayashi Y. Expression of the retinoblastoma protein RbAp48 in exocrine glands leads to Sjogren's syndrome-like autoimmune exocrinopathy. J Exp Med. 205:2915-27. 2008 (査読有)

8. Ishimaru N, Yamada A, Kohashi M, Arakaki R, Takahashi T, Izumi K, Hayashi Y. Development of inflammatory bowel disease in Long-Evans Cinnamon rats based on CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cell dysfunction. J Immunol. 180:6997-7008. 2008 (査読有)

[学会発表] (計 21 件)

1. 松本一真、Immunoregulatory effect via RANKL and Fas signaling of dendritic cells in murine autoimmune arthritis models、第 39 回日本免疫学会総会学術集会、2010 年 12 月 3 日、大阪国際会議場(大阪市)
2. 小橋真之、低用量ダイオキシンの新生児期投与による自己免疫病変への誘導、第 39 回日本免疫学会総会学術集会、2010 年 12 月 3 日、大阪国際会議場(大阪市)
3. 山田安希子、I 型糖尿病モデルマウスにおけるカテプシン L 特異的阻害剤を介した治療学的解析、第 39 回日本免疫学会総会学術集会、2010 年 12 月 3 日、大阪国際会議場(大阪市)
4. 大浦律子、Fas/NF-kB を介したマクロファージによる免疫調節機構、第 39 回日本免疫学会総会学術集会、2010 年 12 月 2 日、大阪国際会議場(大阪市)
5. 石丸直澄、In situ patrolling of regulatory T cells is essential for protecting organ-specific autoimmunity.、第 39 回日本免疫学会総会学術集会、2010 年 12 月 2 日、大阪国際会議場(大阪市)
6. 新垣理恵子、エストロゲン欠乏によって唾液腺に誘導される islet amyloid polypeptide の機能とその意義、第 39 回日本免疫学会総会学術集会、2010 年 12 月 2 日、大阪国際会議場(大阪市)
7. 石丸直澄、Critical Signaling Pathway via CCR7 of Foxp3+CD25+CD4+ Regulatory T Cells for the Egress from Lymph Nodes、第 14 回国際免疫学会議、2010 年 8 月 26 日、神戸ポートピアホテル、神戸国際展示場 (神戸市)
8. 大浦 律子、Rapid T cell death via interaction with CD11b+ macrophages in Fas-deficient host、第 14 回国際免疫学会議、2010 年 8 月 24 日、神戸ポートピアホテル、神戸国際展示場 (神戸市)
9. 松本 一真、Fas-independent apoptosis of T cells via DCs controls autoimmune arthritis、第 14 回国際免疫学会議、2010 年 8 月 24 日、神戸ポートピアホテル、神戸国際展示場 (神戸市)
10. 松本 一真、マウス関節炎モデル樹状細胞の RANKL/FAS シグナルを介した免疫抑制効果、第 99 回日本病理学会総会、2010 年 4 月 29 日、京王プラザホテル (東京都新宿区)
11. 山田 安希子、I 型糖尿病モデルマウスにおけるカテプシン L 特異的阻害剤を用いた治療効果の検討、第 99 回日本病理学会総会、2010 年 4 月 29 日、京王プラザホテル (東京都新宿区)
12. 石丸直澄、シェーグレン症候群における調節性 T 細胞の役割、第 99 回日本病理学会総会、2010 年 4 月 29 日、京王プラザホテル (東京都新宿区)
13. 新垣理恵子、エストロゲン欠乏依存的に唾液腺に誘導される膵ラ氏島アミロイドポリペプチドの機能とその意義、第 99 回日本病理学会総会、2010 年 4 月 28 日、京王プラザホテル (東京都新宿区)
14. 山田安希子、I 型糖尿病モデルマウスにおけるカテプシン L を介した治療学的解析、第 98 回日本病理学会総会、2009 年 5 月 3 日、国立京都国際会館 (京都市)
15. 石丸直澄、Local Tolerance の破綻による臓器特異的自己免疫疾患の発症機序、第 98 回日本病理学会総会、2009 年 5 月 3 日、国立京都国際会館 (京都市)
16. 新垣理恵子、エストロゲン欠乏によって唾液腺に誘導される樹状細胞の同定とその機能、第 98 回日本病理学会総会、2009 年 5 月 3 日、国立京都国際会館 (京都市)
17. Yamada A. Therapeutic analysis for

autoimmune diabetes in NOD mice using specific inhibitor for cathepsin L、第 38 回日本免疫学会総会・学術集会、2008 年 12 月 1 日、国立京都国際会館（京都市）

18. Ishimaru N、Neonatal exposure to low-dose 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin(TCDD)causes autoimmunity due to the disruption of T cell tolerance.、第 38 回日本免疫学会総会・学術集会、2008 年 12 月 1 日、国立京都国際会館（京都市）

19. Arakaki R、Identification and functional analysis of CD11c+B220+dendritic cells induced by estrogen deficiency in salivary glands.、第 38 回日本免疫学会総会・学術集会、2008 年 12 月 1 日、国立京都国際会館（京都市）

20. 新垣理恵子、エストロゲン欠乏による外分泌腺上皮クラス II 発現の誘導メカニズム、第 97 回日本病理学会総会、2008 年 5 月 16 日、石川県立音楽堂（金沢市）

21. 山田安希子、I 型糖尿病モデルマウスにおけるカテプシン L 阻害剤を用いた治療学的解析、第 97 回日本病理学会総会、2008 年 5 月 15 日、石川県立音楽堂（金沢市）

[図書] (計件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新垣 理恵子 (ARAKAKI RIEKO)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・助教

研究者番号：00193061

(2) 研究分担者

石丸 直澄 (ISHIMARU NAOZUMI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・准教授

研究者番号：60314879

(3) 連携研究者

なし