

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2009～2011

課題番号：21249090

研究課題名（和文）新規シェーグレン症候群疾患モデルを用いた革新的治療法の探索

研究課題名（英文）Immunotherapeutic analysis using newly established murine models for Sjogren's syndrome

研究代表者

林 良夫 (HAYASHI YOSHIO)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・客員教授

研究者番号：00127854

研究成果の概要（和文）：200 字

新規疾患モデルを用いたシェーグレン症候群発症機序の解明と治療法開発を目的として、RbAp48 遺伝子導入マウス、CCR7 遺伝子欠損マウス等を用いて検討した。疾患モデルマウスでは涙腺、唾液腺に炎症性病変が加齢的に観察され、MHC クラス II 転写活性化因子の発現が有意に上昇していた。アテロコラーゲンを利用した RbAp48 siRNA 点眼治療法を試み、siRNA 点眼により有効な治療効果の可能性を確認した。

研究成果の概要（英文）：

We reported that transgenic (TG) expression of RbAp48, and CCR7 knockout (KO) mice resulted in the development of autoimmune exocrinopathy resembling Sjogren's syndrome. CD4<sup>+</sup>T cell-mediated autoimmune lesions were aggravated with age, in association with autoantibody productions. We obtained evidences that salivary epithelial cells can produce interferon- $\gamma$  and interleukin-18, which activates interferon regulatory factor-1 (IRF-1), and class II transactivator (CIITA). Regulatory T (Treg) cells were significantly retained in the lymph nodes of CCR7KO mice, and failed to patrol within the exocrine organs to protect autoimmunity. The gene targeting for RbAp48 with application of in vivo siRNA administration prevented autoimmune lesions. These results indicate a novel immunocompetent role of epithelial cells, resulting in loss of local tolerance prior to developing gender-based autoimmunity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	15,100,000	4,530,000	19,630,000
2010 年度	10,200,000	3,060,000	13,260,000
2011 年度	10,200,000	3,060,000	13,260,000
年度			
年度			
総計	35,500,000	10,650,000	46,150,000

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：シェーグレン症候群・自己免疫疾患・治療法開発・RbAp48・CCR7・エストロゲン・アロマターゼ・RNA 干渉

## 1. 研究開始当初の背景

本研究では RbAp48 遺伝子導入(TG)マウス

及び CCR7 遺伝子欠損(KO)マウスなど新たに開発されたシェーグレン症候群疾患モ

デルの詳細な病態解析によって生体内における免疫制御システムの全体像の解明を試み、革新的治療法の研究開発を実施した。

## 2. 研究の目的

多くの自己免疫疾患が女性優位であることはよく知られるが、エストロゲン欠乏との関連について詳細な分子機序は不明であった。Rb 関連タンパク RbAp48 がエストロゲン欠乏に依存して外分泌腺特異的にアポトーシスを誘導することを見出し、RbAp48TG マウスはシェーグレン症候群に類似した自己免疫性外分泌腺炎が発症することを確認した。RbAp48TG マウス、CCR7KO マウスに自己抗原反応性T細胞が出現し、さらに初代培養唾液腺細胞は MHC クラス II 分子、CD86、及び ICAM-1 を高発現している事実が判明しており、末梢における自己反応性T細胞の活性化機構解明に有用なツールになると考えられる。自己免疫疾患発症には異所性抗原提示細胞におけるアポトーシスカスケードと MHC クラス II 発現、自己抗原ペプチドへの抗原プロセッシング機構のクロストークが予測され、これらの複雑な分子基盤の解明が必要である。標的臓器上皮細胞の自己免疫反応に重要とされる分子に関してモデル動物を用いてノックダウンする系として、局所または全身へのこれら遺伝子の siRNA 投与やアンチセンス遺伝子導入による実験的治療を実施し、自己免疫疾患シェーグレン症候群に対する革新的治療法の開発を目指す。

## 3. 研究の方法

性差に関連した抗原提示細胞における異所性 MHC クラス II 発現の分子機構については不明な点が多く、適切なモデル系が存在しないことからアポトーシスとの関連性についても殆ど解明が進んでいない。申請者らが報告してきた実証的事実から、シェーグレン症候群モデルマウスにおける標的臓器としての唾液腺では病態増強とともに上皮細胞のアポトーシスが進行し (Am. J. Pathol. 156:1557, 2000. J. Immunol. 169:1050, 2002, Am. J. Pathol. 163:1481, 2003, Am. J. Pathol. 167:1051, 2005, Mol. Cell. Biol. 26:2924, 2006)、標的臓器上皮細胞は MHC クラス II 分子とともに、自己抗原ペプチドを共発現している事実が明らかにされている (J. Clin. Invest. 110:361, 2002. J. Exp. Med. 205:2915, 2008.)。自己反応性T細胞による臓器特異的組織破壊はシェーグレン症候群以外の自己免疫疾患にも共通するメカニズムであると予測される。

新たなシェーグレン症候群モデル CCR7KO マウスを用い、末梢リンパ組織あるいは標的臓器組織における Treg 細胞の分布を検討するとともに、細胞移入実験により CCR7KO Treg 細

胞の抑制性機能を評価して、Treg 細胞の標的臓器での末梢性トレランス維持への寄与や末梢への細胞移動について検討する。

以上の結果に基づき、siRNA などを用いてアポトーシス制御、MHC クラス II 発現制御を検討し、さらに Treg 細胞移入などによる実験的治療法の検証を試みることにより、自己免疫疾患制圧の新たな治療戦略の可能性を明らかにする。

## 4. 研究成果

本研究では新たに開発された疾患モデルの詳細な病態解析によって生体内における免疫制御システムの全体像の解明を試み、革新的治療法の研究開発を目指して実施した。RbAp48TGマウスでは唾液腺上皮細胞に RbAp48 を介して IFN- $\gamma$  の産生が誘導されることによって MHC クラス II 分子の異所性発現が認められることに加え、唾液腺上皮細胞から IL-18 が産生され IL-1 のような炎症性サイトカインの活性化およびアポトーシス誘導により、末梢トレランス破綻に至る可能性が示された。また、病態形成と関連して所属リンパ節の CD4 陽性 T 細胞において DUSP1, LT $\cdot$ R の強発現が認められ、組織破壊に関与する自己反応性 T 細胞のエフェクター機能獲得に至る分子機構の一端が明らかにされた。新規疾患モデルを用いた自己免疫疾患発症機序の解明を目指すために、エストロゲンを起点とした自己免疫疾患発症機序に関連して、エストロゲン合成酵素として知られている アロマターゼ 遺伝子欠損マウスを用いて、自己免疫疾患における標的臓器の変化を検討した。アロマターゼ 遺伝子欠損マウスでは涙腺、唾液腺に限局した炎症性病変が加齢的に観察された。アロマターゼ 遺伝子欠損マウスの唾液腺組織において、MHC class II 転写活性化因子 (CIITA) の mRNA 発現が対照マウスと比較して、有意に上昇していることが判明した。この所見は RbAp48TG マウスで得られた結果と一致していた。一方、CCR7KO マウスは 8 週齢頃からシェーグレン症候群様自己免疫病変が観察され、その病変は経時的に増悪する。CCR7KO マウスのリンパ節において Treg 細胞の分画が対照群と比較して有意に増加していることが判明した。CCR7KO マウスの CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞を Rag2KO マウスに移入する系に対照 Treg 細胞または CCR7KO Treg 細胞を cotransfer することによる自己免疫病変の病態を検討したところ、対照 Treg 細胞の移入により自己免疫病変が抑制されるのに対し、CCR7KO マウス Treg 細胞の移入により病変は増悪した。即ち、CCR7KO Treg 細胞の *in vivo* での抑制性機能は障害されていた。Treg 細胞

移入によって臓器特異的な自己反応性T細胞の抑制が可能であり、Treg細胞による細胞免疫療法の有効性が確認された。また、インビボでのsiRNAを効率よく導入するために、アテロコラーゲンあるいは合成コラーゲンの応用に関する実験的研究を実施した (Dev Growth Differ 52:339, 2010, 53:48, 2011)。RbAp48 遺伝子ノックダウンのためにRbAp48siRNAをアテロコラーゲンを応用してシェーグレン症候群疾患モデルへ点眼治療法を試みた結果、siRNA点眼により有効な治療効果の可能性が確認された。

#### 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 32 件)

1. Ishimaru N, Yamada A, Nitta T, Arakaki R, Lipp M, Takahama Y, Hayashi Y: CCR7 with S1P1 signaling through AP-1 for migration of Foxp3+ regulatory T-cells control autoimmune exocrinopathy. *Am. J. Pathol.* 180:199-208, 2012. (査読有)
2. Kawakami E, Kinouchi N, Adachi T, Ohsawa Y, Ishimaru N, Ohuchi H, Sunada Y, Hayashi Y, Noji S. Atelocollagen-mediated systemic administration of myostatin-targeting siRNA improves muscular atrophy in caveolin-3-deficient mice. *Dev Growth Differ* 53(1):48-54, 2011 (査読有)
3. Watanabe M, Ishimaru N, Ashrin MN, Arakaki R, Yamada A, Ichikawa T, Hayashi Y: A novel DC therapy with manipulation of MKK6 gene on Nickel allergy in mice. *PLoS One.* 6: e19017, 2011. (査読有)
4. Lei Y, Mat Ripen A, Ishimaru N, Ohigashi I, Nagasawa T, Jeker L, Bosl M, Hollander GA, Hayashi Y, de Waal Malefyt R, Nitta T, Takahama Y. Aire-dependent production of XCL1 mediates medullary accumulation of thymic dendritic cells and contributes to regulatory T cell development. *J. Exp. Med.* 208:383-394, 2011. (査読有)
5. 林 良夫, 新垣理恵子, 石丸直澄: Sjogren 症候群 日本内科学会雑誌 100:1262-1268, 2011. (査読無)
6. 石丸直澄, 井澤俊, 林 良夫: RANKL と Fas による免疫応答の制御 臨床免疫・アレルギー科 55:142-147, 2011. (査読無)
7. 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(1):e8588, 2010. (査読有)
8. 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(9): e12894, 2010. (査読有)
9. Sakai T, Liu L, Teng X, Ishimaru N, Tran NH, Kim SM, Sano N, Hayashi Y, Kaji R, Fukui K. : Inflammatory disease and cancer with a decrease in Kupffer cell numbers in Nucling-knockout mice. *Int. J. Cancer.* 126:1079-1094, 2010. (査読有)
10. Arakaki R, Ishimaru N, Hayashi Y : Immunotherapeutic target in estrogen deficiency- dependent Sjogren's syndrome-related manifestations. *Immunotherapy* 2(3): 339-346, 2010. (査読有)
11. 石丸直澄, 小橋真之, 山田安希子, 新垣理恵子, 林 良夫: 新生児におけるダイオキシンへの暴露と自己免疫病の発生 臨床免疫・アレルギー科 53(1):92-96, 2010. (査読無)
12. Arakaki R, Nagaoka A, Ishimaru N, Yamada A, Yoshida S, Hayashi Y : Role of plasmacytoid dendritic cells (pDCs) for aberrant class II expression in the exocrine glands from estrogen-deficient mice of healthy background. *Am. J. Pathol.* 174:1715-1724, 2009. (査読有)
13. 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.* 182:6576-6586, 2009. (査読有)

14. Tsubota K, Nishiyama T, Mishima K, Inoue H, Doi T, Hattori Y, Kodama T, Higuchi A, Hayashi Y, Saito I : The role of fractalkine as accelerating factor on the autoimmune exocrinopathy in mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50:4753-4760, 2009. (査読有)
15. Yamakoshi K, Takahashi A, Hirota F, Nakayama R, Ishimaru N, Kubo Y, Mann DJ, Ohmura M, Hirao A, Saya H, Arase S, Hayashi Y, Nakao K, Matsumoto M, Ohtani N, Hara E. : Real-time in vivo imaging of p16Ink4a reveals cross talk with p53. *J. Cell Biol.* 186:393-407, 2009. (査読有)
16. Iwata T, Kuwajima M, Sukeno A, Ishimaru N, Hayashi Y, Wabitsch M, Mizusawa N, Itakura M, Yoshimoto K. : YKL-40 secreted from adipose tissue inhibits degradation of type I collagen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 388:511-516, 2009 (査読有)
17. 石丸直澄、林 良夫: ダイオキシンによる免疫異常 臨床免疫・アレルギー科 51(1):60-65, 2009. (査読無)
18. 石丸直澄、林 良夫: 炎症性腸疾患におけるレギュラトリーT細胞 臨床免疫・アレルギー科 51(3):301-306, 2009. (査読無)
19. 石丸直澄、林 良夫: Sjogren 症候群の発症とエストロゲン 臨床免疫・アレルギー科 51(4):431-437, 2009. (査読無)
20. 井澤 俊、石丸直澄、田中英二、林 良夫: RANKL と Fas シグナルクロストークによる樹状細胞の機能調節機構 臨床免疫・アレルギー科 52(5):471-477, 2009. (査読無)
21. 林 良夫、石丸直澄、新垣理恵子: シェーグレン症候群 感染・炎症・免疫 39:80-82, 2009. (査読無)

[学会発表] (計 38 件)

1. Masahiro Hiasa, A novel role of NFκB relB in bone remodeling. 第 40 回日本免疫学会総会・学術集会、2011 年 12 月 28 日、幕張メッセ (千葉市)
2. Ritsuko Oura, In vivo T cell apoptosis via interaction with CD11b+ macrophages in Fas-deficient host. 第 40 回日本免疫学会総会・学術集会、2011 年 11 月 28 日、幕張メッセ (千葉市)

3. Kazuma Matsumoto, Hyperfunctions of osteoclasts in pathogenesis of rheumatoid arthritis in MRL/lpr mice. 第 40 回日本免疫学会総会・学術集会、2011 年 11 月 28 日、幕張メッセ (千葉市)
4. Akihiko Iwasa, A critical role of aromatase in the pathogenesis of Sjogren's syndrome. 第 40 回日本免疫学会総会・学術集会、2011 年 11 月 28 日、幕張メッセ (千葉市)
5. Rieko Arakaki, Th17 cells on the development of Sjogren's syndrome in estrogen deficient NOD mice. 第 40 回日本免疫学会総会・学術集会、2011 年 11 月 28 日、幕張メッセ (千葉市)
6. Meinar Nur Ashrin, Analysis of Immune Responses to Metal using Murine Nickel Allergy Model. 第 40 回日本免疫学会総会・学術集会、2011 年 11 月 27 日、幕張メッセ (千葉市)
7. 石丸直澄、自己免疫疾患の病態におけるメモリーCD8 陽性 T 細胞の役割、第 100 回日本病理学会総会、2011 年 4 月 28 日、パシフィコ横浜 (横浜市)
8. 松本一真、関節リウマチ病態における破骨細胞を介した T 細胞活性化機構の解析、第 100 回日本病理学会総会、2011 年 4 月 28 日、パシフィコ横浜 (横浜市)
9. 新垣理恵子、エストロゲン欠乏によって誘導されるシェーグレン症候群病態増強への Th17 細胞の関与、第 100 回日本病理学会総会、2011 年 4 月 28 日パシフィコ横浜 (横浜市)
10. 小橋真之、低用量ダイオキシンの新生仔期投与による自己免疫病変の誘導 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)
11. Ishimaru N, Neonatal exposure to low-dose 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) causes autoimmunity in salivary glands due to the disruption of T cell tolerance. The 11<sup>th</sup> International Symposium on Exocrine Secretion Program and Abstract p.8, 2009. 12. 3. KOBE

[図書] (計 0 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

林 良夫 (HAYASHI YOSHIO)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス  
研究部・客員教授  
研究者番号：00127854

(2) 研究分担者

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：40231120  
山田 安希子 (YAMADA AKIKO)  
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：70452646  
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(H21～H22 年まで)  
研究者番号：60314879

(3) 連携研究者