

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390429

研究課題名(和文)性差に起因する自己免疫疾患発症機序の解明

研究課題名(英文)Autoimmune diseases driven with sex difference

研究代表者

新垣 理恵子(Arakaki, Rieko)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：00193061

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,800,000円、(間接経費) 4,440,000円

研究成果の概要(和文)：自己免疫疾患の多くは加齢に伴って発症し、特に閉経期以降の女性優位に発症することから、自己免疫疾患発症には性ホルモンの影響が多大であると考えられる。女性患者の割合が最も多いシェーグレン症候群(SS)モデルマウスの標的臓器(唾液腺)では卵巣摘出により、唾液腺上皮のアポトーシスおよびTh17細胞の増加が認められ、卵巣未摘出群と比較して病態が悪化していた。さらに免疫不全マウスを利用したリンパ球移入によるSS再構築においてもレシビエントの卵巣摘出がSS発症に重要であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Physiological gender differences in immune system are well recognized and suggested that sex steroid hormones such as estrogen may be involved in the regulation of autoimmunity. We show that estrogen deficiency induces apoptosis of target cells and enhances the inflammatory lesion and Th17 cells in the salivary gland of Sjogrens syndrome (SS) model mice. By the adoptive transfer of cervical lymph node cells from NOD mice (SS model mice) into NOD/scid mice, estrogen deficiency enhances inflammatory lesions in Ovx-NOD/scid mice than Sham-NOD/scid mice. These results show that estrogen deficiency may play a pivotal role for gender-based autoimmunity in postmenopausal women.

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 シェーグレン発症群 エストロゲン欠乏 性差 肥満 性差

1. 研究開始当初の背景

(1) 自己免疫疾患発症患者数は、年々増加傾向にある。糖尿病やクローン病などは、生物学的製剤による薬物療法により病態のコントロールがかなり可能になってきたが、自己免疫疾患の病態発症の原因・メカニズム等はまだ解明されておらず、QOLを著しく低下させるこれら自己免疫疾患完治のための治療法開発が切望されている。また自己免疫疾患の多くは女性優位に発症することが知られ、自己免疫疾患発症への性ホルモンの関与が提唱されている。

(2) 自己免疫疾患の大半は病因不明のままであり、疾患非特異的診断・治療法に頼っているのが現状である。一般に、自己免疫疾患発症には性差がみられることは古くから知られている。特に多くの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。SSは閉経期以降の女性に最も優位に発症することから、エストロゲン欠乏に起因する自己免疫疾患解析には最も適した疾患である。SS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な点が多く、有効な治療法の開発のためにも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。

(3) 我々のグループではSSの病因性自己抗原として膜タンパク抗原 α -フォドリンを同定した(*Science* 276:604, 1997)。唾液腺にはエストロゲン欠乏依存的にアポトーシスが誘導され、その際に α -フォドリンが自己抗原120 kDへ分断化されることを確認し、エストロゲン欠乏による標的臓器のアポトーシスが自己免疫病変発症に密接に関連していることを明らかにしてきた(*Am.J.Pathol.* 155:173, 1999, *Am.J.Pathol.* 167:1051,2003, *Endocrinol.* 145:2384,2004)。さらに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、エストロゲン欠乏時に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(*Mol. Cell. Biol.* 26:2924, 2006)、唾液腺特異的RbAp48発現トランスジェニックマウスがSS様病態を発症することを明らかにした(*J.Exp. Med.*205:2915,2008)。またエストロゲン欠乏依存的に唾液腺アポトーシスが誘導される際に、プラズマサイトイド樹状細胞(pDC)を介した異所性MHCクラスII発現が上昇することも明らかにした(*Am.J.Pathol.* 174:1715, 2009)。さらに内分泌攪乱化学物質(環境ホルモン)の代表分子であるダイオキシン(TCDD)新生児暴露ではTCDDの受容体である **aryl hydrocarbon receptor (AhR)**発現亢進がT細胞の負の選択異常をもたらし、雌

マウスに自己免疫病変を誘導することを見出した(*J.Immunol.*182:6576,2009)。申請者らはこれまで多くのモデルマウスを用いてエストロゲン欠乏によるSS発症メカニズムの解明を試みてきたが、これまでの結果を包括的に捉え、さらに核心的な分子・メカニズムの追求を推進していきたいと考えている。

2. 研究の目的

女性優位に発症する多くの自己免疫疾患とエストロゲン欠乏との関連についての詳細は未だ十分な解明がなされていない。性差による自己免疫疾患発症メカニズムを解明するには、**標的臓器**と免疫担当細胞(T細胞、B細胞、樹状細胞、マクロファージ等)の両方からアプローチしなくてはならない。エストロゲンはエストロゲン受容体(ER)に結合して様々な機能を発揮するが、エストロゲン結合ERはエストロゲン応答配列(ERE)に結合して目的分子の転写調節をするだけでなく、エストロゲン結合あるいは非結合ERが種々の転写因子と複合体を形成して増殖や炎症等に関わることが明らかになり、ERの多様性が注目されている。ダイオキシン受容体である**AhR**はERと複合体を形成してホルモン分解を促進し、ホルモン活性を減弱させることによって、ホルモン作用を攪乱する。一方ではERと複合体を形成する**AhR**が、**Th17**細胞、**Treg**細胞の分化や**Th1/Th2**細胞の分化バランスを調整していることが報告され、**AhR**は免疫制御療法における1つのターゲットになると考えられている。そこでエストロゲン欠乏に高い感受性を示すSSモデルマウスを利用して、エストロゲン欠乏によるSS発症時の**Treg**、**Th17**細胞の動態を詳細に解析し、**AhR**を始めとする病態発症および制御に関わる分子を明らかにしたいと考えている。本研究では、免疫細胞と標的臓器細胞の両面の視点から、病期ごとの自己免疫疾患発症の**実行分子の同定**を試みる。SSモデルマウスを用いて、エストロゲンや**AhR**が**関与する免疫応答の異常**がどのように性差に起因する自己免疫疾患発症に至るのか、その生体内分子メカニズムを解明することによって女性に好発する自己免疫疾患制圧を目的として研究を進めたいと考えている。

3. 研究の方法

(1) NOD(SS疾患モデルマウス)マウスを利用した唾液腺組織への浸潤T細胞および頸部リンパ節T細胞のサブセット解析

および NOD/scid マウスへの T 細胞移入による疾患の再構築

(2) アロマターゼ欠損マウスの SS 病態解析:エストロゲン合成酵素であるアロマターゼを欠損したマウスを用いてエストロゲン欠乏が持続する系での SS 病態を解析する。

(3) Aryl hydrocarbon receptor (AhR) 欠損マウスを利用した SS 病態発症解析

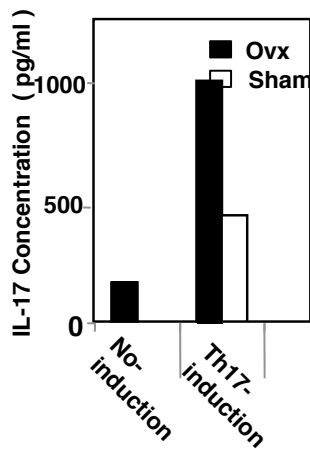
4. 研究成果

(1) NOD マウスを使用したエストロゲン欠乏依存性の SS 発症解析

NOD 雌マウスは 10 週齢過ぎから唾液腺への炎症浸潤・唾液分泌量低下が観察される SS モデルマウスである (雄マウスは顎下腺への病態誘導は弱い) が涙腺への病態は早期より出現する)。NOD 雌マウスに卵巣摘出を施すと Sham 群に比較して早期により強い唾液腺組織への病態誘導があること、このエストロゲン欠乏時には頸部リンパ節および唾液腺浸潤免疫細胞において優位に Th17 細胞の割合が上昇していることを (脾臓は変化なし) 前回の成果報告書 (課題番号 20390479) にて報告した。頸部リンパ節 CD4 陽性 T 細胞を Th17 分化誘導条件で培養すると OVX 群から得られた T 細胞は Sham 群に比較して Th17 細胞に分化誘導される

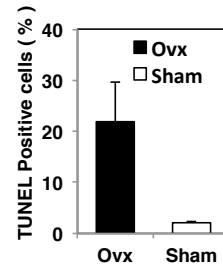
割合が多く、エストロゲン欠乏が T 細胞を Th17 優位に誘導することが明らかとなった。唾液腺組織においても IL-17 の発現が OVX 群で高いことを ELISA にて確認し、産生された IL-17 が唾液腺上皮細胞に作用して IL-1、TNF 等の炎症性サイト

カインを誘導することを確認した。SS モデルマウスにおけるエストロゲン欠乏は、頸部リンパ節の T 細胞に作用して Th17 細胞優位に傾けるが、前述したように脾臓の T 細胞にはこのような変化が認められなかった。またエストロゲン欠乏は唾液腺組織特異的に SS モデルマウスにアポトーシスを誘導する (右図)。SS モデルマウスではエストロゲン欠乏が標的臓器のアポトーシス、およびその局所リンパ節の Th17 細胞増加を誘導することが明らかとなった。そこで T および B 細胞の発達分化が障害されている免疫不全 NOD マウス (NOD/scid) に卵巣摘出を施し、その後 NOD

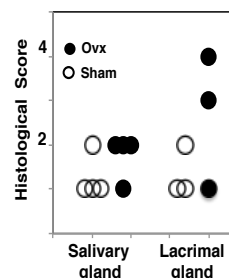


卵巣摘出群の頸部リンパ節 CD4 陽性 T 細胞は Th17 細胞に分化誘導されやすい

マウス頸部リンパ節細胞 (制御性 T 細胞は除去) を移入することによって SS 誘導の有無を検討した。使用したリンパ節細胞は Th17 細胞の増加が誘導されていない卵巣未摘出の細胞である。この細胞を移入して 7 週後に標的臓器の病態をスコア化した結果を右図に示すが、卵巣摘出群において優位に病態が悪化をしていた。このことからエストロゲン欠乏依存性の SS 発症には標的臓器側 (唾液腺上皮細胞) にエストロゲン欠乏によって誘導される変化が重要な誘導ステップになっており、おそらく上皮細胞のアポトーシスが重要な役割を担っていると考えられる。しかし健康 B6 マウスではこのような SS 発症の再構築を認めることができないので、T 細胞の分化異常も SS 発症には必須であり、エストロゲン欠乏と SS モデルマウスリンパ節細胞を用いることで、標的臓器と免疫担当細胞の両方を病態発症に傾けることができるので加齢という追加ファクターを待たずに早期に SS を発症させることが可能であることが明らかとなった。



卵巣摘出群の唾液腺組織におけるアポトーシスの上昇

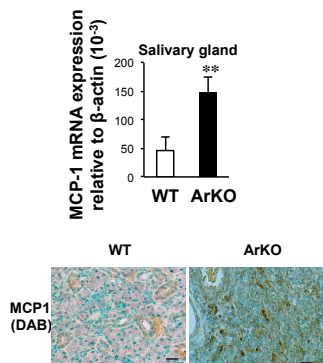


NOD/scid への頸部リンパ節移入では NOD/scid のエストロゲン欠乏がより病態を憎悪する

(2) アロマターゼ欠損マウスにおける SS 病態発症解析

アロマターゼ欠損マウスが SS を発症することは既に報告されているが、発症は高齢 (30 週以降) になってからである。舌下腺分化異常を持つ NFS/sld マウスは生後 3 日目に胸腺摘出 (3 dTx) を施すと 8 週齢より SS 病態を誘導する SS モデルマウスである。そこで 3 dTx-NFS/sld マウスにアロマターゼ阻害剤 (AI) を投与するとより早期により強い病態悪化を認めた。発症に加齢が必要なアロマターゼ欠損マウスと顕著に病態悪化を招いたアロマターゼ阻害剤投与 3 dTx-NFS/sld モデルの結果から、エストロゲン欠乏はまず標的臓器に影響を与え、免疫細胞への影響にはより多くの時間 (Aging) が必要であると推測された。まずアロマターゼ欠損マウスと野生型マウスの血清中のサイトカイン・ケモカイン量を Multiplex により確認したところ、IL-6、IL-1β、IL-2 等の炎症性サイトカインの上昇と優位な Monocyte chemoattractant

protein (MCP-1)の上昇を認めた。またアロマターゼ欠損マウスは野生型に比較して体重増加傾向にあり、内臓脂肪量も多い。脂肪組織に存在する多くのマクロファージや脂肪組織から産生されるアディポカイン等が脂肪代謝や炎症を制御して免疫系に影響していることが明らかになってきている。これらのことからアロマターゼ欠損マウスにおけるマクロファージとMCP-1について検討した。アロマターゼ欠損マウスの内臓脂肪および唾液腺周囲脂肪中にはCD192 (MCP-1受容体)を発現する炎症性マクロファージM1が野生型

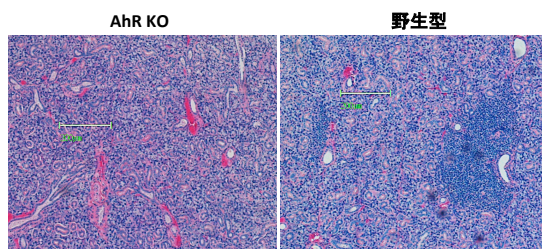


唾液腺におけるMCP-1の発現はアロマターゼ欠損マウスにおいて優位に高い

に比較して優位に存在し、また多くのMCP-1産生が見られた。ヒトの場合は加齢や疾患に伴い顕著な唾液腺の脂肪化が観察され、脂肪細胞や脂肪中のマクロファージから産生されるMCP-1やアディポカインが直接唾液腺組織の免疫機能に干渉している可能性が高いと思われる。SSモデルマウスにおいては若年齢での唾液腺脂肪化は観察されないが、年齢とともにOil Redに染色される脂肪が増加しており、今後唾液腺およびその周囲の脂肪と自己免疫疾患発症との関わりについても検討していかなくてはならないと考えている。

(3) Aryl hydrocarbon receptor (AhR) 欠損マウスを利用したSS発症の解析
ダイオキシンの受容体であるAhRはTh17や制御性T細胞(Treg)に関わっていることが明らかになり、AhR欠損マウスではT細胞のTh17細胞への分化が抑制されるために実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)やI型糖尿病の発症が抑えられることが報告されている。SS発症についてAhR欠損マウスを解析すると、加齢により出現する野生型での唾液腺や涙腺への炎症性細胞の浸潤が抑制されていることを見いだした。加齢による炎症浸潤でありSS発症と対応させることはできないが、唾液腺・涙腺はAhR発現が他組織よりも高く、

Salivary gland 42週齢



さらに卵巣摘出によるエストロゲン欠乏により唾液腺・涙腺で特にAhR発現が高くなることを確認した。AhR欠損マウスを利用することによって内分泌攪乱物質の受容体発現、エストロゲン欠乏、Th17細胞分化抑制そしてSS発症を総括的に解析できる可能性が示されたと考えられる。

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 5 件)

- ① Akiko Yamada, Rieko Arakaki, Yasusei Kudo and Naozumi Ishimaru, Targeting IL-1 in Sjögren's syndrome., Expert Opinion on Therapeutic Targets, 査読有り、Vol. 17, No. 4, pp. 393--401, 2013. doi:10.1517/14728222.2013.754427.
- ② Ritsuko Oura, Rieko Arakaki, Akiko Yamada, Yasusei Kudo, Eiji Tanaka, Yoshio Hayashi and Naozumi Ishimaru : Induction of Rapid T Cell Death and Phagocytic Activity by Fas-Deficient lpr Macrophages, The Journal of Immunology, 査読有り、Vol. 190, No. 2, 578-585, 2013 doi: 10.4049/jimmunol.1103794
- ③ Takashi Izawa, Tomoyuki Kondo, Mie Kurosawa, Ritsuko Oura, Kazuma Matsumoto, Eiji Tanaka, Akiko Yamada, Rieko Arakaki, Yasusei Kudo, Yoshio Hayashi and Naozumi Ishimaru : Fas-Independent T-Cell Apoptosis by Dendritic Cells Controls Autoimmune Arthritis in MRL/lpr Mice, PLoS ONE, 査読有り、Vol. 7, No. 12, p. e48798, 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0048798.
- ④ Naozumi Ishimaru, Akiko Yamada, Takeshi Nitta, Rieko Arakaki, Martin Lipp, Yousuke Takahama and Yoshio Hayashi : CCR7 with S1P1 signaling through AP-1 for migration of Foxp3+ regulatory T-cells controls autoimmune exocrinopathy, The American Journal of Pathology, 査読有り、Vol. 180, No. 1, pp. 199--208, 2012. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.09.027.
- ⑤ Megumi Watanabe, Naozumi Ishimaru, Meinur Nur Ashrin, Rieko Arakaki, Akiko Yamada, Tetsuo Ichikawa and Yoshio Hayashi : A Novel DC Therapy with Manipulation of MKK6 Gene on Nickel Allergy in Mice, 査読有り、 PLoS ONE, Vol. 6, No. 4, p. E19017, 2011. doi: 10.1371/journal.pone.0019017

[学会発表] (計 30 件)

- ①新垣理恵子、Eye drop administration of rebamipide is effective to a dry eye symptom in a model mice of Sjogren's syndrome, 第 42 回日本免疫学会総会、2013 年 12 月 11 日～12 月 13 日、幕張メッセ (千葉県千葉市)
- ②岩浅亮彦、Relationship between aromatase-related obesity and autoimmunity in Sjogren's syndrome, 第 42 回日本免疫学会総会、2013 年 12 月 11 日～12 月 13 日、幕張メッセ (千葉県千葉市)
- ③黒澤実愛、A novel role of CXCR7 in controlling autoreactive T cells of a murine model for Sjogren's syndrome, 第 42 回日本免疫学会総会、2013 年 12 月 11 日～12 月 13 日、幕張メッセ (千葉県千葉市)
- ④Yamada Koichi, in vivo effect of multi-wall carbon nanotubes on immune system, 6th International Symposium on Nanotechnology, Occupational and Environmental system, 2013 年 10 月 28 日～10 月 31 日名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)
- ⑤近藤智之、自己免疫疾患モデルを用いた腫瘍免疫システムの解析、第 55 回日本歯科基礎医学会、2013 年 9 月 20 日～9 月 22 日、岡山コンベンションセンター、(岡山県岡山市)
- ⑥Akiko Yamada, Deficient differentiation of Treg cells in a murine model of Sjogren's syndrome, 2013 年 8 月 22 日～8 月 27 日、Milano Congressi (Milan Italy) 近藤智之、自己免疫疾患モデルを用いた腫瘍免疫システムの解析、第 55 回日本歯科基礎医学会、2013 年 9 月 20 日～9 月 22 日、岡山コンベンションセンター、(岡山県岡山市)
- ⑦岩浅亮彦、アロマトラーゼ遺伝子欠損マウスにおけるシェーグレン症候群要病変と肥満との関連、第 10 回四国免疫フォーラム、2013 年 6 月 22 日、徳島文理大学香川薬学部 (香川県さぬき市)
- ⑧新垣理恵子、シェーグレン症候群モデルを用いたレバミピド点眼薬によるドライアイの改善効果とその作用機序、第 102 回日本病理学会、2013 年 6 月 6 日～6 月 8 日、ロイトン札幌・さっぽろ芸文館 (北海道札幌市)
- ⑨山田安希子、シェーグレン症候群における制御性 T 細胞の機能解析、第 102 回日本病理学会、2013 年 6 月 6 日～6 月 8 日、ロイトン札幌・さっぽろ芸文館 (北海道札幌市)
- ⑩岩浅亮彦、アロマトラーゼ遺伝子欠損マウスにおける肥満とシェーグレン症候群病変との関連、第 102 回日本病理学会、2013 年 6 月 6 日～6 月 8 日、ロイトン札幌・さっぽろ芸文館 (北海道札幌市)
- ⑪新垣理恵子、An Effective Therapy of Ocular Lesions in a Murine Model for Sjogren's Syndrome by Eye Drop Administration of Rebamipide, 第 41 回日本免疫学会総会、2012 年 12 月 5 日～12 月 7 日、神戸ポートピアホテル (兵庫県神戸市)
- ⑫岩浅亮彦、The dysfunction of the aromatase worsens the pathogenesis of Sjogren's syndrome, 第 41 回日本免疫学会総会、2012 年 12 月 5 日～12 月 7 日、神戸ポートピアホテル (兵庫県神戸市)
- ⑬山田安希子、Functional defect of Focp3+Treg cells in Sjogren's syndrome, 第 41 回日本免疫学会総会、2012 年 12 月 5 日～12 月 7 日、神戸ポートピアホテル (兵庫県神戸市)
- ⑭新垣理恵子、エストロゲン欠乏に寄って増悪されるシェーグレン症候群病態への Th17 細胞の関与、第 54 回日本歯科基礎医学会総会、2012 年 9 月 7 日、奥羽大学 (福島県郡山市)
- ⑮山田安希子、シェーグレン症候群における制御性 T 細胞の役割、第 21 回日本シェーグレン症候群学会、2012 年 9 月 7 日、ウエスティン都京都ホテル (京都府京都市)
- ⑯岩浅亮彦、シェーグレン症候群発症機序におけるアロマトラーゼの役割、第 31 回分子病理学研究会、2012 年 7 月 21 日、恵那峡グランドホテル (岐阜県岐阜市)
- ⑰Yamada Akiko, Cathepsin L inhibition prevents murine autoimmune diabetes via suppression of CD8+T cell activity, 8th International Congress on Autoimmunity, 2012 年 5 月 9 日、Palcic de Ecposicionesy Congresos de Granada (Granada Spain)
- ⑱Oura Ritsuko, Pathological Analysis of Autoimmunity in NF-B1KO/LPR mice, 8th International Congress on Autoimmunity, 2012 年 5 月 9 日、Palcic de Ecposicionesy Congresos de Granada (Granada Spain)
- ⑲新垣理恵子、シェーグレン症候群モデルマウスを利用したレバミピド点眼投与による病態抑制機序の解明、第 101 回日本病理学会総会、2012 年 4 月 25 日～4 月 27 日、京王プラザホテル (東京都新宿区)
- ⑳山田安希子、シェーグレン症候群における制御性 T 細胞の役割、第 101 回日本病理学会総会、2012 年 4 月 25 日～4 月 27 日、京王プラザホテル (東京都新宿区)
- ㉑大浦律子、Fas 分子を介したマクロファージによる末梢 T 細胞の維持機構、第 101 回日本病理学会総会、2012 年 4 月 25 日～4 月 27 日、京王プラザホテル (東京都新宿区)
- ㉒石丸直澄、自己免疫疾患における CCR7 を介した制御性 T 細胞のパトローリング機能、第 101 回日本病理学会総会、2012

年 4 月 25 日～4 月 27 日、京王プラザホテル（東京都新宿区）

- ⑳新垣理恵子、The role of Th17 cell on the development of Sjogren's syndrome in estrogen deficient NOD mice, 第 40 回に本免疫学会総会、2011 年 11 月 28 日、幕張メッセ（千葉県千葉市）
- ㉑岩浅亮彦、A critical role of aromatase in the pathogenesis of Sjogren's syndrome, 第 40 回に本免疫学会総会、2011 年 11 月 28 日、幕張メッセ（千葉県千葉市）
- ㉒大浦律子、In vivo T cell apoptosis interaction with CD11b+ macrophages in Fas- deficient host, 第 40 回に本免疫学会総会、2011 年 11 月 28 日、幕張メッセ（千葉県千葉市）
- ㉓Ashrin Meinar Nur, Analysis of Immune response to Metal using Murine Nickel Allergy Model, 第 40 回に本免疫学会総会、2011 年 11 月 28 日、幕張メッセ（千葉県千葉市）
- ㉔Hiasa Masahiro, A novel role of NFkB in bone remodeling, 第 40 回に本免疫学会総会、2011 年 11 月 28 日、幕張メッセ（千葉県千葉市）
- ㉕Matsumoto Kazuma, Hyperfunctions of osteoclasts in pathogenesis of rheumatoid arthritis in MRL/lpr mice, 第 40 回に本免疫学会総会、2011 年 11 月 28 日、幕張メッセ（千葉県千葉市）
- ㉖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（神奈川県横浜市）
- ㉗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（神奈川県横浜市）

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

なし

(3) 連携研究者

なし