

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月30日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659879

研究課題名（和文） 遺伝子改変マウスを用いた自己免疫疾患における性差の解明

研究課題名（英文） Analysis of sex dimorphism of autoimmune disease with gene-manipulated models

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：

本研究は、性ホルモンであるアロマターゼの免疫細胞における役割を明らかにすることで、自己免疫疾患発症における性差の解明を目指す。シェーグレン症候群のモデルマウスでもあるアロマターゼ欠損(ArKO)マウスを用いて解析した結果、CD4陽性T細胞が産生するIFN- $\gamma$ が炎症を誘起していることが示唆された。また、このとき樹状細胞やマクロファージがCD4陽性T細胞の活性化に関与している可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：

To understand the relationship between autoimmunity and sex hormones, we analyzed the role of aromatase on the onset of autoimmune disease using ArKO mice. As a result, we showed that CD4<sup>+</sup> T cells produced IFN- $\gamma$  in ArKO mice. Moreover, the numbers of dendritic cells and macrophages were increased in ArKO mice. This finding suggested that dendritic cells and macrophages may activate CD4<sup>+</sup> T cells and induce inflammation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

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、性ホルモン、シェーグレン症候群

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 我々の免疫システムは自己と非自己を厳密に区別することが可能で、自身の組織、細胞を排除することなく、細菌やウイルスなどの外来抗原のみを排除することによって健康な身体が維持されている。しかし、遺伝的因子、環境因子など様々な要因により免疫システムに異常が生じ、自身の臓器を標的として攻撃が起こってしまう病気が自己免疫疾患である。

(2) 当教室はこれまでに唾液腺、涙腺を標的とする難治性の自己免疫疾患であるシェーグレン症候群の病態機序の解明を目指し、

多角的なアプローチにより研究を進めてきた (Science 1997, J Clin Invest 2002, Nature Immunol 2006, J Exp Med 2008)。シェーグレン症候群の発症は閉経期以降の女性が圧倒的に多く (約94% : NIH report 1994)、ドライアイ、ドライマウスを中心とした乾燥症候群は閉経期に悩まされる更年期障害の症状としても捉えられている。従来、性ホルモンが免疫細胞の分化や機能に影響を及ぼすことは報告されてきたが、自己免疫疾患の発症に直接関連する分子メカニズムは不明であった。当教室ではシェーグレン症候群の標的細胞である唾液腺細胞のアポト

ーシスがエストロジェンによって制御されていて、その分子機構として RbAp48 分子が重要な役割を果たしていることを解明した (Mol Cell Biol 2006, J Exp Med 2008)。しかしながら、エストロジェンが免疫システムに直接影響することによって自己免疫反応が誘導されるか否かについては未だ結論は出ていない。

## 2. 研究の目的

本研究では骨髄レベルから末梢リンパ組織に至る免疫細胞の分化成熟過程で、エストロジェンを中心とした性ホルモンの作用点あるいは作用機序を解明するとともに、様々な免疫細胞が性ホルモンによってどのような制御を受けているのかを明らかにすることによって、自己免疫疾患の発症機序との関連を理解することを目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) アロマターゼ遺伝子欠損 (ArKO) マウスにおける免疫細胞の機能解析

アンドロジェンをエストロジェンに変換する酵素であるアロマターゼの遺伝子欠損 (ArKO) マウスはシェーグレン症候群様の自己免疫性病変が自然発症することが報告されている (Proc Natl Acad Sci USA 2004)。申請者らは別ラインである ArKO マウスに関して、骨髄、胸腺、全身リンパ節及び脾臓における免疫細胞分画を細胞表面マーカーあるいは細胞内マーカーを用いて、フローサイトメーターによる経時的な解析を進めた。免疫細胞分画の中で、特に T 細胞は自己免疫反応の起点となる重要な分画であることから、胸腺における分化パターン、末梢における活性化状態、さらにサイトカインや種々の抗原刺激に対する反応性など、in vivo あるいは in vitro で詳細に対照マウスと比較することによって、アロマターゼの免疫システムへの影響を検討した。また、B 細胞、樹状細胞、マクロファージなどの免疫細胞に関しても免疫学的手法を用い、詳細にその表現型、機能に関して解析を加えた。

### (2) シェーグレン症候群モデルにおける性ホルモン及び関連因子を介した病態機序解析

過去に当教室で確立した別のシェーグレン症候群モデルマウス (NFS/*sld* マウス) にアロマターゼ阻害剤を投与して、病態への影響を解析した。

## 4. 研究成果

### (1) アロマターゼ遺伝子欠損 (ArKO) マウスにおける免疫細胞の機能解析

申請者らは別ラインであるアロマターゼノックアウト (ArKO) マウスに関して、病態解

析を行ったところ、12ヶ月齢を経過した時点で唾液腺、涙腺に局限した炎症性病変を確認した。免疫組織学的染色の結果、局所に浸潤している細胞の大部分が CD4 陽性 T 細胞であることが示された (図 1)。

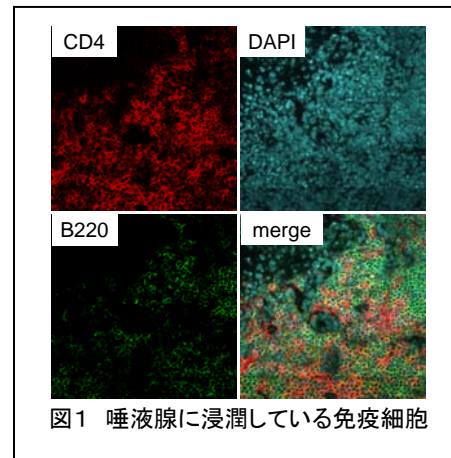


図1 唾液腺に浸潤している免疫細胞

また、ArKO マウスの唾液腺では、炎症性サイトカインである IFN- $\gamma$  の mRNA 発現が有意に高いことが示された。これらのことから、CD4 陽性 T 細胞が産生する IFN- $\gamma$  が炎症を誘起していることが示唆される。一方、頸部リンパ節における免疫細胞分画について解析を行った結果、ArKO マウスでは樹状細胞およびマクロファージの割合が顕著に増加していることが明らかになった (図 2)。したがって、性ホルモンを欠損した場合には、CD4 陽性 T 細胞に加え、樹状細胞およびマクロファージが炎症の誘起あるいは増悪に大きく関与す

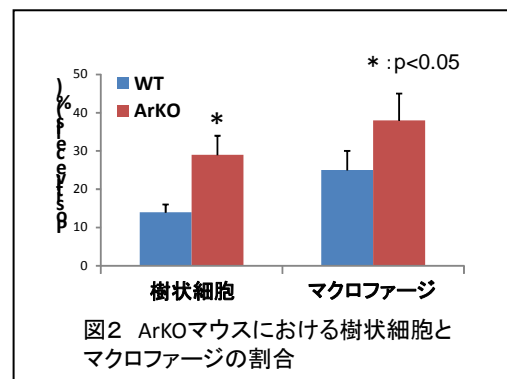


図2 ArKOマウスにおける樹状細胞とマクロファージの割合

る可能性が示唆された。

### (2) シェーグレン症候群モデルにおける性ホルモン及び関連因子を介した病態機序解析

NFS/*sld* マウスにアロマターゼ阻害剤を1か月間毎日投与したところ、涙腺・唾液腺における炎症の増悪が観察された。またアロマターゼ阻害剤投与マウスで、樹状細胞およびマクロファージの割合が増加していた。したがって、このことから樹状細胞およびマクロファージが病態の増悪に関わっていること

が示唆された。一方、アロマターゼ阻害剤投与マウスでは体重増加が認められたことから、ArKOマウスにおけるシェーグレン症候群様の自己免疫性病変の増強に肥満が関与している可能性が示唆される。

#### 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. 山田安希子 他3名、Targeting IL-1 in Sjogren's syndrome、*Expert opinion on therapeutic targets*、査読有、17巻、2013、393-401、doi:10.1517/14728222.2013.754427

2. 大浦律子、山田安希子 他5名、Induction of Rapid T Cell Death and Phagocytic Activity by Fas-Deficient lpr Macrophages、*The Journal of Immunology*、査読有、1巻、2012、1550-6606、doi:10.4049/jimmunol.1103794

3. 井澤俊 山田安希子 他9名、Fas-Independent T-Cell Apoptosis by Dendritic Cells Controls Autoimmune Arthritis in MRL/lpr Mice、*PLoS ONE*、査読有、7巻、2012、e48798、doi:10.1371/journal.pone.0048798

4. 石丸直澄、山田安希子 他5名、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、180(1)巻、2012、199-208、doi:10.1016/j.ajpath.2011.09.027

5. 渡邊恵、山田安希子 他5名、A novel DC therapy with manipulation of MKK6 gene on nickel allergy in mice、*PLoS One*、査読有、6(4)巻、2011、e19017、doi:10.1371/journal.pone.0019017

[学会発表] (計14件)

1. 山田安希子 他、Functional defect of Foxp3+Treg cells in Sjogren's syndrome、日本免疫学会、2012年12月05日～2012年12月07日、神戸ポートピアホテル (兵庫県)

2. 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、日本免疫学会、2012年12月05日～2012年12月07日、

神戸ポートピアホテル (兵庫県)

3. 岩浅亮彦、The dysfunction of the aromatase worsens the pathogenesis of Sjogren's syndrome、日本免疫学会、2012年12月05日～2012年12月07日、神戸ポートピアホテル (兵庫県)

4. 黒澤実愛 他、Analysis of infiltrating immune cells in the target tissues of murine models for Sjogren's syndrome、日本免疫学会、2012年12月05日～2012年12月07日、神戸ポートピアホテル (兵庫県)

5. 近藤智之 他、口蓋に生じた悪性リンパ腫の2症例、第23回日本臨床口腔病理学会2012年09月20日、東京医科歯科大学 (東京都)

6. 新垣理恵子 他、エストロゲン欠乏によ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回歯科基礎医学会2012年09月14日～2012年09月16日、奥羽大学 (福島県)

7. 山田安希子 他、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09月07日、京都ウエスティンホテル (京都府)

8. 岩浅亮彦 他、A critical role of aromatase in the pathogenesis of Sjogren's syndrome、第31回分子病理学研究会、2012年07月21日、恵那峡グランドホテル (岐阜県)

9. 山田安希子 他、Cathepsin L inhibition prevents murine autoimmune diabetes via suppression of CD8+T cell activity、8th International Congress on Autoimmunity、2012年05月09日～2012年05月13日、Palacio de Exposiciones y Congresos de Granada (スペイン)

10. 大浦律子 他、Pathological Analysis of Autoimmunity in NF-B1KO/LPR mice、8th International Congress on Autoimmunity、2012年05月09日～2012年05月13日、Palacio de Exposiciones y Congresos de Granada (スペイン)

11. 山田安希子 他、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、2012年04月28日、京王プラザホテル (東京都)

12. 新垣理恵子 他、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、2012年04月28日、京王プラザホテル（東京都）

13. 石丸直澄 他、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、2012年04月28日、京王プラザホテル（東京都）

14. 大浦律子 他、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、2012年04月28日、京王プラザホテル（東京都）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.dent.tokushima-u.ac.jp/byouri/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：