

50. 性ホルモンによる自己免疫疾患発症機序の解明

石丸 直澄

Key words : 自己免疫疾患, 性ホルモン, アロマターゼ,
シェーグレン症候群, 脂肪

*徳島大学
大学院ヘルスバイオサイエンス研究部
口腔分子病態学分野

緒言

自己免疫疾患は様々な臓器を標的とする難治性疾患であり, その発症機序は十分に理解されていない. シェーグレン症候群, 関節リウマチなどの自己免疫疾患の患者は大多数が女性であり, 中でも閉経期以降の中年女性に発症のピークが存在している事実がある. エストロゲンを中心とした女性ホルモンが枯渇する閉経期に自己免疫疾患が発症することから, エストロゲンによって免疫制御システムが調節されていることが想定され, エストロゲンと免疫システムとの関わりについて多くの報告がなされてきた¹⁻³⁾. 骨髄, 胸腺及びリンパ組織における免疫細胞の分化成熟への性ホルモンの関与, 免疫細胞のサイトカイン分泌, 活性化機構における性ホルモンの関与など免疫調節機構における性ホルモンの影響が知られている一方で, 自己免疫疾患の発症機序における性ホルモンの詳細な関与は未だ不明なままである.

自己免疫疾患の発症機序に秘められた性ホルモンの役割は免疫細胞だけでなく標的細胞にも関与していることから, 生体の免疫学的恒常性を維持するために極めて重要な因子である事は疑う余地がない. しかしながら, 性ホルモンはステロイド骨格を有する分子であり, 細胞内でのタンパク合成, 転写制御機構など複雑なシグナル経路を介することによって, 細胞機能・恒常性を維持する重要な働きを担っているため, 免疫制御に関わる性ホルモンの役割も複雑であり, 十分な理解ができていないのが現状である. 本研究では, 性ホルモンによって調節される免疫制御システムの詳細な分子機序を明らかにすることにより, 生体全体の中での標的臓器, 性ホルモン, 免疫システムとのクロストークを解明することが大きな課題である. 自己免疫疾患における性ホルモンの役割を明らかにすることで, 女性特有の免疫疾患の発症機序を解明した上で, 自己免疫疾患の新たな治療戦略に基づいたトランスレーショナルリサーチを目指す.

方法および結果

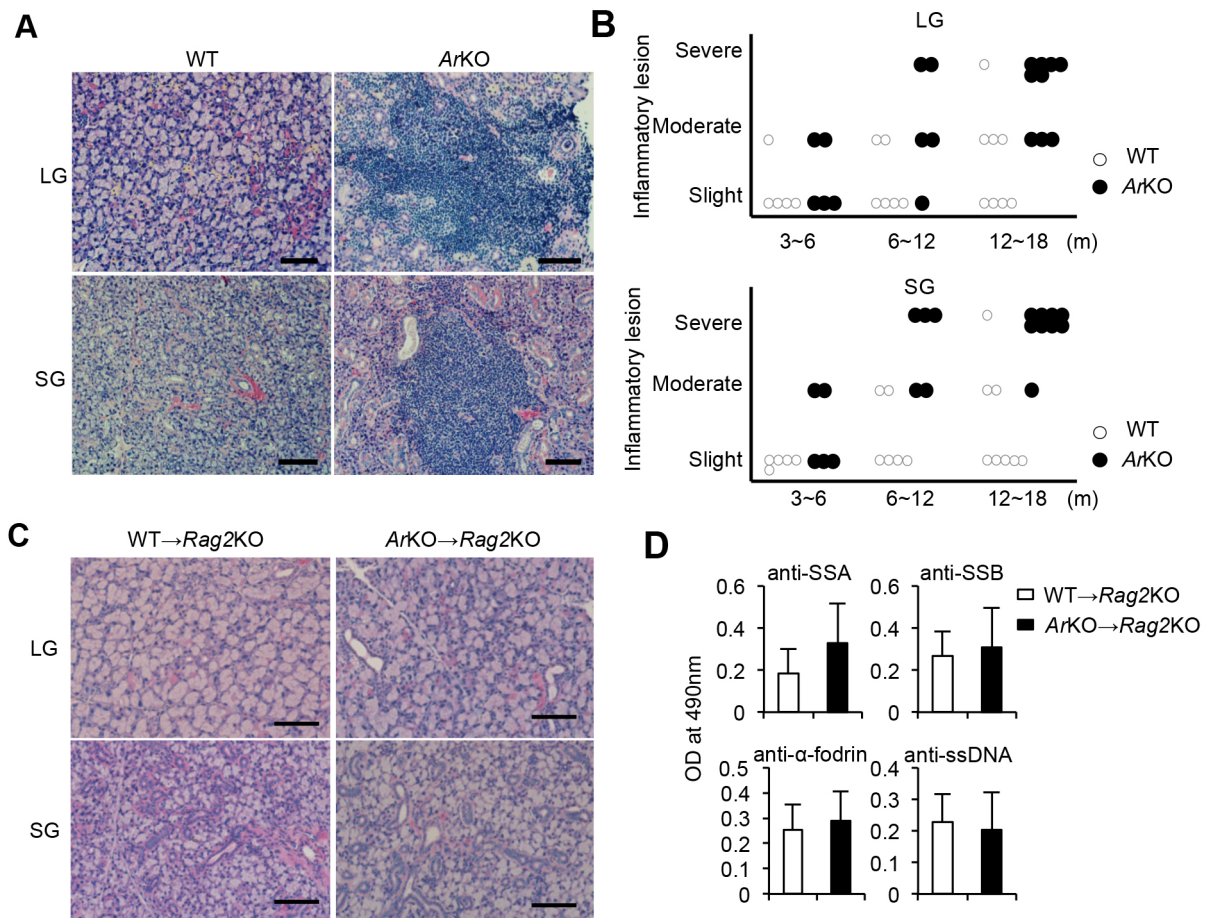


図1. *Ar* KO マウスの自己免疫病変.

A) 涙腺 (LG), 唾液腺 (SG) の病理組織像 (12 ヶ月齢, 雌). Scale bars: 200 μ m. B) LG 及び SG における病理組織学的スコア. C) WT 及び *Ar* KO マウスの脾細胞の *Rag2* KO マウスへの移入. 細胞移入された *Rag2* KO マウスの LG 及び SG の病理組織像. Scale bars: 200 μ m. D) 細胞移入された *Rag2* KO マウス血清中の自己抗体の産生量 (ELISA).

1. *Ar* KO マウスの自己免疫性病変

6 ヶ月齢の雌 *Ar* KO マウスの唾液腺, 涙腺を病理組織学的に解析すると, WT マウスの唾液腺, 涙腺組織では炎症性病変は見られないが, *Ar* KO マウスの唾液腺, 涙腺ともに導管周囲性に単核リンパ球の浸潤が目立ち, 腺房細胞の破壊を伴っている (図 1A) ⁴⁾. *Ar* KO マウスの唾液腺, 涙腺における炎症性病変の加齢的变化を経時的に観察すると, いずれの臓器でも *Ar* KO マウスにおける炎症性病変の増悪が病理組織学的評価にて示されている (図 1B) ⁴⁾.

Ar KO マウスの炎症性病変が T 細胞, B 細胞を有さない *Rag2* KO マウスに再現できるか否かを検討するために, *Ar* KO マウス及び WT マウスの脾細胞 (5×10^6) を *Rag2* KO マウスに移入後 3 ヶ月の時点で全身臓器の病理組織学的解析を加えた. いずれのドナー由来の *Rag2* KO マウスにおいても, 涙腺, 唾液腺には炎症性病変は観察されなかった (図 1C) ⁴⁾. さらに, 細胞移入された両者の *Rag2* KO マウスの血清中に自己抗体の産生に差は見られなかった (図 1D) ⁴⁾. したがって, *Ar* KO の自己免疫性病変は免疫担当細胞以外の因子が発症に関与している可能性が示された.

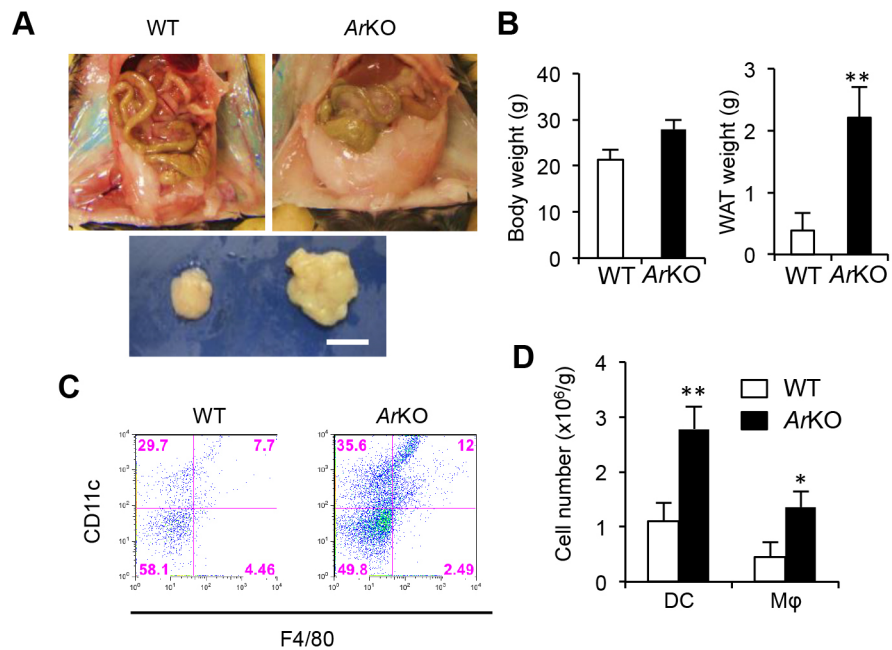


図2. *Ar* KO マウスの脂肪組織.

A) WT 及び *Ar* KO マウスの腹腔内脂肪組織. Scale bar: 1 cm. B) 体重と腹腔内脂肪組織重量. C) 脂肪組織内の樹状細胞及びマクロファージ分画 (フローサイトメーター解析). D) 脂肪組織中の樹状細胞数及びマクロファージ細胞数. * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$ (Student's t-test).

2. *Ar* KO マウスの脂肪組織

Ar KO マウスの特徴として脂肪組織の増加がある. 体重に関しては, 雄雌ともに *Ar* KO マウスと WT で有意な差は見られなかったが (図 2B) ⁴⁾, 腹腔内の白色脂肪組織の重量は *Ar* KO マウスで有意に増加していた (図 2A, B) ⁴⁾. また, 白色脂肪内の樹状細胞及びマクロファージ分画についてフローサイトメーターにて検討すると, CD11c 陽性 F4/80 陰性の樹状細胞, F4/80 陽性のマクロファージともに割合及び細胞数ともに *Ar* KO マウスで有意に増加していた (図 2C, D) ⁴⁾.

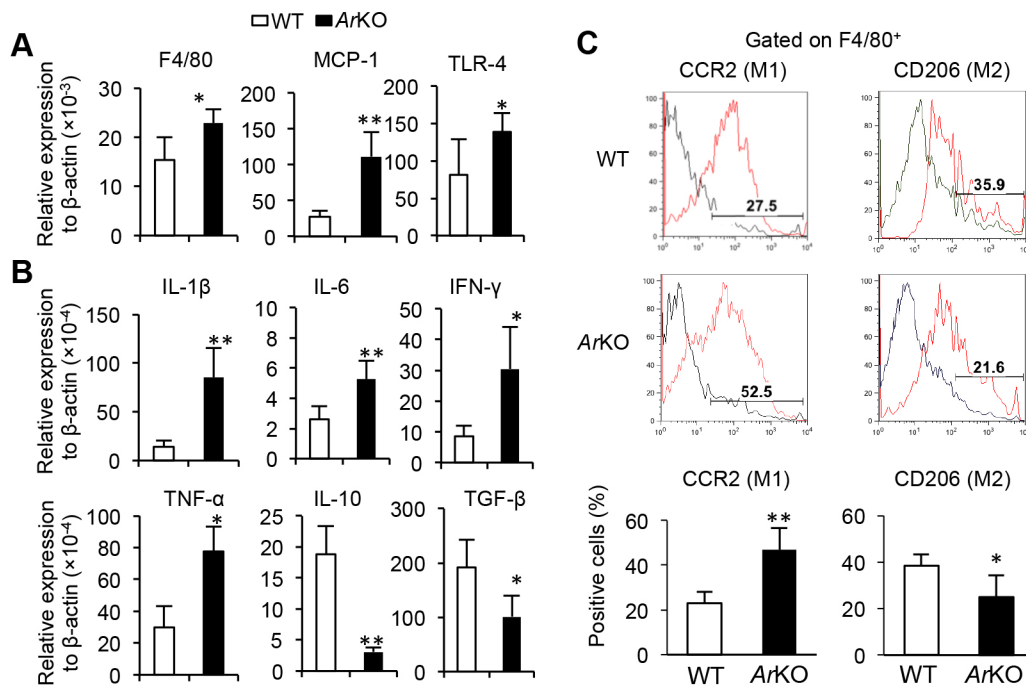


図3. 脂肪組織におけるマクロファージ関連遺伝子発現.

A) *Ar* KO, WT マウスの白色脂肪組織における F4/80, MCP-1, TLR-4 の mRNA 発現 (定量化 RT-PCR). B) M1/M2 マクロファージ関連遺伝子発現 (定量化 RT-PCR). C) F4/80 陽性細胞上の CCR2 (M1) 及び CD206 (M2) の発現 (フローサイトメーター解析). * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$ (Student's t-test).

さらに、白色脂肪組織におけるマクロファージ関連遺伝子の mRNA 発現を定量化 RT-PCR 法にて検討すると、F4/80, MCP-1, TLR-4 とともに *Ar* KO マウスで有意に発現が亢進していた (図 3A) 4). また、マクロファージの M1/M2 分化に関与する遺伝子発現に関しては、M1 マクロファージ関連遺伝子 (IL-1 β , IL-6, IFN- γ , TNF- α) が *Ar* KO マウスで有意に上昇し、逆に、M2 マクロファージ関連遺伝子 (IL-10, TGF- β) の mRNA 発現は *Ar* KO マウスで有意に低下していた (図 3B) 4). 実際には、白色脂肪組織内のマクロファージ分画に関してフローサイトメーターで確認すると、CCR2 陽性 M1 マクロファージの割合は *Ar* KO マウスで有意に増加し、CD206 陽性 M2 マクロファージは *Ar* KO マウスで有意に減少していた (図 3C) 4).

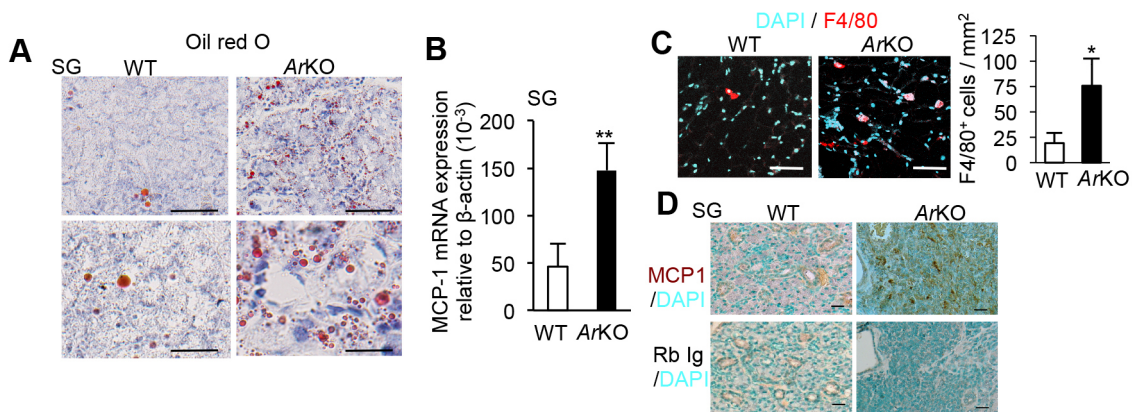


図4. 唾液腺組織の脂肪化.

A) WT 及び *Ar* KO マウス (10 ヶ月齢) の唾液腺組織における脂肪化 (Oil-Red-O 染色). Scale bars: 100 μ m. (上段写真), 20 μ m. (下段写真). B) MCP-1 の mRNA 発現 (定量化 RT-PCR). C) 唾液腺周囲の脂肪組織における F4/80 陽性マクロファージ (蛍光免疫染色). Scale bars: 50 μ m. D) 唾液腺組織における MCP-1 発現細胞 (免疫化学染色). Scale bars: 50 μ m. * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$ (Student's t-test).

3. *Ar* KO マウスの唾液腺細胞における脂肪変性

Ar KO マウスの唾液腺細胞における脂肪変性に関して, Oil-Red-O 染色にて検討すると, *Ar* KO マウスの唾液腺組織において脂肪変性が多く観察された (図 4A) ⁴⁾. また, *Ar* KO マウスの唾液腺では MCP-1 の mRNA 発現が有意に亢進し (図 4B) ⁴⁾, *Ar* KO マウスで F4/80 陽性のマクロファージが有意に多く唾液腺に浸潤していることが判明した (図 4C) ⁴⁾. さらに, 唾液腺組織における MCP-1 の発現を免疫染色法にて検討すると, *Ar* KO マウスの浸潤細胞とともに唾液腺細胞でも発現していることが分かった (図 4D) ⁴⁾. 以上の結果より, アロマターゼの欠損によって, 脂肪組織と同様に標的臓器でも脂肪化が進行するとともに, マクロファージの浸潤, MCP-1 の発現亢進が自己免疫疾患の発症に大きく関与している可能性が示された.

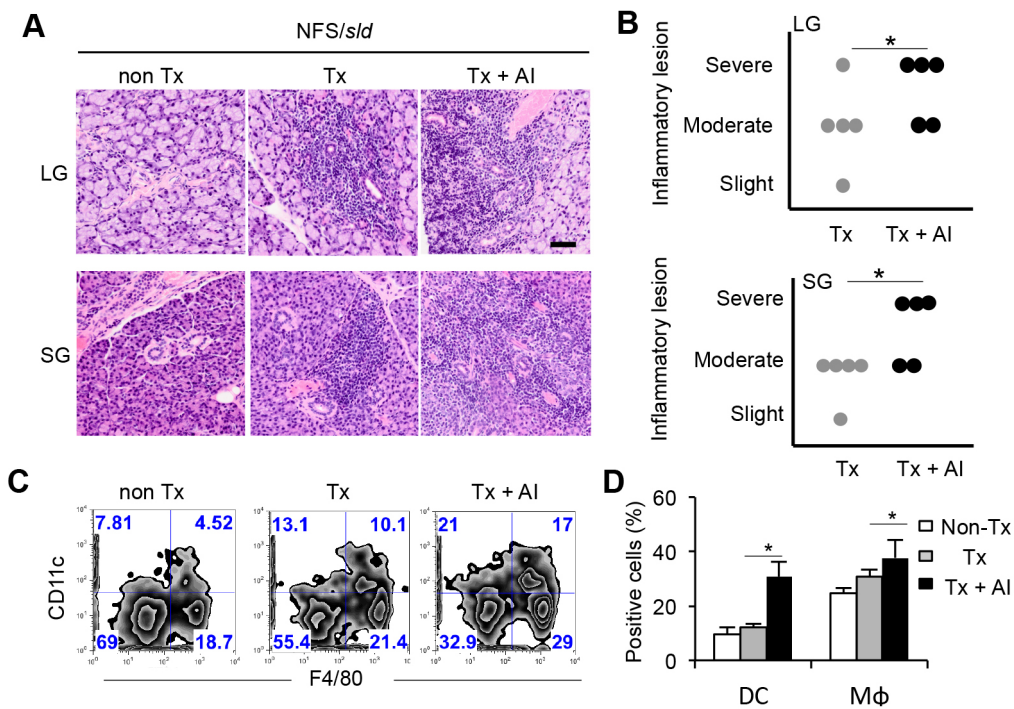


図5. シェーグレン症候群モデルへのアロマトラーゼ阻害剤の投与。

胸腺摘出 (Tx) NFS/*sld* マウス (4 週齢) へのアロマトラーゼ阻害剤 (AI) の連日腹腔内投与 (200 μ g) を 4 週間続け、8 週齢にて解析した。A) 涙腺 (LG), 唾液腺 (SG) における病理組織像。Scale bar: 100 μ m. B) LG 及び SG における病理組織学的スコア。C, D) AI 投与による脾臓における樹状細胞及びマクロファージ分画 (フローサイトメーター解析)。P < 0.05, **P < 0.005 (Student's t-test).

4. シェーグレン症候群モデルマウスへのアロマトラーゼ阻害剤の投与

シェーグレン症候群のモデルとして知られる新生仔胸腺摘出 NFS/*sld* マウス⁵⁾ (Tx) にアロマトラーゼ阻害剤を 4 週齢から 8 週齢まで腹腔内投与すると、Tx マウスで見られる涙腺、唾液腺の自己免疫病変は増悪し (図 5A)⁴⁾、病理組織病変のスコアは有意に悪化することが判明した (図 5B)⁴⁾。さらに、脾臓における樹状細胞とマクロファージの割合はアロマトラーゼ阻害剤投与により有意に増加することが明らかとなった (図 5C, D)⁴⁾。

考 察

自己免疫疾患は多因子疾患と言われ、様々な因子が複雑に作用し合いながら発症、進展していくことが知られている¹⁾。唾液腺、涙腺を中心に外分泌腺を標的とする自己免疫疾患であるシェーグレン症候群は閉経期以降の女性を中心に発症し、ドライアイ、ドライマウスを主徴とする難治性疾患であり、2015 年度からは厚生労働省の難病指定疾患となっている。これまでに、シェーグレン症候群の病態解明に向けた研究として様々なアプローチがなされてきた。本研究で用いられた *Ar* KO マウスに関してもシェーグレン症候群の疾患モデルとして報告されたが、B 細胞系の異常があること以外は病態機序に関する研究は進んでいなかった⁶⁾。今回の研究では、アロマトラーゼが脂肪組織と唾液腺組織でのマクロファージの集簇、サイトカイン分泌を調節することによってシェーグレン症候群の病態を制御している可能性が示された⁴⁾。

共同研究者

本研究は藤田保健衛生大学医学部生化学第一講座の原田信広教授、東京都健康長寿医療センターの本間尚子博士との共同研究によるものである。最後に本研究にご支援賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Cutolo, M., Sulli, A. & Straub, R. H. : Estrogen metabolism and autoimmunity. *Autoimmun. Rev.*, **11** : A460-A464, 2012.
- 2) Ishimaru, N., Saegusa, K., Yanagi, K., Haneji, N., Saito, I. & Hayashi, Y. : Estrogen deficiency accelerates autoimmune exocrinopathy in murine Sjögren's syndrome through fas-mediated apoptosis. *Am. J. Pathol.*, **155** : 173-181, 1999.
- 3) Ishimaru, N., Arakaki, R., Yoshida, S., Yamada, A., Noji, S. & Hayashi, Y. : Expression of the retinoblastoma protein RbAp48 in exocrine glands leads to Sjögren's syndrome-like autoimmune exocrinopathy. *J. Exp. Med.*, **205** : 2915-2927, 2008.
- 4) Iwasa, A., Arakaki, R., Honma, N., Ushio, A., Yamada, A., Kondo, T., Kurosawa, E., Kujiraoka, S., Tsunematsu, T., Kudo, Y., Tanaka, E., Yoshimura, N., Harada, N., Hayashi, Y. & Ishimaru, N. : Aromatase controls Sjögren's syndrome-like lesions through monocyte chemotactic protein-1 in target organ and adipose tissue-associated macrophages. *Am. J. Pathol.*, **185** : 151-161, 2015.
- 5) Saegusa, K., Ishimaru, N., Yanagi, K., Arakaki, R., Ogawa, K., Saito, I., Katunuma, N. & Hayashi, Y. : Cathepsin S inhibitor prevents autoantigen presentation and autoimmunity. *J. Clin. Invest.*, **110** : 361-369, 2002.
- 6) Shim, G. J., Warner, M., Kim, H. J., Andersson, S., Liu, L., Ekman, J., Imamov, O., Jones, M. E., Simpson, E. R. & Gustafsson, J. A. : Aromatase-deficient mice spontaneously develop a lymphoproliferative autoimmune disease resembling Sjögren's syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **110** : 12628-12633, 2004.