

様式 5

論文内容要旨

題目：シェーグレン症候群疾患モデルマウスにおけるエストロジェンの役割

著者：石丸 直澄

内容要旨（和文約1,500字）

自己免疫疾患の発症に性差が存在することはよく知られているが、その詳細なメカニズムに関しては全く不明である。シェーグレン症候群疾患モデルNFS/sldマウスにおいても雌優位に自己免疫性唾液腺炎・涙腺炎を発症することから、本研究は本モデルマウスにおける自己免疫病変の発症におけるエストロジェンの役割を詳細に解析し、性差のメカニズムを解明することを目的とする。

NFS/sld雌マウスに生後3日目に胸腺を摘出（Tx）した後、卵巣摘出（Ovx）を施し、自己免疫病変の動態、免疫調節系への影響を観察し、さらに、Tx+Ovxマウスへのエストロジェン、そのアンタゴニスト（タモキシフェン）やテストステロンの投与による病態の変動を検討した。また、*in vivo* 及び *in vitro*におけるエフェクター細胞のエストロジェンに対する反応性・エストロジェンレセプターの発現について検索した。加えて、エストロジェンが標的臓器に及ぼす影響を腺組織破壊という観点から解析した。

シェーグレン症候群疾患モデルNFS/sldマウスにおいて、Ovxを施すことにより、自己免疫病変はさらに増悪することが判明した。その病変局所においてCD4陽性T細胞の浸潤が主体を成し、各種炎症性サイトカイン（IL-1 β , IL-4, IL-7, TNF- α ）の産生亢進が認められた。Tx+Ovxによる変化として、T細胞系ではTxマウスに比較して脾細胞中のCD8陽性細胞の有意な低下が認められ、B細胞系では唾液腺特異的な自己抗原（ α -fodrin）に対する自己抗体の産生が亢進していた。また、Tx+Ovxによって増悪した自己免疫病変はエストロジェン投与により回復し、エストロジェンが自己反応性T細胞の活性化を抑制する作用のあることが判明した。そのメカニズムの一つとして、*in vitro*においてCD8陽性細胞がエストロジェンに対して有意に反応し、エストロジェンレセプターの強い発現が認められたことから、レセプターを介したCD8陽性細胞のサプレッサー機能をエストロジェンが制御している可能性が示唆された。さらに、*adoptive transfer*によりCD4陽性細胞が直接病態形成を調節することが判明した。一方、標的臓器である唾液腺の組織破壊のメカニズムにFas/Fas Ligand（FasL）を介したアポトーシスが関与し、エストロジェンは唾液腺細胞のFas発現及び浸潤Tリンパ球のFasL発現の両者に影響を与えている可能性が示唆された。本実験系から得られた結果はヒトの自己免疫疾患発症における性差のメカニズムを解明する上で有用であり、シェーグレン症候群の病因に基づいた治療法の開発に重要な知見をもたらすものと考えられた。

②

シェーグレン症候群疾患モデルマウス
におけるエストロジェンの役割

著者： 石丸 直澄

所属： 徳島大学歯学部口腔病理学講座

(主任：林 良夫教授)

論文表題 シェーグレン症候群疾患モデルマウスにおけるエストロジェンの役割

著者名 石丸 直澄

所属 徳島大学歯学部口腔病理学教室
(主任：林 良夫 教授)

キーワード 自己免疫疾患、シェーグレン症候群、エストロジェン、NFS/sldマウス

1. 原著

2. 原稿総枚数 43枚 (表題 1枚、本文28枚、
文献 7枚、図の説明 5枚、
英文抄録 2枚)

表 2枚

図 12枚

3. 連絡先 石丸 直澄

徳島大学歯学部口腔病理学講座

緒言

自己免疫疾患の多くは中年以降の女性に高頻度に発症することがよく知られているが、その発症のメカニズムと性差との関連性については不明な点が多い。従来まで、全身性エリトマトーデスのモデルである NZB/NZW F1マウスおよび MRL/lprマウス、多発性硬化症のモデルである Lewisラットや SJL/Jマウス、慢性関節リウマチのモデルである B10:RIIIマウス、I型糖尿病のモデルである non-obese diabetic (NOD) マウスなどの自己免疫疾患のモデル動物を用いて、性ホルモンと病態発症との関連性について多くの報告がなされている¹⁻⁸⁾。その中で女性ホルモンであるエストロジェンが IL-6、IL-1、TNF- α 、INF- γ などのサイトカインの産生パターンや抗 DNA 抗体などの自己抗体の産生に影響し、自己免疫病変を大きく修飾することが知られている^{6, 7)}。また、自己免疫性涙腺炎のモデル MRL/lprマウスでは男性ホルモンであるテストステロンを投与することにより、病変が劇的に回復したという報告もある⁸⁾。しかし、自己免疫病変の発症機構に関与するエストロジェンの役割について組織レベル・細胞レベル・遺伝子レベルにおける分子病理学的な詳細な解析を加えた報告はみられない。

シェーグレン症候群 (Sjögren's syndrome: 以下 SSと略) は、

1933年スウェーデンの眼科医・シェーグレンにより最初に記載された慢性唾液腺炎・乾燥性角結膜炎による乾燥症候群を主徴とする難治性の自己免疫疾患である。このSSにおいても中年以降の女性に好発することは既によく知られている。SSのモデル動物として、NZB/NZW F1マウス、MRL/lprマウス、NODマウスなどの他の自己免疫疾患のモデルにSS類似の自己免疫性唾液腺炎および涙腺炎が随伴すること、ある種の系統の老化マウスに自己免疫性唾液腺炎が発症すること、などが報告されているが⁹⁻¹³⁾、いずれも臓器特異性という重要な点に関しては不十分な疾患モデルであった。1994年、当教室で確立されたNFS/sldマウスは、生後3日目の胸腺摘出により雌優意に唾液腺・涙腺に限局した病変を発症し、他臓器には病変を認めない臓器特異的な原発性ヒトSSに極めて類似した疾患モデルとして重要である¹⁴⁾。

本研究では、SS疾患モデルNFS/sldマウスを用い、自己免疫病変の発症におけるエストロジェンの役割を解析する目的で、卵巣摘出による唾液腺・涙腺組織における自己免疫病変の病態形成への影響、全身の免疫系への影響、卵巣摘出マウスへのエストロジェン投与による病態の変動などについて検討した。また、*in vitro*におけるエフェクター細胞のエストロジェンに対する反応性およびエストロジェンレセプターの発現について検索した。さらに、標的臓器における自己免疫病変の発

... (faint, illegible text) ...

症に及ぼすエストロジェンの影響を腺組織破壊という観点からも解析を加えた。

... (faint, illegible text) ...

実験材料と実験方法

1. 動物および処置

NFS/sldマウスは実験動物中央研究所（川崎）より購入し、放射線滅菌試料 CL-2（日本クレア社、東京）、滅菌水を常時与え、SPF (Specific pathogen-free) 下で繁殖飼育した。雌 NFS/sldマウスを用い生後3日目に胸腺摘出（以下Txと略）を施し4週齢にて卵巣摘出（以下Ovxと略）を行った。

2. 実験群

生後8週齢・12週齢・16週齢・20週齢において、TxマウスとTx+Ovxマウスとを各群5-7匹を用いて比較した。また、Tx+Ovxマウスに生後4週齢から8週齢まで、60 mg/kg/weekのエストロジェン（Ovahormine depo: 帝國臓器、東京）を筋肉内投与、25 mg/kg/dayのテストステロン（和光純薬、大阪）・2.5 mg/kg/dayのタモキシフェン（Research Biochemicals International, Natick, MA, USA）を皮下投与し、8週齢で比較検討した。対照として、オリーブオイル（和光純薬）の皮下投与群を用いた。エストロジェン、テストステロン、タモキシフェン投与群を、それぞれTx+Ovx+E₂群 (n=5)、Tx+ovx+Tes群 (n=5)、Tx+Tam群 (n=5) と略す。また、正常対照群としてBALB/cマウスを適宜使用した。

3. 病理組織学的検討

雌TxマウスおよびTx+Ovxマウスを8週齢から20週齢まで経時的に屠殺し、全身諸臓器を採取した。各臓器

は10%中性緩衝ホルマリンにて固定し、軟パラフィン包埋後、4 μ mの組織切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン染色（以下H・E染色と略）を施した。唾液腺および涙腺における炎症性病変の組織学的評価は以下に示す如く、Whiteらの分類¹⁵⁾に準じた。

Grade 0 : 浸潤巣を認めず。

Grade 1 : 倍率150倍で、20個以上の単核細胞よりなる浸潤巣が1視野中に1-5個認められる。

Grade 2 : 同様に浸潤巣が5個以上認められ、実質の破壊を伴わない。

Grade 3 : 浸潤巣は多数認められ、実質の中等度の変性破壊を伴う。

Grade 4 : 多数の浸潤巣により著しい実質の破壊を伴う。

4. 免疫組織化学的観察

各種リンパ球表面抗原の検出を免疫組織化学的手法（アビジン・ビオチンペルオキシダーゼ複合体法 : avidin-biotin peroxidase complex; 以下ABC法と略）により実施した。唾液腺組織の凍結切片を作成し、内因性ペルオキシダーゼ活性を阻止するため、0.3%（容量/容量；以下V/Vと略）過酸化水素水を含むエタノールで処理し、リン酸緩衝生理食塩水（Phosphate-buffered saline; 以下PBSと略、pH 7.0）で洗浄した後、至適濃度に希釈した各種1次抗体と室温にて1時間反応させた。2次抗体としてピオ

チン化抗マウス抗体 (Vector Laboratories, Inc., Burlingam, CA, USA) を用い、室温にて30分間反応させた後、ABC試薬 (Vector Laboratories, Inc.) と反応させ、3,3-ジアミノベンチジン (Sigma, Inc., St. Luis, Mo, USA) を用いて発色させた。各種の抗マウスモノクローナル1次抗体は抗Thy1.2, 抗L3T4 (CD4), 抗Lyt2 (CD8) (Becton Dickinson Inc., San Jose, Ca, USA)、抗B220, 抗MHC classII(I-Aq) (Pharmingen, Inc., San Diego, CA, USA) を使用した。

5. フローサイトメトリー (FACS) 解析

各群マウスを屠殺後、直ちに脾臓を摘出し、2% (V/V) Fetal calf serum (FCS) 含有PBS中でホモジナイズし、トリス塩化アンモニウム溶液 (Tris-HCl, pH8.0 および0.83% 塩化アンモニウム1:9混合溶液) 処理により溶血させ、洗浄後 1×10^6 個に調製した。以下に示す各種抗体と反応させた後に、細胞自動解析装置 (EPICS, Coulter, Miami, FL, USA) を用いて解析した。

PE標識抗マウスCD4 (L3T4) モノクローナル抗体 (Cedar Lane Laboratories Ltd. Ontario, Canada)

FITC標識抗マウスCD8 (Ly2) モノクローナル抗体 (Cedar Lane Laboratories Ltd.)

FITC標識抗マウスCD44, CD45RB, Mel-14モノクローナル抗体 (Pharmingen, Inc.)

ビオチン標識抗Fasモノクローナル抗体 (Pharmingen, Inc.)

抗Fasポリクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz,

CA, USA)

6. リンパ球分画分離法

雌 NFS/sldマウスより摘出された脾臓からリンパ球浮遊液に調製し、T細胞分離用ナイロンウール（和光純薬）とイムノマグネティックビーズ（Dynal, CA, USA）により CD4陽性および CD8陽性 T細胞を分離し、細胞増殖反応、ウエスタンブロット法、RT-PCR法（以下に記載）に用いた。また、発症マウス唾液腺組織内の浸潤リンパ球は Ficollリンパ球分離液（Ceder Lane Laboratories Ltd.）にて分離・洗浄後 1×10^6 個に調製し、FACS解析に用いた。

7. 細胞増殖反応

リンパ球分離法にて調製された 10% (V/V) FCS含有 RPMI 1640 培地（日本水産、東京）浮遊液としたリンパ球 5×10^5 / well を 96 穴マイクロタイタープレート（Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA）に分注し、各種マイトージェン $2.0 \mu\text{g/ml}$ ConA（Concanabalin A: EY Laboratories, Inc., San Mateo, CA, USA）、 $4 \mu\text{g/mg}$ LPS（Lipopolysaccharide: DIFCO Laboratories, Detroit, MI, USA）および 10^{-9} M β -エストラジオール（以下 E_2 と略）（和光純薬）、 10^{-9} M タモキシフェン（以下 Tam と略）（RBI）にて 72 時間 37°C で培養し、最終 20 時間における [^3H] チミジン（NEN Life Science Products Boston, MA, USA）の取り込みをオートマチック β シンチレーションカウンター（Aloka, CA,

USA)にて計測し、増殖反応の評価を行った。

8. ウェスタンブロット法

当教室で精製した唾液腺特異的自己抗原 α -fodrin¹⁶⁾ 30 ng を 10% (重量/容量、以下 W/V と略) アクリルアミド (和光純薬) で調製したゲルを用いて Laemmili の方法に準じたドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミド電気泳動 (以下 SDS-PAGE と略) を行った。標品はポリビニリデンジフルオリド膜 (以下 PVDF 膜 と略; Biorad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) に 100 V、3 時間、氷冷下にて電氣的に転写した。PVDF 膜は 5% (W/V) スキムミルク含有 TBS でブロッキングした後、1 次抗体として 200 倍希釈の発症マウス血清を含む 1% スキムミルク-TBS で室温、8 時間反応させた。洗浄後、ペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG (Biorad Laboratories, Inc.) と室温で 2 時間反応させた。TBS で洗浄した後、ECL 試薬 (Amersham Life Science, Inc., Buckinghamshire, England) を用いて化学発色法にて自己抗体の検出を行った。また、リンパ球のエストロジェンレセプターの検出を行うために、リンパ球分画分離法で得られた各 T 細胞サブセットを 2 μ g/ml アプロチニンおよび 10 mM EDTA 含有の細胞溶解液にて溶解・遠心後、上清を 1 レーンあたり 40 ng を SDS-PAGE に展開、PVDF 膜に転写し、1 次抗体として抗エストロジェンレセプターモノクローナル抗体 (Transduction Laboratories Inc., Lexington, KY, USA) を用い上述の方法を行っ

た。

9. 酵素免疫測定法 (ELISA)

発症マウス血清中の抗唾液腺自己抗体の検出に、酵素免疫測定法 (ELISA; Enzyme-linked Immunosorbent Assay) を用いた。唾液腺自己抗原溶液 $50 \mu\text{l}$ を 96 well マイクロタイタープレート (Nunc, Inc., Poskilide, Denmark) に加え 4°C で 1 晩固相化した。抗原液除去後、10% (W/V) スキムミルク (0.05% (V/V) Tween 20 含有) を $200 \mu\text{l}/\text{well}$ 加え、 37°C で 1 時間静置し非特異的反応を除去した。0.05% (V/V) Tween 20 含有 PBS で洗浄後、1% (W/V) スキムミルク (0.05% (V/V) Tween 20 含有) で希釈したマウス血清を $50 \mu\text{l}/\text{ml}$ 加え、 37°C で 1 時間静置した。2次抗体として 1000 倍希釈したペルオキシダーゼ標識ウマ抗マウス IgG (フナコシ、東京) を $50 \mu\text{l}/\text{well}$ 加え、 37°C で 60 分間反応させた。過酸化水素水を含む o-フェニレンジアミン (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 溶液を基質液として発色反応させ、 492 nm での吸光度として吸光度測定器 (Titertec Multiskan MC; Flow Laboratories, McLean, V. A.) にて測定した。

10. 細胞移入法

イムノマグネティックビーズおよび抗 CD4 抗体・抗 CD8 抗体を用いて、未処置の NFS/sld の脾細胞から CD4 陽性 T 細胞を除いた分画 (CD4-depleted と略)、CD8 陽性 T 細胞を除いた分画 (CD8-depleted と略) および未分画細胞 (Whole と略)

を調整し、それぞれ 1×10^6 個を、Tx+Ovxマウスの腹腔内にOvx直後に投与した後、8週齢にて屠殺し各臓器の病理組織学的評価を行った（各群 $n = 5 - 7$ ）。

1.1. RT-PCR法

RT-PCR (Reverse transcriptase polymerase chain reaction) 法を用い T細胞サブセットにおけるエストロジェンレセプター messenger RNA (以下mRNAと略) の発現を以下の如く解析した。

1) RNA 抽出

リンパ球分画分離法にて分離したCD4陽性T細胞およびCD8陽性T細胞からtotal RNA (以下tRNAと略) を抽出した。抽出はRN easy kit (Quiagen, Inc., Chatsworth, CA, USA) を用いて、添付プロトコールに従って実施し、使用時まで -80°C にて保存した。

2) complementary DNA (cDNA) 合成

50 ngのtRNAを用い、 65°C 、5分間加熱した後、氷中に5分間静置し、cDNA反応液としてRibonuclease inhibitor (宝酒造、京都)、 $10 \times$ PCR緩衝液 ($500 \mu\text{M}$ 塩化カリウム； 200 mM トリス-塩酸緩衝液、 $\text{pH}8.4$ ； 25 mM 塩化マグネシウム)、 1.25 mM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP; Pharmacia, Inc.)、 $10 \times$ hexanucleotid mixture (Boehringer Mannheim, Inc., Mannheim, Germany)、 100 mM dithiothreitol DEPC処理滅菌水、逆転写酵素 (宝酒造、京都) を加え、 42°C 、60分間反応させた。 95°C 、5分間加熱し反応を停止させ、cDNAを得た。

3) 遺伝子増幅

cDNAに10×PCR緩衝液、エストロジェンレセプター遺伝子5'および3'プライマー(5'-TCGGTTCCGCATGATGAAC, 3'-AGCAGGTCATAGAGGGGC)^{17, 18)}、1.25 mM dNTPs、20 mM塩化マグネシウム、DNA合成酵素としてTaqポリメラーゼ(Perkin Elmer Centus, Inc., Norwalk, CT, USA)を加え、至適条件にてサーマルサイクラー(Perkin Elmer Centus, Inc.)で反応、増幅させた。得られたPCR産物にエチジウムブロマイドを添加し、1.7%アガロースゲル電気泳動後、UVトランスイルミネーター(UVP, Inc., San Gabriel, CA, USA)を用いて検出し、ポラロイドカメラにて撮影した。

12. マウス顎下腺細胞初代培養

マウス顎下腺細胞(Mouse salivary gland cell; 以下MSG細胞と略)の初代培養をHannらの方法に準じて実施した^{19, 20)}。3週齢の無処置雌NFS/sldマウスの顎下腺を摘出しCa²⁺、Mg²⁺無添加のHBSS溶液にて被膜剥離後、1 mm²角に細切・洗浄し、0.76 mg/ml EDTA、4.9 μg/ml L-アスコルビン酸、4.9 μg/ml グルタチオン含有HBSS溶液(Sigma Chemical Co.)中にて37℃で15分間培養した。組織細片をDMEM/STI溶液(Sigma Chemical Co.)にて洗浄後、750 U/mlタイプIコラーゲナーゼ(和光純薬)、500 U/mlタイプIVヒアルロニダーゼ(和光純薬)、10% (V/V) FCS含有DMEM/F12 (Sigma Chemical Co.)にて37℃で2時間処理した。100 μmナイロンメッシュフィルターにて濾

過した後、再び上述の酵素処理を37℃で30分間行い、洗浄後10% (V/V) FCS含有のMEM培地（日本水産、東京）にて37℃で24時間培養し、プレートに接着した細胞を上皮細胞として用いた。なお、抗ケラチン抗体（LSL Co., Ltd., 東京）を用いた免疫組織化学法にて90%以上が陽性細胞であることを確認した。

13. アポトーシスの検出

MSG細胞のアポトーシスを誘導するために、MSG細胞を1000 U/ml IFN- γ (Pharmingen, Inc.)にて37℃で24時間培養後、100 ng/ml 抗 Fasモノクローナル抗体 (Pharmingen, Inc.) と 10^{-9} M の β -エストラジオール（和光純薬）の存在・非存在下でさらに24時間培養した。細胞回収・洗浄後、70% エタノールにて固定し、アポトーシス細胞の検出試薬である100 mg/ml プロピジウムヨード（Propidium Iodide, Sigma Chemical Co.: 以下 PI と略）にて37℃で30分間反応させた。PBSにて洗浄後、細胞自動解析装置 (EPICS, Coulter) によりアポトーシス細胞を検出した。

14. 統計学的検索

組織学的インデックス、FACS、ELISA、細胞増殖反応におけるデータは平均 \pm SDで表し、Mann-Whitney U-test を用い $p < 0.05$ にて有意とする。

結果

1. 病理組織学的変化

生後3日目にてTxを施したNFS/sldマウスにさらに4週齢にて、エストロジェンを欠乏させる目的で卵巣摘出を行った。Tx+Ovx群8週齢における唾液腺・涙腺における病理組織像を図1に示す。Txマウスに比較してTx+Ovxマウスでは顎下腺、舌下腺、耳下腺、涙腺のいずれの臓器においても腺組織破壊を伴う著しい炎症性病変が認められた。8週齢より20週齢までの各臓器における病変の経時的变化を図2に示す。各臓器ともにTxマウスに比較し、Tx+Ovxマウスでは自己免疫病変の増強が有意に認められた。なお、いずれのマウスにも他臓器の炎症性病変は認められなかった。

2. 唾液腺浸潤リンパ球サブセットの同定

免疫組織化学的検索の結果から、Tx+Ovxマウスの唾液腺浸潤リンパ球の多くはThy1.2陽性T細胞(図3A)でありB220陽性B細胞は少数であった。T細胞サブセットの表現形質はCD4陽性T細胞が優位で(図3B)CD8陽性T細胞は少数であること(図3C)が判明した。唾液腺組織から分離した浸潤リンパ球のFACS解析では、CD4陽性T細胞は30.2%、CD8陽性T細胞は4.8%であった(図3D)。

3. 卵巣摘出による脾臓T細胞およびB細胞への影響

響

生体内でのエストロゲン欠乏状態が全身の免疫系にどのような影響を与えているのかを知るために、各群の脾臓におけるT細胞サブセットをFACSにて解析した。CD4およびCD8の二重染色によるプロファイルを図4に示す。Txを施さない未処置のNFS/*sld*マウスに比べ、TxマウスではCD4・CD8陽性T細胞ともに減少していた。このことは、胸腺を摘出することによるT細胞の分化・成熟不全を反映している。Tx+OvxマウスではさらにT細胞は減少し、特にCD8陽性T細胞の有意な減少が認められた。脾臓におけるB220陽性B細胞はTxマウスに比較してTx+Ovxマウスでは軽度増加していたが、有意な変化ではなかった(表1)。B細胞のマイトーゲンであるLPSに対する反応では、TxマウスよりもTx+Ovxマウスの方が有意に高い増殖反応を示していた(表1)。

4. 自己抗体の検出

発症マウス血清中の唾液腺特異的自己抗原(120kD α -fodrin)に対する自己抗体を検出するために、ウエスタンブロット法、ELISAによる解析を行った。

1) ウエスタンブロット法

SSモデル NFS/*sld*マウス唾液腺から抽出した唾液腺特異的自己抗原 120kD α -fodrin¹⁶⁾ に対して、TxマウスおよびTx+Ovxマウス血清を1次抗体とするウエスタンブロット法を行ったところ、Txマウスに比較してTx+Ovxマウスで120kDに特異的なバンドが強く検出された。なお、

対照として用いた正常 BALB/c マウス血清および Tx を行わずに Ovx のみを施した NFS/sld マウス血清と反応するバンドは認められなかった (図 5 A)。

2) ELISA

ELISA により唾液腺特異的自己抗体の定量を行った結果、Tx マウスに比較して Tx+Ovx マウスの血清中に自己抗体量の有意な増加が認められた (図 5 B)。

5. Tx+Ovx マウスへのエストロジェン投与による病態回復効果

Tx+Ovx により増強された自己免疫病変がエストロジェン投与によって回復するか否かを検討した。Tx、Tx+Ovx、Tx+Ovx+E₂、Tx+Tam、Tx+Ovx+Tes の 5 群を 4 週齢から 8 週齢まで処置し 8 週齢にて屠殺し、各臓器の組織学的検索を行った (表 2)。エストロジェン投与により、顎下腺・舌下腺・耳下腺・涙腺ともに自己免疫病変の発症は有意に回復することが判明した。また、エストロジェンの拮抗薬であるタモキシフェン投与群では顎下腺以外は Tx+Ovx 群とほぼ同程度の病変であった。テストステロン投与群では耳下腺・涙腺で Tx+Ovx 群よりも病変の増悪が認められた。

6. エストロジェン投与による脾臓 T 細胞への影響

無処置, Tx, Tx+Ovx, Tx+Ovx+E₂, Tx+Tam, Tx+Ovx+Tes の各群での脾細胞における CD4 および CD8 陽性 T 細胞の割合を FACS にて検出し、CD4/CD8 比を図 6 に示した。Tx+Ovx 群を基準にすると、

エストロジェン投与で CD4/CD8比は低下し、タモキシフェン投与で同程度となり、テストステロン投与で上昇することが判明した。つまり、CD4/CD8比は病変の程度には連動していることが判った。また、各実験群の脾臓における CD4陽性 T細胞の活性化の程度を知るために、T細胞の活性化マーカーである CD44, CD45RB, Mel-14発現を FACSにて解析した。このモデルマウスは Txを施すことにより、CD44^{high}, CD45RB^{low}, Mel-14の活性化パターンを示し、Tx+Ovx処理によってそのパターンは増強され、エストロジェン投与により Mel-14と CD44の活性化パターンが弱まり、活性化の抑制効果が認められた。(図7)

7. 卵巣摘出マウスへの T細胞分画移入による自己免疫病変の影響

Tx+Ovxにて増強された自己免疫病変が、正常脾細胞の T細胞分画を移入することにより回復するか否かを検討するために、細胞移入実験を行った。図8に8週齢における各臓器の組織学的インデックスを示す。wholeの細胞を移入した群および CD8-depleted細胞を移入した群において各臓器ともに自己免疫病変の回復が有意に認められ、CD4-depleted細胞を移入した群は病変の回復は認められなかった。即ち、CD4陽性 T細胞を含む分画の移入により病変の回復効果が認められた。

8. in vitroにおける脾細胞のエストロジェンに対する反応性

NFS/sldマウス脾細胞のエストロジェンに対する反応性を
知るために、T細胞およびB細胞のマイトーゲンであ
る ConAおよび LPSを用い、*in vitro*におけるエストロジェンに対
する増殖反応を検討した。ConAで刺激を受けた脾細胞は
エストロジェンを加えることによりさらに反応性が上
昇し、その反応はエストロジェンの拮抗薬であるタモ
キシフェンにより抑制された(図9A)。一方、エスト
ロジェンのみでは全く反応しなかった。LPSで刺激を
受けた脾細胞はエストロジェンを加えても反応性に変
化は認められなかった(図9B)。即ち、活性化された
T細胞にエストロジェンが作用し、その増殖反応を増強
していることが判明した。そこで、T細胞の各サブセッ
トを分離し、同様の反応性を検討した。CD4陽性T細胞
とCD8陽性T細胞を分離し、エストロジェンに対する反
応性を比較すると、CD8陽性T細胞の方がエストロジェ
ンによって有意に増殖反応が亢進することが明らかと
なった。また、その反応はタモキシフェンにより抑制
されることが判った(図9C, D)。

9. T細胞各サブセットにおけるエストロジェンレ セプターの発現

CD8陽性T細胞のエストロジェンに対する有意な反応性
が認められたことから、その反応がエストロジェンレ
セプターの発現と関わっている可能性を明らかにする
ために、T細胞各サブセットにおけるエストロジェン

レセプターの発現をウエスタンブロット法と RT-PCR法にて検索した。ウエスタンブロット法では、約70 kDにエストロジェンレセプター特異的なバンドが検出され、CD4陽性T細胞に比較してCD8陽性T細胞に強い発現が認められた(図10A)。なお、陽性対照として NFS/sldマウスの子宮組織ホモジネートを用いた。RT-PCR法においても、CD8陽性T細胞において、エストロジェンレセプター mRNAの発現がCD4陽性T細胞に比べて明らかに増強されていることが判明した(図10B)。

10. 自己免疫病変における Fas を介した組織破壊とエストロジェンとの関係

胃炎・甲状腺炎などにおける自己免疫性の組織破壊のメカニズムの一つに Fas を介したアポトーシスの関与が知られている²¹⁻²⁵⁾。そこで、Txマウスと Tx+Ovxマウスにおける唾液腺浸潤リンパ球の Fas リガンドの発現と、それぞれのマウスより分離した MSG細胞の Fas 発現を FACSにて比較検討した。唾液腺浸潤リンパ球の Fas リガンド発現は、Txマウス(図11A:72%)に比較して、Tx+Ovxマウスの方がより増強されていた(図11B:88%)。MSG細胞における Fas 発現においても Tx+Ovxマウスの方がより増強されていることが判った(図11C, D)。

11. *in vitro*での Fas を介したアポトーシスにおけるエストロジェンの影響

*in vivo*において、エストロジェン欠乏状態では唾液腺細

胞の Fas 発現が増強されていたことから、エストロジェンが直接唾液腺細胞における Fas 発現を調節するのか否かを明らかにするために、MSG細胞に *in vitro* で Fas を発現させ、その発現にエストロジェンがどのように影響するのかを検討した。ある種の骨髄細胞や glioma 細胞などで、IFN- γ を作用させることにより Fas の発現が増強することが知られている^{26, 27)}。本実験系で確立した MSG 細胞においても IFN- γ によって Fas の発現が増強されたことから、この系を用いて、*in vitro* でエストロジェンの作用を加えると、MSG細胞の Fas 発現は抑制され、タモキシフェンによりその抑制効果は相殺されることが判明した (図 12 A)。また、抗 Fas 抗体による MSG 細胞のアポトーシス誘導実験においても、IFN- γ で誘導された Fas を介したアポトーシスはエストロジェンにより抑制されていることが明らかとなった (図 12 B)。

考察

自己免疫疾患の成立機構は不明であるが、染色体上の複数の遺伝子座の働きと、環境因子とが相俟っておこる多因子性疾患と考えられている。遺伝的因子として組織適合遺伝子複合体 (MHC; major histocompatibility complex) をはじめとする様々な遺伝子群が関与していることが知られている²⁸⁻³²⁾。環境因子としてはウイルス感染、ホルモン、ストレス、加齢など多く要因が知られており、その中でも性ホルモンに関する報告は多い。自己免疫疾患の発症に女性優位の性差があることは従来から周知の事実であるが、自己免疫疾患の発症における性ホルモンの役割を組織レベル・細胞レベル・遺伝子レベルで詳細に解析した報告はない。本研究では、臓器特異的自己免疫疾患であるシェーグレン症候群の疾患モデル NFS/sldマウスを用い、卵巣摘出を施すことによりエストロゲン欠乏状態を誘導すると、唾液腺・涙腺における自己免疫病変は著しく増悪することが判明した。また、生理的濃度のエストロゲンを *in vivo* に経時的に投与することによりそれらの病変は回復することが判った。このことは、エストロゲンが生体内で自己免疫病変の発症に防御的な作用をしていることを示唆している。さらに、エストロゲンの拮抗薬であるタモキシフェンを投与することにより卵巣摘出群と同程度の

病変が誘導できたことから、エストロジェンの作用が病態抑制効果に働いている可能性が強く示唆された。なお、タモキシフェン投与群において唾液腺炎のうちで顎下腺病変に増悪がみられなかった原因として、タモキシフェンが部分的拮抗薬であることや臓器によってホルモン感受性に差のある可能性が考えられた。SSのモデルとして MRL/lprマウスや NZB/NZW F1マウスを用いた実験では、エストロジェンではなくアンドロジェンが病態抑制に効果的であるという報告があるが^{8, 33)}、それらのマウスは全身的な自己免疫疾患を背景とした二次性SSのモデルであり、本研究で用いた NFS/sld疾患モデルマウスが一次性SSのモデルである点と異なっている。また、個々の系統のマウスによるホルモン感受性の違いや病態発症のメカニズムの相違も関与しているものと思われる。閉経期以降のエストロジェンの欠乏状態にある女性に好発するSSの病態と、卵巣摘出によって増強される NFS/sld疾患モデルマウスの病態には類似点が多く認められ、自己免疫疾患の発症に関与するエストロジェンの機能を解析するうえで本モデルの有用性が重視される。

卵巣摘出を施したマウスの病変局所に浸潤しているリンパ球は CD4陽性 T細胞が主体であり、この所見は胸腺摘出のみの NFS/sld疾患モデルと類似し、自己免疫病変の形成に CD4陽性 T細胞がエフェクター細胞として機能し

ているものと考えられる。また、正常 CD4陽性 T細胞を含む分画の移入により卵巣摘出マウスの自己免疫病変が回復したことから CD4陽性 T細胞中に自己免疫反応に対して防御的に働く調節性 T細胞が含まれている可能性を示唆しており、このことは従来の報告と一致している^{3,4)}。卵巣摘出による全身の免疫系への影響として、*in vivo*における CD8陽性 T細胞の減少が著明であり、*in vitro*において CD8陽性 T細胞のエストロジェンに対する有意な反応性がみられたことから、生体内でエストロジェンが欠乏することにより CD8陽性 T細胞の増殖能が抑制され、サプレッサー機能に不全状態がもたらされた可能性が示唆された。また、従来から免疫担当細胞には、エストロジェンレセプターが存在することが知られており^{3,5,36)}、本モデルマウスにおいて CD8陽性 T細胞に優位にエストロジェンレセプターの発現が認められたことは、ヒトにおける解析結果³⁷⁾と一致している。また、卵巣摘出による自己抗体産生の増強効果は NZB/NZW F1マウスなどにおける従来の報告^{6,7)}と一致しており、エストロジェンが負の調節因子として働く IL-6などのサイトカインの産生亢進によるものであると説明されている。一般的に、エストロジェンは標的細胞の細胞質に存在するエストロジェンレセプターに結合し、エストロジェン・エストロジェンレセプターコンプレックスを形成し、そのコンプレックスが核内に移

行し特定の遺伝子上に存在するエストロジェンレスポ
ンシブエレメント (ERE; estrogen responsive element) と相互作用し、
標的遺伝子の転写を調節していることが明らかにされ
ている³⁸⁻⁴⁰⁾。その標的遺伝子の中に IL-6, IFN- γ , IL-1 β ,
TNF- α などの各種サイトカイン遺伝子が存在しているとい
う報告がある⁴¹⁻⁴⁷⁾。生体内におけるエストロジェ
ンの作用として直接細胞の増殖などの機能に関与して
いるシグナルと、サイトカインなどを介して間接的に
作用しているシグナルとが存在しており、自己免疫病
変の発症メカニズムにこれらエストロジェンの複雑な
直接的・間接的作用が関与している可能性が強く示唆
される。

多くの自己免疫疾患の組織破壊のメカニズムに Fas を介
したアポトーシスの関与が知られている^{21-25, 48, 49)}。
本モデルにおいても、MSG細胞に Fas 抗原が発現し、唾液
腺に浸潤する CD4陽性 T 細胞に Fas リガンドが検出され、
さらに *in vitro* において MSG 細胞の抗 Fas 抗体によるアポト
ーシスが誘導されたことから、Fas を介したアポト
ーシスが唾液腺の組織破壊に関与している可能性が示唆され
た。この点に関しては、エストロジェンの欠乏状態に
よって CD8陽性 T 細胞のサプレッサー機能不全やサイト
カインの産生亢進によるエフェクター細胞の活性化が
もたらされ、Fas リガンドを強く発現した自己反応性 T 細
胞の局所浸潤を促すと同時に、IFN- γ によって増強され

た唾液腺細胞側の Fas を介したアポトーシスが誘導され、これらの結果として組織破壊が進行するというメカニズムが考えられる。角膜、精巣、胎盤などの組織側に Fas 抗原ではなく Fas リガンドが発現し、浸潤細胞の Fas と相互作用し浸潤細胞のアポトーシスが誘導され、免疫防御的な役割を果たしているという報告⁵⁰⁻⁵²⁾や、橋本甲状腺炎⁵²⁾においては Fas および Fas リガンドの両方を発現し浸潤リンパ球とは関係なくアポトーシスが起これるという報告⁵³⁾なされている。本疾患モデルマウスにおいて唾液腺細胞には Fas 抗原が発現し、Fas リガンドの発現は認められなかったことから、上述したような現象とは異なるメカニズムによる組織破壊と考えられる。

NFS/sld マウスにおいて、胸腺摘出を行わずに卵巣摘出を施しても自己免疫病変は全く認められず、免疫担当細胞にも影響がなかったことから、胸腺摘出によって自己抗原に反応する活性化した T 細胞のみにエストロジェンが作用している可能性がある。また、*in vitro*における脾細胞の増殖反応においても、マイトージェン刺激がなければエストロジェンの作用は認められなかったことも *in vivo*における所見を反映しているものと考えられる。免疫系細胞と性ホルモンとの関連性については多くの報告があり⁵⁴⁻⁵⁷⁾、それらの中で、胸腺細胞には性ホルモンに対する強い感受性が存在し、性ホルモンが胸

腺内T細胞の分化に大きく影響することが明らかにされている。一方、本疾患モデルでは生後3日目に胸腺を摘出し、4週齢にて卵巣摘出を施すので、この実験系においては胸腺細胞とエストロジェンとの関連性は少ないものと考えられる。また、高濃度のエストロジェンがT細胞の胸腺外分化を誘導することが知られているが、胸腺摘出を施したNFS/sldマウスの肝臓における胸腺外分化を示唆するTCR (T cell receptor) / $\alpha\beta^m$ のポピュレーション⁵⁸⁾は認められなかったことから、本モデルにおける自己免疫疾患の発症に胸腺外分化T細胞は関与していないものと考えられた。

このSS疾患モデルマウスを用い、ヒトSSと共通する臓器特異的自己抗原が α -fodrinであることはすでに当教室から報告されている¹⁶⁾。自己抗原とエストロジェンとの関係については不明であるが、エストロジェンによって調節を受けるある種のカテプシンやカルパインなどのプロテアーゼ群⁵⁹⁻⁶³⁾が自己抗原の分断化およびプロセッシングに関係している可能性が考えられる。本研究では、卵巣摘出マウスにおいて120 kD α -fodrinに対する自己抗体の産生亢進が認められたことから、自己抗原の発現増強がエストロジェンの動態によって影響を受けていることが示唆された。

本研究において、エストロジェンがSS疾患モデルであるNFS/sldマウスの自己免疫病変に対して防御的に作用し

ており、そのメカニズムの一端が、エストロジェン欠乏状態によるCD8陽性T細胞のサプレッサー機能不全、 α -fodrinに対する自己抗体産生亢進、唾液腺におけるFas/Fasリガンドを介した組織破壊の亢進などであることが明らかになったが、これらの分子生物学的な制御機構については不明のままである。今後、唾液腺組織においてエストロジェンによって調節・制御されて自己抗原の発現や組織破壊に関与する新たな分子群の同定や、自己反応性T細胞の活性化を調節するシグナルカスケードにおけるエストロジェンの役割を解析することなどが重要な検討課題である。これらのアプローチにより、自己免疫疾患発症における性差のメカニズムの分子論的解明がなされるものと考えられる。

結論

1. シェーグレン症候群モデルマウス NFS/sldにおいて、
卵巣摘出を施すことにより、自己免疫病変はさらに
増悪することが明らかとなった。
2. 卵巣摘出により脾細胞中の CD8陽性 T細胞が減少し、
in vitroにおいて CD8陽性 T細胞が優位にエストロジェン
に反応し、さらに CD8陽性 T細胞にエストロジェンレ
セプターの強い発現がみられたことから、エストロ
ジェンレセプターを介した CD8陽性 T細胞のサプレッ
サー機能にエストロジェンが密接に関与している可
能性が示唆された。
3. 唾液腺特異的な自己抗原 120 kD α -fodrin に対する自
己抗体の産生が卵巣摘出により亢進していることが
判明した。
4. 標的組織破壊のメカニズムに Fas/Fasリガンドを介し
たアポトーシスが関与し、エストロジェンが唾液腺
細胞の Fas抗原 の発現および浸潤 T細胞の Fasリガンド
発現の両者に影響を与えている可能性が示唆された。
5. 本研究はヒト自己免疫疾患発症における性差のメ
カニズムの一端を解明する上で有用であり、シェー
グレン症候群の病因に基づいた治療法の開発に重要
な知見をもたらすものと考えられる。

参考文献

- 1) Keisler L, Vom S, Keisler D, and Walker S : Hormonal manipulation of the prenatal environment alters reproductive morphology and increases longevity in autoimmune NZB/W mice. *Biol Report* 44, 707-716 (1991)
- 2) Carlsten H, Nilsson N, Jonsson R, Backman K, Holmdahl R, and Tarkowski A : Estrogen accelerates immune complex glomerulonephritis but ameliorates T cell-mediated vasculitis and sialadenitis in autoimmune MRL lpr/lpr mice. *Cell Immunol* 144, 190-202 (1992)
- 3) Jansson L, Olssen T, and Holmdahl R : Estrogen induces a potent suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis and collagen-induced arthritis in mice. *J Neuroimmunol* 53, 203-207 (1994)
- 4) Hawkins T, Gala R, and Dunbar J : The effect of neonatal sex hormone manipulation on the incidence of diabetes in nonobese diabetic mice. *Proc Soc Exp Biol Med* 202, 201-205 (1993)
- 5) Grossman C : Interactions between the gonadal steroids and the immune system. *Science* 227, 257-261 (1985)
- 6) Jansson L, Mattsson A, Mattsson R, and Holmdahl R : Estrogen-induced suppression of collagen arthritis. *J Autoimmun* 3, 257-270 (1990)
- 7) Ansar A S, Dauphinee M J, Montoya A L, and Talal N : Estrogen induces normal murine CD5⁺ B cells to produce autoantibodies. *J Immunol* 142, 2647-2653 (1989)
- 8) Sato E H, and Sullivan D A : Comparative influence of steroid hormones and immunosuppressive agents on autoimmune expression in lacrimal glands of a female mouse model of Sjögren Syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35, 2632-2642 (1994)
- 9) Kessler H : A laboratory model for Sjögren's syndrome. *Am J Pathol* 52, 671-685 (1968)

- 10) Hoffman R, Alspaugh M, Waggie K, Durham J, and Walker S : Sjögren's syndrome in MRL/l and MRL/n mice. *Arthritis Rheum* 27, 157-165 (1984)
- 11) Sato E, Ariga H, and Sallivan D : Impact of androgen therapy in Sjögren's syndrome: Hormonal influence on lymphocyte populations and Ia expression in lacrimal glands of MRL/Mp-lpr/lpr mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33, 2537-2545 (1992)
- 12) Hayashi Y, Kurashima C, Utsuyama M, and Hirokawa K : Spontaneous development of autoimmune sialadenitis in aging BDF1. *Am J Pathol* 132, 173-176 (1988)
- 13) Hayashi Y, Utsuyama M, Kurashima C, and Hirokawa K : Spontaneous development of organ-specific autoimmune lesions in aged C57BL/6 mice. *Clin Exp Immunol* 78, 120-123 (1989)
- 14) Haneji H, Hamano H, Yanagi K, and Hayashi Y : A new animal model for primary Sjögren's syndrome in NFS/sld mutant mice. *J Immunol* 153, 2767-2777 (1994)
- 15) White S, and Casaret G : Induction of experimental autoallergic sialadenitis. *J Immunol* 112, 178-185 (1974)
- 16) Haneji N, Nakamura T, Takio K, Yanagi K, Higashiyama H, Saito I, Noji ., Sugino H, and Hayashi Y : Identification of α -fodrin as a candidate autoantigen in primary Sjögren's Syndrome. *Science* 267, 604-607 (1997)
- 17) White R, Lees J, Needham M, Ham J, and Parker M : Structural organization and expression of the mouse estrogen receptor. *Mol Endocrinol* 1, 735-744 (1990)
- 18) Greene G, Gilna P, Waterfield M, Baker A, Hort Y, and Shine J : Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science* 231, 1150-1154 (1986)
- 19) Yoshino K, Tseng S, and Pflugfelder S : Substitute modulation of morphology, growth and tear protein production by cultured human lacrimal gland epithelial cells. *Exp Cell Res* 220, 138-151 (1995)

- 20) Hann L, Tatro J, and Sullivan D : Morphology and function of lacrimal gland acinar cells in primary culture. *Inv Opthal Vis Sci* 30, 145-158 (1989)
- 21) Ito M, Terasaki S, Itoh J, Katoh H, Yonehara S, and Nose M, Rheumatic Disease in an MRL strain of mice with a deficit in functional Fas ligand. *Arthritis Rheum* 40, 1054-1063 (1997)
- 22) Nishio A, Katakai T, Oshima C, Kasakura S, Sakai M, Yonehara S, Suda T, Nagata S, and Masuda T : A possible involvement of Fas-Fas ligand signaling in the pathogenesis of murine autoimmune gastritis. *Gastroenterology* 111, 956-967 (1996)
- 23) Ludgate M, and Jasani B : Apoptosis in autoimmune and non-autoimmune thyroid disease. *J Pathol* 182, 123-124 (1997)
- 24) Theofilopoulos A : Genetics of systemic autoimmunity. *J Autoimmun* 9, 207-210 (1996)
- 25) Nagata S, and Golstein P : The Fas death factor. *Science* 267, 1449-1456 (1995)
- 26) Maciejewski J, Selleri C, Anderson S, and Young N : Fas antigen expression on CD34⁺ human marrow cells is induced by IFN- γ and TNF- α and potentiates cytokine-mediated hematopoietic suppression in vitro. *Blood* 85, 3183-3190 (1995)
- 27) Weller M, Frei K, Groscurth P, Krammer P H, Yonekawa Y, and Fontana A : Anti-Fas/APO-1 antibody-mediated apoptosis of cultured human glioma cells. Induction and modulation of sensitivity by cytokines. *J Clin Invest* 94, 954-964 (1994)
- 28) Reich E P, Sherwin R S, Kanagawa O, Jareway C A Jr : An explanation for the protective effect of the MHC class II I-E molecule in murine diabetes. *Nature* 341, 326-328 (1989)
- 29) Zamvil S S, Mitchell D J, Lee N E, Moore A C, Waldor M K, Sakai K, Pothbard J B, McDevitt H O, Steinman L, and Acha O H : Predominant expression of a T cell receptor V β gene subfamily in autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 167, 1586-1596 (1987)
- 30) Kotzin B L, and Palmer E : The contribution of NZW gene to lupus-like disease in

- (NZBXNZW)F1 mice. *J Exp Med* 165, 1237-1251 (1987)
- 31) Hashimoto Y, Maxam A M, and Greene M I : T-cell antigen-receptor genes in autoimmune mice. *Proc Natl Aca USA* 83, 7865-7869 (1986)
- 32) Wucherpfennig K W, Newcombe J, Li H, Keddy C, Cuzner M L, and Hafler, D A : T cell receptor V/ab repertoire and cytokine gene expression in active multiple sclerosis lesions. *J Exp Med* 175, 993-1002 (1992)
- 33) Vendramini A, Soo C, and Sullivan D A : Testosterone-induced suppression of autoimmune disease in lacrimal tissue of amouse model (NZB/NZW F1) of Sjögren's syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32, 3002-3006 (1991)
- 34) Ikeda H, Taguchi O, Takahashi T, Itoh G, and Nishizuka Y : L3T4 effector cells in multiple organ-localized autoimmune disease in nude mice grafted with embryonic rat thymus. *J Exp Med* 168, 2397-2402 (1988)
- 35) Weusten J, Blankenstein M, Gmelig-Meyling F, Scuurman H, Kater L, and Thijssen J : Presence of oestrogen receptors in human blood mononuclear cells and thymocytes. *Acta Endocrinol* 112, 409-414 (1986)
- 36) Cocchiara R, Albegiani G, Di Trapani G, Azzolina A, Lampiasi N, Rizzo F, and Geraci D : Modulation of rat peripheral mast cell and human basophil histamine release by estrogens. *Int Arch Allergy Appl Immune* 93, 192 (1990)
- 37) Cone H, Lawrence G, Corridor K, Simian F, and Reviled J, Sex steroid receptors in peripheral T cells : Absence of androgen receptors and restriction of estrogen receptors to OKT8-positive cells. *J Immunol* 131, 2767-2771 (1983)
- 38) Miller C, and Miller W : Transcriptional repression of the ovine follicle-stimulating hormone- β gene by 17 β -estradiol. *Endocrinology* 137, 3437-3446 (1996)
- 39) Augereau P, Miralles F, Cavailles V, Gaudalet C, Parker M, and Rchefort H :

Characterization of the proximal estrogen- responsive element of human cathepsin D gene.
Mol Endocrinol 8, 693-703 (1994)

- 40) Umehara Y, Kawamori R, Watabe H, Imano E, Iwama N, Morishima T, Yamasaki Y, Kajimoto Y, and Kamada T : Estrogen regulation of the insulin-like growth factor I gene transcription involves an AP-1 enhancer. J Biol Chem 269, 16433-16442 (1994)
- 41) Manolagas S, Bellido T, and Jilka R : New insights into the cellular, biochemical, and molecular basis of postmenopausal and senile osteoporosis: roles of IL-6 and gp130. Int J Immunopharmacol 17, 109-116 (1995)
- 42) Frazier-Jessen M, Mott F, Witte P, and Kovacs E : Estrogen suppression of connective tissue deposition in a murine model of peritoneal adhesion formation. J Immunol 154, 1838-1845 (1996)
- 43) Knopp R : The effects of postmenopausal estrogen therapy on the incidence of arteriosclerotic vascular disease. Obstet Gynecol 72, 23-30 (1988)
- 44) Cantatore F G, Loverro G, Ingrosso A, Lacanna R, Sassanelli E, Selvaggi L, and Carrozzo M : Effect of oestrogen replacement on bone metabolism and cytokines in surgical menopause. Clin. Rheumatol 14 157-160, (1995)
- 45) Ralston S : Analysis of gene expression in human bone biopsies by polymerase chain reaction: evidence for enhanced cytokine expression in postmenopausal osteoporosis. J Bone Miner Res 9, 883-890 (1994)
- 46) Jilka R, Hangoc G, Girasole G, Passeri G, and Manolagas D : Increased osteoclast development after estrogen loss: Mediation by Interleukin-6. Science 257, 88-91 (1992)
- 47) Fox H, Bond B, and Parslow T : Estrogen regulates the IFN- γ promoter. J Immunol 146, 4362-4367 (1991)
- 48) Kagi D, Vignaux F, Ledermann B, Burki K, Depraetere V, Nagata S, Hangartner H, and

- Golstein P : Fas and perforin pathways as major mechanisms of T-cell mediated cytotoxicity. *Science* 265, 528-530 (1994)
- 49) Lowin B, Hahne M, Mattmann C, and Tschopp J : Cytolytic T-cell cytotoxicity is mediated through perforin and Fas lytic pathways. *Nature* 370, 650-652 (1994)
- 50) Griffith T S, Brunner T, Fletcher S M, Green D R, and Ferguson T A : Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science* 270, 1189-1192 (1995)
- 51) Bellgrau D, Gold D, Selawry H, Moore J, Franzusoff A, and Duke R C : A role for CD95 ligand in preventing graft rejection. *Nature* 377, 630-632 (1995)
- 52) Hunt J S, Vassmer D, Ferguson T A, and Miller L : Fas ligand is positioned in mouse uterus and placenta to prevent trafficking of activated leukocytes between the mother and the conceptus. *J Immunol* 158, 4122-4128 (1997)
- 53) Giordano C, Stassi G, DeMaria R, Todaro M, Richiusa P, Papoff G, Ruberti G, Bagnasco M, Testi R, and Galluzzo A : Potential involvement of Fas and its ligand in the pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis. *Science* 275, 960-963 (1997)
- 54) Compton M M, and Cidlowski J A : Rapid in vivo effects of glucocorticoids on integrity of rat lymphocyte genomic deoxyribonucleic acid. *Endocrinology* 118, 38-45 (1986)
- 55) Gulino A, Screpanti I, Torrisi M R, and Frati L : Estrogen receptors and estrogen sensitivity of fetal thymocytes are restricted blast lymphoid cells. *Endocrinology* 117, 47-54 (1985)
- 56) Screpani I, Meco D, Morrone S, Gulino A, Mathieson B J, and Frati L : In vivo modulation of the expression of different T cell receptor V β gene families in CD4-, CD8- thymocytes. *Cell Immunol* 134, 414-426 (1991)
- 57) Seiki K, and Sakabe K : Sex hormones and the thymus in relation to thymocyte proliferation and maturation. *Arch Histol Cytol* 60, 29-38 (1997)
- 58) Okuyama R, Abo T, Seki S, Ohteki T, Sugiura K, Kusumi A, and Kumagai K : Estrogen

administration activated extrathymic T cell differentiation in the liver. *J Exp Med* 175, 661-669 (1992)

59) Shiba E, Kim S, Fujitani M, Kanbayashi J, Kawamura I, Tsujimoto S, Shimomura K, Tanji Y, Taguchi T, Kimoto Y, Izukura M, and Takai S : Possible involvement of calpain in the growth of estrogen receptor positive breast cancer cells. *Anticancer Res* 16, 773-777 (1996)

60) Cheung A N, Ngan H Y, Ng W F, and Khoo U S : The expression of cathepsin D estrogen receptor and progesterone receptor in hydatidiform mole-an immunohistochemical study. *Histopathology* 27, 341-347 (1995)

61) Soto A M, Silvia R M, and Sonnenschein C : A plasma-borne specific inhibitor of the proliferation of human estrogen-sensitive breast tumor cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 43, 703-712 (1992)

62) Rogers S, Day C A, and Fox S B : Expression of cathepsin D and estrogen receptor in male breast carcinoma. *Hum Pathol* 24, 148-151 (1993)

63) Metaya T, Millet C, Kraimps J L, Aubouin B, Barbier J, and Begon F : Estrogen receptor and cathepsin D in human thyroid tissue. *Cancer* 72, 1991-1996 (1993)

図の説明

(図1) 卵巣摘出による自己免疫性唾液腺炎・涙腺炎の病理組織像

Txマウス(左)およびTx+Ovxマウス(右)の顎下腺、舌下腺、耳下腺、涙腺(上段より)の8週齢における組織像を比較する。Tx+Ovxマウスにおいて各臓器ともに組織破壊を伴う自己免疫病変の増強が認められる。(×120)

(図2) 卵巣摘出マウスにおける自己免疫病変の経時的変化

唾液腺・涙腺における自己免疫病変をWhiteらの組織学的index(平均±SD)で示す。Tx+Ovxマウスの各臓器の炎症性病変は20週齢まで経時的に増悪していることがわかる。

(図3) 唾液腺浸潤細胞の免疫組織化学的解析およびFACS解析

浸潤細胞はThy1.2陽性T細胞(A)が主体で、T細胞の表現形質はCD4陽性T細胞(B)が優位で、CD8陽性T細胞(C)は少数であることが判明した(12週齢顎下腺; ABC法、×360)。浸潤細胞のFACS解析(D)を示す。CD4陽性T細胞が30.2%、CD8陽性T細胞が4.8%で、CD4が主体である。(CD4/CD8; 二重染色)

(図4) 脾細胞におけるT細胞表現形質のFACS解析
8週齢における無処置、Tx, Tx+Ovxマウスの脾細胞の表現形質を示す。Tx+OvxによりCD8陽性T細胞の有意な減少が認められる。($p < 0.05$: Mann-Whitney U-test)

(図5) 唾液腺特異的自己抗原に対する自己抗体の検索

(A) ウエスタンブロット法

Txを行わずにOvxのみを施したマウス、Txマウス、Tx+Ovxマウス、Balb/cマウスの各血清を一次抗体とするウエスタンブロット法の結果を示す。Txマウス、Tx+Ovxマウス血清中に120kDに特異的なバンドを検出し、Tx+Ovxマウス血清中においてより強い発現増強を認める。

(B) ELISA

血清中の自己抗体の定量化を行うために、ELISAを行った。Txマウス血清に比較して、Tx+Ovxマウス血清中の自己抗体量が有意に増加していることが判る。($p < 0.05$: Mann-Whitney U-test)

(図6) 性ホルモンの影響による脾細胞のCD4/CD8比の解析

無処置、Tx, Tx+Ovx, Tx+Ovx+E2, Tx+Ovx+Tes, Tx+Tamマウスの脾細胞を用い、FACS解析にてCD4/CD8比を評価した。エストロジェ

ン投与により有意な減少が ($p < 0.05$: Mann-Whitney U-test)、
テストステロン投与により有意な増加 ($p < 0.01$
:Mann-Whitney U-test) が認められる。(CD4/CD8; 二重染色)

(図7) 性ホルモンの影響による脾細胞におけるT細胞
活性化マーカーのFACS解析

各群の脾細胞のCD4陽性T細胞における活性化マーカー
(CD44, CD45RB, Mel-14) のFACS解析を示す。Tx+Ovxマウスにお
けるCD44^{high}, CD45RB^{low}, Mel-14の活性化パターンから、エストロ
ジェン投与によってCD44, Mel-14においてナイーブ型に移行
していることが判る。(CD4/CD44, CD4/CD45RB, CD4/MEL-14; 二
重染色)

(図8) 卵巣摘出マウスへの正常T細胞分画移入によ
る病変回復効果の検討

whole細胞およびCD8-depleted細胞移入群に各臓器ともに病変
の回復効果が認められ、CD4-depleted細胞移入群では病変の
回復は認められない。($p < 0.05$: Mann-Whitney U-test)

(図9) 脾細胞のエストロジェンに対する反応性の解
析

各種マイトージェンおよびエストロジェンに対する脾
細胞の増殖反応を示す(3 well平均(cpm) ± SD)。

(A) ConAで刺激を受けた脾細胞はエストロジェンに

より反応性に有意な増加が認められ ($p < 0.05$: Mann-Whitney U-test)、タモキシフェンでその反応性は抑制される。

(B) LPSに対する反応性はエストロジェンによって影響を受けない。

(C) CD4陽性T細胞のConA反応性はエストロジェンによって影響を受けない。

(D) ConAで刺激を受けたCD8陽性T細胞はエストロジェンによって有意な反応性の増強を示し ($p < 0.05$: Mann-Whitney U-test)、タモキシフェンによってその反応性は抑えられた。

(図10) 各T細胞サブセットにおけるエストロジェンレセプターの解析

(A) ウェスタンブロット法

分離したCD4, CD8分画の細胞溶解液40ngを10%SDSゲルに展開後のクマシーブルー染色を示す(左)。抗エストロジェンレセプター抗体を一次抗体(希釈 $\times 2000$)とするウェスタンブロット法の結果を示す(右)。約70kDにバンドが検出され、CD8陽性T細胞に強い発現が認められる。陽性対照としてNFS/sldマウスの子宮組織ホモジネートを用いた。

(B) RT-PCR法

各フラクションにおけるエストロジェンレセプターmRNAの発現を示す(左)。CD8フラクションに明らかに

強い発現が認められる。(右: β -actin)

(図11) FasリガンドおよびFas発現のFACS解析

(A, B) 唾液腺浸潤リンパ球におけるCD4陽性T細胞のFasリガンド発現のFACS解析を示す。Tx+OvxマウスはTxマウスと比較してFasリガンドの強い発現を認める。

(C, D) 初代培養マウス唾液腺細胞(MSG)におけるFasの発現を示す。Tx+Ovxにおいてやや強い発現傾向が認められる。

(図12) MSG細胞のアポトーシスにおけるエストロジェンの役割

(A) MSG細胞での、IFN- γ によって誘導されたFas発現に対するエストロジェンの影響をFACS解析にて検索し、MFI比で示す。(MFI; mean fluorescence intensity比: 抗Fas抗体のMFI/コントロール抗体のMFI) IFN- γ によって誘導されたFasはエストロジェンによって発現が抑制され、さらにタモキシフェンにより抑制効果が相殺される。

(B) MSG細胞の抗Fas抗体でのアポトーシスへのエストロジェンの影響を、PI染色によるアポトーシスの検出で評価した。エストロジェンによりアポトーシスが抑制されることがわかる。

In vivo Role of Estrogens in Organ-specific Autoimmune Lesions of
an Animal Model for Sjögren's Syndrome

Naozumi ISHIMARU

Department of Oral Pathology, Tokushima University School of Dentistry, 3
Kuramotocho, Tokushima 770, Japan

It is well known that estrogens have important roles on the development of autoimmune lesions, and they also modulate immune responses in a number of animal models. To analyze the in vivo role of estrogenic action on the development of autoimmune lesions in the salivary and lacrimal glands, we investigated an animal model for Sjögren's syndrome in NFS/*sld* mutant mice treated with ovariectomy (Ovx) at 4-week after birth. Histology of autoimmune lesions in the salivary and lacrimal glands in estrogen-deficient mice shows severe destructive changes with inflammatory infiltration. A significantly higher incidence of autoimmune lesions was observed in each age (8-week, 12-week, 16-week, and 20 week) of Ovx-mice compared with those in non-Ovx mice. Immunohistochemical analysis to identify cell populations revealed that a major proportion of infiltrating cells were Thy1.2⁺ and CD4⁺, with a small number of CD8⁺ and B220⁺ cells from the onset of autoimmune disease. In addition, estrogen injections decreased the incidence of autoimmune lesions in Ovx-mice, but

tamoxifen treatment significantly increased the incidence of autoimmune lesions in Ovx-mice. We also found a significant increase in serum autoantibody production against salivary gland-specific autoantigen in Ovx-mice. Flow cytometric analysis using splenic T cells revealed a decreased proportion of CD8⁺ T cells in Ovx-mice. In contrast, proliferative responses of splenic CD8⁺ T cells to Con A and estrogen was significantly higher than those of CD4⁺ T cells. We detected estrogen receptor in splenic CD8⁺ T cells on immunoblotting and RT-PCR analysis. Proportion of tissue-infiltrating CD4⁺ T cells bearing FasL was significantly higher in Ovx-mice than that in non Ovx-mice. In addition, primarily cultured salivary gland epithelial cells were found to be reduced expression of Fas antigen. These results indicate that dysfunction of CD8⁺ T cells induced by estrogen deficiency may play a crucial role on acceleration of autoimmune lesions in the salivary and lacrimal glands, and estrogenic action appears to influence both effector and target cells in animal model for Sjögren's syndrome.

图 1

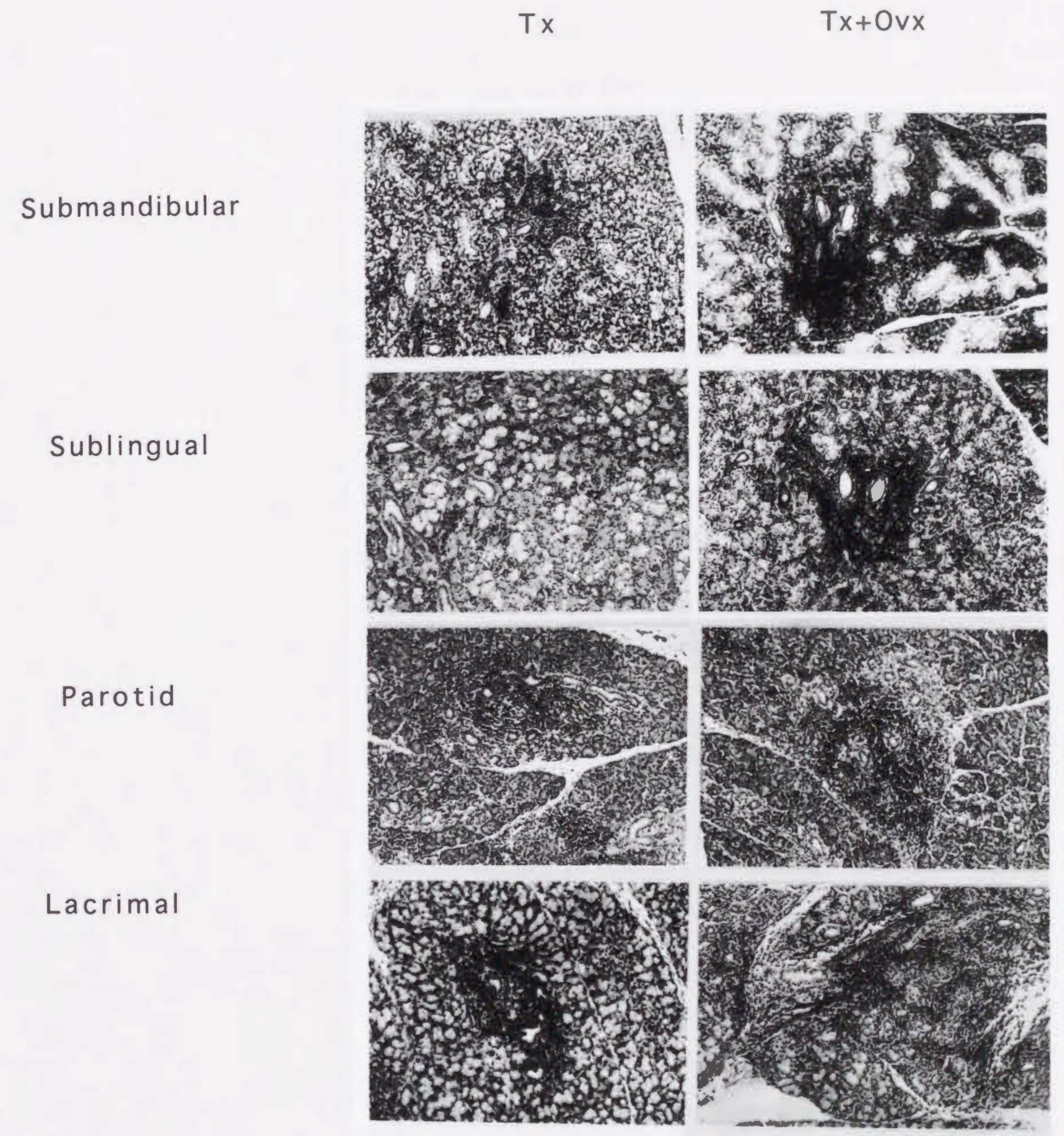


图 2

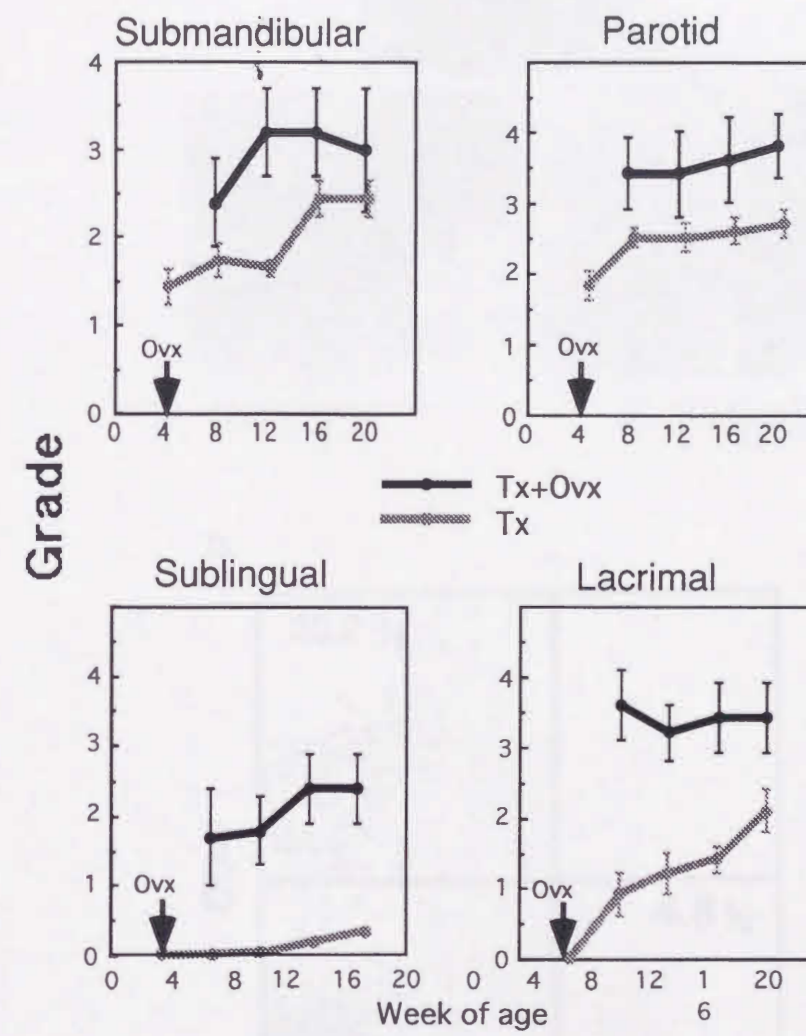
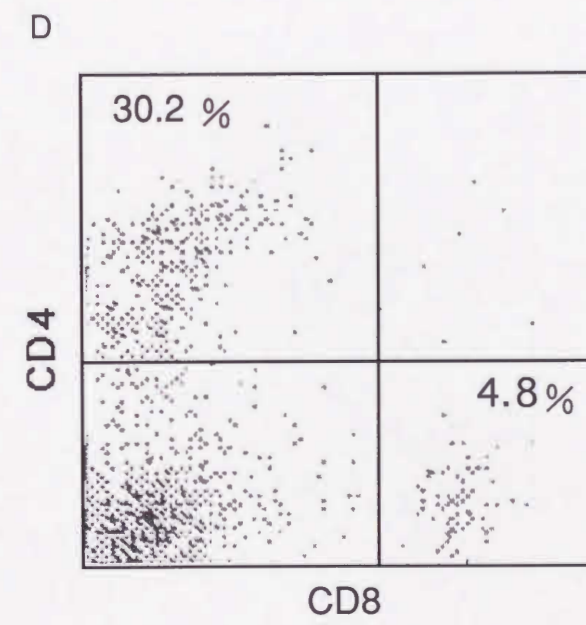
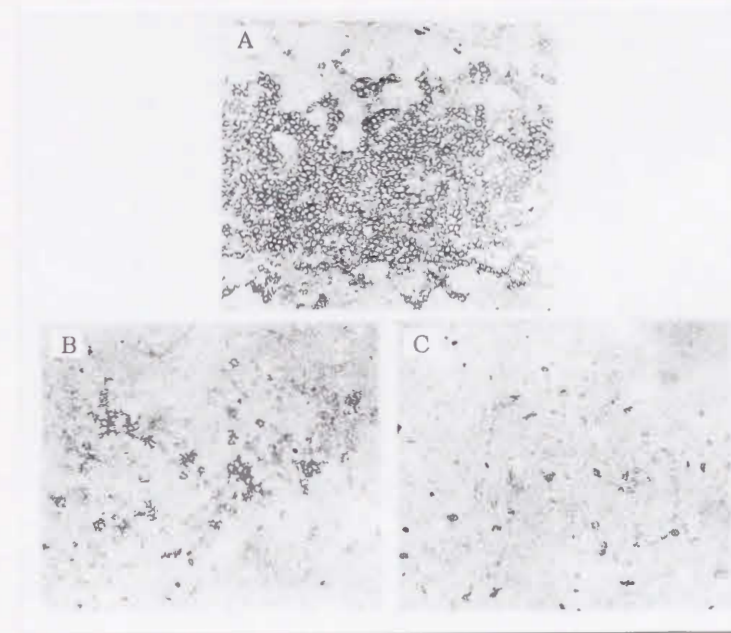


图 3



☒ 4

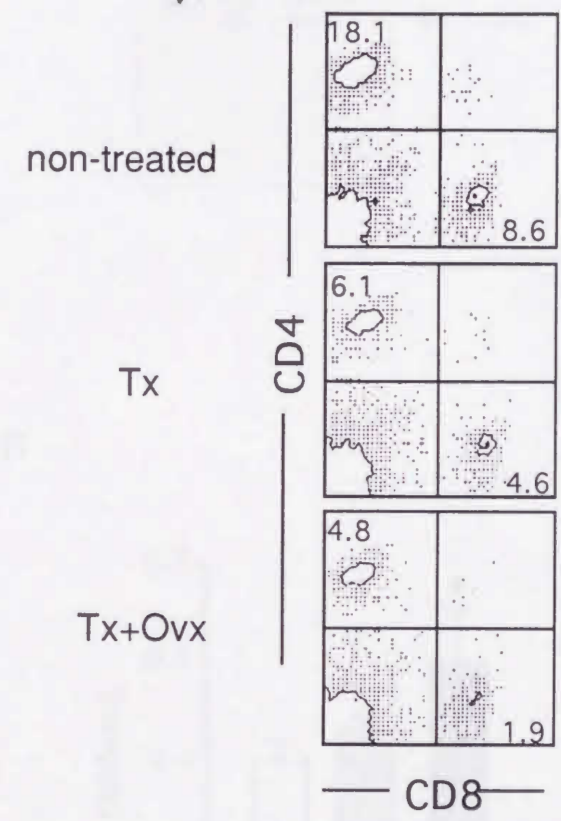
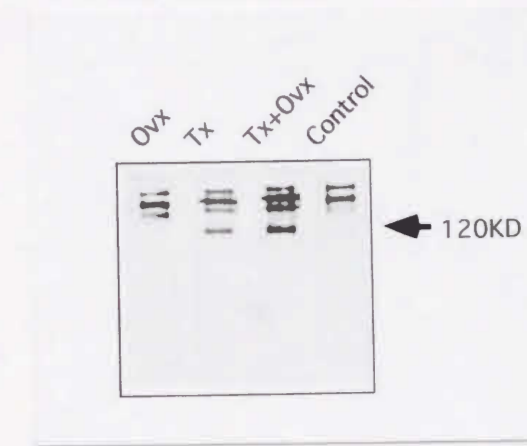


图 5

A



B

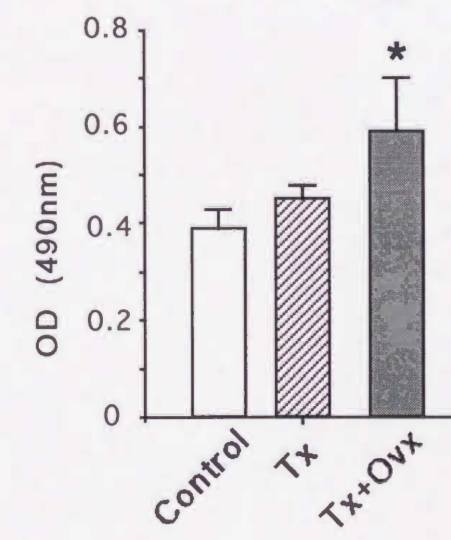


图 6

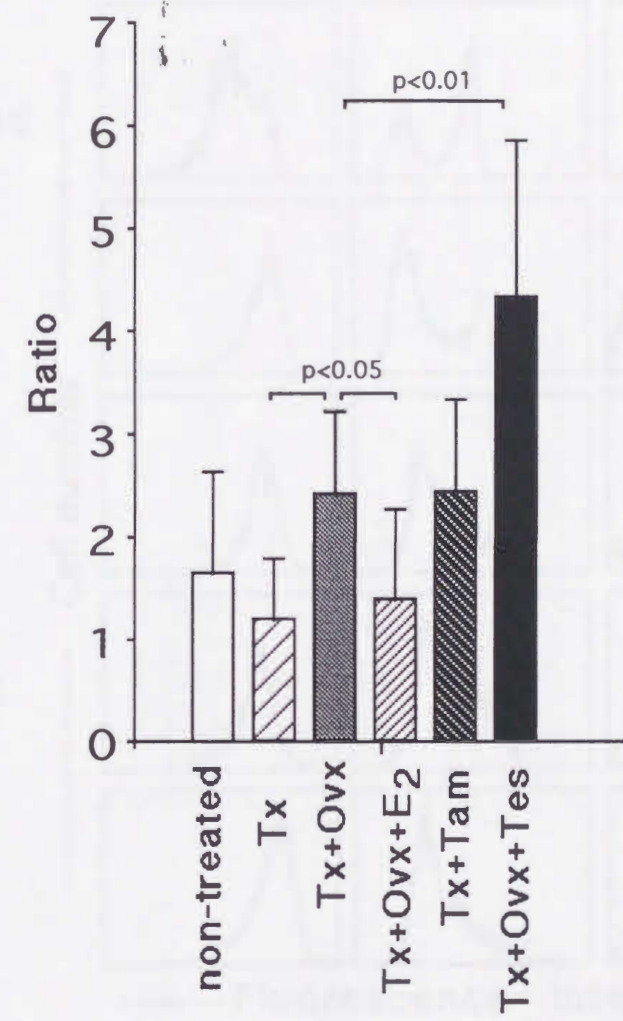


图 7

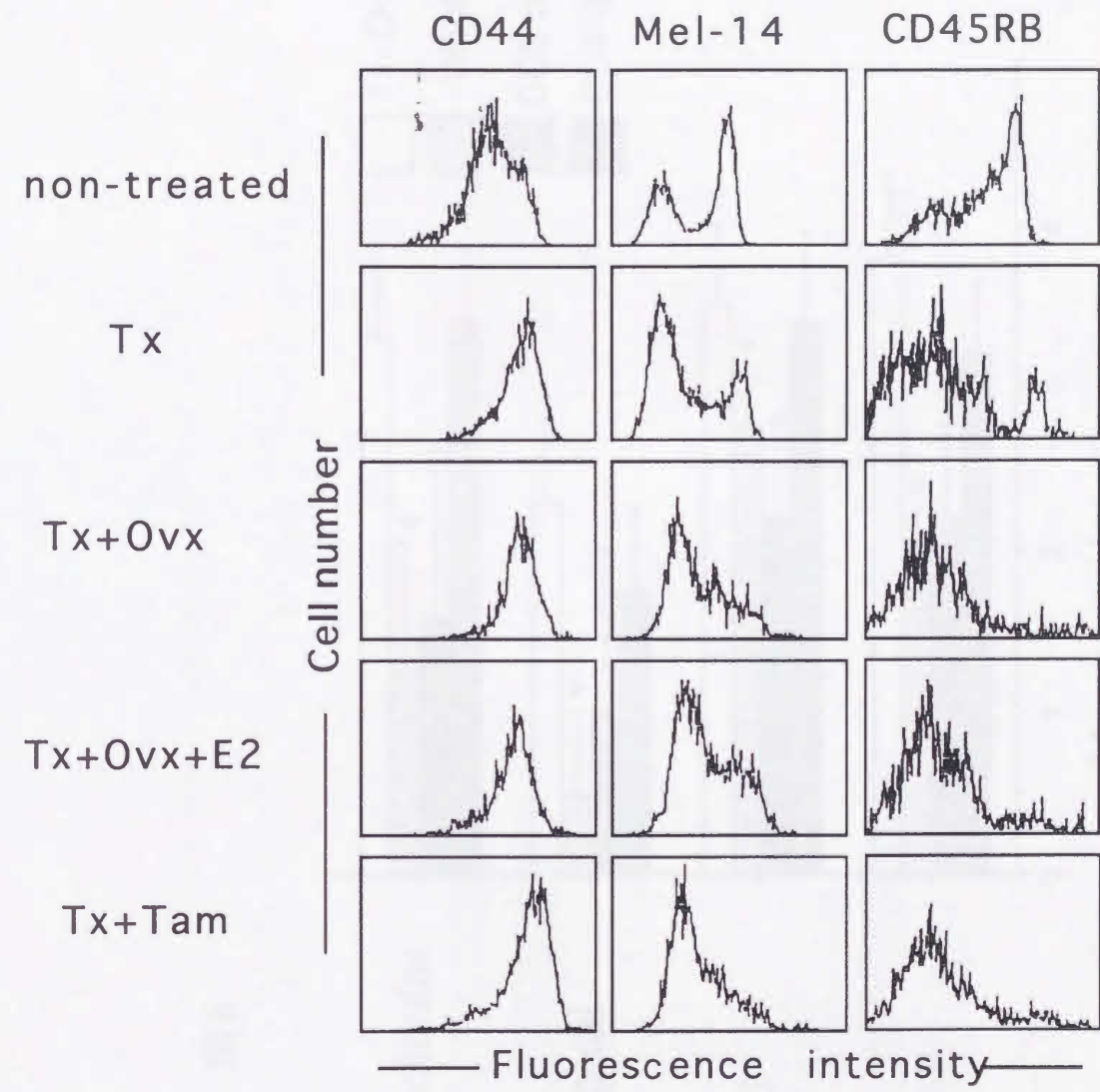




Fig 8

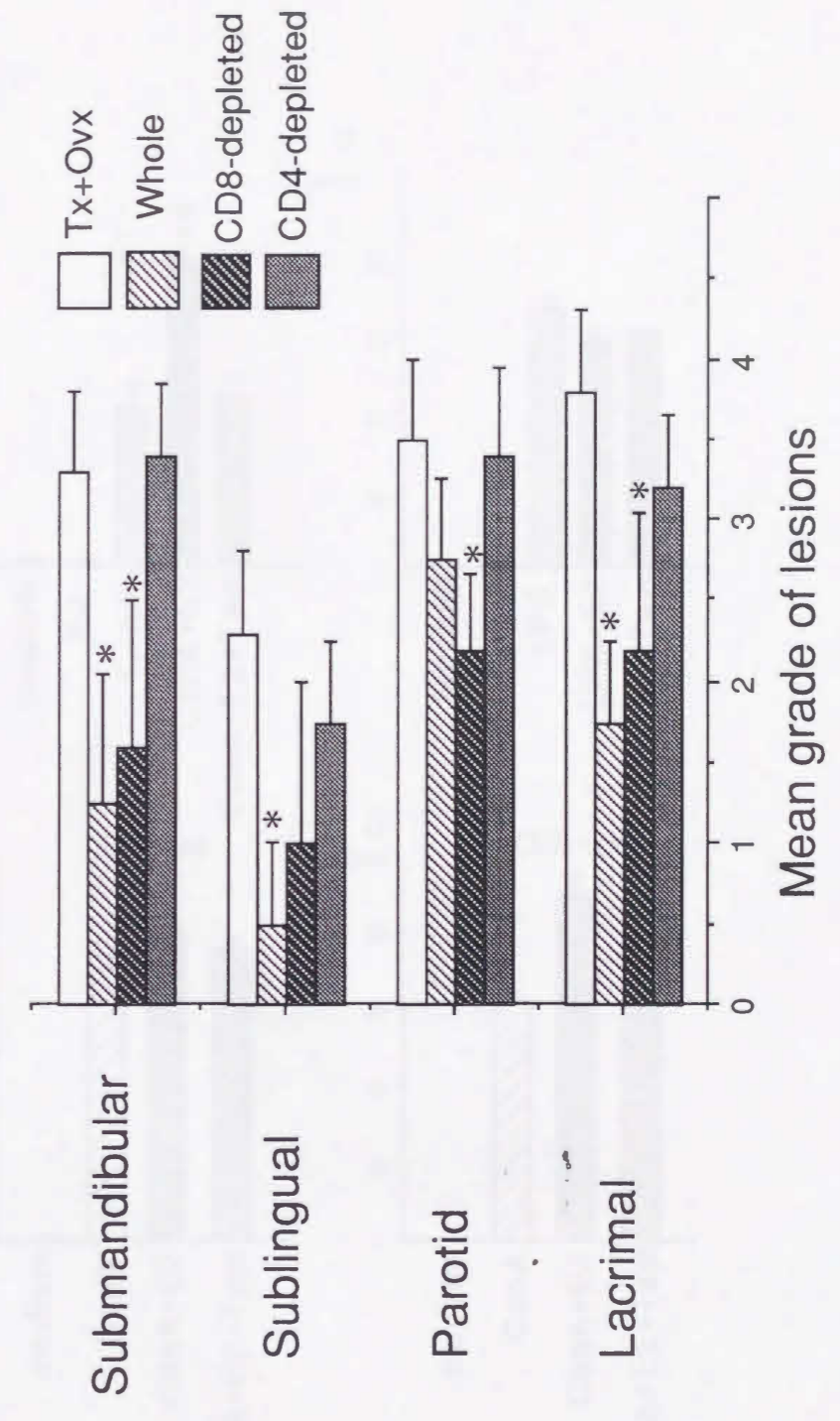
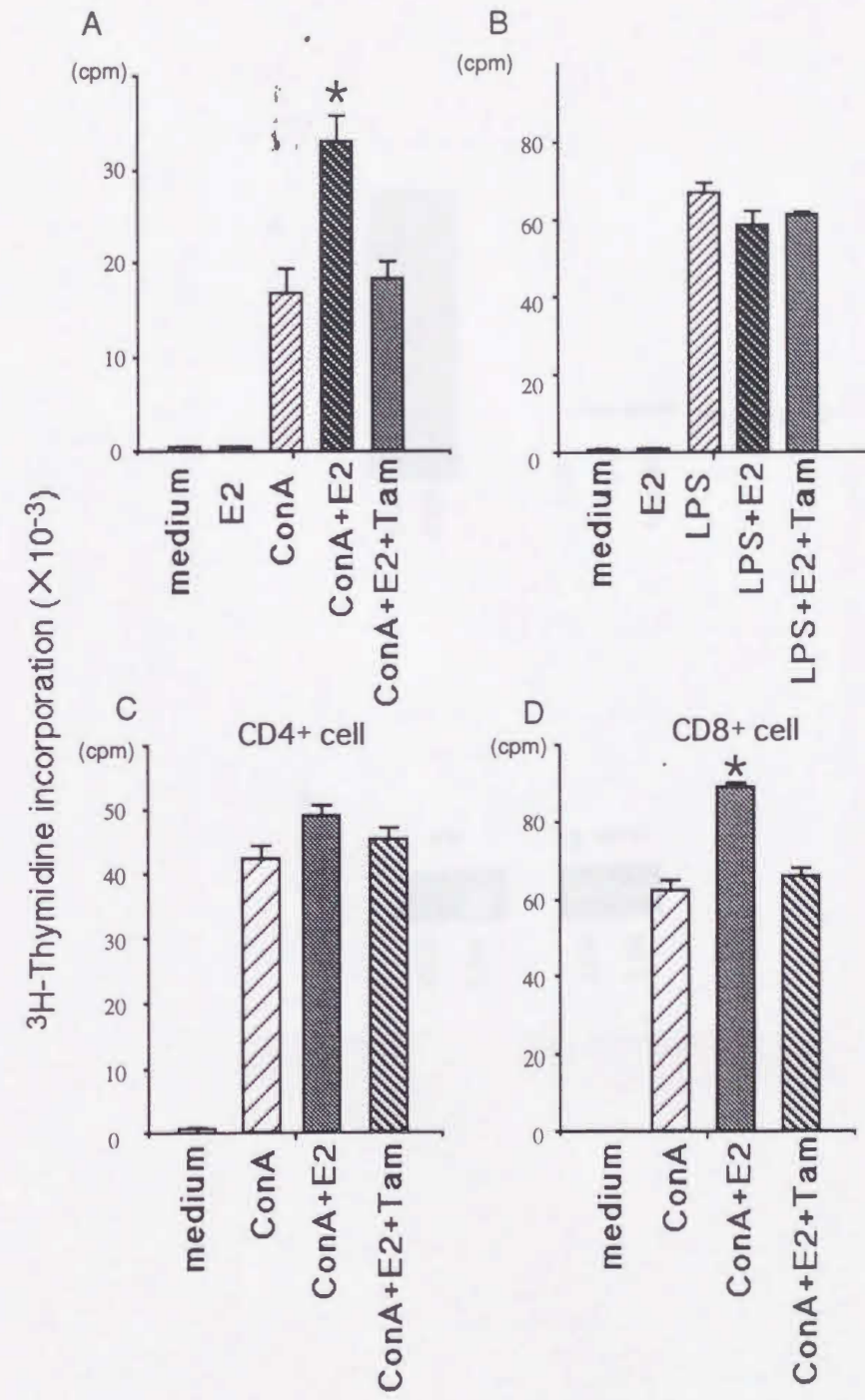


图9



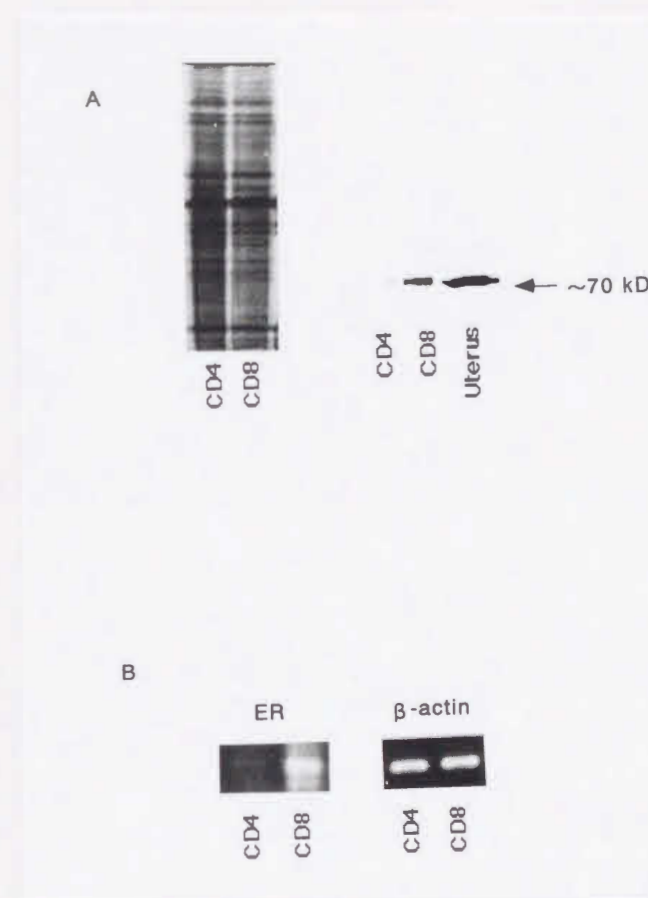


图11

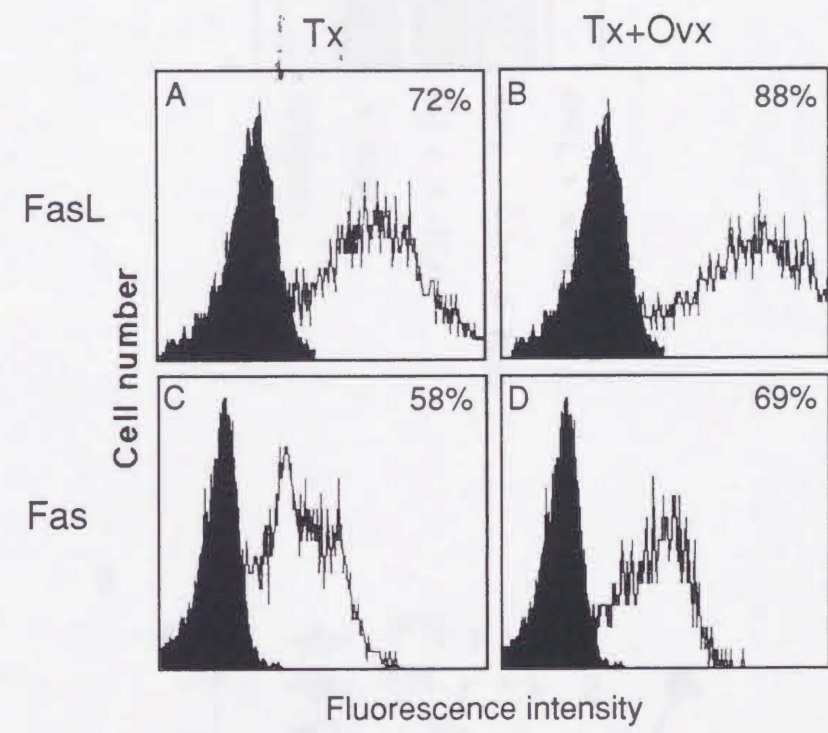


图12

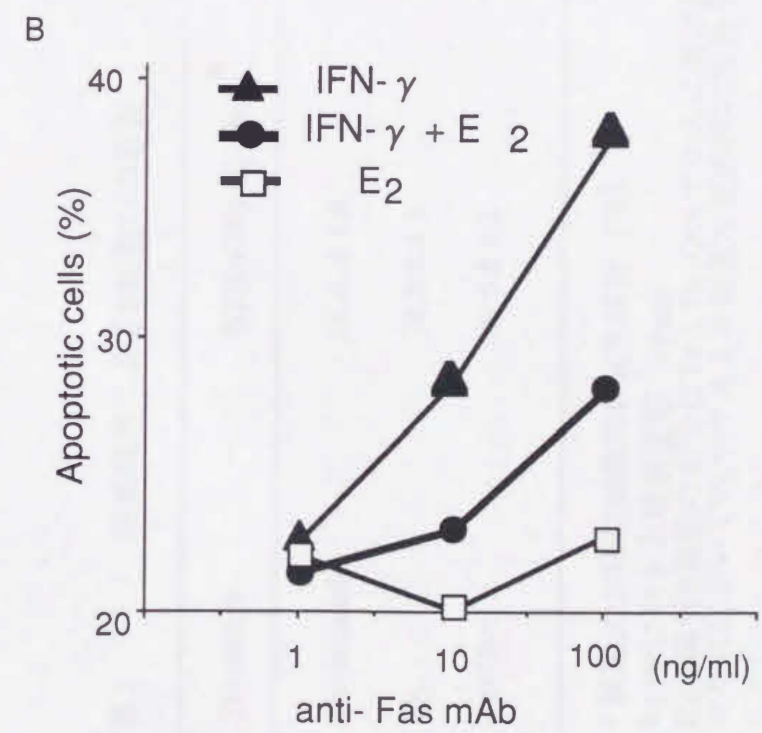
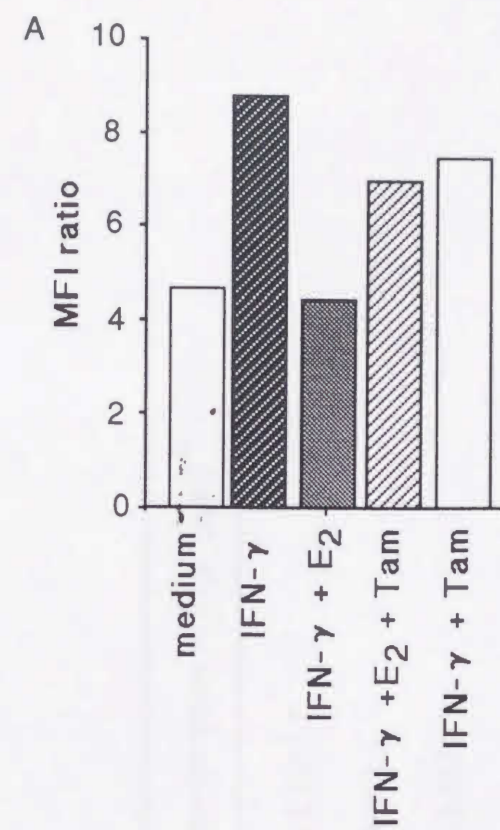


表 1 卵巣摘出によるB細胞への影響

Treatment	B220+Thy1.2- (%) ^a	Proliferative response to LPS (cpm) ^b
non-treated	66.4 ± 3.4	20,289.4 ± 1232.2
Tx	78.8 ± 4.3	6,896.4 ± 567.3
Tx+Ovx	80.5 ± 6.2	12,786.5 ± 567.8*

^a 脾臓B220陽性細胞のFACS解析 (%)

^b LPSに対する増殖反応 (cpm)




B220陽性B細胞の割合はTxとTx+Ovxマウスに差は認められない。LPSに対する増殖反応はTx+OvxマウスにおいてTxマウスより有意な反応性の増強を示す。(p<0.05: Mann-Whitney U-test)

表2 性ホルモンの自己免疫病変への影響

Treatment	Submandibular	Sublingual	Parotid	Lacrimal
Tx (n=18)	2.21±0.19	0	2.50±0.14	0.86±0.25
Tx+Ovx (n=6)	3.20±0.45	1.75±0.50	3.40±0.55	3.20±0.45
Tx+Ovx+E2 (n=5)	1.20±0.40*	0.60±0.80*	2.00±0.63*	1.40±1.02*
Tx+Tam (n=5)	1.40±0.49	1.60±1.02	2.40±1.02	3.40±0.49
Tx+Ovx+Tes (n=5)	1.80±0.40	0.40±0.49	3.80±0.40	3.60±0.80

4週齢Tx+Ovxマウスにエストロジェン(Tx+Ovx+E2)、テストステロン(Tx+Ovx+Tes)を、Txマウスにタモキシフェン(Tx+Tam)を4週間投与し、8週齢にて屠殺し各臓器の組織学的index(平均±SD)にて自己免疫病変を評価した。エストロジェン投与により自己免疫病変は有意な回復効果が認められる。(p<0.05: Mann-Whitney U-test)



報告番号	① 乙	歯第 121 号	氏名	石丸 直澄
審査委員	主査 林 良夫  副査 佐藤 光信  副査 三宅 洋一郎 			

題 目

シェーグレン症候群疾患モデルマウスにおけるエストロジェンの役割

要 旨

シェーグレン症候群は慢性唾液腺炎・涙腺炎など外分泌障害をきたす原因不明の自己免疫疾患であり中年以降の女性に特に好発することが知られているが、性差のメカニズムに関しては全く不明である。シェーグレン症候群疾患モデルNFS/sldマウスにおいても雌優位に自己免疫性唾液腺炎・涙腺炎を発症することから、本研究は本モデルマウスを用いて自己免疫病変発症におけるエストロジェンの役割を詳細に解析したものである。

卵巣摘出を施した疾患モデルNFS/sldマウスにおいて、自己免疫病変はさらに増悪することが判明し、その病変局所においてCD4陽性T細胞の浸潤が主体を成していた。エストロジェン欠乏状態における全身の免疫系への変化として、T細胞系では脾細胞中のCD8陽性T細胞の有意な低下が認められ、B細胞系では唾液腺特異的な自己抗原 (α -fodrin) に対する自己抗体の産生が亢進していた。また、卵巣摘出で増悪した自己免疫病変はエストロジェン投与により回復し、エストロジェンが自己反応性T細胞の活性化を抑制する作用のあることが判明した。そのメカニズムの一つとして、エストロジェンレセプターを介したCD8陽性T細胞のサプレッサー機能をエストロジェンが制御している可能性が示唆された。さらに、細胞移入によりCD4陽性T細胞が直接病態形成を調節することが判明した。一方、標的臓器である唾液腺の組織破壊のメカニズムにFas/Fasリガンドを介したアポトーシスが関与し、エストロジェンは唾液腺細胞のFas発現および浸潤リンパ球のFasリガンド発現の両者に影響を与えている可能性が示唆された。

NFS/sldマウスの病態形成におけるエストロジェンの役割の解析を中心としたこれらの研究成果は、ヒト・シェーグレン症候群の性差の解明、病因に基づいた治療法の確立、ならびに歯科医学の発展に貢献するところが大きく、本論文は博士(歯学)の学位授与に値するものと判定した。