

---

## 学位論文 (Thesis)

---

### シェーグレン症候群の病態形成におけるアロマターゼの影響

岩浅 亮彦

キーワード：シェーグレン症候群，アロマターゼ，エストロゲン，自己免疫疾患

#### 緒 言

自己免疫疾患の多くは多因子疾患であり，様々な発症要因が複雑に関与していることから，必ずしも疾患特異的ではない診断，および対症療法による治療が行われているのが現状であり，本疾患の病態の解明ならびに根治的治療法の開発が重大な研究課題である。それらの自己免疫疾患の大半が，女性優位に発症することが知られている<sup>1)</sup>。外分泌腺である涙腺，唾液腺を標的とするシェーグレン症候群 (Sjögren's syndrome: SS) も，その罹患患者のうち95%以上が女性であるといわれ，特に閉経期以降の女性に好発する自己免疫疾患である<sup>2,3)</sup>。その主症状はドライアイやドライマウスであり，さらに口腔内の乾燥に伴う舌乳頭の萎縮や，齶蝕の多発，味覚異常，摂食嚥下障害など，多くの口腔症状を引き起こし，患者のクオリティーオブライフを低下させる<sup>4,5)</sup>。従来，閉経期前後におけるエストロゲン産生量の変化が免疫システムの維持に影響を与え，自己免疫疾患の発症に関与しているものと考えられてきたが，特定の臓器が自己免疫反応の標的となる詳細な分子メカニズムについては不明である<sup>6,8)</sup>。

これまでに SS の疾患モデルマウスにおいて，卵巣摘出によるエストロゲン欠乏状態が免疫細胞の機能障害をもたらすと同時に，標的臓器である唾液腺に Fas 依存的アポトーシスの亢進を誘導することにより，唾液腺における自己免疫病態の増悪をもたらすことが報告されている<sup>9)</sup>。また，正常 C57BL/6 マウスにおいて卵巣摘出術を施すと，摘出後2,3週間に限り，SSの標的臓器である唾液腺細胞にアポトーシスが誘導され，SSの自己抗原の一つとして知られている  $\alpha$ -fodrin の分断化が一過性に観察されることなどが明らかにされている<sup>10)</sup>。さらに，自己免疫疾患の多くが閉経期前後の女性を中心に発症することから抗エストロゲン作用により誘導される遺伝子の同定が進められ，シェーグレン症候群の標

的上皮細胞にエストロゲン欠乏によって発現が誘導される遺伝子として細胞周期関連因子である Retinoblastoma-associated protein 48 (RbAp48) 遺伝子が報告されている<sup>11)</sup>。RbAp48 タンパクは癌抑制遺伝子産物として知られている Rb タンパクと複合体を形成する核タンパクとして，そのヒト型遺伝子が1993年にクローニングされた<sup>12)</sup>。その機能としては，ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 複合体の構成成分の一つとして細胞の分化増殖の調節など様々な遺伝子の転写調節に関与するとの報告があるが，詳細については不明な点が多い<sup>13,14)</sup>。In vitro の培養ヒト唾液腺細胞を用いた系で RNA 干渉法により RbAp48 を抑制するとアポトーシス能が低下し，さらに，RbAp48 遺伝子トランスジェニックマウスにて涙腺，唾液腺に限局する自己免疫性病変が観察されることが報告されている<sup>15)</sup>。

アロマターゼは，エストロゲンを合成するために必要なステロイド代謝酵素であり，ヒトにおいては，生殖器や，脳，脂肪組織，骨などに広く局在しており，多様な生理機能に関わっている<sup>16,18)</sup>。アロマターゼ遺伝子が欠損した aromatase knockout (ArKO) マウスは，ヒトでのエストロゲン産生能の低下した状態が再現されており，エストロゲンが免疫システムに及ぼす影響を理解するための有用な動物モデルとして知られている<sup>19)</sup>。Shim らは，ArKO マウスにおいて B 細胞の分化促進あるいは活性化亢進による自己抗体の産生を介した自己免疫反応により，SS 様の炎症性病変が唾液腺に認められることを報告している<sup>20)</sup>。しかしながら，アロマターゼ欠損によるエストロゲン欠乏状態が，SS の標的臓器である涙腺，唾液腺に自己免疫性の病態を引き起こす詳細な分子メカニズムについては不明なままである。そこで，本研究では，エストロゲン産生に異常をきたす ArKO マウスを用い，エストロゲン産生異常が自己免疫病変へ及ぼす影響について検討を行った。

## 材料ならびに方法

### 1. 動物

ArKO マウスは藤田保健衛生大学医学部生化学講座（豊明，愛知）および理研バイオリソースセンター（つくば，茨城）より提供された。C57BL/6（以下，WT と略す）マウスは日本エスエルシー（浜松，静岡）より購入した。SS の疾患モデルのために NFS/N (NFS/*sld*) マウス<sup>21,22)</sup> の生後3日目に胸腺摘出術（以下，Tx と略す）を行った。Tx を行った NFS/*sld* マウスに，生後4週齢から4週間1日1回アロマトラーゼインヒビター (AI) である exemestane (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を0.5% carboxymethylcellulose (CMC) (和光純薬工業，大阪) で50 µg/200 µl になるよう濃度調整して腹腔内投与した。マウスに放射線滅菌飼料 CL-2 (日本クレア社，東京)，滅菌水を常時与え，徳島大学歯学部動物実験施設にて specific pathogen-free (SPF) 下で繁盛飼育した。すべての動物実験に関して，徳島大学動物実験委員会（承認番号：toku12034）および遺伝子組み換え実験安全管理委員会（承認番号：第25-112号）の承認を得て実施された。

### 2. 病理組織学的解析

ArKO マウス，WT マウス，NFS/*sld* マウスをジエチルエーテルによる安楽死後，全身臓器を採取した。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 µm の組織切片を作製し，ヘマトキシリン・エオジン染色（以下 HE 染色と略す）を施した。各臓器における炎症性病変の有無を評価した。組織像は×100倍で示す。組織評価方法としては，Kohashi らの方法<sup>23)</sup> に準じて，Slight；炎症病変を認めないもの，Moderate；リンパ球数が20個以上のリンパ球浸潤が1～5カ所認められるもの，Severe；リンパ球数が20個以上のリンパ球浸潤が5カ所以上あり，実質組織の破壊を認めるものとして病理評価を行った。

### 3. 蛍光免疫染色法

ArKO マウスの唾液腺凍結薄切切片を冷アセトンで固定し，10%ヤギ血清によるブロッキング後，FITC 標識抗マウス CD4 抗体 (eBioscience, San Diego, CA, USA) およびビオチン標識抗 B220 抗体 (eBioscience) と反応させ，その後それぞれを Alexa488 標識抗 FITC 抗体 (緑色) (eBioscience)，Alexa546 標識 Streptavidin (赤色) (eBioscience) で染色した。また，青色で示される核は 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Molecular Probe Inc., Eugene, OR, USA) で染色した。撮影には LSM 5 PASCAL Confocal Laser-scanning microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) を使用した。

### 4. フローサイトメトリー解析

胸腺，リンパ節あるいは脾臓をホモジナイズして得られた浮遊細胞を 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.6, phosphate

buffered saline) で洗浄後， $1 \times 10^6$  細胞に調整し，以下に示す各種モノクローナル抗体にて染色後，細胞自動解析装置（フローサイトメーター）(BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) を用いて解析した。

- ・ Phycoerythrin (PE)-Cy7 標識抗マウス CD4 モノクローナル抗体 (eBioscience)
- ・ Fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗マウス CD8 モノクローナル抗体 (eBioscience)
- ・ Allophycocyanin (APC) 標識抗マウス CD25 モノクローナル抗体 (eBioscience)
- ・ PE-Cy5.5 標識抗マウス CD44 モノクローナル抗体 (eBioscience)
- ・ APC-Cy7 標識抗マウス CD62L モノクローナル抗体 (eBioscience)
- ・ PE-Cy5.5 標識抗マウス F4/80 モノクローナル抗体 (eBioscience)
- ・ APC 標識抗マウス CD11c モノクローナル抗体 (eBioscience)

### 5. 定量 Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法

ArKO マウス，WT マウスおよび Tx-NFS/*sld* マウスから回収した涙腺，唾液腺，胸腺，脾臓を TRIZOL reagent (Gibco BRL, Rockville, MD, USA) を用いて，添付プロトコールに従い全 RNA を抽出した。PrimeScript RT reagent Kit (Takara Bio, 滋賀) を用いた逆転写反応によって cDNA を生成した。それぞれの反応物は以下に示すプライマーを用いて増幅した。

- ・ RbAp48, forward, 5'-TATGGAAGAAGAACCACCCT-3', and reverse, 5'-GCAGATGGTATGCTCACTCG-3'
- ・ Major histocompatibility complex (MHC) class II transactivator (CIITA), forward, 5'-CAGATACCATCAAC TGCGACCA-3', and reverse, 5'-TCTGCTCCAATGTGCT CTATGAAG-3'
- ・ Interferon regulatory factor 1 (IRF-1), forward, 5'-AACTC CAGCACTGTCAACCGTG-3', and reverse, 5'-GAGTTGCC CAGCAGGCTGTCC-3'
- ・ IFN- $\gamma$ , forward, 5'-AGCGGCTGACTGAACTCAGATTGT AG-3', and reverse, 5'-GTCACAGTTTTTCAGCTGTATAG GG-3'
- ・ IL-18, forward, 5'-GTGACCCTCTCTGTGAAGGATA-3' and reverse, 5'-TGTGTCCTGGAACACGTTTC-3'
- ・ IL-2, forward, 5'-CCTGAGCAGGATGGAGAATTACA-3', and reverse, 5'-TCCAGAACATGCCGCAGAG-3'
- ・ IL-4, forward, 5'-TCTCATGGAGCTGCAGAGACTCT-3', and reverse, 5'-TCCAGGAAGTCTTTCAGTGATGTG-3'
- ・ IL-17, forward, 5'-CTCCAGAAGGCCCTCAGACTAC-3', and reverse, 5'-AGCTTCCCTCCGCATTGACACAG-3'
- ・ T-bet, forward, 5'-CCAGAGCGGCAAGTGGG-3', and reverse, 5'-CATATAAGCGTTCCCTGGC-3'

- ・ GATA binding protein 3 (GATA-3), forward, 5'-CCTACCGGGTTTCGGATGTAA-3', and reverse, 5'-CACACACTCCCTGCCTTCTGT-3'
- ・ RAR-related orphan receptor gamma (ROR $\gamma$ T), forward, 5'-GCCTACAATGCCAACCAACCCACACA-3', and reverse, 5'-ATTGATGAGAACCAGGGCCGTGTA-3'
- ・ Forkhead box P3 (Foxp3), forward, 5'-CCCAGGAAAGACAGCAACCTT-3', and reverse, 5'-TTCTACAACCAGGCCACTC-3'
- ・  $\beta$ -actin, forward, 5'-GTGGGCCGCTCTAGGCACCA-3', and reverse, 5'-CGGTTGGCCTTAGGGTTCAGGGG-3'

## 6. 免疫染色

ArKO マウスおよび WT マウスの唾液腺のホルマリン固定パラフィン薄切切片を 10 mM クエン酸緩衝液 (pH 6.0) による抗原賦活化処理, 過酸化水素水による内在性ペルオキシダーゼ枯渇化および Blocking One Histo (ナカライテスク株式会社, 京都) によるブロッキング後, 抗マウス F4/80 抗体 (eBioscience) と反応させた。二次抗体として ImmPress™ ペルオキシダーゼ標識抗ラットイムノグロブリン (VECTOR Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) を使用し, ImmPACT™ VIP (VECTOR Laboratories Inc.) 基質を用いて発色させた。対比染色にはヘマトキシリンを使用した。

## 結 果

### 1. ArKO マウスにおける病理組織学的解析

3~6, 6~12, 12~18 か月齢の ArKO マウスと WT マウスの解剖を行い, HE 染色にて, 涙腺および唾液腺における病理組織学的検討を行ったところ, 3~6 か月齢の ArKO マウスでは涙腺, 唾液腺のいずれにも炎症病変は目立たなかったが, 12~18 か月の ArKO マウスでは涙腺, 唾液腺の両方で SS 様の広範なリンパ球浸潤と腺房細胞の破壊を認めた (図 1 A)。これらの涙腺, 唾液腺における炎症性病変の加齢変化を, Kohashi らの方法<sup>23)</sup> に準じて, 病理組織の炎症病変の評価を行うと, 3~6 か月齢では B6 マウス, ArKO マウスともに強い炎症性病変は観察されず, 6~12 か月齢, 12~18 か月齢の ArKO マウスの涙腺, 唾液腺では病理スコアは WT マウスと比べて, 増悪することが判明した (図 1 B)。さらに, 18 か月齢の ArKO マウス唾液腺凍結切片において, 病変部での導管周囲に浸潤しているリンパ球について検討したところ, CD4 陽性 T 細胞が主体であり, B220 陽性 B 細胞も浸潤していることが分かった (図 2)。

### 2. ArKO マウスの各臓器における T 細胞の動態

18 か月齢の ArKO マウスと WT マウスの胸腺, 脾臓, 頸部リンパ節におけるリンパ球を各種モノクローナル抗体にて染色し, フローサイトメーターにて, 各臓器に

おける T 細胞の動態について検討を行った。胸腺細胞のリンパ球分画を CD4 と CD8 で展開して, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>, CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> の各分画の割合を ArKO マウスと WT マウスで比較したところ, 両者間で大きな違いは認められなかった (図 3 A)。また, 脾細胞と頸部リンパ節細胞のリンパ球分画を CD4 と CD8 で展開したところ, ArKO マウスと WT マウスの CD4<sup>+</sup>T 細胞と CD8<sup>+</sup>T 細胞の割合に大きな違いはなかった (図 3 B)。さらに, 脾細胞と頸部リンパ節細胞の CD4<sup>+</sup>T 細胞にゲートをかけて, CD44 と CD62L で展開し, 活性化されたメモリー型の CD4<sup>+</sup>T 細胞の割合について比較検討を行ったところ, 脾臓と頸部リンパ節での活性化された CD44<sup>hi</sup>CD62L<sup>low</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞の割合に, ArKO マウスと WT マウスではほとんど違いは見られなかった (図 3 C)。

### 3. ArKO マウスの胸腺, 脾臓における T 細胞分化に関連する転写因子の mRNA 発現の検討

アロマターゼの欠損が中枢および末梢免疫組織での T 細胞の分化に及ぼす影響を検討するために, 18 か月齢の ArKO マウスと WT マウスの胸腺および脾臓の組織を回収し, Th1 細胞の分化に重要である転写因子 T-bet, Th2 細胞の分化に重要な転写因子である GATA-3, Th17 細胞の分化に重要な転写因子である ROR $\gamma$ T, 制御性 T 細胞 (Treg) の機能に重要な転写因子である Foxp3 の mRNA 発現について定量 RT-PCR 法にて検討したところ, 脾臓の T-bet の mRNA 発現が WT に比べて有意に上昇していた。その他の因子に関して, 胸腺, 脾臓ともにいずれの転写因子の発現量も WT マウスと ArKO マウスで有意な差は認めなかった (図 4)。したがって, アロマターゼの欠損は末梢組織における Th1 細胞への分化を促進している可能性が示された。

### 4. ArKO マウスの涙腺, 唾液腺におけるアポトーシス関連遺伝子の mRNA 発現の検討

アロマターゼ欠損が, SS の標的臓器である涙腺, 唾液腺に及ぼす影響を検討するため, 両臓器での細胞周期関連遺伝子及び免疫関連遺伝子の発現を検討した。RbAp48, CIITA, IRF-1 の遺伝子発現量を定量 RT-PCR を用いて測定を行ったところ, RbAp48 の mRNA 量は涙腺, 唾液腺ともに ArKO マウスで WT マウスに比較して有意に上昇していた (図 5 A)。さらに, MHC class II の転写活性化因子である CIITA の遺伝子発現量は, 涙腺では有意差は認めなかったが, 唾液腺において ArKO マウスで WT マウスに比較して有意に上昇していた (図 5 B)。また, IRF-1 の mRNA 発現量については, 涙腺, 唾液腺ともに ArKO マウスと WT マウスで有意な差は認めなかった (図 5 C)。これらの結果から, アロマターゼ欠損によるエストロゲンの産生異常が, SS の標的臓器である涙腺, 唾液腺での RbAp48 の発現に影響を及ぼ

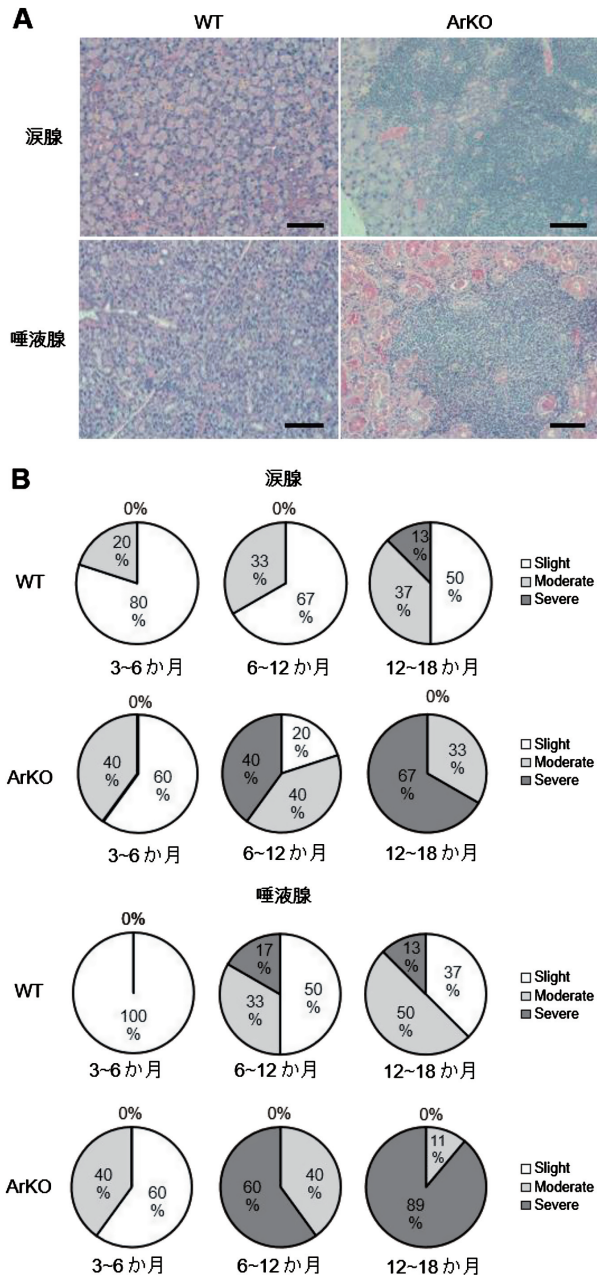


図1 ArKOマウスの涙腺・唾液腺における自己免疫病変 (A) 18か月齢WTマウスおよびArKOマウスの涙腺・唾液腺のHE染色像を示す。(Scale bars = 100  $\mu$ m) (B) WTマウスおよびArKOマウスの3~6か月齢 (n=5), 6~12か月齢 (n=5), 12~18か月齢 (WT n=8, ArKO n=9) における涙腺・唾液腺のHE染色を行い、病理組織評価を行った結果を示す。

すことが示唆され、これまでの卵巣摘出マウスの唾液腺で見られたRbAp48の高発現と合致する結果が得られたといえる。

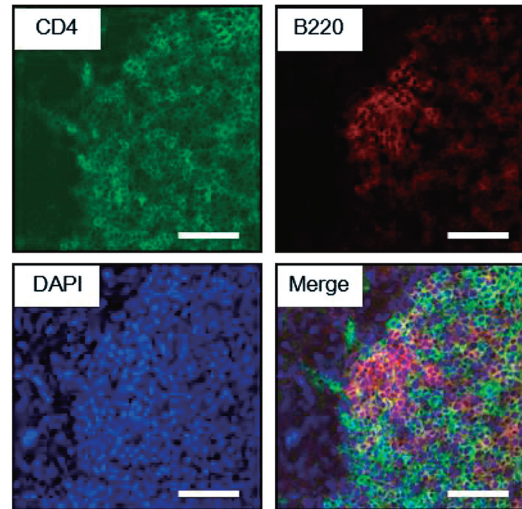


図2 ArKOマウスの唾液腺病変部における浸潤リンパ球 18か月齢のArKOマウス唾液腺凍結切片を作製し、蛍光免疫染色を行い、病変部での導管周囲に浸潤しているリンパ球について解析を行った。左上の緑色 (Alexa488) がCD4, 右上の赤色 (Alexa546) がB220, 左下の青色 (DAPI) が核, 右下がそれぞれを重ね合わせたものを示す。写真は5匹のArKOマウス唾液腺の代表的な結果を示す。(Scale bars = 50  $\mu$ m)

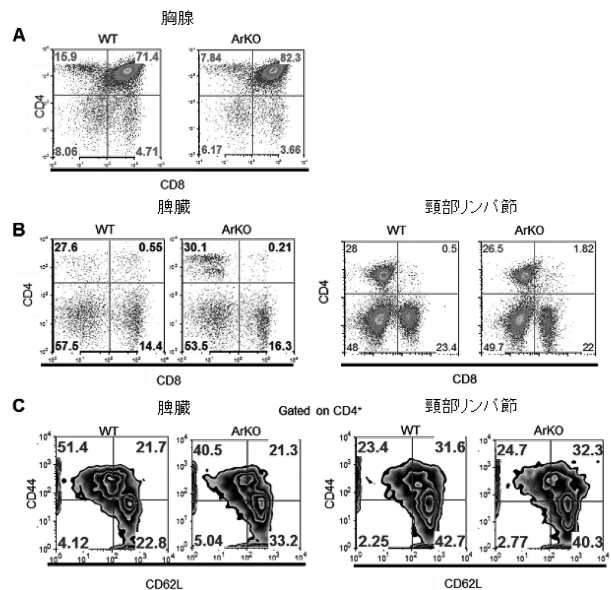


図3 ArKOマウスの各臓器におけるT細胞の動態 WTマウスおよびArKOマウスの臓器におけるT細胞マーカーについて、フローサイトメーターにて解析した結果を示す。 (A) 胸腺細胞をCD4とCD8で展開。 (B) 脾細胞と頸部リンパ節細胞をCD4とCD8で展開。 (C) 脾細胞と頸部リンパ節細胞のCD4<sup>+</sup>細胞をCD44とCD62Lで展開。それぞれの結果は各群 (n=5) の代表的なものを示す。

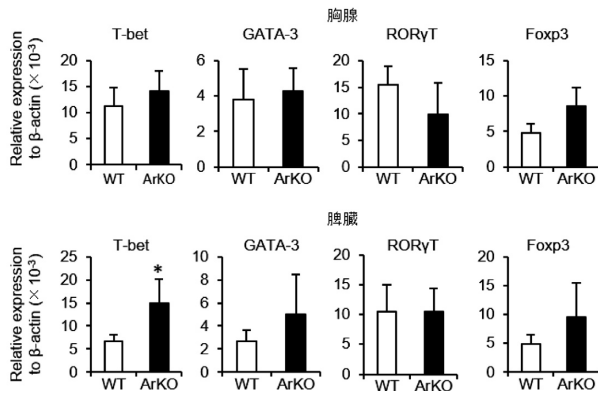


図4 ArKO マウス胸腺および脾臓における T 細胞分化に関連する転写因子の遺伝子発現解析  
WT マウスおよび ArKO マウスの胸腺, 脾臓における T 細胞分化に関連する転写因子である T-bet, GATA-3, RORγT, Foxp3 の mRNA 発現の結果を示す。各 mRNA 量は β-actin mRNA に対する相対的な値で表されている。結果は平均値(n=5) ± 標準偏差で示されている。(\*: P<0.05, Student's t-test)

### 5. ArKO マウスの各臓器におけるサイトカインの遺伝子発現の検討

次に, 定量 RT-PCR 法を用いて, ArKO マウスの唾液腺, 脾臓, 胸腺におけるサイトカインの mRNA の発現の検討を行った。炎症性サイトカインである IFN-γ の mRNA 発現は, WT マウスと比較して, ArKO マウスの唾液腺と脾臓で有意に上昇しており (図 6 A), 同じく炎症性サイトカインである Interleukin (IL)-18 の mRNA 発現は, ArKO マウス唾液腺において有意に上昇していた (図 6 B)。胸腺における IFN-γ, 脾臓及び胸腺における IL-18 の発現については両者で差は見られなかった (図 6 A, B)。以上のことから, ArKO マウスでみられる唾液腺での SS 様の炎症所見に IFN-γ や IL-18 といった炎症性サイトカインの発現上昇が関与していることが示唆された。また, 脾臓における IL-2, IL-4 あるいは IL-17 の mRNA 発現についても検討を行ったところ, いずれのサイトカインの遺伝子発現においても WT マウスと ArKO マウスで有意な差は認められなかった (図 6 C)。

### 6. AI 投与 SS モデルマウスにおける病理組織学的解析

次に, 生後 3 日目に Tx を施行した雌性 NFS/*sld* マウスを用いて, 4 週齢から AI を 4 週間腹腔内投与し, SS モデルマウスにおけるアロマターゼ阻害による影響について検討を行った。Tx 後 AI を投与した Tx+AI 群では Tx+CMC 群の炎症病変と比較して, 涙腺, 唾液腺に導管周囲への顕著なリンパ球浸潤と腺房細胞の破壊像を認めた (図 7 A)。さらに, ArKO マウスと同様に SS 様の

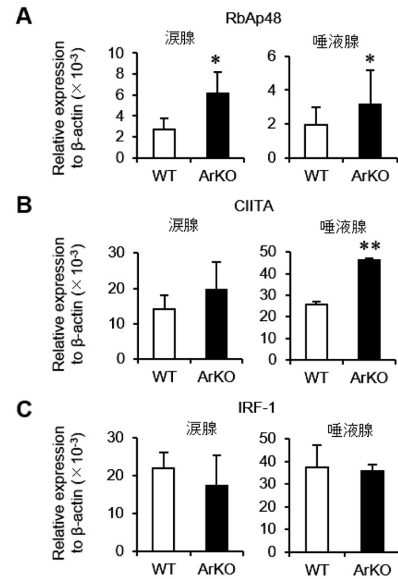


図5 ArKO マウス涙腺および唾液腺におけるアポトーシスおよび免疫関連因子の mRNA 発現の解析  
WT マウスおよび ArKO マウスの涙腺, 唾液腺における RbAp48, CIITA, IRF-1 の mRNA 発現を定量 RT-PCR 法にて解析した。各 mRNA 量は β-actin mRNA に対する相対的な値で表されている。結果は平均値(n=5) ± 標準偏差で示されている。(\*: P<0.05, \*\*: P<0.001, Student's t-test)

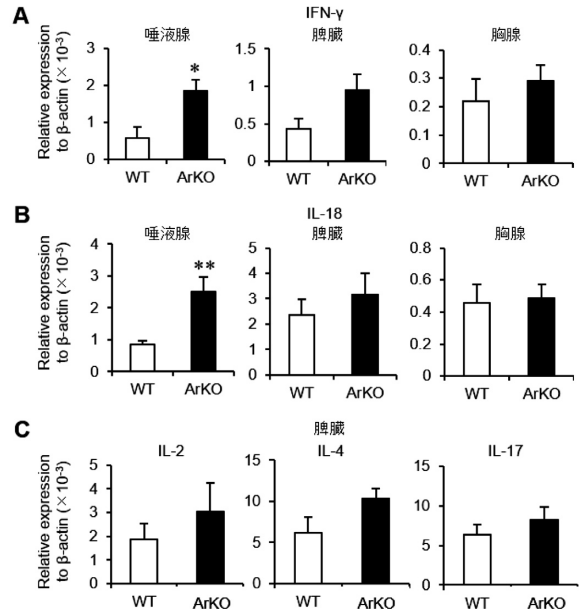


図6 ArKO マウスの各臓器における各種サイトカインの mRNA 発現の解析  
WT マウスおよび ArKO マウスの唾液腺, 脾臓および胸腺における IFN-γ, IL-18, IL-2, IL-4, IL-17 の mRNA 発現を, 定量 RT-PCR 法にて解析した。各 mRNA 量は β-actin mRNA に対する相対的な値で表されている。結果は平均値(n=5) ± 標準偏差で示されている。(\*: P<0.05, \*\*: P<0.001, Student's t-test)

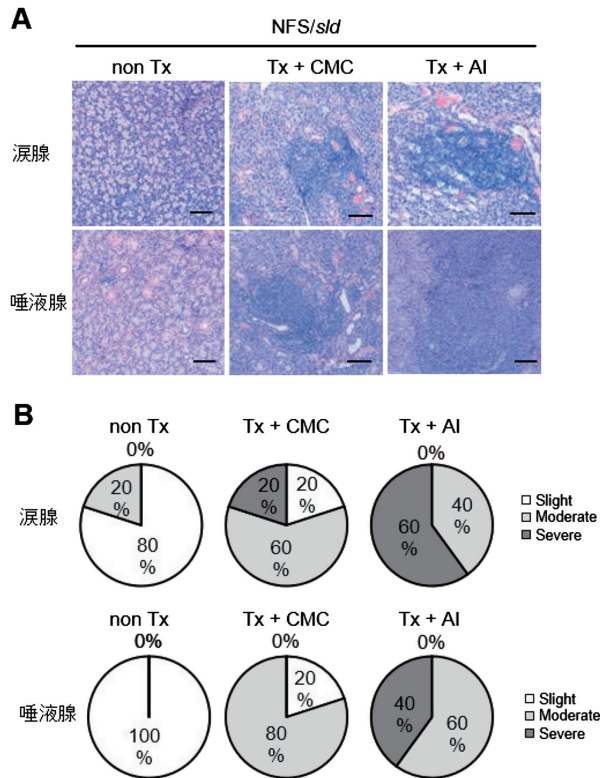


図7 AI投与SSモデルマウスの涙腺・唾液腺における自己免疫病変  
 (A) AI 4週間投与後のSSモデルマウスの涙腺・唾液腺のHE染色像を示す。(Scale bars = 100  $\mu$ m)  
 (B) AI 4週間投与後のSSモデルマウスにおける涙腺・唾液腺のHE染色を行い、病理組織評価を行った結果を示す。写真は各群 (n=5) の代表的な結果を示す。

炎症の程度を評価したところ、Tx+CMC群に対して、Tx+AI群で病理スコアが増悪する傾向を認めた(図7B)。この結果より、AI投与によるアロマトラーゼの障害が、SSモデルマウスにおける涙腺、唾液腺でのSSの病態を悪化させることが明らかになった。

#### 7. AI投与SSモデルマウスの脾臓におけるT細胞の解析

SSモデルマウスへのAI投与による脾臓でのT細胞の動態についてフローサイトメトリーにて検討を行った。脾臓のリンパ球分画をCD4とCD8で展開して、各群でのCD4陽性T細胞、CD8陽性T細胞を検討したところ、胸腺摘出にて減少したCD4陽性T細胞はAI投与により非摘出群と同等の割合になった(図8A)。CD8陽性T細胞の割合はAI投与によって変化は認めなかった(図8A)。さらに、CD4陽性T細胞をCD44とCD62Lで展開して、CD4陽性T細胞の活性化について検討したところ、Tx群にて増加したCD44<sup>high</sup>CD62L<sup>low</sup>CD4陽性T細胞の割合はAI投与によって著変は認められなかった(図

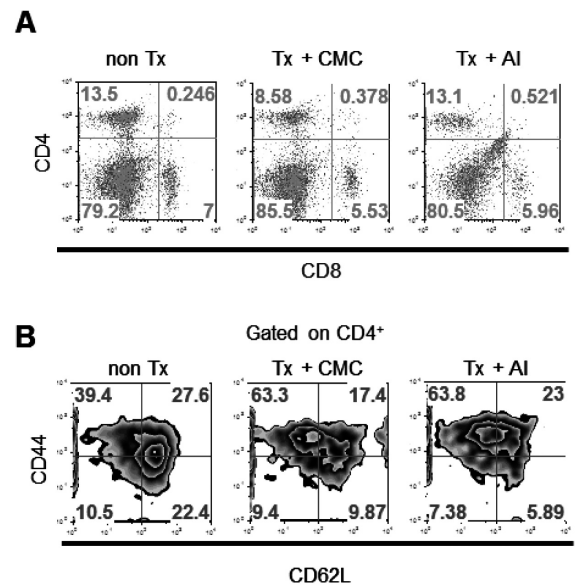


図8 AI投与SSモデルマウスの脾臓におけるT細胞の動態

AI 4週間投与後のSSモデルマウスの脾臓におけるT細胞マーカーをフローサイトメーターにて解析した結果を示す。

(A) 脾臓細胞をCD4とCD8で展開した結果を示す。

(B) 脾臓のCD4<sup>+</sup>細胞をゲーティングし、CD44とCD62Lで展開した結果を示す。それぞれの結果は各群 (n=5) の代表的なものを示す。

8B)。したがって、SSモデルマウスにおいてアロマトラーゼの障害によってCD4陽性T細胞の割合は増加するものの末梢の活性化には関与しないことが示唆された。

#### 8. AI投与SSモデルマウスの唾液腺におけるアポトーシス関連因子のmRNA発現についての検討

AI投与によるSSモデルマウスの唾液腺でのアポトーシス関連因子のmRNA発現に及ぼす影響について検討を行ったところ、RbAp48のmRNA発現は胸腺非摘出群(non Tx群)と比較して、Tx群とTx+AI群で有意に上昇し、Tx+AI群でさらに発現の亢進が認められた(図9)。また、CIITAおよびIRF-1の遺伝子発現についてはAI投与によって有意な差は認められなかったが増加傾向が見られた(図9)。これらの結果から、SSモデルマウスへのAI投与による唾液腺のアポトーシスへの影響が示唆された。

#### 9. ArKOマウスの頸部リンパ節におけるマクロファージおよび樹状細胞についての検討

WTマウスとArKOマウスの末梢リンパ節におけるマクロファージと樹状細胞の割合について検討を行ったと

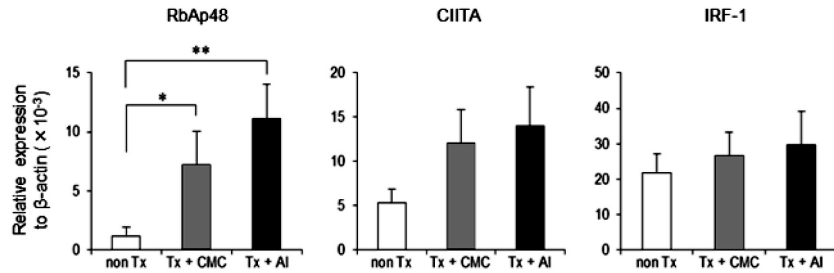


図9 AI投与SSモデルマウスの唾液腺におけるアポトーシスおよび免疫関連因子の mRNA 発現の解析  
AI投与SSモデルマウスの唾液腺における RbAp48, CIITA, IRF-1 の mRNA の発現を, 定量 RT-PCR 法にて解析を行った。各 mRNA 量は  $\beta$ -actin mRNA に対する相対的な値で表されている。結果は平均値 ( $n=5$ )  $\pm$  標準偏差で示されている。(\*:  $P<0.05$ , \*\*:  $P<0.001$ , Student's t-test)

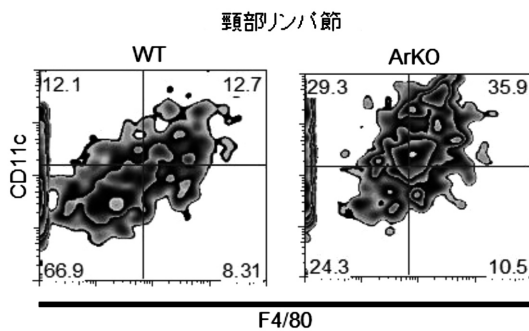


図10 ArKOマウスの頸部リンパ節におけるマクロファージおよび樹状細胞の動態  
WTマウスおよびArKOマウスの頸部リンパ節における F4/80 および CD11c の陽性細胞を, フローサイトメーターにて解析した結果を示す。結果は, 各群 ( $n=5$ ) の代表的なものを示す。

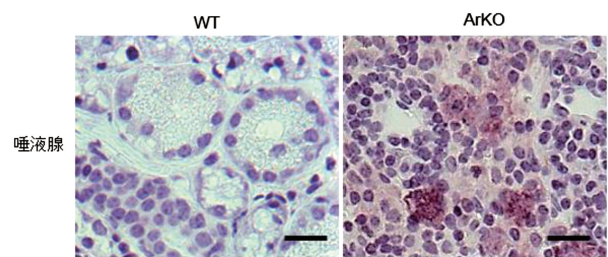


図11 ArKOマウスの唾液腺における F4/80 陽性マクロファージの検討

WTマウスおよびArKOマウスの唾液腺の凍結切片を用いて, 免疫化学染色法にて F4/80 陽性細胞の解析を行った。対比染色にはヘマトキシリンを使用した。写真は各群 ( $n=3$ ) の代表的な結果を示す。(Scale bars = 50  $\mu$ m)

ころ, ArKOマウスの頸部リンパ節において F4/80 陽性のマクロファージおよび CD11c 陽性 F4/80 陰性の樹状細胞の割合が増加していることが明らかとなり, ArKOマウスの末梢でのマクロファージおよび樹状細胞の増加が自己免疫疾患様病態に関与している可能性が示唆された(図10)。

#### 10. ArKOマウスの標的臓器におけるマクロファージの検討

SSの標的臓器である唾液腺でのマクロファージの動態について検討を行った。唾液腺の炎症病変部での免疫染色において, F4/80 陽性のマクロファージの集簇像が確認された(図11)。このことから, ArKOマウスの標的臓器における炎症病変の形成にマクロファージが関与している可能性が示された。

### 考 察

SSを含む多くの自己免疫疾患は, 複数の遺伝子座の

異常と環境因子が相関して発症する多因子疾患とされている<sup>24-26)</sup>。遺伝的な要因として, 主要組織適合遺伝子複合体(MHC)分子をはじめとする様々な遺伝子群が関与していることが報告されている<sup>27-31)</sup>。また, 自己免疫疾患の多くは男性と比較して, 女性で優位に発症することが知られており<sup>1)</sup>, SSも, 閉経期以降の中老年の女性に好発する<sup>2,3)</sup>。これまでに, エストロゲンが性ホルモンの中で最も重要な免疫システムの調節因子であり, 閉経などによるエストロゲンレベルの著明な変化が自己免疫疾患を引き起こすといった報告があり<sup>32)</sup>, 男女間での性ホルモンによる免疫反応の違いが自己免疫病態に影響を及ぼしていると考えられてきた<sup>33,34)</sup>。

SS以外に, 自己免疫疾患である全身性エリテマトーデスや関節リウマチなどの病態形成においてもエストロゲンが関与していることが知られているが<sup>35-38)</sup>, 自己免疫疾患の病態形成と性ホルモンとの関係について個々の疾患の発症機序が異なる点やステロイド受容体とサイトカインシグナルの複雑なクロストークの関与が指摘され

ている<sup>39-41)</sup>。さらに、女性では男性と比較してT細胞の増殖能やIFN- $\gamma$ の産生能が高いことや、エストロゲンが抗原刺激後のCD4陽性T細胞によるIFN- $\gamma$ 産生を誘導することなどが報告されている<sup>42)</sup>。エストロゲンの免疫系における多彩な機能発現については不明な点が多く、T細胞、B細胞、抗原提示細胞に対してエストロゲン受容体(ER- $\alpha$ , ER- $\beta$ , 膜型ER)を介したサイトカイン産生や自己抗体産生、さらにはアポトーシスに関与するシグナル伝達分子の転写活性化を調節していることが要因と考えられている<sup>42)</sup>。

アロマトラーゼは、アンドロゲンをエストロゲンに転換するステロイド代謝酵素であり、活性部位にヘムが結合しており、チトクロームP450スーパーファミリーに属する<sup>43)</sup>。ヒトにおいては、女性生殖組織のみならず、男性生殖組織や、脳、胎児肝臓、皮膚、脂肪組織、骨、血管組織などに広く局在しており、アロマトラーゼ遺伝子の持つ多重エクソン1/多重プロモーター構造の選択的スプライシングにより組織特異的な発現調節が行われている<sup>44, 45)</sup>。アロマトラーゼ遺伝子の厳密な発現制御により、産生されたエストロゲンは傍分泌・自己分泌機構を介して組織独自の多様な生理機能に関わっていると考えられている<sup>46)</sup>。

ヒトのアロマトラーゼ遺伝子欠損症の症状としては、女性では2次性徴の欠如、多嚢胞性卵巣、女性仮性半陰陽(尿道下裂を示す男児様の外陰)、多毛、動脈硬化、骨粗鬆症、脂質代謝異常、男性では、骨端軟骨の閉鎖不全による高身長、脊柱後側彎症、脂質代謝異常などが報告されている<sup>47-51)</sup>。

一方、ArKOマウスにおいては、ヒトでのエストロゲン産生能の低下した状態が再現されており、アロマトラーゼ欠損が骨組織での小柱骨の容積の顕著な低下や、脂肪細胞の肥大と脂質代謝異常による肥満を引き起こすなどの報告がある<sup>52, 53)</sup>。免疫学の分野においても、エストロゲンがどのように免疫システムに影響を及ぼしているのかを理解するための有用な動物モデルとして、ArKOマウスはこれまでいくつかの研究で用いられてきた。特に、Shimらは、ArKOマウスでSS様の自己免疫病変を認め、その病態として、末梢でのB細胞の増加と自己抗体の産生亢進を報告している<sup>20)</sup>。本研究においても、ArKOマウスの涙腺、唾液腺で加齢に伴い、SS様の炎症所見が増悪することを認め(図1A)、今回データを示していないが、ArKOマウス血清中の自己抗体の産生亢進も確認している。

SS患者の唾液腺にはリンパ球が浸潤しているが、そのリンパ球の主体はCD4陽性T細胞およびB細胞であり、本研究においても、18か月齢のArKOマウス唾液腺において、病変部へのCD4陽性T細胞とB細胞の浸潤を認めた(図2)。しかしながら、胸腺、脾臓、頸部リンパ節でのフローサイトメトリーを行った結果では、CD4陽性T細胞およびCD8陽性T細胞の割合に変化は

認めず(図3A, B)、脾臓と頸部リンパ節でのCD4陽性T細胞の活性化についてもArKOマウスとWTマウスで差は見られなかった(図3C)。また、エストロゲンの産生が低下したArKOマウスでは、唾液腺でのCD4陽性T細胞の浸潤とそれに伴うSS様の炎症所見を認めるが、全身のリンパ組織でのリンパ球の動態にはWTマウスと比較してほとんど変化を認めないことが明らかとなった。

生体内においてエストロゲンが免疫システムに及ぼす影響の一つとして、エストロゲンが制御性T細胞を誘導し、Th1細胞とTh17細胞の機能を減弱させるように働くという報告がある<sup>54, 55)</sup>。そのため、胸腺と脾臓におけるTh1細胞の分化に重要な転写因子であるT-bet、あるいは、Th2細胞の分化に重要な転写因子であるGATA-3、さらに、Th17細胞の分化に重要な転写因子であるROR $\gamma$ T、Tregの機能に重要とされる転写因子であるFoxp3の4種類の遺伝子発現について検討を行ったところ、胸腺での各転写因子の遺伝子発現にArKOマウスとWTマウスの間で有意な差は認められなかったが、脾臓でのT-betの遺伝子発現がArKOマウスで有意に増加しており、ArKOマウスにおけるエストロゲン産生量の低下が脾臓でのTh1細胞の発現を促進していることが示唆された(図4)。T-bet以外の3種類の転写因子の発現には両者間で差を認めず、ArKOマウスを用いた本研究では、エストロゲン低下がTh2細胞、Th17細胞、Tregに及ぼす影響については確認できなかった。

Ishimaruらは、エストロゲンの欠乏によって唾液腺細胞で発現が上昇する遺伝子の中で自己免疫疾患の発症の引き金になる遺伝子を探索した結果、細胞周期関連因子であるRbAp48遺伝子を同定している<sup>11)</sup>。さらに、RbAp48遺伝子を唾液腺、涙腺にのみ発現するトランスジェニックマウスを作製して、唾液腺細胞、涙腺細胞のアポトーシスを確認している<sup>11)</sup>。また、RbAp48トランスジェニックマウスを経時的に観察を行うと、20週齢以降に涙腺、唾液腺に炎症性病変を認めることを明らかにした<sup>11)</sup>。加えて、RbAp48トランスジェニックマウスにはSS患者で検出されるSSA抗体、SSB抗体、抗 $\alpha$ -fodrin抗体などの自己抗体が血清中に観察されることを報告している<sup>15)</sup>。さらに、RbAp48トランスジェニックマウスの唾液腺細胞、涙腺細胞にはIL-18やIFN- $\gamma$ の産生に加え、MHC class IIの発現も亢進しており、標的細胞が抗原提示細胞として機能していることも明らかにしている<sup>15)</sup>。つまり、エストロゲン欠乏による標的細胞でのRbAp48を介したアポトーシスに加えて、局所における抗原提示能が亢進することが、臓器特異的自己免疫疾患の発症機序の一つになっているものと考えられ、閉経期以降に発症する多くの自己免疫疾患の病態発症メカニズム解明の一助となる有用な所見であると考えられる。ArKOマウスの涙腺、唾液腺においても、RbAp48とCIITAの遺伝子発現が亢進しており(図5A, B)、



さらに、IFN- $\gamma$  と IL-18 といったサイトカインの遺伝子発現についても ArKO マウスの唾液腺において有意な発現の上昇を認め (図 6 A, B), ArKO マウスの SS 様病態は RbAp48 トランスジェニックマウスで報告されている自己免疫病態と類似した病態であることが明らかとなった。また、ArKO マウスの脾臓においても IFN- $\gamma$  の遺伝子発現の上昇を認め、脾臓での Th1 細胞特異的転写因子である T-bet の発現が促進された結果、Th1 細胞の産生するサイトカインである IFN- $\gamma$  の発現も亢進されたことが示唆された (図 4, 図 6 A)。一方で、各転写因子の発現亢進を認めなかった Th2 細胞の産生する IL-4, Th17 細胞の産生する IL-17 の ArKO マウス脾臓における遺伝子発現は、WT と比較して有意な変化は認められなかった (図 6 C)。Ogawa らは、SS 患者の唾液腺において浸潤リンパ球で産生される IFN- $\gamma$  が、MHC class II, Fas, および CD40, 副刺激分子, iNOS など病態に関わる主要な分子の発現を増大させ、上皮細胞のアポトーシス誘導にも密接に関連している事を報告している<sup>55,56)</sup>。

生体内におけるエストロゲンレベルの変化は T 細胞だけでなく、その他の免疫担当細胞にも影響を及ぼすとされ、エストロゲンが、抗原提示細胞である樹状細胞の機能を低下させ、自己免疫疾患における Treg の進展に関与していることや<sup>8)</sup>、貪食細胞として初期の免疫反応で重要な役割を持つ単球やマクロファージに対して、エストロゲン産生が低下した状態により、活性化された単球あるいはマクロファージが炎症性サイトカインの産生を調節していることが報告されている<sup>57)</sup>。今回の研究においても、ArKO マウスの T 細胞の動態には WT マウスと有意な違いは認められなかったが、これら樹状細胞やマクロファージなどの抗原提示細胞の末梢リンパ節での増加と SS の標的臓器である唾液腺でのマクロファージの増加を認め (図 9, 10), アロマターゼ欠損によるエストロゲン産生量の低下が抗原提示細胞へ影響を与え、涙腺、唾液腺における SS 様の自己免疫病態形成に関与していることが示唆された。

## 結 論

1. ArKO マウスの自己免疫病態は加齢とともに悪化し、12 および 18 か月齢の涙腺・唾液腺において著明なリンパ球浸潤と腺房細胞の破壊を認めた。
2. ArKO マウス唾液腺病変部において、導管周囲への CD4 陽性 T 細胞の浸潤を認めた。
3. ArKO マウスの唾液腺において、RbAp48, CIITA, IFN- $\gamma$  の発現上昇を認めた。
4. SS モデルマウスにアロマターゼインヒビターを投与することによって、SS 病変の悪化が認められた。
5. ArKO マウスの末梢リンパ節および唾液腺でのマクロファージの増加を認めた。

以上より、アロマターゼ欠損によるエストロゲン産生異常が、涙腺・唾液腺におけるシェーグレン症候群様の

自己免疫病態に関与していることが示唆された。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、終始御指導・御校閲を賜りました口腔顎顔面矯正学講座田中栄二教授に深甚なる謝意を表しますとともに、本研究の実施に際して、終始御指導・御校閲を頂きました口腔分子病態学分野石丸直澄教授に心より感謝の意を捧げます。また、御校閲・御助言を賜りました分子薬理学分野吉本勝彦教授に深く感謝いたします。さらに、本研究の円滑な遂行のため、終始御協力戴きました口腔分子病態学分野ならびに口腔顎顔面矯正学分野の教室員の皆様に深謝いたします。

## 参 考 文 献

- 1) Pannell LM, Galligan CL and Fish EN: Sex affects immunity. *J Autoimmun* 38, 282-291 (2012)
- 2) Kontinen YT, Fuellen G, Bing Y, Porola P, Stegaev V, Trokovic N, Falk SS, Liu Y, Szodoray P and Takakubo Y: Sex steroids in Sjögren's syndrome. *J Autoimmun* 39, 49-56 (2012)
- 3) Sammaritano LR: Menopause in patients with autoimmune diseases. *Autoimmun Rev* 11, A430-436 (2012)
- 4) Nikolov NP and Illei GG: Pathogenesis of Sjögren's syndrome. *Curr Opin Rheumatol* 21, 465-470 (2009)
- 5) Cutolo M, Sulli A and Straub RH: Estrogen metabolism and autoimmunity. *Autoimmun Rev* 11, A460-464 (2012)
- 6) Fox RI: Sjögren's syndrome. *Lancet* 366, 321-331 (2005)
- 7) Gleicher N: Postpartum depression, an autoimmune disease? *Autoimmun Rev* 6, 572-576 (2007)
- 8) Lee TP and Chiang BL: Sex differences in spontaneous versus induced animal models of autoimmunity. *Autoimmun Rev* 11, A422-429 (2012)
- 9) Ishimaru N, Saegusa K, Yanagi K, Haneji N, Saito I and Hayashi Y: Estrogen deficiency accelerates autoimmune exocrinopathy in murine Sjögren's syndrome through Fas-mediated apoptosis. *Am J Pathol* 155, 173-181 (1999)
- 10) Ishimaru N, Arakaki R, Watanabe M, Kobayashi M, Miyazaki K and Hayashi Y: Development of autoimmune exocrinopathy resembling Sjögren's syndrome in estrogen-deficient mice of healthy background. *Am J Pathol* 16, 1481-1490 (2003)
- 11) Ishimaru N, Arakaki R, Omotehara F, Yamada K, Mishima K, Saito I and Hayashi Y: Novel role for RbAp48 in tissue-specific, estrogen deficiency-dependent apoptosis in the exocrine glands. *Mol Cell Biol* 26, 2924-2935 (2006)
- 12) Qian YW, Wang YC, Hollingsworth RE Jr, Jones D, Ling N and Lee EY: A retinoblastoma-binding protein related

- to a negative regulator of Ras in yeast. *Nature* 364, 648-652 (1993)
- 13) Lai A, Lee JM, Yang WM, DeCaprio JA, Kaelin WG Jr, Seto E and Branton PE: RBP1 recruits both histone deacetylase-dependent and -independent repression activities to retinoblastoma family proteins. *Mol Cell Biol* 19, 6632-6641 (1999)
  - 14) Nicolas E, Ait-Si-Ali S and Trouche D: The histone deacetylase HDAC3 targets RbAp48 to the retinoblastoma protein. *Nucleic Acids Res* 29, 3131-3136 (2001)
  - 15) Ishimaru N, Arakaki R, Yoshida S, Yamada A, Noji S and 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)
  - 16) Hill RA and Boon WC: Estrogens, brain, and behavior: lessons from knockout mouse models. *Semin Reprod Med* 27, 218-228 (2009)
  - 17) Hill RA, Chua HK, Jones ME, Simpson ER and Boon WC: Estrogen deficiency results in apoptosis in the frontal cortex of adult female aromatase knockout mice. *Mol Cell Neurosci* 41, 1-7 (2009)
  - 18) Bakker J, Pierman S and González-Martínez D: Effects of aromatase mutation (ArKO) on the sexual differentiation of kisspeptin neuronal numbers and their activation by same versus opposite sex urinary pheromones. *Horm Behav* 57, 390-395 (2010)
  - 19) Plackett TP, Oz OK, Simpson ER and Kovacs EJ: Lack of aromatase improves cell-mediated immune response after burn. *Burns* 32, 577-582 (2006)
  - 20) Shim GJ, Warner M, Kim HJ, Andersson S, Liu L, Ekman J, Imamov O, Jones ME, Simpson ER and Gustafsson JA: Aromatase-deficient mice spontaneously develop a lymphoproliferative autoimmune disease resembling Sjögren's syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 12628-12633 (1994)
  - 21) Hayashi Y, Kojima A, Hata M and Hirokawa K: A new mutation involving the sublingual gland in NFS/N mice. Partially arrested mucous cell differentiation. *Am J Pathol* 132, 187-191 (1988)
  - 22) Haneji N, Hamano H, Yanagi K and Hayashi Y: A new animal model for primary Sjögren's syndrome in NFS/*sld* mutant mice. *J Immunol* 153, 2769-2777 (2004)
  - 23) Kohashi M, Ishimaru N, Arakaki R and Hayashi Y: Effective treatment with oral administration of rebamipide in a mouse model of Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 58, 389-400 (2008)
  - 24) Miller FW, Alfredsson L, Costenbader KH, Kamen DL, Nelson LM, Norris JM and De Roos AJ: Epidemiology of environmental exposures and human autoimmune diseases: findings from a National Institute of Environmental Health Sciences Expert Panel Workshop. *J Autoimmun* 39, 259-271 (2012)
  - 25) Karlson EW and Deane K: Environmental and gene-environment interactions and risk of rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 38, 405-426 (2012)
  - 26) Eringsmark Regnéll S and Lernmark A: The environment and the origins of islet autoimmunity and Type 1 diabetes. *Diabet Med* 30, 155-160 (2013)
  - 27) Hashimoto Y, Maxam AM and Greene MI: T-cell antigen-receptor genes in autoimmune mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 83, 7865-7869 (1986)
  - 28) Reich EP, Sherwin RS, Kanagawa O and Janeway CA Jr: An explanation for the protective effect of the MHC class II I-E molecule in murine diabetes. *Nature* 341, 326-328 (1989)
  - 29) Wucherpfennig KW, Newcombe J, Li H, Keddy C, Cuzner ML and Hafler DA: T cell receptor V $\alpha$ -V $\beta$  repertoire and cytokine gene expression in active multiple sclerosis lesions. *J Exp Med* 175, 993-1002 (1992)
  - 30) Zamvil SS, Mitchell DJ, Lee NE, Moore AC, Waldor MK, Sakai K, Rothbard JB, McDevitt HO, Steinman L and Acha-Orbea H: Predominant expression of a T cell receptor V $\beta$  gene subfamily in autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 167, 1586-1596 (1988)
  - 31) Kotzin BL and Palmer E: The contribution of NZW genes to lupus-like disease in (NZB x NZW) F1 mice. *J Exp Med* 165, 1237-1251 (1987)
  - 32) Nadkarni S and McArthur S: Oestrogen and immunomodulation: new mechanisms that impact on peripheral and central immunity. *Curr Opin Pharmacol* 13, 576-581 (2013)
  - 33) Cutolo M, Sulli A, Cappellino S, Villaggio B, Montagna P, Serio B and Straub RH: Sex hormones influence on the immune system: basic and clinical aspects in autoimmunity. *Lupus* 13, 635-638 (2004)
  - 34) Nussinovitch U and Shoenfeld Y: The role of gender and organ specific autoimmunity. *Autoimmun Rev* 11, A377-385 (2012)
  - 35) Lahita RG: The role of sex hormones in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol* 11, 352-356 (1999)
  - 36) Bateman A, Singh A, Kral T and Solomon S: The immune-hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Endocr Rev* 10, 92-112 (1989)
  - 37) Grossman C: Possible underlying mechanisms of sexual dimorphism in the immune response, fact, and hypothesis. *J Steroid Biochem* 34, 241-251 (1989)
  - 38) Mooradian AD, Morley JE and Korenman SG: Biological actions of androgens. *Endocr Rev* 8, 1-28 (1987)

- 39) Renno T, Zeine R, Girard JM, Gillani S, Dodelet V and Owens T: Selective enrichment of Th1 CD45RB<sup>low</sup> CD4<sup>+</sup> T cells in autoimmune infiltrates in experimental allergic encephalomyelitis. *Int Immunol* 6, 347-354 (1994)
- 40) Fox RI, Kang HI, Ando D, Abrams J and Pisa E: Cytokine mRNA expression in salivary gland biopsies of Sjögren's syndrome. *J Immunol* 152, 5532-5539 (1994)
- 41) Liblau RS, Singer SM and McDevitt HO: Th1 and Th2 CD4<sup>+</sup> T cells in the pathogenesis of organ-specific autoimmune diseases. *Immunol Today* 16, 34-38 (1995)
- 42) Maret A, Coudert JD, Garidou L, Foucras G, Gourdy P, Krust A, Dupont S, Chambon P, Druet P, Bayard F and Guéry JC: Estradiol enhances primary antigen-specific CD4 T cell responses and Th1 development in vivo. : Essential role of estrogen receptor  $\alpha$  expression in hematopoietic cells. *Eur J Immunol* 33, 512-521 (2003)
- 43) Ghosh D, Griswold J, Erman M and Pangborn W: Structural basis for androgen specificity and oestrogen synthesis in human aromatase. *Nature* 457, 219-223 (2009)
- 44) Means GD, Kilgore MW, Mahendroo MS, Mendelson CR and Simpson ER: Tissue-specific promoters regulate aromatase cytochrome P450 gene expression in human ovary and fetal tissues. *Mol Endocrinol* 5, 2005-2013 (1991)
- 45) Harada N, Utsumi T and Takagi Y: Tissue-specific expression of the human aromatase cytochrome P-450 gene by alternative use of multiple exons 1 and promoters, and switching of tissue-specific exons 1 in carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 11312-11316 (1993)
- 46) Harada N: Aromatase and intracrinology of estrogen in hormone-dependent tumors. *Oncology* 57, 7-16 (1999)
- 47) Mullis PE, Yoshimura N, Kuhlmann B, Lippuner K, Jaeger P and Harada H: Aromatase deficiency in a female who is compound heterozygote for two new point mutations in the P450<sub>arom</sub> gene: impact of estrogens on hypergonadotropic hypogonadism, multicystic ovaries, and bone densitometry in childhood. *J Clin Endocrinol Metab* 82, 1739-1745 (1997)
- 48) Carani C, Qin K, Simoni M, Faustini-Fustini M, Serpente S, Boyd J, Korach KS and Simpson ER: Effect of testosterone and estradiol in a man with aromatase deficiency. *N Engl J Med* 337, 91-95 (1997)
- 49) Sasano H, Uzuki M, Sawai T, Nagura H, Matsunaga G, Kashimoto O and Harada N: Aromatase in human bone tissue. *J Bone Miner Res* 12, 1416-1423 (1997)
- 50) Ito Y, Fisher CR, Conte FA, Grumbach MM and Simpson ER: Molecular basis of aromatase deficiency in an adult female with sexual infantilism and polycystic ovaries. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 11673-11677 (1993)
- 51) Oz OK, Zerwekh J, Fisher C, Graves K, Nanu L, Millsaps R and Simpson ER: Bone has a sexually dimorphic response to aromatase deficiency. *J Bone Miner Res* 15, 507-514 (2000)
- 52) Jones ME, Thorburn AW, Britt KL, Hewitt KN, Wreford NG, Proietto J, Oz OK, Leury BJ, Robertson KM, Yao S and Simpson ER: Aromatase-deficient (ArKO) mice have a phenotype of increased adiposity. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 12735-12740 (2000)
- 53) Luo CY, Wang L, Sun C and Li DJ: Estrogen enhances the functions of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells that suppress osteoclast differentiation and bone resorption in vitro. *Cell Mol Immunol* 8, 50-58 (2011)
- 54) Lélou K, Laffont S, Delpy L, Paulet PE, Périnat T, Tschanz SA, Pelletier L, Engelhardt B and Guéry JC: Estrogen receptor  $\alpha$  signaling in T lymphocytes is required for estradiol-mediated inhibition of Th1 and Th17 cell differentiation and protection against experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 187, 2386-2393 (2011)
- 55) Ogawa N, Ping L, Zhenjun L, Takada Y and Sugai S: Involvement of the interferon- $\gamma$ -induced T cell-attracting chemokines, interferon- $\gamma$ -inducible 10-kd protein (CXCL10) and monokine induced by interferon- $\gamma$  (CXCL9), in the salivary gland lesions of patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 46, 2730-2741 (2002)
- 56) Brookes SM, Price EJ, Venables PJ and Maini RN: Interferon- $\gamma$  and epithelial cell activation in Sjögren's syndrome. *Br J Rheumatol* 34, 226-231 (1995)
- 57) Kramer PR, Kramer SF and Guan G: 17 $\beta$ -estradiol regulates cytokine release through modulation of CD16 expression in monocytes and monocyte-derived macrophages. *Arthritis Rheum* 50, 1967-1975 (2004)

