

学 位 論 文 題 名

Molecular Mechanisms of Autoimmunity in IQI/Jic mice, A Model for Sjögren's Syndrome

（シェーグレン症候群モデルマウス IQI/Jic における自己免疫の分子機構）

学位論文内容の要旨

ヒトのシェーグレン症候群(SS)は、涙腺・唾液腺へのリンパ球浸潤により、ドライアイおよび口腔乾燥を呈する代表的な慢性自己免疫疾患である。SS の病態には、複数の遺伝要因および環境要因が関与すると考えられているが、その因子の多くは未だ明らかにされていない。本研究では、SS の自己免疫病態の分子機構の一端を明らかにする目的で、新規動物モデルである IQI/Jic マウスの解析を行った。

SS では、涙腺・唾液腺に始まった炎症が全身諸臓器へ波及する症例が多く、この病像は古くから“autoimmune exocrinopathy”、あるいは“autoimmune epithelitis”として知られている。その機序として、標的臓器に共通に発現する自己抗原の関与が示唆されているが、詳細は明らかにされていない。そこで、まず、4 週齢から 52 週齢までの IQI/Jic マウスの全身臓器を病理組織学的ならびに免疫組織化学的に検索した結果、28 週齢以上の老齢マウスでは、これまで報告されている涙腺炎・唾液腺炎に加え、肺、脾臓、腎臓にも CD4⁺ T 細胞および B 細胞から成るリンパ球浸潤巣が認められた。また、8 週齢における初期の病変は唾液腺に限局して発症し、その後、加齢に伴って他の臓器に現れることが明らかとなった。

これらの結果を受け、次に、IQI/Jic マウスにおける多発性自己免疫病変に関連した自己抗原の同定を試みた。IQI/Jic マウスの血清中抗体と各臓器抽出物との反応をウエスタンブロット法で検索したところ、唾液腺抽出物中の 16~18 kDa のポリペプチドとの特異的な反応が認められた。このポリペプチドを、イオン交換、ゲル濾過、および逆相 HPLC によって精製し、N 末端アミノ酸配列解析を行った結果、マウス組織カリクレイン(Klk)-1 および-13 であることが明らかとなった。IQI/Jic マウスの血清中自己抗体は、これら Klk に対して交差性に反応し、さらに、脾細胞は Klk-13 に特異的な増殖反応を示した。また、RT-PCR 法による検索から、Klk-13 の発現は唾液腺で最も豊富であるとともに、他の標的臓器にも共通に発現していることが明らかとなり、IQI/Jic マウスにおける唾液腺から他臓器への炎症波及に、Klk-13 に対する自己免疫反応が関与している可能性が示唆された。

自己抗原に対する細胞性免疫反応を検討する過程で、T 細胞特異的マイトージェンに対する脾細胞増殖反応が、IQI/Jic マウスでは、対照 BALB/c マウスに比較して有意に低い、という興味深い知見を得た。この異常は、発症前の 4 週齢から、全身症状を伴う 48 週齢までのマウスで同程度に認められた。T 細胞増殖異常の原因を検索するため、培養上清中に産生された各種サイトカインの濃度を測定した結果、IL-2 の産生が顕著に低下しており、また、これが IL-2 遺伝子発現の低下に起因することが、定量的 PCR による検討から明らかとなった。IL-2 は *in vivo* において自己抗原に対する免疫寛容の維持に重要な役割を果たしていることが知られており、これらの結果から、T 細胞活性化に伴う IL-2 の産生低下が、IQI/Jic マウスにおける自己寛容の破綻を引き起こし、自己免疫疾患の発症に直接的に関与している可能性が考えられた。

近年、CD4⁺CD25⁺制御性 T 細胞(T_{reg})の機能維持における IL-2 の重要性が明らかとなり、IL-2 を介した自己寛容の機序のひとつとして注目されている。そこで、T_{reg} による自己寛容機構と IQI/Jic マウスの自己免疫病態との関連を明らかにする目的で、T_{reg} の発生を特異的に阻害する手法として知られる、

生後 3 日目の胸腺摘出(D3Tx)を IQI/Jic マウスに施し、16 週齢における唾液腺炎および涙腺炎への影響を組織学的に検討した。その結果、D3Tx により涙腺炎の顕著な悪化が認められたのに対し、唾液腺炎は胸腺摘出群および無処置群で同程度であった。このことから、若齢 IQI/Jic マウスでは T_{reg} の機能は正常に維持され、初期病変の形成には直接関与していないことが示唆された。

本研究の結果をまとめると、IQI/Jic マウスでは、T 細胞の活性化に伴う IL-2 産生不全が T_{reg} とは異なる自己寛容機構を破綻させ、カリクレイン-13 を含む自己抗原に対する持続的な T 細胞の活性化を引き起こすと考えられる。また、カリクレイン-13 に対する自己免疫反応は、唾液腺から他の標的臓器への炎症波及に関与し、全身病態の形成に重要な役割を果たすと考えられる。これらの知見は SS を含めた自己免疫疾患の病因解明に寄与すると期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 稲 葉 睦
副 査 教 授 斉 藤 昌 之
副 査 教 授 梅 村 孝 司
副 査 教 授 安居院 高 志

学 位 論 文 題 名

Molecular Mechanisms of Autoimmunity in IQI/Jic mice, A Model for Sjögren's Syndrome

(シェーグレン症候群モデルマウス IQI/Jic における自己免疫の分子機構)

ヒトのシェーグレン症候群(SS)は、涙腺・唾液腺へのリンパ球浸潤によりドライアイと口腔乾燥を呈する代表的な慢性自己免疫疾患である。SS の病態には、複数の遺伝性素因と環境要因が関与すると考えられているが、その因子の多くは未だ明らかにされていない。本研究では、SS の自己免疫病態の分子機構を明らかにすることを目的に、新規動物モデルである IQI/Jic マウスの解析を行った。

SS では、涙腺・唾液腺に始まった炎症が全身諸臓器へ波及する症例が多く、この病像は古くから "autoimmune exocrinopathy" として知られている。その機序として、標的臓器に共通して発現する自己抗原の関与が示唆されているが、詳細は不明である。そこで、まず第1章では、4 週齢から 52 週齢までの IQI/Jic マウスの全身臓器を病理組織学的、ならびに免疫組織化学的に検索した。その結果、28 週齢以上の老齢マウスでは、これまで報告されている涙腺炎・唾液腺炎に加え、肺、脾臓、腎臓にも CD4⁺ T 細胞、および B 細胞からなるリンパ球浸潤巣を認めた。また、8 週齢における初期の病変は唾液腺に局限して発症し、その後、加齢に伴って他の臓器に現れることを明らかにした。

この知見に基づき、第2章では IQI/Jic マウスにおける多発性自己免疫病変に関連した自己抗原の同定を試みた。IQI/Jic マウスの血清中抗体と各臓器抽出物との反応をウエスタンブロット法で検索したところ、唾液腺抽出物に含まれる 18 kDa、ならびに 16 kDa のポリペプチドとの特異的な反応が認められた。これらのポリペプチドを、イオン交換、ゲル濾過、および逆相クロマトグラフィーによって精製し、N 末端アミノ酸配列解析を行った結果、各々マウス組織カリクレイン(Klk)-1 と-13 であることが明らかになった。IQI/Jic マウスの血清中自己抗体は、これらの Klk に対して交差性に反応し、さらに、脾細胞は Klk-13 に特異的な増殖反応を示した。また、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応による検索から、Klk-13 の発現は唾液腺で最も豊富であるとともに他の標的臓器にも共通に発現していることが明らかとなり、IQI/Jic マウスにおける唾液腺から他臓器への炎症波及に、Klk-13 に対する自己免疫反応が関与している可能性が示された。

第3、4章では、IQI/Jic マウスにおける自己免疫病態と T 細胞機能の関連について、T 細胞が産生するインターロイキン(IL)-2 などのサイトカイン、ならびに IL-2 を介した自己寛容の機序のひとつとされる CD4⁺CD25⁺制御性 T 細胞(T_{reg})に焦点を充てた検討を行った。まず、T 細胞特異的マイトージェンに対する脾細胞の増殖反応が IQI/Jic マウスでは対照 BALB/c マウスに比較して有意に低いという知見を得た。この異常は、発症前の 4 週齢から、全身症状を伴う 48 週齢までのマウスで同程度に認められた。細胞培養上清中に産生された IL-2、IL-4、インターフェロン- γ の濃度を測定した結果、IL-2 の産生が顕著に低下していること、さらに定量的ポリメラーゼ連鎖反応により、これが IL-2 遺伝子発現の低下に

起因することを明らかにした。一方、 T_{reg} の発生を特異的に阻害する手法である生後 3 日目での胸腺摘出を IQI/Jic マウスに施し、16 週齢における唾液腺炎および涙腺炎への影響を組織学的に検討したところ、胸腺摘出により涙腺炎の顕著な悪化が認められたのに対し、唾液腺炎は胸腺摘出群と無処置群とで同程度であった。即ち、若齢 IQI/Jic マウスでは T_{reg} の機能は正常に維持され、初期病変の形成には直接関与しないことが示された。これらの結果から、IQI/Jic マウスでは、T 細胞の活性化に伴う IL-2 産生不全が T_{reg} の機能によるものとは異なる自己寛容機構を破綻させ、Klk-13 を含む自己抗原に対する持続的な T 細胞の活性化を引き起こすことが考えられた。

本研究は、SS モデルマウスである IQI/Jic マウスの自己免疫病態とその進行に関わる因子を解明、さらに発症機構解明への基盤となる知見を提供し、広く自己免疫疾患の分子機構解明に貢献するものである。したがって、審査員一同は、上記博士論文提出者高田健介の博士論文が北海道大学大学院獣医学研究科規程第 6 条の規定による本研究科博士論文審査等に合格と認めた。