第 37 回総会ポスター受賞記念論文

総 説 (推薦論文)

推薦者: 日本臨床免疫学会副編集委員長 湯尾明

シェーグレン症候群の病態形成における M3 ムスカリン作動性アセチルコリン受容体に対する自己免疫応答の解明

飯塚 麻菜^{*1}, 若松 英^{*1,*2}, 松本 功^{*1}, 坪井 洋人^{*1}
中村 友美^{*1,*3}, 松井 稔^{*4}, 住田 孝之^{*1}

A role of immune response to M3 muscarinic acetylcholine receptor in the pathogenesis of Sjögren's syndrome

Mana IIZUKA^{*1}, Ei WAKAMATSU^{*1,*2}, Isao MATSUMOTO^{*1}, Hiroto TSUBOI^{*1},
Yumi NAKAMURA^{*1,*3}, Minoru MATSUI^{*4} and Takayuki SUMIDA^{*1}^{*1}*Division of Clinical Immunology, Doctoral Programs in Clinical Sciences, Graduate School
Comprehensive Human Science, University of Tsukuba, Tsukuba, Japan*^{*2}*Department of Pathology, Harvard Medical School, Boston, MA 02115, USA*^{*3}*Research Fellow of the Japan Society for the Promotion of Science, Tokyo, Japan*^{*4}*Department of Clinical Research and General Medicine, Tokyo-Nishi Tokushukai Hospital, Tokyo, Japan*

(Received February 19, 2010)

summary

Sjögren's syndrome (SS) is a chronic autoimmune disease characterized by lymphocytic infiltration of salivary glands, in which CD4⁺ T cells are predominant. These infiltrating T cells play a crucial role in the generation of SS. Previous studies showed that autoantibodies and auto-reactive T cells against M3 muscarinic acetylcholine receptor (M3R) were detected in patients with SS. In this study, to reveal the pathological mechanisms underlying immune response against M3R, we tried to induce SS like sialoadenitis. M3R knockout (M3R^{-/-}) mice were immunized with murine M3R peptides. Their splenocytes were isolated and transferred into Rag1 knockout (Rag1^{-/-}) mice. Mononuclear cells infiltration was detected in salivary glands of Rag1^{-/-} mice inoculated splenocytes of M3R^{-/-} mice immunized with M3R peptides. Moreover we transferred CD3⁺ cells from splenocytes of M3R^{-/-} mice immunized with M3R peptides into Rag1^{-/-} mice. In their salivary glands, mononuclear infiltration was also detected. These findings suggest that the immune response to M3R plays a crucial role in the generation of SS like sialoadenitis.

Key words—Sjögren's syndrome; M3 muscarinic acetylcholine receptor; sialoadenitis

抄 録

シェーグレン症候群 (SS) は, 慢性唾液腺炎と乾燥性角結膜炎を主徴とする自己免疫疾患の一つである。病理学的には, 唾液腺や涙腺などの導管, 腺房周囲に著しい CD4⁺ T 細胞を主体とする細胞浸潤が認められ, 腺組織の破壊と機能障害をもたらすと考えられている。SS の自己抗原の一つとして M3 ムスカリン作動性アセチルコリン受容体 (M3R) が報告されている。これまでに, SS 患者において抗 M3R 抗体, および M3R 反応性 T 細胞が検出されており, M3R に対する自己免疫応答が SS の病態に関与していることが示唆されている。

今回我々は, マウス M3R ペプチドを M3R 欠損 (M3R^{-/-}) マウスに免疫し, その脾細胞を Rag1 欠損 (Rag1^{-/-}) マウスに移入することで SS 類似の唾液腺炎を誘導した。さらに, マウス M3R ペプチドを免疫した M3R^{-/-} マウス由来の CD3⁺ 細胞のみを移入しても, 同様に唾液腺炎が誘導された。

以上の結果より, M3R に対する免疫応答が, SS 類似の唾液腺炎を誘導することが示され, 特に M3R 反応性 T 細胞がその発症に重要であることが示唆された。

^{*1}筑波大学大学院人間総合科学研究科疾患制御医学専攻臨床免疫学^{*2}日本学術振興会 特別研究員^{*3}ハーバード大学医学部^{*4}東京西徳洲会病院臨床研究部総合診療内科

はじめに

SS の発症機序は, 抗原特異的免疫応答と抗原非

特異的免疫応答にわけて考えられている。抗原特異的免疫応答の先行因子として、ヒト T 細胞白血病ウイルス (HTLV-I)^{1,2)}、Ebsteine-Barr (EB) ウイルス^{3,4)}などのウイルス感染や熱ショックタンパクを産生する感染が考えられ、それらの構成成分の一部が抗原として提示されるか、あるいは、感染によりアポトーシスに陥った細胞から自己抗原が提示されることにより免疫応答が惹起される。

自己抗原としては、臓器非特異的抗原として Ro/SS-A 52 kDa⁵⁻⁷⁾、HSP10/60 タンパク⁸⁾、臓器特異的抗原として α -アミラーゼ⁹⁾、M3 ムスカリン作動性アセチルコリン受容体 (M3R)^{10,11)}が報告されている。

M3R は、7 回膜貫通ドメインをもつ分子量約 70 kDa の糖蛋白で、G タンパクの共役した受容体である (図 1)。ムスカリン受容体は外分泌腺細胞や副交感神経臓器、中枢神経、神経節に存在するが、M3R は特に唾液腺に高発現していることから、唾液分泌に重要であると報告されている¹²⁾。M3R 欠損 (M3R^{-/-}) マウスにおいても、唾液分泌量の低下が認められることから、唾液腺における M3R の機能不全が唾液分泌低下を引き起こすと考えられる¹³⁾。

これまでに SS 患者血清中において、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) や flow cytometry assay などにより、抗 M3R 抗体が検出されている¹⁴⁾。また、Robinson ら¹⁵⁾は SS 患者由来の IgG がマウスの唾液分泌能を低下させ、SS 患者 IgG がムスカリン受容体に結合することを示し、ムスカリン受容体に対する抗体が腺機能障害に関わっていることが示唆された。我々のグループの先行研究においても、M3R の第二細胞外ドメインに対する自己抗体が SS 患者より検出され、抗 SS-B 抗体

との相関が認められた。このことから、抗 M3R 抗体は SS 特異的な抗体である可能性が示唆された¹⁰⁾。さらに、SS 患者末梢血中で、M3R 反応性の T 細胞が検出されている¹⁶⁾。

以上の報告より、SS において M3R 抗原に対する自己免疫応答が発症に関与していることが示唆される。しかし、M3R に対する自己免疫応答が、SS の発症にどのように関与しているかについては未だ明らかではない。

Amagai ら¹⁷⁾は、天疱瘡の自己抗原として同定されているデスモグレイン 3 (desmoglein 3 ; Dsg3) 欠損 (Dsg3^{-/-}) マウスを用いて天疱瘡モデルマウスの構築を行った。Dsg3^{-/-} マウスにおいては Dsg3 に対する自己免疫寛容が破綻しているため、Dsg3 タンパク免疫により強力な免疫応答が誘導される。その脾細胞を免疫不全マウスである Rag2^{-/-} マウスに移入すると、Dsg3 に対する自己免疫応答が惹起され天疱瘡を発症する。自己抗原欠損マウスに自己抗原を免疫し、その脾細胞を免疫不全マウスに移入することで自己免疫疾患を発症させる手法を参考に、本研究では M3R^{-/-} マウスを用いて SS 類似の唾液腺炎発症モデルマウスを誘導し、M3R に対する自己免疫応答と SS の発症について検討した。

M3R に対する免疫応答

M3R^{-/-} と M3R^{+/+} (C57BL/6J) マウスにおける、M3R 抗原に対する免疫応答の違いを検討するため、M3R^{-/-} と M3R^{+/+} マウスに M3R の細胞外領域をコードする合成ペプチドを強化アジュバントおよび百日咳毒と共に免疫し (図 2A)、それぞれの脾細胞における M3R に対する免疫応答について ELISA により検討した (図 2B)。その結果、

図 1 ムスカリン受容体の構造

ムスカリン性アセチルコリン受容体 (ムスカリン受容体) は、7 回細胞膜貫通ドメインを持つ分子量約 70 kDa の糖タンパクで、G タンパクの共役型受容体である。アセチルコリン (ACh) を内在性アゴニストとし、外分泌腺や中枢神経、副交感神経支配臓器など生体内に広く分布する。薬物親和性および遺伝子の解析から、5 種類のサブタイプ (M1~M5) が存在する。

図2 M3R^{+/+} および M3R^{-/-} マウスにおける M3R に対する免疫応答の誘導

(A) M3R ペプチドを M3R^{+/+} および M3R^{-/-} マウスに 0, 10 日目に免疫し, 20 日後に脾臓を摘出した. (B) 脾細胞 (2×10^5 cells/well) を M3R ペプチド ($5 \mu\text{g/ml}$) で 72 時間刺激し, 培養上清中の IFN- γ , IL-17 および IL-4 産生を ELISA により測定した.

表1 M3R に対する免疫応答

	M3R ^{+/+} (n=3)	M3R ^{-/-} (n=3)	p 値*
IFN- γ (pg/ml)	216 $\pm$ 56	1499 $\pm$ 158	0.04
IL-17 (pg/ml)	371 $\pm$ 4	121 $\pm$ 66	0.04
IL-4 (pg/ml)	N.D.	N.D.	

* Mann-Whitney の U 検定
N.D. : Not detected

表2 M3R 反応性脾細胞を移入した Rag1^{-/-} マウスにおける解析

	M3R ^{+/+} $\rightarrow$ Rag1 ^{-/-} * (n=5)	M3R ^{-/-} $\rightarrow$ Rag1 ^{-/-} ** (n=5)	p 値***
抗 M3R 抗体価	0.06 $\pm$ 0.03	0.42 $\pm$ 0.40	0.04
唾液分泌量 ($\mu\text{l/weight}$)	1.32 $\pm$ 0.14	0.92 $\pm$ 0.15	0.04
Greenspan 分類	1.20 $\pm$ 1.09	3.20 $\pm$ 1.09	0.04

* M3R ペプチドを免疫した M3R^{+/+} マウス由来脾細胞を移入した Rag1^{-/-} マウス, ** M3R ペプチドを免疫した M3R^{-/-} マウス由来脾細胞を移入した Rag1^{-/-} マウス, *** Mann-Whitney の U 検定

M3R^{+/+} マウスと比較して, M3R ペプチドを免疫した M3R^{-/-} マウスの脾細胞において, IFN- γ および IL-17 の有意に高い産生が認められた (表 1). しかし, IL-4 については, M3R^{+/+} および M3R^{-/-} マウスの脾細胞において産生は認められなかった. これらの結果より, M3R^{+/+} と比較して M3R^{-/-} マウスにおいて M3R ペプチドに対する高い免疫応答が誘導できる出来ることが示された.

M3R 反応性脾細胞による唾液腺炎誘導モデルマウス

M3R^{+/+} および M3R^{-/-} マウスに M3R ペプチド

図3 M3R 反応性脾細胞移入による唾液腺炎の誘導

M3R^{+/+} $\rightarrow$ Rag1^{-/-} (A) および M3R^{-/-} $\rightarrow$ Rag1^{-/-} マウス (B) の唾液腺を摘出し, HE 染色による組織学的検討を行った. Bars = 30 μm

ドを免疫し誘導された M3R 反応性の脾細胞を, M3R が発現している Rag1^{-/-} マウスに移入することで SS 類似の病態を誘導できるか検討した. 脾細胞移入より 45 日後に唾液分泌量および抗 M3R 抗体価を測定した. M3R^{+/+} マウスと比較して M3R^{-/-} マウス由来脾細胞を移入した Rag1^{-/-} マウス (M3R^{-/-} $\rightarrow$ Rag1^{-/-}) の唾液分泌量は有意に低下, 抗 M3R 抗体価は有意に上昇した (表 2).

さらに, 脾細胞を移入した Rag1^{-/-} マウスの唾液腺を細胞移入 45 日後に摘出し, 組織学的検討を行った. M3R^{+/+} マウス由来脾細胞を移入した Rag1^{-/-} マウス (M3R^{+/+} $\rightarrow$ Rag1^{-/-}) の唾液腺において, 著明な浸潤は認められなかった. しかし, M3R^{-/-} $\rightarrow$ Rag1^{-/-} マウスの唾液腺においては細胞浸潤が認められ (図 3), Greenspan 分類¹⁸⁾に基づく組織学的スコアの結果より, 浸潤の程度も有意に高いことが示された (表 2).

唾液腺における浸潤細胞の同定

M3R^{-/-}→Rag1^{-/-} マウスの唾液腺組織における浸潤細胞を明らかにするため、免疫組織化学染色法を用いて検討を行った。抗 Thy1 抗体、抗 B220 抗体、抗 CD4 抗体、抗 CD8 抗体を用いて染色した結果、Thy1⁺ CD4⁺ 細胞が多数認められた。しかし、B220⁺ および CD8⁺ 細胞はほとんど認められなかった。

また、IgG の沈着を検討するため、抗 IgG 抗体を用いて染色を行った。その結果、わずかではあるが、IgG の沈着が認められた。

さらに、唾液腺におけるサイトカインの産生について蛍光免疫染色法による検討を行った。その結果、M3R^{-/-}→Rag1^{-/-} マウスの唾液腺において、IFN- γ および IL-17 を産生する CD4⁺ 細胞が浸潤部位に認められた。

M3R 反応性 T 細胞による唾液腺炎誘導マウス

M3R^{-/-}→Rag1^{-/-} マウスの唾液腺において浸潤している細胞は主に CD4⁺ T 細胞であったため、唾液腺炎発症における T 細胞の役割について検討を行った。M3R ペプチドを免疫した M3R^{-/-} マウスの脾臓細胞を単離し、magnetic cell sort (MACS) により CD3⁺ および CD3⁻ 細胞に分離した。精製度については、CD3⁺ 細胞分画 (>93%)、CD3⁻ 細胞分画 (<1.6%) であった。CD3⁺ および CD3⁻ 細胞をそれぞれ Rag1^{-/-} マウスに移入し、唾液腺の組織学的検討を行った。その結果、M3R ペプチドを免疫した M3R^{-/-} マウスより分離した CD3⁺ 細胞のみを移入した Rag1^{-/-} マウス (M3R^{-/-} CD3⁺→Rag1^{-/-}) の唾液腺において、細胞浸潤が認められた。しかし、CD3⁻ 細胞を移入した Rag1^{-/-} マウスの唾液腺において、細胞浸潤は認められなかった。

さらに、M3R^{-/-} CD3⁺→Rag1^{-/-} マウスの唾液腺における浸潤細胞を明らかにするため、免疫組織化学染色を行った。その結果、浸潤細胞のほとんどは Thy1⁺ CD4⁺ 細胞であった。

以上の結果より、SS 類似の唾液腺炎発症には、M3R 反応性の T 細胞が必須であることが示された。

おわりに

今回我々は、M3R に対する自己免疫応答により、SS 類似の唾液腺炎が誘導されることを示した。さ

らに、M3R 反応性 T 細胞のみを移入した Rag1^{-/-} マウスにおいて唾液腺への細胞浸潤が誘導されたことより、唾液腺炎の発症には M3R 反応性 T 細胞が重要であることが明らかとなった。

臓器特異的抗原である M3R が SS の発症に関与する自己抗原である可能性が示されたことは、SS を臓器特異的自己免疫疾患と考えた場合、自己反応性 T 細胞の臓器特異性を説明する機序として興味深い。また、臓器特異的自己抗原が同定されれば、そのアナログペプチド (APL; Altered peptide ligand) を投与することにより、臓器特異的自己免疫応答を抑制できる可能性がある。さらに、我々のグループの先行研究により同定された M3R 反応性 T 細胞の APL¹⁶⁾ を用いて、M3R に対する自己免疫応答を抑制し、SS の唾液腺炎の進展を制御できる可能性が考えられる。

文 献

- 1) Green JE, et al.: Exocrinopathy resembling Sjögren's syndrome in HTLV-1 tax transgenic mice. *Nature* **341**: 72-74, 1989.
- 2) Fox RI, et al.: Current issues in the diagnosis and treatment of Sjögren's syndrome. *Curr Opin Rheumatol.* **11**: 364-371, 1999.
- 3) Saito I, et al.: Detection of Epstein-Barr virus DNA by polymerase chain reaction in blood and tissue biopsies from patients with Sjögren's syndrome. *J Exp Med.* **169**: 2191-2198, 1989.
- 4) Fox RI, et al.: Potential role of Epstein-Barr virus in Sjögren's syndrome and rheumatoid arthritis. *The Journal of Rheumatology.* **19**: 18-24, 1992.
- 5) Namekawa T, et al.: Identification of Ro (SSA) 52 kDa reactive T cells in labial salivary glands from patients with Sjögren's syndrome. *J Rheumatol.* **22**: 2092-2099, 1995.
- 6) Halse AK, et al.: Ro/SS-A-reactive B lymphocytes in the salivary glands and peripheral blood from patients with Sjögren's syndrome. *Clin Exp Immunol.* **115**: 203-207, 1999.
- 7) Tengner P, et al.: Detection of anti-Ro/SSA and anti-La/SSB autoantibody-producing cells in salivary glands from patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* **41**: 2238-2248, 1998.
- 8) Sumida T, et al.: Regulatory T cells epitope recognized by T cells from labial salivary glands of patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis*

- Rheum.* **40** : 2271–2273, 1997.
- 9) Matsumoto I, et al. : Alpha-amylase functions as a salivary gland-specific self T cell epitope in patients with Sjögren's syndrome. *Int J Mol Med.* **3** : 485–490, 1999.
- 10) Naito Y, et al. : Muscarinic acetylcholine receptor autoantibodies in patient with Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis.* **64** : 510–511, 2005.
- 11) Dawson LJ, et al. : Antimuscarinic antibodies in primary Sjögren's syndrome reversibly inhibit the mechanism of fluid secretion by human submandibular salivary acinar cells. *Arthritis Rheum.* **54** : 1165–1173, 2006.
- 12) Gordon B. Proctor, Guy H. Carpenter. : Regulation of salivary gland function by autonomic nerves. *Auton Neurosci.* **133**(1) : 3–18, 2007.
- 13) Matsui M, et al. : Multiple functional defects in peripheral autonomic organs in mice lacking muscarinic acetylcholine receptor gene for the M3 subtype. *Proc Natl Acad Sci USA.* **97** : 9579–9584, 2000.
- 14) Bacman S, et al. : Muscarinic acetylcholine receptor antibodies as a new marker of dry eye Sjögren's syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sc.* **42** : 321–327, 2001.
- 15) Robinson CP, et al. : Transfer of human serum IgG to nonobese diabetic Igm^{null} mice reveals a role for autoantibodies in the loss of secretory function of exocrine tissues in Sjögren's syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA.* **95** : 7538–7543, 1998.
- 16) Naito Y, Matsumoto I, Wakamatsu E, Goto D, Ito S, Tsutsumi A and Sumida T. : Altered peptide ligand regulate muscarinic acetylcholine receptor reactive T cells of patients with Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis.* **65** : 269–271, 2006.
- 17) Amagai M, et al. : Use of autoantigen-knock-out mice in developing an active autoimmune disease model for pemphigus. *J. Clin. Invest.* **105** : 625–631, 2000.
- 18) Greenspan JS, et al. : The histopathology of Sjögren's syndrome in labial salivary gland biopsies. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* **37** : 217–229, 1974.