シェーグレン症候群疾患モデルの SCID マウスへの移入

林 良夫・羽地則雄*

Transfer of murine Sjögren's syndrome into SCID mice

Successful transfer of murine Sjögren's syndrome from MRL/lpr mice into SCID mice and prevention of lesions by anti-CD 4 and α -T cell receptor $V\beta$ 8 anti body treatment are described. Mononuclear cells is isolated from the inflammatory salivary gland tissues of MRL/lpr were transferred intraperitoneally into SCID mice. Autoimmune lesions resembling those seen in Sjögren's syndrome developed in the salivary and lacrimal glands of SCID mice 8 weeks after the injection. A major proportion of these infiltrating cells in transferred SCID mice were CD 4⁺ and $V\beta$ 8⁺. Moreover, we found that the lesions were prevented by administration of the isolated cells treated *in vitro* with anti-CD 4- and $V\beta$ 8-bearing monoclonal antibodies. These results suggest that CD 4- and $V\beta$ 8-bearing T cells are involved in recognizing an unknown autopeptide and triggering autoimmunity in the salivary and lacrimal glands.

Rec. 12/12/1994, Acc. 12/19/1994, pp 225~230

Yoshio Hayashi・Norio Haneji*

key words : Sjögren's syndrome, SCID mice, trasfer,
 $V\beta$ gene usage, MRL/lpr mice

SCID(severe combined immunodeficiency)マウスは、抗原レセプターの遺伝子再構成の障害のため成熟したT細胞、B細胞の欠損したミュータントマウスとして発見され¹⁾、自己免疫疾患・感染症をはじめとするヒトの免疫システムの再構築に広く用いられ、病因解明のための有用なモデルマウスとされている^{2,3)}。

シェーグレン症候群は、唾液腺・涙腺を主とした外分泌臓器を標的臓器とする原因不明の自己免疫疾患とされ、やがて肺・腎・肝などに重篤な全身症状をきたし、まれにはあるが悪性リンパ腫へ移行する特異な疾患であり^{4,5)}、疾患モデルによる病因解明が必要とされている。

MRL/lpr マウスは、全身性エリテマトーゼス(SLE)や慢性関節リウマチ(RA)の疾患モデルとして広く知られているが、自己免疫性唾液腺炎・

涙腺炎を自然発症することからシェーグレン症候群のモデルとしても報告されており^{6,7)}、従来から筆者らも *in vivo* における病因解析を行ってきた。現在までの成績から、MRL/lpr マウス自己免疫性唾液腺炎は未知の自己抗原に反応する CD 4⁺ $V\beta$ 8⁺T 細胞を主体とした自己反応性T細胞により発症し、IL-1 β , TNF α , IL-6 などのサイトカイン産生異常による病態増強がもたらされていることが明らかとなっている^{8,9)}。

今回、MRL/lpr マウスに自然発症するシェーグレン症候群モデルにおける自己免疫的メカニズムを明らかにする目的で、MRL/lpr マウス唾液腺炎局所から直接分離し調整した単核細胞をSCID マウス腹腔内へ投与することにより臓器局在性自己免疫性病変のトランスファーが可能か否か、また可能であるならモノクローナル抗体投与によって発症阻止効果があるのか否かについて検討を加えた。

* Department of Pathology, Tokushima University School of Dentistry 徳島大学歯学部口腔病理学講座
Offprint requests to : Yoshio Hayashi, Department of Pathology, Tokushima University School of Dentistry, 3 Kuramoto-cho, Tokushima 770, Japan

図1 Histological appearance of Sjögren's syndrome in transferred SCID mice at 8 weeks after the intraperitoneal injection. Periductal inflammatory infiltrations were observed in the parotid salivary gland(A), and in the lacrimal gland(B). (HE stain, $\times 120$).

材料と方法

MRL/Mp-lpr マウス(MRL/lpr, H-2^k: 5~7 カ月, n=48)顎下腺組織から比重遠心法にて分離した単核細胞を 1×10^6 に調整し, 8~9 週齢の SCID マウス(C. B-17 scid, H-2^d: n=48)の腹腔内へ移入したのち, 4 週目と 8 週目の SCID マウス全身諸臓器の病理組織学的変化を通常通り観察した. また, 主要臓器の凍結切片を作製し SCID マウスへの浸潤細胞の同定(CD 3, CD 4, CD 8, Mac-1, V β 8, V β 6)を免疫組織化学的に実施した(ABC 法).

唾液腺組織から total RNA を抽出し, 通常に従い RT(reverse transcriptase)-PCR 法にて T 細胞レセプター(TCR) V β ファミリー(V β 1-V β

図2 Immunohistochemical appearance of inflammatory lesion in the salivary glands. A major proportion of infiltrating cells were V β 8⁺(A), while a lesser number of V β 6⁺ cells(B) was observed. (Immunoperoxidase stain, $\times 180$)

19, C β)の遺伝子解析を実施した. 対照として MRL/lpr マウス脾細胞(n=12)および血清(n=11), H-2 ハプロタイプが MRL/lpr と同じ C3 H/He マウス(n=12)および SCID と同じ BALB/c マウス(n=12)の脾細胞を SCID 腹腔内へ注入した.

つぎに, MRL/lpr マウス唾液腺浸潤細胞を SCID 腹腔内へ移入したあとのレシピエントの免疫動態を解析する目的で, SCID マウス尾静脈から末梢血を週齢ごとに経時的に採血し, 塩化アンモニウムにて溶血操作を施したのちリンパ球表面マーカー(CD 3, CD 4, CD 8, B 220)のフローサイトメトリー(FACSCAN, Becton Dickinson 社)による解析と各種サイトカイン(IL-2, IL-4, IL-6,

图 3 Expression of TCR V β mRNA in the salivary glands of transferred SCID mice analyzed by RT-PCR and Southern blot

图 4 Flow cytometric analysis of the PBMC from transferred SCID mice at 2 weeks and 4 weeks after the intraperitoneal injection
A significant increase of B220⁺B cells and CD3⁺T cells was observed.

图 5 Flow cytometric analysis of the PBMC from transferred(A) and non-treated (B)SCID mice at 2, 4 and 8 weeks after the intraperitoneal injection
Peripheral CD4⁺T cells were increased gradually, while leaky pattern in non-treated SCID mice was found at a low level.

表 1 Kinetic analysis of cytokine gene expression on PBMC and spleen by a semi-quantitative PCR*

Cytokine		Transferred SCID mice(wk after injection)							
		1	2	3	4	5	6	7	8
IL-1 β	PBMC	—	(+)	+	+	+	+	+	+
	Spleen	ND	(+)	ND	+	ND	ND	ND	+
TNF α	PBMC	—	(+)	+	+	+	+	+	+
	Spleen	ND	(+)	ND	+	ND	ND	ND	+
IL-6	PBMC	—	—	—	(+)	+	++	++	++
	Spleen	ND	—	ND	+	ND	ND	ND	+
IFN γ	PBMC	—	(+)	+	+	+	+	+	+
	Spleen	ND	(+)	ND	+	ND	ND	ND	+
IL-2	PBMC	—	—	—	—	—	—	—	—
	Spleen	ND	—	ND	—	ND	ND	ND	—
IL-4	PBMC	—	(+)	+	+	+	+	+	+
	Spleen	ND	—	ND	—	ND	ND	ND	(+)
IL-10	PBMC	—	—	—	—	—	—	—	+
	Spleen	ND	—	ND	—	ND	ND	ND	—
IL-12	PBMC	(+)	(+)	(+)	+	+	+	+	+
	Spleen	ND	(+)	ND	(+)	ND	ND	ND	+

*—: Not detectable. (+), +, ++: amount of product detectable. ND: not done

IL-10, IL-12 p 40, IFN γ , β -actin) mRNA の発現について RT-PCR 法による解析を試みた。

さらに, T細胞および TCR に対する モノクローナル抗体によって SCID マウスへのトランスファーが阻止できるか否かについて検討した (n=30). すなわち, 上記と同じく MRL/lpr マウス顎下腺より分離した単核細胞を *in vitro* にて 37°C, 30 分補体共存下でモノクローナル抗体処理を行ったのち 1×10^6 を腹腔内に移入し, 8 週後の病理組織学的変化を White らの組織学的 Index¹⁰⁾ によって比較検討した. 阻止実験として用いた抗体は MRL/lpr マウス唾液腺炎局所での発現が確認されている CD 4 (n=8), CD 8 (n=8), V β 8 (n=8), V β 6 (n=6) に対するモノクローナル抗体を用いた.

結 果

MRL/lpr マウス顎下腺組織から分離調整した単核細胞 (1×10^6) を SCID マウス腹腔内へ移入後, 4 週群には全身諸臓器にまったく病理組織学的変化はみられなかったが, 8 週群の SCID マウスにおいて耳下腺 (92%)・顎下腺 (92%)・舌下腺 (33%) の唾液腺のみならず涙腺 (75%) にも導管周

表 2 Preventive effect of *in vitro* antibody treatment

Gland	Treatment	Mean grade of lesion ^{*1)} ($\pm$ SD)	% of prevention ^{*2)}
Parotid	Non	2.82 $\pm$ 0.37	—
	anti-CD4	0.14 $\pm$ 0.03**	95
	anti-CD8	2.76 $\pm$ 0.42	2
	anti-V β 8	0.20 $\pm$ 0.03**	93
	anti-V β 6	1.78 $\pm$ 0.32	37
Submandibular	Non	2.84 $\pm$ 0.44	—
	anti-CD4	0.17 $\pm$ 0.06**	94
	anti-CD8	2.67 $\pm$ 0.36	4
	anti-V β 8	0.22 $\pm$ 0.09**	92
	anti-V β 6	2.07 $\pm$ 0.31	27
Sublingual	Non	1.44 $\pm$ 0.30	—
	anti-CD4	0	100
	anti-CD8	14.1 $\pm$ 0.30	2
	anti-V β 8	0.09 $\pm$ 0.01*	94
	anti-V β 6	0.89 $\pm$ 0.21	38
Lacrimal	Non	3.00 $\pm$ 0.71	—
	anti-CD4	0	100
	anti-CD8	2.88 $\pm$ 0.44	4
	anti-V β 8	0.21 $\pm$ 0.02**	93
	anti-V β 6	2.31 $\pm$ 0.33	23

*P<0.05, P<0.01 ($\times^2$ test)

*1) Mean grade of lesion was expressed as the method of White & Caserett¹⁰⁾.

*2) % indicates mean grade of respective gland treated with antibodies versus that with no treatment.

囲性の巣状リンパ球浸潤を高頻度に認めることができた (図 1). これらの SCID マウスの他臓器には病理組織学的変化がみられないことから, GvH 反応の関与は否定できるものと考えられた.

一方, MRL/lpr マウス脾細胞を同数に調整し SCID マウスへ移入した群では肝・腎・肺・脾・消化管・唾液腺などに激しい瀰漫性の炎症所見がみられ, GvH 反応によるものと考えられた. また, その他の対照群ではいずれも SCID マウス諸臓器に 4 週群, 8 週群とも著変は認められなかった. トランスファーされた唾液腺病変の免疫組織化学的観察より浸潤細胞の主体が CD 4⁺ V β 8⁺ T 細胞であり, 少数の CD 4⁺ V β 6⁺ T 細胞をまじえていた (図 2). SCID マウス唾液腺組織を用いた RT-PCR 法により V β 8 遺伝子にもっとも強い発現を確認することができた (図 3).

SCID マウス末梢血単核細胞における免疫動態

を経時的に FACS 解析した結果から、細胞移入後 2 週目ですでに CD 3⁺ T 細胞 (37.0%), B 220⁺ B 細胞 (10.1%) とともに出現し、その後週齢とともに増加が認められた (図 4)。CD 4⁺ T 細胞は 2 週から 8 週までその数の増加がみられたが (9.1~19.3%), CD 8⁺ T 細胞は少数であった (2.0~6.6%) (図 5)。SCID マウス末梢血単核細胞を用いた RT-PCR 法によるサイトカイン mRNA の検索では IL-1 β , TNF α , IFN γ , IL-4 mRNA が 2 週目から、IL-6 mRNA が 4 週目からその発現が認められた。IL-10 mRNA の発現は 8 週目の末梢血にのみ認められたが、IL-12 mRNA はいずれの週齢でも発現が認められた (表 1)。

つぎに、モノクローナル抗体処理によってトランスファーが阻止できるか否かについて明らかにするため、MRL/lpr マウス顎下腺より分離した単核細胞を *in vitro* にて 37°C, 30 分補体共存下で抗体処理を行ったのち 1×10^6 を腹腔内に移入し、8 週後の病理組織学的変化を検索した。その結果、抗 CD 4 処理群では 94~100%, および抗 V β 8 処理群では 92~94% の病変のトランスファー阻止効果が認められた。一方、抗 CD 8 処理ではほとんどブロックされず、抗 V β 6 処理の効果も 30% 前後と低かった (表 2)。

考 察

シェーグレン症候群疾患モデルとしての MRL/lpr マウス自己免疫性唾液腺炎の局所から分離した単核細胞を SCID マウス 腹腔内へ投与し、自己免疫性病変のトランスファーを試みた。

細胞移入後 4 週群には全身諸臓器にまったく変化はみられなかったが、8 週群の SCID マウスにおいて耳下腺・顎下腺・舌下腺の唾液腺のみならず涙腺にも導管周囲性の巣状リンパ球浸潤を高頻度に認められ、シェーグレン症候群モデルの SCID マウスへのトランスファーが成立した。さらに、SCID マウスへトランスファーされた病変の免疫組織化学的観察より浸潤リンパ球の主体が CD 4⁺ V β 8⁺ T 細胞であり、RT-PCR 法によって TCRV β 8 遺伝子の強い発現が確認されたことから、自己免疫病変の発症に関与する自己反応性 T 細胞の TCR の V β usage が比較的限定されてい

ることが明らかとなった。

MRL/lpr マウスに自然発症する唾液腺炎局所 (顎下腺) から分離した単核細胞を SCID マウス腹腔内へ移入することにより、唾液腺炎のみならず涙腺炎の再構築も認められた。このことは、T 細胞とともに移入された抗原提示細胞が唾液腺・涙腺に共通する臓器特異的な未知の抗原ペプチドをクラス II 分子とともに CD 4⁺ T 細胞に提示し、活性化された T 細胞が各種のサイトカインなどを産生し、autocrine 機構も関与した増殖が誘発された結果、SCID マウス唾液腺・涙腺の組織破壊がもたらされたものと考えられる。

そのメカニズムの一端を明らかにするため、細胞移入後トランスファーの成立する 8 週まで SCID マウス末梢血を採取して、その単核細胞を経時的に観察した。その結果、移入後 2 週から CD 3⁺ CD 4⁺ T 細胞および B 220⁺ B 細胞が確認され週齢とともに増加がみられた。さらに、サイトカイン mRNA の検索では IL-1 β , TNF α , IFN γ , IL-4 mRNA が 2 週目から、IL-6 mRNA が 4 週目からその発現が認められた。

IL-1 β や TNF α は生体内で IL-6 産生を誘導することはよく知られ¹¹⁾、IL-6 は effector molecule として B 細胞の抗体産生を亢進するとともに、キラー T 細胞の分化を誘導することが明らかにされている¹²⁾。また IL-12 mRNA はいずれの週齢でも発現が認められ、レシピエント生体内で T 細胞の増殖や IFN γ の産生誘導に働いているものと考えられる¹³⁾。

これら唾液腺浸潤細胞を移入された SCID マウス生体内に認められたサイトカイン産生異常が本実験におけるトランスファーの成立、すなわち自己反応性 T 細胞の局所への病態形成に積極的に関与していることが明らかとなった。

従来までの SCID マウスを用いた原因不明のヒト疾患の究明は、患者リンパ球の移入による自己抗体の産生や病理組織変化など疾患の一部を再現することが可能であることを明らかにしている^{2,3)}。しかし、病態を表現する病理組織像としての原疾患が SCID マウスへ再構築されたという報告は、多発性硬化症患者髄液中の単核細胞を SCID 髄腔内へ移入した実験のみである¹⁴⁾。

本実験による SCID マウスへのトランスファー

の成立はシェーグレン症候群唾液腺炎・涙腺炎の発症には自己抗原に反応する自己反応性T細胞を主体とした自己免疫的メカニズムがもっとも中心的な役割を果たしていることをはじめて実証したものと考えられる。

さらに、T細胞およびT細胞レセプターに対するモノクローナル抗体処理により、SCID マウスへのトランスファーが阻止できるか否かについて検討した結果、抗CD4処理群で94~100%、およびV β 8処理群で92~94%の阻止効果が認められた。この事実はシェーグレン様病変のSCIDマウスへのトランスファーにはCD4⁺V β 8⁺T細胞がたしかに主役を演じており、それぞれ抗体処理によって発症が阻止されたことは*in vivo*における抗体投与による疾患特異的治療の可能性が示唆された。

実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)の実験系においてはすでに限定されたTCRに対する抗体投与やTCRのペプチド接種により発症が予防されることが明らかにされており^{15,16)}、シェーグレン症候群においても治療の効果の可能性が期待される。このトランスファーシステムの確立によって様々な細胞接着分子やサイトカインに対する抗体投与など実験的治療の試みが可能であり、現在検討を開始している。

文 献

- 1) Bosma, G.C., Custer, R.P., Bosma, M.J. : A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature* 345 : 344-346, 1983.
- 2) Duchosal, M.A., McConahey, P.J., Robinson, C.A. et al. : Transfer of human systemic lupus erythematosus in severe combined immunodeficient mice. *J. Exp. Med.* 172 : 985-988, 1990.
- 3) Tighe, H., Silverman, J.G., Kotzin, F. et al. : Auto-antibody production by severe combined immunodeficient mice reconstituted with synovial cells with rheumatoid arthritis patients. *Eur. J. Immunol.* 20 : 1843-1848, 1990.
- 4) Bloch, K.J., Buchanan, W., Wohl, W.M., Bunim, J. : Sjögren's syndrome : a clinical, pathological and serological study of sixty two cases. *Medicine* 44 : 187-231, 1965.
- 5) Moutsopoulos, H.M., Chused, T.M., Mann, D.L. et al. : Sjögren's syndrome (sicca syndrome) : current issues. *Ann. Int. Med.* 92 : 212-226, 1980.
- 6) Hoffman, R.W., Alspaugh, M.A., Waggle, K.S. : Sjögren's syndrome in MRL/l and MRL/n mice. *Arthritis & Rheum.* 27 : 157-165, 1984.
- 7) Jonsson, R., Tarkowski, A., Bachman, K. et al. : Sialadenitis in the MRL/l mouse : morphological and immunohistochemical characterization of resident and infiltrating cells. *Immunology* 60 : 611-616, 1987.
- 8) Hayashi, Y., Haneji, N., Hamana, H. : Pathogenesis of Sjögren's syndrome-like autoimmune lesions in MRL/lpr mice. *Pathol. Int.* 44 : 559-568, 1994.
- 9) Hamano, H., Saito, I., Haneji, N. et al. : Expression of cytokine genes during development of autoimmune sialadenitis in MRL/lpr mice. *Eur. J. Immunol.* 23 : 2387-2391, 1993.
- 10) White, S.C., Casarett, G.W. : Induction of experimental autoallergic sialadenitis. *J. Immunol.* 112 : 178-185, 1974.
- 11) Boswell, J.M., Yui, M.A., Burt, D.W. et al. : Increased tumor necrosis factor and IL-1 β gene expression in the kidneys of mice with lupus nephritis. *J. Immunol.* 141 : 3050-3054, 1988.
- 12) Horii, Y., Myraguchi, A., Iwano, M. et al. : Involvement of IL-6 in mesangial proliferative glomerulonephritis. *J. Immunol.* 143 : 3949-3955, 1989.
- 13) Schmit, E., Hoehn, P., Germann, T., Rude, E. : Differential effect of interleukin-12 on the development of naive CD4⁺ T cells. *Eur. J. Immunol.* 24 : 343-347, 1994.
- 14) Saeki, Y., Mita, T., Sakoda, S. et al. : Transfer of multiple sclerosis into severe combined immunodeficiency mice by mononuclear cells from cerebrospinal fluid of the patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89 : 6157-6161, 1992.
- 15) Archa-Orbea, H., Mitchell, O.J., Timmermann, L. et al. : Limited heterogeneity of T cell receptors from lymphocytes mediating autoimmune encephalomyelitis allows specific immune intervention. *Cell* 54 : 263-273, 1988.
- 16) Vandenbark, A.A., Hashim, G., Offner, H. : Immunization with a synthetic T-cell receptor V-region peptide protects against experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nature* 341 : 541-544, 1989.