自己免疫性外分泌腺炎マウスに対する 抗 IL-10 抗体の投与効果の検討

石田 博・柳田英寿・土橋浩章*

mini-review article

JAPANESE JOURNAL OF INFLAMMATION

Continuous anti-IL-10 antibody administration prevents alymphoplasia mice from autoimmune exocrinopathy

ALY (alymphoplasia) /aly mutant (ALY) mice were established as an animal model for immunodeficiency bearing an autosomal recessive gene with lack of lymph nodes and immunoglobulin especially IgA. Recently, Tsubata reported ALY mice exhibited autoimmune multiple exocrinopathy that strikingly resembles human Sjogren's syndrome. Since the ALY mice lack conventional B cells, they had relatively abundant CD5⁺B cells producing IL-10 constitutively in lymphoid organs. IL-10 is a soluble protein produced by helper T (Th) cells, macrophages (M ϕ), and B cells, that exhibits a wide array of both immunosuppressive and immunostimulatory properties.

In order to explore the pathological significance of IL-10 in autoimmune exocrinopathy, ALY mice were administered either anti-IL-10 or isotype control antibody continuously from 8 to 24 weeks. At 24 weeks, we sacrificed them and subjected the exocrine organs to pathological examinations.

Inflammatory changes in lacrimal and salivary glands were significantly reduced by anti-IL-10 antibody treatment in ALY mutant mice. These results suggest that IL-10 might be involved in the pathophysiology in multiple autoimmune exocrinopathy in ALY mutant mice.

Rec. 2/27/1998, Acc. 3/10/1998, pp 205~209

*Hiroshi Ishida・Hidetoshi Yanagida・Hiroaki Dobashi**

key words : *alymphoplasia mouse, autoimmune exocrinopathy, interleukin-10, interferon γ , Sjogren's syndrome*

自己免疫性外分泌腺炎を主徴とするシェーグレン症候群 (Sjogren's syndrome : SS) などの自己免疫疾患の発症あるいは病態形成においては、各種免疫担当細胞から産生されるサイトカインが関与していると考えられている¹⁾。すなわち免疫応答を規定する中心的役割を担うヘルパー T 細胞

は、そのサイトカイン分泌パターンにより、IL-2 や IFN γ を産生する「Th1」と IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 を産生する「Th2」の 2 亜群に分類される²⁾。この Th1 と Th2 は、相互に抑制回路を介してバランスを保ちながら、生体の恒常性を維持している。

SS などの全身性自己免疫疾患は、Th2 優位の免疫応答によりその病態が形成されていると考えられている³⁾。実際、全身性エリテマトーデス (SLE) のモデルマウスである NZB/WF₁ マウスにおいても、IFN γ や IL-10 がその病態形成に関

* Department of Clinical Immunology, Clinical Research Center, National Utano Hospital 国立療養所宇野病院内科・臨床研究部

Offprint requests to : Hiroshi Ishida, Department of Clinical Immunology, Clinical Research Center, National Utano Hospital, 8 Ondoyama-cho, Narutaki, Ukyo-ku, Kyoto 616-8255, Japan

表 1 炎症性病変の病理組織学診断グレード

Organs	Grade	Histological findings
Pancreas	0	No visible change
	1	Focal accumulation of lymphoid cells
	2	Focal accumulation of lymphoid cells with the evidence of tissue damage
	3	Extensive lymphoid cell infiltration with tissue damage(<30%)
	4	Replacement by adipose tissue(>50%)
Salivary and lacrimal gland	0	No visible change
	1	Focal accumulation of lymphoid cells
	2	Focal accumulation of lymphoid cells with tissue damage

与していることが明らかになっている。自己免疫疾患はこの Th1/Th2 のバランスが崩れた病態と考えられる⁴⁾。しかし、ヒト自己免疫疾患の病態形成には完全に Th1/Th2 バランスでは説明できない面もある。ヒト SS でも局所において mRNA レベルにおける、IFN γ や IL-10 が病態形成に関与する報告がなされている。

目 的

そこで、もともと免疫不全マウスとして同定された突然変異 alymphoplasia (ALY) マウスは⁵⁾、リンパ節および腸管のパイエル板を欠損するのみならず、14 週齢以降に加齢とともに涙腺・唾液腺・膵外分泌腺などの臓器に自己免疫性外分泌腺炎を自然発症することが判明し、SS のモデルマウスになりうる可能性が示唆された⁶⁾。加えて、この ALY マウスにおいては conventional B 細胞が減少しているため、相対的に CD5 陽性 B 細胞が増加している。CD5 陽性 B 細胞は構成的に IL-10 を産生するので、ALY マウスに認められる外分泌腺炎の発症や病態形成への関与を検討することを目的にして、抗 IL-10 中和抗体あるいは抗 IFN γ 中和抗体を頻回投与を行い、内因性 IL-10 あるいは IFN γ を阻害して、その投与効果を検討した。

材料と方法

(1) マウス

ALY (aly/aly) マウスは、常染色体劣性単一遺伝子 aly によって支配されている突然変異免疫不

全マウスで、8 週齢の雌を日本クレア社より購入した。血清中の IgA 値を測定して、ホモ接合体であることを確認した。

(2) 抗サイトカイン中和抗体

マウス IL-10 に対する中和抗体は、米国の DNAX 研究所の John Abrams 博士らによって樹立されたラット IgG₁ 抗マウス IL-10 抗体「JES5-2A5」を用い⁷⁾、マウス IFN γ に対する中和抗体は「XMG 1.2」を用いた。患与されたハイブリドーマ細胞を nude あるいは scid マウスの腹腔内に注入し、腹水より硫酸アンモニウム塩析法にて精製し、カラムにて純度 95% 以上に純化したものを用いた。エンドトキシン高値のものは、カラムによりエンドトキシンを除去した。コントロール抗体は、 β ガラクトシダーゼに対するラット IgG₁ 抗体 (GL113) を用いた。

(3) 抗体投与方法

ALY マウスに対して、抗 IL-10 中和抗体、抗 IFN γ 中和抗体あるいはコントロール抗体を 0.5 mg をエンドトキシンフリーのリン酸緩衝食液 (PBS) にて溶解し、8 週齢から 24 週齢まで週 2 回腹腔内投与を行った。

(4) 効果判定法

24 週齢にて抗体投与 ALY マウスを屠殺し、膵臓、肺、唾液腺、涙腺などの組織を摘出し、病理組織学的検討を行い、その投与効果を判定した。病理組織の grade の基準は表 1 の判定基準によって行った。

図 1 ALY マウスにおける唾液腺炎の重症度
ALY ホモマウスに、抗体を8週齢より24週齢まで投与し、24週齢で屠殺して唾液腺を摘出し、病理医にブラインドで組織学的重症度をスコア判定してもらった。

○：コントロール抗体投与群，●：抗 IFN γ 抗体投与群，▲：抗 IL-10 抗体投与群

図 2 ALY マウスにおける涙腺炎の重症度
ALY ホモマウスに、抗体を8週齢より24週齢まで投与し、24週齢で屠殺して涙腺を摘出し、病理医にブラインドで組織学的重症度をスコア判定してもらった。

○：コントロール抗体投与群，●：抗 IFN γ 抗体投与群，▲：抗 IL-10 抗体投与群

結 果

(1) 抗 IL-10 中和抗体および抗 IFN γ 抗体投与

ALY マウスでは、コントロール抗体投与 ALY マウスに比して、唾液腺(図 1)、涙腺(図 2)および腭外分泌腺(図 3, 4)の炎症が有意に軽減していた。

(2) 抗 IL-10 中和抗体および抗 IFN γ 抗体投与

ALY マウスでは、コントロール抗体投与 ALY マウスに比して、肺の血管周囲のリンパ球浸潤が軽減していた(図 5)。

考 察

ヒト SS は原因不明の全身性自己免疫疾患で、乾燥症状や腺外病変に対して効果的な治療法も確立されておらず、難治性疾患である。慢性関節リウマチとの合併症などもあり、患者数は他の膠原病に比して有意に多いにもかかわらず、臨床場においては対症療法に甘んじているのが現状である。この SS の病因・病態解明こそが望まれており、これまでいろいろなアプローチがなされてきたが、画期的なものは少ない。

この意味で、モデル動物を用いた病態解析は重要な手がかりとなる。従来より、誘発モデル動物

図 3 ALY マウスにおける腭外分泌腺炎の重症度

ALY ホモマウスに、抗体を8週齢より24週齢まで投与し、24週齢で屠殺して腭臓を摘出し、病理医にブラインドで組織学的重症度をスコア判定してもらった。

○：コントロール抗体投与群，●：抗 IFN γ 抗体投与群，▲：抗 IL-10 抗体投与群

および他の自己免疫疾患の合併モデルはいくつか報告があったが、自然発症モデルとしては、筆者らの報告した ALY マウスは、SS のモデルとしてはきわめて有用である⁶⁾。

従来より、SS は Epstein-Barr ウイルス (EBV) との関連性が指摘されている。ウイルス型サイトカインの一種である IL-10 も、EBV の open

図4 ALY マウスにおける膵外分泌腺炎の組織像
コントロール抗体投与群(左)では、外分泌腺に炎症細胞浸潤を認めたが、抗 IL-10 抗体投与群(右)では炎症は認めなかった。

図5 ALY マウスにおける肺血管周囲炎症細胞浸潤

ALY ホモマウスに、抗体を8週齢より24週齢まで投与し、24週齢で屠殺して肺を摘出して、病理医にブラインドで組織学的重症度をスコア判定してもらった。

○：コントロール抗体投与群，●：抗 IFN γ 抗体投与群，▲：抗 IL-10 抗体投与群

reading frame の一種である BCRF1 と相同性が高い⁸⁾。SS のモデルマウスである ALY 変異マウスに、抗 IL-10 中和抗体を継続的に投与したところ、病変が軽減したことより、IL-10 が SS の自己免疫性外分泌炎の病態形成に関与している可能性

が強く示唆された。筆者らはすでに、SLE のモデルマウスである NZB/WF₁ マウスに対して抗 IL-10 中和抗体を継続的に投与すると、ループス腎炎が軽減することを明らかにした⁹⁾。

最近、IL-10cDNA をアミラーゼの発現プロモーターにつないで、唾液腺で IL-10 を過剰発現させた IL-10 トランスジェニックマウスにおいて唾液腺炎が発症することが確認されている(林・斉藤ら私信)。

また、IFN γ も SLE のモデルマウスのループス腎炎を増悪させることが明らかになっている。自己免疫性外分泌炎のモデルマウスである ALY 変異マウスに、IFN γ 中和抗体を継続的に投与したところ、病変が軽減したことより、IFN γ も自己免疫性外分泌炎の病態形成に関与している可能性が強く示唆された。

さらに、ヒト SS 患者の IL-10 および IFN γ の病態形成に関与している可能性についても、今後の検討を要するが、血清中サイトカイン濃度のパターンでは矛盾しない結果を得ている¹⁰⁾。加えて、ヒト SS 患者の小唾液腺において IL-2、IL-10、IFN γ などの mRNA が増加しているとの報告¹¹⁾

にも合致する。

臓器特異的な自己免疫疾患においては Th1 優位の免疫応答によって形成されることには、動物モデルやヒト臨床材料における検討で確認されている。これに対して、SS や SLE などの全身性自己免疫疾患では、Th2 優位の免疫応答により形成されていることはおおむね受け入れられているものの、IFN γ の関与は上述のように否定できない。また IL-10 についてもヒト Th 細胞では Th2 細胞のみならず Th1 細胞からも産生されることが判明している。この意味でも、本モデルにおける知見からも、全身性自己免疫疾患は Th2 > Th1 の免疫応答によって形成されることを認めざるをえない。

今後、IL-10 や IFN γ に対する阻害剤の開発および臨床応用が強く望まれる。

本研究の一部は、厚生省特定疾患に関する免疫研究班(山本班)および財団法人清水免疫学振興財団・財団法人内藤記念科学振興財団の助成によるものである。

文 献

1) 熊谷俊一, 梅原久範, 石田 博・他: リンフォカイン

- と自己免疫疾患. *Med. Immunol.* 15: 401-410, 1989.
- 2) Mosmann TR: Cytokine secretion patterns and cross-regulation of T cell subsets. *Immunol. Res.* 10: 183-188, 1991.
- 3) 石田 博, 大田博之, 柳田英寿・他: Th1 介在自己免疫病と Th2 介在自己免疫病. *日本臨床* 55: 1438-1443, 1997.
- 4) 石田 博: インターロイキン 10 と自己免疫. *リウマチ* 34: 795-803, 1994.
- 5) Miyawaki S, Nakamura Y, Suzuka H et al.: A new mutation, *aly*, that induces a generalized lack of lymph nodes accompanied by immunodeficiency in mice. *Eur. J. Immunol.* 24: 429-434, 1994.
- 6) Tsubata R, Tsubata T, Hiai H et al.: Autoimmune disease of exocrine organs in immunodeficient *alymphoplasia* mice: a spontaneous model for Sjogren's syndrome. *Eur. J. Immunol.* 26: 2742-2748, 1996.
- 7) Abrams JS, Roncarolo MG, Yssel H et al.: Strategies of anti-cytokine monoclonal antibody development: Immunoassay of IL-10 and IL-5 in clinical samples. *Immunol. Rev.* 127: 5-24, 1992.
- 8) Moore KW, Vieira P, Fiorentino D et al.: Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRF1. *Science* 248: 1230-1234, 1990.
- 9) Ishida H, Muchamuel T, Sakaguchi S et al.: Continuous administration of anti-IL-10 antibodies delays onset of autoimmunity in NZB/WF₁ mice. *J. Exp. Med.* 179: 305-310, 1994.
- 10) 石田 博, 大田博之, 柳田英寿・他: サイトカインと自己免疫. *内科* 80: 51-55, 1997.
- 11) Fox RI, Kang H, Ando D et al.: Cytokine mRNA expression in salivary gland biopsies of Sjogren's syndrome. *J. Immunol.* 152: 5532-5539, 1994.