

図3. 筋芽細胞におけるCD40架橋刺激によるサイトカイン産生亢進

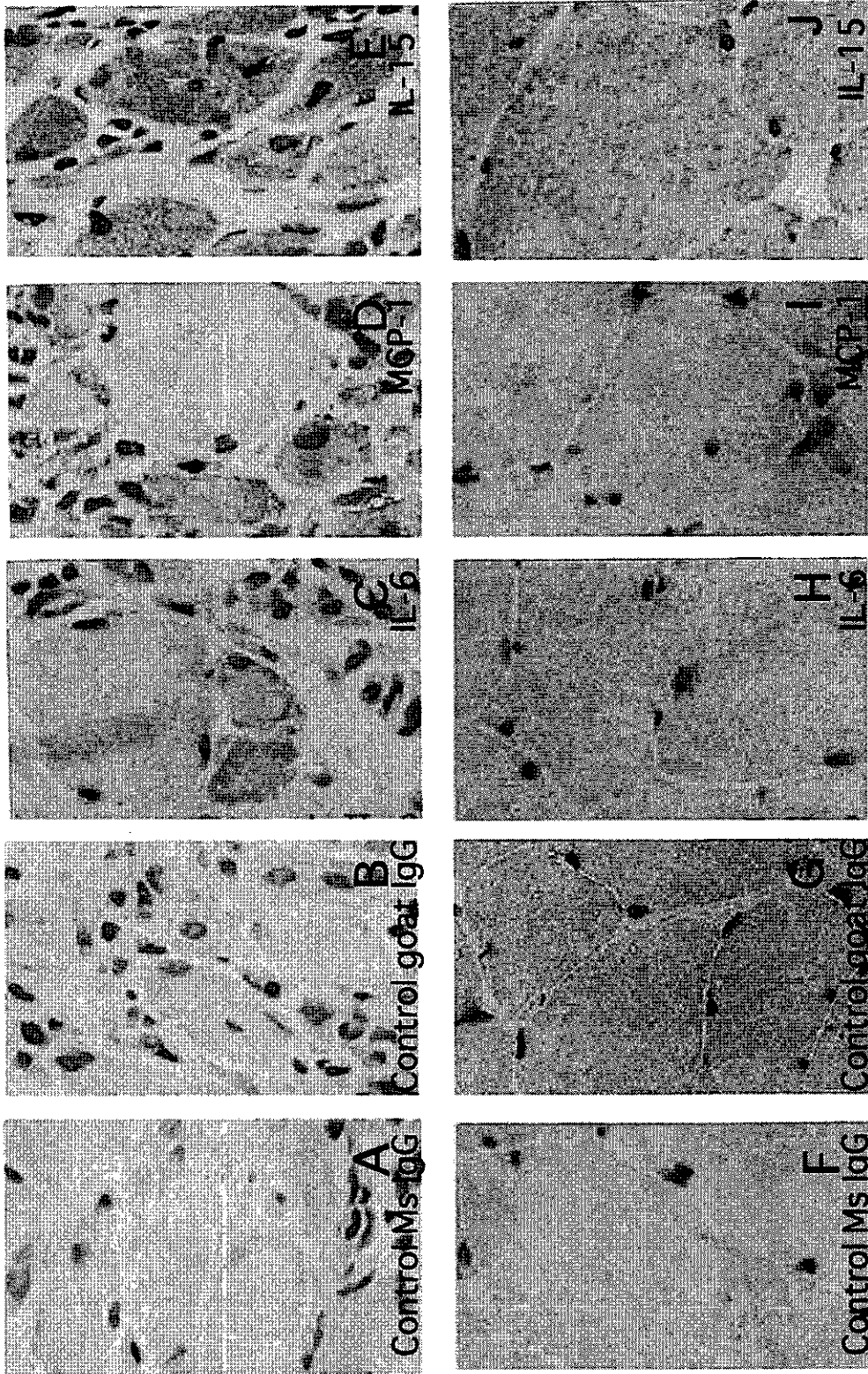


図4. 筋組織におけるサイトカインの発現

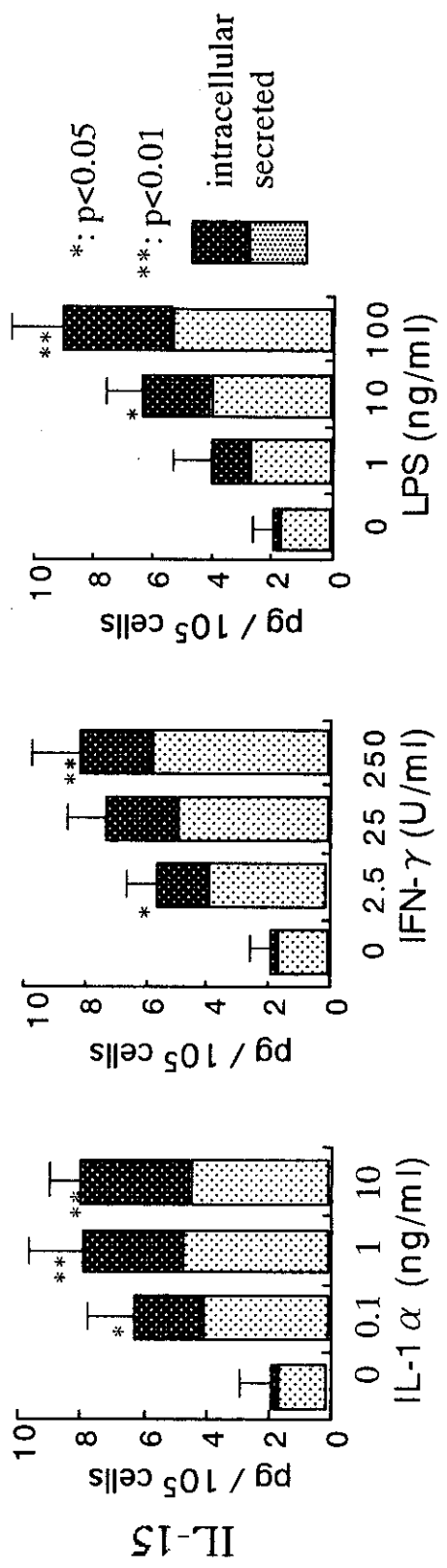


図5. 培養筋芽細胞におけるIL-15の産生

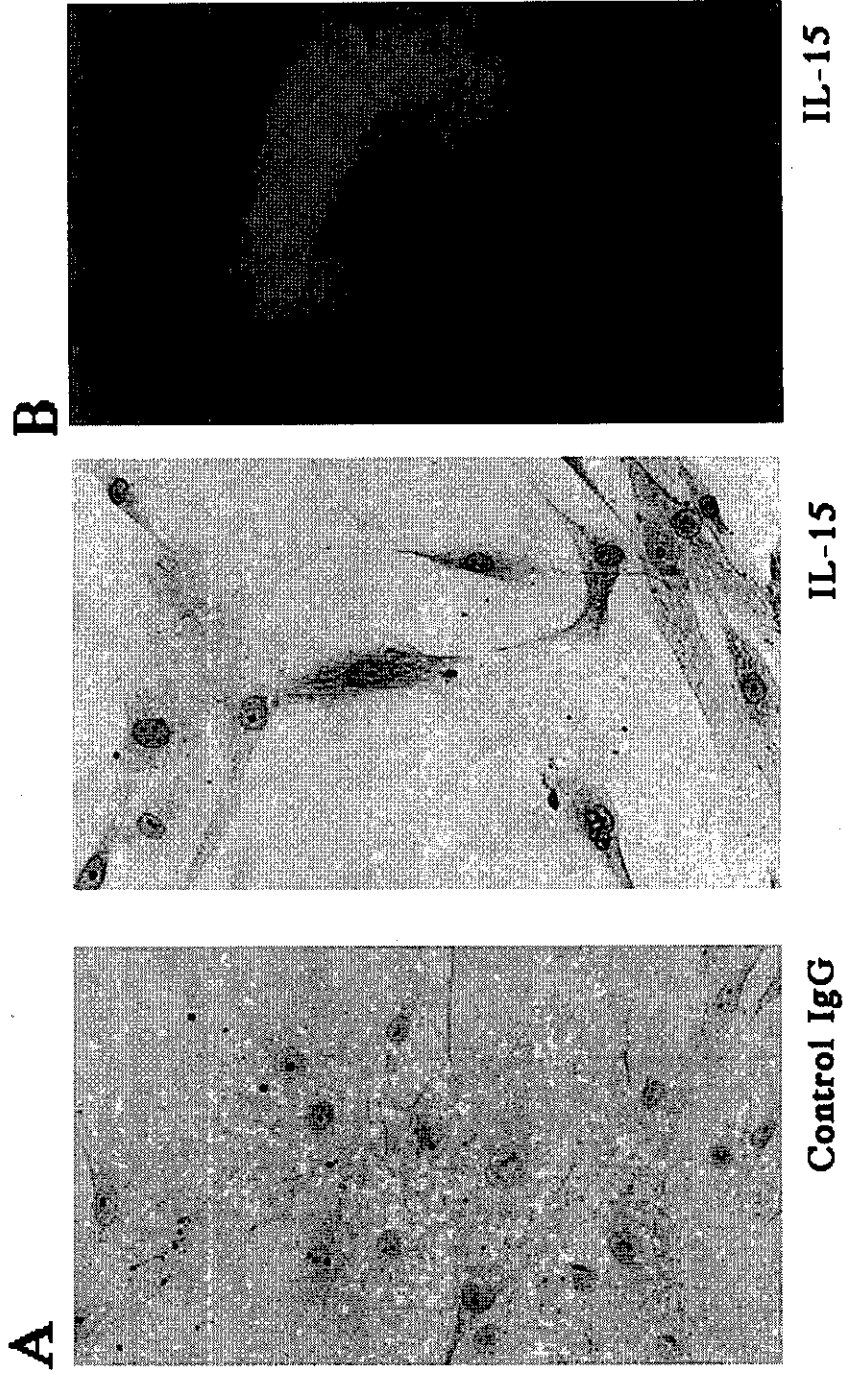


図6. 培養筋芽細胞におけるIL-15の発現

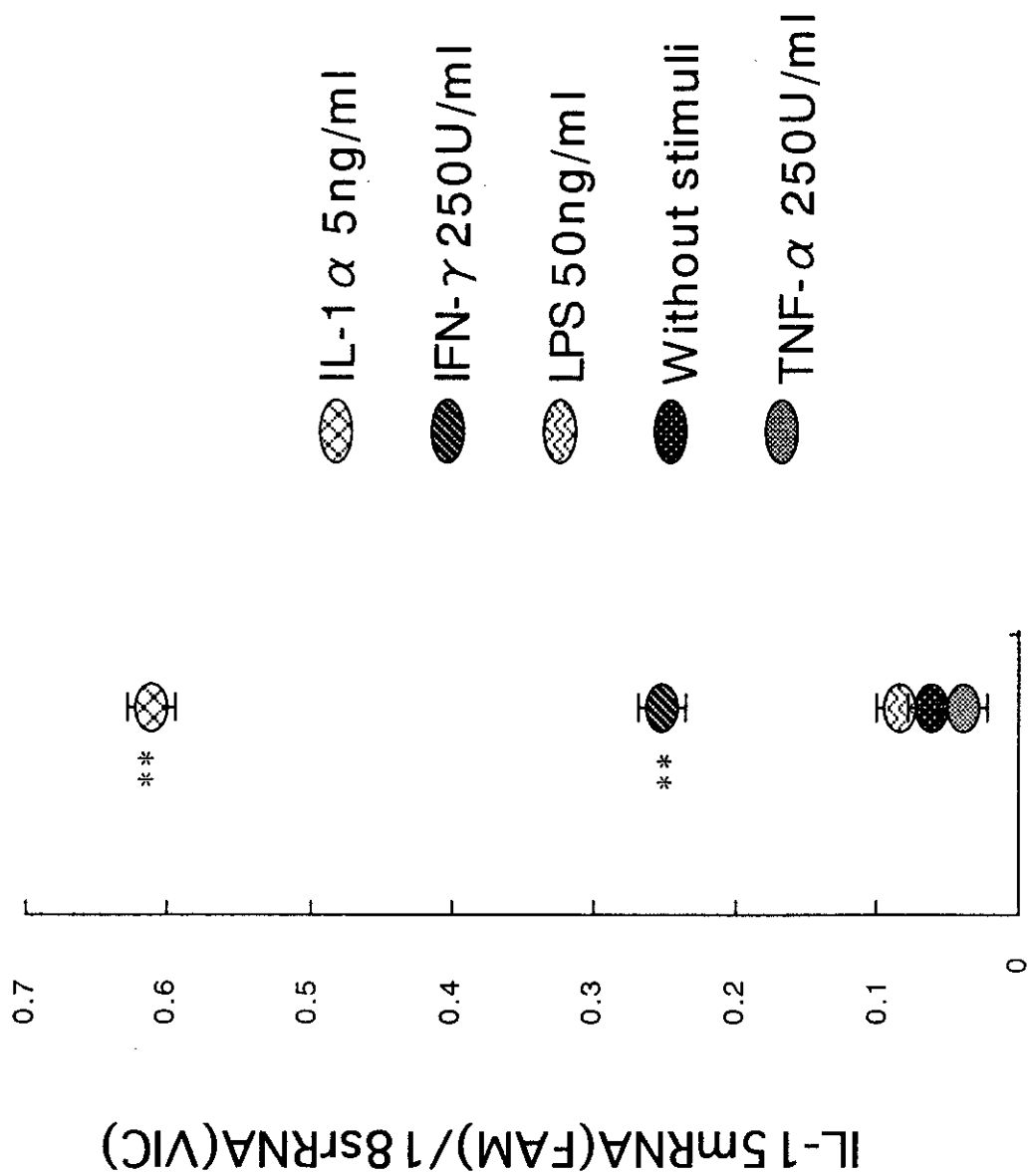


図7.培養筋芽細胞におけるサイトカイン、LPS刺激
6時間後のIL-15mRNA発現量の変化

炎症性筋疾患における ARC (apoptosis repressor with caspase recruitment domain) の発現異常について

研究協力者： 當間 重人
(国立相模原病院 リウマチ内科)

研究要旨

ARC (apoptosis repressor with caspase recruitment domain) は筋組織で特異的に発現し、caspase-8 に結合しその作用を抑制することで筋細胞のアポトーシスを抑制する分子である。多発性筋炎や皮膚筋炎の筋生検での ARC 分子の発現を RT-PCR 法により検討したところ、完全長の ARC の発現は認められず、代わりに short forms の発現が認められた。

一方、末梢神経障害患者や強皮症に伴う筋炎患者では完全長の ARC の発現を認めた。完全長 ARC の発現消失が筋細胞のアポトーシスを誘導を介して、多発性筋炎や皮膚筋炎の病態形成に関与する可能性が考えられる。

A. 研究目的

ARC (apoptosis repressor with caspase recruitment domain) と Nop30 (nucleolar protein of 30kDa) は同一遺伝子によりコードされ、その違いはスプライシングの際に、3'のアクセプターは共通であるが、異なる5'ドナー site が使われるために生じる。

ARC は caspase recruitment domain を有する遺伝子として Nunez らにより、同定された分子であり、筋肉で特異的に発現し、caspase-8 に結合しその作用を抑制することで Fas や TNF α を介する筋肉のアポトーシスを抑制することが示されている。一方、Nop30 は、Stamm らにより、Splicing factor である SRp30c と相互作用する分子として同定された。Nop30 も筋肉でのみ発現する分子で、強制発現により RNA の alternative splicing のパターンを変えることから Nop30 もスプライシングに関与すると分子と考えられている。

炎症性筋疾患の病因は不明であるが、筋細胞の障害機転にアポトーシスによる細胞死

が関与している可能性が指摘されている。本研究の目標は炎症性筋疾患におけるアポトーシスの意義を検討するとともに、ARC 等の筋組織特異分子の自己抗原性の有無や変異の意義を検討することにあるが、今回の研究の目的は ARC の機能不全によるアポトーシス感受性の亢進が、炎症性筋疾患の病態形成に関与している可能性を考え、その発現パターンを筋生検サンプルで検討することである。

B. 研究方法

今回、皮膚筋炎 (DM) 5 例、多発性筋炎 (PM) 4 例、全身性強皮症 (SSC) 3 例、全身性側索硬化症 (ALS) 1 例、横紋筋融解症 1 例、サルコイドーシス 1 例、炎症性筋炎 2 例、計 17 名のサンプルについて検討した。平均年齢は 50.4 才、男性 6 例、女性 11 例であった。横紋筋融解症と筋萎縮性側索硬化症、以下 ALS を除いて、他はすべて病理学的に myogenic pattern である筋線維横断面の大小不同を認め、また、血管周囲あるいは筋線維周囲に炎症細胞の浸潤を認めた。ARC

の発現解析のために筋生検サンプルより RNA を抽出し、ARC/Nop30 に特異的なプライマーを用いて RT-PCR を施行した。PCR のプライマーには ARC の start codon を含む downstream primer と stop codon を含む upstream primer を用いた。得られた PCR 産物は TA クローニングベクターにサブクローニングし、それぞれの塩基配列を決定した。

C. 研究結果

RT-PCR により ARC/Nop30 は複数のバンドとして検出された。外側のプライマーセットおよび、より内側のプライマーセットを用いた RT-PCR で複数本認められたバンドのサイズは、プライマー位置を内側にずらすことで、それに応じて小さくなることが示された。サザンプロット法にてこれらのバンドは、ARC と Nop30 に共通の短い N 末に相当する DNA プローブとハイブリダイズした。従ってこれらの複数のバンドは ARC/Nop30 に関連したシーケンスを有するものと考えられる。

炎症性筋疾患患者で ARC/Nop30 の発現を検討したところ、完全長の ARC の出現は稀であることが明らかとなった。すなわち、完全長の ARC/Nop30 が発現していたのは、SSc に合併した筋炎の 3 例のみで、他は完全長よりも短いバンドが 1 本ないし複数本認められた。これらには PM, DM の他に神経原性である ALS のサンプルも含まれており、完全長 ARC の消失は PM や DM に特異的な変化ではなかった。short form の出現パターンは PM と DM で一定の傾向はなかった。疾患コントロールとして末梢神経障害患者の神経筋生検より同様の検討をしたところ、全例で完全長の ARC/Nop30 の発現が確認された(班会議後のデータ)。

次にこれらの short form の構造について検討した。ARC/Nop30 の PCR 産物を TA ベクターに組み込み、1 症例につき 7~8 個

のクローンを単離し、その塩基配列を決定した。その過程でエチジウム染色では判別できなかったマイナーなクローンも単離された。次にそれぞれのクローンの塩基配列を解析したところ、これらは塩基配列の欠損したクローンであることが判明した。

最も普遍的に認められたクローンは GT-AG rule に従って exon 内の cryptic splicing donor site が使用されたと考えられる塩基配列を有し、読み枠のずれにより、ストップコドンが早期に出現するため、ARC/Nop30 に共通の短い N 末に相当するものであった (type I)。他に、type II (GT-AG rule に従って exon 内の cryptic splicing donor site が使用されて生じた Nop30 の欠損型)、type IV (ARC の読み枠を保持した欠損型で、exon 内の cryptic splicing donor/acceptor site が使用されたと考えられるパターンであるが、skip したのは GT-AG ではなく、GC-AG)、intron retention type (splicing site に変異は認められず)などが検出された。なお、今回検討した範囲で coding region の ARC に遺伝的多形性は検出されなかった。

D. 考察

今回の検討により、ARC/Nop30 には RNA レベルで様々なサブタイプが存在することが明らかとなり、さらに、PM, DM では完全長の ARC/Nop30 が発現していないことが明らかとなった。すなわち、17 例の筋生検サンプルにおいて ARC/Nop30 は 1 本または複数のバンドとして検出され、強皮症の 3 例を除き、完全長の ARC の出現は稀であり、最も多く認められたパターンは ARC と Nop30 の短い N 末に相当する分子であった。17 例中 SSc に併発した筋炎 3 例すべてで完全長の ARC が検出されたことは興味深いと考えられる。また 1 例での検討ではあるが、ALS でも完全長の ARC は消失しており、myogenic であれ neurogenic であれ、筋生

検を要した多くの筋疾患で RNA レベルにおいて wild type ARC 発現は消失していた。これらの short form は蛋白に翻訳された場合に ARC や Nop30 の機能を阻害する可能性がある。すなわち、神経由来の myotrophic factor の減少や、炎症細胞によるアポトーシス誘導因子増加などにより、wild type ARC の発現低下と変異 ARC 分子の出現が生じ、その結果、筋肉にアポトーシスが生じて、筋肉の障害に至るといふ仮説を考えることが可能である。このようなケースでは intact な ARC 遺伝子の導入による遺伝子治療が有効である可能性がある。また、今回の検討の範囲では ARC や Nop30 に SNP は検出されなかったが、さらに検討を進めて、ARC の発現パターンに個人差が認められたり、SNP が検出された場合には、特発性筋疾患や薬剤性筋障害などに関してその発症の予見に関する情報が得られる可能性もある。今後、これらの症例におけるアポトーシスの関与をさらに症例数を増して検討する共に、正常筋肉での検討を進め、完全長 ARC の欠損や変異 ARC 分子が筋アポトーシスに与える影響や、その発現機序、同分子の自己抗原性について検討したいと考えている。

E. 結論

PM, DM では完全長の ARC/Nop30 は発現しておらず、アポトーシス抑制分子である ARC の消失が PM, DM の筋細胞障害機転に関与している可能性が示唆される。

F. 参考文献

- 1) Koseki T, Inohara N, Chen S, Nunez G: ARC, an inhibitor of apoptosis expressed in skeletal muscle and heart that interacts selectively with caspases. *Proc Nat Acad Sci* 95:5156-60,1998..
- 2) Stoss O, Schwaiger FW, Cooper TA, Stamm S; Alternative splicing determines the intracellular

localization of the novel nuclear protein Nop30 and its interaction with the splicing factor SRp30c. *J Biol Chem.* 274:10951-62,1999.

3) Sandri M, Carraro U: Apoptosis of skeletal muscles during development and disease. *Int J Biochem Cell Biol* 31:1373-90,1999.

4) Sugiura T, Murakawa Y, Nagai A, Kondo M, Kobayashi S: Fas and Fas ligand interaction induces apoptosis in inflammatory myopathies: CD4+ T cells cause muscle cell injury directly in polymyositis. *Arthritis Rheum* 42:291-8,1999.

5) Bialik S, Geenen DL, Sasson IE, Cheng R, Horner JW, Evans SM, Lord EM, Koch CJ, Kitsis RN: Myocyte apoptosis during acute myocardial infarction in the mouse localizes to hypoxic regions but occurs independently of p53. *J Clin Invest* 100:1363-72,1997.

プリスタン(pristane)投与による正常マウスにおける 筋炎特異自己抗体産生誘導に関する研究

研究協力者： 平形道人
(慶應義塾大学医学部内科学リウマチ研究室)

研究要旨

抗 SRP 抗体, 抗アミノアシル tRNA 合成酵素抗体などの筋炎特異自己抗体は特徴的臨床像と密接に関連し, 診断, 病型分類, 症状発現の推測など臨床的に有用なばかりでなく, 病因・病態を考える上でも大切である。しかし, その産生機序は不明である。本研究は, SLE 特異自己抗体などを誘導することが明らかとなったプリスタンを 14 種の正常マウス系(B6, B10, BALB/c, C3H, CBA 系など)に投与し, 免疫沈降法により筋炎特異自己抗体産生を追究した。抗 SRP 抗体, 抗 OJ 抗体を含む抗 tRNA 関連自己抗体がプリスタン投与後の B6, BALB/c などの正常マウス血清に検出された。この結果は, ある環境要因に曝露された正常マウスにおける筋炎特異自己抗体の産生が示している。本動物モデルは筋炎特異自己抗体産生に対する, 遺伝, 環境因子の役割を追究する上で有用と考えられた。

A. 研究目的

再燃性, 重症筋炎と関連する抗シグナル認識粒子(signal recognition particle:SRP)抗体や, 間質性肺炎併発筋炎と関連する抗アミノアシル tRNA 合成酵素(aminoacyl tRNA synthetase:ARS)抗体などの筋炎特異自己抗体は多発性筋炎・皮膚筋炎(PM/DM)の診断, 病型分類, 臨床経過の推測など臨床的に有用で, 病態との関連性からも注目されている¹⁾。しかし, 筋炎特異自己抗体の産生機序は不明であり, これらの自己抗体を産生するモデル実験動物についての報告もほとんどない。本研究は筋炎特異自己抗体の産生機序を明かにするために, プリスタン投与による正常マウスにおける筋炎特異自己抗体産生誘導を追究した。

B. 研究方法

- 1) 細胞: RPMI 1640 あるいは MEM 培地で継代培養した K562 (human erythroleukemia), あるいは HeLa 細胞を, 免疫沈降法に用いる細胞成分として用いた。
- 2) 血清: 筋炎特異自己抗体である抗 SRP, 抗 ARS 抗体標準血清は, 既報の教室の標準患者血清を用いた。
- 3) プリスタンのマウスへの投与方法: 生後 3 カ月の 14 種正常マウス (C57BL/6, B6CH2bm12, B6H2k, B10, B10.S, SJL/J, A.SW, BALB/cByJ, BALB/cJ, DBA/1, C3HeB/FeJ, C3H/HeOuJ, C3H/HeJ, CBA/CaJ) に 0.5ml のプリスタンあるいは, 滅菌生理食塩水を腹腔内注射し, teil vein より経時的に採血し, 自己抗体の産生を調べた。

4)自己抗体の測定：Lerner-Steitzに準じ、アイソトープ標識 K562 あるいは HeLa 細胞抽出物などを用いた免疫沈降法により検討した。自己抗体と反応した核酸成分は尿素-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE), 蛋白成分は SDS-PAGE で分析した。

C. 研究結果

1) プリスタン投与による正常マウスにおける抗 SRP 抗体と抗 7-2 RNP 抗体産生の誘導：

プリスタン投与 6 カ月後, BALB/c ByJ, C57BL/6 などの正常マウスに抗 SRP 抗体, 抗 7-2 RNP 抗体産生が認められた。プリスタン投与前・後マウス血清, 対照血清の免疫沈降した核酸成分の尿素-PAGE では, プリスタン投与前の BALB/c ByJ マウス血清(レーン 1), ヒト健常人血清(レーン 9)は, 核酸成分を全く沈降しなかったが, プリスタン投与後正常マウス血清(レーン 2: BALB/c ByJ, レーン 4: C57BL/6 J, レーン 5: DBA 1/J, レーン 6, 7: C3H/HeOuJ)は, ヒト抗 SRP 抗体標準血清(レーン 8)と同様 7SL-RNA を免疫沈降した。また, C57BL/6 ByJ(レーン 3)血清は, 7SL-RNA より低分子の 7-2 RNA を弱く免疫沈降した(図-1)。一方, かかる血清の免疫沈降した蛋白成分の SDS-PAGE では, プリスタン投与前の BALB/c ByJ マウス血清(レーン 1), ヒト健常人血清(レーン 9)は, 特異蛋白を沈降しなかったが, プリスタン投与後正常マウス血清(レーン 2: BALB/c ByJ, レーン 4: C57BL/6 J, レーン 5: DBA 1/J, レーン 6, 7: C3H/HeOuJ)は, ヒト抗 SRP 抗体標準血清(レーン 8)と同様に, 54kDa をはじめとする SRP 構成サブユニット蛋白を免疫沈降した。また, 7-2 RNA 沈降した C57BL/6 ByJ 血清(レーン 3)は, 7-2 RNP 関連蛋白と考えられる

40 kDa 蛋白と弱く反応した(図-2)。

2) プリスタン投与による正常マウスにおける抗 tRNA 関連自己抗体産生の誘導：プリスタン投与 6 カ月後, B6 CH2bm12, C57 α d などの正常マウスに抗 OJ 抗体 など抗 tRNA 関連自己抗体産生が認められた。プリスタン投与 6 カ月後の正常マウス血清, 対照血清により沈降された核酸成分の尿素-PAGE では, プリスタン投与前の正常マウス血清(レーン 1: B6 CH2bm, レーン 3: C57 α d)は核酸成分を全く免疫沈降しなかったが, プリスタン投与後の同マウス血清(レーン 2: B6 CH2bm, レーン 4: C57 α d)は, 抗 OJ 抗体標準血清とパターンが少し異なるものの, 同じ電気泳動移動度を示す tRNA 成分を沈降した(図-3)。プリスタン投与後 tRNA 成分を免疫沈降したマウス血清(レーン 2: B6HCH2bm12, レーン 3: C57 α d, レーン 4: B10.S, レーン 5: CBA/CaJ)は, ヒト抗 OJ 抗体標準血清(レーン 1)と同様に 150kDa を中心とする複合蛋白を沈降し, これらの血清に抗 OJ(isoleucyl tRNA 合成酵素)抗体が含まれる可能性が示唆された(図-4)。

3) プリスタン投与により正常マウスに誘導された筋炎特異自己抗体の出現頻度：

抗 SRP 抗体が, C57BL/6 に 2/30(7%), BALB/cByJ に 1/20(5%), DBA1 に 1/15(7%), C3H/HeOuJ に 2/8(25%)と種々の系のマウスに検出された。また, 抗 7-2 RNP 抗体は, 抗 SRP 抗体を産生するマウス系に共通して見出された(表-1)。一方, 抗 OJ 抗体を含む tRNA 関連抗体は, CBA/CaJ 系 1 匹に陽性であったが, B6/B10 系を background とする系を中心に検出された(表-2)。これらの自己抗体と MHC との関連では, 抗 tRNA 関連

抗体は H-2b, H-2k, H-2s マウスに検出されたが、とくに MHC との関連は明らかでなかった。

D. 考察・結論

近年の臨床免疫学の進歩により、かつては自己免疫現象が乏しいとされた PM/DM においても、細胞成分、特にリポ核蛋白に対する新たな自己抗体が報告され、特異臨床像との密接な関連が明かにされた²⁾。この中で、ステロイド療法に抵抗性で、再燃を繰り返す筋炎に見出される抗シグナル認識粒子(SRP)抗体と、間質性肺炎、多発関節炎を併発する筋炎に見出される抗アミノアシル tRNA 合成酵素(ARS)抗体は、診断、病型分類、臨床経過の推測など臨床的に有用であり、病因・病態との関連性からも注目される¹⁾。しかし、かかる自己抗体の産生機序は不明である。

鉱物油の成分であるプリスタンの腹腔内投与は、マウスのモノクローナル抗体を得る標準的手法であるが、感受性マウスに形質細胞腫や慢性関節リウマチ様破壊性関節炎を誘発することが報告されていた³⁾。さらに、Sato らは、プリスタン投与で正常マウスにおいて、抗 DNA, 抗 Sm, 抗 Su, 抗リボソーム P 抗体などの SLE 特異抗体とともに、高 γ グロブリン血症、免疫複合体腎炎などのループス様症候群が誘発されることを明らかとした⁴⁾⁵⁾。その発症機序は不明であるが、サイトカインの過剰産生(IL-4,5,6, IFN- γ), 内在性レトロウイルスの再活性化、染色体の転座などが関与する可能性が示唆されている。

本研究により、ある環境要因に曝露された正常マウスにおいて、抗 SRP 抗体、抗 OJ 抗体を含む抗 tRNA 関連抗体などの筋炎

特異自己抗体も産生されることが明らかとなった。これまで、lymphoid cell 投与による chronic graft versus host disease(GVHD)モデル・マウスに抗 OJ 抗体を含む抗 tRNA 関連抗体が検出され、筋炎所見を認めたとの報告があるものの、それ以外に筋炎特異自己抗体を産生する動物モデルは知られていない⁶⁾。プリスタン投与により抗 OJ 抗体が誘導されたものの、ヒト PM/DM で最も高頻度に見出される抗 Jo-1 抗体が見出されなかった点、GVHD モデルマウスでも抗 OJ 抗体が検出されている点は、筋炎モデルマウスの免疫学的特性と関連している可能性もあり、今後の検討を要する。

多くの自己免疫疾患で、遺伝的素因が自己抗体の産生、発症に大切な役割をすると考えられている。しかし、プリスタン投与は遺伝的素因の制約を超えて、多くの種類の正常マウスに抗 SRP 抗体、抗 tRNA 関連抗体などの筋炎特異抗体産生を誘導した。本動物モデルはかかる筋炎特異自己抗体産生に対する、遺伝、環境因子の役割を追究する上で有用と考えられる。今後、かかる自己抗体を産生したマウスの筋、肺などの病理組織学的検討を行い、自己抗体と臓器障害との関連機序を追究することは、筋炎の病態の解明、特異的治療法開発につながる大切な課題である。

E. 参考文献

- 1) Targoff, I.N., et al.: Rheum. Dis. Clin. North Am. 20:857-880, 1994
- 2) Hirakata, M., et al.: Arthritis Rheum. 35:449-456, 1992
- 3) Wooley, P.H., et al.: Arthritis Rheum. 32:1022-1030, 1989
- 4) Sato, M., et al.: J. Exp. Med. 180:2341-2346,

1994

5) Satoh, M., et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA
92:10934-10938, 1995

6) Gelpi, C., et al.: J. Immunol. 152:1989-1999,
1994.

表-1 Frequency of autoantibodies to SRP, 7-2 RNP, and tRNA related proteins

Strain	H-2	number	SRP	7-2RNP	tRNA
C57BL/6	b	30	2 (7%)	6 (20%)	2 (7%)
B6CH2bm12	bm12	12	0	0	1 (8%)
B6H2k	k	8	0	0	0
B10	b	7	0	1 (14%)	0
B10.S	s	6	0	1 (17%)	1 (17%)
SJL/J	s	8	0	0	0
A.SW	s	6	0	0	0
BALB/cByJ	d	20	1 (5%)	1 (5%)	0
BALB/cJ	d	12	0	1 (8%)	0
DBA/1	q	15	1 (7%)	0	0
C3HeB/FeJ	k	8	0	0	0
C3H/HeOuj	k	8	2 (25%)	2 (25%)	0
C3H/HeJ	k	8	0	0	0
CBA/CaJ	k	12	0	0	1 (8%)

表-2 Frequency of autoantibodies to SRP, 7-2 RNP, and tRNA related proteins and background

Background	H-2	number	SRP	7-2 RNP	tRNA
B6/B10	b, bm12, k, s	63	2 (3%)	8 (13%)	4 (6%)
BALB/c	d	32	1 (3%)	2 (6%)	0
C3ll	k	24	2 (8%)	2 (8%)	0
CBA	k	12	0	0	1 (8%)
DBA/1	q	15	1 (7%)	0	0
SJL/J	s	8	0	0	0
A.SW	s	6	0	0	0

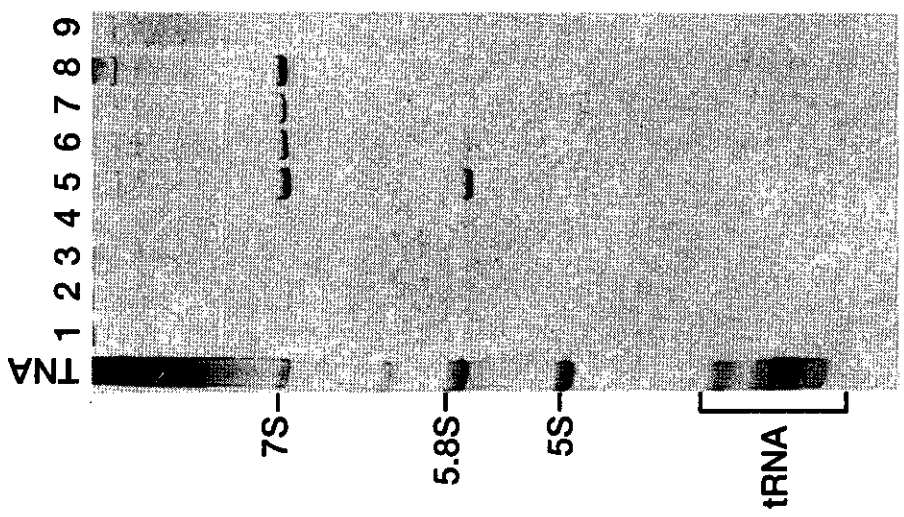


图 1

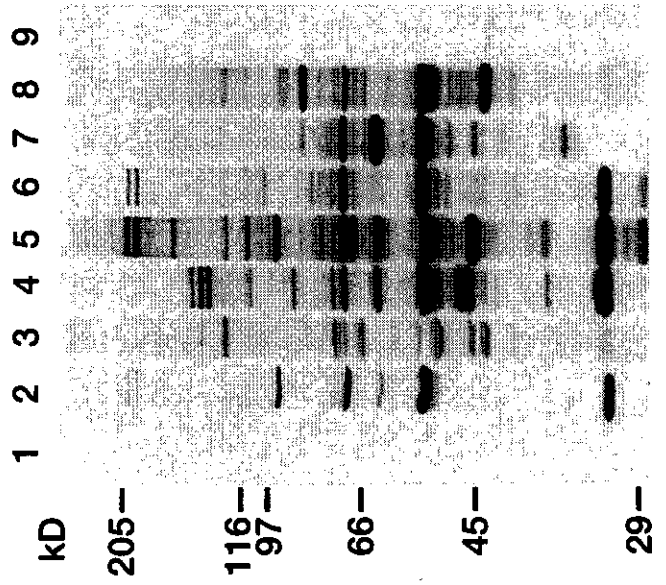


图 2

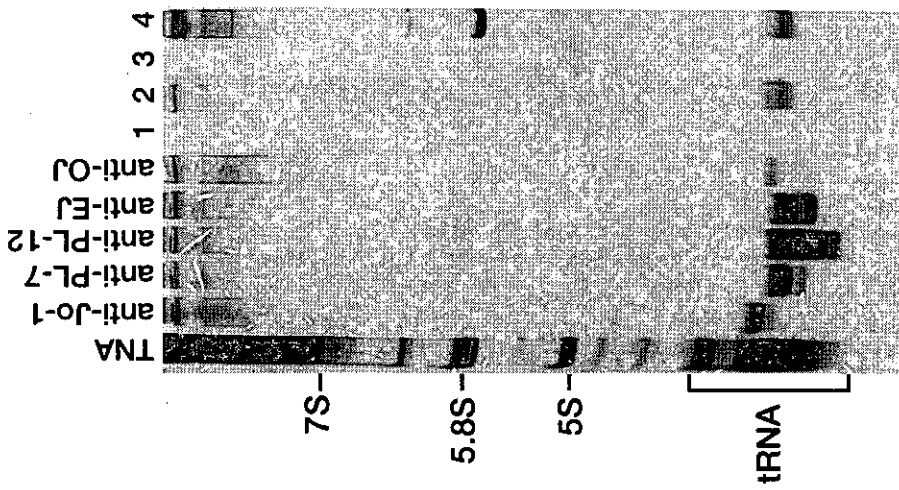


图 3

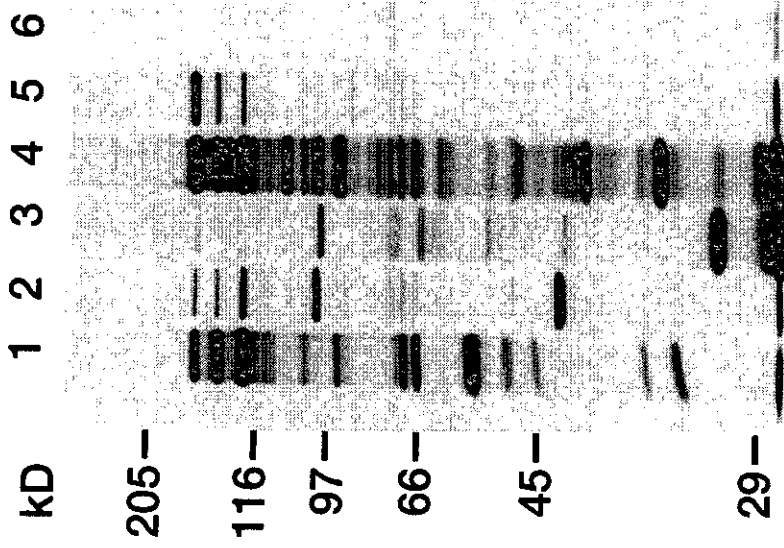


图 4

シェーグレン症候群における唾液腺組織障害関連分子に関する研究

研究協力者 菅井進
(金沢医科大学血液免疫内科)

研究要旨

シェーグレン症候群（以下 SS）における唾液腺組織障害に関与する分子を同定するため、1) ケモカイン、2) サイトカイン、3) アポトーシス関連分子、4) CD40/CD40 リガンド (CD40L) について検討した。1) SS 唾液腺では正常唾液腺と比較し、IP-10 は 12.3 ± 8.6 倍、MIG は 6.8 ± 2.6 倍と有意に mRNA 発現が增強していた（ともに $P < 0.01$ ）。IP-10 と MIG は SS 唾液腺の導管細胞に発現しており、浸潤リンパ球の多くが CXCR3 を発現していた。2) SS 唾液腺では IL-2、IL-6、IL-10 など様々なサイトカインの発現が認められた。TGF β は導管上皮細胞に発現が認められ、Focus score の高い症例にて発現が減少していた。3) SS 唾液腺において導管上皮、腺房細胞ともにアポトーシスに陥っている細胞が認められた。Fas は導管上皮および浸潤細胞に発現しており、FasL は一部の導管上皮、腺房細胞、導管周囲の少数の浸潤細胞に発現が認められた。正常唾液腺では腺房細胞が Fas を発現していたが、FasL の発現はなかった。また SS 唾液腺では腺房に Bax 陽性細胞を数多く認めた。唾液腺浸潤細胞は Bcl-2 を発現しており、アポトーシス細胞は少なかった。4) NZB/W F1 マウスに抗 CD40L 抗体を投与し、組織学的な変化を検討したところ、唾液腺、肺、腎においてリンパ球浸潤の著明な抑制が認められた。

A. 研究目的

SS においては唾液腺にリンパ球からなる炎症性細胞浸潤が生じ、腺細胞の死から腺構造の破壊へと進展し、最終的に唾液腺機能の廃絶へと至る。唾液腺における組織障害の分子機構の解明は SS の治療戦略を考える上で重要である。しかしながら、組織障害の詳細なメカニズムは未だ解明されていない。このため唾液腺の破壊がリンパ球浸潤による二次的なものであるのか、あるいは上皮細胞に生じる一次的な現象であるのか不明である。SS 唾液腺における組織障

害の機序を解明し、病態生理に基づいた治療法を開発するには、1) 唾液腺における病変形成および進展に関わる分子の同定、2) *in vitro* の系における病変関連分子中の中心的因子の決定、3) *in vivo* の系における病変責任分子の阻害による効果および副作用の検討、4) ヒトの治療への応用、というステップが必要と考えられる。今回我々は、SS 唾液腺病変の形成および進展に関与する分子を同定するため、ヒト唾液腺組織と NZB/W F1 マウスを用いて、1) ケモカイン、2) サイトカイン、3) アポトーシス関連分子、4) CD40/CD40 リガンド (CD40L) について検討した。

B. 研究方法

1) ヒト唾液腺組織を用いた検討 (SS および正常唾液腺)

診断のために施行した口唇小唾液腺生検において得られた組織より、診断のために必要な部分を除去した後、余った組織を用いて以下の検討を行った。

a) ケモカインの解析

唾液腺における T 細胞特異的ケモカイン (SDF-1 α , β , IP-10, MIG) とレセプター (CXCR3, CXCR4) の発現を、1) PCR-ELISA、2) 免疫組織染色を用いて検討した。

b) サイトカインの解析

唾液腺におけるサイトカインの発現を1) RT-PCR、2) 唾液腺細胞初代培養における培養上清中サイトカインの ELISA 法による定量、3) 免疫組織染色を用いて検討した。

c) アポトーシス関連分子の解析

唾液腺におけるアポトーシス細胞を TUNEL 法にて検出し、また Fas/FasL および Bcl-2 ファミリー分子 (Bcl-2, Bcl-x, Bax) の発現を、1) RT-PCR、2) 免疫組織染色を用いて検討した。

2) NZB/W F1 マウスを用いた検討

18 週令の雌の NZB/W F1 マウス 8 匹に抗 CD40L 抗体 (ハムスター IgG) を週 3 回、22 週よりは週 1 回、計 10 週、50 μ g/回、腹腔内に投与した。対照群は治療群と同じ用法、用量でハムスター IgG を投与した。28 週令で唾液腺、肺、腎における組織学的な変化および同部位における浸潤リンパ球の免疫組織学的検討 (CD4, CD8, B220,

CD40) を行った。

C. 研究結果

1) ヒト唾液腺組織を用いた検討

a) ケモカイン

SS 唾液腺では正常唾液腺と比較し、IP-10 は 12.3 ± 8.6 倍、MIG は 6.8 ± 2.6 倍と有意に mRNA 発現が増強していた (ともに $P < 0.01$)。SDF-1 α , β , CXCR3, CXCR4 の mRNA 発現に有意差はなかった。免疫組織染色では、IP-10 と MIG は SS 唾液腺の導管細胞に発現しており、この部位の両ケモカインの発現は導管上皮の増殖が強いほど、また導管周囲のリンパ球浸潤が高度なほど強かった (図 1 a,b)。腺房細胞でも弱い発現を認めたが、浸潤細胞では発現を認めなかった。一方、浸潤リンパ球の多くが CXCR3 を発現していたが、CXCR4 の発現はほとんど認めなかった (図 1 c,d)。正常唾液腺ではケモカイン、レセプターとも発現は認めなかった。

b) サイトカイン¹⁾

SS 唾液腺において様々なサイトカイン mRNA の発現が認められたが、病変の進展とともに IL-2、IL-6、IL-10 の mRNA の発現頻度が増大した (図 2)。TGF β の mRNA 発現は SS、正常唾液腺ともに認められた。ELISA による検討にて、SS 唾液腺細胞培養上清中では IL-6、IL-10、TGF β の産生が認められた (IL-6:625-4200 pg/ml, IL-10:1239 pg/ml, TGF β :68-480 pg/ml)。正常唾液腺においては TGF β の産生が認められたが、IL-6、IL-10 の産生はなかった。免疫組織染色にて TGF β は SS 唾液腺の導管上皮細胞に発現が認められ、

Focus score の高い症例にてその発現が減少していた (図 3 a, b)。

c) アポトーシス関連分子^{2, 3)}

SS 唾液腺において導管上皮、腺房細胞ともにアポトーシスに陥っている細胞が認められた。正常唾液腺においても一部の導管上皮にアポトーシス細胞が認められたが、腺房細胞ではアポトーシスは認めなかった。

Fas は導管上皮および浸潤細胞に発現しており (図 4 a)、FasL は一部の導管上皮、腺房細胞、導管周囲の少数の浸潤細胞に発現が認められた (図 4 b)。正常唾液腺では腺房細胞が Fas を発現していたが、FasL の発現はなかった。また SS 唾液腺では腺房に Bax 陽性細胞を数多く認めた (図 4 c)。正常唾液腺では腺房細胞に Bax の発現は認めなかった。唾液腺浸潤細胞は Bcl-2 を発現しており (図 4 d)、アポトーシス細胞は少なかった。

2) NZB/W F1 マウスを用いた検討⁴⁾

SS のモデル動物である NZB/W F1 マウスにおいて、T 細胞と B 細胞の相互作用において重要な CD40/CD40L 系を阻害することにより、自己免疫性炎症性病変の変化を検討した。NZB/W F1 マウスに抗 CD40L 抗体を投与し、組織学的な変化を検討したところ、唾液腺においてリンパ球浸潤の著明な抑制が認められた (図 5 a, b)。浸潤リンパ球の解析では、B 細胞および CD40 陽性細胞の減少が認められた (B220 陽性細胞: 抗 CD40L 抗体投与群 $16.2 \pm 4.8\%$ 、対照群 $29.5 \pm 9.1\%$ 、 $p < 0.01$, CD40 陽性細胞: 抗 CD40L 抗体投与群 $3.6 \pm 1.1\%$ 、対照群 $6.3 \pm 3.0\%$ 、 $p < 0.05$)。

D. 考察

SS 唾液腺病変において、1) 細胞浸潤の形成における IP-10 や MIG などのケモカインの関与、2) 慢性炎症の維持、進展における IL-6, IL-10 などの発現増加および免疫抑制性サイトカインである TGF β の産生減少、3) Fas/FasL や Bax による上皮細胞のアポトーシスおよび Bcl-2 による浸潤リンパ球のアポトーシス抑制、4) CD40/CD40L 系の阻害による自己免疫性炎症の抑制、などが示唆された。今後、これらの多種多様な因子が実際にどのようにして唾液腺組織障害を引き起こすのかを解明する必要がある。

そのためにまず、SS 唾液腺組織より上皮細胞株と T 細胞株を樹立する。樹立した細胞株を用いて唾液腺組織障害に関わる液性因子 (ケモカイン、サイトカイン) の発現を解析し、1) リンパ球浸潤を引き起こすケモカイン、2) 上皮細胞のアポトーシスを惹起するサイトカインを決定する。

次に唾液腺組織障害に関わる細胞性因子を解析するため、同一患者から樹立した上皮細胞株と T 細胞株を用いて、抗体により CD40/CD40L および Fas/FasL の系を阻害することにより上皮細胞の増殖やアポトーシスに関する責任分子を決定する。同時に上皮細胞死に浸潤リンパ球が関与しているか否かを決定する。

次に、Scid マウス (重症複合免疫不全マウス) にヒト唾液腺組織を移植した SS の新しいモデル動物を樹立し、このマウスを用いて、決定された組織障害の責任分子を阻害することにより、唾液腺病変に対する効果と副作用を検討し、ヒト SS における唾液腺病変の治療への可能性を検討する。

E. 結論

SS唾液腺における組織障害に関与する分子として、1) ケモカイン、2) サイトカイン、3) アポトーシス関連分子、4) CD40/CD40L が同定された。今後、これらの分子が唾液腺組織障害を引き起こすメカニズムを解明する必要がある。

F. 参考文献

- 1、Ogawa, N., Dang, H., Lazaridis, K., McGuff, H. S., Aufdemorte, T. B., Talal, N.: Analysis of transforming growth factor β and other cytokines in autoimmune exocrinopathy (Sjogren's syndrome). *J. Interferon Cytokine Res.* 1995, 15:759-767.
- 2、Kong, L., Ogawa, N., Nakabayashi, T., Liu, G. T., D'souza, E., McGuff, H. S., Guerrero, D., Talal, N., Dang, H.: Fas and Fas ligand expression in the salivary glands of patients with primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 1997, 40:1, 87-97.
- 3、Kong, L., Ogawa, N., McGuff, H. S., Nakabayashi, T., Sakata, K., Masago, R., Vela-Roch, N., Talal, N., Dang, H.: Bcl-2 family expression in salivary glands from patients with primary Sjogren's syndrome: involvement of Bax in salivary gland destruction. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1998, 88:2, 133-141.
- 4、Guohui, C., Sugai, S.: Suppression of autoimmune diseases by blockade of the CD40-CD40L interaction. *J. Kanazawa Med. Univ.* 1999, 24:137-144.



a



b



c



d

図1
免疫染色組織所見。(a)SS 唾液腺における IP-10 の発現。(b)SS 唾液腺における MIG の発現。(c)SS 唾液腺における CXCR3 の発現。(d)SS 唾液腺における CXCR4 の発現。