

200400846A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

涙腺の分化増殖機構の解明と再生医療への応用

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 坪田一男

平成17(2005)年3月

## 目 次

### I. 総括研究報告書

涙腺・唾液腺分化・増殖機構の解明に関する研究-----	1
坪田一男	

### II. 分担研究報告

涙腺の分化増殖機構の解明と再生医療への応用-----	9
斎藤一郎	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----	13
--------------------------	----

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
総括研究報告書

涙腺の分化増殖機構の解明と再生医療への応用

主任研究者 坪田一男 東京歯科大学眼科教授

研究要旨

スティーブン・ジョンソン症候群やシェーグレン症候群などにより消失または著しく障害された涙腺の分泌機能を回復するために再生医療を応用することが本研究の目的である。すなわち効率よく涙腺組織幹細胞の増殖・分化を誘導する因子を同定するとともに、同定された因子を用いて *in vitro* で涙腺組織幹細胞より分化誘導した涙腺の構成細胞を障害された涙腺に移入することによりその機能の回復をはかる。本年度は本研究の最終年度に当たり涙腺・唾液腺分泌障害を呈する患者の新規治療法として細胞治療が応用可能か否かを検討する目的で、放射線照射により涙液・唾液分泌障害を誘導したマウスを用いて細胞移入実験を行った。GFP トランスジェニックマウスの涙腺・唾液腺それぞれから採取した SP 細胞を放射線照射マウスの当該組織に移入した後、経時的に涙液・唾液分泌量を測定した結果、分泌量の回復が認められた。SP 細胞を移入した涙腺・唾液腺組織の摘出標本では GFP 陽性細胞が少数しか確認されなかったことより涙液・唾液量の回復は SP 細胞から分泌される液性因子などを介した残存組織の活性化による可能性が考えられた。この可能性について検討するため cDNA microarray を用いた解析により同定された SP 細胞特異的な発現遺伝子をマウス線維芽細胞株 (STO 細胞) に導入し導入遺伝子を恒常的に発現する細胞株を樹立した。樹立した細胞株のストレス応答性を検討するために H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激後に trypan blue 染色による生細胞数を計測するとともに細胞内で産生される活性酸素種 (reactive oxygen species, ROS) 量を蛍光色素である CM-H<sub>2</sub>DCFDA 染色後 FACS により解析した。導入遺伝子の一つを恒常的に発現する STO 細胞では H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激による細胞死が抑制され、かつ細胞内の ROS 量も減少していた。これらの結果から、SP 細胞を用いた細胞治療が涙液・唾液分泌障害患者の新規治療法として奏効する可能性が示唆された。

分担研究者 齋藤一郎 鶴見大学歯学部教授

## A. 研究目的

スティーブン・ジョンソン症候群やシェーグレン症候群などの難治性疾患により消失または著しく障害された涙腺の機能を回復することが本研究の目的である。涙腺・唾液腺細胞に効率よく増殖・分化を誘導する因子を同定するとともに、同定された因子を用いて *in vitro* で大量培養した組織幹細胞より分化誘導した涙腺の構成細胞を移入することによりその機能の回復をはかる。

## B. 研究方法

本研究は 1) 涙腺・唾液腺組織幹細胞の大量培養および、その分化誘導に必要なとされる因子の同定 2) 涙液分泌障害に対する新規治療法として細胞治療の応用に関する検討の二つの研究項目から構成され本年度は当該研究の最終年度に当たり涙液・唾液分泌障害に対する新規治療法として細胞治療が奏効する可能性を検討した。

### 1) 涙液・唾液分泌障害マウスを用いた治療実験

(1) 涙液・唾液分泌障害マウスの作製  
6週齢の雄性 C57BL/6 マウス眼窩外涙腺あるいは唾液腺組織に 15Gy の放射線を照射し一週後にピロカルピン刺激による涙液あるいは唾液分泌量を測定した。

### (2) SP 細胞の移入

分泌量の減少を確認した後、放射線照射 2 週後に Green Fluorescent Protein (GFP) を全身組織に恒常的に発現する GFP トランスジェニックマウスの涙腺あるいは唾液腺それぞれから

採取した SP 細胞 ( $5 \times 10^3$  cell  $\sim 1 \times 10^4$  cell) を涙液・唾液分泌障害マウスの当該組織に移入した。

### (3) 涙液・唾液量の測定

経時的にピロカルピン刺激後の涙液・唾液量を測定した。

### (4) 移入した SP 細胞の生着確認

蛍光顕微鏡を用いて SP 細胞を移入した涙腺および唾液腺組織の摘出標本における GFP 陽性細胞の存在を検討した。

### 2) SP 細胞に特異的な発現遺伝子の機能解析

#### 1) 全長 cDNA の増幅

マウス顎下腺より採取した RNA を鋳型として RT-PCR により増幅した。

#### 2) 遺伝子発現ベクターの構築

増幅した cDNA を mammalian expression vector である pCAGS-puro に挿入し大腸菌で大量培養した後 plasmid を精製した。導入遺伝子を挿入していない empty vector を transfection した mock も作製した。

#### 3) 遺伝子発現 stable cell line の樹立

精製した pCAGS-puro をリポフェクタミン 2000 (Invitrogen) によりマウスの線維芽細胞株 (STO) に遺伝子導入し、さらに puromycin による薬剤選択を 2 週間行い stable clone を採取した。

#### 4) 樹立した STO 細胞を用いた導入遺伝子の機能解析

放射線障害は細胞外あるいは細胞内に生じたフリーラジカルを介した染色体 DNA をはじめとした細胞の構成成分の障害に起因することが知られている。ここでは導入した遺伝子がフリーラジカルに対する細胞障害性を抑制するかどうかを検討する目的で代表的なフリーラジカルとして知られる活性酸素種 (reactive oxygen species, ROS) に対

するその機能を解析した。

#### (1) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激後の生細胞数の計測

樹立 ST0 細胞および mock 細胞の培養上清に種々の濃度の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を加えた 24 時間後に trypan blue 染色による生細胞数を計測した。

#### (2) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激後の細胞内 ROS 量の測定

細胞内の ROS 量を蛍光色素である 100nM の CM-H<sub>2</sub>DCFDA 染色後 FACS により解析した。CM-H<sub>2</sub>DCFDA は蛍光色素の一つで ROS などによる酸化を受けると分子内のエステル結合が切断され異なる波長の蛍光を発する。この原理を利用して細胞内の ROS 量を FACS により測定することが可能である。

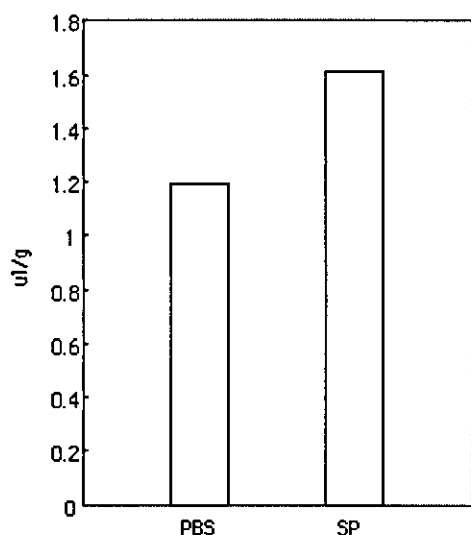
#### (倫理面への配慮)

本研究では事前に実験手技、倫理面での対応などに関する承認を本学動物実験委員会から得ており、動物の飼育ならびに屠殺にあたっては動物への苦痛を極力避けるよう厳重に配慮した。

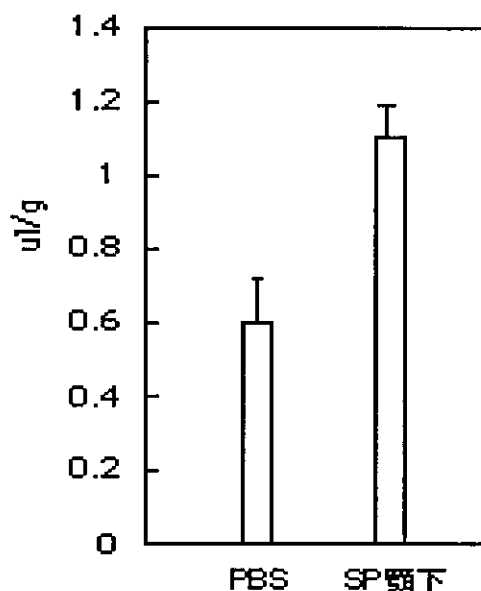
### C. 研究結果

#### 1) 涙液・唾液分泌障害マウスを用いた治療実験

涙腺・唾液腺に放射線照射したマウスでは照射後一週目からピロカルピン刺激による涙液あるいは唾液分泌量に明らかな減少が認められた。放射線照射 2 週後に、これらの組織に GFP トランスジェニックマウスの涙腺あるいは唾液腺それぞれから採取した SP 細胞 ( $5 \times 10^3$  cell  $\sim$   $1 \times 10^4$  cell) を移入した結果、涙液・唾液量の回復が認められた。



SP 細胞移入 8 週後の涙液量



SP 細胞移入 8 週後の唾液量

次に、GFP をマーカーとして蛍光顕微鏡を用いて SP 細胞を移入した涙腺および唾液腺組織の摘出標本における、その生着の有無を詳細に検討した結果、GFP 陽性細胞は散在性に存在するものの、明らかな再生結節の存在は認められなかった。このことから、SP 細胞を移入した組織において分泌量の回復が認められたのは、移入細胞自身の増

殖・分化による可能性は低く、移入細胞が分泌する液性因子などを介した残存組織の活性化に起因した可能性が考えられた。

## 2) SP 細胞に特異的な発現遺伝子の機能解析

SP 細胞特異的な遺伝子を導入した STO 細胞を用いた解析結果より導入された遺伝子の一つ (FactorX) が ROS による細胞障害抑制作用を示した。(以下 FactorX を恒常的に発現する STO 細胞を STO-FactorX 細胞と略す。) すなわち、STO-FactorX 細胞および mock 細胞の培養上清に種々の濃度の  $H_2O_2$  を加えた 24 時間後に trypan blue 染色による生細胞数を計測した結果、STO-FactorX 細胞では mock と比較して有意に細胞の生存率が高かった。さらに、細胞内で産生される ROS 量を蛍光色素である 100nM の CM- $H_2$ DCFDA 染色後 FACS により解析した結果、STO-FactorX 細胞では mock と比較して有意に ROS 量の減少が認められた。

## D. 考察

根治療法の存在しない難治性疾患により失われた組織を再生するために幹細胞による再生医療の応用が検討されている。白血病患者における骨髄移植や熱傷患者における培養皮膚移植などは既に臨床応用され、糖尿病やパーキンソン病などでも疾患モデル動物を用いた実験で、胎児性幹細胞 (embryonic stem: ES 細胞)、骨髄細胞、組織幹細胞を用いた組織再生による治療法の奏効が報告されており、その臨床応用が期待される。また、眼科領域でもステューブン・ジョンソン症候群や角膜化学傷・熱傷などの角膜障害に対して角膜幹細胞移植の応用を主任研究者が報告している。ステューブン・ジョンソン症候群で認められる重篤な涙液分泌

障害はシェーグレン症候群や頭頸部悪性腫瘍の放射線治療後にも認められるものの、その根治療法に関する報告は国内・国外において皆無であり効果的な治療法の開発が望まれる。

本研究結果において涙液・唾液分泌障害マウスの涙腺・唾液腺に SP 細胞を移入することにより、その分泌機能の改善が認められたことはヒトの涙液・唾液分泌障害の治療法として SP 細胞を用いた細胞治療の応用の可能性を示唆するものであり極めて有用と思われる。また、本研究で同定された SP 細胞特異的な発現遺伝子を用いた SP 細胞の大量培養法および分化誘導法が確立されれば、さらに臨床応用への可能性は高まると考えられる。加えて、SP 細胞の大量培養が可能となれば SAGE 法により明らかとなった涙腺・唾液腺特異的分化誘導因子を用いることにより分化誘導し得られた涙腺・唾液腺細胞の培養上清が生理的な人工涙液あるいは人工唾液として応用可能となることが期待される。

本研究では SP 細胞特異的に発現する遺伝子の一つが最近種々の疾患の原因として報告されている free radical による細胞障害を抑制することは極めて興味深く、このことは組織幹細胞の数が加齢により減少するものの成人においても残存している理由の一つと考えられる。また、このような因子は創薬の標的分子としても興味深く今後さらに組織幹細胞の性格を解析することにより新たな機能を有する因子の発見につながる可能性が考えられた。

## E. 結論

放射線照射により涙液・唾液の分泌障害を呈するマウスを作製し、これらの涙腺・唾液腺組織に SP 細胞を移入

した結果、涙液・唾液分泌量に改善が認められた。このことより、SP 細胞を用いた細胞治療が涙液・唾液分泌障害に対する新規治療法として応用可能であることが示唆された。加えて、本研究において涙腺・唾液腺組織幹細胞や涙腺・唾液腺樹立細胞株に特異的に発現する遺伝子を、それぞれ同定したことは、涙腺・唾液腺組織幹細胞の大量培養条件を検討する際に不可欠であり極めて有用である。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- (1) Maruyama, T., Saito, I., Hayashi, Y., Kompfner, E., Fox, R. I., Burton, D. R., Ditzel, H. J.: Human autoantibodies to cleaved  $\alpha$ -fodrin in Sjogren's syndrome. *Am. J. Pathol.*, in press.
- (2) Iioka, Y., Mishima, K., Azuma, N., Tsuchida A., Takagi Y., Aoki, T., Saito, I. Overexpression of protein kinase C $\delta$  enhances cisplatin-induced cytotoxicity correlated with p53 in gastric cancer cell line. *Pathobiology*, in press.
- (3) Nagata, Y., Inoue, H., Yamada, K., Higashiyama, H., Mishima, K., Kizu, Y., Takeda, I., Mizuno, F., Hayashi, Y., Saito, I.: Activation of Epstein-Barr Virus by saliva from Sjogren's syndrome patients. *Immunol.*, 111: 223-229, 2004.
- (4) Dogru M, Kaderli B, Gelisken O, Yucel A, Avci R, Goto E, Shimmura S, Shimazaki J, Tsubota K. Ocular surface changes with applanation contact lens and coupling fluid use after argon laser photocoagulation in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Ophthalmol* 2004; 138(3): 381-388.
- (5) Dogru M, Karakaya H, Baykara M, Ozmen A, Koksal N, Goto E, Matsumoto Y, Kojima T, Shimazaki J, Tsubota K. Tear function and ocular surface findings in premature and term babies. *Ophthalmology* 2004; 111(5): 901-905.
- (6) Kaido M, Goto E, Dogru M, Tsubota K. Punctal occlusion in the management of chronic Stevens-Johnson syndrome. *Ophthalmology* 2004; 111(5): 895-900.
- (7) Kojima T, Ishida R, Dogru M, Goto E, Takano Y, Matsumoto Y, Kaido M, Ohashi Y, Tsubota K. A new noninvasive tear stability analysis system for the assessment of dry eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45(5): 1369-1374.
- (8) Koseki M, Maki Y, Matsukubo T, Ohashi Y, Tsubota K. Salivary flow and its relationship to oral signs and symptoms in patients with dry eyes. *Oral Dis* 2004; 10(2): 75-80.
- (9) Matsumoto Y, Dogru M, Goto E, Ohashi Y, Kojima T, Ishida R, Tsubota K. Autologous serum application in the treatment of neurotrophic keratopathy. *Ophthalmology* 2004; 111(6): 1115-1120.
- (10) Ono M, Takamura E, Shinozaki K,

- Tsumura T, Hamano T, Yagi Y, Tsubota K. Therapeutic effect of cevimeline on dry eye in patients with Sjogren's syndrome: a randomized, double-blind clinical study. *Am J Ophthalmol* 2004; 138(1): 6-17.
- (11) Tanaka M, Takano Y, Dogru M, Toda I, Asano-Kato N, Komai-Hori Y, Tsubota K. Effect of preoperative tear function on early functional visual acuity after laser in situ keratomileusis. *J Cataract Refract Surg.* 2004, 30(11): 2311-2315.
- (12) Toda I, Asano-Kato N, Hori-Komai Y, Tsubota K. Ocular surface treatment before laser in situ keratomileusis in patients with severe dry eye. *J Refract Surg* 2004; 20(3): 270-275.
2. 学会発表
- (1) 美島健二, 坪田一男, 千葉 寛, 山田耕一, 井上裕子, 斎藤一郎 涙腺・唾液腺組織からの side population 細胞の同定とその発現遺伝子の解析 第3回日本再生医療学会, シンポジウム, 2004
- (2) 小川葉子, Razzaque MS, 河合正孝, 亀山香織, 真島行彦, 坪田一男, 桑名正隆 慢性移植片対宿主病の涙腺組織における heat shock protein 47 の発現の検討 第13回シェーグレン症候群学術研究会, 2004
- (3) Inoue, H., Mishima, K., Tsubota, K., Saito, I., :Molecular Profiles and Therapeutic Potential of Side Population Cells of Lacrimal and Salivary Glands. International Conference on the Lacrimal Gland, Tear Film, Ocular Surface and Dry Eye Syndromes: Basic Science and Clinical Relevance, 2004.
- (4) Toda I, Kamiyama Y, Sakai C, Goto E, Tsubota K. Efficacy of disposable eyelid warming device for the treatment of post-LASIK dry eye. The Association for Research in Vision and Ophthalmology, Annual Meeting, Florida, U.S.A., 2004
- (5) Tsubota K, Mishima K, Saito I. Identification of side population cells in lacrimal glands for the novel cell therapy of dry eye. The Association for Research in Vision and Ophthalmology, Annual Meeting, Florida, U.S.A., 2004
- (6) Ogawa Y, Razzaque S M, Kawai M, Kameyama K, Mashima Y, Tsubota K, Kuwana M. Fibrogenic role of collagen-binding heat shock protein 47 in lacrimal glands of patients with chronic graft versus host disease. 4<sup>th</sup>International Conference on the Lacrimal Gland, Tear Film, Ocular Surface and Dry Eye Syndromes: Basic Science and Clinical Relevance., Fajardo, Puerto Rico, 2004.
- (7) Uchino M, Ogawa Y, Kawai M, Kawashima M, Mashima Y, Shimada H, Tsubota K. Successful treatment of extensive corneal ulcer after excision of pseudomembrane associated with acute graft versus host disease following cord blood stem cell transplantation. 4<sup>th</sup>International Conference on the Lacrimal Gland, Tear Film, Ocular Surface and Dry Eye Syndromes: Basic Science and



Clinical Relevance., Fajardo,  
Puerto Rico, 2004.

H. 知的所有権の出願・取得状況（予定  
を含む。）

特許取得

特願 2002-313579

「プロラクチンを含む外分泌腺組織か  
らの分泌促進剤およびプロラクチン遺  
伝子が導入されたトランスジェニック  
動物」

Agent for treatment of exocrine  
gland disorders and transgenic mouse  
useful for screening the same.  
0079244. 2003/4/24.

Inventors: Kazuo Tsubota,  
Ichiro Saito.

Assignee: R-Tech Ueno, Ltd.

実用新案登録

3) その他

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

涙腺・唾液腺分化・増殖機構の解明に関する研究

分担研究者 斎藤一郎 鶴見大学歯学部教授

**研究要旨**

すでに我々は DNA microarray を用いた解析により涙腺・唾液腺において多数の stem cell を含む分画として知られる side population cell (SP 細胞) を同定し、これらの細胞に特異的に発現する複数の遺伝子を明らかにした。当該年度は特定された遺伝子の機能を解析をする目的でこれらの遺伝子をマウス線維芽細胞株 (STO 細胞) に導入し導入遺伝子を恒常的に発現する細胞株を樹立した。樹立した細胞株のフリーラジカルを介したストレス応答性を検討するために H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激後に trypan blue 染色による生細胞数を計測するとともに細胞内で産生される活性酸素種 (reactive oxygen species, ROS) 量を蛍光色素である CM-H<sub>2</sub>DCFDA 染色後 FACS により解析した。導入遺伝子の一つ (FactorX) を恒常的に発現する STO 細胞 (STO-FactorX) では H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激による細胞死が抑制され、かつ細胞内の ROS 量も減少していた。また、FactorX は分泌蛋白であることから SP 細胞を用いた細胞治療では、移入組織において SP 細胞自身の再生による機能回復に加えて、これらの細胞から分泌される因子によるレシーピエントにおける残存組織の機能回復の可能性が示唆された。

## A. 研究目的

組織の再生は種々の疾患や障害などにより喪失した組織を人為的に構築し、その生理的機能を回復させる事を目的に行われており、この見地からこれまで臨床応用を目指した種々の試みが行われている。例えば糖尿病やパーキンソン病などの疾患モデル動物の治療に胚性幹細胞(ES細胞)、骨髄細胞、組織幹細胞を用いた組織再生の応用が検討されている。これらの治療法は今まで特異的な治療法がなかった疾患に対する新たな治療法となりうると思われる。難治性疾患として知られるスティーブン・ジョンソン症候群、シェーグレン症候群もまた、これまで特異的な治療法がない疾患の一つで、これらの疾患の罹患により認められる重篤な涙液・唾液の分泌不全を呈する患者の新たな治療法として組織幹細胞を用いた細胞治療の応用が考えられる。しかしながら、組織幹細胞を用いた細胞治療において克服されなければならない問題点は、組織幹細胞の大量培養条件を確立することにある。

本研究の目的は多数の組織幹細胞を含む分画として知られる side population cell (SP細胞) に特異的に発現する遺伝子の機能を解析することにより、涙腺・唾液腺組織幹細胞の大量培養条件を検討することにある。また、同定された因子を用いて in vitro で大量培養した組織幹細胞より分化誘導した涙腺・唾液腺の構成細胞を移入することによりその機能の回復をはかる。

## B. 研究方法

### SP細胞に特異的な発現遺伝子の機能解析

#### 1) 全長 cDNA の増幅

マウス顎下腺より採取した RNA を鋳型として RT-PCR により増幅した。

#### 2) 遺伝子発現ベクターの構築

増幅した cDNA を mammalian expression vector である pCAGS-puro に挿入し大腸菌で大量培養した後 plasmid を精製した。導入遺伝子を挿入していない empty vector を transfection した mock も作製しコントロールとした。

#### 3) 遺伝子発現 Stable cell line の樹立

精製した pCAGS-puro をリポフェクタミン 2000 (Invitrogen) によりマウスの線維芽細胞株(ST0)に遺伝子導入した。さらに puromycin による薬剤選択を2週間行い stable clone を採取した。

#### 4) 樹立した ST0 細胞を用いた導入遺伝子の機能解析

放射線障害は細胞外あるいは細胞内に生じたフリーラジカルによる細胞の構成成分の障害に起因することが知られている。ここでは導入した遺伝子がフリーラジカルに対する細胞障害性を抑制するか否かを検討する目的で代表的なフリーラジカルとして知られる活性酸素種 (reactive oxygen species, ROS) に対するその機能を解析した。

##### (1) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激後の生細胞数の計測

樹立 ST0 細胞および mock 細胞の培養上清に種々の濃度の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を加えた 24 時間後に trypan blue 染色による生細胞数を計測した。

##### (2) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激後の細胞内 ROS 量の測定

細胞内で産生される ROS 量を蛍光色素である 100nM の CM-H<sub>2</sub>DCFDA 染色後 FACS により解析した。CM-H<sub>2</sub>DCFDA は蛍光色素の一つで ROS などによる酸化を受けると分子内のエステル結合が

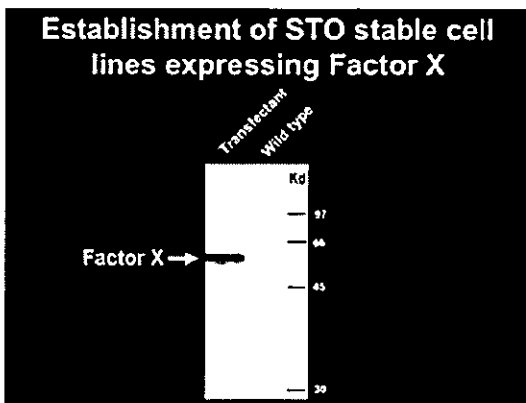
切断され異なる波長の蛍光を発する。この原理を利用して細胞内の ROS 量を FACS により測定することが可能である。

(倫理面への配慮)

本研究では事前に実験手技、倫理面での対応などに関する承認を本学動物実験委員会から得ており、動物の飼育ならびに屠殺にあたっては動物への苦痛を極力避けるよう厳重に配慮した。

### C. 研究結果

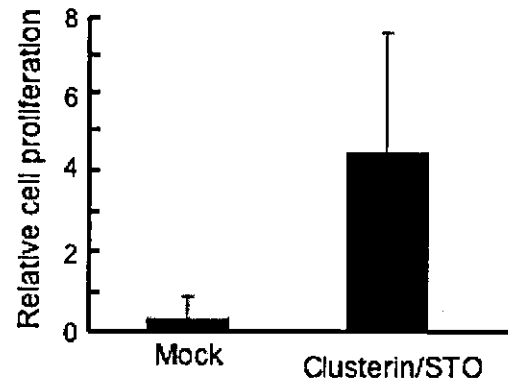
SP 細胞特異的な遺伝子を導入した STO 細胞を用いた解析結果より導入された遺伝子の一つ (FactorX) が ROS による細胞障害に対する抑制作用を示した。(以下 FactorX を恒常的に発現する STO 細胞を STO-FactorX 細胞と略す。) STO-FactorX はウエスタンブロットにより恒常的に FactorX 蛋白を発現していた。



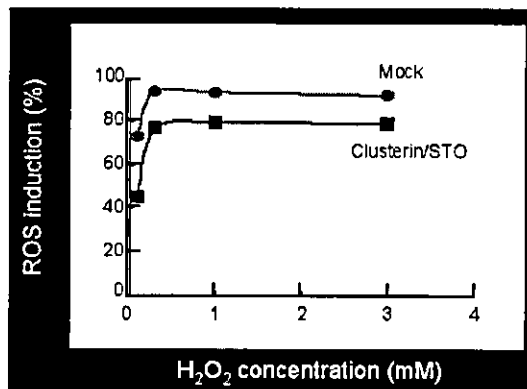
また、FactorX は分泌蛋白であり STO-FactorX 細胞の培養上清にその存在が確認された。

次に、STO-FactorX 細胞および mock 細胞の培養上清に種々の濃度の  $H_2O_2$  を加えた 24 時間後に trypan blue 染色による生細胞数を計測した結果、

STO-FactorX 細胞では mock と比較して有意に細胞の生存率が高かった。



さらに、細胞内で産生される ROS 量を蛍光色素である 100nM の CM- $H_2$ DCFDA 染色後 FACS により解析した結果、STO-FactorX 細胞では mock と比較して有意に ROS 量の減少が認められた。



### D. 考察

本研究で同定された SP 細胞特異的な発現遺伝子を用いた SP 細胞の大量培養法および分化誘導法が確立されれば、さらに臨床応用への可能性は高まると考えられる。本研究では SP 細胞特異的に発現する遺伝子の一つが最近種々の疾患の原因として報告されている free radical による細胞障害を抑制することは極めて興味深く、このことにより組織幹細胞が加齢によりその数を減ずるものの成

人においても残存している理由が説明可能となるかもしれない。また、このような因子は創薬の標的分子としても興味深く今後さらに組織幹細胞の性格を解析することにより新たな機能を有する因子の発見につながる可能性が考えられた。

## E. 結論

本研究において涙腺・唾液腺組織幹細胞や涙腺・唾液腺樹立細胞株に特異的に発現する遺伝子をそれぞれ同定したことは涙腺・唾液腺組織幹細胞の大量培養条件を検討する際に不可欠であり極めて有用である。また、その機能をさらに詳細に検討することは細胞の生存に関与する遺伝子の発見をもたらす可能性を有すると考えられる。

## F. 健康危険情報 特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- (1) Maruyama, T., Saito, I., Hayashi, Y., Kompfner, E., Fox, R, I., Burton, D, R., Ditzel, H, J.: Human autoantibodies to cleaved  $\alpha$ -fodrin in Sjogren's syndrome. *Am. J. Pathol.*, in press.
- (2) Iioka, Y., Mishima, K., Azuma, N., Tsuchida A., Takagi Y., Aoki, T., Saito, I. Overexpression of protein kinase C $\delta$  enhances cisplatin-induced cytotoxicity correlated with p53 in gastric cancer cell line. *Pathobiology*, in press.
- (3) Nagata, Y., Inoue, H., Yamada, K., Higashiyama, H., Mishima, K., Kizu, Y., Takeda, I., Mizuno, F.,

Hayashi, Y., Saito, I.: Activation of Epstein-Barr Virus by saliva from Sjogren's syndrome patients. *Immunol.*, 111: 223-229, 2004.

### 2. 学会発表

- (1) 美島健二, 坪田一男, 千葉 寛, 山田耕一, 井上裕子, 斎藤一郎 涙腺・唾液腺組織からの side population 細胞の同定とその発現遺伝子の解析 第3回日本再生医療学会, シンポジウム, 2004
- (2) Inoue, H., Mishima, K., Tsubota, K., Saito, I.: Molecular Profiles and Therapeutic Potential of Side Population Cells of Lacrimal and Salivary Glands. International Conference on the Lacrimal Gland, Tear Film, Ocular Surface and Dry Eye Syndromes: Basic Science and Clinical Relevance, 2004.
- (3) Tsubota K, Mishima K, Saito I. Identification of side population cells in lacrimal glands for the novel cell therapy of dry eye. The Association for Research in Vision and Ophthalmology, Annual Meeting, Florida, U. S. A., 2004

## H. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む。)

特許取得

特願 2002-313579

「プロラクチンを含む外分泌腺組織からの分泌促進剤およびプロラクチン遺伝子が導入されたトランスジェニック動物」

Agent for treatment of exocrine gland disorders and transgenic mouse useful for screening the same.

0079244. 2003/4/24.

Inventors: Kazuo Tsubota,  
Ichiro Saito.

Assignee: R-Tech Ueno, Ltd.

実用新案登録

3) その他

## 別紙 4

## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Iioka, Y., Mishima, K., Azuma, N., Tsuchida A., Takagi Y., Aoki, T., Saito, I.	Overexpression of protein kinase C $\delta$ enhances cisplatin-induced cytotoxicity correlated with p53 in gastric cancer cell line.	Pathobiology	in press		
Maruyama, T., Saito, I., Hayashi, Y., Kompfner, E., Fox, R. I., Burton, D. R., Ditzel, H. J.	Human autoantibodies to cleaved $\alpha$ -fodrin in Sjogren's syndrome.	Am J Pathol	165	53-61	2004
Nagata, Y., Inoue, H., Yamada, K., Higashiyama, H., Mishima, K., Kizu, Y., Takeda, I., Mizuno, F., Hayashi, Y., Saito, I.	Activation of Epstein-Barr Virus by saliva from Sjogren's syndrome patients.	Immunol	111	223-229	2004
Dogru M, Kaderli B, Gelisken O, Yucel A, Avci R, Goto E, Shimmura S, Shimazaki J, Tsubota K.	Ocular surface changes with applanation contact lens and coupling fluid use after argon laser photocoagulation in noninsulin-dependent diabetes mellitus.	Am J Ophthalmol	138	381-388	2004
Dogru M, Karakaya H, Baykara M, Ozmen A, Koksal N, Goto E, Matsumoto Y, Kojima T, Shimazaki J, Tsubota K.	Tear function and ocular surface findings in premature and term babies.	Ophthalmology	111	901-905	2004
Kaido M, Goto E, Dogru M, Tsubota K.	Punctal occlusion in the management of chronic Stevens-Johnson syndrome.	Ophthalmology	111	895-900	2004

Kojima T, Ishida R, Dogru M, Goto E, Takano Y, Matsumoto Y, Kaido M, Ohashi Y, Tsubota K. 2004; 45(5): 1369-1374.	A new noninvasive tear stability analysis system for the assessment of dry eyes.	Invest Ophthalmol Vis Sci	45	1369-1374 4	2004
--	--	---------------------------	----	----------------	------

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Koseki M, Maki Y, Matsukubo T, Ohashi Y, Tsubota K.	Salivary flow and its relationship to oral signs and symptoms in patients with dry eyes.	Oral Dis	10	75-80	2004
Matsumoto Y, Dogru M, Goto E, Ohashi Y, Kojima T, Ishida R, Tsubota K.	Autologous serum application in the treatment of neurotrophic keratopathy.	Ophthalmology	111	1115-1120	2004
Ono M, Takamura E, Shinozaki K, Tsumura T, Hamano T, Yagi Y, Tsubota K.	Therapeutic effect of cevimeline on dry eye in patients with Sjogren's syndrome: a randomized, double-blind clinical study.	Am J Ophthalmol	138	6-17	2004
Tanaka M, Takano Y, Dogru M, Toda I, Asano-Kato N, Komai-Hori Y, Tsubota K.	Effect of preoperative tear function on early functional visual acuity after laser in situ keratomileusis.	J Cataract Refract Surg	30	2311-2315	2004
Toda I, Asano-Kato N, Hori-Komai Y, Tsubota K.	Ocular surface treatment before laser in situ keratomileusis in patients with severe dry eye.	J Refract Surg	20	270-275	2004



# Molecular Analysis of the Human Autoantibody Response to $\alpha$ -Fodrin in Sjögren's Syndrome Reveals Novel Apoptosis-Induced Specificity

Toshiaki Maruyama,\* Ichiro Saito,<sup>†</sup>  
Yoshio Hayashi,<sup>‡</sup> Elizabeth Kompfner,\*  
Robert I. Fox,<sup>§</sup> Dennis R. Burton,\* and  
Henrik J. Ditzel\*<sup>¶||</sup>

From the Department of Immunology,\* The Scripps Research Institute, La Jolla, California; the Allergy and Rheumatology Clinic,<sup>§</sup> The Scripps Memorial Hospital, La Jolla, California; the Department of Pathology,<sup>†</sup> Tsurumi University School of Dental Medicine, Yokohama, Japan; the Department of Pathology,<sup>‡</sup> Tokushima University School of Dentistry, Tokushima, Japan; Center of Medical Biotechnology,<sup>¶</sup> Institute of Medical Biology, University of Southern Denmark, Odense, Denmark; and Department of Internal Medicine C,<sup>||</sup> Odense University Hospital, Odense, Denmark

**Lymphocyte infiltration of salivary and lacrimal glands leading to diminished secretion and gland destruction as a result of apoptosis is thought to be pivotal in the pathogenesis of Sjögren's syndrome (SS). The cytoskeletal protein  $\alpha$ -fodrin is cleaved during this apoptotic process, and a strong antibody (Ab) response is elicited to a 120-kd fragment of cleaved  $\alpha$ -fodrin in the majority of SS patients, but generally not in other diseases in which apoptosis also occurs. Little is known about the anti- $\alpha$ -fodrin autoantibody response on a molecular level. To address this issue, IgG phage display libraries were generated from the bone marrow of two SS donors and a panel of anti- $\alpha$ -fodrin IgGs was isolated by selection on  $\alpha$ -fodrin immunoblots. All of the human monoclonal Abs (hmAbs) reacted with a 150-kd fragment and not with the 120-kd fragment or intact  $\alpha$ -fodrin, indicating that the epitope recognized became exposed after  $\alpha$ -fodrin cleavage. Analysis of a large panel of SS patients (defined by the strict San Diego diagnostic criteria) showed that 25% of SS sera exhibited this 150-kd  $\alpha$ -fodrin specificity. The hmAbs stained human cultured salivary acinar cells and the staining was redistributed to surface blebs during apoptosis. They also stained inflamed acinar/ductal epithelial cells in SS salivary tissue biopsies, and only partially co-localized with monoclonal Abs recognizing the full-length  $\alpha$ -fodrin. Our study shows that in SS patients, neoepitopes on the 150-kd cleaved product of  $\alpha$ -fodrin become exposed to the immune system, frequently eliciting anti-150-kd  $\alpha$ -fodrin Abs in addition to the previously reported anti-**

**120-kd Abs. The anti-150-kd  $\alpha$ -fodrin hmAbs may serve as valuable reagents for the study of SS pathogenesis and diagnostic analyses of SS salivary gland tissue. (Am J Pathol 2004, 165:53–61)**

Sjögren's syndrome (SS) is the second most common autoimmune rheumatic disease, causing ocular and oral dryness and extraglandular manifestations in three to four million people in the United States alone.<sup>1–3</sup> The disease is characterized by lymphocytic infiltrates and destruction of the salivary and lacrimal glands, and systemic production of characteristic autoantibodies. Xerostomia and keratoconjunctivitis sicca are the common clinical signs, but the San Diego SS diagnostic criteria also require a positive salivary gland biopsy or the presence of autoantibodies to the ribonucleoprotein SS-A/Ro for diagnosis;<sup>4</sup> these requirements are not included in the European Economic Committee diagnostic criteria.<sup>5,6</sup> The typical histopathological findings of SS salivary and lacrimal gland tissues include glandular attrition in acinar and ductal epithelia concomitant with lymphoplasmacytic infiltration consisting of predominantly CD4<sup>+</sup> cells, but also CD8<sup>+</sup>, B cells, and plasma cells. Several immune and inflammatory effector pathways seem to be implicated in the ongoing pathology of SS, but our understanding of the initiation factors and the precise mechanism of epithelial cell damage and dysfunction remains limited.

Recent studies have indicated a 120-kd fragment of  $\alpha$ -fodrin as a potential important autoantigen in the pathogenesis of primary SS in both a mouse model and in humans.<sup>7–11</sup> Fodrin is an abundant component of the membrane cytoskeleton of most eukaryotic cells. It is composed of heterodimers of an  $\alpha$  (240 kd) and a  $\beta$  (235 kd) subunit that share homologous internal spectrin repeats, but have distinct amino- and carboxyl-terminal regions. The  $\alpha$ -fodrin subunit is an actin-binding protein that may be involved in secretion<sup>12–14</sup> and has been shown in apoptotic cells to be cleaved by calpain,

Supported in part by a research grant from the Sjögren's Syndrome Foundation and the National Institutes of Health (grants AI41590 and HL63651 to H.J.D.).

Accepted for publication March 4, 2004.

Address reprint requests to Henrik J. Ditzel, Center of Medical Biotechnology, University of Southern Denmark, Winsloewparken 25, 3, 5000 Odense C, Denmark. E-mail: hditzel@health.sdu.dk.

caspace, and an unidentified protease present in T-cell granule content.<sup>15-18</sup> Indeed, treatment of mice with caspase inhibitors prevents induction of SS.<sup>19</sup> Autoantibodies to the 120-kd cleavage fragment of  $\alpha$ -fodrin have been detected in patients with primary and secondary SS but also in a few systemic lupus erythematosus (SLE) patients without SS.<sup>7,9,20-22</sup> Different diagnostic criteria for SS have been used in the various studies and differences in the specificity of 120-kd  $\alpha$ -fodrin for SS have been observed, which has rendered the importance of 120-kd  $\alpha$ -fodrin as a diagnostic marker controversial.

Here, we have further evaluated the incidence and specificity of anti- $\alpha$ -fodrin Ab response in American SS patients and found a correlation between anti- $\alpha$ -fodrin Ab and SS, but a lower prevalence of anti-120-kd  $\alpha$ -fodrin Abs in American versus Japanese SS patients. We also found that ~25% of SS sera contained Abs against the 150-kd cleavage fragment of  $\alpha$ -fodrin. To examine these Abs at a molecular level, we cloned and characterized a panel of hmAbs from SS patients using phage display technology that specifically recognized the 150-kd  $\alpha$ -fodrin neopeptide. The anti-150-kd hmAbs were shown to detect 150-kd  $\alpha$ -fodrin in apoptotic acinar and ductal salivary gland cells in cell culture, and in SS salivary gland tissue sections, indicating that the hmAbs may be useful diagnostic reagents in SS pathology.

## Materials and Methods

### Patients

Sera were obtained from 60 SS patients (42 American and 18 Japanese) who fulfilled the San Diego criteria for the diagnosis of SS,<sup>23</sup> 12 rheumatoid arthritis (RA) patients; 12 SLE patients, diagnosed based on American College of Rheumatology criteria; and 10 healthy individuals. Bone marrow from two Caucasian American patients with secondary SS (designated SS23 and SS30) were obtained for Ab library construction.

### Western Blot Analysis

$\alpha$ -Fodrin was purified from mouse brain tissue using the method of Cheney and colleagues<sup>24</sup> yielding >95% purity. Mouse  $\alpha$ -fodrin exhibits 94% amino acid sequence identity to human  $\alpha$ -fodrin. Coomassie staining of mouse brain  $\alpha$ -fodrin separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) on a 10% Tris-HCl gel (Bio-Rad, Hercules, CA) showed an intense band at 240 kd corresponding to intact  $\alpha$ -fodrin, but also weaker bands at 180, 150, 120, 80, 50, and 30 kd that corresponded to cleaved  $\alpha$ -fodrin because of low levels of constitutive apoptosis, as previously reported.<sup>14,17,24,25</sup> Mouse brain  $\alpha$ -fodrin separated by SDS-PAGE was also electroblotted onto polyvinylidene difluoride membrane (Immobilon P; Millipore, Bedford, MA), the membrane was blocked with 5% nonfat dry milk (Bio-Rad) in phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.0, for 30 minutes, and incubated with serum (diluted 1:1000 in PBS), human recombinant Fabs (1 to 20  $\mu$ g/ml) or mouse

anti- $\alpha$ -fodrin mAb AA6 (Affiniti, Exeter, UK) for 1 hour on a rotator. mAb AA6 predominantly recognizes the 240-kd intact form of  $\alpha$ -fodrin, but also the 120- and 150-kd cleaved form of  $\alpha$ -fodrin. The membrane was washed three times (10 minutes/wash) in PBS and bound serum Ab was detected with horseradish peroxidase-conjugated goat Fab anti-human IgG (H+L) Ab (Bio-Rad). A patient serum was used as internal control in each blotting experiment to adjust for band intensity variations between gels. The intensity of the bands was scored (1 to 5) based on quantification by densitometry. Bound human recombinant Fabs were detected with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-human IgG F(ab')<sub>2</sub> Ab and bound mouse mAb detected with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG Ab (both Jackson) diluted in blocking solution and incubated for 1 hour at room temperature. After washing for 45 minutes with PBS, membranes were rinsed briefly in MilliQ water, and bound enzyme-labeled Ab was visualized using chemiluminescent substrate (SuperSignal, WestPico; Pierce, Rockford, IL) according to the manufacturer's instructions and autoradiographic film (Eastman Kodak, Rochester, NY). All incubations were done at room temperature. As controls, all experiments were performed using the anti-Ebola virus Fab ELZ510, the anti-HIV-1 gp120 Fab b12, normal sera or by omitting the primary Ab.

### Analysis of Patient Sera and Human Fabs by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Mouse brain  $\alpha$ -fodrin (2  $\mu$ g/ml) and ovalbumin (4  $\mu$ g/ml) (Pierce) were coated onto microtiter wells (Costar, Cambridge, MA) at 4°C overnight. Wells were washed with PBS; blocked with 4% nonfat dry milk in PBS for 30 minutes; and incubated with patient serum (diluted 1:100 and 1:400 in PBS), human Fabs, or mouse anti- $\alpha$ -fodrin mAb AA6 for 1 hour at 37°C. Wells were washed six times with PBS-0.05% Tween and bound Ab was detected with alkaline phosphatase-conjugated goat IgG anti-human IgG F(ab')<sub>2</sub> Ab or anti-mouse IgG F(ab')<sub>2</sub> Ab (both 1:500 in 1% bovine serum albumin/PBS, Pierce) and visualized with nitrophenol substrate (NPP substrate) (Sigma, St. Louis, MO) by reading absorbance at 405 nm.

### RNA Isolation and Library Construction

RNA was isolated from bone marrow of two American SS patients (designated SS23 and SS30) by a guanidinium isothiocyanate method, as described previously.<sup>26</sup> Serum samples from each donor were drawn concomitantly. After reverse-transcription, the  $\gamma$ 1 (Fd region) and  $\kappa$  and  $\lambda$  chains were amplified by polymerase chain reaction and phage-display libraries were constructed in the phage-display vector pComb3, as described previously.<sup>27-29</sup>

### Ab Library Selection

Libraries were selected against  $\alpha$ -fodrin blotted membrane. Mouse brain  $\alpha$ -fodrin was separated by SDS-

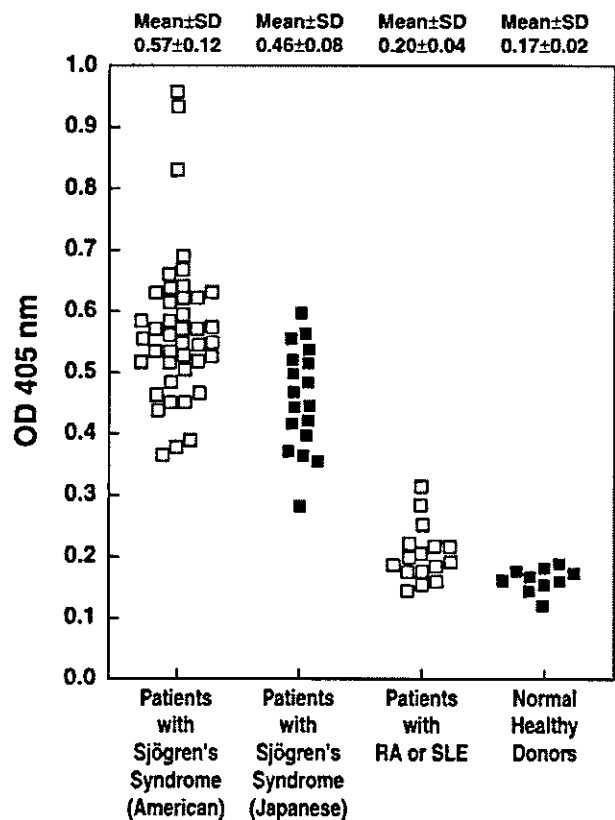
PAGE using a 10% Tris-HCl gel and transferred to polyvinylidene difluoride membranes. After blocking with 5% nonfat dry milk/PBS for 30 minutes, the membrane was incubated with phage ( $10^{11}$  pfu) resuspended in PBS containing 1% bovine serum albumin for 2 hours at room temperature. The membrane was washed and the bound phage, enriched for those bearing antigen-binding surface Fabs, were eluted with 0.2 mol/L glycine-HCl buffer, pH 2.2, as previously described.<sup>29-31</sup> The eluted phages were amplified by infection of *Escherichia coli* and superinfection with M13 helper phage. The libraries were panned for four consecutive rounds with increasing washing stringency ( $2 \times 10$  minutes for first panning round and  $4 \times 10$  minutes thereafter). Phagemid DNA, isolated after the last round of panning, was digested with *NheI* and *SpeI* restriction endonucleases and religated to excise the *cpIII* gene. The reconstructed phagemid was used to transform XL1-Blue cells (Stratagene, La Jolla, CA) to produce clones secreting soluble Fab fragments. Positive Fab clones were purified from bacterial supernatants by affinity chromatography as previously described.<sup>32</sup>

### Nucleic Acid Sequencing

Nucleic acid sequencing was performed on a 373A or 377A automated DNA sequencer (ABI, Foster City, CA) using a *Taq* fluorescent dideoxy terminator cycle sequencing kit (ABI). Sequencing primers were as reported.<sup>33</sup> Comparison to reported Ig germline sequences from GenBank and EMBL was performed using the Genetic Computer Group (GCG) sequence analysis program.

### Confocal Laser-Scanning Microscopy Analysis of Human Cells and Tissue Biopsies

Human salivary gland (HSG) cells were grown in minimum essential medium, Eagle's, in Earle's balanced salt solution (EMEM) medium supplemented with 10% fetal calf serum and allowed to adhere to chambered coverslips (Nunc, Kamstrup, Denmark) for 48 hours at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, to form monolayers. Apoptosis of HSG cells was induced by incubating the cells with 100 ng/ml of tumor necrosis factor- $\alpha$  (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY) and 1  $\mu$ g/ml of cycloheximide for 3 to 15 hours at 37°C/5% CO<sub>2</sub>. Untreated cells or those induced to undergo apoptosis were fixed by 96% ice-cold ethanol for 5 minutes at 4°C or by 4% paraformaldehyde for 10 minutes at room temperature. Paraformaldehyde-fixed cells were washed in PBS before being permeabilized in 0.005% saponin for 10 minutes at room temperature. After washing in PBS and blocking with 5% normal goat serum for 1 hour, cells were incubated with Ab. Fresh-frozen tissue was obtained from labial biopsies of patients with active SS and healthy controls. Freshly cut 5- $\mu$ m sections were dried overnight, fixed by ice-cold 96% ethanol for 5 minutes at 4°C or by acetone for 10 minutes at room temperature, and blocked with 5% normal goat serum. HSG cells and tissue sections were incubated with human Fabs (10  $\mu$ g/ml in PBS), or mouse



**Figure 1.** Sera from SS patients contain anti- $\alpha$ -fodrin Abs, as measured by ELISA. Sera, diluted 1:400 in PBS, from 42 American SS patients, 17 Japanese SS patients, 16 RA and SLE patients, and 10 healthy individuals were tested for binding to mouse brain  $\alpha$ -fodrin by ELISA. Samples with  $A_{405}$  values more than twice the mean of the control normals ( $>0.33$ ) were considered positive.

anti- $\alpha$ -fodrin mAb AA6 (Affiniti) for 1 hour. In some experiments apoptotic cells were stained with Annexin V-FITC (Pharmingen, La Jolla, CA) for 1 hour before fixation. The slides were washed with PBS and incubated with fluorescein isothiocyanate-labeled (Fab')<sub>2</sub> goat anti-human IgG (Fab')<sub>2</sub> Ab (Jackson), and Texas Red-labeled goat anti-mouse IgG Ab (Jackson), or propidium iodide (Sigma) for 1 hour. The slides were again washed with PBS for 5 minutes and mounted with Slow Fade in PBS/glycerol (Molecular Probes, Eugene, OR) before analysis using a Zeiss Axiovert S100 TV confocal laser-scanning microscope (Zeiss, New York, NY). All incubations were performed at room temperature unless otherwise indicated. As controls, all experiments were performed using the human Fab b12 to HIV-1 gp120 or by omitting the primary Ab. Adjacent tissue sections were hematoxylin and eosin stained or stained with anti-CD3 (DAKO, Carpinteria, CA), and anti-cytokeratin 18 (CY-90; Sigma-Aldrich) mAbs to determine the cell type present.

### Results

#### Serological Analysis of $\alpha$ -Fodrin Autoantibodies in SS Patients

To investigate the specificity and sensitivity of anti- $\alpha$ -fodrin Abs for SS, serum from patients with SS, RA, SLE,

and healthy individuals were tested for binding to mouse brain  $\alpha$ -fodrin by ELISA. A secondary Ab capable of detecting both IgG and IgA was used, because anti- $\alpha$ -fodrin Ab of both the IgG and IgA have been suggested to be elevated in SS sera. As shown in Figure 1, elevated  $\alpha$ -fodrin Ab levels were observed in both American and Japanese SS patients compared to the RA and SLE patient groups and healthy individuals. Positivity was defined as an OD<sub>405</sub> value greater than twice the mean of the normal controls (>0.33) at a serum dilution of 1:400. Sera from all of the American SS patients and all but one of the Japanese SS patients were positive for  $\alpha$ -fodrin Abs (98%), whereas only 1 of 16 RA/SLE patients (6%), and none of the healthy donors, were positive. The mean level of anti- $\alpha$ -fodrin Ab in both the American (OD<sub>405</sub> nm, 0.57  $\pm$  0.12) and Japanese SS patients (OD<sub>405</sub> nm, 0.46  $\pm$  0.08) were significantly higher than healthy controls (0.17  $\pm$  0.02,  $P < 0.0001$ ) or the RA/SLE patients (0.20  $\pm$  0.04,  $P < 0.0001$ ). The mouse anti- $\alpha$ -fodrin mAb AA6 was included in each experiment as a control (OD<sub>405</sub> nm, 0.8).

The frequency of SS sera with Abs specific for the 120-kd fragment of cleaved  $\alpha$ -fodrin was determined by assessing binding to Western blots of mouse brain  $\alpha$ -fodrin. Fifteen of 42 American SS sera (36%) (diluted 1:1000) exhibited reactivity against the 120-kd fragment of  $\alpha$ -fodrin (Table 1). In addition, 10 sera showed reactivity with a 150-kd fragment of cleaved  $\alpha$ -fodrin (24%), while 7 showed reactivity with a 180-kd fragment and other cleaved products of  $\alpha$ -fodrin. As shown in Table 1, some patient sera reacted with multiple  $\alpha$ -fodrin fragments, whereas the Western blot for other sera revealed reactivity with only one of the fragments. Overall, 22 American SS sera (52%) reacted with at least one form of cleaved  $\alpha$ -fodrin. When the 17 Japanese SS sera were tested by Western blotting, the prevalence of anti- $\alpha$ -fodrin Ab reactivity was found to be significantly higher than in the American SS sera (12 of 17 positive, 70.6%;  $P < 0.01$ ). All of the  $\alpha$ -fodrin-reactive sera from the Japanese patients recognized 120-kd, but five also bound to the 150-kd  $\alpha$ -fodrin (29.4%) (Table 1). Serum of 8 RA patients, 8 SLE patients, and 10 healthy individuals was also tested by Western blot analysis. Only one SLE serum was found to react with the 120-kd fragments of  $\alpha$ -fodrin and none reacted with the 150-kd fragments of  $\alpha$ -fodrin.

#### *Isolation of Human IgG mAbs Against the 150-kd Form of Cleaved $\alpha$ -Fodrin from SS Patients*

To characterize the anti-150-kd  $\alpha$ -fodrin Abs response at a molecular level, IgG<sub>1</sub>  $\kappa/\lambda$  Ab phage display libraries were generated from two patients (SS23 and SS30), whose sera predominantly recognized the 150-kd cleavage fragment of  $\alpha$ -fodrin and also reacted with extract of human SS salivary gland tissue. As starting material for the Ab library construction, bone marrow was obtained from patients SS23 and SS30. Bone marrow has been shown to be a major repository for the plasma cells that produce the Abs found in the circulation. The Ab libraries from patients SS23 ( $\approx 6 \times 10^6$  members) and SS30

**Table 1.** Binding of American (ASSP) and Japanese (JSSP) SS Patient Sera to Cleaved Mouse Brain  $\alpha$ -Fodrin by Western Blot Analysis

Patient	Intensity* of bands	Fragment size (kd)
ASSP1	–	
ASSP2	–	
ASSP3	1+	150
ASSP4	–	
ASSP5	–	
ASSP6	1+	120
ASSP7	3+	180
ASSP8	3+	120, 150, 50
ASSP9	2+	120
ASSP10	–	
ASSP11	–	
ASSP12	1+	150, 80, 30
ASSP13	–	
ASSP14	–	
ASSP15	–	
ASSP16	–	
ASSP17	–	
ASSP18	–	
ASSP19	1+	120, 150
ASSP20	1+	120, 150
ASSP21	–	
ASSP22	2+	150, 180
ASSP23	4+	120, 150
ASSP24	–	
ASSP25	2+	150
ASSP26	–	
ASSP27	2+	150
ASSP28	3+	120, 180
ASSP29	2+	120, 180
ASSP30	5+	150
ASSP31	3+	120
ASSP32	–	
ASSP33	–	
ASSP34	3+	120
ASSP35	2+	120, 180, 50
ASSP36	1+	120
ASSP37	–	
ASSP38	–	
ASSP39	1+	120, 180, 50
ASSP40	–	
ASSP41	2+	120, 180, 80
ASSP42	2+	120, 50
JSSP1	3+	120
JSSP2	2+	120
JSSP3	2+	120, 150
JSSP4	2+	120
JSSP5	2+	120, 150
JSSP6	1+	120
JSSP7	1+	120, 150
JSSP8	1+	120
JSSP9	1+	120
JSSP10	1+	120, 150
JSSP11	1+	120
JSSP12	1+	120, 150
JSSP13	–	
JSSP14	–	
JSSP15	–	
JSSP16	–	
JSSP17	–	

\*The intensity was evaluated at a scale 1 to 5; 5 being the most intense.

( $\approx 8 \times 10^6$  members) were panned against mouse brain  $\alpha$ -fodrin consisting of mostly intact  $\alpha$ -fodrin, but also a small amount of apoptotic cleaved  $\alpha$ -fodrin. The  $\alpha$ -fodrin preparation was either separated by SDS-PAGE and