

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14年度～16年度 総合研究報告書

主任研究者 坪田一男

平成17（2005）年3月

目 次

I. 総合研究報告書

涙腺の分化増殖機構の解明と再生医療への応用----- 1
坪田一男

II. 研究成果の刊行に関する一覧表-----14

III. 研究成果の刊行物・別刷-----16

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
（総合）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の難治性疾患に起因した重篤な涙液分泌障害では、これまで根治療法が存在せず、再生医療を応用した新規治療法の開発が望まれている。自己組織再生による機能回復には 1) 内在性の組織幹細胞の活性化 2) 組織幹細胞を用いた細胞治療の応用の二つの方法が考えられている。本研究は、これらの観点から遂行され以下のことが明らかとなった。1) プロラクチンが涙腺・唾液腺における組織再生を促進する因子であること 2) p53 欠損マウスから樹立した涙腺・唾液腺細胞株における発現遺伝子プロファイルを serial analysis gene expression (SAGE 法) により作製し涙腺・唾液腺特異的に分化誘導する候補遺伝子を同定 3) p53 欠損マウスから樹立した細胞株を用いた 3 次元的腺組織再構築モデルの確立 4) 組織幹細胞を多く含む分画として知られる side population cell (SP 細胞) を涙腺・唾液腺組織で同定 5) DNA microarray により SP 細胞特異的に発現する複数の遺伝子を特定 6) 涙液・唾液分泌障害マウスに SP 細胞を移入した結果、涙液および唾液の回復が認められた。7) レシピエントマウスの涙腺・唾液腺では GFP 陽性細胞の存在が確認された。8) SP 細胞特異的に発現する遺伝子の一つ (FactorX) が活性酸素種による細胞障害性を抑制することが明らかとなった。

これらの結果より、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。

分担研究者 斎藤一郎 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傷害された涙腺・唾液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・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

本研究は 1) 涙腺組織幹細胞の大量培養および、その分化誘導に必要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た。

1. トランスジェニックラットを用いたプロラクチンの機能解析

(1) プロラクチン発現トランスジェニックラット (PRL-TG) の作出

涙腺・唾液腺局所にプロラクチン遺伝子を発現させるため、parotid secretory protein のプロモーターである Lama6 を用い、この下流にラットプロラクチン遺伝子をつなぎ TG の遺伝子を構築した。

(2) PRL-TG における涙腺・唾液腺放射線障害後の修復能の検討

上記で作成した TG の涙腺・唾液腺に 15Gy の放射線照射を行う。コントロールの放射線照射を行った正常ラットと比較検討を行った。

2. p53 欠損マウスより涙腺細胞株 (ML) および唾液腺細胞株 (MSG) を用いた解析

(1) p53 欠損マウスより涙腺細胞株 (ML) および唾液腺細胞株 (MSG) の樹立 p53 欠損マウスより涙腺および唾液腺を採取し酵素処理により細胞を分散した後、EGF および下垂体ホルモンを含んだ serum free keratinocyte medium で培養し細胞株を樹立した。

(2) p53 欠損マウスより樹立された涙腺細胞 (ML) の遺伝子プロファイルの作成

p53 欠損マウスより樹立された涙腺細胞 (ML) における発現遺伝子プロファイルを serial analysis of gene expression (SAGE) 法により作成さらに、この data をすでに homepage 上で公開されている ES 細胞の発現遺伝子プロファイルと比較し、統計学的解析を行い、涙腺特異的に分化を誘導する候補遺伝子を選択する。また、これまで涙腺と唾液腺は発生学的あるいは組織学的に非常に類似した組織と考えられ特異的なマーカー分子の報告はない。そこで、p53 欠損マウスの唾液腺から樹立された唾液腺細胞の発現遺伝子プロファイルを涙腺と同様な方法により作成し、涙腺細胞株の発現遺伝子プロファイルと比較することにより、涙腺特異的に発現している遺伝子を同定する。

(3) 樹立した唾液腺細胞株における発現蛋白の解析

培養した細胞株から抽出した蛋白をアクリルアミドゲルで電気泳動後ウエスタンブロット法によりサイトケラチン 14 と α -smooth muscle actin (α -SMA) の発現を検討した。

(4) 樹立した唾液腺細胞株における分化能の解析

樹立した細胞株をマトリジェル上で培養した後、形態学的な変化を検討した。また、マトリジェル上で培養した細胞より RNA を抽出し RT-PCR により分化マーカーの発現を解析した。

(5) 樹立した唾液腺細胞株の in vivo における腺組織の再構築能の解析

樹立した細胞株を PBS あるいはマトリジェルとともにヌードマウスの皮下に移植し 3 ヶ月後に摘出標本を組織学的に検索した。

3. 涙腺・唾液腺組織幹細胞を用いた解析

(1) 涙腺・唾液腺組織幹細胞の同定

肝臓をはじめ多くの臓器で特異的マーカー分子を利用した幹細胞の単離が可能となったが、これまで涙腺・唾液腺特異的な幹細胞のマーカー分子に関する報告はなく、幹細胞の単離は困難と考えられていた。最近になり ES 細胞、造血幹細胞、組織幹細胞に共通して ATP binding cassette (ABC) transporter の発現が報告され、幹細胞マーカーとして利用が可能と考えられる。ABC transporter を有する細胞は色素排除能を有し Hoechst3342 で処理しても染色されない細胞群

(side population, SP 細胞) として検出されることが報告されている。この方法は、涙腺・唾液腺にも応用が可能で、具体的には、マウスより採取した涙腺を酵素処理し細胞を分散した後 Hoechst3342 により染色し、FACS Vantage (自動細胞分離装置:フローサイトメトリー) により Hoechst3342(-)分画を sorting した。

(2) 涙腺・唾液腺 SP 細胞に特異的な発現遺伝子の解析

fluorescence activated cell sorter (FACS) を用いて涙腺・唾液腺組織より得られた SP 細胞と non-SP 細胞 (main population cell, MP 細胞)

から RNA を採取した。採取した RNA それぞれを T7 promoter-based method により増幅した後 NIA mouse 15K cDNA microarray (Version2) 上で競合的に hybridization を行うことにより発現量に差のある遺伝子を同定した。

(3) cDNA microarray により同定された遺伝子の発現を検証

MP 細胞と比較して SP 細胞において高発現が認められた因子について RT-PCR によりそれらの発現を検証した。

4. 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 (ST0) に遺伝子導入する。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を介した染色体 DNA などの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) H₂O₂ 刺激後の生細胞数の計測

樹立 STO 細胞および mock 細胞の培養上清に種々の濃度の H₂O₂ 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) H₂O₂ 刺激後の細胞内の ROS 量

細胞内で産生される ROS 量を蛍光色素である 100nM の CM-H₂DCFDA 染色後 FACS により解析した。CM-H₂DCFDA 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。

5. 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する。

(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(5×10³cell~1×10⁴cell)を放射線照射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。

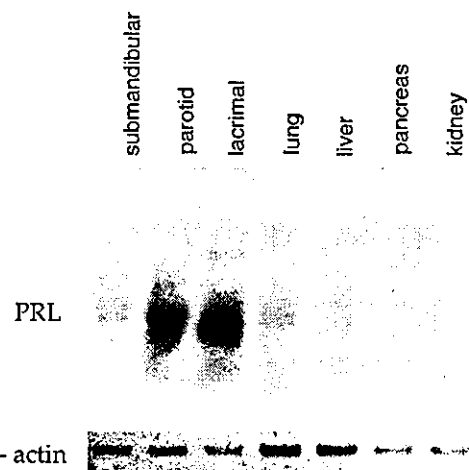
(倫理面への配慮)

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

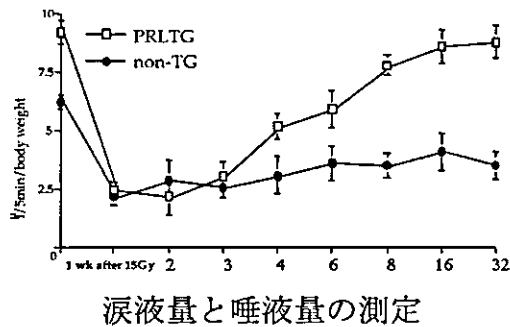
1. PRL-TG を用いた解析

(1) 作出された PRL-TG ではプロラクチン発現が耳下腺や涙腺組織で認められたが、顎下腺や肺、肝臓などに明らかな発現は認められなかった。



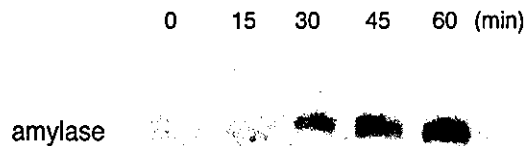
ノーザンブロット法を用いた導入遺伝子発現の確認

(2) PRL-TG はノン TG と比較すると、唾液分泌量の亢進を認めた。更に、PRL-TG に放射線を 15Gy 照射し、放射線障害後の分泌能の賦活化を検討したところ、照射後 3 週間までは PRL-TG、non-TG 共に著しい分泌量の低下を示したが、その後、PRL-TG では徐々に唾液分泌量が亢進し、照射後 16 週では未照射のラットと同等な分泌量に回復した。



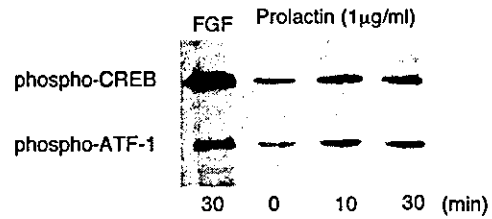
涙液量と唾液量の測定

(3) ヒト唾液腺細胞株 (HSY) を用いてプロラクチンの分泌能に与える影響を検討した。プロラクチン 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を HSY 培養上清に添加し、分泌能の指標である唾液アミラーゼを検出したところ、添加 30 分後で明らかなアミラーゼタンパクの発現が検出された。



プロラクチン刺激によるアミラーゼ蛋白発現

これまでの報告により、cAMP を介した経路が涙腺・唾液腺の分化に関与している可能性が考えられ、その下流に位置している転写因子の一つである CREB のリン酸化が検出されるか否かを検討した。HSY にプロラクチンを添加後 10 分でリン酸化 CREB が認められ経時的に増強することがみられた。

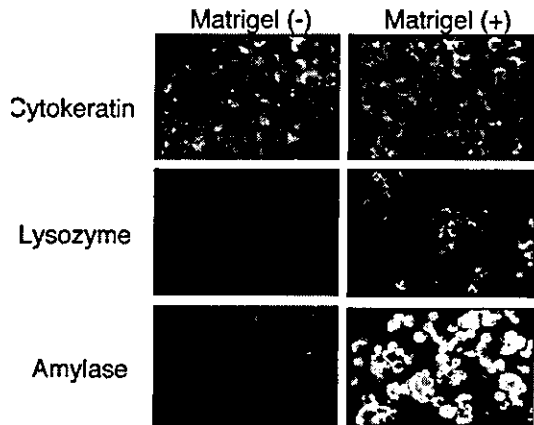


プロラクチン刺激によるのリン酸化 CREB の検出

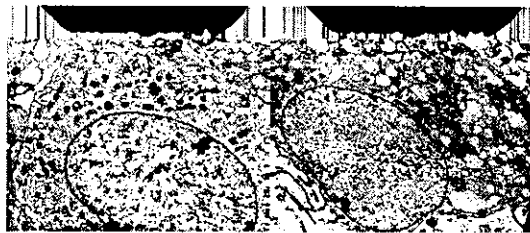
従って、プロラクチンによる唾液分泌能と PRL-TG における腺組織の再生機序に転写因子 CREB の関与が示唆された。

2. p53^{-/-}唾液腺細胞株 (MSG) を用いた解析

(1) 我々は p53^{-/-}マウスより樹立した涙腺 (ML) および唾液腺細胞 (MSG) を用いて分化経路に関する詳細な検討を行った。これらの細胞はケラチン陽性で、マトリジェル上で培養するとリゾチームおよびアミラーゼ陽性を示した。また、電子顕微鏡にて形態学的特徴を検討した結果、マトリジェル上での培養により分泌顆粒の産生が認められた。従って、これらの細胞株は涙腺・唾液腺の上皮細胞であり、分泌細胞への分化能を有すると考えられた。



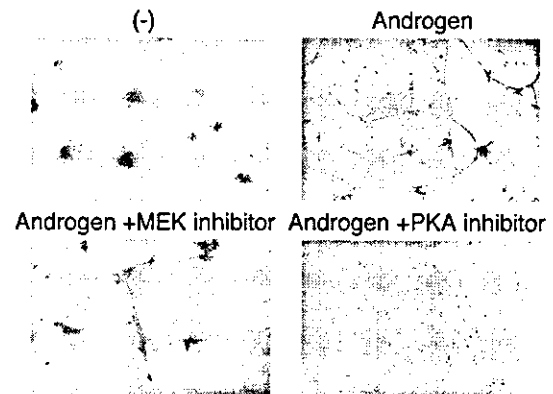
matrigel による各種分泌マーカーの検索



分泌顆粒の電顕的観察

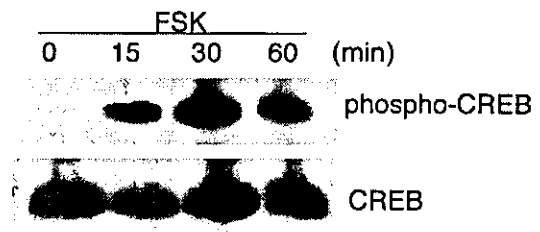
これらの細胞を用いて涙腺・唾液腺の形態形成を促進させると報告されている因子についてその機能を解析した。ここでは以前より唾液腺の分化を促進すると報告されている性ホルモンの一つであるアンドロジェンの機能について解析を行った。

アンドロジェンを添加したマトリジェル上で MSG を培養すると branching の促進が認められたので、そのメカニズムを検討するため、アンドロジェンを加えたマトリジェルに、さらに MAP キナーゼ経路のインヒビターとして MEK インヒビターと、cAMP 活性化経路の下流である PKA のインヒビターを用いて形態学的特徴を観察した。その結果、MEK インヒビター添加により部分的に、PKA インヒビター添加により完全にアンドロジェンによる branching の促進が抑制された。

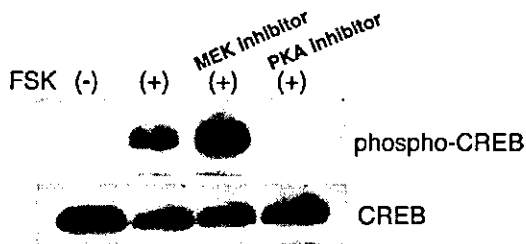


inhibitor によるアンドロジェンを介した branching の抑制効果

これらの結果より唾液腺細胞の branching には PKA を介した経路が関与している可能性が示唆されたので、その下流に位置している転写因子の一つである CREB のリン酸化について抗リン酸化 CREB 抗体を用いたウェスタンブロット法により検出した。アデニル酸シクラーゼの活性化を介して、cAMP 濃度を上昇させる forskolin (FSK) で刺激した後、抗リン酸化 CREB 抗体を用いたウェスタンブロット法により検出した結果、forskolin 刺激 15 分よりリン酸化 CREB が検出された。このリン酸化は PKA inhibitor 存在下では抑制されるが、MEK inhibitor では抑制されなかった。



forskolin 刺激によるリン酸化 CREB の検出



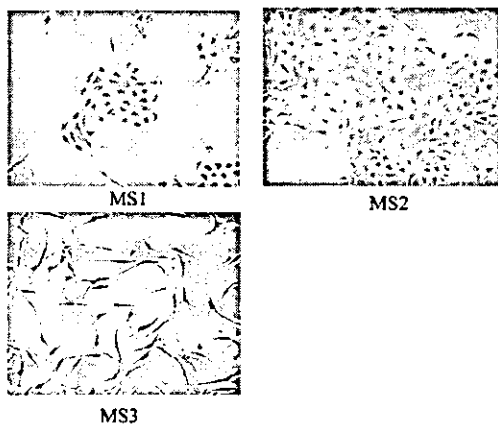
inhibitor による forskolin を介した CREB のリン酸化抑制効果

(2) 涙腺・唾液腺特異的な分化誘導因子の同定

SAGE 法により作製された ML、MSG、における発現遺伝子プロファイルと既に公開されている ES 細胞の発現遺伝子プロファイルを比較し統計学的な解析を行っている。

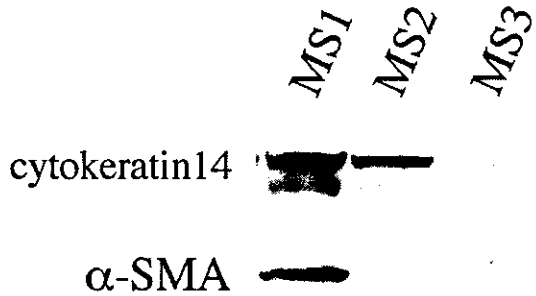
(3) p53^{-/-}マウスの涙腺・唾液腺より樹立した涙腺細胞株および唾液腺細胞株の三次元的に腺組織を再構築する可能性について検討した。p53^{-/-}マウスの唾液腺組織の培養により得られた細胞を限界希釈して得られたクローンの中から明らかに敷石状構造を示す上皮様細胞株を 2 クローン

(MS1 細胞および MS2 細胞) と紡錘形の線維芽細胞様の形体を示す細胞株 1 クローン (MS3 細胞) を選びこれらの細胞の特徴を解析した。



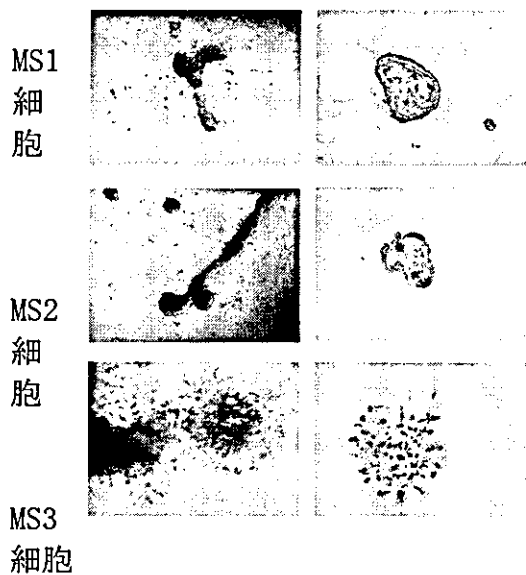
p53^{-/-}マウスより樹立した唾液腺細胞株の組織像

これらの細胞株はウエスタンブロットにより MS1 細胞はサイトケラチン 14 陽性、 α -smooth muscle actin 陽性、MS2 細胞はサイトケラチン 14 陽性、 α -smooth muscle actin 陰性。MS3 細胞はいずれも陰性であった。



p53^{-/-}マウス唾液腺より樹立した細胞株における発現蛋白の検討 (ウエスタンブロット法)

加えて電子顕微鏡を用いて微細構造を解析したところ MS1 細胞および MS2 細胞では上皮様の構造が、一方 MS3 では間葉系由来を示唆する構造が認められた。これまでヒト唾液腺細胞株 (HSG) を用いた解析では唾液腺上皮細胞をマトリゲル上で培養することにより腺房細胞様の分化を誘導することが可能であると報告されていたので、これらの細胞についてもマトリゲル上で培養し分泌細胞への分化能の有無について解析した。マトリゲル上で一週間培養すると MS1 細胞および MS2 細胞では棍棒状の導管様構造の形成がみられ MS2 細胞では部分的に分泌細胞への分化を認めた。MS3 では多数の紡錘形細胞の集合よりなる凝集体を形成するのみで導管様構造や分泌細胞の存在は認められなかった。



MS1 細胞
MS2 細胞
MS3 細胞

p53^{-/-}マウス唾液腺より樹立された細胞株をマトリゲル上で一週間培養，左：位相差顕微鏡像，右：薄切標本のヘマトキシリン・エオジン染色像

次に、これらの細胞が分泌細胞への分化能を有するか否かを検証するためにマトリゲル上で培養した細胞からRNAを抽出し、唾液腺の分化マーカーである amylase の遺伝子発現をRT-PCRにより検討したところ、MS1細胞、MS3細胞では amylase mRNA が検出されずMS2細胞では検出された。従って、MS2細胞は腺房細胞様の分泌細胞に分化する可能性が示唆された。

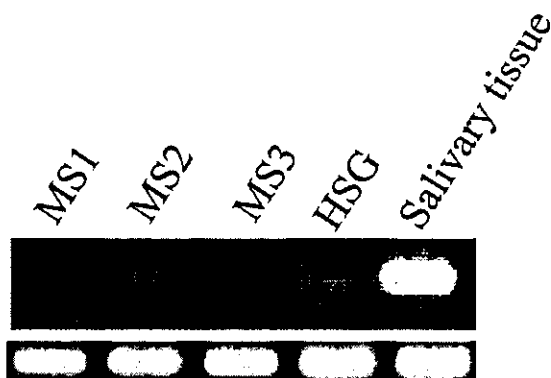


図4 RT-PCRによる amylase mRNA

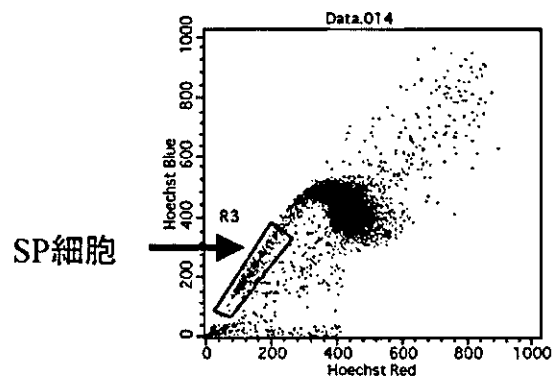
の検出;上段 amylase, 下段 β -actin

3. 涙腺・唾液腺組織幹細胞を用いた解析

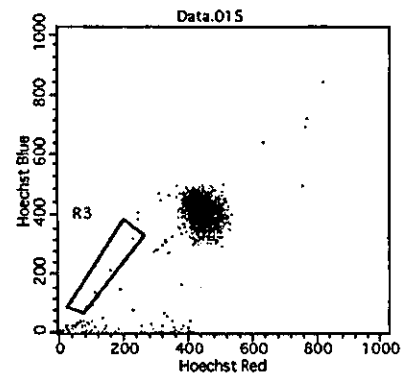
(1) SP細胞の単離

6週齢の雄性 C57/BL6 マウスの涙腺・唾液腺より SP細胞を採取した。また、これらの細胞は ABC transporter の阻害剤であるレセルピンにより色素排除能が阻害されていることが確認された。

Reserpine(-)



Reserpine(+)



FACSを用いた涙腺 SP細胞の同定

採取した細胞は培養可能で、広い細胞質を有する上皮様の細胞が認められた。

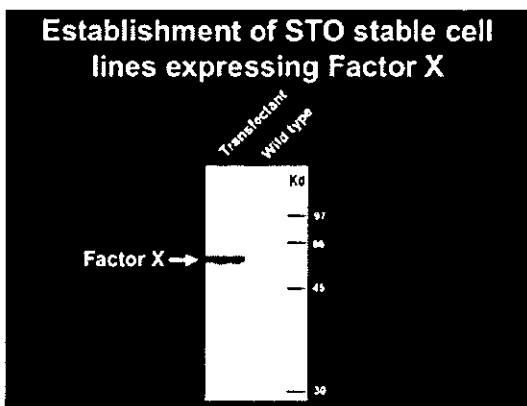
(2) cDNA microarray による涙腺・唾液腺 SP細胞の発現遺伝子解析

涙腺・唾液腺の SP細胞に高発現が認められる複数の遺伝子が明らかとな

った。

(3) 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。) 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。

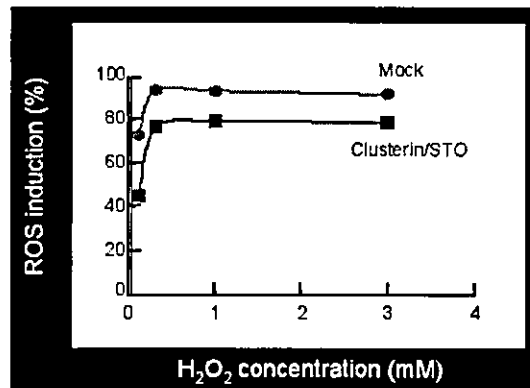


また、FactorX は分泌蛋白であり STO-FactorX 細胞の培養上清にその存在が確認された。

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。

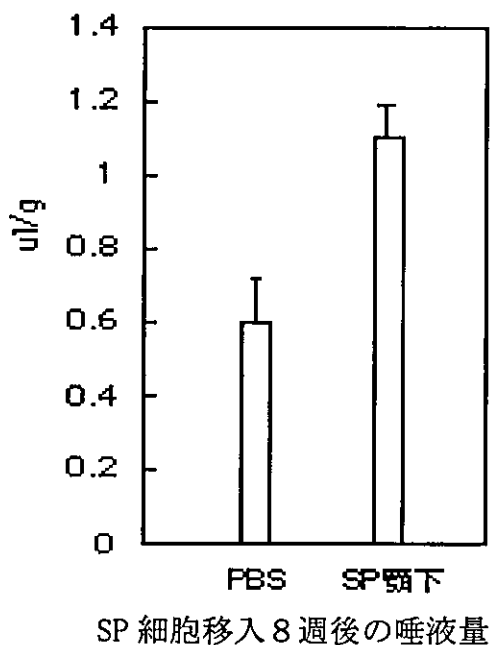
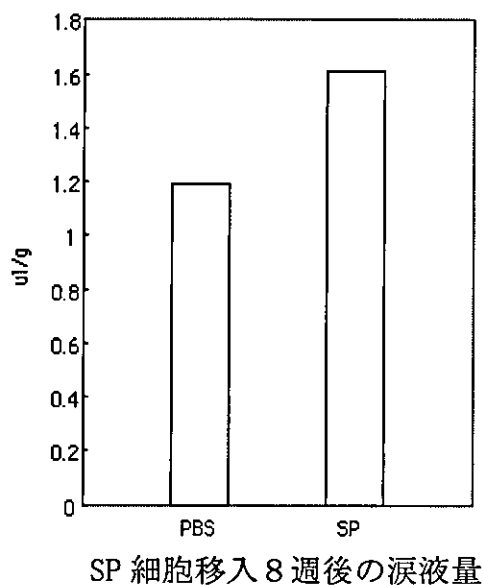


さらに、細胞内で産生される ROS 量を蛍光色素である 100nM の $CM-H_2DCFDA$ 染色後 FACS により解析した結果、STO-FactorX 細胞では mock と比較して有意に ROS 量の減少が認められた。



4. 涙液・唾液分泌障害マウスを用いた治療実験

涙腺および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 (5×10^3 cell ~ 1×10^4 cell) を移入した結果、涙液・唾液量の回復が認められた。



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・唾液腺摘出標本において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

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に応用され、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、眼科領域でもスティーブン・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。スティーブン・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やプロラクチン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. 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 α -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 δ 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, Koksall 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, 7 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. 4thInternational 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. 4thInternational Conference on the Lacrimal Gland, Tear Film, Ocular Surface and Dry Eye Syndromes: Basic Science and Clinical Relevance., Fajardo, Puerto Rico, 2004.
- (8) Arakaki, R., Ishimaru, N., Saito, I., Kobayashi, M., Yasui, N., Sumida, T., Hayashi, Y.: Development of autoimmune exocrinopathy resembling Sjogren's syndrome in adoptively transferred mice with autoreactive CD4+ T cells. Arthritis Rheum., 48: 3603-3609, 2003.
- (9) Takeda, I., Kizu, Y., Okamoto, Y., Saito, I., Yamane, G.: Possible role of nitric oxide in radiation-induced salivary gland dysfunction. Radiation Research, 159: 465-470, 2003.
- G. 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 δ 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 α -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	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
Arakaki R, Ishimaru N, Saito I, Kobayashi M, Yasui N, Sumida T, Hayashi Y.	Development of autoimmune exocrinopathy resembling Sjogren's syndrome in adoptively transferred mice with autoreactive CD4+ T cells.	Arthritis Rheum	48	3603-3609	2003
Takeda I, Kizu Y, Okamoto Y, Saito I, Yamane G.	Possible role of nitric oxide in radiation-induced salivary gland dysfunction.	Radiation Research	159	465-470	2003

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

Toshiaki Maruyama,* Ichiro Saito,[†]
Yoshio Hayashi,[‡] Elizabeth Kompfner,*
Robert I. Fox,[§] Dennis R. Burton,* and
Henrik J. Ditzel*^{¶||}

From the Department of Immunology,* The Scripps Research Institute, La Jolla, California; the Allergy and Rheumatology Clinic,[‡] The Scripps Memorial Hospital, La Jolla, California; the Department of Pathology,[†] Tsurumi University School of Dental Medicine, Yokohama, Japan; the Department of Pathology,[§] Tokushima University School of Dentistry, Tokushima, Japan; Center of Medical Biotechnology,[¶] Institute of Medical Biology, University of Southern Denmark, Odense, Denmark; and Department of Internal Medicine C,^{||} 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 α -fodrin is cleaved during this apoptotic process, and a strong antibody (Ab) response is elicited to a 120-kd fragment of cleaved α -fodrin in the majority of SS patients, but generally not in other diseases in which apoptosis also occurs. Little is known about the anti- α -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- α -fodrin IgGs was isolated by selection on α -fodrin immunoblots. All of the human monoclonal Abs (hmAbs) reacted with a 150-kd fragment and not with the 120-kd fragment or intact α -fodrin, indicating that the epitope recognized became exposed after α -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 α -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 α -fodrin. Our study shows that in SS patients, neoepitopes on the 150-kd cleaved product of α -fodrin become exposed to the immune system, frequently eliciting anti-150-kd α -fodrin Abs in addition to the previously reported anti-

120-kd Abs. The anti-150-kd α -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.^{1–3} 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;⁴ these requirements are not included in the European Economic Committee diagnostic criteria.^{5,6} 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⁺ cells, but also CD8⁺, 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 α -fodrin as a potential important autoantigen in the pathogenesis of primary SS in both a mouse model and in humans.^{7–11} Fodrin is an abundant component of the membrane cytoskeleton of most eukaryotic cells. It is composed of heterodimers of an α (240 kd) and a β (235 kd) subunit that share homologous internal spectrin repeats, but have distinct amino- and carboxyl-terminal regions. The α -fodrin subunit is an actin-binding protein that may be involved in secretion^{12–14} 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, Winsløwparken 25, 3, 5000 Odense C, Denmark. E-mail: hditzel@health.sdu.dk.

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

Here, we have further evaluated the incidence and specificity of anti- α -fodrin Ab response in American SS patients and found a correlation between anti- α -fodrin Ab and SS, but a lower prevalence of anti-120-kd α -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 α -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 α -fodrin neopeptide. The anti-150-kd hmAbs were shown to detect 150-kd α -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;²³ 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

α -Fodrin was purified from mouse brain tissue using the method of Cheney and colleagues²⁴ yielding >95% purity. Mouse α -fodrin exhibits 94% amino acid sequence identity to human α -fodrin. Coomassie staining of mouse brain α -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 α -fodrin, but also weaker bands at 180, 150, 120, 80, 50, and 30 kd that corresponded to cleaved α -fodrin because of low levels of constitutive apoptosis, as previously reported.^{14,17,24,25} Mouse brain α -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 μ g/ml) or mouse

anti- α -fodrin mAb AA6 (Affiniti, Exeter, UK) for 1 hour on a rotator. mAb AA6 predominantly recognizes the 240-kd intact form of α -fodrin, but also the 120- and 150-kd cleaved form of α -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')₂ 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 α -fodrin (2 μ g/ml) and ovalbumin (4 μ 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- α -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')₂ Ab or anti-mouse IgG F(ab')₂ 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.²⁶ Serum samples from each donor were drawn concomitantly. After reverse-transcription, the γ 1 (Fd region) and κ and λ chains were amplified by polymerase chain reaction and phage-display libraries were constructed in the phage-display vector pComb3, as described previously.²⁷⁻²⁹

Ab Library Selection

Libraries were selected against α -fodrin blotted membrane. Mouse brain α -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.²⁹⁻³¹ 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 (2×10 minutes for first panning round and 4×10 minutes thereafter). Phagemid DNA, isolated after the last round of panning, was digested with *NheI* and *SpeI* restriction endonucleases and religated to excise the *cplIII* 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.³²

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.³³ 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% CO₂, to form monolayers. Apoptosis of HSG cells was induced by incubating the cells with 100 ng/ml of tumor necrosis factor- α (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY) and 1 μ g/ml of cycloheximide for 3 to 15 hours at 37°C/5% CO₂. 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- μ 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 μ g/ml in PBS), or mouse

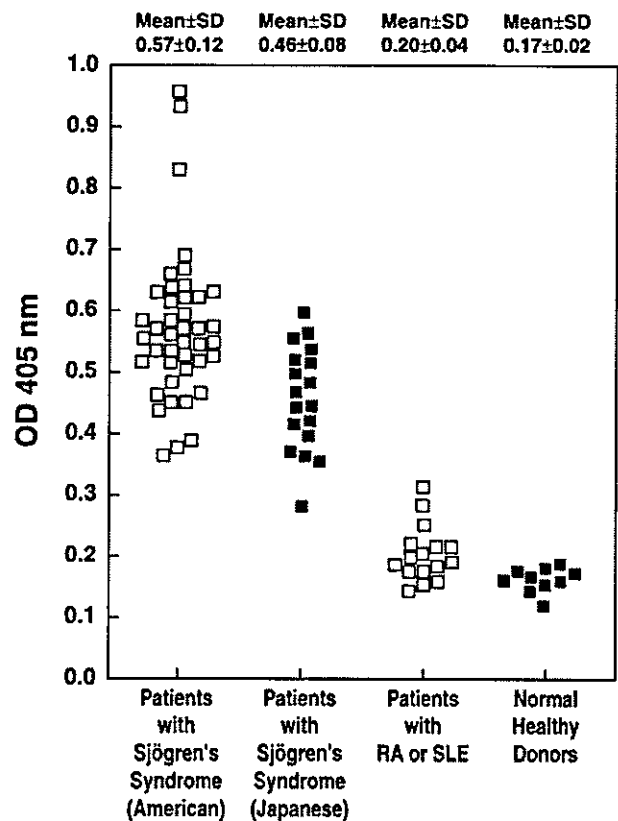


Figure 1. Sera from SS patients contain anti- α -fodrin Abs, as measured by ELISA. Sera, diluted 1:400 in PBS, from 42 American SS patients, 17 Japanese SS patients, 16 RA and SLE patients, and 10 healthy individuals were tested for binding to mouse brain α -fodrin by ELISA. Samples with A₄₀₅ values more than twice the mean of the control normals (>0.33) were considered positive.

anti- α -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')₂ goat anti-human IgG (Fab')₂ 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 α -Fodrin Autoantibodies in SS Patients

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