

平成21年5月29日現在

研究種目：基盤研究（S）

研究期間：2005～2008

課題番号：17109016

研究課題名（和文） シェーグレン症候群発症の分子基盤の解明と  
新たな診断・治療法の創出研究課題名（英文） Molecular analysis of pathogenesis on Sjogren's  
syndrome and its application of new diagnosis and therapy

研究代表者

林 良夫 (HAYASHI YOSHIO)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号:00127854

## 研究成果の概要：

シェーグレン症候群を含めた自己免疫疾患の大半は原因不明であり疾患非特異的な診断・治療法で対処しているのが世界の現状である。本研究プロジェクトは難治性自己免疫疾患シェーグレン症候群の発症に密接に関連するアポトーシス経路を介した膜タンパク破綻の分子基盤の全容解明による新たな診断・治療法の創出を目的として実施した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	27,000,000	8,100,000	35,100,000
2006年度	19,100,000	5,730,000	24,830,000
2007年度	16,800,000	5,040,000	21,840,000
2008年度	11,600,000	3,480,000	15,080,000
年度			
総計	74,500,000	22,350,000	96,850,000

## 研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学／病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：シェーグレン症候群；唾液腺；自己抗原； $\alpha$ -フォドリン；アポトーシス；システインプロテアーゼ；トレランス；疾患モデル

## 1. 研究開始当初の背景

研究代表者は以前にシェーグレン症候群の病因性自己抗原として分子量120KDの臓器特異的膜タンパク抗原 $\alpha$ -フォドリンを分離した。膜タンパク $\alpha$ -フォドリンはカスパーゼその他アポトーシス関連システインプロテアーゼによって分断化を受ける基質タンパクであることから疾患固有の膜タンパク破綻が病因性自己抗原の成立に深く関与していることが示唆されている。

## 2. 研究の目的

(1) 唾液腺特異的自己抗原 $\alpha$ -フォドリンの成立にはFas/Fasリガンド経路のアポトーシスが重要な役割を果たし、カスパーゼ3などシステインプロテアーゼの活性化を介した膜タンパク破綻機構の関与を実験的に明らかにした。本研究は、難治性自己免疫疾患シェーグレン症候群の発症に密接に関連する標的臓器（主に唾液腺・涙腺）におけるアポトーシス経路を介した膜タンパク破綻の分子基盤の全容解明によ



る新たな診断・治療法の創出を目的として実施する。

(2) 唾液腺・涙腺に組織特異的アポトーシスをもたらす生体内分子機序を総合的に解析することにより、アポトーシス制御、および自己抗原制御システムを先端医療技術として確立し、将来的には病因に基づく疾患特異的な診断・治療法の実用化を目標とする。

### 3. 研究の方法

(1) 自己抗原 $\alpha$ -フォドリンの成立にはアポトーシスが重要な役割を果たしていることから、培養ヒト唾液腺細胞、及びシェーグレン症候群患者生検唾液腺組織、及び末梢血 T 細胞を用いて組織特異的プロテアーゼ活性化機構について解析した。

(2) ヒト培養唾液腺細胞 HSG を用いてタモキシフェン刺激により誘導されるアポトーシス関連遺伝子をディファレンシャルディスプレイ法により同定を進めた。

(3) 自己抗原 120KD  $\alpha$ -フォドリン全領域をカバーする 100 アミノ酸からなるオーバーラッピング GST 融合蛋白を作製し、病原性エピトープの同定を試みた。

(4) 免疫動態の解析にフローサイトメトリー (BD Biosciences FACSCant™) を、細胞内に存在する分子同士の相互関係を可視化するために検出系として共焦点倒立顕微鏡 (Zwiss LSM5 PASCAL) を必要とした。

(5) エストロゲン欠乏に伴う標的臓器アポトーシスに際し発現誘導される遺伝子をマイクロアレイ法により同定する。

### 4. 研究成果

(1) 培養ヒト唾液腺細胞に anti-Fas 抗体刺激を加えると濃度依存的に  $\alpha$ -フォドリンの 120KD への分断化が確認され、カスパーゼ-3、及び  $\mu$ -カルパインの活性化を伴っていた。更に、カスパーゼ-3、 $\mu$ -カルパインの co-transfection によって、より効率的な分断化が認められ、自己抗原 120KD  $\alpha$ -フォドリンの成立にはカスパーゼ-3、 $\mu$ -カルパインのシナジスチックな効果が重要な役割を果たしている可能性が判明した (*Am. J. Pathol.* 167:1051, 2005)。

(2) 患者末梢血 T 細胞の反応性を検討した結果、 $\alpha$ -フォドリンペプチド 21-28 領域に反応する患者の多い傾向が確認された (*Am. J. Pathol.* 167:1051, 2005)。

(3) 病原性エピトープの同定を試みた結果、主要エピトープは N 末端 150 アミノ酸領域に存在することが判明した。患者多数症例での検討を継続して実施し、最終的な責任エピトープを決定し、高感度 ELISA システムを確立する。

(4) シェーグレン症候群の標的臓器 (唾液腺) のアポトーシスに際し発現誘導される遺伝子として RbAp48 を見出し、その強発現が自己抗原 N 末  $\alpha$ -フォドリンの 120KD への分断化に必須であることを明らかにした (*Mol. Cell. Biol.* 26:2924, 2006)。

(5) RbAp48 トランスジェニック (TG) マウスをシェーグレン症候群の新たな疾患モデルとして確立した (*J. Exp. Med.* 205:2915, 2008)。RbAp48-TG マウスでは病態増強とともに、異所性主要組織適合抗原クラス II (MHC classII) 発現のモデル系としても注目され、RNA 干渉などによる MHC classII 発現制御によって治療法の検証が可能となった。

(6) 樹状細胞 (Dendritic cell:DC) のシグナルカスケードの異常について解析を進め、RANKL/Fas クロストークによる免疫機能不全が病態形成に大きく関与している可能性を実験的に示した。DC の機能不全が自己免疫病態の形成に大きく関与している可能性を実験的に明らかにした (*Blood*, 110:242, 2007)。

(7) レバミピドの疾患モデルへの経口投与を試みた結果、自己抗原特異的 T 細胞活性化の抑制が認められ、本薬剤を用いた著明な病態制御効果が明らかにされた (*Arthritis Rheum.* 58:389, 2008)。

(8) 自己免疫疾患の多くは閉経期以降の女性優位に発症することが知られているので、卵巣摘出によってエストロゲン欠乏を誘導したマウスの顎下腺の変化を検討した。エストロゲン欠乏マウスの顎下腺では MHC classII 発現増強が認められ、主に plasmacytoid DC (pDC) の数や機能が増強していることを明らかにした。エストロゲン欠乏による自己免疫疾患発症に標的臓器の pDC が関与していることを明らかにした (*Am. J. Pathol.* 174:1715, 2009)。

(9) 環境ホルモンすなわち内分泌攪乱物質であるダイオキシン (TCDD) をシェーグレン症候群モデルマウスである NFS/sld に生後 3 日目に投与すると胸腺の分化異常および顎下腺への炎症性浸潤、血清中の自己抗体の増加を認めた。TCDD の受容体である aryl hydrocarbon receptor は生後すぐのマウス胸腺に多く発現しており TCDD による胸腺分化攪乱が自己免疫疾患誘導に関わっていくことを明らかにした (*J. Immunol.* 182:6576, 2009)。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

1) Ishimaru N, Takaji A, Kohashi M,



- Yamada A, Arakaki R, Kanno J, Hayashi Y. : Neonatal exposure to low-dose 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin causes autoimmunity due to the disruption of T cell tolerance. *J. Immunol.* 182:6576-6586, 2009 (査読有り)
- 2) Arakaki R, Nagaoka A, Ishimaru N, Yamada A, Yoshida S, Hayashi Y. : Role of plasmacytoid dendritic cells for aberrant class II expression in exocrine glands from estrogen-deficient mice of healthy background. *Am. J. Pathol.* 174:1715, 2009 (査読有り)
- 3) Ishimaru N, Arakaki R, Yoshida S, Yamada A, Noji S, Hayashi Y. : Expression of the retinoblastoma protein RbAp48 in exocrine glands leads to Sjogren's syndrome-like autoimmune exocrinopathy. *J. Exp. Med.* 205:2915-2927, 2009. (査読有り)
- 4) Ishimaru N, Yamada A, Kohashi M, Arakaki R, Takahashi T, Izumi K, Hayashi Y. : Development of inflammatory bowel disease in Long-Evans Cinnamon rats based on CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cell dysfunction. *J. Immunol.* 180:6997-7008, 2008. (査読有り)
- 5) Kohashi M, Ishimaru N, Arakaki R, Hayashi Y. : Effective treatment of a mouse model of Sjogren's syndrome with oral administration of rebamipide. *Arthritis Rheum.* 58:389-400, 2008. (査読有り)
- 6) Izawa T, Ishimaru N, Moriyama K, Kohashi M, Arakaki R, Hayashi Y. : Crosstalk between RANKL and Fas signaling in dendritic cells controls immune tolerance. *Blood* 110:242-250, 2007. (査読有り)
- 7) Ishimaru N, Kishimoto H, Hayashi Y, Sprent J: Regulation of naïve T cell function by the NF- $\kappa$ B2 pathway. *Nature Immunol.* 7:763-771, 2006. (査読有り)
- 8) Ishimaru N, Arakaki R, Omotehara F, Yamada K, Mishima K, Saito I, Hayashi Y. : Novel role of RbAp48 for tissue-specific estrogen deficiency-dependent apoptosis in the exocrine glands. *Mol. Cell. Biol.* 26:2924-2935, 2006. (査読有り)
- 9) Kurobe H, Cunlan Liu C, Ueno T, Saito F, Ohigashi I, Seach N, Arakaki R, Hayashi Y, Kitagawa T, Lipp M, Richard L. Boyd R, Takahama Y : CCR7-dependent cortex-to-medulla migration of positively selected thymocytes is essential for establishing central tolerance. *Immunity* 24:1-13, 2006. (査読有り)
- 10) Entesarian M, Matsson H, Klar J, Bergendal B, Olson L, Arakaki R, Hayashi Y, Ohuchi H, Falhat B, Bolstad AI, Jonsson R, Wahren-Herlenius M, Dahl N, Mutations in the fibroblast growth factor 10 gene are associated with aplasia of lacrimal- and salivary glands (ALSG). *Nature Genetics* 37:125-127, 2005. (査読有り)
- [学会発表] (計 29 件)
- 1) Ishimaru N. et al. : Neonatal exposure to low-dose 2, 3, 4, 7, 8-tetrachloro-dibenzo-p-dioxin (TCDD) causes autoimmunity due to the disruption of T cell tolerance. 第38回免疫学会総会 2008年12月1日, 京都
- 2) Arakaki R. et al. : Identification and functional analysis of CD11c+B220+



- dendritic cells induced by estrogen deficiency in salivary glands. 第38回日本免疫学会総会 2008年12月1日 京都
- 3) 新垣 理恵子 : エストロゲン欠乏による外分泌腺上皮クラスII発現の誘導メカニズム. 第97回日本病理学会総会 2008年5月17日 金沢
- 4) 石丸 直澄 : 自己演繹疾患におけるT細胞の制御機構. 第6回口腔医学科学フロンティア 東京
- 5) 小橋 真之ら : シェーグレン症候群モデルマウスへのTCDD投与による影響. 第37回日本免疫学会総会 2007年11月20日、東京
- 6) Izawa T et al. : Crosstalk between RANKL and Fas signaling in dendritic cells controls immune tolerance. 第37回日本免疫学会総会, 2007年11月21日、東京
- 7) Ishimaru N. et al. : RbAp48 トランスジェニックマウスを用いたシェーグレン症候群モデルの確立とINF $\gamma$ 産出上皮細胞の解析. 第37回日本免疫学会総会 2007年11月22日 東京
- 8) Hayashi Y. : Development of autoimmune exocrinopathy resembling Sjogren's syndrome in RbAp48 transgenic mice. The 71<sup>st</sup> Annual Meeting of the American College of Rheumatology 6-11 Nov. 2007, Boston
- 9) Kohashi M. et al. : Effect of rebamipide administration on Sjogren's syndrome mouse model 第36回日本免疫学会総会 2006年12月12日 大阪
- 10) Ishimaru N. et al. : NF- $\kappa$ B pathway in T cell activation for autoimmunity 第36回日本免疫学会総会 2006年12月13日 大阪
- 11) Ishimaru N. et al. : Taking advantage of saliva for immune test 第36回日本免疫学会総会 2006年12月13日 大阪
- 12) Izawa T. et al. : Immunoregulatory role RANKL-stimulated dendritic cells on autoimmune arthritis in MRL/lpr mice 第36回日本免疫学会総会 2006年12月13日 大阪
- 13) Wei Hua et al. : The crucial signaling pathway of dendritic cells in metal allergy 第36回日本免疫学会総会 2006年12月13日 大阪
- 14) Hayashi Y. et al. : Cathepsin L-inhibitor prevents proinsulin peptide processing and autoimmune diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice. International Symposium on Medical and Biological Perspective in Protease and Their Inhibitors 25-26 June 2006, Awaji, Japan
- 15) 表原文江ら : シェーグレン症候群加齢モデルマウスにおける自間質性肺病変の解析 第95回日本病理学会総会 2006年5月1日 東京
- 16) 佐藤亜紀ら : NFS/sldマウス舌下腺におけるNkx2.3の発現・機能解析 第95回日本病理学会総会 2006年4月30日 東京
- 17) 石丸直澄ら : NF- $\kappa$ Bシグナルを介した自己免疫疾患の発症機序 第95回日本病理学会総会 2006年4月30日 東京
- 18) Hayashi Y. et al. : Involvement of interstitial pneumonia in Sjogren's syndrome mouse model with aging. T Cell Immunity & Aging. 13-16 Dec. 2005 Freudenstadt-Lauterbad
- 19) 小橋真之ら : シェーグレン症候群モデルマウスにおけるレバミピドの治療効果の検討 第35回日本免疫学会総会 2005年12月13日 横浜



- 20) 表原文江ら：シェーグレン症候群加齢モデルマウスにおける間質性肺病変の解析 第35回日本免疫学会総会 2005年12月13日 横浜
- 21) 渡邊恵ら：Niアレルギーにおける樹状細胞及びT細胞の活性化機構 第35回日本免疫学会総会 2005年12月14日 横浜
- 22) 井澤俊ら：RANKL刺激活性化DCを介したMRL/lprマウス関節炎の病態修飾 第35回日本免疫学会総会 2005年12月15日 横浜
- 23) Ishimaru N. et al. : Immunoregulation of NF-kB for T cell activation in autoimmune disease 第35回日本免疫学会総会 2005年12月15日 横浜
- 24) 林良夫：シェーグレン症候群発症の分子基盤 第94回日本病理学会総会 2005年4月14日 横浜
- 25) 大嶋淳ら：RANKL刺激樹状細胞移入によるMRL/lprマウス関節リウマチ病変の解析 第94回日本病理学会総会 2005年4月14日 横浜
- 26) 表原文江ら：シェーグレン症候群発症における自己抗原120kDa-フォドリンの意義 第94回日本病理学会総会 2005年4月14日 横浜
- 27) 新垣理恵子ら：RbAp48遺伝子導入マウスにみられるシェーグレン症候群類似病変の解析 第94回日本病理学会総会 2005年4月14日 横浜
- 28) 石丸直澄ら：自己免疫疾患におけるNF-kBを介したT細胞活性化機構の解析 第94回日本病理学会総会 2005年4月16日 横浜
- 29) Hayashi Y. et al. : Possible mechanism of autoimmune exocrinopathy resembling Sjogren's syndrome through RbAp48 overexpression. Gordon Research Conference on Salivary Glads & Exocrine Secretion. 6-11 Feb. 2005. Ventura

[図書] (計 1 件)

- 1) 林 良夫、株式会社 飛鳥出版室、口腔内科、2008, 118-126

[産業財産権]

○取得状況 (計 2 件)

- 1) 特願 2003-123959・林 良夫「自己免疫疾患の予防・治療剤及びそのスクリーニング方法」 林 良夫、興和株式会社；平成15年4月28日
- 2) Patent Number. US6,703,021 B2  
Hayashi Y, Hiromu Sugino:「Composition containing  $\alpha$ -fodrin or  $\alpha$ -fodrin fragment protein」 Yoshio Hayashi  
March 9, 2004

[その他]

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

林 良夫 (HAYASHI YOSHIO)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授  
研究者番号：00127854

##### (2) 研究分担者

石丸 直澄 (ISHIMARU NAOZUMI)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授  
研究者番号：60314879  
新垣 理恵子 (ARAKAKI RIEKO)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教  
研究者番号：00193061