

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究（B）

研究期間：平成 22 年度～平成 24 年度

課題番号：22790938

研究課題名（和文）シェーグレン症候群の病因解明と治療法開発に向けた基礎的な研究

研究課題名（英文）Basic research towards the development of therapy and pathogenesis elucidation of Sjogren's syndrome.

研究代表者 石野 秀岳（ISHINO HIDETAKA）

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：60464583

研究成果の概要（和文）：

シェーグレン症候群(SjS)の病因機序におけるムチンの役割を検討した。SjS 患者より口唇組織生検、ガムテストで合計 20 例の組織と唾液を得た。唾液標本をゲルろ過し、腫瘍関連性ムチンを確認した。分泌ムチンは健常ヒト末梢血単核球に対して、PGE₂ とサイトカイン産生能を亢進させる事と、患者唾液腺の腺細胞にムチンの発現を確認した。SjS 患者唾液、唾液腺内には糖鎖異常に陥ったムチンが存在し、唾液腺内の炎症に関連していることが判明した。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to investigate the existence and bioactivity of tumor-associated carbohydrate antigens in Sjogren's syndrome (SjS).

Saliva was collected by the gum test. Labial salivary gland biopsies were obtained in 20 patients. We found that saliva from SjS patients was subjected to gel filtration on Sepharose 6B and collected the fractions including mucins, mucins were strongly expressed in mucous acinar cells and infiltrating mononuclear cells on the labial salivary gland. Saliva fractions can stimulate the production of TNF- α and PGE₂ in human peripheral blood mononuclear cell.

This finding suggests that the mucins exhibiting with abnormal glycosylation may be in part responsible for salivary glands inflammation, leading to the salivary glands destruction in the pathogenesis of SjS.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
22 年度	800,000	240,000	1,040,000
23 年度	900,000	270,000	1,170,000
24 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：膠原病・アレルギー内科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー内科学

キーワード：臨床 免疫学 糖鎖 シェーグレン症候群 ムチン

1. 研究開始当初の背景

近年、核酸（DNA）、タンパク質に続く第

三の鎖状生命分子として、糖鎖分子が注目されてきている。自然免疫と獲得免疫における重要な分子のほぼ全てが糖蛋白であり、体液性免疫系においては、IgG 抗体の全てと補体の構成要素のほとんどが糖鎖の付加を受けている。関節リウマチ (RA) においては、RA 患者の血清 IgG に糖鎖異常(抗ガラクトース欠損 IgG 抗体)が起こる、という発見に端を発し RA は糖鎖異常疾患の一種ではないかという段階まで達した。(Nature, 316, 452-457, 1985) (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 6123-6127, 1994) これは糖鎖と疾病に関連する、糖鎖病理学と呼ばれる研究領域における大きな話題であり、新しい局面を拓くものとして期待されている。糖鎖研究は、遺伝子や蛋白質の機能構造解析などを中心とするポストゲノム研究に続くポスト・ポストゲノム研究の一つ、次世代産業基盤技術として重視されている。糖鎖は癌に対する免疫応答とワクチン、自己免疫疾患等との関連でも注目されているが、その生物学的機能解析は未だ不十分である。

SjS については、肺組織で主に発現している MUC5B が唾液腺でも発現しているという報告がなされ(Ann Rheum Dis. 2008 Oct;67(10):1480-7)糖鎖分子と病態との関連が示唆されている。しかし未だ唾液腺破壊の原因究明とまでは至ってはいない。また線組織の破壊、リンパ球集簇が、non-hodikin リンパ腫と関連しているとの報告(Eular2010 Theander OP0065)もあり、炎症機序の解明が待たれている。

我々はこれまで京都産業大学の中田博士とともに、糖鎖の中でも代表的な膜型ムチンの一つである MUC1 の生物学的活性と、その糖鎖異常について研究を行ってきた(Ishino, Clin Exp Rheumatol. 2010 Mar-Apr ;28(2) :246-9)。自己免疫においては、糖鎖の作用の大部分は糖鎖異常に陥った側鎖の部分が影響している。関節リウマチでは滑膜細胞とマクロファージに MUC1 とともに異常糖鎖抗原である MLS128/132, が発現しており、関節液内の高分子分画は PGE₂ 産生能を持つ事を解明してきた。SjS 患者では、口唇腺組織に存在するムチンが糖鎖異常におちいり、COX-1,2 の誘導に続く PGE₂ の産生亢進による様々な腺破壊につながる免疫現象を起こす可能性がある。これらの事象を背景に、SjS 患者の口唇腺組織にもこれら糖鎖異常を伴ったムチンが発現する事で、口唇腺の炎症をひき起こし、腺破壊に関与しているものと考えられる。

2. 研究の目的

SjS 患者唾液腺内に糖鎖異常に陥ったムチンの存在を証明し、精製したムチンの生理活性などを解明することで SjS の病因機序におけ

る役割を明らかにする。同時に SjS の唾液腺炎特異的な治療薬のターゲットとして、SjS 治療への応用を検討していくための基礎的な研究を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

シェーグレン症候群患者(女性 20 名, 男性 0 名)について 検討を行う。(学内倫理委員会承認済 C-907)

(1) 免疫染色

唾液腺生検を行い SjS 患者口唇組織を(京都府立医科大学 耳鼻咽喉科にて)生検採取した。唾液腺組織は免疫染色に一部を分離、他はホルマリン固定もしくは凍結保存し、Western blot 法などに使用する。採取した唾液腺組織をコア蛋白抗体 (MUC-1, MUC-5B) 糖鎖抗原 (MLS128, MLS132) で、免疫染色を行い、組織内にムチンの存在を確認する。ムチンの発現について、Vectastain ABC kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA) を用いた ABC 法で免疫染色を行った。1 次抗体は抗 MUC-1, 5B 抗体(1:100) (555925: BD Bioscience, Santa Cruz, CA), 抗 MLS128, 132 抗体 (1:100) 及びコントロールとしてマウス IgG 抗体を用いた。

(2) ゲルろ過

ガムテストで採取した患者唾液を Sepharose6B にてゲル濾過する。ゲル濾過前に、シェーグレン症候群患者唾液をヒアルロニダーゼ処理した。更に遠心分離(14,000 rpm for 30 min at 4° C) し細胞成分を除去後に、上清をサンプルとして使用した。

(Beads : Sepharose CL-6B, Column : Φ 2 cm, height 110 cm → volume 345.4 cm³ Buffer : PBS)

(3) PAS 染色、Western blotting

SjS 患者唾液からゲルろ過で分離された高分子分画にムチンが存在することを、PAS 染色、Western blotting を用いて証明する。高分子分画、Fraction No. 21-30 から 200 μl 取り、それぞれを エタノール沈殿して脱塩、濃縮したものをサンプルとして SDS-PAGE 後、PAS 染色を行った。

O. D. 280 の吸収がみられた高分子分画 No 24-27 を 500ml ずつ、それぞれをエタノール沈殿して脱塩し、電気泳動を行い、Western blotting 後に糖鎖抗原抗体 (Biotin-MLS128/-MLS 132)、MAC5 を用いてムチンの検出を試みた。

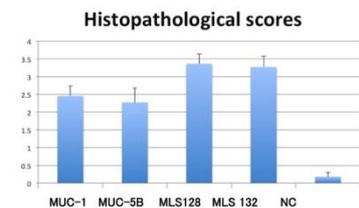
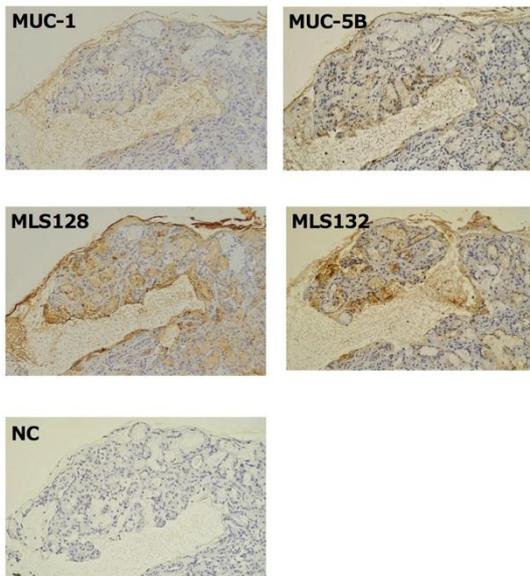
(4) サイトカイン産生能

ムチン成分を含む高分子分画フラクションを使用して、ヒト PBMC でのサイトカイン産生能を ELISA で評価行う。ヒト末梢血単核球を抽出した後、24well のプレートを用い、1well あたり 1.0×10⁵ 個/mL に調整し、ゲルろ過後のフラクションを、100 μL/well として 500 μL RPMI で培養した。

24 時間後、上澄み液を回収し、ELISA 法 (Biosource International) にて TNF- α 、PGE₂ を測定した (n=3)。

4. 研究成果

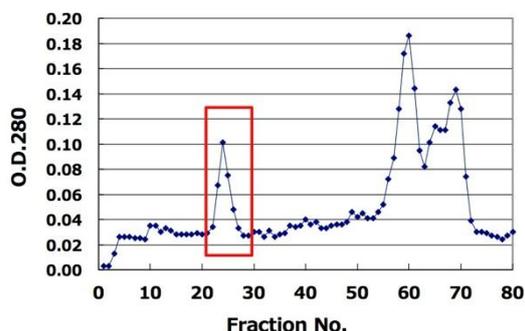
(1) 免疫染色



MAC1, MAC5B は正常唾液腺内に存在する糖鎖であり、今回も発現を認める。腺細胞の破壊が進行すると、MUC1 の発現が低下するという報告もある。

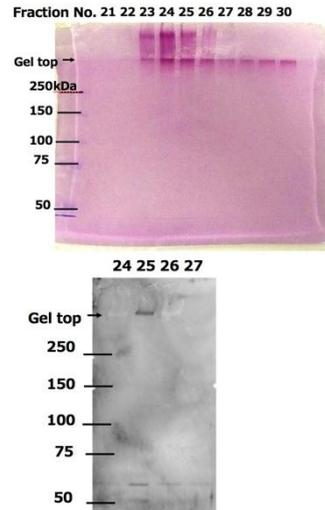
今回 20 名のシェーグレン症候群患者唾液腺細胞内において、健常人唾液腺細胞に発現する MUC-1, 5B だけでなく、糖鎖異常を持つ糖蛋白抗原である MLS128, MLS132 も唾液腺細胞に強く発現していた。発現強度を 0~4 までの 5 段階で評価し、スコア化した。それぞれ 20 例でのスコアを平均化した。

(2) ゲルろ過



ゲルろ過したサンプルを O.D. 280 で吸光度測定した。# 21~27 の高分子画分において、吸光度の上昇を認める。患者唾液内には高分子成分が存在することが判明した。

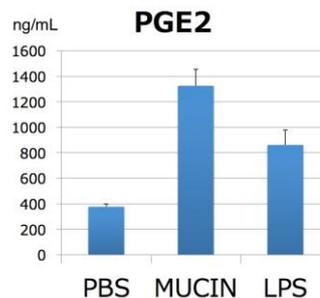
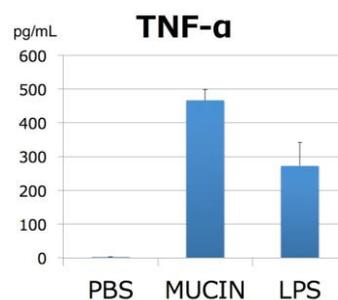
(3) PAS 染色、Western blotting



O.D. 280 の吸光度の値の上がり方に呼応するように、No. 23 から PAS 染色でバンドが Gel top や濃縮ゲルに検出されている。ゲルろ過サンプルの高分子画分には糖を多く含む分子が含まれていることがわかり、ムチンであることが推察される。

MUC5 に対する抗体で検出した結果、No. 25 のレーンでムチン抗体と同様の分子量の位置にバンドが検出された。

(4) サイトカイン産生能



TNF- α は 467.9 \pm 31.3pg/mL とコントロール群 2.9 \pm 1.1pg/mL に比べて著明な上昇を認められた。PGE₂においても、1325.5 \pm 128.1ng/mL とコントロール群 376.5 \pm 23.9ng/mL と比較して有意な差を認めている。

上記より SjS 患者唾液、唾液腺内には糖鎖異常に陥ったムチンが存在し、唾液腺内の炎症に関連していることが判明した。

今回の成果は、SjS 患者唾液腺内には従来提唱されてきた正常のムチン(MUC-1, 5B)以外に、糖鎖異常に陥ったムチン(MLS128/132)が存在している事が証明された。この糖鎖異常に陥ったムチンは、唾液腺組織に浸潤したマクロファージや T 細胞にサイトカイン TNF- α や、PGE₂ を産生させることが判明した。これは同時にオートクライン/パラクライン的に作用し、炎症細胞の浸潤、血管新生等が関与する唾液腺組織破壊を惹起することが予測される。

今後の展望については、本研究をさらに推し進め、シェーグレン症候群における糖鎖異常に陥ったムチンを介した自己免疫、炎症の関与が明らかとなり、機序の一端が解明されることで、自己免疫疾患の治療への道が開かれる。シェーグレン症候群の治療は、画期的な治療法が開発されておらず、患者は日々苦痛を強いられている。この意味で SjS 患者の唾液腺に存在する、糖鎖異常を伴う PGE₂・サイトカイン誘導性ムチンをターゲットとした治療は、疾患特異的に作用する可能性があり、また、糖鎖異常を阻害することにより、様々な免疫学的異常を改善させる可能性を秘めている。

糖鎖研究は注目を浴びているが、シェーグレン症候群患者の口唇腺組織に存在するムチンの糖鎖異常に着目したムチンの研究は未開拓分野であり、本研究は世界の先駆け的なものである。

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] 該当なし

[学会発表] (計 2 件)

1 石野秀岳 シェーグレン症候群患者唾液腺内での糖鎖の存在証明とその生物学的活性についての検討、第 57 回日本リウマチ学会学術集会、平成 25 年 4 月 20 日、京都

2 Hidetaka Ishino EXPRESSION OF

ABERRANTLY GLYCOSYLATED MUCINS (TN AND SIALYL TN ANTIGENS) AND MUC1 IN LABIAL SALIVARY GLAND OF PATIENTS WITH SJOGREN'S SYNDROME.

Annual European Congress of Rheumatology EULAR 2013 平成 25 年 6 月 13 日 Madrid Spain

[その他] 該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石野 秀岳 (ISHINO HIDETAKA)
京都府立医科大学・医学研究科・講師
研究者番号：60464583

(2) 研究分担者 該当なし

(3) 連携研究者 該当なし