

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5月31日現在

機関番号：24061

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591096

研究課題名（和文）シェーグレン症候群の唾液腺障害と再生機構の解明

研究課題名（英文）The pathoetiology of destruction and regeneration in salivary gland of Sjögren's syndrome

研究代表者

藤本 隆 (FUJIMOTO TAKASHI)

奈良県立医科大学 医学部・准教授

研究者番号：60264850

研究成果の概要（和文）：シェーグレン症候群（SS）は唾液腺・涙腺に炎症を来して口腔内乾燥・眼乾燥の症状を呈する。インスリンを産生する膵β細胞の再生増殖に関わる遺伝子として同定された Reg (Regenerating gene) は、SS 患者の唾液腺上皮にも発現しており、また、患者血清中に REG 蛋白に対する自己抗体を検出した。SS における唾液腺障害と再生の機構を明らかにする目的で、唾液腺組織における Reg 遺伝子、REG 蛋白、および血清中 REG 自己抗体の詳細に解析し、本症における唾液腺の障害と再生における Reg の役割を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Sjögren's syndrome (SS) is a chronic autoimmune disease, characterized by inflammation of salivary and lacrimal glands, leading to dry mouth and dry eye. The regenerating gene (*Reg*) was originally isolated as a gene specifically overexpressed in regenerating pancreatic islets. In this study, we examined the expression of *REG* genes in the salivary glands (SG) and anti-REG autoantibodies in SS. These data strongly suggest that autoimmunity to REG may play a role in the degeneration of SG ductal epithelial cells in SS.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯学

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：免疫学、シェーグレン症候群、REG

1. 研究開始当初の背景

(1) Reg (Regenerating gene) は膵β細胞の再生増殖に関わる遺伝子として 1988 年に分離された (J Biol Chem 263, 2111, 1988)。次いで、Reg 遺伝子が増殖因子遺伝子群 Reg ファミリーを形成し、膵以外の消化器系臓器でも細胞増殖活性や抗アポトーシス活性を

示し、臓器損傷・炎症・再生と増殖に関与する遺伝子群であることを明らかにされた。

(2) 糖尿病患者の抗 REG 抗体と病態への関与 (Eur J Clin Invest 34, 752, 2004) の報告から、REG 蛋白と抗 REG 抗体は細胞の再生増殖への関与が示唆された。ヒト糖尿病では、インスリン産生細胞が障害された際に REG 蛋

白が発現して細胞の再生が誘導される。一方、抗 REG 抗体を有する患者では、この再生機構が正常に機能しないために膵のインスリン産生細胞は再生せず細胞死に陥り、インスリン産生の低下の結果として糖尿病が発症する。

(3) シェーグレン症候群では、外分泌臓器である唾液腺・涙腺の上皮が自己免疫による慢性炎症の進行により腺上皮が細胞死に陥る。その結果、唾液・涙液の分泌不全が進行して口腔内および眼乾燥症状を呈して多大な ADL の低下をきたす。唾液腺・涙腺は、膵類似の組織形態を持つので、前記の糖尿病におけるインスリン再生細胞と同様に REG 蛋白と抗 REG 抗体の関与が考えられた。加えて最近、REG の部分ペプチドを抗原として調整した抗体を用いた免疫組織法によりシェーグレン症候群患者の唾液腺上皮に REG 蛋白の発現を確認した。次に、リコンビナント ヒト REG 蛋白を抗原としたウェスタンブロット法によりシェーグレン症候群の患者血清中に抗 REG 抗体が存在するという予備的知見を得た。したがって、シェーグレン症候群における外分泌腺の再生と障害（細胞死）の機構に、膵と同様に REG、抗 REG 抗体の関与が考えられた。

2. 研究の目的

(1) シェーグレン症候群は原因不明の慢性炎症性疾患であり、唾液腺・涙腺にリンパ球の浸潤と腺上皮の障害を特徴とする。膵β細胞の再生増殖に関わる遺伝子として同定された **Reg (Regenerating gene)** は、本症患者の唾液腺上皮にも発現していることを予備的研究で確認した。また、本症患者血清中に REG 蛋白に対する自己抗体も確認しており、本症の唾液腺障害への Reg の関与が示唆される。シェーグレン症候群における唾液腺障害と再生の機構を明らかにすることは本症の診断と治療に直結するので、本研究では、唾液腺における Reg 遺伝子、REG 蛋白、および血清 REG 自己抗体の詳細な解析を行い、本症における唾液腺の障害と再生における Reg の役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) シェーグレン症候群 (SS) 患者から口唇生検で得られた唾液腺組織における Reg 遺伝子の発現および REG 蛋白の発現を real-time PCR 法と免疫組織化学法により解析する。

(2) 血清中の抗 REG 自己抗体リコンビナント ヒト REG Iα を抗原基質に用いたウェスタンブロット法により検討し、唾液腺機能との関連を解析する

(3) SS 患者唾液腺組織での REG Iα 発現の機構を種々のサイトカイン・ケモカインの遺

伝子発現を real-time PCR 法により解析する。

(4) ラット培養唾液腺導管細胞 (A5 細胞) を用いて Reg の遺伝子発現誘導の機構を REG Iα 転写調節に関与するサイトカイン (IL-6, IL-8, IL-11, IL-22, IFNβ) についてルシフェラーゼ・アッセイにより解析する。

4. 研究成果

(1) シェーグレン症候群 (SS) 患者の唾液腺組織における Reg 遺伝子および REG 蛋白の発現

唾液腺・涙腺にリンパ球の浸潤と腺上皮の障害を特徴とする原因不明の慢性炎症性疾患である SS の唾液腺障害における膵β細胞の再生増殖に関わる遺伝子として同定された遺伝子群である Reg の関与を検討した。

生検により得られた唾液腺上皮を用いて解析した。real-time PCR 法による Reg 遺伝子群の mRNA 発現を検討したところ、REG Iα が SS 患者の唾液腺上皮で健常者より有意に発現が亢進していた。そこで、抗ヒト REG Iα 抗体を用いた免疫組織化学法により REG Iα の発現と局在を検討した。REG Iα は SS 患者の 29 例 (54%) で導管上皮に局限して発現が確認された。一方、SS 患者の腺上皮および健常者の導管・腺上皮には REG Iα の発現は認められなかった (図 1)。

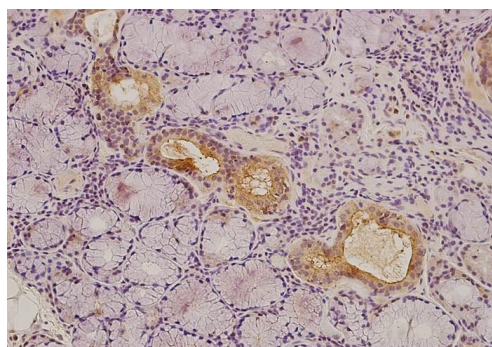


図 1. SS 患者唾液腺導管上皮における REG Iα の発現

(2) SS 患者血清中の抗 REG Iα 自己抗体と唾液腺機能との関連

REG Iα に対する自己抗体をリコンビナントヒト REG Iα を抗原基質に用いたウェスタンブロット法により本症患者 135 例と健常者 271 例の血清について検討した。血清中の抗 REG Iα 抗体は SS 患者の 11% で検出され、健常者 (2.3%) より有意に高頻度に認められた ($p=0.0001$) (図 2)。加えて、抗 REG Iα 抗体の陽性群では唾液分泌量が陰性群に比べて有意に低下していた ($0.71 \text{ g/2 min vs } 1.97 \text{ g/2 min}$, $p=0.07$)。これらの結果から、SS 患者において REG Iα の唾液腺導管上皮での発現と REG Iα に関与する自己免疫応答は本症の唾液腺障害と再生機構に関与する事が強

く示唆された。

(3) SS 患者唾液腺組織での REG I α 発現の機構

SS 患者唾液腺組織を種々のサイトカイン・ケモカインの遺伝子発現の動態から検討した。SS 患者と健常者唾液腺組織におけるサイトカイン・ケモカイン (IL-6, IL-8, IL-11, IL-22, IL-22R, IFN γ , IFN β , CXCL1) の mRNA 量を real-time PCR 法で定量した。IL-6 と IL-8 の mRNA 量が健常者に比して SS 患者組織で有意に増加していた。そこで、SS 患者唾液腺組織での REG I α の mRNA 量と IL-6 あるいは IL-8 の mRNA 量との関連を検討した。REG I α と IL-6 の遺伝子発現量は有意な正の相関を示したが、と IL-8 の遺伝子発現は相関を示さなかった。次に、IL-6 の受容体である gp130 と IL-6R の唾液腺組織での mRNA 量を測定したが、健常者と SS 患者組織間で IL-6 の受容体の遺伝子発現に差を認めなかった。以上の結果から、SS 患者唾液腺組織での REG I α の発現は IL-6 発現がその調節役を担っていると考えられた。

(4) ラット培養唾液腺導管細胞 (A5 細胞) を用いた Reg の遺伝子発現誘導の機構

REG I α 転写調節に関与するサイトカイン (IL-6, IL-8, IL-11, IL-22, IFN β) について、A5 細胞を用いたルシフェラーゼ・アッセイにより解析した。ヒト REG I α プロモータをルシフェラーゼレポータ遺伝子上流に挿入したプラスミドを A5 細胞に導入した後、各サイトカインで処理して REG I α 転写活性を解析した。IL-6 と IL-11 が、A5 細胞における REG I α 転写を有意に増強した。一方、IL-6 と IL-11 の両者による REG I α 転写に対する相乗作用は認めなかった。したがって、IL-6 と IL-11 の REG I α 転写活性化機序は同一であり、IL-6 と IL-11 が独立して REG I α の発現増加を調節していると考えられた。したがって、IL-6 と IL-11 による唾液腺導管細胞の REG I α 発現調節の経路が SS の唾液腺障害に重要な役割を果たすと考えられた。

本研究における以上の成果により、シェーグレン症候群の唾液腺の破壊と再生の機序に Reg と REG 蛋白に対する自己抗体が関与していることを初めて明らかにし、本疾患の病態の解明および治療への端緒に大いに貢献した。

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 14 件)

①Yoshimoto K, Fujimoto T, Itaya-Hironaka A, Miyaoaka T, Sakuramoto-Tsuchida S, Yamauchi A, Takeda M, Kasai T, Nakagawara K, Nonomura A,

Takasawa S Involvement of autoimmunity to REG, a regeneration factor, in patients with primary Sjogren's syndrome. **Clin Exp Immunol** in press 2013 査読有
DOI: 10.1111/cei.12142.

② Naito H, Yoshimura M, Mizuno T, Takasawa S, Tojo T, Taniguchi S. The advantages of three-dimensional culture in a collagen hydrogel for stem cell differentiation. **J Biomed Mater Res A** in press 2013 査読有
DOI: 10.1002/jbm.a.34578.

③ Klasan GS, Ivanac D, Erzen DJ, Picard A, Takasawa S, Peharec S, Arbanas J, Girotto D, Jerkovic R. Reg3G gene expression in regenerating skeletal muscle and corresponding nerve. **Muscle Nerve** in press 2013 査読有
DOI: 10.1002/mus.23877.

④Vives-Pi M, Takasawa S, Pujol-Autonell I, Planas R, Cabre E, Ojanguren I, Montraveta M, Santos AL, Ruiz-Ortiz E Biomarkers for diagnosis and monitoring of celiac disease. **J Clin Gastroenterol** 47, 308-13. 2013 査読有
DOI: 10.1097/MCG.0b013e31827874e3.

⑤Ikeda T, Takasawa S, Noguchi N, Nata K, Yamauchi A, Takahashi I, Yoshikawa T, Sugawara A, Yonekura H, Okamoto H. Identification of a major enzyme for the synthesis and hydrolysis of cyclic ADP-ribose in amphibian cells and evolutionary conservation of the enzyme from human to invertebrate. **Mol Cell Biochem** 366, 69-80. 2012 査読有
DOI: 10.1007/s11010-012-1284-0.

⑥Ota H, Tamaki S, Itaya-Hironaka A, Yamauchi A, Sakuramoto-Tsuchida S, Morioka T, Takasawa S, Kimura H. Attenuation of glucose-induced insulin secretion by intermittent hypoxia via down-regulation of CD38. **Life Sci.** 90, 206-11. 2012 査読有
DOI: 10.1016/j.lfs.2011.11.011

⑦Suzuki H, Usui I, Kato I, Oya T, Kanatani Y, Yamazaki Y, Fujisaka S, Senda S, Ishii Y, Urakaze M, Mahmood A, Takasawa S, Okamoto H, Kobayashi M, Tobe K, Sasahara M. Deletion of platelet-derived growth factor receptor- β improves diabetic nephropathy in Ca²⁺/calmodulin-dependent

protein kinase II α (Thr286Asp) transgenic mice. **Diabetologia**. 54, 2953-62, 2011 査読有
DOI: 10.1016/j.lfs.2011.11.011

⑧ Yamamoto Y, Harashima A, Saito H, Tsuneyama K, Munesue S, Motoyoshi S, Han D, Watanabe T, Asano M, Takasawa S, Okamoto H, Shimura S, Karasawa T, Yonekura H, Yamamoto H. Septic shock is associated with receptor for advanced glycation end products ligation of LPS. **J Immunol**. 186, 3248-3257, 2011, 査読有
DOI: 10.4049/jimmunol.1002253

⑨ Zheng HC, Sugawara A, Okamoto H, Takasawa S, Takahashi H, Masuda S, Takano Y. Expression profile of the REG gene family in colorectal carcinoma. **J Histochem Cytochem**, 59, 106-15. 2011 査読有
DOI: 10.1369/jhc.2010.956961

⑩ Naito H, Dohi Y, Zimmermann WH, Tojo T, Takasawa S, Eschenhagen T, Taniguchi S. The effect of mesenchymal stem cell osteoblastic differentiation on the mechanical properties of engineered bone-like tissue. **Tissue Eng Part A**. 17, 2321-2329, 2011 査読有

⑪ Yamaguchi H, Fujimoto T, Nakamura S, Ohmura K, Mimori T, Matsuda F, Nagata S., Aberrant splicing of the milk fat globule-EGF factor 8 (MFG-E8) gene in human systemic lupus erythematosus. **Eur J Immunol**, 40, 1778-1785, 2010 査読有
DOI: 10.1002/eji.200940096.

⑫ Fukuhara H, Kadowaki Y, Ose I, Ishihara S, Takasawa S, Kinoshita Y. In vivo evidence for the role of Reg I in gastric regeneration: Transgenic overexpression of Reg accelerates the healing of experimental gastric ulcers. **Lab Invest**, 190, 555-565, 2010 査読有
DOI: 10.1038/labinvest.2010.42.

⑬ Imaoka H, Ishihara S, Kadowaki Y, Aziz Md M, Rahman F R, Ose T, Fukuhara H, Takasawa S, Kinoshita, Y. Exacerbation of indomethacin-induced small intestinal injuries in Reg I-knockout mice. **Am J physiol Gastrointest Liver Physiol**, 299, G311-G319. 2010 査読有
DOI: 10.1152/ajpgi.00469.2009.

⑭ Usami S, Motoyama S, Koyota S, Wang J, Hayashi-Shibuya K, Maruyama K, Takahashi N, Saito H, Minamiya Y, Takasawa S, Ogawa J I, Sugiyama T. Regenerating gene I regulates interleukin-6 production in squamous esophageal cancer cells. **Biochem Biophys Res Commun**, 392, 4-8, 2010 査読有
DOI: 10.1016/j.bbrc.2009.12.129.

[学会発表] (計 14 件)

① Fujimura T, Fujimoto T: NON-STEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY DRUGS HAVE AN INDEPENDENT EFFECT ON SYNOVIAL VASCULARITY ASSESSED BY MUSCULOSKELETAL ULTRASOUND IN RHEUMATOID ARTHRITIS, Annual European Congress of Rheumatology (EULAR) 2013. 2013.06.12., Madrid (Spain)

② Fujimura T, Takasawa S, Fujimoto T: INDUCTION OF REG I A, A NEW AUTO-ANTIGEN IN SJOGREN'S SYNDROME PATIENTS, IN SALIVARY DUCT EPITHELIAL CELLS BY INTERLEUKIN-6 AND -11., Annual European Congress of Rheumatology (EULAR) 2013. 2013.06.12., Madrid (Spain)

③ Yamauchi, A. Takasawa, S.: The JAK/STAT signaling is essential for human REG I α transcription in pancreatic β cells. The 9th IDF-WPR Congress/4th AASD Scientific Meeting., 2012.11.24., Kyoto (Japan)

④ Takasawa S: Pancreatic β cell proliferation by intermittent hypoxia via up-regulation of Reg family genes., The 48th EASD Meeting, 2012.10.01., Berlin (Germany)

⑤ 藤村 貴則、藤本 隆: 原発性シェーグレン症候群の関節炎-超音波検査による検討-、第56日本リウマチ学会総会・学術集会、2012.04.26.、東京

⑥ Naito H, Takasawa S: REG family genes expression in lung cancer. International Association for the Study of Lung Cancer, 2011.7.03., Amsterdam (Netherlands)

⑦ Yamauchi A, Takasawa S.: IL-6/Dexamethasone activated the human REG I α gene transcription in pancreatic β -cells via the JAK/STAT signaling pathway. The 71st American Diabetes Association Scientific Sessions, 201106.24., San

Diego (USA)

⑧吉本清巳、藤本 隆：シェーグレン症候群の唾液腺障害における REG の関与について、第 55 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2011.07.19. 神戸

⑨ Fujimoto T, Kawane K, Nagata S: Therapeutic effect of recombinant DNaseII on the arthritis caused by DNA escaped from degradation. The13th international TNF conference, 2011.05.17., Hyogo

⑩ Fujimoto T, Yoshimoto K, Takasawa S: Involvement of autoimmunity to REG in patients with primary Sjogren's syndrome., The 11th International Symposium on Sjogren's Syndrome, 2011.09.29., Athens(Greece)

⑪ Yoshimoto K, Fujimoto T, Takasawa S: Autoimmunity to REG, in patients with primary Sjogren's syndrome. Annual European Congress of Rheumatology EULAR 2011, 2011.05.27., London(UK)

⑫吉本清巳、藤本 隆、高澤 伸：シェーグレン症候群の唾液腺障害機序における REG (regenerating gene product) の発現と自己抗体の関係、第 19 回日本シェーグレン症候群学会、2010.09.09.、東京

⑬ Yoshimoto K, Fujimoto T, Takasawa S: Autoantibodies to REG, a regeneration factor, in patients with primary Sjögren syndrome, 2010.07.12., 14th Asia Pacific League of Associations for Rheumatology (APLAR) Congress, Hong Kong(China)

⑭吉本清巳、藤本 隆、高澤 伸：原発性シェーグレン症候群患者における REG に対する自己抗体について、第 54 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2010.04.22、神戸

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤本 隆 (FUJIMOTO TAKASHI)
奈良県立医科大学・医学部・准教授
研究者番号：60264850

(2) 研究分担者

高澤 伸 (TAKASWA SHIN)
奈良県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：50187944
笠井 孝彦 (KASAI TAKAHIKO)
奈良県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：50224374