

## 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

Molecular analysis of pathogenesis on Sjogren's Syndrome and its application of new diagnosis and therapy

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する。

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・動機

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 BD 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生物顕微鏡 (Zwiss Axiovert 200M)、電動倒立顕微鏡アップグレード (Zwiss LSM5 PASCAL) を必要とする。

#### 4. これまでの成果

(1)培養ヒト唾液腺細胞に anti-Fas 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、遺伝子導入実験からカスパーゼ-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)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)。

(3)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)。

(4)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、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)。

(5) 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)。

#### 5. これまでの進捗状況と今後の計画

(1)標的臓器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、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することが必要とされている。

(2) RbAp48-TG マウスでは病態増強とともに、異所性クラス II 発現のモデル系としても注目され、RNA 干渉などによるクラス II 発現制御によって治療法の検証が可能となる。

(3)樹状細胞のシグナルカスケードの異常から、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。抗原提示におけるアポトーシスカスケードと異所性クラス II 発現プロセッシング機構のクロストークの解明が不可欠とされている。

(4)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。

#### 6. これまでの発表論文等

(研究代表者は太字、研究分担者には下線)

- 1) Kohashi M, Ishimaru N, Arakaki R, **Hayashi Y**: Effective treatment with oral administration of rebamipide in a mouse model of Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 58:389-400, 2008.
- 2) Izawa T, Ishimaru N, Moriyama K, Kohashi M, Arakaki R, **Hayashi Y**: Crosstalk between RANKL and F as signaling in dendritic cells controls immune tolerance. *Blood* 110:242-250, 2007.
- 3) 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.
- 4) Ishimaru N, Arakaki R, Omotehara F, Yamada K, Mishima K, Saito I, **Hayashi Y**: Novel role for RbAp48 in tissue-specific, estrogen deficiency-dependent apoptosis in the exocrine glands. *Mol. Cell. Biol.* 26:2924-2935, 2006.
- 5) 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.
- 6) 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.

ホームページ等

<http://www.dent.tokushima-u.ac.jp/byour/i/page1.html>