
 総 説

シェーグレン症候群に対する病期対応型テーラーメイド医療の構築

東 雅之

キーワード：唾液腺，口腔乾燥症，腺房細胞，導管細胞

Establishment of a Tailor-made Therapy Based on the Disease-stage of Sjögren's Syndrome

Masayuki AZUMA

Abstract : Sjögren's syndrome (SS) is one of the most common rheumatic diseases. Histopathologic features of SS salivary glands include: (a) the eventual total replacement of the acinar structure by marked lymphocytic infiltrate and (b) the occurrence of various changes in the ductal structure within infiltrated areas, such as metaplasia, hyperplasia, thinning of ductal layer, or oncocytic change, and in some cases the formation of epimyoeplithelial islands arising from ductal proliferation. Accordingly, surviving and/or proliferating ductal cells in SS salivary glands may be regarded as one of the possible sources for the improvement of salivary secretion. Thus far, I found that inhibition of TNF- α -induced MMP-9 production in acinar cells lead to restored integrity of the acinar structure in SS salivary glands. Therefore, in this review I would like to postulate a tailor-made therapy based on the disease-stage of SS. First, therapy for the inhibition of lymphocytic infiltrate into salivary glands by regulating balance of sex hormones in acinar cells (early stage of SS); second, therapy for the maintenance of stable acinar structure by inhibiting cytokine-induced basement membrane-degrading enzymes, such as MMP-9 (intermediate stage of SS); and third, therapy for the bestowal of ability to secrete saliva on ductal cells (late stage of SS). Hopefully, these disease stage-specific therapies would contribute to the improvement of QOL of SS patients.

I. はじめに

シェーグレン症候群唾液腺における病理学的特徴としては、小葉内導管周囲の巣状リンパ球浸潤と腺組織破壊、そして導管細胞の増殖、が挙げられる¹⁾。そしてこれらの所見を病態の進行度の観点から考えた場合、シークエンシャルな変化として捉えることができる。すなわち、アポトーシス細胞や α -fodrinなどの臓器特異的自己抗原の成立により、唾液腺導管周囲組織においてリンパ球の浸潤が開始される²⁾ (病変初期段階とする)。そして唾液腺を含む多くの臓器の構築において非常に重要な役

割を担っている基底膜が、腺房細胞による異常かつ不完全な laminin α 1 chain/laminin 1 産生のため、あるいは何らかの原因により腺房細胞周囲の基底膜が分解されることにより、腺房細胞はアノイキスに陥り腺組織破壊が引き起こされる³⁾ (病変中期段階とする)。この際、導管細胞周囲の laminin α 1 chain/laminin 1 は完全な構造をしているため、導管細胞は正常に増殖・分化し、消失した腺房細胞に置き換わる⁴⁾。このため、導管細胞の増殖が観察される (病変後期段階とする)。そこで本総説においては、我々が樹立した不死化正常ヒト唾液腺細胞株⁵⁾と

シェーグレン症候群モデルマウス⁶⁾を用いて、唾液腺病変の進行度に対応した「シェーグレン症候群に対するテーラーメイド医療」の構築につき考えてみたい。

Ⅱ. 唾液腺組織へのリンパ球浸潤に対する浸潤阻止療法（初期段階での治療法）

一般にシェーグレン症候群は圧倒的に女性に多く発症し、その発症年齢も閉経期である40-50歳であることが知られている⁷⁾。通常 estrogen は免疫促進作用を有する一方、androgen は免疫抑制作用を発揮する⁸⁾ことから、シェーグレン症候群の女性発症優位のメカニズムとして、androgen 低下が起こる結果 estrogen/androgen imbalance が惹起され、唾液腺組織にリンパ球浸潤が開始することが明らかにされている⁹⁾。そこで我々は、シェーグレン症候群患者唾液腺組織へのリンパ球浸潤機構につき解析した。図1は腺房細胞における性ホルモンの代謝機構を示したものである。すなわち、血中に存在する前駆物質である dehydroepiandrosterone sulphate (DHEA-S) は steroid sulfatase (STS) により DHEA に変化し、また steroid sulfotransferase (SULT2M) により DHEA-S が変わる。細胞内の DHEA は 17- β -hydroxysteroid dehydrogenase (17- β -HSD) および 3- β -HSD により testosterone (TEST) に変換する。そして一部の TEST は核内に移行し、5- α -reductase (5- α -R) によって男性ホルモンである dihydrotestosterone (DHT) に変換する。そして残りの TEST は分泌側に存在する aromatase によって女性ホルモンである 17- β -estradiol に変換する。そこで上記酵素群の発現について、それぞれの抗体 (goat anti-human STS, goat anti-human SULT2M, goat anti-human 3- β -HSD, goat anti-human 17- β -HSD, goat anti-human 5- α -R, goat anti-human aromatase) を用いて間接蛍光抗体法にて検索した。その結果、健常者においては STS は腺房細胞基底側に強く発現がみられたが、シェーグレン症候群患者においては発現の減弱が認められた。SULT2M については、両者ともに発現はわずかに認められた。また、3- β -HSD と 17- β -HSD については細胞質内に比較的強い染色がみられた。さらに aromatase に関しては両者において同様に観察された。一方、図2において示すように 5- α -R については、健常者においては核内に存在が確認されたが、シェーグレン症候群患者においては細胞質内にその局在を認めた。したがって、シェーグレン症候群患者腺房細胞においては testosterone から androgen への変換酵素である 5- α -R が局在異常を示すため androgen の発現が低下し、estrogen/androgen imbalance が惹起されリンパ球浸潤が起こることが示唆された¹⁰⁾。今後病変初期段階であるリンパ球の唾液腺組織への浸潤を阻止するため、腺房細胞における androgen の発現正常化を目指して研究を進展させる予定である。

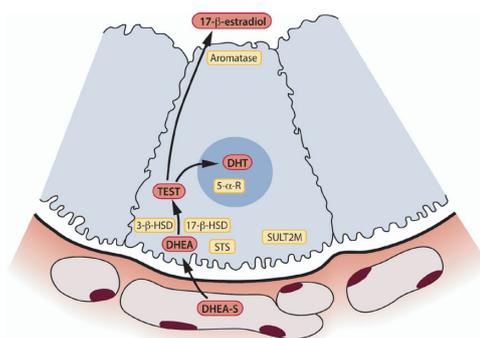


図1 正常唾液腺腺房細胞における性ホルモンの代謝経路
STS: steroid sulphatase,
SULT: steroid sulfotransferase,
3- β -HSD: 3- β -hydroxysteroid dehydrogenase,
17- β -HSD: 17- β -hydroxysteroid dehydrogenase,
DHEA-S: dehydroepiandrosterone sulphate,
TEST: testosterone, DHT: dihydrotestosterone.

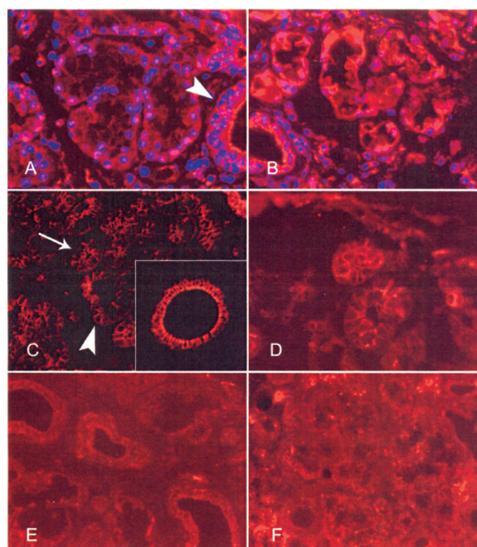


図2 口唇腺における 5- α -reductase (5- α -R) と aromatase の発現

健常者口唇腺において、5- α -R の染色は腺房細胞の核に強く認められた。一方導管細胞においては核にび漫性に染色がみられた (A, 矢頭)。Aromatase の免疫染色は腺房細胞において偏在性がみられた。すなわち aromatase は腺房細胞の分泌側と側壁に認められた (C, 矢頭)。そして基底側にはわずかな染色であった (C, 矢)。C における囲みに示すように、導管細胞において aromatase は基底側に染色がみられた。シェーグレン症候群患者口唇腺においては、5- α -R の染色は主として細胞質内であった (B, A と比較)。なおシェーグレン症候群患者口唇腺における aromatase の染色像は健常者のそれとほぼ同様であった (D, C と比較)。ネガティブコントロールとして E と F において示す。A-F: X200, C における囲み: X400。

Ⅲ. 腺房構造の萎縮・消失に対する 腺房構造安定化療法（中期段階での治療法）

既に健常者の腺房細胞の構造維持には、正常な type IV collagen や laminin $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 4$ chains から成る基底膜の存在の重要性が指摘されている⁴⁾。我々もこれまで、正常唾液腺組織の構築には基底膜の安定化が極めて重要であることを明らかにしてきた¹¹⁾。また、培養ヒト腺房細胞と導管細胞を TNF- α や IL-1 β で処理した場合、腺房細胞においてのみ MMP-9 と MMP-2 の活性上昇がみられ、これは転写因子 NF- κ B の活性化を介していることを報告した¹²⁾。そこで腺房細胞に NF- κ B の恒常的抑制因子である変異型 I κ B- α cDNA を導入した遺伝子導入細胞を樹立したところ、導入細胞は TNF- α にて刺激しても MMP-9 の活性化はみられず良好な増殖を示した¹³⁾。すなわち NF- κ B 活性の抑制の重要性を明らかにした。更に腺房細胞における TNF- α による NF- κ B の活性化を抑制する効果は、アルカロイド製剤やプロテアソーム阻害剤においてもみられることを報告した¹⁴⁾。そこで、シェーグレン症候群モデルマウスを用いて本製剤の治療効果を検討した。すなわち、生後 3 日目の雌 NFS/*sld* マウスから胸腺を摘出 (3d-Tx) した 3d-Tx NFS/*sld* マウスに生後 4 週齢から、植物アルカロイド製剤であるセファランチンを 10 μ g/mouse/day (5 匹) あるいは 100 μ g/mouse/day (11 匹)、またコントロールとして生理食塩水 (9 匹) の腹腔内投与を 8~10 週齢まで行った。その後、病理組織学的検索を行った。すなわち 3d-Tx NFS/*sld* マウスを 8 から 10 週齢で屠殺し、唾液腺と涙腺を摘出し、ヘマトキシリンエオジン染色を施行した。そして、White らの分類¹⁵⁾ に従って唾液腺および涙腺の炎症性病変につきスコアを付け、グレイディングを行った。また、TUNEL 法を用いてアポトーシスの検索を行った。更に唾液腺および涙腺組織における p65, リン酸化 I κ B- α , MMP-9 および type IV collagen の局在を免疫組織化学的に検索した。なお、本研究は徳島大学動物実験委員会の承認を得て行った。その結果セファランチン未投与マウスにおいては唾液腺と涙腺に著明なリンパ球浸潤と腺房構造の破壊が観察されたが、セファランチン投与マウスにおいてはリンパ球浸潤の抑制と腺房構造の安定化が認められた。また、White らの分類に従って行ったグレイディングにおいても、セファランチン投与によりグレイディングの低下が確認された。更に唾液腺および涙腺組織における p65, リン酸化 I κ B- α , MMP-9 および type IV collagen の発現については、セファランチン未投与マウスにおいては p65 とリン酸化 I κ B- α , MMP-9 の強い発現が認められたが、セファランチン投与マウスにおいては p65 とリン酸化 I κ B- α , MMP-9 の著しい発現低下が観察された。そして基底膜構成成分である type IV collagen の断裂がセファランチン未投与マウスにおいては認められたが、セファランチン投与マウスにおいては type IV collagen の連続性が確認された。すなわち、セファラン

チンは腺房細胞の NF- κ B 活性と MMP-9 産生を抑制する結果、基底膜の分解阻止に寄与し腺房構造が安定化されることが明らかとなった¹⁶⁾。今後は上記の研究結果を踏まえて、病変中期段階である腺房構造の消失の阻止を目指して、本モデルマウスにおけるアルカロイド製剤およびプロテアソーム阻害剤の治療効果に関する研究を進展させる予定である。

Ⅳ. 残存導管細胞に対する水分分泌機能の付与療法 (後期段階での治療法)

正常腺房細胞には水分分泌膜蛋白である Aquaporin 5 (AQP5) の存在が確認されているが、導管細胞には認められていない¹⁷⁾。一方既に述べた如く、消失した腺房細胞に置換する形で導管細胞の増殖がみられる⁴⁾。そこで我々は、残存導管細胞に水分分泌機能を付与し得るか否か検討を行った。すなわち、導管細胞株 (NS-SV-DC) を 2 μ M の 5-aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-CdR) にて処理することにより誘導される AQP5 の発現・機能につき解析した。その結果 Real-time RT-PCR 法を用いた解析より明らかに AQP5 mRNA の発現誘導が認められた。また間接蛍光抗体法での AQP5 の細胞内局在の解析結果 (図 3) より、AQP5 は細胞膜を中心に発現が認められた。更に水分分泌能につき浸透圧勾配法により解析したところ、AQP5 の発現により有意に分泌量の増加が確認された (図 4)。すなわち、導管細胞において発現誘導された AQP5 は水分分泌機能を有していることが明らかとなった¹⁸⁾。したがって今後、病変後期段階にみられる残存した導管細胞に対して水分分泌機能の付与を目指して、シェーグレン症候群モデルマウスを用いて *in vivo* での AQP5 発現システムを構築する予定である。

Ⅴ. おわりに

周知の如くシェーグレン症候群はドライマウスとドライアイという乾燥症状を主徴候とする自己免疫疾患である。本疾患は未だ発症原因が解明されていないため、その根治的治療法は存在しない。従来より我々は、本総説において述べたように、シェーグレン症候群の唾液腺病変の進行度に対応した治療法の構築について研究を行っている。すなわち、唾液腺病変の(1)初期段階であるリンパ球浸潤に対する浸潤阻止療法、(2)中期段階である腺房構造の萎縮・消失に対する腺房構造安定化療法、(3)後期段階である残存導管細胞に対する水(唾液)分泌機能の付与療法、である。本研究は、臨床的に口唇生検により判明した患者の病期に応じて初期、中期、後期の 3 段階に治療法を選択することに反映させることが可能である。このため、個々の患者の病期にあった最適の治療(テーラーメイド医療)を行うことが可能となり、無駄な治療法の排除と医療資源の削減につながる事が期待される。

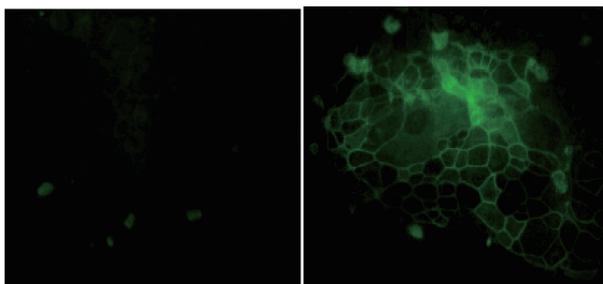


図3 導管細胞株 (NS-SV-DC) における AQP5 の発現と局在

未処理 NS-SV-DC 細胞においては AQP5 の発現は認められなかった (コントロール) が, 5-Aza-CdR にて処理した NS-SV-DC 細胞においては, 主として細胞膜に AQP5 の発現と局在が確認された (5-Aza-CdR 処理)。

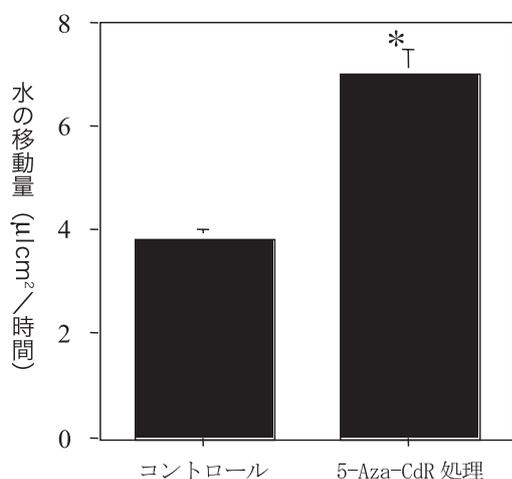


図4 水分分泌量の測定

未処理 NS-SV-DC 細胞 (コントロール) から分泌される水の量に比較して, 5-Aza-CdR にて処理した NS-SV-DC 細胞 (5-Aza-CdR 処理) においては, 有意に分泌量の増加が認められた。

※ $P < 0.05$, コントロールと比較して (Mann-Whitney *U*-test)。

謝 辞

稿を終るに臨み, 本稿執筆の荣誉を賜りました四国歯学会会長林 良夫学部長, 四国歯学会編集委員会の諸先生方に感謝の意を表します。

文 献

- 1) Laine M, Virtanen I, Salo T and Kontinen Y T: Segment-specific but pathologic laminin isoform profiles in human labial salivary glands of patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 50, 3968-3973 (2004)
- 2) Haneji N, Nakamura T, Takio K, Yanagi K, Higashiyama

- H, Saito I, Noji S, Sugino H and Hayashi Y: Identification of a-fodrin as a candidate autoantigen in primary Sjögren's syndrome. *Science* 276, 604-607 (1997)
- 3) Goicovich E, Molina C, Perez P, Aguilera S, Fernandez J and Olea N: Enhanced degradation of proteins of the basal lamina and stroma by matrix metalloproteinases from the salivary glands of Sjögren's syndrome patients: correlation with reduced structural integrity of acini and ducts. *Arthritis Rheum* 48, 2573-2584 (2003)
- 4) Kontinen Y T, Porola P, Kontinen L, Laine M and Poduval P: Immunohistopathology of Sjögren's syndrome. *Autoimmun Rev* 6, 16-20 (2006)
- 5) Azuma M, Tamatani T, Kasai Y and Sato M: Immortalization of normal human salivary gland cells with duct-, myoepithelial-, acinar-, or squamous phenotype by transfection of SV40 ori- mutant DNA. *Lab Invest* 69, 24-42 (1993)
- 6) Haneji N, Hamano H, Yanagi K and Hayashi Y. A new animal model for primary Sjögren's syndrome in *NFS/sld* mutant mice. *J Immunol* 153, 2769-2777 (1994)
- 7) Talal N: Overview of Sjögren's syndrome. *J Dent Res* 66, 672-674 (1987)
- 8) Wilder R L: Neuroimmunoendocrinology of the rheumatic diseases: past, present, and future [review]. *Ann N Y Acad Sci* 966, 13-19 (2002)
- 9) Porola P, Laine M, Virkki L, Poduval P and Kontinen Y T: The influence of sex steroids on Sjögren's syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 1108, 426-432 (2007)
- 10) Spaan M, Porola P, Laine M, Rozman B, Azuma M and Kontinen Y T: Healthy human salivary glands contain a DHEA-sulphate processing intracrine machinery, which is deranged in primary Sjögren's syndrome. *J Cell Mol Med* 13, 1261-1270 (2009)
- 11) Azuma M, Tamatani T, Fukui K, Bando T and Sato M: Enhanced proteolytic activity is responsible for the aberrant morphogenetic development of SV40-immortalized normal human salivary gland cells grown on basement membrane components. *Lab Invest* 70, 217-227 (1994)
- 12) Azuma M, Motegi K, Aota K, Hayashi Y and Sato M: Role of cytokines in the destruction of acinar structure in Sjögren's syndrome salivary glands. *Lab Invest* 77, 269-280 (1997)
- 13) Azuma M, Aota K, Tamatani T, Motegi K, Yamashita T, Harada K, Hayashi Y and Sato M: Suppression of TNF- α -induced MMP-9 production by the introduction of a super-repressor form of I κ B- α cDNA into immortalized human salivary gland acinar cells. *Arthritis Rheum* 43, 1756-1767 (2000)
- 14) Azuma M, Aota K, Tamatani T, Motegi K, Yamashita T,

- Ashida Y, Hayashi Y and Sato M: Suppression of TNF- α -induced MMP-9 production in human salivary gland acinar cells by cepharanthine occurs via down-regulation of NF- κ B. *Arthritis Rheum* 46, 1585-1594 (2002)
- 15) White S C and Casarett G W: Induction of experimental autoallergic sialadenitis. *J Immunol* 112, 178-185 (1974)
 - 16) Azuma M, Ashida Y, Tamatani T, Motegi K, Takamaru N, Ishimaru N, Hayashi Y and Sato M: Cepharanthin, a biscochlorine alkaloid, prevents destruction of acinar tissues in murine Sjögren's syndrome. *J Rheumatol* 33, 912-920 (2006)
 - 17) Agre P, Brown D and Nielsen S: Aquaporin water channels: unanswered questions and unresolved controversies. *Curr Opin Cell Biol* 7, 472-483 (1995)
 - 18) Motegi K, Azuma M, Tamatani T, Ashida Y and Sato M: Expression of aquaporin-5 in and fluid secretion from immortalized human salivary gland ductal cells by treatment with 5-aza-2'-deoxycytidine: a possibility for improvement of xerostomia in patients with Sjögren's syndrome. *Lab Invest* 85, 342-353 (2005)