
学位論文

唾液腺腺房細胞における matrix metalloproteinase-9 抑制と 導管細胞における aquaporin-5 誘導機構

— シェーグレン症候群唾液腺水分分泌機能の再生 —

芦田 有紀

キーワード：シェーグレン症候群, MMP-9, セファランチン, aquaporin-5, デシタビン

Regulation of MMP-9 Expression in Salivary Gland Acinar Cells and A Mechanism Involved in the Induction of Aquaporin-5 Expression in Ductal Cells — Regeneration of Functional Fluid Secretion from Sjögren's Syndrome Salivary Glands —

Yuki ASHIDA

Abstract : Our previous *in vitro* study suggested that the suppression by cepharanthin of tumor necrosis factor (TNF)- α -induced matrix metalloproteinase (MMP)-9 could prevent the destruction of the acinar structure in Sjögren's syndrome (SS) salivary glands. In this study, we demonstrated that the *in vivo* administration of cepharanthin resulted in the prevention of severe damage to acinar tissues in the murine model of human SS. Cepharanthin was intraperitoneally administered five times a week at a dose of 0, 10, or 100 μ g/mouse to 4 to 10 week-old thymectomized female NFS/*sld* mice. Mononuclear cell infiltrates and the destruction of acinar tissue in the salivary and lacrimal glands were extensively observed in the control mice; however, in the mice treated with cepharanthin for 6 weeks, both a significant decrease in the mononuclear cell infiltrates and an improvement of the severe damage to the acinar tissues were evident in the salivary and lacrimal glands. Immunohistochemical analysis revealed that phosphorylated I κ B- α and MMP-9 were more strongly stained in the acinar cells of the control mice than in those of the cepharanthin-treated mice. In addition, although the lack of staining for type IV collagen was partially observed in the acinar tissues of the control mice, the continuity of type IV collagen was detected in the acinar tissues of the cepharanthin-treated mice. According to the results of a TUNEL analysis, the destruction of acinar tissues was attributed to the induction of apoptosis, suggesting that cepharanthin inhibits apoptosis by suppressing phosphorylation of I κ B- α , followed by the prevention of MMP-9 activation. Our findings suggest that cepharanthin may be a promising agent for use in preventing the destruction of acinar tissues in murine SS. Moreover, to investigate the possibility that salivary gland cells, especially ductal cells, surviving in the salivary gland tissues of SS could acquire the functional expression of membrane water channel aquaporin-5 (AQP5), because ductal cells, but not acinar cells, preferentially survive and/or proliferate in SS salivary glands. Thus, in this study, we demonstrate that an immortalized normal human salivary gland ductal cell (NS-SV-DC) line, lacking the expression of AQP5, acquires AQP5 gene expression in response to treatment with 5-aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-CdR), a DNA demethylating agent.

Confocal microscopic analysis revealed the localization of AQP5 expression mainly at the apical and lateral sides of the plasma membrane. The expressed AQP5 protein was functionally active because AQP5 expression resulted in a significant increase in the osmotically directed net fluid rate across monolayers of NS-SV-DC cells. By the analysis of bisulfite sequencing of CpG islands in the AQP5 promoter, hypermethylation within the consensus Sp1-binding sites was commonly observed in parental cell clones, whereas demethylation at the CGs, one in the second consensus Sp1 element and the other outside of the third consensus Sp1 element in the AQP5 promoter, was detected in NS-SV-DC cells after treatment with 5-Aza-CdR. By analyzing the luciferase activity of transfected AQP5 promoter vectors, it became evident that demethylation at the CGs cooperatively functions between these two sites to induce AQP5 expression. Our data, therefore, suggest that treatment of ductal cells with 5-Aza-CdR could result in the expression of the AQP5 gene, thereby leading to increased fluid secretion from ductal cells in SS salivary glands.

緒 言

シェーグレン症候群 (Sjögren's syndrome: 以下 SS と略記する) は原因不明の難治性の自己免疫疾患であり, その標的臓器は唾液腺や涙腺, 気管支腺, 汗腺, 膵分泌腺などの外分泌腺である¹⁾. 本疾患はこれら外分泌腺からの分泌障害によって引き起こされる乾燥症状を主症状として中年以降の女性に好発し, 現在その患者数は約50万人と推定されている。SS 患者の最も一般的な症状は, 上記のごとく唾液分泌不全と涙液分泌不全に起因する口腔乾燥とドライアイである。とりわけ口腔内乾燥症状を主症状とする SS 患者においては, 他に口腔灼熱感や嚥下障害, 味覚異常, 嗄声などの諸症状を呈するため, 日常生活において数多くの支障をきたしている場合がある。したがって, SS 患者のこれら乾燥症状を改善するためには少なくとも SS の発症機構の解明とそのメカニズムに沿った治療法の開発が必要不可欠であると考えられる。

SS 患者の唾液腺組織や涙腺組織の組織学的特徴として, 唾液腺, 涙腺組織には著しい炎症性細胞浸潤とそれによる腺房構造の破壊, また導管構造の種々の変化, すなわち導管の化生や過形成, 導管細胞のオンコサイト様変化, あるいは導管細胞の増殖によっておこる筋上皮島の形成などが観察される^{2,3)}。すなわち, 腺房細胞の選択的破壊と導管細胞の生存あるいは増殖が SS 患者唾液腺, 涙腺組織での特徴的病理組織像であることが理解される。現在までのところ SS 唾液腺病変において tumor necrosis factor (TNF)- α や interleukin (IL)-1 β , IL-2, IL-6, interferon (IFN)- γ などの炎症性サイトカインが mRNA レベルで強く発現していること^{4,5)} から, SS 唾液腺病変の発症に腺組織に浸潤した単核細胞から分泌されるサイトカインが重要な役割を担っていることが示唆されている。

一般に, 成熟した臓器の構築には基底膜を含めた細胞外基質の存在が不可欠であることが知られており, 上皮細胞層を周囲の間質から隔離し, 三次元的構造の形成

に關与している。唾液腺組織においても腺房構造や導管構造の構築に基底膜が重要な役割を担っている。この基底膜は正常唾液腺組織においては, 唾液腺細胞によって産生される蛋白分解酵素とその抑制因子の両者によって厳密に調節されている。たとえば, 過剰の蛋白分解酵素などによる腺房細胞-基底膜相互関係あるいは導管細胞-基底膜相互関係の崩壊は, 腺房構造や導管構造の破壊につながるかとされている。すでに TNF- α や IL-1 β などのサイトカインは, 基底膜分解につながるコラゲナーゼの合成と産生を促進させることが報告されていることより^{6,7)}, サイトカインが唾液腺腺房構造や導管構造の破壊につながる基底膜の分解に寄与している可能性が示唆される。事実, SS 患者唾液腺においては基底膜の破壊的变化がおこっていることや, SS 患者唾液中には基底膜を分解する蛋白分解酵素である不活型と活性型 matrix metalloproteinase (MMP)-9 の増強がみられることが報告されている^{8,9)}。MMP-9 は基底膜の分解に關与する重要な決定因子の一つであり, TNF- α の刺激によって細胞から分泌されることが知られている¹⁰⁾。その分泌促進に關する分子機構として, MMP-9 遺伝子の転写調節領域には核内転写因子である activator protein-1 (AP-1) や specificity protein 1 (Sp1), そして nuclear factor- κ B (NF- κ B) などの結合部位があること¹¹⁾, また TNF- α は NF- κ B を活性化させることから^{6,7)}, TNF- α による NF- κ B 活性の上昇を介した MMP-9 遺伝子の転写活性促進作用が推察される。

NF- κ B は免疫グロブリンの軽鎖 (Ig κ) 遺伝子のプロモーター領域に結合する蛋白として発見された転写因子であり¹²⁾, 通常 p65 と p50 の2つの構成分子よりなるヘテロ二量体として存在している¹³⁾。これら2種類の構成分子にはそのN末端にプロトオンコジーンである c-rel 遺伝子産物と相同性の認められる領域が存在しており, Rel ホモロジドメインと呼ばれている。この領域は300個ほどのアミノ酸配列を有しており, ホモあるいはヘテロ二量体の形成や DNA 結合に必要であることが報告さ

れている^{14, 15)}。さらに核移行シグナルもこの領域に存在していることが明らかにされている^{13, 14, 16)}。通常 NF- κ B は刺激がない状態では NF- κ B の抑制因子の一つである inhibitor of nuclear factor κ B (I κ B)- α 蛋白と複合体を形成して細胞質に留まり不活性化状態となっている¹⁵⁾。しかし TNF- α 等の細胞外からの刺激により, I κ B- α はリン酸化とユビキチン化を介し 26S プロテアソームにより分解される。そして I κ B- α から分離した NF- κ B は核に移行し, 遺伝子上の κ B モチーフに結合することにより種々の標的遺伝子の転写調節が行われる^{17, 18)}。したがって NF- κ B の活性化の制御は主として NF- κ B と I κ B- α の解離によって調節されていると理解される^{13, 19, 20)}。

アクアポリン (AQP) は細胞膜に存在する水輸送に関与する蛋白であり, 浸透圧/静水圧勾配に反応して水を細胞内外に急速に移動させる機能を有しており, 全身のほぼすべての臓器に存在することが知られている²¹⁾。現在までに AQP は AQP0 から AQP12 まで 13 種類のアイソフォームが報告されている²¹⁻²³⁾。これら AQP のうち, AQP5 はラット顎下腺からクローニングされたものであり, 水輸送上皮である涙腺, 気管, 眼, 肺および唾液腺細胞に存在する²⁴⁾。なお, ヒト唾液腺においては AQP5 は細胞局在学的解析より腺房細胞の分泌側の細胞膜に存在していることが報告されているが²⁵⁾, 導管細胞での発現は認められていない。この AQP5 の機能は腺房細胞から腺腔内への水の移行に関与している。事実, 変異型 AQP5 を発現しているマウスにおいては唾液腺での水分分泌量の低下が報告されている²⁶⁾。一方, AQP3 は腺房細胞の基底側と側壁に局在しており, 腺房細胞への水成分の流入に寄与している²⁷⁾。したがって, 腺房細胞において機能を有する AQP5 と AQP3 の両者の存在が正常水輸送に重要であると考えられる。そこで, これらの所見から導管細胞において AQP5 と AQP3 の発現が認められた場合, 導管細胞は水分分泌機能を獲得することが可能になるという作業仮説が立案される。

近年の研究より, 遺伝子のプロモーター領域内に存在する CpG アイランドでのメチル化は遺伝子発現を抑制する重要なエピジェネティックな修飾であることが示されている²⁸⁻³⁰⁾。CpG アイランドでのメチル化による遺伝子発現抑制のメカニズムとして, DNA のメチル化は DNA の二次構造を変え, またメチル基結合蛋白とヒストン脱アセチル化酵素を介して染色体のリモデリングを惹起させることにより, 直接的に遺伝子の転写機構に影響をおよぼし, その結果転写抑制につながると考えられている³¹⁾。したがって, 細胞を DNA の脱メチル化剤である 5-aza-2'-deoxycytidine (デシタピン) にて処理をした場合, 高メチル化により不活性化されている遺伝子の再活性化につながることを予測される³²⁻³⁶⁾。現在まで, AQP5 遺伝子プロモーター内には 3 つの Sp1 結合部位の存在が知られているが, AQP5 遺伝子プロモーターのメチル化状態と遺伝子発現との関連性についてはヒト唾液腺細胞に

おいては未だ解析されていない。

現在までにわれわれは, 不死化正常ヒト唾液腺腺房細胞株である NS-SV-AC 細胞を用いて, *in vitro* において植物アルカロイド製剤であるセファランチン (CE) にて処理することにより TNF- α によって誘導される NF- κ B 活性と MMP-9 産生を低下させる結果, NS-SV-AC 細胞が IV 型コラーゲンにて裏装された培養皿上でアポトーシスの一種であるアノイキスに陥らず, 正常な形態形成を維持することを報告した³⁷⁾。なお, アノイキスとは細胞が細胞外基質との接触を喪失することによって引き起こされるアポトーシスのことである。そこで本研究においては 2 つの作業仮説, すなわち 1) ヒト SS モデルマウスを用いて, CE が *in vivo* においても NF- κ B 活性と MMP-9 産生を低下させることにより, 基底膜の安定化と腺房構造の破壊阻止に寄与する, 2) AQP3 を発現するが AQP5 を発現していない不死化正常ヒト唾液腺導管細胞株である NS-SV-DC 細胞を用いて, *in vitro* においてデシタピンにて処理をすることにより AQP5 の発現が誘導され, 発現した AQP5 は水分分泌機能を有すること, そして AQP5 発現誘導の分子機構を明らかにする, につき検討を行った。

実験材料ならびに実験方法

1. 細胞および培養法

本研究においては, SV40 DNA をトランスフェクションすることにより *in vitro* において不死化した正常ヒト唾液腺腺房細胞株 (NS-SV-AC) と導管細胞株 (NS-SV-DC) および筋上皮細胞株 (NS-SV-MC) を使用した³⁸⁾。すなわち NS-SV-AC 細胞と NS-SV-DC 細胞および NS-SV-MC 細胞は, 手術時に得られた明らかな病変を有さないヒト顎下腺を無菌的に細切し, Serum-Free Keratinocyte Medium (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) (以下 SFM と略記する) を用いたコラーゲンゲル (新田ゼラチン社, 大阪) 培養法で初代培養することにより得られた単層培養ヒト唾液腺細胞に SV40 DNA をリポソームトランスフェクション法³⁹⁾を用いてトランスフェクションすることにより樹立された³⁸⁾。NS-SV-AC 細胞はプラスチックペトリ皿 (Becton-Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA) 上で培養することにより類円形で敷石状の増殖を示した。この細胞クローンの超微構造学的特徴として, 細胞質内に多数の分泌顆粒が認められた。また細胞が保有する特異的細胞マーカーの検索では, アミラーゼの発現が認められた³⁸⁾。上記の様な超微構造学的特徴と細胞が保有する特異的細胞マーカーの発現している細胞は腺房細胞であることがすでに報告されている^{40, 41)}。よって, NS-SV-AC 細胞は腺房細胞に近似した細胞であると考えられる³⁸⁾。一方, NS-SV-DC 細胞は多角形で敷石状の増殖を示した。この細胞クローンの超微構造学的特徴としては, ミトコンドリア, 粗面小胞体, ゴルジ装置等の細胞内小器官が細胞質の一極に偏

在する像が認められた。また、細胞が保有する特異的細胞マーカーの検索では、secretory componentの発現が認められた。すでに上記の様な超微構造学的特徴と細胞が保有する特異的細胞マーカーの発現している細胞は導管細胞であることが報告されている^{40,41}。それ故に、NS-SV-DC細胞は導管細胞に近似した細胞であると考えられる³⁸。さらに、NS-SV-MC細胞は紡錘形で索状の増殖様式を示し、超微構造学的に細胞質の長軸に沿って走行する微細線維と細胞膜に飲小胞が認められ、また、細胞が保有する特異的細胞マーカーの検索ではミオシンの発現を認めた。一般に、上記のような超微構造学的特徴と細胞が保有する特異的細胞マーカーの発現している細胞は筋上皮細胞であることが明らかにされていることから^{40,41}、NS-SV-MC細胞は、筋上皮細胞に近似した細胞であることが明らかにされた³⁸。なお、NS-SV-AC細胞とNS-SV-DC細胞及びNS-SV-MC細胞は軟寒天培地中でのコロニー形成能が認められず、さらにヌードマウス背部皮下での造腫瘍性も有していないことから、正常細胞としての表現形質を保有していることが明らかにされている³⁸。NS-SV-AC細胞とNS-SV-DC細胞およびNS-SV-MC細胞はSFMを増殖培養液として用いて、空气中に5%（容量/容量（volume/volume）；以下V/Vと略記する）の割合に炭酸ガスを含む培養器中で37℃にて培養した。

2. 蛋白分解酵素（MMP-2とMMP-9）活性の測定法

血清無添加培地であるSFMにて培養した各細胞から分泌されるMMP-2とMMP-9の測定をゼラチンを基質としたザイモグラフィにより行った⁴²。すなわち、NS-SV-AC細胞とNS-SV-DC細胞およびNS-SV-MC細胞を100 mmプラスチックペトリ皿（Becton-Dickinson Labware）に植え込み、TNF- α （Genzyme/Techne, Cambridge, MA, USA）（10 ng/ml）とセファランチン（化研生薬、東京）（10 μ g/ml）にて処理或いは未処理で3日間培養した。得られた培養上清を1,700 \times gで遠心し、細胞残渣を除去した後、Spectra・Por3（Spectrum, Houston, TX, USA）を用いて約20倍の濃縮を行った。得られたサンプルはBradfordの方法⁴³に準じたBio-Rad laboratories（Richmond, CA, USA）の蛋白定量キットを用いて蛋白定量を行い、最終蛋白濃度が1 mg/mlになるように調製した。このようにして得られた培養液中より調製した蛋白標品20 μ gを、 β -メルカプトエタノールを含むサンプルバッファー（最終濃度50mM トリス塩酸緩衝液（pH 6.8）、2%（重量/容量（weight/volume）（W/V））sodium dodecyl sulfate（SDS）（和光純薬、大阪）、0.1%（W/V）ブロムフェノールブルー（片山化学、大阪）、10%（W/V）グリセロール（和光純薬））からなる標品緩衝液に混和した。この標品を1 mg/mlの割合でゼラチンを含む最終濃度0.1%（W/V）N-N、メチレンビス含有10（W/V）ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリ

ルアミドゲルを用い、Laemmliの方法⁴⁴に準じて電気泳動（SDS-PAGE）を行った。SDS-PAGE後、SDSを取り除くためにゲルを0.25%（V/V）Triton-X100（和光純薬）を含む50 mM トリス塩酸緩衝液（pH 7.6）で30分間洗浄した。次に50 mM トリス塩酸緩衝液（pH 7.6）、0.2 M 塩化ナトリウム、5 mM 塩化カルシウム（和光純薬）、0.02%（W/V）Brij-35（和光純薬）からなる反応用緩衝液を用いてゲルを37℃にて16時間反応させた。反応後、Coomassie blue R250（和光純薬）を含む30%（V/V）メチルアルコールと10%（V/V）酢酸溶液にて脱色した。ゼラチナーゼ活性はゲル上にて透明のバンドとして検出された。バンドがMMPであることは、Ethylenediamine tetraacetic acid（EDTA）（和光純薬）でゲルを処理することによりそのバンドが消失することによって確認された。

3. Western blot 法

前述した培養液より調製した蛋白標品20 μ gを β -メルカプトエタノール（Sigma-Aldrich corporation, St. Louis, MO, USA）を含むサンプルバッファーに混和した後、最終濃度0.1%（W/V）N-N'メチレンビス含有10%（W/V）SDS-ポリアクリルアミドゲルを用い、Laemmliの方法に準じて電気泳動（SDS-PAGE）を行った。その後、Towbinらの方法⁴⁵に準じてニトロセルロース膜（Bio-Rad）に転写した。次に、転写したニトロセルロース膜を5%（W/V）脱脂粉乳（和光純薬）-Tween 20-トリリス塩酸緩衝液（pH 7.6）（以下、T-TBSと略記する）にて処理することにより、非特異的反応を阻止した後、1000倍希釈濃度の抗MMP-9抗体（Oncogene Research Products, Cambridge, MA, USA）或いは抗I κ B- α 抗体（Rockland, Gilbertsville, PA, USA）と室温で3時間反応させた。T-TBSで洗浄後、horseradish-peroxidase（HRP）標識ウサギIgG抗体（Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden）にて室温で1時間反応させた。T-TBSにて洗浄後、Enhanced Chemiluminescence（ECL）kit（Amersham Pharmacia Biotech）で反応させ、オートラジオグラフィを行った。

4. RNAの抽出、Reverse transcriptase-polymerase chain reaction（RT-PCR）法およびReal-time RT-PCR法

培養細胞より5 μ gの全RNAを抽出し、これを鋳型としてランダムプライマー（Invitrogen, CA, USA）を用い、逆転写酵素（Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase）（Life Technologies Inc.）を加え42℃にて60分間反応させ逆転写を行い、cDNAを作製した。PCR反応は1 μ lのcDNAとMMP-9およびGlyceraldehyde-3-P-dehydrogenase（GAPDH）のプライマー（最終濃度1 μ M（下記に示す）、Taqポリメラーゼ（最終濃度0.05 U/ μ l）（宝酒造、草津）、dNTPs mixture（宝酒造）、およびPCR

緩衝液 (宝酒造) を混和し, DNA Thermal Cycler TP 3000 (宝酒造) を用いて下記の条件下に PCR 反応を行った。すなわち 94°C にて 5 分間の熱変性後, 94°C にて 1 分, 68°C にて 1 分, 72°C にて 1 分のアニーリングを 1 サイクルとし, 計 35 サイクルを行った。PCR 産物は 2% (W/V) アガロースゲルにて電気泳動し, エチジウムブロマイド (1 µg/ml; 和光純薬) にて染色した。

プライマーの塩基配列: MMP-9 S (センス):

5'-GGTCCCCACTGCTGGCCCTTCTACGGCC-3'

MMP-9 AS (アンチセンス):

5'-GCCCACCTCCACTCCTCCCTTCTCCAGA-3'

GAPDH S:

5'-ACGCATTTGGCTGTATTGGG-3'

GAPDH AS:

5'-TGATTTGGAGGGATCTCGC-3'

また, NS-SV-DC 細胞を 2 µM のデシタピンにて 0, 48, 72, 96, 120 時間処理した後, TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いて全 RNA を抽出した。AQP5 の陽性対照としてヒト唾液腺組織を用いた。RT 反応にて 10 µg の全 RNA より cDNA を作製し, 下記の条件下に DNA Thermal Cycler TP 3000 (宝酒造) を用いて PCR 反応を行った。94°C 1 分間の熱変性後, 94°C にて 30 秒, 68°C にて 2 分のアニーリングを 1 サイクルとしこれを 35 サイクル行い, 72°C で 3 分間の伸長反応を行った。

AQP3: S; 5'-CCTTTGGCTTTGCTGTCACCTC-3'

AS; 5'-ACGGGGTTGTTGAGGGGTCA-3'

AQP5: S; 5'-CAAGGCCGTGTTTCGCAGAGTTCT-3'

AS; 5'-TCTTCCGCTCTCCCGCTGCTCC-3'

また, 作製した cDNA に, 下記に示すプライマーと TaqMan プローブ, ユニバーサルマスターミックスを反応させ, ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems Japan Ltd, Tokyo) を用いて PCR 反応を行った。

AQP5 プライマー:

S; 5'-CTGCGGTGGTCATGAATCG-3'

AS; 5'-TTGATGATGGCCACACGCT-3'

TaqMan プローブ:

5'-FAM-CCTACCCAGAAAACCCAGTGAGCGG-MGB-3'

5. Chloramphenicol acetyltransferase (CAT) assay

各細胞クローンを 60 mm プラスチックペトリ皿 (Becton-Dickinson Labware) に 5×10^4 個植え込み, 24 時間培養した。次にレポーター遺伝子として CAT をコードした遺伝子を含んだ MMP-9 プロモーターコンストラクトプラスミド (5 µg) を SuperfectTM (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて各細胞にトランスフェクションを行った。なお, 本プラスミドは清水元治博士 (東京大学・医科学研究所・癌細胞) より供与された。トランスフェクション開始 8 時間後, TNF-α (10 ng/ml) 単独, 或いは TNF-α (10 ng/ml) とセファランチン (10 µg/ml) を添加し 12 時間培養した。細胞を回収後, CAT ELISA

kit (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) を用い, Microplate reader (Bio-Rad laboratories) にて 490 nm の波長を基準値として 405 nm で吸光度を測定し, MMP-9 プロモーターの転写活性を算定した。

6. 核抽出物と細胞質抽出物の採取方法

NS-SV-AC 細胞を 100 mm プラスチックペトリ皿 (Becton-Dickinson Labware) に植え込み培養した後, 10 ng/ml の濃度の TNF-α 単独あるいは 10 µg/ml のセファランチンにて前処理したのち, 10 ng/ml の TNF-α と 10 µg/ml のセファランチンにて処理した。ついで Chan と Aggarwal の方法⁴⁶⁾ に準じて核抽出物および細胞質抽出物を回収した。すなわち, 氷冷した PBS (-) にて細胞を 3 回洗浄した後, 400 µl の lysis buffer (10 mM N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES) (pH 7.9), 400 mM NaCl (和光純薬), 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM Ethylen Glycol-bis β-aminoethyl ether (EGTA), 1 mM Dithiothreitol (DTT), 0.5 mM Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 2 µg/ml Aprotinin) を加えて 15 分間室温にて静置し, ラバーポリスマンにて細胞を回収した。最終濃度が 0.3% (V/V) となるように Nonidet-P40 (NP-40) (Sigma-Aldrich) を加え 700 × g にて 15 分間遠心した後, 上清を回収し細胞質抽出物とした。次に, 得られた沈渣に 50 µl の extraction buffer (10 mM HEPES, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 0.5 mg/ml benzamidine, 2 µg/ml Aprotinin) を加え氷上で 30 分間室温にて静置した後, 700 × g にて 15 分間遠心し得られて上清を回収して核抽出物とした。核抽出物と細胞質抽出物中に含まれている蛋白量は Bio-Rad laboratories の蛋白定量キットを用いて測定した。

7. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

B 細胞由来の κB エンハンサー内の κB binding site を含むオリゴヌクレオチド (5'-AGTTGAGGGGACTTTCC CAGGC-3') (Promega Corporation, Madison, WI, USA) をポリヌクレオチドキナーゼ (Promega Corporation) と [γ -³²P] ATP (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて標識し, Sephadex G-25 スピンカラム (Amersham Pharmacia Biotech) にて精製した後, プローブとした。プローブと TNF-α 処理或いは未処理の核抽出物と反応させた。EMSA は Imbert らの方法⁴⁷⁾ に準じて行った。すなわち, 1.0 µg の核抽出物に標識されたプローブと緩衝液 (10 mM HEPES, pH 7.9, 50 mM KCl, 0.2 mM EDTA, 2.5 mM DTT, 10% glycerol, 0.05% Nonidet P-40) を加え, 20 µl の標品とした。標品を最終濃度 0.1% (W/V) N-N, メチレンビス含有 5% (W/V) ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動後, ゲルドライヤー (Bio Rad) を用いて 80°C で 2 時間乾燥し, Kodak X-Omat AR-5 (Eastman Kodak, CO, Rochester, NY) を用いてオートラジオグラフィーを

行った。なお、NF- κ B と標識 κ B プローブとの結合が特異的反応であることを確認するため、過剰の非標識 κ B プローブを添加することにより結合阻害反応を行った。

8. 実験動物

NFS/*sld* ミュータントマウスは本学口腔病理学教室にて繁殖飼育したものを供与された。生後3日目の雌 NFS/*sld* ミュータントマウスに胸腺摘出（以下3d-Tx NFS/*sld* と略）を施した^{48,49}。3d-Tx NFS/*sld* マウスは、4週齢から唾液腺、涙腺に局限した自己免疫疾患を発症し、原発性ヒトシェーグレン症候群に極めて類似した疾患を呈するモデルマウスである⁴⁹。なお、動物実験は本学歯学部動物実験委員会により承認された動物実験計画書に基づいて行った。

9. セファランチン投与実験群

3d-Tx NFS/*sld* マウスに生後4週齢から、10 μ g/100 μ l/mouse/day のセファランチンを腹腔内投与（5匹）、あるいは100 μ g/100 μ l/mouse/day のセファランチンを腹腔内投与（11匹）をそれぞれ週5日行い、8~10週齢まで行った。対照として、100 μ l/mouse/day の生理食塩水の腹腔内投与群（9匹）を用いた。

10. 病理組織学的検討

実験群のマウスを8~10週齢で屠殺し、唾液腺および涙腺組織を採取した。各臓器は10%中性緩衝ホルマリンにて固定し、軟パラフィン包埋後、4 μ m の組織切片を作成し、ヘマトキシリン-エオジン（H-E）染色を施した。唾液腺および涙腺における炎症性病変の組織学的評価は以下に示す如く、White らの分類⁵⁰ に準じて行った。すなわち、

Grade 0：浸潤巣を認めず。

Grade 1：倍率150倍で、20個以上の単核細胞よりなる浸潤巣が1視野中に1~5個認められる。

Grade 2：倍率150倍で、20個以上の単核細胞よりなる浸潤巣が5個以上認められ、実質の破壊を伴わない。

Grade 3：浸潤巣は多数認められ、実質の中等度の変性破壊を伴う。

Grade 4：多数の浸潤巣により著しい実質の破壊を伴う。

11. Terminal deoxynucleotidyltransferase dUTP nick end labeling (TUNEL) 法によるアポトーシスの検出

唾液腺、涙腺組織におけるアポトーシス細胞の検出を行うために、TUNEL 法による検索を行った。TUNEL 法は KLENOW-FragEL™ DNA FRAGMENTATION DETECTION KIT (Oncogene Research Products) を用いて行った。すなわち、脱パラフィン後の切片標本を Proteinase K にて蛋白分解処理した後、内因性ペルオキシダーゼを不活化するため、3% H₂O₂ にて30分間処理した。ピ

オチン化した deoxynucleotides を Klenow enzyme を用いて DNA 断片にラベリングし、HRP 標識 streptavidin と反応させ、diaminobenzidine を用いて発色させた。Methyl green 染色液にて対比染色し、アポトーシス細胞のカウント（倍率150倍で一視野中のアポトーシス細胞数の平均）を行った。すべての操作の洗浄には tris-buffered saline (1 \times TBS) (1 M Tris-HCl pH 7.6, 5 M NaCl) を用い、また、陽性対照には DNase I で処理し同様の操作を行い検索を行った。

12. 免疫組織化学的染色

唾液腺および涙腺組織をホルマリンにて固定後、パラフィン包埋を行い、4 μ m の組織標本を作製した。標本はキシレンを用いて脱パラフィンとエタノールを用いて脱水を行った。Antigen retrieval (抗原性回復操作) は標本を DAKO^R TARGET RETRIVAL SOLUTION (DAKO CORPORATION, Carpinteria, CA, USA) 中にてマイクロウェーブ (600 W) を用いて5分間、2回処理することにより行った。また、内因性ペルオキシダーゼを不活化するため、3% H₂O₂ にて30分間処理した。至適濃度に希釈した各種一次抗体と4 $^{\circ}$ C にて12時間反応後、ABC (Avidin-Biotinylated enzyme Complex) kit (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA) と、3,3'-diaminobenzidine (DAB) 試薬にて発色させ、リン酸化 I κ B- α 、MMP-9 および IV 型コラーゲンの発現および局在につき解析した。すべての操作の洗浄には PBS (-) を用い、また、陰性対照には一次抗体のかわりに PBS (-) を使い、同様の操作を行い検索した。各種の抗家兎ポリクローナル一次抗体は抗リン酸化 I κ B- α (Ser 32) (Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA)、抗 MMP-9 (Sigma-Aldrich)、抗 IV 型コラーゲン (CHEMICON^R International, Inc., Temecula, CA, USA) を使用した。

13. MTT assay

NS-SV-DC 細胞を 1 \times 10⁴個/well となるように96穴マイクロタイタープレート (Becton-Dickinson) に植え込み、24時間培養した。その後、0, 0.5, 1, 2 μ M の濃度の 5-aza-2'-deoxycytidine (デシタビン) (Sigma-Aldrich) にて処理し、1~7日間培養した。各時間培養した後、10 μ l/well の 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 試薬 (Sigma-Aldrich) (5 mg/ml) を加えさらに3時間培養し、形成された MTT ホルマザンをジメチルスルホキシド (DMSO) にて溶解し発色させ、Microplate reader (Bio-Rad laboratories) を用い波長 540 nm にて吸光度を測定した。

14. 間接蛍光抗体法ならびに共焦点レーザー顕微鏡像による解析法

35 mm カルチャーデイッシュ (Becton-Dickinson) にカバーガラスを入れ、NS-SV-DC 細胞を植え込み、24時

間後よりデシタピン 2 μM を添加し、72時間培養した。4%パラホルムアルデヒドにて細胞を固定し、一次抗体として抗 AQP5 抗体 (Santa Cruz) と室温にて2時間反応させ、洗浄後さらに Fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識 2次抗体 (1:50 dilution, Rockland, Gilbertsville, PA, USA) と室温にて2時間反応させた。蛍光顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡 (Leica Microsystems AG, Wetzlar, Germany) にて AQP5 の局在を観察した。なお、細胞は蛍光顕微鏡像においては xy 面にて、また共焦点レーザー顕微鏡像においては xz 面にて解析した。

15. 培養細胞の水分泌量の測定

デシタピン処理および未処理 NS-SV-DC 細胞からの水分泌量の測定はすでに報告されている原法に基づいて行った⁵¹⁾。すなわち、トランスウエルールコル培養チャンパー (Coster, Cambridge, MA, USA) に NS-SV-DC 細胞を 5×10^5 個となるように植え込み、24時間後よりデシタピン 2 μM を添加し72時間培養した。その後、細胞膜の分泌側に 0.4 ml の高張培養液 (400 mOsm; 培養液中に 100 mM のスクロースを添加することにより調製) を、また細胞膜の基底側と側壁に等張培養液 (300 mOsm) にて置き換え、さらに4時間培養した。4時間後、分泌側の培養液を回収し、測定用ピペットを用いて容量を計測することにより水分泌量を算定した。

16. Bisulfite sequence 法

デシタピン処理および未処理 NS-SV-DC 細胞から Promega's Wizard DNA isolation kit (Madison, WI, USA) を用いて DNA を抽出した。抽出した 2 μg DNA を 2 M NaOH にて10分間処理した後、50°C にて16時間 CpGenome™ DNA Modification Kit (Promega) の 3 M 塩化ビスルファイト (Promega) にて処理をすることにより非メチル化シトシンのチミン化を行った⁵²⁾。これをテンプレートとして PCR 反応を行った (S: 5'-GGGAAT TTCGGTTTGGGAGA-3'; AS: 5'-CCCGTCCGAAC CACGTAAC-3')。PCR 反応は94°C 1分間の熱変性後、94°C にて30秒、68°C にて2分のアニーリングを1サイクルとしこれを35サイクル行い、72°C で3分間の伸長反応を行った。PCR 産物をゲルより抽出後 (Qigen, Valencia, CA, USA), TA cloning kit (Invitrogen) を用いてプラスミドベクター pCR2.1-TOPO に組み込んだ。このベクターをバクテリア TPO10F' に組み込み培養後、プラスミド DNA を抽出 (Qigen) した。デシタピン処理および未処理細胞からそれぞれ5個のサブクローンをを用いてシークエンスの解析を行った。

17. ルシフェラーゼアッセイ

脱メチル化部位の検索にてシークエンスを解析したプラスミドベクターより、挿入したフラグメントを切り出し、ルシフェラーゼ レポーター ベクター (pCR-

Luc) に組み換え、4種類のベクターを作製した。すなわち、未処理 1 は24番目と31番目の CpG が両方もメチル化されたものであり、デシタピン 1 は24番目の CpG が、デシタピン 3 は24番目と31番目の両方の CpG デシタピン 4 は31番目の CpG が脱メチル化されたものである。作製した4種類のベクターを NS-SV-DC 細胞にトランスフェクションし、48時間細胞を培養した。細胞を溶解用バッファー (PicaGene, 東洋インキ, 東京) にて溶解して回収した後、ルシフェラーゼ発光基質 (PicaGene) と反応させルミノメーター (Lumat LB 9507; PerkinElmer Life Sciences, Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany) にて蛍光量を測定し、転写活性を調べた。

18. 統計的解析法

得られたデータは平均値 \pm SD で表現し、Analysis of variance (ANOVA) あるいは Mann-Whitney の U 検定を用いて有意差検定を行い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

結 果

1. 唾液腺細胞株の MMP-2, -9 活性におよぼす TNF- α の影響

NS-SV-AC 細胞, NS-SV-DC 細胞及び NS-SV-MC 細胞において TNF- α 処理による MMP-2 と MMP-9 活性の誘導を Gelatin zymography により解析した。その結果、NS-SV-AC 細胞においては、TNF- α 処理により MMP-9 の著しい活性増強と MMP-2 のわずかな活性増強が認められた (図 1, レーン 2 と 3)。しかし、NS-SV-DC 細胞においては、MMP-9 と MMP-2 の明らかな活性増強は認めなかった。NS-SV-MC 細胞においても、NS-SV-AC 細胞において認められるような著しい活性増強は見られなかった。

2. TNF- α によって誘導される MMP-9 発現上昇に対するセファランチンの抑制効果

TNF- α によって誘導される MMP-9 産生をセファランチンが抑制するか否かについて解析を行うために、NS-SV-AC 細胞の培養上清における MMP-9 活性をゼラチンザイモグラフィー (図 2 A) にて、また MMP-9 蛋白の発現を Western blotting (図 2 B) にて解析した。TNF- α 未処理細胞においては MMP-9 蛋白の発現と活性はほとんど認められなかったが (レーン 1), TNF- α 処理によって MMP-9 の発現と活性は著しく増強した (レーン 2)。一方、セファランチンにて24時間前処理後、セファランチンと TNF- α にて処理した場合、MMP-9 の発現と活性は著しく抑制された (レーン 3)。セファランチンによる MMP-9 蛋白の産生抑制が mRNA の発現にも影響を及ぼしているか否かを検索するために、RT-PCR 法を用いて解析した (図 3)。その結果、NS-SV-AC 細胞において TNF- α 未処理では MMP-9 mRNA の発現は

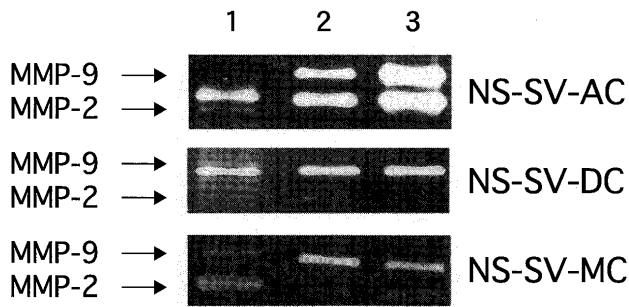


図1 唾液腺細胞株のMMP-2, -9活性におよぼすTNF- α の影響

NS-SV-AC細胞, NS-SV-DC細胞およびNS-SV-MC細胞のTNF- α 処理によるMMP-9とMMP-2活性の誘導をGelatin zymographyにより解析した。レーン1:未処理, レーン2:10 ng/mlのTNF- α にて48時間処理, レーン3:50 ng/mlのTNF- α にて48時間処理。NS-SV-AC細胞においては, TNF- α 処理によりMMP-9の著しい活性増強とMMP-2のわずかな活性増強が認められたが, NS-SV-DC細胞においては, MMP-9とMMP-2の明らかな活性増強は認めなかった。NS-SV-MC細胞においてもNS-SV-AC細胞においてみられるような強い活性増強は見られなかった。

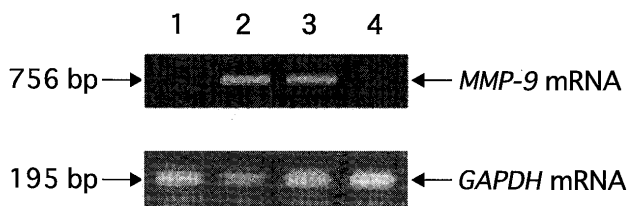


図3 TNF- α によって誘導されるMMP-9 mRNAのセファランチン(CE)処理による抑制

MMP-9の産生抑制につきRT-PCR法を用いてmRNAレベルで解析した。レーン1:未処理, レーン2:TNF- α (10 ng/ml)にて6時間処理, レーン3:TNF- α (10 ng/ml)とCE(10 μ g/ml)にて6時間処理, レーン4:CE(10 μ g/ml)にて24時間前処理後, TNF- α (10 ng/ml)とCE(10 μ g/ml)にて6時間処理。レーン1とレーン4ではMMP-9 mRNAの発現は検出されなかったが, レーン2とレーン3では明らかな発現誘導が認められた。なお, 内部コントロールとしてGAPDH mRNAを用いた。

検出されなかった(レーン1)が, TNF- α 処理によりMMP-9 mRNAの明らかな発現誘導が認められた(レーン2)。TNF- α とセファランチンで同時に処理した時はMMP-9 mRNAの発現には変化が認められなかった(レーン3)。しかし, セファランチンにて24時間前処理した後, TNF- α とセファランチンで処理することによりMMP-9

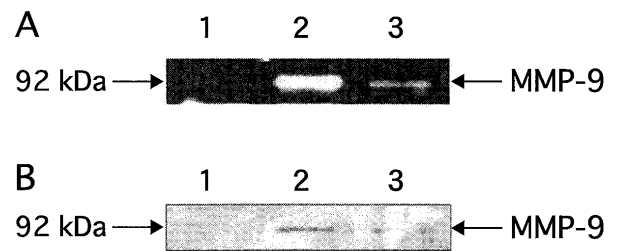


図2 TNF- α によって誘導されるMMP-9産生のセファランチン(CE)処理による抑制

TNF- α にてNS-SV-AC細胞を処理し, 培養上清中のMMP-9をGelatin zymography(A)とWestern blotting(B)にて解析した。レーン1:未処理, レーン2:TNF- α (10 ng/ml)にて24時間処理, レーン3:CE(10 μ g/ml)にて24時間前処理後, TNF- α (10 ng/ml)とCE(10 μ g/ml)にて24時間処理。レーン1ではMMP-9の発現と活性はほとんど認められなかったが, レーン2においては著しく増強した。そして, レーン3ではMMP-9の発現と活性は著しく抑制された。

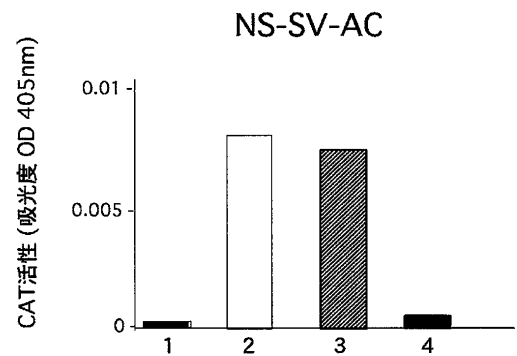


図4 TNF- α によって誘導されるMMP-9遺伝子転写活性のセファランチン(CE)処理による抑制

MMP-9遺伝子の転写調節に及ぼすCEの影響につきCAT assayにて解析した。レーン1:未処理, レーン2:TNF- α (10 ng/ml)にて12時間処理, レーン3:TNF- α (10 ng/ml)とCE(10 μ g/ml)にて12時間処理, レーン4:CE(10 μ g/ml)にて24時間前処理後, TNF- α (10 ng/ml)とCE(10 μ g/ml)にて12時間処理。レーン2とレーン3ではCAT活性の上昇が認められたが, レーン4ではCAT活性の著しい低下が認められた。

mRNAの発現は抑制された。さらに, MMP-9遺伝子の転写活性に及ぼすセファランチンの影響をCAT assayを用いて解析した(図4)。その結果, TNF- α 未処理(レーン1)と比較してTNF- α 処理(レーン2)或いはTNF- α とセファランチン(レーン3)による処理ではCAT活性の上昇が認められた。しかし, セファランチン

ンで24時間前処理後, TNF- α とセファランチンで処理した場合, CAT 活性の著しい抑制 (レーン 4) が認められた。すなわち, NS-SV-AC 細胞においてはセファランチンにて前処理することにより, TNF- α によって誘導される MMP-9 遺伝子の転写活性の増強を抑制することが明らかとなった。

3. TNF- α によって誘導される NF- κ B 結合能の増強に対するセファランチンによる抑制効果

転写因子 NF- κ B は MMP-9 のプロモーター領域内にその結合部位が存在し, MMP-9 の転写調節に深く関与していると考えられている。そこで, セファランチンが TNF- α によって誘導される NF- κ B 活性に影響をおよぼすかどうかについて EMSA 法を用いて解析した。その結果, 図 5 において示すように NS-SV-AC 細胞を TNF- α にて処理した後, 30分後に NF- κ B の κ B プローブ結合能は増強したが, セファランチンにて24時間前処理することにより TNF- α によって誘導される NF- κ B 結合能の増強は抑制された。

4. セファランチンが I κ B- α 蛋白分解と I κ B- α mRNA の発現に及ぼす影響

セファランチンの TNF- α によって誘導される NF- κ B 活性の抑制効果がどのような分子機構を介して行われるかを明らかにするために, まず NF- κ B の抑制因子の一つである I κ B- α 蛋白の発現につき Western blotting (図 6 a, b) と I κ B- α mRNA の発現を RT-PCR (図 6 c) を用いて解析を行った。その結果, TNF- α 単独で処理した場合, I κ B- α 蛋白は30分で完全に分解されているのに対し (図 6 a), セファランチンにて24時間前処理後, TNF- α とセファランチンにて処理した場合, I κ B- α 蛋白の分解は抑制された (図 6 b)。次いで, セファランチンによる I κ B- α 蛋白の分解の抑制が, I κ B- α mRNA の分解抑制を介しているか検討するために, RT-PCR 法により解析を行った (図 6 c)。その結果, セファランチンでの前処理は I κ B- α mRNA の発現に影響を与えないことが分かった。すなわち, セファランチンは TNF- α によって誘導される I κ B- α 蛋白の分解を抑制することにより, NF- κ B 活性を抑制していることが示唆された。以上の *in vitro* の結果より, 唾液腺腺房細胞においてセファランチンは TNF- α によって誘導される NF- κ B 活性の抑制を介して MMP-9 産生を抑制することにより, 腺房細胞周囲の基底膜の破壊を阻止する可能性が示唆された。

5. シェーグレン症候群疾患モデルマウスへのセファランチン投与による治療効果

3d-Tx NFS/*sld* マウスを用いてセファランチンが *in vivo* において, ヒトシェーグレン症候群に類似した疾患を呈する唾液腺, 涙腺組織にどのような影響を及ぼすかを調べたところ, セファランチン未処置マウスにおける

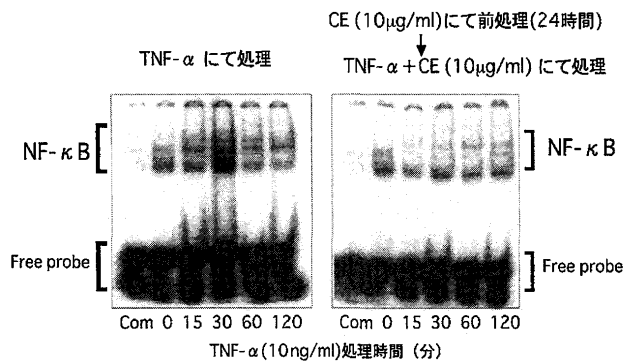


図 5 TNF- α によって誘導される NF- κ B 活性のセファランチン (CE) による抑制
(左) TNF- α (10 ng/ml) 単独で処理, (右) CE (10 μ g/ml) にて24時間前処理後, TNF- α (10 ng/ml) と CE (10 μ g/ml) にて処理。腺房細胞を TNF- α で処理することにより, 30分後に NF- κ B 活性は増強したが, CE にて24時間前処理後, TNF- α と CE で処理した場合には NF- κ B 活性の増強は認められなかった。Com: 過剰の非標識 κ B プローブを用いることにより本反応の特異性

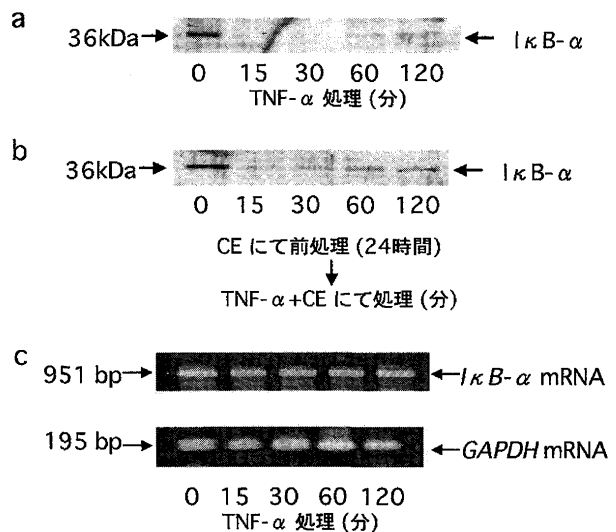


図 6 セファランチン (CE) が I κ B- α 蛋白分解と I κ B- α mRNA に及ぼす影響
NF- κ B の抑制因子の一つである I κ B- α 蛋白分解の CE による影響を Western blotting にて解析した。(a) TNF- α (10 ng/ml) 単独で処理, (b) CE (10 μ g/ml) にて24時間前処理後, TNF- α (10 ng/ml) と CE (10 μ g/ml) にて処理。a では I κ B- α 蛋白は30分で完全に分解されているのに対し, b では I κ B- α 蛋白分解は部分的に抑制されていた。また, CE が TNF- α による I κ B- α mRNA の発現に及ぼす影響について RT-PCR 法により解析した。(c) CE (10 μ g/ml) にて24時間前処理後, TNF- α (10 ng/ml) と CE (10 μ g/ml) にて処理。CE にて前処理を行っても I κ B- α mRNA の発現にはほとんど影響がなかった。なお, 内部コントロールとして GAPDH mRNA を用いた。

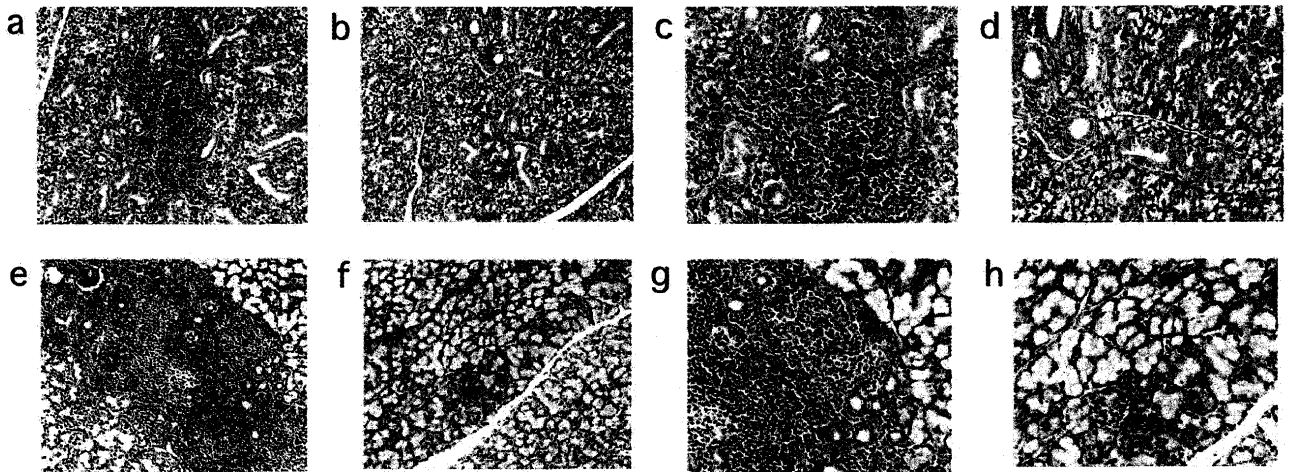


図7 SS疾患モデルマウスへのセファランチン (CE) 投与による治療効果

CE 未処置マウスにおける顎下腺の HE 染色像 (a: 倍率100倍, c: 倍率200倍) においては, 著しい炎症性変化が認められたが, CE (100 μ g) 投与マウスの顎下腺 (b: 倍率100倍, d: 倍率200倍) においては, a と c でみられた炎症性細胞浸潤は, ほとんど認められなかった。涙腺組織においても同様に, CE 未処置マウスの HE 染色像 (e: 倍率100倍, g: 倍率200倍) においては, 著しい炎症性変化が認められたが, CE (100 μ g) 投与マウス (f: 倍率100倍, h: 倍率200倍) においては, CE 投与による炎症性病変の改善が認められた。

顎下腺 (図7a, c) と涙腺 (図7e, g) の組織像においては, 著しい炎症性細胞浸潤やその浸潤巣による腺実質の破壊および導管の拡張などの炎症性変化が認められたが, 100 μ g のセファランチン投与マウスの顎下腺 (図7b, d) と涙腺 (図7f, h) においては, 未処置マウスでみられた炎症性細胞浸潤やその浸潤巣による腺実質の破壊の程度は減少していた。他の唾液腺組織 (耳下腺と舌下腺) においても同様に, セファランチン投与により炎症性病変の改善が認められた。唾液腺および涙腺における炎症性病変を組織学的に評価するために White らの分類⁵⁰⁾ を用いて検討を行った。その結果, 図8において示すように唾液腺および涙腺のいずれの臓器においても, 未処置マウスと比較しセファランチン100 μ g 投与したマウスでは有意に低値を示しており, 唾液腺および涙腺の炎症性変化が有意に ($p < 0.05$) 抑制されることが示された。なお, セファランチン10 μ g を投与したマウスでは, 涙腺組織において炎症性変化が有意に抑制された ($p < 0.05$) が, 涙腺組織以外の臓器においては有意な差は認められなかった。

6. 唾液腺と涙腺組織におけるリン酸化 I κ B- α , MMP-9 および IV 型コラーゲンの発現および局在

セファランチン未処置と処置マウスにおけるリン酸化 I κ B- α , MMP-9 および IV 型コラーゲンの発現および局在を免疫組織化学的染色法を用いて解析したところ, セファランチン未処置マウスの涙腺組織では炎症性細胞浸潤の近傍に存在する腺房細胞の細胞質にリン酸化 I κ B- α の発現が強く認められた (図9a, c)。一方, 100 μ g の

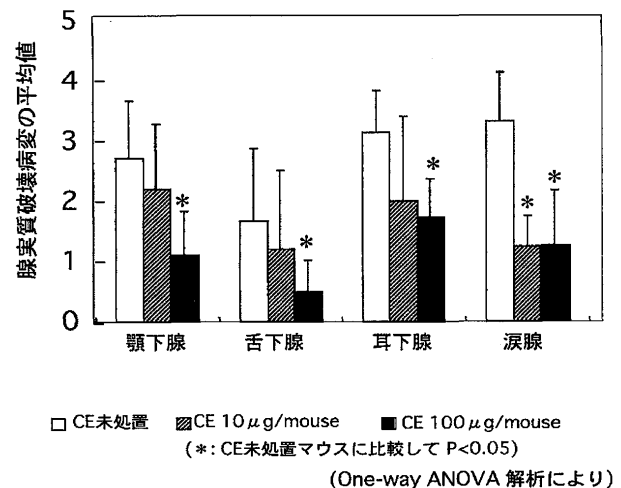


図8 White らの分類による唾液腺および涙腺における炎症性病変の組織学的評価

いずれの臓器においても, CE 未処置マウスと比較して, CE (100 μ g) を投与したマウスでは, 有意に低値を示しており, 唾液腺および涙腺の炎症性変化が抑制されていることが示された。CE (10 μ g) を投与したマウスにおいては, 炎症性変化が抑制されていたが, 涙腺以外の臓器においては有意な差は認められなかった。

セファランチン投与マウスにおいては, セファランチン未処置マウスにみられる腺房細胞内のリン酸化 I κ B- α の発現は減弱していた (図9b, d)。これらの染色像は唾液腺組織においても同様に観察された。MMP-9 の発現においても (図9e, f, g, h), セファランチン未処

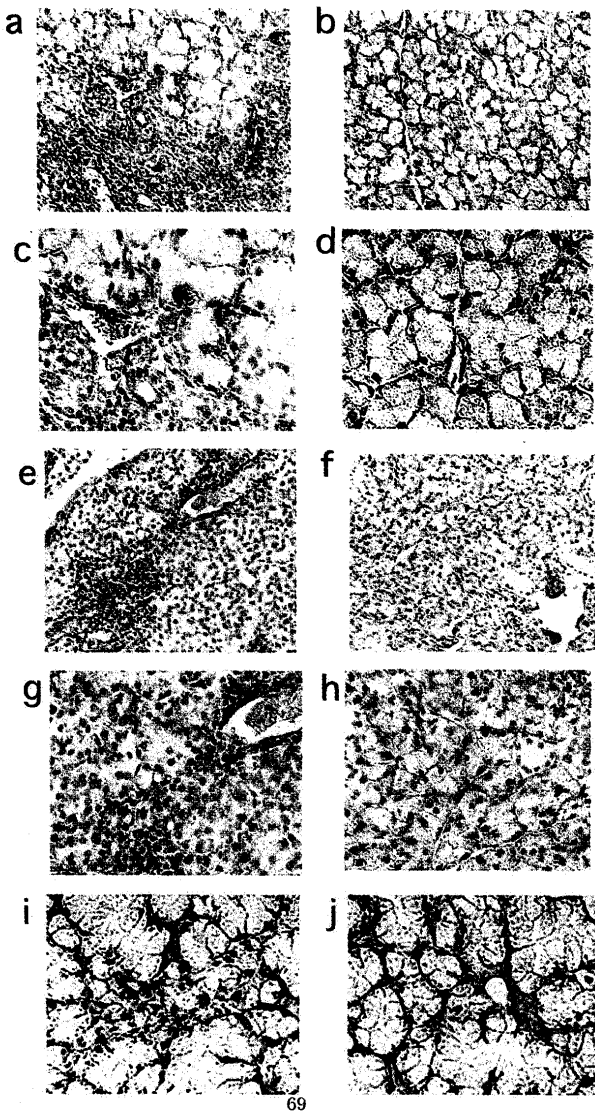


図9 唾液腺, 涙腺組織におけるリン酸化 IκB-α と MMP-9 および IV 型コラーゲンの発現および局在
a, b, c, d は涙腺組織におけるリン酸化 IκB-α の染色像を示す。CE 未処置マウス (a: 倍率100倍, b: 倍率200倍) では炎症性細胞浸潤の近傍に存在する腺房細胞の細胞質にリン酸化 IκB-α の発現が強く認められた。CE100μg 投与マウス (c: 倍率100倍, d: 倍率200倍) においては, 腺房細胞内でのリン酸化 IκB-α は検出されなかった。e, f, g, h は顎下腺における MMP-9 の発現を示す。CE 未処置マウス (e: 倍率100倍, f: 倍率200倍) においては, 炎症性細胞浸潤の近傍に存在する腺房細胞に MMP-9 の発現が認められた。CE100μg 投与マウス (g: 倍率100倍, h: 倍率200倍) においては, 腺房細胞の MMP-9 の染色像はほとんど認められなかった。i, j は涙腺組織における IV 型コラーゲンの染色像 (倍率400倍) を示す。CE 未処置マウス (i) においては, 炎症性細胞浸潤の認められる近傍の腺房細胞において, IV 型コラーゲンの染色の断裂が認められたが, CE100μg 投与マウス (j) においては, IV 型コラーゲンの連続性を示す染色像が認められた。

置マウスの涙腺においては炎症性細胞浸潤の近傍に存在する腺房細胞の周囲に MMP-9 の発現の局在が認められた (図 9 e, g)。しかし 100 μg のセファランチン投与マウスでは, MMP-9 の染色像は減弱していた (図 9 f, h)。この染色像は唾液腺組織においても同様の結果を示していた。さらに, 涙腺組織における基底膜成分の一つである IV 型コラーゲンの染色像はセファランチン未処置マウスにおいては炎症性細胞浸潤の認められる近傍の腺房細胞において, IV 型コラーゲンの染色の断裂が認められた (図 9 i) が, 100 μg 投与マウスにおいては, IV 型コラーゲンの連続性を示す染色像が認められた (図 9 j)。これらの所見は, 唾液腺組織においても同様に認められた。以上の免疫組織化学的検索結果より, セファランチンは未処置マウスにおいて認められた炎症性細胞浸潤近傍の腺房細胞における IκB-α のリン酸化の亢進と MMP-9 の発現増強および IV 型コラーゲンの断裂を阻止することが示された。

7. 唾液腺及び涙腺組織におけるアポトーシス細胞の検索

セファランチン処置と未処置マウスの唾液腺及び涙腺組織において, TUNEL 法によるアポトーシス細胞の検出につき解析を行った。その結果, 唾液腺及び涙腺組織のいずれの臓器においても, 未処置マウス (図 10a; 褐色の核染色がアポトーシス細胞を示す) と比較して, 投与マウス (図 10b) ではアポトーシスの抑制が認められた。この結果を数値的に解析したところ, 図 10c において示すように, 顎下腺, 舌下腺, 耳下腺, 涙腺の各組織におけるアポトーシス細胞はセファランチンを投与することにより有意に ($p < 0.05$) 抑制された。

8. NS-SV-AC 細胞と NS-SV-DC 細胞における AQP5 の発現

唾液腺導管上皮細胞 NS-SV-DC と腺房細胞 NS-SV-AC において AQP3 と AQP5 の発現を RT-PCR 法にて検索した (図 11)。その結果, AQP5 mRNA の発現は NS-SV-AC 細胞においては認められたが, NS-SV-DC 細胞にはその

発現は認められなかった。なお、*AQP3* mRNA の発現は NS-SV-AC 細胞と NS-SV-DC 細胞の両方に認められた。

9. 5-aza-2'-deoxycytidine (デシタビン) 処理による NS-SV-DC における *AQP5* の発現誘導

AQP5 mRNA が発現していなかった NS-SV-DC 細胞を DNA 脱メチル化を誘導するデシタビンにて処理することにより、*AQP5* の発現を誘導することが可能か否かにつき検討を行った。これに先立ち、デシタビン処理を行うための至適濃度を決定するために、デシタビンが NS-SV-DC 細胞の細胞増殖に及ぼす影響を MTT assay にて検索した (図12)。その結果、デシタビン未処理細胞と比較して、デシタビンにて処理した細胞はいずれの濃度、処理時間においても有意な細胞増殖抑制効果は認められなかった。この MTT assay の結果より、以後の実験においては NS-SV-DC 細胞を処理する場合の濃度を $2 \mu\text{M}$ とした。次にデシタビンによる NS-SV-DC 細胞での *AQP5* mRNA の発現誘導につき検索した。すなわち、NS-SV-DC 細胞を $2 \mu\text{M}$ デシタビンにて処理し、*AQP5* mRNA の発現を RT-PCR 法にて解析を行った。その結果、デシタビン未処理 NS-SV-DC 細胞において認められなかった *AQP5* mRNA の発現は処理開始後48時間より認められるようになり、120時間まで発現は持続した (図13)。さらに、デシタビンによる *AQP5* mRNA の発現量を定量的に測定するため、Real-time RT-PCR を行った。デシタビン未処理細胞においては、*AQP5* mRNA の発現はほとんど検出されなかったが、デシタビン処理により *AQP5* mRNA の発現は経時的に上昇した。ヒト唾液腺組織での発現を100%とした場合、処理後48時間で3.75%、72時間で8.75%、96時間で8.5%、120時間で21%に上昇した (図14)。よって、*AQP5* mRNA の発現が認められなかった NS-SV-DC 細胞において、デシタビンが *AQP5* mRNA の発現を誘導することが明らかになった。次に、NS-SV-DC 細胞における *AQP5* 蛋白の発現を Western blotting にて調べたところ、デシタビン未処理 NS-SV-DC 細胞においては認められなかった *AQP5* 蛋白の発現は、デシタビン処理により経時的に発現誘導が認められた (図15)。デシタビン処理により誘導された *AQP5* 蛋白の局在を調べるために、間接蛍光抗体法によって染色し、共焦点レーザー顕微鏡にて観察を行った。デシタビン未処理 NS-SV-DC 細胞においては *AQP5* の発現は認められなかったが (図16a)、デシタビンにて72時間処理した NS-SV-DC 細胞においては、*AQP5* の発現が検出された (図16b)。共焦点レーザー顕微鏡による解析では *AQP5* は細胞の基底側以外の細胞膜に発現していることが確認された (図16c)。

10. デシタビン処理による水分量の増加

NS-SV-DC 細胞においてデシタビン処理により発現誘導の認められた *AQP5* 蛋白が水輸送の機能を有している

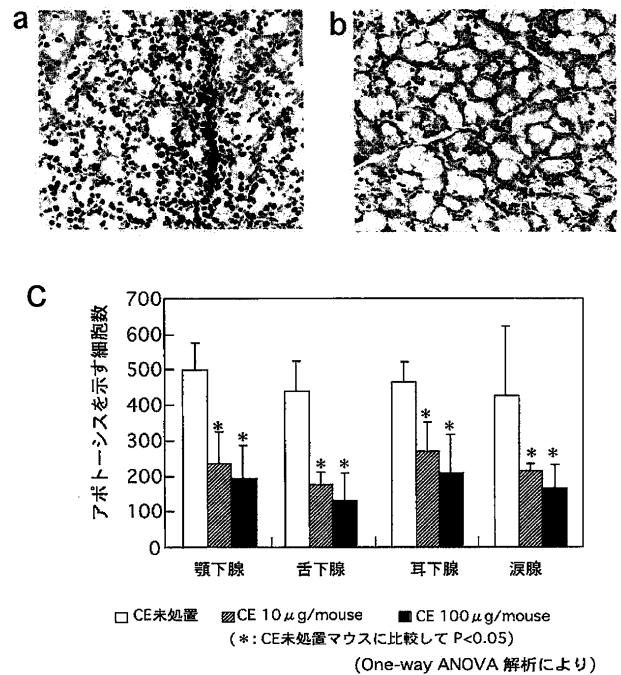


図10 唾液腺組織と涙腺組織におけるアポトーシスの検出
a と b は涙腺組織における TUNEL 法によるアポトーシス細胞の染色像を示す。a : CE 未処置マウス (褐色の核染色がアポトーシス細胞を示す)、b : CE 100 μg 投与マウス。c はアポトーシス細胞をカウントした結果を示す。いずれの臓器においても、CE 未処置マウスと比較して、CE 10 μg および100 μg を投与したマウスでは、有意にアポトーシスの抑制が認められた。

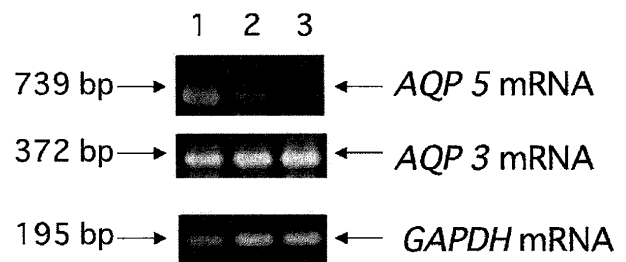


図11 腺房細胞 (NS-SV-AC) と導管細胞 (NS-SV-DC) における *AQP5* の発現
NS-SV-AC 細胞と NS-SV-DC 細胞における *AQP5* mRNA の発現を RT-PCR により検索した。レーン 1 : 陽性対照として用いた正常ヒト唾液腺組織, レーン 2 : NS-SV-AC 細胞, レーン 3 : NS-SV-DC 細胞。*AQP5* mRNA の発現は、レーン 1 とレーン 2 においては認められたが、レーン 3 においては認められなかった。*AQP3* mRNA の発現はレーン 2 とレーン 3 の両方に認められた。なお、内部コントロールとして *GAPDH* mRNA を用いた。

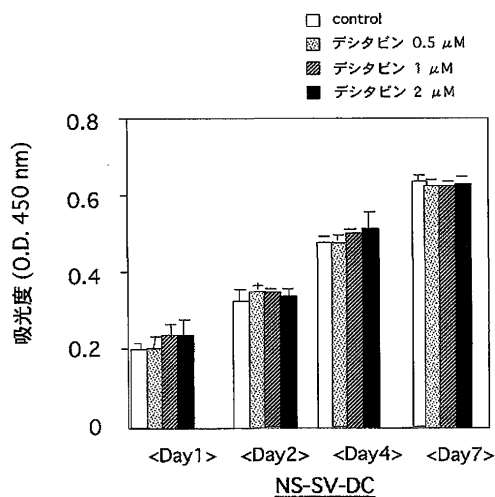


図12 デシタピンのNS-SV-DC細胞の増殖に及ぼす影響
デシタピンの細胞増殖に及ぼす影響をMTT assay
にて検索した。デシタピン未処理細胞と処理細胞
を比較して、有意な細胞増殖への影響は認められ
なかった。

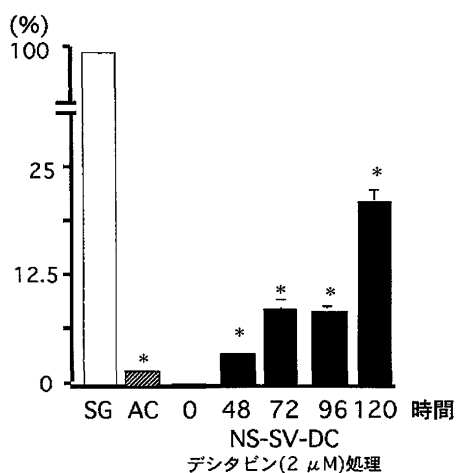


図14 Real-time RT-PCRによるNS-SV-DC細胞における
AQP5 mRNAの発現誘導
AQP5 mRNAの発現量を定量的に測定するため、
Real-time RT-PCRを行った。各発現量の表示は、
正常ヒト唾液腺組織における発現量を100とし
て表示した。デシタピン未処理細胞においては、
AQP5 mRNAの発現は検出されなかったが、デ
シタピン処理により*AQP5* mRNAの発現は経時
的に上昇し、処理後48時間で3.75%、72時間
で8.75%、96時間で8.5%、120時間で21%に
上昇した。

か否かにつき解析するため、水分分泌量の測定を行った。
その結果、デシタピン未処理NS-SV-DC細胞におい
ては、 1 cm^2 あたり $3.8\ \mu\text{l}$ の水が1時間で細胞内から流出
したが、デシタピンにて72時間処理したNS-SV-DC細胞
においては、 1 cm^2 あたり $7.0\ \mu\text{l}$ の水が1時間で細胞

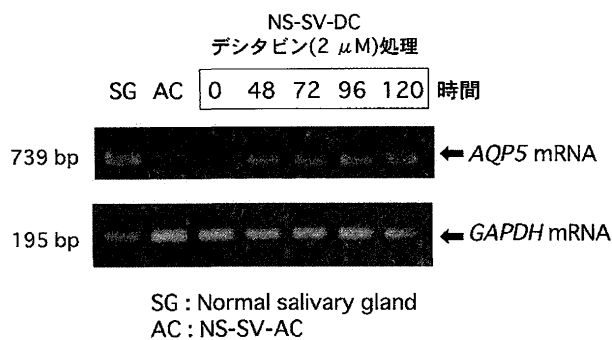


図13 デシタピン処理によるNS-SV-DC細胞における
AQP5 mRNAの発現誘導の検索
デシタピン処理による*AQP5* mRNAの発現誘導
をRT-PCRにて解析した。SG:正常ヒト唾液腺
組織, AC:NS-SV-AC細胞。デシタピン未処理
NS-SV-DC細胞において認められなかった*AQP5*
mRNAの発現は処理開始後48時間より認められ
るようになり、検索をおこなった120時間まで発
現は持続した。

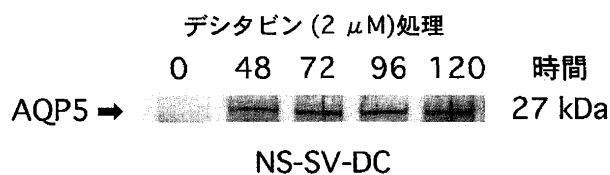


図15 デシタピン処理によるNS-SV-DC細胞における
AQP5蛋白の発現
Western blottingにてデシタピン処理によるAQP5
蛋白の発現につき解析した。デシタピン未処理
NS-SV-DC細胞ではAQP5蛋白の発現は認められ
なかったが、デシタピン処理によりAQP5蛋白の
発現誘導が認められるようになった。

内から流出し、有意に分泌量の増加が認められた ($p < 0.05$, 図17)。これらの結果より、デシタピン処理によ
り発現誘導されたAQP5は実際に水分分泌に関与している
可能性が示唆された。

11. *AQP5* 遺伝子プロモーター領域の転写因子結合部位 メチル化の検索

デシタピン処理にて誘導された*AQP5*の遺伝子発現誘
導機構を解析するため、*AQP5*遺伝子プロモーター領域
内での発現調節機構につき解析した。図18において示す
ように、*AQP5*遺伝子の転写開始領域より上流-406 bp
までの塩基配列中には43個のCpG-ジヌクレオチドが存
在しており、この領域には3個のSp1結合領域と1個
のAP-2結合領域が存在している。1番目のSp1結合領
域に1番目のCpGが、2番目のSp1結合領域に23番目

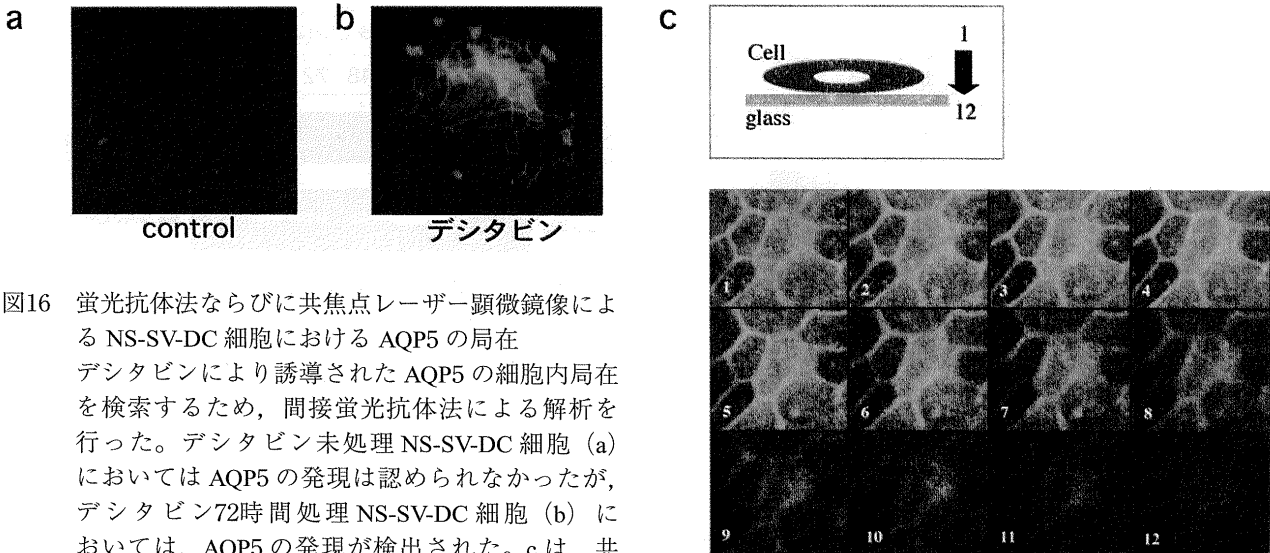


図16 蛍光抗体法ならびに共焦点レーザー顕微鏡像によるNS-SV-DC細胞におけるAQP5の局在
 デシタピンにより誘導されたAQP5の細胞内局在を検索するため、間接蛍光抗体法による解析を行った。デシタピン未処理NS-SV-DC細胞(a)においてはAQP5の発現は認められなかったが、デシタピン72時間処理NS-SV-DC細胞(b)においては、AQP5の発現が検出された。cは、共焦点レーザー顕微鏡による解析結果を示す。1から12の番号で示す各写真は、細胞の分泌側から0.7μmごとの深さでの顕微鏡像を示している。AQP5は細胞の基底側以外の細胞膜に発現していることが確認された。

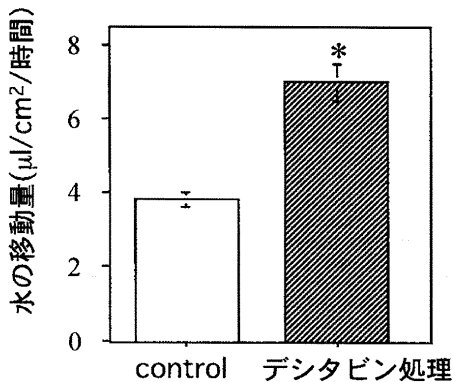
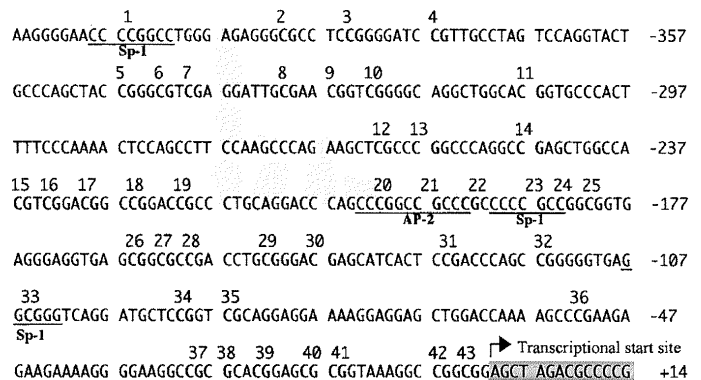


図17 デシタピン処理によるNS-SV-DC細胞からの水分量の増加
 デシタピン処理により発現誘導の認められたAQP5が水分分泌能を有しているか否かにつき解析するため、浸透圧勾配法を用いて水分分泌量を測定した。デシタピン未処理NS-SV-DC細胞においては、1cm²あたり3.8μlの水が1時間で移動したが、デシタピン72時間処理NS-SV-DC細胞においては、7.0μlの水が1時間で移動した。*未処理対照に比較して有意(p<0.05)に増強した。



<数字はCGの順序を示す>

図18 AQP5遺伝子プロモーター領域内のCpGアイランドでのメチル化の検索
 AQP5遺伝子の転写開始領域より上流-406bpまでの塩基配列とCpG部位および転写因子結合部を示している。転写開始点の上流-406塩基の間に43個のCpG-ジヌクレオチドが存在し、この領域には3個のSp1結合領域と1個のAP-2結合領域が存在する。1番目のSp1結合領域に1番目のCpGが存在し、2番目のSp1結合領域に23番目と24番目のCpGが存在し、3番目のSp1結合領域に33番目のCpGが存在する。AP-2結合領域には、20番目と21番目そして22番目のCpGが存在する。

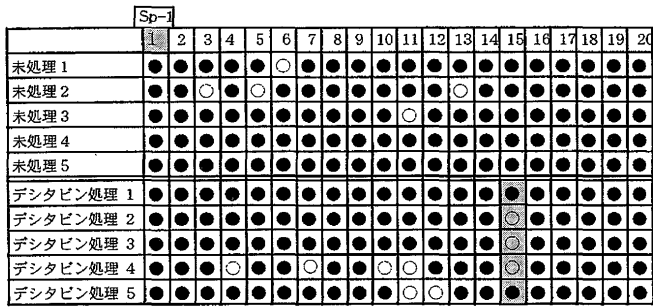


図19 デシタピン処理による CpG アイランドの脱メチル化部位の検索
ビスルファイト・シーケンス法により、CpG アイランドの脱メチル化部位を検索した結果を示す。2番目の Sp1 結合部位に存在する24番目の CpG と 3番目の Sp1 結合部位近傍の31番目の CpG および15番目の CpG に脱メチル化が高頻度に観察された。

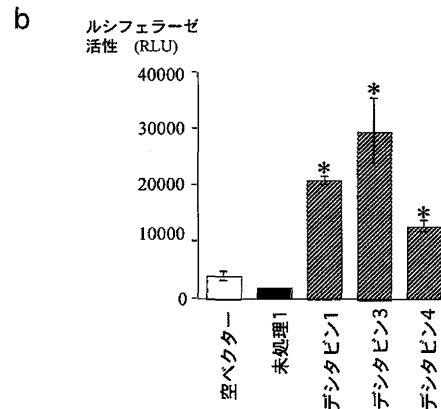
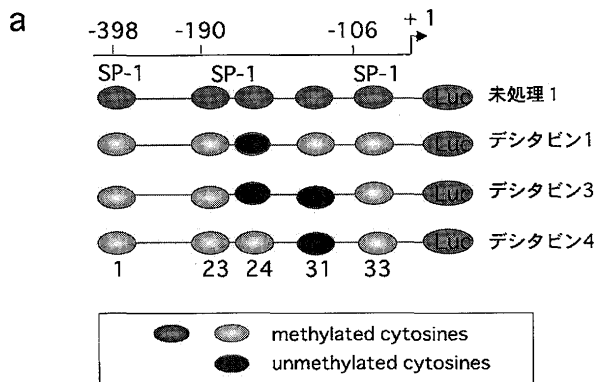
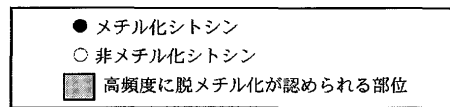
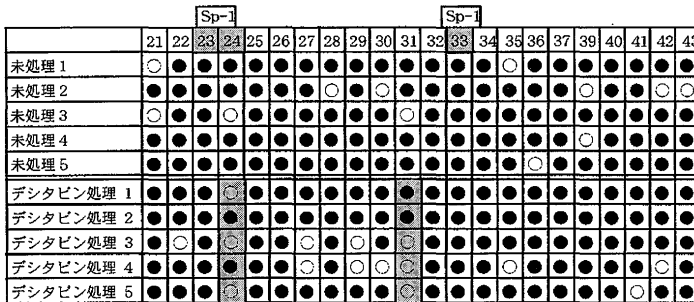


図20 ルシフェラーゼ アッセイによる転写活性の測定
ルシフェラーゼ アッセイにて、どの CpG の脱メチル化が AQP5 遺伝子の発現に深く関与しているかを検索した。a は作製した 4 種類のベクターの模式図を示す。未処理 1 : 24番目と31番目の CpG が両方ともメチル化されたもの、デシタピン 1 : 24番目の CpG が脱メチル化されたもの、デシタピン 3 : 24番目と31番目の CpG が両方とも脱メチル化されたもの、デシタピン 4 : 31番目の CpG が脱メチル化されたもの。b は、それぞれのベクターのルシフェラーゼ活性を示す。ルシフェラーゼ活性は、デシタピン 3、デシタピン 1、デシタピン 4 の順に高かった。

と24番目の CpG が、また 3番目の Sp1 結合領域に33番目の CpG が存在する。さらに AP-2 結合領域には、20番目と21番目、22番目の CpG が存在する。デシタピンは DNA 脱メチル化剤であり、メチル化シトシンを脱メチル化する。そこで、CpG-ジヌクレオチドの脱メチル化による AQP5 の発現誘導が起きているかどうか調べるために、ビスルファイト・シーケンス法による CpG アイランドの脱メチル化部位を検索した (図19)。その結果、2番目の Sp1 結合部位に存在する24番目の CpG と 3番目の Sp1 結合部位近傍の31番目の CpG および15番目の CpG に脱メチル化が高頻度に認められた。なお、

15番目の CpG については転写因子結合部位から離れているため、今回は解析の対象としなかった。そこで、24番目と31番目の CpG の脱メチル化に注目し、どの CpG の脱メチル化が AQP5 遺伝子の発現に深く関与しているかを調べるためルシフェラーゼアッセイを行った。すなわち、4種類のプロモーター領域の配列を含むベクターを作製し比較検討した (図20a)。未処理 1 は、24番目と31番目の CpG が両方ともメチル化されたプロモーター配列、デシタピン 1 は24番目の CpG が脱メチル化されたプロモーター配列、デシタピン 3 は24番目と31番目の CpG が両方とも脱メチル化されたプロモーター配列、

デシタピン4は31番目の CpG が脱メチル化されたプロモーター配列である。上記のベクターを NS-SV-DC 細胞にトランスフェクションすることにより得られたルシフェラーゼ活性は、24番目と31番目の CpG が両方とも脱メチル化されたデシタピン3が一番高く、ついで24番目の CpG が脱メチル化されたデシタピン1、31番目の CpG が脱メチル化されたデシタピン4の順であった (図 20b)。したがって、以上の結果より AQP5 プロモーター領域に存在する CpG のうち上流から24番目と31番目の両 CpG の脱メチル化が、AQP5 の遺伝子発現誘導に深く関与している可能性が示唆された。

考 察

SS における唾液腺病変および涙腺病変は、病理組織学的に炎症性細胞浸潤と腺房構造の破壊および導管構造の残存によって特徴づけられるが、本疾患の発症・進展に関する正確な分子機構は明らかにされていない。従来より我々は、SS 唾液腺における腺房構造破壊の分子機構に注目し、以下のような作業仮説を想定して研究を行ってきた。すなわち、SS 患者の唾液腺では浸潤した炎症性細胞から分泌された TNF- α が腺房細胞においてのみ NF- κ B 活性の増強を介して基底膜の分解に関与する MMP-9 の産生を誘導し、この結果腺房細胞-基底膜相互関係が消失して腺房細胞はアポトーシスの一種であるアノイクスに陥り、腺房構造破壊がおこるといものである。そしてこの作業仮説に沿って現在までに我々は、SS 唾液腺組織において炎症性細胞浸潤近傍の腺房細胞においては MMP-9 と NF- κ B の構成分子の一つである p65 の発現が、炎症性細胞浸潤から離れた腺房細胞や正常唾液腺における腺房細胞に比較して著しく増強していることを報告した³⁷⁾。さらに我々は、腺房細胞株である NS-SV-AC 細胞を基底膜成分の一つである IV 型コラーゲンにて裏装された培養皿上で TNF- α とプラスミン共存下で培養した時、NS-SV-AC 細胞は基質から遊離しアポトーシス (アノイクス) をおこしたが、NF- κ B の構成的抑制因子である変異型 I κ B- α cDNA を遺伝子導入した NS-SV-AC 細胞においては、上記と同じ条件下において培養してもアポトーシス (アノイクス) をおこさず良好な増殖様式を示した³⁷⁾。この基底膜と細胞との接触による相互関係の維持は細胞の生存において重要な因子であり、このことは本唾液腺細胞においてのみならず、正常血管内皮細胞や前立腺癌細胞においても報告されている^{53, 54)}。したがって、上記の実験結果より、SS 患者唾液腺における腺房構造破壊において MMP-9 は原因因子の一つであることが示唆されるとともに、腺房細胞において MMP-9 誘導の抑制は SS 唾液腺病変や涙腺病変の改善にとって治療的戦略と成り得る可能性が推察される。このような所見に基づいて我々は最近、*in vitro* において NS-SV-AC 細胞をセファランチンにて処理した後、IV 型コラーゲンにて裏装された培養皿上で TNF- α

とプラスミン、セファランチン共存下で培養した時、セファランチンが TNF- α によって活性化される NF- κ B 活性を抑制する結果、MMP-9 産生を低下させることにより NS-SV-AC 細胞は良好な形態を維持し生存することを報告した⁵⁵⁾。そこで本研究においては、このセファランチンの SS に対する治療的有効性をより深く理解するために、ヒト SS に対するモデルマウスを用いて、本マウスの唾液腺と涙腺組織での腺房構造破壊に対するセファランチンの治療効果につき解析した。その結果、セファランチンは SS モデルマウスにおいて腺房細胞のアポトーシスを抑制することにより、腺房構造の破壊を阻止することを明らかにした。

多くの疾患において新規治療法を開発するためには、ヒトと類似した疾患を発症する好適な疾患モデル動物の樹立が要求される。ヒト SS に対する本マウスモデルシステムは NFS/*std* ミュータントマウスを生後3日目に胸腺摘出し、以後何ら免疫的操作をすることなく樹立することが可能なシステムである⁴⁹⁾。本モデルマウスは例外なく唾液腺と涙腺組織に限って自然発症型自己免疫病変を発症する特徴を有し、これら病変は最初4週齢から出現し、そして加齢に伴い徐々に症状の悪化をみる特性を有する。したがって、本マウスモデルシステムは SS 患者に対する治療薬の効果を検証する上で非常に有用であると考えられる。

SS 唾液腺病変や涙腺病変の発症に包含されている分子機構に関する我々の作業仮説と一致して、SS モデルマウス唾液腺組織と涙腺組織におけるリン酸化 I κ B- α と MMP-9 および IV 型コラーゲンに対する免疫組織化学的染色、さらにアポトーシスによる細胞死検出のための TUNEL 解析は、炎症性細胞浸潤近傍の腺房組織においておこっている連続的過程を明確に表現している。すなわち、唾液腺組織や涙腺組織に浸潤した炎症性細胞から分泌された TNF- α や IL-1 β などのサイトカインは腺房細胞において I κ B- α をリン酸化し、その後 NF- κ B に依存した MMP-9 遺伝子の活性化につながる。そして不活型として分泌された MMP-9 は生体内にユビキタスに存在する活性化因子であるプラスミンによって活性化され、活性型 MMP-9 は IV 型コラーゲンから成る基底膜を選択的に分解する。分解された IV 型コラーゲンとの接触を遮断された腺房細胞はアポトーシス (アノイクス) に陥り³⁷⁾、この結果腺房構造の破壊につながるという連続的過程である。したがって、サイトカインを介したシグナル伝達経路の阻止は SS 患者の唾液腺病変や涙腺病変の改善のために選択すべき確実な治療戦略となる可能性が示唆される。

セファランチンは *Stephania cephalantha Hayata* から抽出されたビスコクラウリン型アルカロイドであり、現在白血球減少症⁵⁶⁾ や鼻アレルギー⁵⁷⁾、蝮咬症⁵⁸⁾ 患者の治療薬として広く使用されている。セファランチンの正確な作用メカニズムは明らかにされていないが、ナチュ

ラルキラー細胞やマクロファージの殺細胞効果を増強させることにより免疫能修飾効果を発揮することから、セファランチンはサイトカインのシグナル伝導経路の制御に関わっている可能性が推察されている。以前の研究で、セファランチンが腺房細胞において TNF- α によって誘導される NF- κ B 活性の抑制を介して MMP-9 産生を低下させることを報告した⁵⁵⁾。しかしながら、未だセファランチンによって誘導される NF- κ B 活性の抑制に包含されている詳細なメカニズムは、セファランチンが I κ B- α 蛋白の分解を抑制すること以外には明らかにはされていないが、現在幾つかの可能性が示唆されている。これらのうち、I κ B kinase 活性の低下や I κ B- α や I κ B- β , I κ B- ϵ のユビキチン化の低下あるいはプロテアソームを介した I κ B- α や I κ B- β , I κ B- ϵ の分解の低下が重要と考えられてきた⁵⁹⁾。本実験において、唾液腺や涙腺での腺房細胞においてセファランチンが I κ B- α のリン酸化の抑制を示したことから、上記の説明は生体内でのセファランチンの作用分子機構を明らかにしている可能性が示唆される。

SS 唾液腺組織や涙腺組織の腺房構造破壊に対するサイトカインのシグナル伝達経路を標的とした治療法は、組織破壊の進行を阻止する上で非常に有意義な治療法であるが、本治療法単独では減少した唾液分泌を増加させることは困難である。すでに述べたように、SS 唾液腺組織および涙腺組織における病理組織学的特徴の一つとして、導管細胞の残存があげられる。そこで本研究において、SS 唾液腺や涙腺組織において残存あるいは増殖する導管細胞に水輸送膜蛋白である AQP5 を発現することにより水輸送能を獲得させる可能性につき解析した。そして、AQP5 を発現していない導管細胞株である NS-SV-DC 細胞を DNA 脱メチル化剤であるデシタピンにて処理することにより、AQP5 の発現誘導が可能であり、発現した AQP5 は水分分泌機能を有していることを明らかにした。

最近の研究より、SS 唾液腺組織において唾液分泌量の減少は、唾液腺組織の破壊の程度と分泌機能低下の程度との間に相関性が乏しいことから、炎症性細胞浸潤による腺破壊よりも唾液腺の機能的抑制に起因していることが報告されている⁶⁰⁾。確かに、炎症性細胞浸潤により引き起こされた腺房構造の消失は直接的に唾液分泌の減少につながるものが容易に理解されるが、炎症性細胞から分泌された TNF- α や IL-1 β などのサイトカインが、NF- κ B 活性を増強させることにより AQP5 発現を抑制させることも報告されている⁶¹⁾。したがって、このことは TNF- α や IL-1 β などのサイトカインは、炎症性細胞浸潤によって惹起される SS 唾液腺病変の進行において中心的役割を果たしていることを示唆している。さらに、抗サイトカイン療法は SS 唾液腺腺房細胞の AQP5 発現の維持のためにも有用な治療法である可能性が推察される。

現在までの研究結果より、ラット唾液腺においては AQP5 の細胞内局在は腺房細胞の分泌側の細胞膜と介在部導管細胞の近位部分に限局することが示されている^{25, 62-64)}。しかしながら、本研究においては AQP5 の発現は導管細胞株である NS-SV-DC 細胞には検出されず、腺房細胞株である NS-SV-AC 細胞においてのみ認められた。このことは、NS-SV-DC 細胞が遠位介在部あるいは線条部、排出部導管に由来していることを表現している可能性がある。最近、高解析度共焦点レーザー顕微鏡および量的画像解析法を用いた研究より、ヒト唾液腺組織においては AQP5 の発現が腺房細胞においてのみ認められている⁶⁵⁾。したがって、AQP5 の細胞内局在は種特異性である可能性が示唆される。

遺伝子プロモーター内でのメチル化と遺伝子発現抑制との強い相関性が広く認められている⁶⁶⁻⁶⁸⁾、このメチル化によって修飾される遺伝子の不活化分子機構については未だ明らかにされていない。遺伝子プロモーター内メチル化に起因した遺伝子転写活性の不活化に関する現在までに提起されている仮説のうち、遺伝子発現抑制は転写因子結合部位におけるメチル化が直接的な影響を発揮するという一つの仮説が本研究により得られた結果と合致するかもしれない。多くの哺乳類転写因子はそれらの DNA 認識部位において CG に富んだ結合部位を持っていることから、特定の転写因子の結合部位の CG で起こったメチル化は、DNA への転写因子の結合を立体的に抑制し転写の抑制につながる可能性がある⁶⁷⁾。たとえば、制限酵素 HpaII の切断部位 (CCGG) は転写因子 AP-2 が結合する部位に位置している。そして、AP-2 結合部位内に存在する HpaII 切断部位でのメチル化 (CC^mGG) は AP-2 の結合を抑制し、AP-2 によって制御されている遺伝子の転写を抑制することが C6 グリオーマ細胞や CV-1 細胞において報告されている⁶⁹⁾。転写因子の結合におよぼすメチル化のこの直接的効果は、cyclic AMP (cAMP)/cAMP-responsive element (TGACGTCA)⁷⁰⁾ やレチノブラストーマ結合因子 1 認識部位 (AGCTGCCGCGGGCGGAAGT)⁷¹⁾ に結合する他の転写因子においても同様に認められることが知られている。しかしながら一方で、転写因子 Sp1 が結合する Sp1 結合部位でのメチル化に関する報告においては未だ一致した見解は得られていない。たとえば、ある研究者は Sp1 結合部位でのメチル化は Sp1 の結合やそれによる遺伝子発現には何ら影響をおよぼすことがないと報告している^{71, 72)}、一方他の研究者は Sp1 結合部位でのメチル化は種々の程度で Sp1 の結合を阻害することを報告している^{73, 74)}。Sp1 結合部位でのメチル化による遺伝子発現制御に関する上記 2 つの見解のうち、我々の本研究結果は後者の見解と一致するものであった。すなわち、AQP5 遺伝子プロモーターにおける Sp1 結合部位でのメチル化 (24番目の CG) は AQP5 遺伝子の転写活性を部分的に抑制した。したがって、メチル化による遺伝子発

現抑制においてどちらの経路がメインに機能するかは細胞種や転写因子の種類、外部刺激の種類による可能性が示唆された⁷⁵⁾。

また、本研究においては *AQP5* 遺伝子プロモーター内における3番目の Sp1 結合部位近傍での脱メチル化 (31番目の CG) が *AQP5* 遺伝子の転写活性を有意に誘導することを明らかにした。この転写因子結合部位以外でのメチル化による遺伝子発現抑制に関してのメカニズムは明らかではないが、同様の実験結果が最近他の研究者から報告されている。すなわち、ラット白血病細胞株の *cyclin D* 遺伝子の5'末端側は *cyclin D* 遺伝子プロモーター内において連続する2つの Sp1 結合部位の近傍での CG においてメチル化が認められている。そしてこのプロモーター内での2つの Sp1 結合部位外でのメチル化は有意に *cyclin D* 遺伝子の発現を抑制することが報告されている⁷⁶⁾。この研究は間接的ではあるが、Sp1 結合部位以外での CG のメチル化が遺伝子発現の抑制において重要な役割を担っているかもしれないことを示している。さらに、Sp1 結合部位以外での CG におけるメチル化は p21^{Cip} 遺伝子プロモーターにおいて Sp1 の結合阻害と遺伝子発現抑制につながることを EMSA を用いた実験により直接的に証明されている⁷⁵⁾。したがって、転写因子認識部位の周辺でのメチル化は、転写因子の DNA への結合に対して影響をおよぼし、またこの部位でのメチル化の抑制は対応する遺伝子の再発現と相関性を有する可能性が示唆された。

結論として、本研究において我々は大きく2つの研究結果を明らかにした。すなわち、1番目として、ヒト SS モデルマウスである 3d-Tx NFS/*sld* マウスの唾液腺と涙腺における腺房細胞においてはリン酸化 IκB-α と MMP-9 両者の発現増強と IV 型コラーゲン連続性の欠損がみられ、この結果腺房細胞はアポトーシス (アノイキス) に陥ることである。また、3d-Tx NFS/*sld* マウスをセファランチンにて処置した場合、唾液腺と涙腺組織における腺房細胞はリン酸化 IκB-α と MMP-9 両者の著しい発現低下と IV 型コラーゲン連続性の維持がみられ、このため腺房構造破壊の阻止につながったということである。したがって、本研究結果よりセファランチンは SS 唾液腺組織と涙腺組織における腺房構造破壊の発症と進展を克服するための有効な治療薬に成り得る可能性が示唆された。そして2番目として、DNA 脱メチル化剤である 5-aza-2'-deoxycytidine (デシタピン) にて導管細胞株である NS-SV-DC 細胞を処理することにより、水分泌機能を有する膜蛋白である AQP5 の発現誘導が可能となり、NS-SV-DC 細胞は水分泌機能を獲得したことである。また NS-SV-DC 細胞におけるこの機能発現には、*AQP5* 遺伝子プロモーター内における2ヶ所の CG での脱メチル化が重要であることを示したことである。なお、本結果は NS-SV-DC 細胞が生理的外分泌機能を保持していることへの明らかな証明には欠けるかもしれない

が、本研究から得られた多くの結果は導管細胞としての表現形質を有する細胞に機能的な水輸送チャンネルを発現させ、水分泌能を付与させることが可能であることを示唆している。よって、SS 唾液腺や涙腺へのデシタピンの投与は、生存あるいは増殖している導管細胞に促進的な水輸送機能を付与するための有効な手段に成り得るものと考えられる。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究課題を与えられ御指導を賜った佐藤光信教授、本研究の実施に際し終始変わらぬ御指導を戴いた口腔外科学第二講座 東 雅之講師、口腔病理学講座 石丸直澄助教授に心から謝意を表します。また、御校閲を戴いた口腔病理学講座 林 良夫教授、口腔生化学講座 野間隆文教授、ならびに研究の円滑な発展のために特別の御配慮を戴いた口腔外科学第二講座の教室員の方々に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Alspaugh MA, Whaley WW, Wohl MJ and Bunin JJ: Sjögren, s syndrome. In: Kelley WN, Harris ED Jr., Ruddy S, Sledge CB, editors. Textbook of rheumatology. Philadelphia: WB Saunders, 971-999 (1981)
- 2) Danel TE: Labial salivary gland biopsy in Sjögren's syndrome: assesment as a diagnostic criterion in 362 suspected cases. Arthritis Rheum 27, 147-156 (1984)
- 3) Rosai J: Major and minor salivary glands. In: Rosai j, editor. Ackerman's surgical pathology. New York: Mosby-Year Book, 815-818 (1996)
- 4) Hamano H, Saito I, Haneji N, Mitsuhashi Y, Miyasaka N and Hayashi Y: Expressions of cytokine genes during development of autoimmune sialadenitis in MRL/lpr mice. Eur J Immunol 23, 2387-2391 (1993)
- 5) Fox RI, Kang HI, Ando D, Abrams J and Pisa E: Cytokine mRNA expression in salivary grand biopsies of Sjögren's syndrome. J Immunol 152, 5532-5539 (1994)
- 6) Dayer JM, Beutler B and Cerami A: Cachectin/tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells and dermal fibroblasts. J Exp Med 162, 2163-2168 (1985)
- 7) Goldring MB, Birkhead JR, Suen LF, Yamin R, Mizuno S, Glowacki J, Arbiser JL and Apperley JF: Interleukin-1 beta-modulated gene expression in immortalized human chondrocytes. J Clin Invert 94, 2307-2316 (1994)
- 8) Kontinen YT, Kangaspunta P, Lindy O, Takagi M, Sorsa T, Segerberg M, Tschesche H and Eisen AZ: Collagenase in Sjögren's syndrome. Ann Rhuem Dis 53, 836-839 (1994)
- 9) Hanemaaijer R, Visser H, Kontinen YT, Koolwijk P and Verheijen JH: A novel and simple immunocapture assay

- for determination of gelatinase-B (MMP-9) activities in biological fluids: saliva from patients with Sjögren's syndrome contain increased latent and active gelatinase-B levels. *Matrix Biol* 17, 657-665 (1998)
- 10) Okada Y, Tsuchiya H, Shimizu H, Tomita K, Nakanishi I, Sato H, Seiki M, Yamashita K and Hayakawa T: Induction and stimulation of 92-kDa gelatinase/type IV collagenase production in osteosarcoma and fibrosarcoma cell lines by tumor necrosis factor alpha. *Biochem Biophys Res Commun* 171, 610-617 (1990)
 - 11) Sato H and Seiki M: Regulatory mechanism of 92 kDa type IV collagenase gene expression which is associated with invasiveness of tumor cells. *Oncogene* 8, 395-405 (1993)
 - 12) Sen R and Baltimore D: Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 46, 705-716 (1986)
 - 13) Begg AA and Baldwin AS Jr.: The I κ B proteins: multifunctional regulators of Rel/NF- κ B transcription factors. *Genes Dev* 7, 2064-2070 (1993)
 - 14) Baeuerle PA and Henkel T: Function and activation of NF- κ B in the immune system. *Annu Rev Immunol* 12, 141-179 (1994)
 - 15) Scheinman RI, Congswell PC, Lofquist AK, and Baldwin AS: Role of transcriptional activation of I κ B α in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. *Science* 270, 283-286 (1995)
 - 16) Varma IM, Stevenson JK, Schwarz EM, Antwerp DV and Miyamoto S: Rel/NF- κ B/I κ B family: intimate tales of association and dissociation. *Genes Dev* 9, 2723-2735 (1995)
 - 17) Sun SC, Ganchi PA, Beraud C, Ballard DW and Greene WC: Autoregulation of the NF- κ B transactivator RelA (p65) by multiple cytoplasmic inhibitors containing ankyrin motifs. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 1346-1350 (1994)
 - 18) Mellits KH, Hay RT and Goodbourn S: Proteolytic degradation of MAD3 (I κ B α) and enhanced processing of the NF- κ B precursor p105 are obligatory steps in the activation of NF- κ B. *Nucleic Acid Res* 21, 5059-5066 (1993)
 - 19) Gilmore TD and Morin PJ: The I κ B proteins: members of multifunctional family. *Trends Genet* 9, 427-433 (1993)
 - 20) Liou HC and Baltimore D: Regulation of the NF- κ B/rel transactivation factor and inhibition system. *Curr Opin Cell Biol* 5, 477-487 (1993)
 - 21) King LS and Yasui M: Aquaporins and disease: lessons from mice to humans. *Trends Endocrinol Metab* 13, 355-360 (2002)
 - 22) Morishita Y, Sakube Y, Sasaki S and Ishibashi K: Molecular mechanisms and drug development in aquaporin water channel diseases: aquaporin superfamily (superaquaporins): expansion of aquaporins restricted to multicellular organisms *J Pharmacol Sci* 96, 276-279 (2004)
 - 23) Tenckhoff S, Hollborn M, Kohen L, Wolf S, Wiedemann P and Bringmann A: Diversity of aquaporin mRNA expressed by rat and human retinas. *Neuroreport* 16, 53-56 (2005)
 - 24) Raina S, Preston GM, Guggino WB and Agre P: Molecular cloning and characterization of an aquaporin cDNA from salivary, lacrimal, and respiratory tissues. *J Biol Chem* 270, 1908-1912 (1995)
 - 25) Agre P, Brown D and Nielsen S: Aquaporin water channels: unanswered questions and unresolved controversies. *Curr Opin Cell Biol* 7, 472-483 (1995)
 - 26) Ma T, Song Y, Gillespie A, Carlson EJ, Epstein CJ and Verkman AS: Defective secretion of saliva in transgenic mice lacking aquaporin-5 water channels. *J Biol Chem* 274, 20071-20074 (1999)
 - 27) Gresz V, Kwon TH, Hurley PT, Varga G, Zelles T, Nielsen S, Case RM and Steward MC: Identification and localization of aquaporin water channels in human salivary glands. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 281, G247-254 (2001)
 - 28) Laird PW and Jaenisch R: The role of DNA methylation in cancer genetic and epigenetics. *Annu Rev Genet* 30, 441-464 (1996)
 - 29) Baylin SB, Herman JG, Graff JR, Vertino PM and Issa JP: Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Adv Cancer Res* 72, 141-196 (1998)
 - 30) Jones PA and Laird PW: Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet* 21, 163-167 (1999)
 - 31) Di Croce L, Raker VA, Corsaro M, Fazi F, Fanelli M, Faretta M, Fuks F, Lo Coco F, Kouzarides T, Nervi C, Minucci S and Pelicci PG: Methyltransferase recruitment and DNA hypermethylation of target promoters by an oncogenic transcription factor. *Science* 295, 1079-1082 (2002)
 - 32) Cameron EE, Bachman KE, Myohanen S, Herman JG and Baylin SB: Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nat Genet* 21, 103-107 (1999)
 - 33) Daskalakis M, Nguyen TT, Nguyen C, Guldberg P, Kohler G, Wijermans P, Jones PA and Lubbert M: Demethylation of a hypermethylated P15/INK4B gene in patients with myelodysplastic syndrome by 5-Aza-2'-deoxycytidine (decitabine) treatment. *Blood* 100, 2957-2964 (2002)

- 34) Kaneda A, Kaminishi M, Yanagihara K, Sugimura T and Ushijima T: Identification of silencing of nine genes in human gastric cancers. *Cancer Res* 62, 6645-6650 (2002)
- 35) Zhu B, Chen Z, Cheng X and Wu Y: Induction of TRAG-3 expression in A549 lung adenocarcinoma cell line by 5-aza-2'-deoxyazacytidine. *Lung Cancer* 38, 321-322 (2002)
- 36) Chen H, Toyooka S, Gazdar AF and Hsieh JT: Epigenetic regulation of a novel tumor suppressor gene (hDAB21P) in prostate cancer cell lines. *J Biol Chem* 278, 3121-3130 (2003)
- 37) Azuma M, Aota K, Tamatani T, Motegi K, Yamashita T, Harada K, Hayashi Y and Sato M: Suppression of tumor necrosis factor α -induced matrix metalloproteinase 9 production by the introduction of a super-repressor form of inhibitor of nuclear factor κ B α cDNA into immortalized human salivary gland acinar cells. *Arthritis Rheum* 43, 1756-1767 (2000)
- 38) Azuma M, Tamatani T, Kasai Y and Sato M: Immortalization of normal human salivary gland cell with duct-, myoepithelial-, acinar-, or squamous phenotype by transfection with SV40 ori-mutant DNA. *Lab Invest* 69, 24-42 (1993)
- 39) Christian B, Loretz LJ, Oberley TD and Reznick CA: Characterization of human urothelial cells immortalized in vitro by Simian Virus 40. *Cancer Res* 47, 6066-6073 (1987)
- 40) Dardick I, Naiberg J, Leung R, Ramjohn S, Christensen H, Mason AB, Henderson WD and Rioostein P: Ultrastructural study of acinar and intercalated duct organization of submandibular and parotid salivary gland. *Lab Invest* 63, 394-404 (1990)
- 41) Hus SM, Ralne L and Fanger H: Use of avidin-biotin peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase technique, a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 29, 577-580 (1981)
- 42) Herron GS, Banda MJ, Clark EJ, Gavrilovic J and Werb Z: Secretion of metalloproteinase by stimulated capillary endothelial cells. *J Biol Chem* 261, 2814-2818 (1986)
- 43) Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254 (1976)
- 44) Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685 (1979)
- 45) Towbin H, Staehelin T and Gordon J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76, 4350-4354 (1979)
- 46) Chan H and Aggarwal BB: Role of tumor necrosis factor receptors in the activation of NF- κ B in human histiocytic lymphoma U-937 cells. *J Biol Chem* 269, 31424-31429 (1994)
- 47) Imbert V, Rupec RA, Livolsi A, Pahl HL, Traenkner EB, Mueller-Dieckmann C, Farahifar D, Rossi B, Auburger P, Baeuerle PA and Peyron JF: Tyrosine phosphorylation of I κ B- α activates NF- κ B without proteolytic degradation of I κ B- α . *Cell* 86, 787-798 (1996)
- 48) Hayashi Y, Kojima A, Hata M and Hirokawa K: A new mutation involving the sublingual gland in NFS/N mice. Partially arrested mucous cell differentiation. *Am J Pathol* 132, 187-191 (1988)
- 49) 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)
- 50) White SC and Casarett GW: Induction of experimental autoallergic sialadenitis. *J Immunol* 112, 178-185 (1974)
- 51) Neufeld TK, Grant ME and Grantham JJ: A method to measure the rate of net of fluid secretion by monolayers of cultured renal epithelial cells. *J Tissue Cult Methods* 13, 229-234 (1991)
- 52) Esteller M, Sparks A, Toyota M, Sanchez-Cespedes M, Capella G, Peinado MA, Gonzalez S, Tarafa G, Sidransky D, Meltzer SJ, Baylin SB and Herman JG: Analysis of adenomatous polyposis coli promoter hypermethylation in human cancer. *Cancer Res* 60, 4366-4371 (2000)
- 53) Aoudjit F and Vuori K: Matrix attachment regulates Fas-induced apoptosis in endothelial cells: a role for c-flip and implications for anoikis. *J Cell Biol* 152, 633-643 (2001)
- 54) Jiang C, Wang Z, Ganther H and Lu J: Caspases as key executors of methyl selenium-induced apoptosis (anoikis) of DU-145 prostate cancer cells. *Cancer Res* 61, 3162-3170 (2001)
- 55) Azuma M, Aota K, Tamatani T, Motegi K, Yamashita T, Ashida Y, Hayashi Y and Sato M: Suppression of tumor necrosis factor α -induced matrix metalloproteinase 9 production in human salivary gland acinar cells by cepharanthine occurs via down-regulation of nuclear factor κ B. *Arthritis Rheum* 46, 1585-1594 (2002)
- 56) Gutterman JU, Fine S, Quesada J, Horning SJ, Levine JF, Alexanian R, Bernhardt L, Kramer M, Spiegel H, Colburn W, Trown P, Merigan Y and Dziewanowski Z: Recombinant leukocyte A interferon: pharmacokinetics, single-dose tolerance, and biologic effects in cancer patients. *Ann Intern Med* 96, 549-556 (1982)
- 57) Hamburger AW and Salmon SE: Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science* 197, 461-463 (1977)

- 58) Havell EA and Vilcek J: Inhibition of interferon secretion by vinblastine. *J Cell Biol* 64, 716-719 (1975)
- 59) Yamamoto Y, Yin MJ, Lin KM and Gaynor RB: Sulindac inhibits activation of the NF kappa B pathway. *J Biol Chem* 274, 27307-27314 (1999)
- 60) Humphreys-Beher MG, Brayer J, Yamachika S and Peck AB: An alternative perspective to the immune response in autoimmune exocrinopathy: induction of functional quiescence rather than destructive autoaggression. *Scand J Immunol* 49, 7-10 (1999)
- 61) Towne JE, Krane CM, Bachurski CJ and Menon AG: Tumor necrosis factor-alpha inhibits aquaporin 5 expression in mouse lung epithelial cells. *J Biol Chem* 276, 18657-18664 (2001)
- 62) He X, Tse CM, Donowitz M, Alper SL, Gabriel SE and Baum BJ: Polarized distribution of key membrane transport proteins in the rat submandibular gland. *Pflugers Arch* 433, 260-268 (1997)
- 63) Nielsen S, King LS, Christensen BM and Agre P: Aquaporins in complex tissues. II. Subcellular distribution in respiratory and glandular tissues of rat. *Am J Physiol* 273, C1549-1561 (1997)
- 64) Matsuzaki T, Suzuki T, Koyama H, Tanaka S and Tanaka K: Aquaporin-5 (AQP5), a water channel protein, in the rat salivary and lacrimal glands: immunolocalization and effect of secretory stimulation. *Cell Tissue Res* 295, 513-521 (1999)
- 65) Beroukas D, Hiscock J, Jonsson R, Waterman SA and Gordon TP: Subcellular distribution of aquaporin 5 in salivary glands in primary Sjögren's syndrome. *Lancet* 358, 1875-1876 (2001)
- 66) Jones PA and Takai D: The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science* 293, 1068-1070 (2001)
- 67) Bird A: DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 16, 6-21 (2002)
- 68) Plass C and Soloway PD: DNA methylation, imprinting and cancer. *Eur J Hum Genet* 10, 6-16 (2002)
- 69) Comb M and Goodman HM: CpG methylation inhibits proenkephalin gene expression and binding of the transcription factor AP-2. *Nucleic Acids Res* 18, 3975-3982 (1990)
- 70) Iguchi-Arigo SM and Schaffner W: CpG methylation of the cAMP-responsive enhancer/promoter sequence TGACGTCA abolishes specific factor binding as well as transcriptional activation. *Genes Dev* 3, 612-619 (1989)
- 71) Ohtani-Fujita N, Fujita T, Aoike A, Osifchin NE, Robbins PD and Sakai T: CpG methylation inactivates the promoter activity of the human retinoblastoma tumor-suppressor gene. *Oncogene* 8, 1063-1067 (1993)
- 72) Holler M, Westin G, Jiricny J and Schaffner W: Sp1 transcription factor binds DNA and activates transcription even when the binding site is CpG methylated. *Genes Dev* 2, 1127-1135 (1988)
- 73) Clark SJ, Harrison J and Molloy PL: Sp1 binding is inhibited by (m)Cp(m)CpG methylation. *Gene* 195, 67-71 (1997)
- 74) Mancini DN, Singh SM, Archer TK and Rodenhiser DI: Site-specific DNA methylation in the neurofibromatosis (NF1) promoter interferes with binding of CREB and SP1 transcription factors. *Oncogene* 18, 4108-4119 (1999)
- 75) Zhu WG, Srinivasan K, Dai Z, Duan W, Druhan LJ, Ding H, Yee L, Villalona Calero MA, Plass C and Otterson GA: Methylation of adjacent CpG sites affects Sp1/Sp3 binding and activity in the p21 (Cip1) promoter. *Mol Cell Biol* 23, 4056-4065 (2003)
- 76) Kitazawa S, Kitazawa R and Maeda S: Transcriptional regulation of rat cyclin D1 gene by CpG methylation status in promoter region. *J Biol Chem* 274, 28787-28793 (1999)