総 説

ドライマウス研究の現状と展望

斎 藤 一 郎

Recent advances in pathogenesis and regenerative medicine for salivary gland disorder

SAITO Ichiro

Abstract: Oxidative damage to the gland was measured by 8-OHdG and HEL using the Sjögren's syndrome (SS) saliva. In addition, LDH and mitochondrial (m)-GOT, both general markers for cell damage, were also analyzed. Increased levels of 8-OHdG and HEL were found in the saliva from SS patients, but not in those from patients with other salivary gland dysfunction or those of healthy individuals. Levels of LDH and m-GOT were significantly correlated with 8-OHdG and HEL levels respectively. Furthermore, the increased levels of 8-OHdG and HEL were also correlated in the SS saliva. These findings suggested the involvement of oxidative stress in glandular tissue destruction in SS. It was indicated that the detection of 8-OHdG and HEL in the saliva may become a useful tool for the diagnosis of SS.

Epstein-Barr virus (EBV) reactivation is thought as a causative factor for SS. However, the physiological stimuli responsible for the EBV activation in the patients have not been characterized. 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo (p) dioxin, (TCDD) and certain polycyclic aromatic hydrocarbons are widespread environmental pollutants that are designated human carcinogens, immunomodulator and virus activator. We used the firefly luciferase plasmids connected with promoters of BZLF1, indispensable and sufficient for viral reactivation, and CYP1A1, target gene for aryl hydrocarbon receptor (AhR). We have found that xenobiotics bound AhR upregulated the BZLF1 promoter activity in salivary epithelial cells, HSY. This result suggested that dioxins might activate EBV reactivation in epithelial cells. Next, to confirm the effect of dioxins for the pathogenesis of SS, we analyzed promoter activity of CYP1A1 in saliva from SS (n = 10) and control individuals (n = 10). The average CYP1A1 activity induced by SS saliva (3.56-fold) was higher than by control saliva (1.61-fold). Moreover, a significant correlation was observed between the level of CYP1A1 and BZLF1 promoter activities, and the amount of EBV DNA in each saliva sample of SS patients was parallel to the BZLF1 promoter activity. These results suggest that xenobiotics activated AhR in SS saliva might enhance the EBV reactivation in salivary epithelial cells.

Stem cell based-therapy is a promising treatment for patients suffering from severe dry mouth. We identified side population cells (SP cells), which are highly enriched for stem cell activity, in salivary glands to apply them for the cell therapy of hypofunction in the damaged glands. Submandibular gland cells from the fractions of side population cells (SP cells) and main population cells (MP cells) were sorted on a flow cytometry into tubes. We also analyzed differential gene expressions between SP and MP cells by cDNA microarray. In addition, to examine whether SP cell transplantation can recover the function of the glands, we isolated SP cells from submandibular glands of transgenic mice expressing green fluorescent protein (GFP) and transplanted them into mice with hypofunction in the glands induced by irradiation. By cDNA microarray, we could identify a SP cell-specific gene in salivary glands. Furthermore, SP cell transplantation enabled recovery from the hypofunction in the irradiated glands, although the transplanted cells were only sparsely distributed in the glands of the recipient mice, suggesting that soluble factors secreted from SP cells are possibly involved in the rescue of secretory function. Our data suggests that SP cell transplantation is available for the recovery of secretory function in damaged glands.

Key words: Sjögren's syndrome (シェーグレン症候群), oxidative stress (酸化ストレス), Epstein-Barr virus (EB ウィルス), dioxin (ダイオキシン), regenerative medicine (再生医療)

はじめに

ドライマウスの原因は、シェーグレン症候群、スティーブン・ジョンソン症候群、頭頸部癌に対する放射線治療、種々の薬剤などによる涙腺・唾液腺の分泌低下があげられる。これらの対処法の現状は人工唾液の使用や残存する腺房細胞の分泌を促進するムスカリン性アセチルコリン受容体アゴニストなどの服用が行われているが、このような対症療法が奏功せず重篤な口腔内病変やQOLの低下を引き起こすことが知られている。このことから本症の病因の究明と新たな治療法の確立が求められている。本稿では現在までのドライマウス研究における我々の取り組みについて概説し、特にドライマウスのプロトタイプとしてシェーグレン症候群 (SS) の病因や唾液腺の修復機構について紹介する。

腺組織障害における酸化ストレスの関与

酸化ストレスは活性酸素・フリーラジカルを介して細胞死を誘導することや¹⁾、脂質膜や膜蛋白質に酸化傷害を来すことが知られ、このような機序を介してさまざまな病態が成立することが近年報告されている。特に自己免疫疾患においては関節リウマチの滑液²⁾、I型糖尿病の血清・尿に酸化ストレスマーカーが検出されていることから^{3, 4)}、我々は腺組織破壊の顕著なSSにおける酸化ストレスの関与と唾液分泌障害との関連について検討を行った。

対象は鶴見大学歯学部附属病院ドライマウス専門外来を受診した女性患者37名（平均年齢64.6±9.6歳）を被験者とし、SS罹患の有無および唾液分泌量により4群に分類し検討した。SS群（8名）ならびにG1群（9名）は、SSの罹患の有無と安静時唾液分泌量：< 0.5ml/15分、刺激時唾液分泌量：< 5ml/10分の分泌量を認めた疾患群であり、G2群（10名）はSSの罹患がなく安静時唾液分泌量：0.5≤—< 1.5 ml/15分、刺激時唾液分泌量：5≤—< 10ml/10分の唾液分泌量を示し、control群（10名）はSSならびに

明らかな基礎疾患の既往がなく安静時唾液分泌量：≥ 1.5ml/15分、刺激時唾液分泌量：≥ 10 ml/10分の正常の唾液分泌量を認める健常者とした（表1）。

酸化ストレスマーカーである8-OHdG、HEL量に疾患特異性があるか否かを解析する目的から各唾液検体間での比較検討を行ったところ、SS群はG1、G2ならびにcontrol群と比較して有意に高値を示した。一方、G1、G2ならびにcontrol群の8-OHdG、HEL量は有意な差を認めなかったことから、SSにおける唾液分泌障害の成立機序に酸化ストレスの関与が示唆された。

G1群はSS群と同程度の唾液分泌量の低下を認める疾患群であるが、8-OHdG量（ $p < 0.0001$ ）、HEL量（ $p < 0.01$ ）は低値を示したことから、G1群にみられる唾液分泌障害に酸化ストレスを介さない分泌障害の機序が想定された（図1）。

SSにおける唾液での解析結果を検証する目的で、同一患者血清中の8-OHdG量を測定したところ明らかな有意差は認めないものの（ $p = 0.3444$ ）、唾液8-OHdG量と同様の傾向を示した。このことから唾液8-OHdGは血清由来の可能性も考えられたため、これらのことを明らかにするために、血清の指標となるapoBを同一唾液試料で検出を行った結果、いずれも検出感度以下（5mg/dL以下）を示した。さらに唾液8-OHdG量は血清8-OHdG量と比較して約10倍の高値を認めたことより、唾液中の8-OHdGは血清由来ではなく唾液腺由来であると考えられた。以上の結果より、SSの唾液分泌障害に酸化ストレスの関与が想定されたが、さらにこれらの結果を明確にする目的から細胞傷害の指標として汎用されているLDHとm-GOT間での比較検討を行った。その結果、SS群はG1、G2ならびにcontrol群と比較して有意に高値を示し8-OHdG、HEL量と同様の傾向を認めた（図1）。LDH、m-GOTと8-OHd、HELの各項目間を解析したところ有意な相関が得られ（8-OHdG vs.LDH: $p < 0.0001$ 、8-OHdG vs.m-GOT: $p < 0.0001$ 、HEL vs.LDH: $p < 0.0001$ 、HEL vs.m-GOT: $p < 0.0001$ ）（図2）加えて、8-OHdGとHELにも同様な傾向が認められた（ $p <$

表1 対象者群の年齢と唾液分泌量¹⁰⁾

	SS (n = 8)	G1 (non-SS) (n = 9)	G2 (non-SS) (n = 10)	Control (n = 10)
平均年齢±SD	64.6 ± 11.3	61.7 ± 11.9	68.2 ± 6.7	59.8 ± 6.5
安静時唾液分泌量 (ml/15min)	0.1 ± 0.1	0.3 ± 0.2	1.0 ± 0.3	3.0 ± 1.6
刺激時唾液分泌量 (ml/10min)	3.7 ± 0.5	4.1 ± 0.5	7.3 ± 1.5	15.5 ± 3.7

図1 SS群では8-OHdG・HEL値が高いことからSSの唾液分泌機能低下は酸化ストレスに起因する可能性が示唆され、これらの結果はLDHやm-GOTでも同様に認められた¹⁰⁾

図2 酸化ストレスマーカーは細胞傷害マーカーと相関が認められた¹⁰⁾

0.0001) (図 3).

さらに、これらの酸化ストレスマーカーと SS の組織学的評価法との相関を解析したところ、組織学的重症度と 8-OHdG ($p = 0.8231$) 量ならびに HEL ($p = 0.5485$) 量とは共に相関が認められなかった (図 4). このことから、SS における唾液分泌量の減少は唾液腺組織傷害だけでなく、酸化ストレスによる細胞膜脂質や膜蛋白質の変性を介した

機能不全の関与も示唆された⁵⁾.

酸化ストレスマーカーは従来血液や尿を用いて解析されているが⁶⁾、本研究における唾液による検出系はこれらの検査と比較して検体の採取が簡便で非侵襲的なことより、SS の腺組織傷害を把握する手段として有用と思われた⁷⁾.

シェーグレン症候群におけるダイオキシン類を介した EB ウイルス再活性化機構の検討

Epstein-Barr (EB) ウイルスは何らかの刺激、あるいは免疫機構の破綻により再活性化が誘導され、シェーグレン症候群 (SS)⁸⁻¹⁰⁾ や全身性エリテマトーデス¹¹⁾、関節リウマチ⁸⁾ などの自己免疫疾患、伝染性単核症、慢性活動性 EB ウイルス感染症、慢性疲労症候群等の種々の疾患の成立に関与していることが知られている。しかしながら、生体内で EB ウイルスの再活性化を誘導する因子については不明な点が多い。

内分泌攪乱物質として知られるダイオキシン類はインフルエンザウイルス¹²⁾、HIV¹³⁾、ヒトサイトメガロウイルス複製の促進させること等が報告されている¹⁴⁾。また、非ホジキン患者の血中抗 EB ウイルス抗体と患者脂肪中のダイオキシン類に相関が認められたこと¹⁵⁾ などから EB ウイルスとダイオキシンの関連も報告されているが、実際に生体内のダイオキシンのウイルスに対する作用についての詳細は不明である。

図 3 脂質の酸化 (HEL) が増加するに伴い DNA の損傷 (8-OHdG) も高値を示す傾向がみられた¹⁰⁾

図 4 リンパ球の浸潤程度と酸化ストレス度に相関は認められなかった¹⁰⁾

図5 HSY細胞におけるTCDDによるBZLF1プロモーター活性
 HSY細胞にZp552-LucとAhRおよびArntを遺伝子導入しTCDDを
 添加後のルシフェラーゼ活性を測定した。

これらのことから、今回我々はダイオキシン類によるEBウイルス再活性化の可能性を検討し、SSとの関連を検討した。すなわち、ウイルス活性化の必須因子として知られるBZLF1遺伝子のプロモーター活性およびダイオキシン類はその受容体であるアリルハイドロカーボンレセプター(AhR)の標的遺伝子であるCYP1A1のプロモーター活性を指標に解析を行った。

ダイオキシン類のEBウイルス再活性化へ及ぼす影響について検討するために、HSY細胞にAhRおよびArntの発現プラスミドであるpCI-AhR-HA、pCI-Arnt-HAと、pZp552-Lucを遺伝子導入した後、代表的なダイオキシンであるTCDDを添加した結果、用量依存的にBZLF1プロモーター活性を増強させた(図5)。次に、BZLF1プロモーター上への結合部位を予測するために、pZp221-Luc、pZp130-Lucについても同様の検討を行った。その結果、最短のpZp130-Lucで最も強い活性を認めた(図6A)。このことから、ダイオキシンで活性化されたAhRとArntの二量体はこの130bp領域に結合する可能性が示唆された。さらに、最長のプラスミドpZp552から活性の強い130bpを欠失させたコンストラクト(pZp552 Δ 130-Luc)を用いて検討を行った結果、pZp552-Lucと比較してpZp552 Δ 130-Lucでは著しくその活性が抑制され、ダイオキシンレセプターがこの領域に結合していることが強く示唆された(図6B)。

次にEBウイルス関連疾患であるSSにおいてダイオキシンの関与が認められるのか否かを検証するために、SS患者唾液を用いて検討を行った。SS患者10例、健常人10例

の唾液を採取し、BZLF1のプロモーター活性を検討した結果、SS患者で有意にその活性が高値であった(図7A)。またCYP1A1のプロモーターを用いて唾液中のAhRリガンドを検索した結果、SS患者唾液中に有意に高いAhRリガンド活性を認め、さらに両者の活性に正の相関を認めた(図7A, B)。さらに、唾液中のEBウイルスDNAを検出するために、directPCR法にて検討を行ったところ、両プロモーター活性の強かったSS患者唾液中にEBウイルスDNAが有意に検出された(図7C)。

EBウイルスは通常不顕性感染の状態をとるが、ウイルス遺伝子が再活性化されウイルスが産生されると種々の疾患を引き起こす。このように潜伏感染状態から、溶解感染状態へ移行する細胞は主に鼻咽頭上皮や唾液腺上皮細胞であると考えられている¹⁶⁾。さらに活性化AhRの作用は種特異性、細胞特異性が非常に顕著であることから、今回我々の検討ではヒト唾液腺上皮細胞株を用いた。その結果、活性化AhRがBZLF1遺伝子の転写活性を増強したことから、ダイオキシン等のAhRを活性化する環境因子が唾液腺上皮細胞に感染しているEBウイルスの再活性化を誘導する可能性が示唆された。また、SS患者唾液中にAhRを介してEBウイルスの再活性化を誘導する因子の存在が確認されたことから、AhRを活性化するダイオキシンなどの環境因子が唾液腺上皮細胞内でEBウイルスの再活性化を誘導し、SSの病態形成に関与している可能性が示唆された(図8)。

図 6 HSY 細胞における TCDD による BZLF1 プロモーター活性

A : p Zp130-Luc, pZp221-Luc, pZp552-Luc 3 種類の長さの違うプロモーターと, AhR および Arnt, あるいは Zta を遺伝子導入した時のルシフェラーゼ活性を測定した。

B : p Zp552 と pZp552 Δ 130 をそれぞれ HSY 細胞に遺伝子導入し, TCDD によるルシフェラーゼ活性を比較した。

SP 細胞移入による唾液分泌障害マウスの治療実験

重篤なドライアイ・ドライマウスを呈する患者の治療法として組織幹細胞を用いた細胞治療の可能性を検討する目的で, side population (SP) 細胞を用いた治療実験を行っている。放射線の局所照射により涙液・唾液分泌障害を呈するマウスをそれぞれ作製し, これらのマウスの当該組織に SP 細胞を移入することにより涙液・唾液分泌機能に回復が認められるか否かを検討した。すなわちマウス涙腺・

唾液腺局所に 15Gy の放射線照射を行い照射一週後に涙液・唾液量を測定することにより分泌量が減少していることを確認した。さらに放射線照射 2 週後に Green Fluorescent Protein (GFP) トランスジェニックマウスより採取した $5 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$ 個の SP 細胞を移入した (図 9)。移入後, 経時的にムスカリン性アセチルコリン受容体のアゴニストであるピロカルピン投与による涙液・唾液分泌量を測定し SP 細胞移入の効果を検討した。その結果, 移植後一か月で分泌量の回復が認められた (図 10)。さらに, 摘出し

図7 SS患者唾液による CYP1A1 および BZLF1 プロモーター活性

A : HSY 細胞に AhR および Arnt を遺伝子導入した後, SS 患者 10 名, 健常人 10 名の唾液による CYP1A1 および BZLF1 プロモーター活性を測定した.

B : A で測定した CYP1A1, BZLF1 プロモーター活性について両者の相関を解析した.

C : A で測定した唾液について, Direct PCR 法で唾液中の EB ウイルス DNA を検出した.

図8 ダイオキシン類によるEBウイルス再活性化の作業仮説

図9 GFP TG マウスより採取した SP 細胞の移入

図10 SP細胞移入後の涙液・唾液分泌測定

た組織を蛍光顕微鏡にて観察した結果、GFP 陽性細胞が散在性に認められた (図 11)。しかしながら、確認された GFP 陽性細胞は少数であったことより移入した SP 細胞が直接分泌能の回復に寄与した可能性は少なく SP 細胞から分泌された液性因子が残存する腺房細胞の分泌に関与している可能性が示唆された。そこで我々は SP 細胞に特異的に発現する遺伝子を検索することにより、それらの候補遺伝子の同定を試みた。

SP 細胞特異的発現遺伝子の解析

DNA microarray による検索では涙腺・唾液腺の SP 細胞特異的に発現の高い因子が、それぞれ明らかとなり、現在

図11 SP細胞移入組織におけるGFP陽性細胞の検出

それらの因子の機能を解析している。すなわち、当該遺伝子をマウス胎児由来線維芽細胞株（STO）に遺伝子導入し、当該蛋白を恒常的に発現する細胞株を作製しており、すでに造血幹細胞における自己複製能の維持に ATM を介した酸化ストレス抑制機構が重要な役割を担っていることが明らかことから¹⁷⁾、当該蛋白に同様な機能が期待されたので、その可能性を検証している。具体的には当該蛋白を恒常的に発現している STO 細胞を種々の濃度の H₂O₂ で刺激した後、活性酸素種（ROS）感受性色素である CM₂HDCFDA で染色後、細胞内の ROS 量と生細胞数を測定する。このことより現在 ROS 抑制能を有する因子を同定し、さらに、その機能の詳細を解析中である。

ま と め

ドライマウスのプロトタイプであるシェーグレン症候群に対する我々の取り組みを紹介した。紙面の都合で実験の詳細は割愛したが、原著論文を参考にして頂ければ幸甚である。

謝辞

本稿は鶴見大学歯学部口腔病理学講座を代表して執筆したものである。特に酸化ストレスと唾液腺障害の臨床研究は梁洪淵助教、ダイオキシンと EB ウイルスは井上裕子講師、SP 細胞を用いた細胞治療は美島健二准教授がプロジェクトリーダーとして行った成果である。臨床検体は本学附属病院ドライマウス専門外来の担当医の協力によるものであり、ここに深謝致します。

引 用 文 献

- Buttke, T.M. and Sandstrom, P.A.: Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol Today* 15: 7-10 1994.
- Miyata, T., Ishiguro, N., et al.: Increased pentosidine, an advanced glycation end product, in plasma and synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and its relation with inflammatory markers. *Biochem Biophys Res Commun* 244: 45-49 1998.
- Reznick, A.Z., Shehadeh, N., et al.: Free radicals related effects and antioxidants in saliva and serum of adolescents with Type 1 diabetes mellitus. *Arch Oral Biol* 51: 640-648 2006.
- Hata, I., Kaji, M., et al.: Urinary oxidative stress markers in young patients with type 1 diabetes. *Pediatr Int* 48: 58-61 2006.
- Hahm, K.B., Lee, K.J., et al.: Helicobacter pylori infection, oxidative DNA damage, gastric carcinogenesis, and reversibility by rebamipide. *Dig Dis Sci* 43: 72S-77S 1998.
- Higashi, Y., Sasaki, S., et al.: Endothelial function and oxidative stress in renovascular hypertension. *N Engl J Med* 346: 1954-1962 2002.
- Ryo, K., Yamada, H., et al.: Possible involvement of oxidative stress in salivary gland of patients with Sjögren's syndrome. *Pathobiology* 73: 252-260 2006.
- Fox, R.I., Luppi, M., et al.: Potential role of Epstein-Barr virus in Sjögren's syndrome and rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol* 19: 18-24 1992.
- Saito, I., Serenius, B., et al.: Detection of Epstein-Barr virus DNA by polymerase chain reaction in blood and tissue biopsies from patients with Sjögren's syndrome. *J Exp Med* 169: 2191-2198 1989.
- Inoue, H., Tsubota, K., et al.: Possible involvement of EBV-mediated alpha-fodrin cleavage for organ-specific autoantigen in Sjögren's syndrome. *J Immunol* 166: 5801-5809 2001.
- McClain, M.T., Heinlen, L. D., et al.: Early events in lupus humoral autoimmunity suggest initiation through molecular mimicry. *Nat Med* 11: 85-89 2005.
- Burleson, G.R., Lebec, H., et al.: Effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on influenza virus host resistance in mice. *Fundam Appl Toxicol* 29: 40-47 1996.
- Ohata, H., Tetsuka, T., et al.: 3-methylcholanthrene activates human immunodeficiency virus type 1 replication via aryl hydrocarbon receptor. *Microbiol Immunol* 47: 363-370 2003.
- Murayama, T., Inoue, M., et al.: 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin is a possible activator of human cytomegalovirus replication in a human fibroblast cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 296: 651-656 2002.
- Hardell, L., Lindstrom, G., et al.: A dipose tissue concentrations of dioxins and dibenzofurans, titers of antibodies to Epstein-Barr virus early antigen and the risk for non-Hodgkin lymphoma. *Environ Res* 87: 99-107 2001.
- Bornkamm, G.W., Behrends, U., et al.: The infectious kiss: newly infected B cells deliver Epstein-Barr virus to epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 7201-7202 2006.
- Ito, K., Hirao, A., et al.: Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* 431: 997-1002 2004.