総説

2009 年度 口腔四学会合同研修会
(社) 日本口腔外科学会 第 33・34 回教育研修会
「唾液腺疾患 — その基礎から臨床まで —」

シェーグレン症候群の病理と病因

林 良夫

Pathology and etiology of Sjögren's syndrome

HAYASHI Yoshio

Abstract: Primary Sjögren's syndrome (SS) is an autoimmune disorder characterized by lymphocytic infiltrates and destruction of the salivary and lacrimal glands, leading to clinical symptoms of dryness of the mouth and eyes. Autoreactive T cells bearing CD4 molecule may recognize unknown self antigen, triggering autoimmunity in the salivary and lacrimal glands. Recent evidences suggest that the apoptotic pathway plays a central role in tolerizing T cells to tissue-specific self antigen including 120KD α -fodrin, and may drive the autoimmune phenomenon. Cleavage of certain autoantigens during apoptosis may reveal immunocryptic epitopes that could potentially induce autoimmune response. It is now evident that the interaction of Fas with FasL regulates a large number of pathophysiological process of apoptosis including autoimmune diseases. Our data imply that tissue-specific apoptosis and caspase-mediated α -fodrin proteolysis are involved in the progression of autoimmune lesions in SS. We found that retinoblastoma-associated protein RbAp48 overexpression induces apoptosis in the salivary glands caused by estrogen deficiency. The studies reviewed the pathology and molecular mechanisms on the development of SS.

Key words: Sjögren's syndrome (シェーグレン症候群), autoreactive T cells (自己反応性 T 細胞), α -fodrin autoantigen (α -フォドリン自己抗原), apoptosis (アポトーシス), RbAp48

はじめに

シェーグレン症候群 (Sjögren's syndrome) は乾燥性角結膜炎によるドライアイや口腔乾燥症 (ドライマウス) を臨床症状とすることの多い原因不明の自己免疫疾患であり, “乾燥症候群 (sicca syndrome)” とも呼ばれる¹⁾。自己免疫性唾液腺炎, 自己免疫性涙腺炎の他に, 気管支腺・汗腺・腔分泌腺など外分泌腺を標的臓器として発症し, その他の全身症状として, 関節リウマチ (RA)・原発性胆汁性肝硬変 (PBC)・間質性肺炎・間質性腎炎などを腺外病変として随伴することが知られ, 全身性自己免疫疾患であると同時に臓器特異的な表現型を強く発現する難治性自己免疫疾患であると考えられる。また, まれにはあるが B 細胞悪性リンパ腫へ移行することから自己免疫疾患と悪性腫瘍発生との関連性の面からも重要な疾患である。

自己免疫疾患は一般に女性優位に発症するが, シェーグレン症候群は中でも際立って女性の発症率が高い²⁾。臨床病態の特徴から唾液腺・涙腺などに限局して発症する原発性 (一次性) シェーグレン症候群と全身性エリテマトーゼス (SLE) や RA など他の系統的自己免疫疾患に合併する二次性のものとに大別されているが, 両者の境界については曖昧な点も多い。また, SLE や RA などの膠原病患者に二次的ではあるが, 唾液腺・涙腺がかなりの高頻度で標的臓器になりやすい理由についても不明であり, 多くの疑問が残されたままである。

臨床病態と鑑別診断

シェーグレン症候群患者はドライアイ (眼乾燥), ドライマウス (口腔乾燥症) という乾燥症状によって, 眼が渇いて痛む, まばたきがしにくい, 眼がコロコロする, 口が乾いて息苦しい, ものが食べれない, うまく飲み込めない, といった摂食障害・嚥下障害などの症状で苦痛を訴える。さらに, 口腔乾燥症が長期化することによって, 舌乳頭の

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部分子口腔医学
講座口腔分子病態学
Department of Oral Molecular Pathology, Institute of Health
Biosciences, The University of Tokushima Graduate School

萎縮が進行し、口唇の萎縮や口角部のびらんも頻繁にみられる。また、口腔粘膜のびらの進行により口腔内潰瘍が多発したり、潰瘍からの出血が持続し患者の苦痛はさらに激しくなる場合が多い。その他、唾液分泌の低下、唾液粘稠度の増加が進行し急激に多数の歯に齲蝕が発生する。一方、シェーグレン症候群以外でドライアイ・ドライマウス症状をきたす要因としては、向神経薬などの薬剤性のもの、老人性腺萎縮の進行による加齢変化、ある種のウイルス感染、糖尿病などの代謝性疾患、各種のストレスによる心因性のものなどが考えられ、シェーグレン症候群はドライアイ・ドライマウス症状を呈する患者のおよそ10%前後とされている。

シェーグレン症候群は血清診断・眼科検査・口腔検査・病理検査などによって確定診断がなされる。臨床的な乾燥症状を裏付ける眼科検査（シルマーテスト、ローズベンガルテスト）や口腔検査（ガムテストなど）や血清所見（SS-A, SS-B）から臨床的にシェーグレン症候群が疑われる場合、小唾液腺（口唇腺）生検が実施される。シェーグレン症候群の確定診断にとって病理組織診断は極めて重要である。病理検査として一般に指標とされているのは口唇腺生検組織にみられる小葉内導管周囲のリンパ球浸潤である。シェーグレン症候群の診断基準は各国で多少異なっているが、生検で導管周囲に50個以上の単核細胞浸潤が確認されれば病理学的陽性所見として1 focusとみなすことに関しては共通している。欧米ではカリフォルニア基準（1986）、ヨーロッパ基準（1993）とシェーグレン症候群の診断基準の改訂が進められ、我国でも1999年に厚生省新基準として改訂されている。さらに現在、NIHを中心としてシェーグレン症候群の国際基準の策定作業が日米欧で実施されている。一般に、症状が多彩であり、内科・整形外科・眼科・皮膚科・歯科口腔外科など訪れる診療科も各科にわたっているため確定診断が遅れがちであることが従来から指摘されている。また、臨床的に不定愁訴や鬱状態が先行し、シェーグレン症候群の診断が大幅に遅れる症例もかなりあることが指摘されている。

シェーグレン症候群の腺外病変

シェーグレン症候群の腺外病変として、関節リウマチ（RA）・原発性胆汁性肝硬変（PBC）・間質性肺炎・間質性腎炎などが知られ、予後を左右する重要な因子である。シェーグレン症候群患者の約30%に腎病変が出現し、中でも最も頻度の高いのは間質性腎炎とされている。その他、メザンジウム増殖性腎炎、膜性腎炎、半月体形成性腎炎などが報告されている。生検が施行された間質性腎炎組織の検索より、浸潤細胞の大半はCD4陽性T細胞であり、ごく

わずかのB細胞の浸潤を伴っていた。この所見はシェーグレン症候群唾液腺組織の免疫染色所見と類似していた。さらに、腎生検を用いたT細胞レセプター（TCR）のレパトア解析から比較的限られたクローンの存在が確認されており、腎間質への浸潤T細胞の認識する抗原エピトープが限定されていることが示唆されている³⁾。また、尿細管上皮に正常ではみられない副刺激分子CD86分子の発現が認められており、間質性腎炎を呈する尿細管上皮細胞では局所で抗原提示能を示すことによって浸潤T細胞を活性化している可能性が推察されている。一般に、抗原特異的にT細胞が活性化されるためにはTCRを介した第1シグナルと副刺激分子を介した第2シグナルとが不可欠であることから、シェーグレン症候群における間質性腎炎で組織破壊を担う浸潤T細胞は未知の自己抗原を認識していると考えられるが、この際、唾液腺と共通する認識抗原であるか否かは現在まで結論が得られていない。シェーグレン症候群患者の死因として腎障害の他、間質性肺炎などによる呼吸不全が知られるが、その病態や発症機序などについては明らかにされていない。

シェーグレン症候群疾患モデルの確立

原因不明の自己免疫疾患に対し、病因的アプローチを加えるためには好適な疾患モデルの開発が不可欠である。非自己免疫系統マウスを用いて生後3日目に胸腺摘除を施すこと（3d-Tx）によりさまざまな臓器に臓器特異的自己免疫疾患が誘導されるモデルは3d-Tx autoimmunityとしてよく知られていた。筆者らは舌下腺粘液細胞に分化異常をきたすミュータントNFS/sldマウスを用いて生後3日目の胸腺摘出（3d-Tx）を施すことにより、唾液腺・涙腺のみに限局した自己免疫病変が発症することを見出し、原発性シェーグレン症候群の疾患モデルとして報告した⁴⁾。本モデルマウスに認められる自己免疫病変は、4週目から唾液腺・涙腺の導管周囲への単核球浸潤として発症し、経時的に腺組織の破壊を伴って増強していく。発症はいずれの時期も雌優位に認められ、マウス血清中には唾液腺導管上皮に特異的に反応する自己抗体の出現を伴っていた。本モデルマウスを用いた病態解析により唾液腺・涙腺の組織破壊に関与する浸潤細胞はCD4陽性T細胞が主体であり、T細胞レセプター（TCR）V β 鎖レパトアはV β 8およびV β 6優位であることを明らかにした。また、唾液腺局所においてIL-1 β , IFN- γ , IL-6, IL-10などのサイトカイン産生異常がみられた。以上の結果から、本モデルマウスにおける自己免疫病変は未知の自己抗原を特異的に認識する自己反応性T細胞が活性化されることによって発症している可能性が強く示唆され、臓器特異的自己抗原の解明が急がれた。

図1 シェーグレン症候群 (SS) 患者血清では 120KD α -フォドリン蛋白と反応するバンドが検出されるが, SLE 患者, RA (関節リウマチ) 患者および健康者血清ではバンドはみられない (ウエスタンブロット法)。

筆者らは疾患モデルの確立後, 発症マウス血清中に認められた自己抗体に対応する唾液腺特異的自己抗原の精製を試み, モデルマウス唾液腺組織から 120KD α -フォドリン蛋白を同定した⁵⁾。マウス全身諸臓器ホモジネートと発症マウス血清を用いたウエスタンブロット解析の結果, 唾液腺組織のみに約 120KD の位置に特異的反応が認められ, ゲル濾過・イオン交換クロマトグラフィーを組み合わせることにより得られた 120KD の部分精製標品のアミノ酸解析からヒト α -フォドリンの N 末の 20 残基と判明した。マウス血清は特異的に α -フォドリンリコンビナント蛋白と反応し, 脾臓 T 細胞も病変の進行に伴って特異的な増殖反応を示した。したがって, 120KD α -フォドリンはモデルマウスにおける自己免疫病変の発症に密接に関連した臓器特異的自己抗原であることが示唆された。さらに, SLE や RA など他の自己免疫疾患患者, および健康者では反応性を認めなかったが, 原発性シェーグレン患者血清では極めて高率に精製抗原およびリコンビナント蛋白と反応することが判明した (図 1)。また, 患者末梢血から分離した単核細胞はリコンビナント蛋白に特異的に増殖反応を示すことも明らかとなった。したがって, 120KD α -フォドリンはモデルマウスのみならずヒトシェーグレン症候群とも共通する自己抗原であることが明らかになった。

発症要因としてのアポトーシス

自己抗原 α -フォドリンが生体内でどのようなメカニズムで形成されるのかについて検討を加えた。 α -フォドリンはアポトーシスに伴って分断化を受けることは既に報告があり, シェーグレン症候群の発症とアポトーシスとの関連性

について疾患モデルを用いて解析を加えた。 α -フォドリンは分子量 240KD の膜骨格蛋白としてユビキタスに存在し, カルモデュリン, アクチンなどとの結合部位を有していること, また, カルパインやカスパーゼ-3 などある種のシステインプロテアーゼの基質蛋白の一種であることが知られている。局所の組織破壊に関与する CD4 陽性 T 細胞の多くが FasL を発現し, 標的細胞の Fas 抗原との間でアポトーシスが成立していることが判明した。マウス唾液腺局所では TUNEL 陽性アポトーシス細胞が早期から検出された。初代培養唾液腺細胞を anti-Fas 抗体で刺激すると経時的にアポトーシスが誘導され, 正常の 240KD α -フォドリンがアポトーシスの亢進に伴って 120KD に分断化される。さらに, *in vitro* で活性化された CD4 陽性 T 細胞が唾液腺上皮細胞に対して細胞障害能を有していることが判明した。すなわち, 自己抗原によって活性化された CD4 陽性 T 細胞が唾液腺上皮細胞に対して Fas/FasL 経路を介した組織障害活性を有している可能性が実験的に明らかにされた⁶⁾。アポトーシスが自己免疫疾患のみならず移植片対宿主病, アルツハイマー病, 免疫不全症など主に免疫系を中心とした多様な疾患に関わっていることが明らかにされている。アポトーシスが関わる自己免疫疾患は, 特に免疫を司る T 細胞とその周辺の細胞群との関連性で説明されている。一般に, 自己免疫疾患患者の血中には抗核抗体をはじめとするさまざまな自己抗体が出現することが知られている。SLE や RA における RNA ポリメラーゼなどの核蛋白に対する自己抗体, シェーグレン症候群患者における SSA や SS-B などの抗 RNP 抗体などが代表的な診断マーカーとされているが, 疾患特異的な自己抗体は少なく, 臓器固有の自己抗原蛋白が明らかにされたことはない。

RbAp48 遺伝子の同定

一般に自己免疫疾患の発症には女性優位の性差がみられるが、シェーグレン症候群は最も女性優位の自己免疫疾患であり（95 %以上）²⁾、閉経期前後の女性を中心に高頻度に発症する。自己免疫疾患の性差に関連する分子基盤については不明な点が多いが、筆者らはシェーグレン症候群の標的臓器である唾液腺にエストロゲン欠乏依存性にアポトーシスを誘導する因子として細胞周期関連タンパク RbAp48 を同定し⁷⁾、その遺伝子導入マウスにシェーグレン様病態が出現することを見出した⁸⁾。すなわち、タモキシフェン刺激ヒト唾液腺細胞（HSG）を用いてディファレンシャルディスプレイ法によるサブトラクションを行い、得られた遺伝子の中からエストロゲン欠乏によって発現する因子の一つとして RbAp48 を見出した。ヒトおよびマウスの種々の培養細胞株に RbAp48 遺伝子導入を行い検討した結果、ヒトおよびマウス唾液腺細胞のみでアポトーシスが確認された。さらに、細胞周期関連タンパクとしてリン酸化 Rb, E2F, cyclin D3, p14ARF, アポトーシス関連蛋白として Bax, Bad, p53, cytochrome c などの活性化が認められた。また、 α -フォドリンがアポトーシスに伴って 120KD に分断化されることも判明した。*in vivo* における RbAp48 遺伝子の機能を明らかにするために、唾液腺特異的プロモーター遺伝子 Parotid Secretory Protein (PSP) を用いたベクターに RbAp48 遺伝子を挿入し、トランスジェニック (TG) マウスの作成を試みた。TG マウスでは唾液腺・涙腺における RbAp48 タンパクの過剰発現とともに TUNEL 陽性アポトーシス細胞は早期から検出された。リンパ球浸潤などの炎症性病変は 24 週以降 50 週齢にかけて唾液腺・涙腺に限局して出現した。TG マウスでは明らかな唾液・涙液分泌障害が認められ、マウス血清中には SS-A, SS-B, α -フォドリンに対する自己抗体が認められた。本 TG マウスの病態解析により組織破壊に関与する浸潤細胞の多くは CD4 陽性 T 細胞であり、発症はいずれの時期も雌優位に認められた。TG マウスの脾臓 T 細胞を抗 TCR 抗体および抗 CD28 抗体で刺激すると Th1 型サイトカイン (IL-2, IFN- γ) 産生が誘導された。以上の所見から RbAp48-TG マウスにおける自己免疫病変は性差に関連したアポトーシスにより形成される自己抗原を特異的に認識する自己反応性 T 細胞が末梢において活性化されることにより発症していることが示され、シェーグレン症候群の病因を解明するうえで有用な新規モデルになり得ることが確認された。

おわりに

生体内では健常人でも自己抗原を認識する抗体が産生され、自己に対するリンパ球も存在することが知られている。しかし、通常の状態においては生体防御機構により自己免疫疾患の発症に至ることはない。自己免疫応答を抑制するメカニズムが機能していることが推測されているが、末梢トレランスの維持とその破綻機構の解明は今後の大きな課題である。自己免疫疾患の多くは原因不明の難病とされ、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。自己免疫疾患のなかでも女性優位に発症するシェーグレン症候群について性差の分子機構に関する実験的アプローチが加えられ、Rb 関連タンパク RbAp48 の過剰発現が明らかにされた^{7, 8)}。新たな疾患モデルとして RbAp48 遺伝子導入マウスは女性優位に発症するシェーグレン症候群の疾患特異的な治療法の開発にとって極めて有用であると思われる。

引用文献

- 1) 林 良夫, 新垣理恵子, 他: シェーグレン症候群発症の分子機構. 臨床免疫 40: 196-204 2003.
- 2) Whitacre, C.C.: Sex differences in autoimmune disease. Nat Immunol 2: 777-780 2001.
- 3) Murata, H., Kita, Y., et al.: Limited TCR receptor of infiltrating T cells in the kidneys of Sjögren's syndrome. patients with interstitial nephritis. J Immunol 155: 4084-4089 1995.
- 4) Haneji, N., Hamano, H., et al.: A new animal model for primary Sjögren's syndrome in NFS/sld mutant mice. J Immunol 153: 2769-2777 1994.
- 5) Haneji, N., Nakamura, T., et al.: Identification of α -fodrin as a candidate autoantigen in primary Sjögren's syndrome. Science 276: 604-607 1997.
- 6) Saegusa, K., Ishimaru, N., et al.: Prevention and induction of autoimmune exocrinopathy is dependent on pathogenic autoantigen cleavage in murine Sjögren's syndrome. J Immunol 169: 1050-1057 2002.
- 7) Ishimaru, N., Arakaki, R., et al.: Novel role of RbAp48 for tissue-specific estrogen deficiency-dependent apoptosis in the exocrine glands. Mol Cell Biol 26: 2924-2935 2006.
- 8) Ishimaru, N., Arakaki, R., et al.: Expression of the retinoblastoma protein RbAp48 in exocrine glands leads to Sjögren's syndrome-like autoimmune exocrinopathy. J Exp Med 205: 2915-2927 2008.