

Analysis of infiltrating T cells in labial salivary glands of patients with Sjögren's syndrome

大山, 順子
Graduate School of Dental Science, Kyushu University

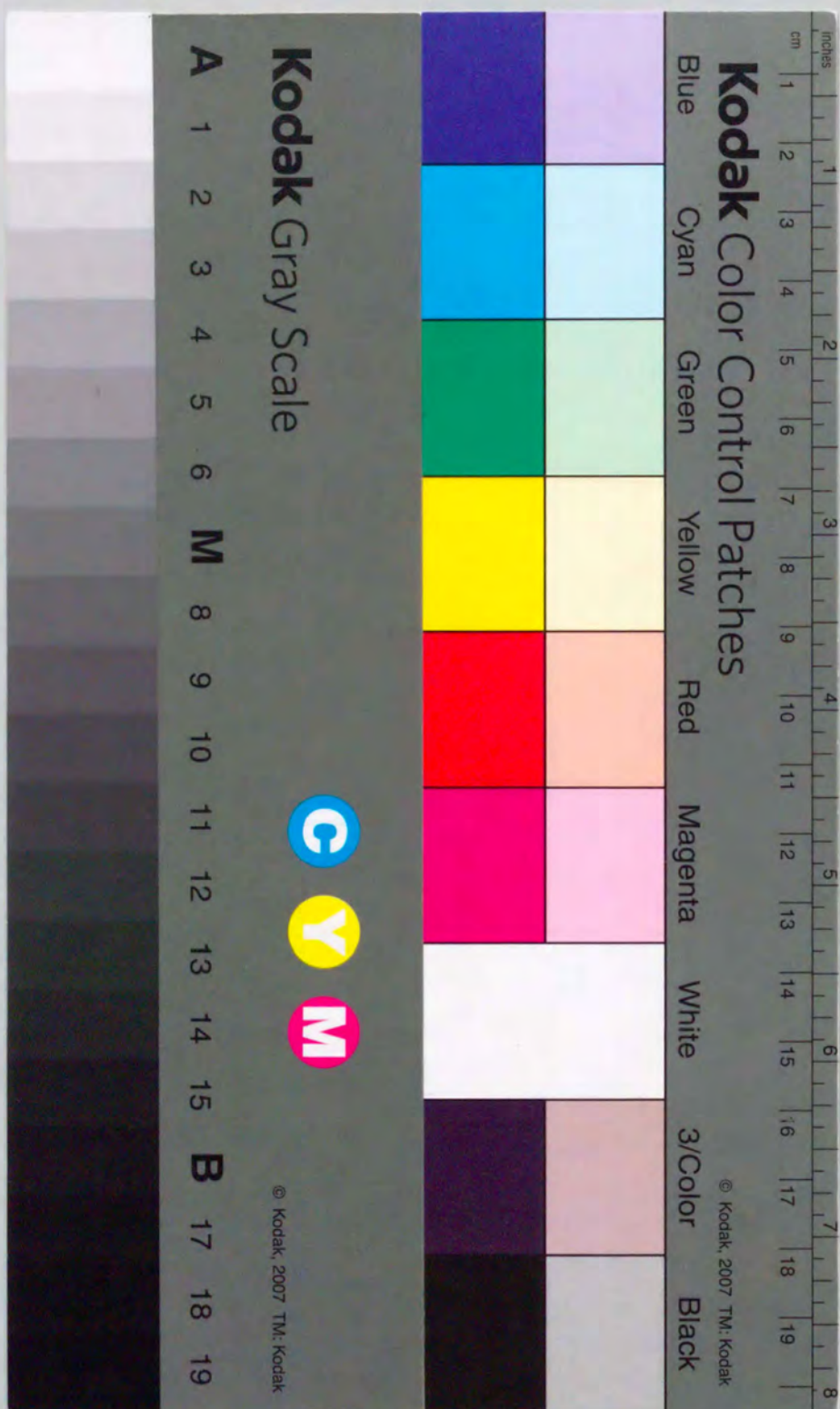
<https://doi.org/10.11501/3105010>

出版情報 : 九州大学, 1995, 博士 (歯学), 課程博士
バージョン :
権利関係 :



シェーグレン症候群患者の口唇腺
における浸潤T細胞の解析

大山順子



①

シェーグレン症候群患者の口唇腺における浸潤 T 細胞の解析

Analysis of infiltrating T cells in labial salivary glands of patients with Sjögren's syndrome

大山 順子

指導教官

九州大学歯学部口腔外科学第二講座

岡 増一郎 教授

中村 誠司 講師

九州大学生体防御医学研究所免疫学部門

野本亀久雄 教授

松崎 吾朗 助手

本研究の一部は、下記の論文に報告した。

T cell receptor V α and V β gene use by infiltrating T cells in labial glands of patients with Sjögren's syndrome

Y. Ohyama, S. Nakamura, G. Matsuzaki, M. Shinohara, A. Hiroki,
M. Oka and K. Nomoto

Oral Surg Oral Med Oral Pathol, in press

略語表

C α : constant region of T cell receptor α chain

C β : constant region of T cell receptor β chain

CD : cluster of differentiation

cDNA : complementary DNA

dNTP : deoxyribonucleoside triphosphate

EAE: experimental autoimmune encephalomyelitis (実験的自己免疫性脳脊髄炎)

IFN : interferon

IL : interleukin

MHC : major histocompatibility complex (主要組織適合性複合体)

PBMC : peripheral blood mononuclear cells (末梢血単核球)

PCR : polymerase chain reaction

rh IL-2 : recombinant human interleukin 2

SDS : sodium dodecyl sulfate

SS : Sjögren's syndrome (シェーグレン症候群)

1°SS : primary Sjögren's syndrome (一次性シェーグレン症候群)

2°SS : secondary Sjögren's syndrome (二次性シェーグレン症候群)

SSC : standard saline citrate

TCR : T cell receptor (T細胞レセプター)

TGF : transforming growth factor

TNF : tumor necrosis factor

V α : variable region of T cell receptor α chain

V β : variable region of T cell receptor β chain

目 次

要旨	1
緒言	2
材料と方法	4
結果	
I. 口唇腺浸潤リンパ球の免疫組織学的解析	12
II. 口唇腺浸潤 T 細胞の TCR 遺伝子のレパトア解析	13
III. 口唇腺におけるサイトカイン mRNA の発現の解析	17
IV. 口唇腺から樹立した T 細胞クローンの解析	21
考察	23
謝辞	29
参考文献	30

要 旨

シェーグレン症候群 (SS) は外分泌腺が特異的に障害をうける自己免疫疾患であり、病期の進展につれ、種々のリンパ球異常をひきおこす lymphoaggressive disorder と考えられている。病変局所に浸潤した T 細胞は SS の発症、進展に重要と考えられており、今回は唾液腺に浸潤した T 細胞の解析を行った。

免疫組織学的検索では、SS 患者の口唇腺に浸潤しているリンパ球の大部分は CD3, CD4, CD45RO, T 細胞レセプター (TCR) $\alpha\beta$ 陽性の T 細胞で、活性化抗原である CD25, CD69 を発現しているリンパ球は少数であった。Polymerase chain reaction (PCR) 法を用いた TCR V α および V β 遺伝子の発現の解析では、口唇腺での発現は多様であるものの末梢血単核球 (PBMC) に比べると限定されていた。また PBMC に比べて口唇腺での発現が優位な TCR V 領域遺伝子のファミリーはそれぞれの患者で複数認められ、患者間で異なっていた。これらのことから、口唇腺内の T 細胞の大部分は抗原非特異的に浸潤したものであるが、一部に抗原特異的に口唇腺内で増殖したものが存在し、これらは複数の TCR を使用している可能性が示唆された。

PCR 法を用いた口唇腺内でのサイトカイン mRNA の発現の解析では、IL-2, IFN- γ , IL-6, IL-10, TGF- β の mRNA 発現はすべての患者で認められ、IL-4, IL-5 の mRNA 発現は口唇腺内の B 細胞の浸潤が強い症例で有意に多く認められた。B 細胞の浸潤が軽度である口唇腺から T 細胞クローンの樹立を行ったところ、Th0 タイプと Th1 タイプの T 細胞クローンが樹立できた。これらの結果から、Th0 タイプあるいは Th1 タイプの T 細胞は SS の発症に重要であり、Th2 タイプの T 細胞は唾液腺局所での B 細胞の増殖、分化、さらには自己抗体の産生、B 細胞リンパ腫のような B 細胞の異常発現に関与する可能性が示唆された。

緒 言

シェーグレン症候群 (SS) は涙腺、唾液腺などの外分泌腺がリンパ球により特異的に障害を受ける臓器特異的自己免疫疾患と考えられており、その患者は口腔乾燥、眼乾燥 (乾燥性角結膜炎) などの乾燥症状を訴える¹⁾。また、SS はその病態の変化から 3 つのステージの病期に分類されている¹⁾。第一期はリンパ球の腺内浸潤を認める時期で、CD4 陽性 T 細胞の導管周囲への浸潤、さらに浸潤程度が強くなると B 細胞の浸潤も認める状態で、血清中に自己抗体を認めるようになる時期である。第二期になるとリンパ球は腺外組織にも浸潤し、偽リンパ腫や高ガンマグロブリン血症を生じるようになる。さらに第三期になると B 細胞リンパ腫が発生し、低ガンマグロブリン血症や免疫不全状態を生じるようになる。このような病態の変化があることから SS は lymphoaggressive disorder とも考えられている。

免疫組織学的検索により、その病態の初期においては主に CD4 陽性 T 細胞の唾液腺組織内、特に導管周囲への浸潤が認められ、さらにリンパ球の浸潤の強い症例では B 細胞が胚中心様に浸潤し、その周囲へ T 細胞の浸潤が認められることが報告されている²⁾。さらに、SS 患者の導管上皮は正常の導管上皮には発現されていない MHC class II 分子を発現していることも報告されている^{3,4)}。また、免疫遺伝学的検索により特別な MHC class II フェノタイプが SS の疾患感受性を有することも報告されている^{5,6,7,8)}。これらの報告から、他の臓器特異的自己免疫疾患と同様⁹⁾ に、SS では CD4 陽性 T 細胞が導管上皮に発現した MHC class II 分子上に提示された自己抗原を認識し、これらが SS の発症、持続に重要な役割を演じていると考えられる。

以上のように SS はきわめて興味深い病態をもった疾患であるが、その発症や病態の変化のメカニズムは不明のままである。私はこれらを解明するのを目的に、診断のために生検時に採取する口唇腺を用いて、SS の発症、病態の変化に重要であると考えられている病変局所に浸潤した T 細胞についての解析を行った。

自己免疫疾患などのヒトの病変局所の T 細胞を解析することは採取可能な組織が限られているため困難であったが、近年 polymerase chain reaction (PCR) 法という少量のサン

プルから遺伝子を増幅する方法が開発され、様々な解析が行われてきている。まず、私はこの PCR 法を用いて唾液腺に浸潤した T 細胞の T 細胞レセプター (TCR) 遺伝子の解析を行った。この解析方法を用いた報告は慢性関節リウマチ^{10,11,12,13,14)} や多発性硬化症^{15,16)} などの自己免疫疾患や腫瘍¹⁷⁾ などの疾患でも多数みられる。T 細胞は TCR で抗原提示細胞上の MHC に提示された抗原を認識するが、病変局所に特定の (病因となる) 抗原が存在すればこれを認識する TCR を持った oligoclonal な T 細胞が存在することが考えられる。Sumida らは一次性 SS (1°SS) 患者の口唇腺においては特定の TCR V β を持った T 細胞の浸潤が優位であることを報告している¹⁸⁾。今回はさらに解析を進めるため 1°SS と二次性 SS (2°SS) 患者において TCR V α , V β 両方のレパトアの解析を行った。

次に口唇腺に浸潤している T 細胞サブセットの機能を調べる目的で、SS 患者の口唇腺内でのサイトカイン mRNA の発現を PCR 法を用いて解析した。Mosmann らはマウスの T ヘルパー細胞はサイトカイン産生能から IL-2, IFN- γ などを産生する Th1 細胞と IL-4, IL-5 などを産生する Th2 細胞に分類されることを報告し、これらが感染の場などで相反する作用を引き起こすことを報告してきた^{19,20,21)}。その後ヒトにおいても同様の Th1, Th2 タイプの T 細胞の存在が報告され、これらは相互に調節を行っていることも明らかになってきた^{22,23,24,25,26)}。自己免疫疾患モデルではその病態の変化とサイトカイン mRNA の発現の変化についての報告がなされている^{27,28,29)}。しかし、ヒト自己免疫疾患においてはサイトカインの産生、mRNA の発現についての報告はあるが^{30,31)}、その病態の変化との関係についての報告は少ない¹⁶⁾。SS については Fox らが 3 症例について耳下腺生検標本から得られた T 細胞のサイトカイン mRNA の発現の報告をしているが³²⁾、病態の変化との関係については言及していない。私は SS 患者の口唇腺のサイトカイン mRNA の発現を組織学的所見と比較することにより、病態の変化と局所でのサイトカイン mRNA の発現との関連についての検討を行った。さらに、Itoh らの方法に従って³³⁾ 口唇腺から T 細胞クローンを樹立し、個々の細胞のレベルでのサイトカイン mRNA の発現の解析も併せて行った。

材料と方法

(1) 対象患者

九州大学歯学部附属病院第二口腔外科を受診した SS 患者 (TCR 遺伝子のレパトア解析では 20 名、サイトカイン mRNA の発現の解析では 15 名、T 細胞クローン作製では 1 名、ただし一部重複する) を対象に検索を行った。これらの患者は SS の診断基準である厚生省シェーグレン症候群診断基準³⁴⁾ およびヨーロッパ診断基準³⁵⁾ を満たしており、1) 口渇の訴えや唾液分泌量の減少、2) 耳下腺造影における異常像、3) 口唇腺へのリンパ球の浸潤などの唾液腺の障害を認めた。組織学的分類には Chisholm & Mason の分類³⁶⁾ を用い、TCR 遺伝子のレパトア解析を行った症例群では 9 例が grade 3、11 例が grade 4 であり、サイトカイン mRNA の発現の解析を行った症例群では 2 例が grade 2、5 例が grade 3、8 例が grade 4 であった。患者は全て女性で年齢は 18 歳から 70 歳であり、他の自己免疫疾患を合併していない 1°SS が TCR 遺伝子のレパトア解析群では 11 例、サイトカイン mRNA の発現の解析群では 8 例であり、他の自己免疫疾患を合併する 2°SS は TCR 遺伝子のレパトア解析群では 9 例、サイトカイン mRNA の発現の解析群では 7 例で、これら 2°SS 患者は皮膚筋炎、全身性進行性硬化症、全身性エリテマトーデス、慢性関節リウマチ、原発性胆汁性肝硬変、橋本病などを合併していた。

(2) 免疫組織学的ならびに組織学的解析

口唇腺生検時に得られた口唇腺は直ちに O.C.T. コンパウンド (Miles) に包埋し凍結した。凍結切片は通常の avidin-biotin complex 法を用いて免疫染色を行った³⁷⁾。使用したモノクローナル抗体は Leu-3a+3b, Leu-2a (それぞれ抗 CD4 抗体、抗 CD8 抗体、Becton Dickinson)、UCHL-1 (抗 CD45 RO 抗体、ニチレイ)、 β -F1, TCR- δ (それぞれ抗 TCR $\alpha\beta$ 抗体、抗 TCR δ 抗体、T Cell Science)、TE, T3-II, B1, G38, AE1 (それぞれ抗 CD2 抗体、抗 CD3 抗体、抗 CD20 抗体、抗 CD69 抗体、抗 CD25 抗体、バージニア大学 S.M.Fu 博士より供与) であった。各抗体陽性細胞の陽性率は、連続するヘマトキシリン-エオジン染色切

片中の総単核球数と各抗体による免疫組織染色切片の陽性細胞数を 3 ヶ所の 4 mm² の範囲内で計測し、各抗体陽性細胞数/総単核球数の比率を求めることによって計算した。

(3) RNA の抽出ならびに complementary DNA (cDNA) の合成

生検時に採取した口唇腺は直ちに液体窒素を用いて凍結し、RNA 抽出時まで -80°C で保存した。また、同時に静脈血をヘパリン採血し、これをリン酸緩衝液で 3 倍に希釈し Ficol-Hypaque (Pharmacia) に重層した。25°C、400×g で 30 分間遠心し、中間層の単核球を採取し、この末梢血単核球 (PBMC) をリン酸緩衝液で 3 回洗浄後以下の実験に用いた。

RNA の抽出には Chomczynski らの acidifide-guanidium-phenol-chloroform 法³⁸⁾ を用いた。口唇腺、PBMC は 1 ml の solution D (4 M グアニジンチオシアネート、25 mM クエン酸ナトリウム (pH 7.0)、0.1 M 2-メルカプトエタノール (以上、和光純薬)、0.5 % ラウリル酸サルコシル (Sigma)) 内で、PBMC は 21 G 針とシリンジ、口唇腺はポリトロン (Kinematica) を用いてホモジネートした。これに 0.1 ml の 2 M 酢酸ナトリウム (和光純薬)、1 ml の水飽和フェノール (BRL)、0.2 ml のクロロホルム、イソamilアルコール (以上、和光純薬) 49:1 混合液を加えて攪拌後、15 分間氷冷した。4°C、10,000 rpm で 20 分間遠心し、RNA を含む水層を採取し、これに 1 ml の イソプロピルアルコール (和光純薬) を加えて攪拌後、-20°C で 1 時間静置した。その後、4°C、10,000 rpm で 20 分間遠心し、上清を除去後に得られた RNA ペレットを再び 0.3 ml の solution D に溶解し、0.3 ml の イソプロピルアルコールを加え攪拌後 -20°C で 1 時間静置した。その後、4°C、10,000 rpm で 10 分間遠心し、再沈澱後に沈澱を 75 % エタノール (和光純薬) で洗浄後乾燥し、0.1 % diethyl pyrocarbonate (Sigma) に溶解した。

TCR 遺伝子のレパトア解析に用いた cDNA の合成は以下のように行った。3 μ g の total RNA に 20 U RNasin ribonuclease inhibitor (Promega)、1 mM TCR C α または C β アンチセンスプライマー、0.5 mM 各デオキシリボヌクレオチド 3 リン酸 (dNTP) (Pharmacia)、反応緩衝液、10 mM dithiothreitol、100U RNase H⁻ reversetranscriptase (BRL) を加え、37°C で 1 時間インキュベートした。その後、95°C で 5 分間加温して酵素を失活させ、直

表 1. TCR レパトア検出に用いた PCR のプライマーおよびプローブの塩基配列

Primer	Sequence	Primer	Sequence
Vα1	CTGAGGTGCAACTACTCA	Vβ1	GCACAACAGTTCCTGACTTGAC
Vα2	GTGTTCCAGAGGGAGCCATTGCC	Vβ2	TCATCAACCATGCAAGCCTGACCT
Vα3	GGTGAACAGTCAACAGGGAGA	Vβ3	GTCTCTTAGAGAGAAGAAGGAGCGC
Vα4	ACAAGCATTACTGTACTCCTA	Vβ4	ACATATGAGAGTGGATTTGTCATT
Vα5	GGCCCTGAACATTTCAGGA	Vβ5.1	ATACTTCAGTGAGACACAGAGAAAC
Vα6	GTCACCTTCTAGCCTGCTGA	Vβ5.2-3	TTCCCTAACTATAGCTCTGAGCTG
Vα7	AGGAGCCATTGTCCAGATAAA	Vβ6.1-3	AGGCCTGAGGGATCCGTCTC
Vα8	GGAGAGAATGTGGAGCAGCATC	Vβ7	CCTGAATGCCCAACAGCTCTC
Vα9	ATCTCAGTGCTTGATAATA	Vβ8	ATTTACTTTAACAACAACGTTCCG
Vα10	ACCCAGCTGCTGGAGCAGAGCCCT	Vβ9	CCTAAATCTCCAGACAAAGCTCAC
Vα11	AGAAAGCAAGGACCAAGTGT	Vβ10	CTCCAAAACTCATCCTGTACCTT
Vα12	CAGAAGGTAAGTCAAGCGCAGACT	Vβ11	TCAACAGTCTCCAGAATAAGGACG
Vα13	GCTTATGAGAAGCACTGCGT	Vβ12	AAAGGAGAAGTCTCAGAT
Vα14	GCAGCTTCCCTTCCAGCAAT	Vβ13.1	CAAGGAGAAGTCCCAAT
Vα15	AGAACCTGACTGCCCAGGAA	Vβ13.2	GGTGAGGGTACAAGTCC
Vα16	CATCTCCATGGACTCATATGA	Vβ14	GTCTCTCGAAAAGAGAAGAGGAAT
Vα17	GCATATACTAACAGCATGT	Vβ15	AGTGCTCTCGACAGGCACAGGCT
Vα18	TGTCAGGCAATGACAAGG	Vβ16	AAAGAGTCTAAACAGGATGAGTCC
Cα anti-sence	AATAGGTGACAGACTTGCTACTGGA	Vβ17	CAGATAGTAAATGACTTTCAG
Cα sence	GAACCCTGACCCTGCCGTGTACC	Vβ18	GATGAGTCAGGAATGCCAAAGGAA
Cα anti-sence	ATCATAAATTCGGGTAGGATCC	Vβ19	CAATGCCCCAAGAACGCACCCTGC
		Vβ20	AGCTCTGAGGTGCCCAAGATCTC
		Cβ anti-sence	TTCTGATGGCTCAAACAC
		Cβ sence	GTGTTTGAGCCATCAGAA
		Cβ anti-sence	TCAGGCGGCTGCTCAGGCAGTA

ちに氷冷した。なお、ここで用いた Cα, Cβ アンチセンスプライマーおよび以後の TCR 遺伝子のレパトア解析に用いたプライマー、プローブはサイクロプラス DNA シンセサイザーおよびその専用試薬 (Millipore) を用いて合成、精製を行った。一方、サイトカイン mRNA の発現の解析に用いた cDNA の合成は、TCR Cα または Cβ アンチセンスプライマーの代わりに 0.5 μg oligo d(T)₁₂₋₁₈ (Pharmacia) を用いた以外は同様に行った。

(4) PCR を用いた増幅と評価

1) TCR 遺伝子のレパトア解析

PCR による増幅に際し、まず 10 mM トリス塩酸 (pH 9.0)、50 mM 塩化カリウム、1.5 mM 塩化マグネシウム、0.1 % Triton X-100 を含んだ反応緩衝液 (Perkin-Elmer/Cetus) に、0.2 mM dNTP、25 U/ml Taq DNA polymerase (Perkin-Elmer/Cetus) を加え、反応液を作った。これに TCR α 鎖については 1/19 量の、TCR β 鎖については 1/23 量の cDNA、それぞれ 0.4 mM の各 Vα または Vβ に特異的なセンスプライマー、0.4 mM の Cα または Cβ に特異的なアンチセンスプライマーを加えて PCR を行った。使用したプライマーは過去に報告されたもので^{16,39)}、その塩基配列を表 1 に示す。PCR にはサーマルサイクラー (Perkin-Elmer/Cetus) を用い、反応条件は denaturation ステップが 95 °C で 1 分間、annealing ステップが 55 °C で 1 分間、extension ステップが 72 °C で 1 分間を 1 サイクルとし、24 サイクル後の 3 サイクルごとにそれぞれの反応産物を 10 μl ずつ採取し、1.8 % アガロースゲル (和光純薬) 上で電気泳動を行った。その後ナイロンフィルター Gene Screen Plus (NEN) にサザンプロットを行い、2× standard saline buffer (SSC)、1 M 塩化ナトリウム、1 % sodium dodecyl sulfate (SDS) (以上、和光純薬)、10 % デキストラン硫酸塩 (Pharmacia)、100 mg/ml 熱変性サケ精子 DNA (Sigma) のハイブリダイゼーション緩衝液に ³²P で標識した Cα または Cβ のオリゴヌクレオチドプローブを加えてハイブリダイゼーションを行った。プローブの標識には T4 polynucleotide kinase を利用したキット MEGALABEL (Takara) と [³²P] ATP (Amersham) を用いた。50 °C、18 時間のハイブリダイゼーションの後、フィルターは 50 °C の 2×SSC、1 % SDS 溶液で 2 回洗浄した。オートラジオグラフィ後、Fuji BA100 バイオイメージアナライザー (富士フィルム) を用いて各 Vα, Vβ に特異的なバンドの放射活性を測定した。各サイクルにおける放射活性を測定し、その放射活性が指数関数的に増加している範囲を確認して、Kerckhove ら⁴⁰⁾ の方法に準じて % Vα または % Vβ を求めることにより各 Vα, Vβ の PCR 産物の相対量を決定した。% Vα または % Vβ は以下のような式で算出した。% Vα または % Vβ = 100 × (各 Vα または Vβ に特異的なバンドの放射活性 / 全ての Vα または Vβ に特異的なバンドの放射活性の合計)

表2. サイトカイン mRNA の検出に用いた PCR のプライマーおよびプローブの塩基配列

Molecule	Primer	Sequence
β-actin	Sence	GTGGGGCGCCCCAGGCACCA
	Anti-sence	CTCCTTAATGTCACGCACGATTTTC
	Probe	CTGCTGACCGAGGCCCTGAACCCC
CD38	Sence	CTGGACCTGGGAAAACGCATC
	Anti-sence	GATCTGAGCATCATCTCGATC
	Probe	GCCGACACACAAGCTCTGTTGAGGA
IL-2	Sence	ACTCACCAGGATGCTCACAT
	Anti-sence	AGGTAATCCATCTGTTCAGA
	Probe	CTGGAGGAAGTGCTAAATTTAGCT
IL-4	Sence	CTTCCCCCTCTGTTCTTCCT
	Anti-sence	TTCCTGTGCGAGCCGTTTCAG
	Probe	CTCGGTGCTCAGAGTCTTCTGCTCT
IL-5	Sence	ATGAGGATGCTTCTGCATTTC
	Anti-sence	TCAACTTTCTATTATCCACTCGGTGTTTCATTAC
	Probe	GCCAATGAGACTCTGAGGATTCCTG
IL-6	Sence	ATGTAGCCGCCCCACACAGA
	Anti-sence	CATTCATCTTTTTCAGCCAT
	Probe	CTGAGAAAGGAGACATGTAACAAGA
IL-10	Sence	ATGCCCCAAGCTGAGAACCAAGACCCA
	Anti-sence	TCTCAAGGGGCTGGGTCAGCTATCCCA
	Probe	TCCAACAGAAAGGCATCTAC
IL-12 (p40)	Sence	CCAAGAACTTGCAGCTGAAG
	Anti-sence	TGGGTCTATTCCGTTGTGTC
	Probe	TGCGTTCAGGTCCAGGGCAAGAGC
IFN-γ	Sence	AGTTATATCTTGCTTTTCA
	Anti-sence	ACCGAATAATTAGTCAGCTT
	Probe	ATTTGGCTCTGCATTATTTTCTGT
TGF-β	Sence	GCCCTGGACACCAACTATTGC
	Anti-sence	GCTGCACTTGAGGAGCGCAC
	Probe	CAGTACAGCAAGGTCCTGGGCCTG

2) サイトカイン mRNA の発現の解析

サイトカイン mRNA の発現の解析は Yamamura ら¹⁷⁾の方法による PCR 法で行った。反応緩衝液は塩化マグネシウムを 2.5 mM にした以外は TCR 遺伝子のレパトア解析の時と同様で、これに 0.2 mM dNTP、1 mM 5' と 3' オリゴヌクレオチドプライマー、種々の濃度の cDNA、100 U/ml Taq DNA polymerase を加え、サーマルサイクラーにて増幅を行っ

た。プライマーおよびインターナルプローブの塩基配列は表2に示す通りであるが、いずれも過去に報告されたものであり^{17,24,41)}、これらは北里大学皮膚科藤村響男博士から供与されたものである。反応条件は denaturation ステップが 94℃で、初回は 5 分間、2 回目以降は 40 秒間、annealing / extension ステップが IL-2 と IFN-γの場合は 55℃、他のサイトカインと β-actin, CD38 の場合は 65℃で 90 秒間とした。PCR 産物は TCR 遺伝子のレパトア解析の時と同様に電気泳動、サザンプロットを行い、³²P で標識したインターナルプローブを用いてハイブリダイゼーションを行い、その後オートラジオグラフィーを行った。ただしナイロンフィルターは Nytran (Schleicher & Schuell) を用いた。

患者間の各サイトカイン mRNA の発現量を比較するための半定量化は、Yamamura らの方法¹⁷⁾に準じた。T 細胞のマーカーとしては CD38 mRNA、すべての細胞のマーカーとしては β-actin mRNA を用い、全症例で等量の PCR 産物が検出されるように、以下のような方法で cDNA 量を調整した。まず、全ての患者の cDNA を 5 倍希釈系で希釈して、それぞれを CD38 あるいは β-actin のプライマーを用いて増幅させ、27, 30, 33 サイクルの増幅時に PCR 産物を採取し、電気泳動、サザンプロット、³²P で標識したオリゴヌクレオチドのインターナルプローブを用いたハイブリダイゼーションを行い、個々の PCR 産物の放射活性を測定した。CD38 と β-actin の両者において、この PCR のサイクル数では増幅効率プラトー相には達しておらず、またすべての患者において同じ増幅効率であることが確認された。さらに図1に示すように、5 倍希釈系で希釈した cDNA の PCR 産物は直線的に減少しており、その減少率は患者間で同じであった。このようにして、CD38 または β-actin mRNA の PCR 産物がすべての患者で等量になるような cDNA 量を 3 回の実験から決定した。そしてこの決定した cDNA 量をさらに 5 倍希釈系で希釈して、各サイトカインのプライマーを用いた増幅を 33 サイクル行なった。CD38, β-actin の場合と同様にハイブリダイゼーション、オートラジオグラフィーを行い、サイトカイン mRNA の PCR 産物を検出し、以下のように各サイトカイン mRNA の発現量を分類した。
-: 最高濃度の cDNA を用いても検出できなかった症例、+: 最高濃度の cDNA でのみ検出できた症例、++: 5 倍希釈まで検出できた症例、+++: 25 倍希釈以上でも検出できた症例。

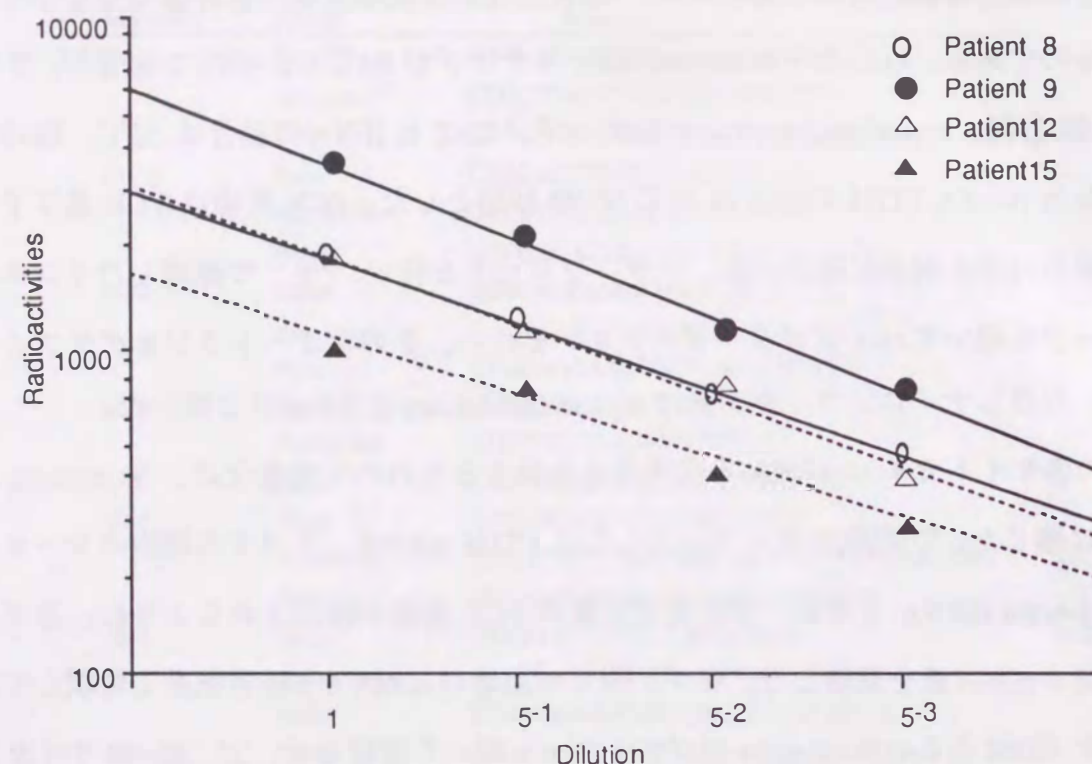


図 1. 5 倍希釈系で希釈した cDNA を用いた CD3 δ の PCR 産物の放射活性
PCR 産物の放射活性の減少は患者間でほぼ同じであった。
代表的な症例を示す。 β -actin も同様の結果となった。

(5) T 細胞クローンの作製

T 細胞クローンの作製に用いた口唇腺は、慢性関節リウマチを発症した 3 カ月後に口
渇を自覚した 39 歳、女性の 2° SS 患者から採取されたもので、これを細切し、ガーゼ
フィルターを通して単離細胞を採取した。Itoh らの方法³³⁾に従って、RPMI 1640 (Gibco),
10% ウシ胎児血清 (Hyclone) 培養液に、50 Gy 照射した 3 人の同種異型の健常者の PBMC
を 2×10^6 cells / ml の濃度で、さらに rh IL-2 50 JRU / ml (武田薬品より供与) と $10 \mu\text{g} / \text{ml}$
phytohaemagglutinin (Sigma) を加え、これに限界希釈法を用いて調整した口唇腺の単核球
を加えて、U 底 96 穴プレートで培養を行った。その後 50 Gy 照射した別の 3 人の健常
者から得た 1×10^6 cells / ml の PBMC、50 JRU / ml の rh IL-2 を 1 週間毎に加え、増殖し
てきたクローンを適宜スケールアップして増殖させてクローンの解析を行った。

(6) 統計

口唇腺と PBMC の検出できたバンドの数の比較には Student's t 検定を用い、サイトカ
イン mRNA 発現と CD20 陽性細胞の割合のグループ間の比較には Mann-Whitney U 検定
を用い検定を行った。

結 果

I. 患者口唇腺浸潤リンパ球の免疫組織学的解析

表 3. シェーグレン症候群患者の口唇腺浸潤リンパ球の免疫組織学的解析

Surface marker	Percentage of stained lymphocytes*		
	1°SS (n=11)	2°SS (n=9)	Total (n=20)
CD2	73.8±10.5	75.6±13.7	74.1±11.8
CD3	72.1±10.8	73.1±12.5	72.6±11.3
CD45RO	72.0± 5.7	71.7±15.1	71.9±10.6
CD20	12.9±13.4	14.9±15.3	16.6±14.8
CD4	45.1±10.7	45.4± 4.7	45.2±10.4
CD8	19.0± 8.1	23.4± 7.9	22.3± 9.4
TCRαβ	73.1± 7.7	73.3±14.7	73.2±11.0
TCRγδ	0.6± 0.3	1.4± 0.4	0.9± 0.9
CD25	0.7± 0.7	1.3± 0.7	1.0± 0.9
CD69	1.3± 0.9	1.4± 0.5	1.3± 0.9

* 陽性細胞の割合は 3ヶ所の 4 mm² の範囲内の細胞数を計測し、各抗体の陽性細胞数/総単核球数×100を計算した。結果は平均パーセント±SDを示している。

SS 患者の口唇腺内に浸潤しているリンパ球のサブセットを調べるために、CD2, CD3, CD45RO, CD4, CD8, CD20, CD25, CD69, TCRαβ, TCR Cδ に対するモノクローナル抗体を用いて凍結切片の免疫染色を行った。表 3 は 20 症例の結果を示し、代表的な症例を図 2 に示している。CD2, CD3, CD45RO 陽性細胞の総単核球に占める割合は 70 % を越えており、全ての患者において CD8 陽性細胞に比べて CD4 陽性細胞が優位であった。大部分の T 細胞が TCR αβ を発現しており、TCR γδ を発現する T 細胞は極く少数であった。活性化リンパ球の表面マーカーである CD25、CD69 の陽性細胞は 20 症例全体でそれぞれ 1.0 %, 1.3 % と少数であった。以上のことから、SS 患者口唇腺に浸潤している単核球の大部分は αβ 型 T 細胞で、その大部分は CD45 RO 陽性の "memory" T 細胞であるが、活性化した細胞は少数であることが明らかになった。

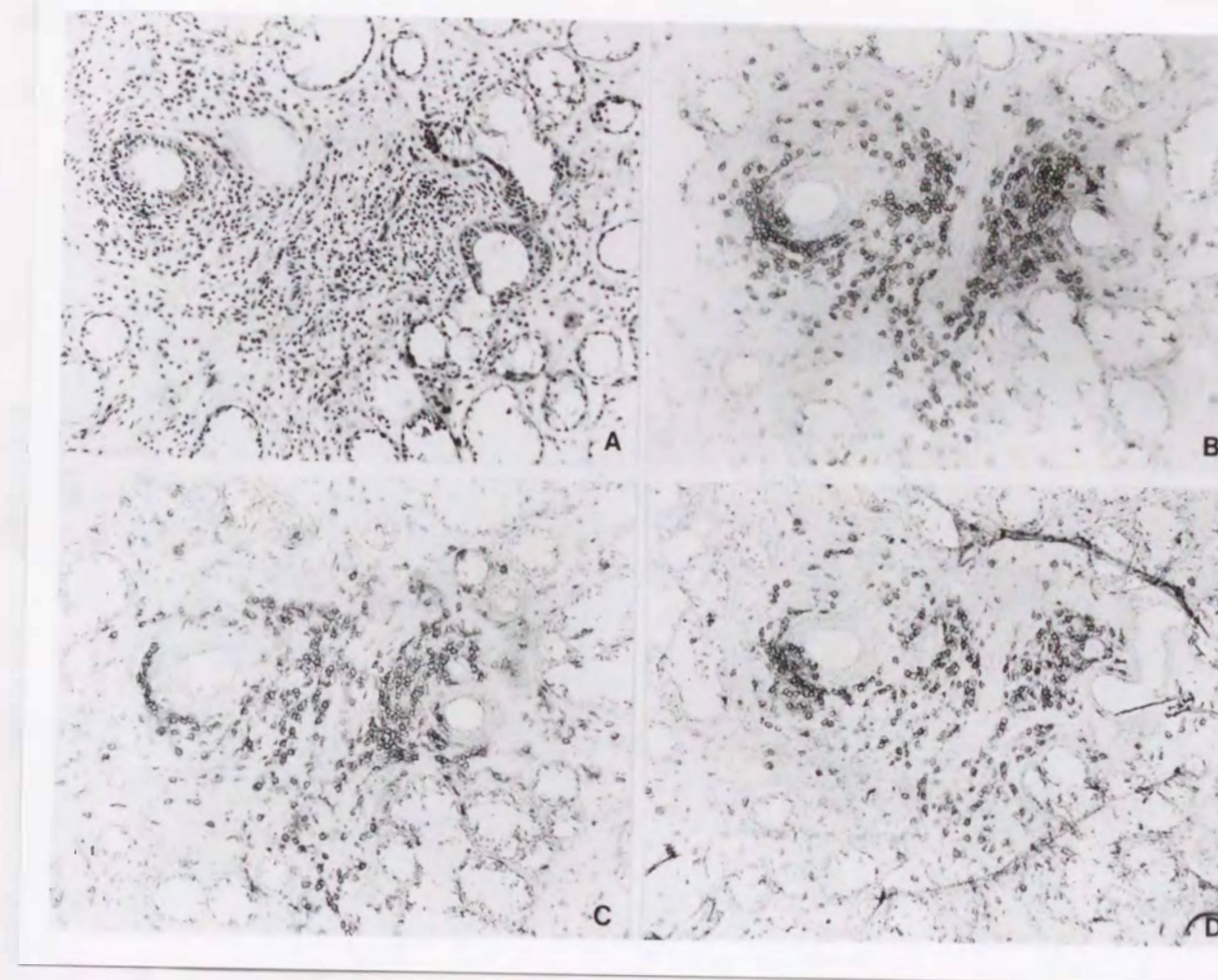


図 2. SS 患者の口唇腺に浸潤した T 細胞 A: ヘマトキシリン-エオジン染色 B-D: 連続切片をそれぞれ B; T3-II (抗 CD-3 抗体), C; UCHL-1 (抗 CD45RO 抗体), D; βF1 (抗 TCRαβ 抗体)を用いて ABC 法にて染色した (倍率 ×180)。

II. 口唇腺浸潤 T 細胞の TCR 遺伝子のレパトア解析

SS 患者の口唇腺内の大部分の浸潤 T 細胞は TCRαβ 鎖を発現していることが免疫組織学的解析で示されたため、TCR Vα および Vβ のレパトアを各 Vα および Vβ に特異的なプライマーと Cα および Cβ に特異的なプライマーを用いた PCR 法で解析した。代表的なオートラジオグラフィーの結果を図 3 に示す。すべての患者において PBMC における Vα および Vβ のレパトアは多様であり、検出された Vα および Vβ のファミリーの数はそれぞれ 18.4±3.1、17.2±3.4 であった。これに対して口唇腺でも多数の Vα および Vβ

のファミリーが検出されたが、その数はそれぞれ 15.6 ± 2.0 、 13.3 ± 4.1 で PBMC に比べて有意に少なかった (Student's *t* 検定、危険率 0.01 未満)。したがって、口唇腺における $V\alpha$ および $V\beta$ のレパトアは多様性に富んではいるが、PBMC に比べると限られていることが示された。

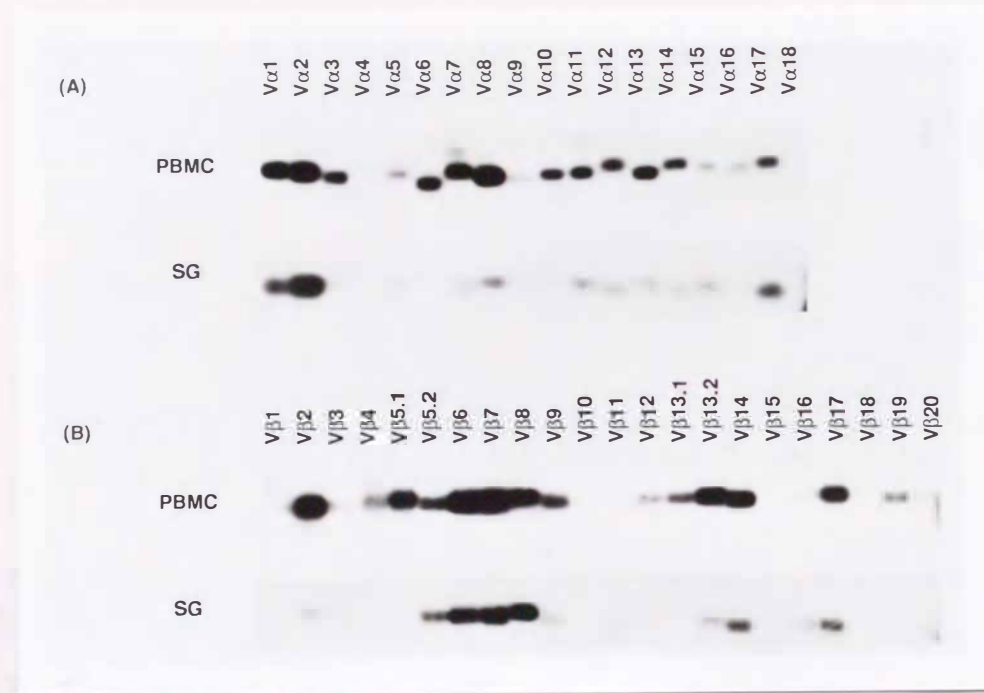


図3. SS患者の口唇腺(SG)およびPBMCにおけるTCR $V\alpha$, $V\beta$ の発現
(A); TCR $V\alpha 1-18$, $C\alpha$, (B); TCR $V\beta 1-20$, $C\beta$ のプライマーを用いて 27 サイクルのPCRを行い、サザンブロット、 ^{32}P でラベルした $C\alpha$, $C\beta$ プロンプでハイブリダイゼーションを行った結果を示す。

つぎに、口唇腺とPBMCにおける% $V\alpha$ および% $V\beta$ のレパトアの比較を行った。この際、口唇腺における% $V\alpha$ および% $V\beta$ がPBMCにくらべて50%以上大きいファミリーを"口唇腺でのそのファミリーの発現が優位である"と定義した。ただし、口唇腺における% $V\alpha$ および% $V\beta$ が5%未満のファミリーについては実験の再現性がなく、また生物学的にも無意味と考え、比較の対象から除外した。結果の評価に際しては、表4、表5に示すようにPBMCに比べて口唇腺でのそのファミリーの発現が100%を越えて

表4. シェーグレン症候群患者の口唇腺におけるTCR $V\alpha$ 遺伝子の発現

(1) 1° SS		$V\alpha$ families																	
Patient no.		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1		↑↑											↑↑						
2		↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
3													↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
4													↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
5													↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
6													↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
7													↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
8													↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
9													↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
10													↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
11													↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
Total observed*		4	5	2	1	1	1	2	3	1	2	4	5	3	2	3	1	5	0
(2) 2° SS		$V\alpha$ families																	
Patient no.		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
12		↑											↑↑						
13		↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
14		↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
15		↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
16		↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
17		↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
18		↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
19		↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
20		↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
Total observed*		2	1	4	0	2	3	1	4	2	1	2	2	0	3	0	0	0	0

口唇腺における各 $V\alpha$ ファミリーの% $V\alpha$ をPBMCの各% $V\alpha$ と比較し、以下のように示した。
 ↑ : PBMCに比べて口唇腺での発現が100%を越えて増加しているファミリー
 ↑↑ : PBMCに比べて口唇腺での発現が50-100%増加しているファミリー
 * : PBMCに比べて口唇腺での発現が50%未満のファミリー
 無印 : 口唇腺での発現が優位な症例数を示す。

表 5. シェーグレン症候群患者の口唇腺における TCR Vβ 遺伝子の発現

(1) 1° SS

		V β families																				
Patient no.	1	2	3	4	5.1	5.2	6	7	8	9	10	11	12	13.1	13.2	14	15	16	17	18	19	20
1												↑↑	↑↑					↑↑	↑↑			
2					↑		↑					↑↑				↑						↑↑
3																						
4		↑↑	↑↑		↑		↑↑	↑↑	↑↑	↑↑		↑↑	↑					↑↑	↑↑	↑		↑↑
5									↑↑	↑↑												
6									↑													↑↑
7																↑↑						↑↑
8					↑↑	↑		↑	↑	↑		↑↑										
9								↑	↑	↑		↑↑							↑			
10					↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑												
11					↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑												
Total observed*	0	1	1	0	4	2	3	3	6	2	0	3	2	2	0	2	0	2	4	0	0	3

(2) 2° SS

		V β families																				
Patient no.	1	2	3	4	5.1	5.2	6	7	8	9	10	11	12	13.1	13.2	14	15	16	17	18	19	20
12	↑↑			↑↑		↑↑									↑↑							
13		↑↑																				
14					↑		↑↑	↑↑	↑↑	↑↑												
15					↑		↑↑	↑↑	↑↑	↑↑												
16							↑	↑	↑	↑				↑↑	↑↑	↑↑	↑↑		↑↑			
17										↑↑				↑↑	↑↑	↑↑	↑↑					
18							↑	↑	↑	↑		↑↑										
19		↑↑			↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑													
20															↑							
Total observed*	1	2	0	1	2	4	2	5	3	2	0	1	0	0	2	4	1	0	1	0	0	0

口唇腺における各 Vβ ファミリーの % Vβ を PBMC の各 % Vβ と比較し、以下のように示した。
 ↑↑ : PBMC に比べて口唇腺での発現が 100 % を越えて増加しているファミリー
 ↑ : PBMC に比べて口唇腺での発現が 50-100 % 増加しているファミリー
 * : PBMC に比べて口唇腺での発現が 50 % 未満のファミリー
 口唇腺での発現が優位な症例数を示す。

増加している群 (↑↑)、50% から 100 % の増加を示す群 (↑)、50 % 未満の増加を示す群 (無印) の 3 群に分類した。表 4, 表 5 に示すように、PBMC に比べて口唇腺で優位な Vα および Vβ のファミリーは各患者で複数認められ、患者間で異なっていた。今回検索した SS 患者全体を通してみると、Vα8, Vα12 および Vβ 8 が口唇腺での発現が優位である頻度が比較的に高いファミリーであったが、半数以上の患者で優位であったファミリーはみられなかった。また、PBMC に比べて口唇腺での発現が優位なファミリーは 1°SS と 2°SS の間で異なる傾向にあり、1°SS においては Vα2, Vα12, Vα17, Vβ8、2°SS においては Vα3, Vα8, Vβ5.2, Vβ7, Vβ14 の頻度が比較的に高かった。そして 2°SS における Vβ 7 のみが半数以上の患者で優位であったファミリーであった。リンパ球の浸潤程度や CD3 /CD20 比などの組織学的な差異と優位な Vα および Vβ のファミリーとの間には明らかな関係は認められなかった。

III. 口唇腺におけるサイトカイン mRNA の発現の解析

IL-2, IFN-γ, IL-4, IL-5, IL-10 といった主に T 細胞により産生されるサイトカインの検出の際には、全症例で等量の CD3δ mRNA の PCR 産物が検出できるように cDNA 量を調整した。15 症例のまとめは表 6 に示し、図 4 は代表的な患者 1 と患者 15 のオートラジオグラフィー像を示している。ただしこの患者番号と前述の TCR レパトアの項の患者番号は同一ではない。IL-2, IFN-γ, IL-10 の mRNA の発現はすべての症例で認められ、サイトカイン mRNA の発現程度と口唇腺のリンパ球浸潤程度、リンパ球サブセットの間には明らかな関係は認められなかった。一方、IL-4, IL-5 の mRNA の発現はそれぞれ 8 症例、6 症例で認められ、サイトカイン mRNA の発現の有無とリンパ球浸潤程度の間には明らかな関係は認められなかった。しかし、図 5 に示すように、口唇腺内の CD20 陽性 B 細胞の割合は IL-4, IL-5 の mRNA の発現が認められる症例では認められない症例に比べて有意に高かった。IL-4, IL-5 の mRNA の発現が認められなかった症例については 10 倍量の cDNA を用いても増幅を行ったが、IL-4, IL-5 mRNA は検出できなかった。PCR 産物から cDNA の正確な定量はできなかったが、IL-4, IL-5 mRNA が検出できた群とできなかった群の間には少なくとも 25 倍以上のサイトカン cDNA 量の差が存在すると考

表 6. シェーグレン症候群患者の口唇腺における組織学的所見とサイトカイン mRNA 発現

Patient no.	Lymphocytic infiltration	Surface markers *			Expression of mRNA **							
		CD3	CD20	CD3/CD20	IL-2	IFN- γ	IL-4	IL-5	IL-10	IL-6	IL-12	TGF- β
1	2	83.4	2.0	41.7	++	+++	-	-	+	++	-	+
2	2	72.4	14.3	5.1	+++	+++	+	+	+	+++	-	+
3	3	86.6	4.2	20.6	+++	+	-	-	+	+++	++	+
4	3	86.3	4.9	17.6	++	+++	-	-	+	+++	+	++
5	3	74.0	6.1	12.1	+	+++	+	-	+	+++	-	++
6	3	73.0	23.8	3.1	+	+	-	-	+	+	-	++
7	3	72.4	25.0	2.9	++	++	-	+	+	++	-	++
8	4	82.3	3.9	21.1	+++	+++	-	-	+	+++	+	+++
9	4	89.1	4.9	18.2	+++	+++	-	-	+	+++	+	+++
10	4	66.7	11.7	5.7	++	+++	++	-	+	+++	-	++
11	4	78.2	14.3	5.4	+	+++	+	-	+	+++	+	+++
12	4	72.1	23.8	3.0	++	++	+	+	+	+	-	+
13	4	61.3	33.2	1.8	+	+	++	+	+	+++	++	+
14	4	49.3	45.2	1.1	++	+++	+	+	+	++	++	++
15	4	46.9	51.2	0.9	+++	+++	+	++	+	++	++	++

* 抗体陽性細胞の比率は3ヶ所の4 mm²の範囲内の細胞数を計測し、100 × (抗体陽性細胞数/総単核球数)を示した。
** CD3 δ または β -actin mRNA のPCR 産物が等量になるように調整したcDNA をさらに5倍希釈系で希釈して、各サイトカインプライマーを用いて増幅、ハイブリダイゼーション、オートラジオグラフィを行い、サイトカインPCR 産物の量をバンドの検出程度から以下のように分類した。-: 最高濃度のcDNA を用いてもバンドが検出できなかった症例、+: 最高濃度のcDNA でのみバンドが検出できた症例、++: 5倍希釈までバンドが検出できた症例、+++: 25倍希釈以上でもバンドが検出できた症例



図 4. 主にT細胞から産生されるサイトカイン mRNA の発現
代表的な症例(表6における患者1と患者15)を示す

えられた。

種々の細胞で産生されるサイトカインの検出に際しては全症例で等量の β -actin mRNA のPCR 産物が検出できるようにcDNA 量を調整した。図6は患者1と患者15の症例について代表的なオートラジオグラフィ像を示しており、15症例のまとめを表6に示す。IL-6, TGF- β の mRNA の発現はすべての症例で認められたが、口唇腺のリンパ球浸潤程度やリンパ球サブセットとの間には明らかな関係はみられなかった。一方、IL-12 の mRNA の発現は8症例で認められたが、リンパ球浸潤程度や、図7に示すようにCD20陽性B細胞の割合との間に明かな関係は認められなかった。またIL-4, IL-5 の mRNA の発現とIL-12 mRNA の発現との間にも明かな関係はみられなかった(表6)。

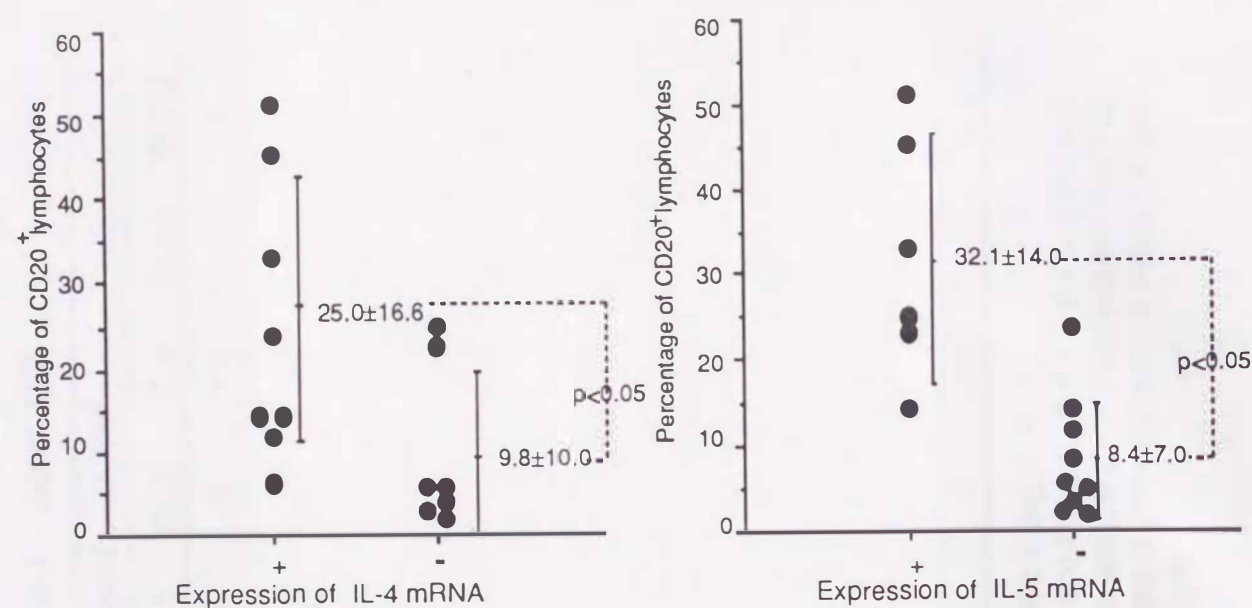


図5. シェーグレン症候群患者口唇腺におけるIL-4、IL-5 mRNAの発現とCD20陽性B細胞浸潤の関係
口唇腺においてIL-4、IL-5 mRNAの発現を認める症例では認めない症例に比べて有意にCD20陽性B細胞の割合が高かった。

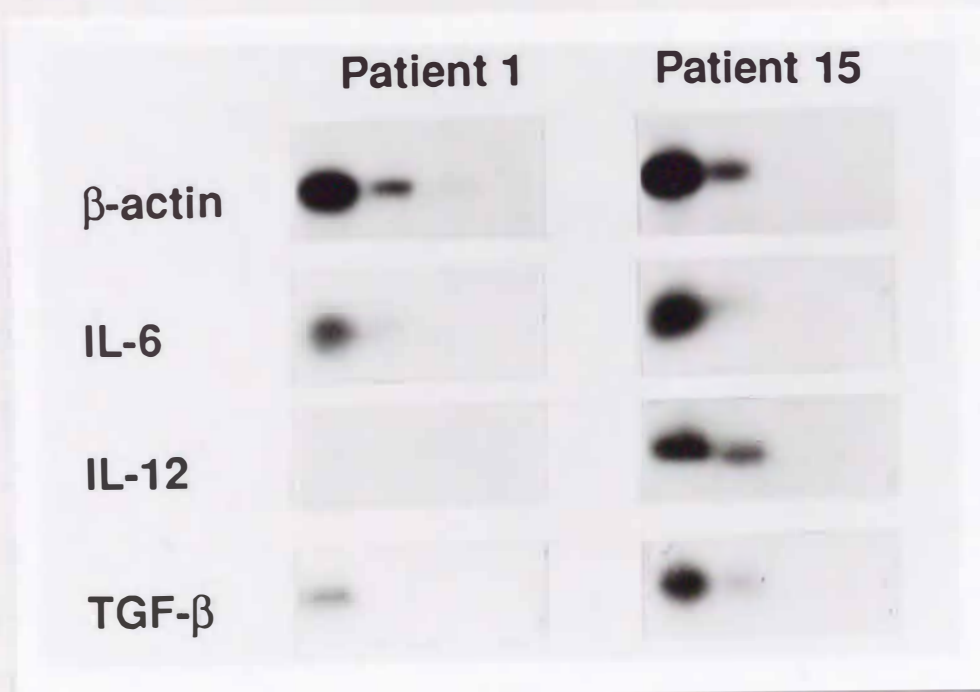


図6. 種々の細胞から産生されるサイトカイン mRNA の発現
代表的な症例 (表6における患者1と患者15) を示す

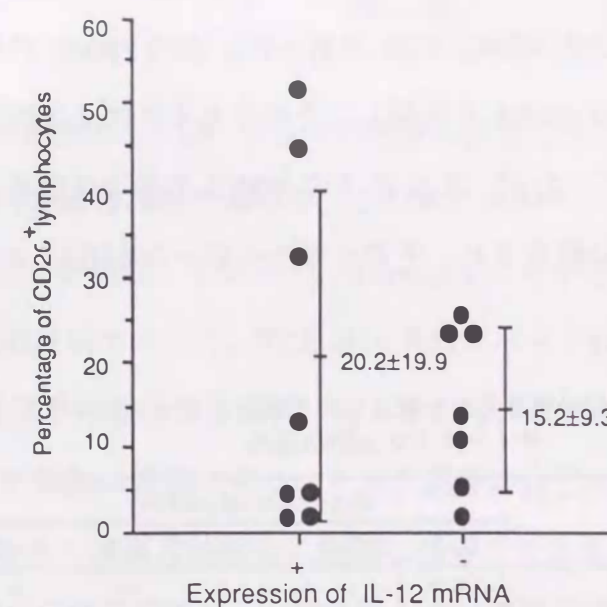


図7. シェーグレン症候群患者口唇腺におけるIL-12 mRNAの発現とCD20陽性B細胞浸潤の関係
口唇腺においてIL-12 mRNAの発現を認める症例と認めない症例の間にはCD20陽性B細胞の割合に有意差は認められなかった。

IV. 口唇腺から樹立したT細胞クローンの解析

つぎに、口唇腺全体ではなく個々のT細胞レベルでのサイトカインの発現を検討するために、口唇腺および対照としてPBMCからT細胞クローンを樹立し、個々のT細胞クローンのサイトカイン mRNA の発現について解析を行い、その結果を表7に示す。クローンの樹立に用いた口唇腺はChisholm & Masonによる組織学的分類でgrade IIに属し、免疫組織学的検索でCD3, CD4, CD8, CD20陽性細胞の割合はそれぞれ87%, 64%, 18%, 10%であった。この口唇腺全体におけるサイトカイン mRNA の発現をみるとIL-2, IFN-γ, IL-10のmRNAの発現は認められたが、IL-4, IL-5のmRNAの発現は認められなかった。口唇腺から樹立したCD4陽性の14クローンはすべてIL-2, IFN-γのmRNAを発現し、そのうち6クローンがIL-10を発現していた。この6クローンのうち、2クローンはIL-5のmRNAを、1クローンはIL-4, IL-5のmRNAを発現していた。CD8陽性の4クローンはすべてIFN-γのmRNAを発現し、そのうち2クローンがIL-2のmRNAを発現していた。

同時に得られた PBMC のフローサイトメトリー解析では CD3, CD4, CD8, CD20 陽性細胞の割合はそれぞれ 85.0%, 21.7%, 47.4%, 5.0% であった。この PBMC から樹立した CD4 陽性 5 クローンはすべて IL-2 の mRNA を発現し、そのうち 4 クローンが IFN- γ 、1 クローンが IL-10 の mRNA を発現していたが、IL-4, IL-5 の mRNA の発現は認められなかった。CD8 陽性クローンは 6 クローン樹立され、そのうち 3 クローンが IL-2 と IFN- γ の mRNA を発現していた。

表 7. シェーグレン症候群患者から樹立した T 細胞クローンにおけるサイトカイン mRNA 発現

		Expression of mRNA				
		IL-2	IFN-γ	IL-4	IL-5	IL-10
salivary gland tissue		+ *	+	—	—	+
SG clones	CD4 ⁺ (n=14)	14 **	14	1	3	6
	CD8 ⁺ (n=4)	2	4	0	0	0
PBMC		+	+	—	—	+
PBMC clones	CD4 ⁺ (n=5)	5	4	0	0	1
	CD8 ⁺ (n=6)	3	3	0	0	0

* mRNA の発現は表 6 と同様に評価した

** サイトカイン mRNA を発現しているクローンの数を示す。

SG : salivary glands

考 察

免疫組織学的解析から SS 患者の口唇腺に浸潤している T 細胞は主に CD3, CD4, CD45RO, TCR $\alpha\beta$ 陽性細胞であった。また活性化のマーカーである CD25, CD69 は極少数のリンパ球にしか発現しておらず、Burmester らが慢性関節リウマチにおいて報告した⁴²⁾ のと同様の結果であった。TCR 遺伝子のレパトア解析でも、SS 患者の口唇腺における TCR V 遺伝子の使用は多様性に富んでおり、これらのことから SS 患者の口唇腺に浸潤している T 細胞は多様であり、その大部分は自己抗原に反応するものではなく、接着分子などを介して抗原非特異的に浸潤したものであることが示唆される。しかしながら、SS 患者の口唇腺内のリンパ球は明らかに導管周囲性に浸潤しており、少なくとも一部の T 細胞は導管上皮の自己抗原を認識している可能性が考えられる。これは導管上皮が抗原提示に必要な MHC class II 分子を異常発現していることから示唆される。これらを実証するためには、慢性関節リウマチにおける報告のように¹²⁾ 局所で活性化している T 細胞の TCR 遺伝子のレパトアを調べるのもひとつの方法であるが、SS の場合に得ることのできる口唇腺標本は極少量であり、そこから活性化した T 細胞だけを分離してくるのは非常に困難であり、今回は検討できなかった。

口唇腺と PBMC における TCR V 領域遺伝子のレパトアを比較すると、口唇腺における TCR V 遺伝子発現のパターンは PBMC とは異なっており、多様性に富んでいるものの PBMC に比べると限定されていた。このことから、導管上皮上の抗原を認識した一部の T 細胞が局所で活性化され増殖しており、その結果 TCR V 遺伝子がオリゴクローナルな発現を示すということが示唆される。しかし、口唇腺において優位な TCR V 遺伝子は多様であり、個々の症例においても優位な TCR V 遺伝子が複数認められた。その理由として、種々の自己抗原または自己抗原決定基の存在の可能性や、疾患の発症に関与すると報告されている細菌やウイルスを認識する T 細胞が存在する可能性などが考えられる。あるいは、TCR 遺伝子のレパトアは固定化されたものではなく、病気の進行に伴って変化していくものとも考えられる。つまり Lehmann ら^{43,44)} や Kaufman ら⁴⁵⁾ が提唱する "determinant spreading" のように、発症初期の反応は限られた抗原決定基を認識す

るものかもしれないが、反応が続くことによって疾患特異的な他のいろいろな抗原決定基が認識されるようになり、その結果多様なレパトアを生じるようになると考えられる。このように、TCR 遺伝子は多様であったが、これは病気の発症に種々の抗原がかかわるというような根本的な違いでなく、病気そのものにいろいろな時期つまり病期が存在しており、発症初期から病期が進んだことを意味するのかもしれない。

口唇腺で優位な TCR V 遺伝子は患者間でも異なっていたが、これは前述したように種々の抗原や抗原決定基が存在したり、それらが病期により変化したり、不安定であったりするからかもしれない。さらに SS の疾患感受性は MHC 遺伝子と相関しているとはいえ、患者の遺伝的背景の多様性が存在することも原因として考えられる。また、1°SS と 2°SS では優位な TCR V 遺伝子が異なっていたが、過去の報告では 1°SS と 2°SS では異なった MHC class II 分子が疾患感受性をもっており⁵⁰⁾、このような遺伝的背景の違いによるのかもしれない。このような 1°SS と 2°SS との相違についてさらに詳細に研究を進めることによって、自己免疫疾患の病因について新たな見解が見いだせるかもしれない。たとえば、2°SS の患者で他の自己免疫疾患の罹患部位についても同様に TCR 遺伝子のレパトアを調べることにより、共通の自己抗原が同定できるかもしれないし、そうすれば複数の自己免疫疾患がなぜ高頻度に合併しやすいかの理由も明らかになるであろう。

Sumida ら¹⁸⁾ は 1°SS 患者の口唇腺での TCR V β は限定されていないものの、V β 2, V β 13 が 7 症例中それぞれ 4, 6 症例に優位に認められたと報告している。この報告は今回の結果とは異なっているが、このような相違は他の自己免疫疾患での研究においても見られ、たとえば慢性関節リウマチでは限定された優位な TCR V 遺伝子が異なっていたり、限定された優位な TCR V 遺伝子は全く存在しないという報告などもある^{10,11,12,13,14,46,47)}。このように結果に矛盾があるのは、検索した患者の病期や MHC の違いなどが関係しているのかもしれない。これらの結果を確かめるには、TCR 遺伝子の塩基配列を決定し、より詳細に検討していく必要がある。

実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) のような自己免疫疾患の動物モデルでは、疾患を引き起こす T 細胞は限られた抗原決定基を認識し、非常に限られた TCR V 遺伝子が病変局所で使われていることも報告されている⁴⁸⁾。このように限定された TCR V 遺伝子が使

われていれば、抗 TCR 抗体⁴⁹⁾ や TCR ペプチドのワクチネーション⁵⁰⁾ を用いて T 細胞レベルで反応を阻害することで特異的な免疫療法を行うことができる。しかしながら、今回のように TCR V 遺伝子の多様性が認められるとすると、なぜ多様であるのか、あるいは病期によってどのように変化するのかが明確にされなければならない。さもなければ、選択的な免疫療法を T 細胞レベルで行うことは困難である。あるいは、病気が発症する初期の段階に関与する自己抗原、あるいはこれを認識する T 細胞を同定することに従事するべきであろう。病気の発症にかかわる T 細胞クローンを樹立することができれば、SS のようなヒトの自己免疫疾患に対する新しい治療法を確立する道が開けてくるかもしれない。

TCR 遺伝子のレパトア解析の結果、SS の病期によって種々の TCR 遺伝子が発現される可能性が示唆されたため、SS 患者の口唇腺でのサイトカイン mRNA の発現パターン、およびその多様性について検討した。その結果 IL-2, IFN- γ , IL-6, IL-10, TGF- β の mRNA はすべての患者で発現が認められたが、IL-4, IL-5, IL-12 の mRNA は 15 症例中それぞれ 8, 6, 8 症例で発現が認められた。

Fox ら³²⁾ は SS 患者の耳下腺中の CD4 陽性 T 細胞は Th1 タイプの IL-2, IFN- γ の mRNA を発現しており、唾液腺組織が IL-1 α , IL-6, TNF- α の mRNA を発現していることを報告している。今回検索したすべての SS 患者の口唇腺でも IL-2, IL-6, IFN- γ の mRNA の発現を認めた。EAE や nonobese diabetic (NOD) マウス、唾液腺炎をひきおこす MRL/lpr マウスなどの自己免疫疾患モデル動物においては、IL-2, IFN- γ といった Th1 タイプのサイトカインや IL-6, TNF- α のような炎症性サイトカインの関与が報告されている^{29,51,52,53,54)}。今回すべての SS 患者において IL-2, IL-6, IFN- γ の mRNA の発現が認められたことから、これらのサイトカインは SS の発症、持続に必要であることが考えられる。これらのサイトカインは直接的に T 細胞の活性化を促進したり、または間接的に周囲の細胞を活性化して "second signal" を発現することによって T 細胞を活性化したりすることも報告されている。また、T 細胞から産生されるサイトカインの 1 つである IFN- γ は、唾液腺の上皮細胞上の MHC class II 分子の発現を誘導、増強し、T 細胞の抗原認識を誘導したり増強することも考えられる。

また、Fox ら³²⁾ は SS 患者の耳下腺中の CD4 陽性 T 細胞は Th2 タイプの IL-4, IL-5 の mRNA をほとんど発現していないと報告しているが、彼らの結果はかなり病気が進行した大唾液腺での結果であることから、初期の病態における IL-4, IL-5 の関与の可能性を除外することはできないとも述べている。しかしながら、今回の研究では IL-4, IL-5 の mRNA は 15 症例中それぞれ 8, 6 症例で検出でき、その発現は口唇腺における CD20 陽性 B 細胞の割合が高い症例に多かった。今回の 15 症例においては IL-4, IL-5 の mRNA の発現とリンパ球浸潤程度、血清中の IgG、抗 SS-A 抗体、抗 SS-B 抗体の濃度の間に明らかな相関関係は認められなかったが、当科を受診したさらに多くの SS 患者で検討してみると、口唇腺において CD20 陽性 B 細胞の割合が高い症例ではリンパ球浸潤程度が強く、そして 1°SS においては血清中の IgG、抗 SS-A 抗体、抗 SS-B 抗体の濃度が高いという相関が認められている（この結果は別に投稿中）。従って、症例数を増やすことによって IL-4, IL-5 の mRNA の発現とリンパ球浸潤程度、血清中の IgG、抗 SS-A 抗体、抗 SS-B 抗体の濃度の間に相関関係が認められるかもしれない。唾液腺局所での Th2 タイプの IL-4, IL-5 の mRNA 発現、産生によって局所での B 細胞の分化、増殖が起こり、その結果として血清中の IgG、抗 SS-A 抗体、抗 SS-B 抗体の濃度の増加が生じる可能性が考えられる。さらに IL-4, IL-5, IL-6 は B 細胞を活性化する結果、EB ウイルス感染なども加わって B 細胞リンパ腫が発生する誘因となることも考えられる。

IL-10, TGF- β の mRNA はすべての SS 患者において発現が認められ、その程度とリンパ球サブセットや他のサイトカインの発現との間には関係を見いだすことはできなかった。自己免疫疾患動物モデルでは IL-10, TGF- β は病気の発症を抑制したり、病気の回復に関与するサイトカインであるとの報告も多数認められるが^{55,56,57,58,59)}、今回の結果ではこれらのサイトカインと病態の変化の間には明らかな関係は認められなかった。また、IL-12 は Th1 細胞を活性化し、その作用は IL-4 などと拮抗するといわれている⁶⁰⁾。今回の症例においては IL-12 の mRNA は一部の症例で発現が認められたが、IL-4, IL-5 の mRNA の発現との関係はみられなかった。今回の結果からは IL-12 の役割について推察することはできないが、今後症例を重ねて検討する予定である。

今回 T 細胞クローンの樹立には feeder 細胞として健常者の PBMC を使用しており、

alloreactive なクローンの樹立も完全には否定できないが、1 週間ごとに別の健常者の PBMC を使用しており同じ allo 抗原を長期間認識しえないこと、樹立された T 細胞クローンが樹立に用いた PBMC と口唇腺のそれぞれの CD4/CD8 比を維持していること、口唇腺からは IFN- γ ⁺, IL-10⁺ の Th0 タイプのクローンが PBMC よりも多く樹立されたことなどから、口唇腺に浸潤した T 細胞に特異的なクローンが樹立されたことが示唆される。今回の T 細胞クローン樹立の方法は alloreactivity の確認はもちろん必要であるが、自己の PBMC を feeder 細胞とするには患者から長期間にわたり定期的に採血を続ける必要があり、このような方法を探らざるを得なかった。口唇腺で主に Th1 タイプの T 細胞が産生するサイトカインが認められた患者の口唇腺から樹立した T 細胞クローンからは IFN- γ ⁺, IL-10⁻ の Th1 タイプのクローンが 8 クローン、IFN- γ ⁺, IL-10⁺ の Th0 タイプのクローンは 6 クローン樹立され、IFN- γ の Th2 タイプのクローンは樹立されなかった。このように、主に Th1 タイプの T 細胞が産生するサイトカインを口唇腺で認めた症例において、クローンレベルの解析から Th1 タイプだけでなく Th0 タイプの T 細胞の存在が考えられ、これらのクローンが SS の発症に重要な役割をはたし、また Th0 タイプの T 細胞は Th2 タイプの T 細胞へ分化し、B 細胞系の異常の発現に関与する可能性も考えられた。

今回検索した口唇腺におけるサイトカイン mRNA の発現パターンから、SS 患者は少なくとも 2 つのグループに分けることができると考えられる。主に Th0, Th1 タイプの T 細胞が浸潤し Th2 タイプの T 細胞の浸潤がみられないグループと、Th0, Th1 タイプの T 細胞に加えて Th2 タイプの T 細胞の浸潤もみられるグループである。前者は B 細胞の浸潤が比較的軽度である non-aggressive タイプと考えられ、後者は B 細胞の浸潤が強く、自己抗体の産生の亢進などの B 細胞系の免疫異常を伴うようになる aggressive タイプとも考えられる。病気の初期においては、Th0, Th1 タイプの T 細胞が局所に浸潤し non-aggressive な状態でバランスを保っているが、病気の進行過程で何らかの原因でこのバランスが壊れ Th0 から Th2 タイプの T 細胞への分化が進み、唾液腺局所で B 細胞の分化、増殖が誘導され、aggressive な状態になるという 1 つの SS の流れが示唆される。しかし、リンパ球の浸潤程度がかなり強くても IL-4 や IL-5 の mRNA の発現を認めない

non-aggressive タイプの患者もみられることから、すべての患者がこのように変化していくのではないかもしれない。いずれにせよ、このバランスを変える原因が何であるのか、そしてどのようにしてこのバランスが変わるのかを検討することは大変興味深いことである。このような唾液腺局所に浸潤した T 細胞のダイナミックな変化が存在するとなると、前述したように "determinant spreading" という現象がおこり複数の抗原抗原決定基を認識する T 細胞が浸潤していることも示唆される。いずれにしてもサイトカインは SS の発症、進展に重要な役割を演じていると考えられるが、これらを明確にしていくためには、患者の長期間の経過観察を行い、病期の進展とサイトカインの変化、TCR 遺伝子のレパトアの変化などを追っていき、これらの関係を詳細に解明することが必要で、これによってサイトカインを用いた免疫療法への道も開けてくるものと考えている。

謝 辞

稿を終るにあたり、御懇篤なる御指導を頂きました野本亀久雄教授ならびに、このような研究の機会を与えて頂きました岡増一郎教授に深甚なる謝意を表します。また、直接御指導頂きました中村誠司講師、松崎吾郎博士に深謝致します。抗体を供与して頂きましたバージニア大学 Dr. S. M. Fu、サイトカインのプライマーを供与して頂きました北里大学医学部皮膚科藤村響男博士、T 細胞クローンの作製にあたり御指導と御協力を頂きました久留米大学医学部免疫学教室伊東恭悟教授、山田亮博士に深謝致します。また、常に励ましの言葉を頂きました九州大学歯学部口腔外科学第二講座と生体防御医学研究所免疫学部門の皆様に深く感謝致します。

参考文献

1. Talal N., Moutsopoulos H.M., Kassan S.S. Sjögren's Syndrome -Clinical and Immunological aspects- Berlin, Springer-Verlag 1987;15-24, 129-136.
2. Adamson T.C., Fox R.I., Frisman D.M. et al. Immunohistologic analysis of lymphoid infiltrates in primary Sjögren's syndrome using monoclonal antibodies. J Immunol 1983; 130: 203-208.
3. Fox R.I., Bumol I., Fantozzi R. et al. Expression of histocompatibility antigen HLA-DR by salivary gland epithelial cells in Sjögren's syndrome. Arthritis Rheum 1986; 29: 1105-1111.
4. Lindahl G., Hedfors E., Kloreskog L. et al. Epithelial HLA-DR expression and T lymphocyte subsets in salivary glands in Sjögren's syndrome. Clin Exp Immunol 1985; 61: 475-482.
5. Harley J.B., Reichlin M., Arnett F.C. et al. Gene interaction at HLA-DQ enhances autoantibody production in primary Sjögren's syndrome. Science 1986; 232: 1145-1147.
6. Moutsopoulos H.M., Mann D.L., Johnson A.H. et al. Genetic differences between primary and secondary sicca syndrome. N Engl J Med 1979; 301: 761-763.
7. Moriuchi J., Ichikawa Y., Takaya M. et al. Association between HLA and Sjögren's syndrome in Japanese patients. Arthritis Rheum 1986; 29: 1518-1521.
8. Kang H., Fei H.M., Saito I. et al. Comparison of HLA class II genes in Caucasoid, Chinese, and Japanese patients with primary Sjögren's syndrome. J Immunol 1993; 150: 3615-3623.
9. Todd J.A., Acha-Orbea H., Bell J.I. et al. A molecular basis for MHC class II-associated autoimmunity. Science 1988; 240: 1003-1009.
10. Paliard X., West S.G., Lafferty J.A. et al. Evidence for the effects of a superantigen in rheumatoid arthritis. Science 1991; 253: 325-329.
11. Sottini A., Imberti L., Gorla R. et al. Restricted expression of T cell receptor V β but not V α genes in rheumatoid arthritis. Eur J Immunol 1991; 21: 461-466.
12. Howell M.D., Diveley J.P., Lundeen K.A. et al. Limited T-cell receptor β -chain

- heterogeneity among interleukin 2 receptor-positive synovial T cells suggests a role for superantigen in rheumatoid arthritis. Proc Natl Acad Sci 1991; 88: 10921-10925.
13. Uematsu Y., Wege H., Straus A. et al. The T-cell-receptor repertoire in the synovial fluid of a patient with rheumatoid arthritis is polyclonal. Proc Natl Acad Sci 1991; 88: 8534-8538.
 14. Pluschke G., Ricken G., Taube H. et al. Biased T cell receptor V α region repertoire in the synovial fluid of rheumatoid arthritis patients. Eur J Immunol 1991; 21: 2749-2754.
 15. Oksenberg J.R., Stuart S., Begovich A.B. et al. Limited heterogeneity of rearranged T-cell receptor V α transcripts in brains of multiple sclerosis patients. Nature 1990; 345: 344-346.
 16. Wucherpfenning K.W., Newcombe J., Li H. et al. T cell receptor V α -V β repertoire and cytokine gene expression in active Multiple Sclerosis lesions. J Exp Med 1992; 175: 993-1002.
 17. Yamamura M., Modulin R.L., Ohmen J.D. et al. Local expression of antiinflammatory cytokines in cancer. J Clin Invest 1993; 91: 1005-1010.
 18. Sumida T., Yonaha F., Maeda T. et al. T cell receptor repertoire of infiltrating T cells in lips of Sjögren's syndrome patients. J Clin Invest 1992; 89: 681-685.
 19. Mosmann T.R., Cherwinski M.W., Bond M.W. et al. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. J Immunol 1986; 136: 2348-2357.
 20. Fernandez Botran R., Sanders V.M., Mosmann T.R. Lymphokine-mediated regulation of the proliferative response of clones of T helper 1 and T helper 2 cells. J Exp Med 1988; 168: 543-552.
 21. Maggi E., Parronchi P., Manetti R. et al. Reciprocal regulatory effects of IFN- γ and IL-4 on the in vitro development of human Th1 and Th2 clones. J Immunol 1992; 148: 2142-2142.
 22. Kapsenberg M.L., Wierenga E.A., Bos J.D. et al. Functional subsets of allergen-reactive human CD4 $^{+}$ T cells. Immunol Today 1991; 12: 392-395.
 23. Romagnani S. Human TH1 and TH2 subsets: doubt no more. Immunol Today 1991; 12:

256-257.

24. Yamamura M., Uyemura K., Deans R.I. et al. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. *Science* 1991; 254: 277-279.
25. Salgame P., Abrams J.S., Clayberger C. et al. Differing lymphokine profiles of functional subsets of human CD4 and CD8 T cell clones. *Science* 1991; 254: 279-282.
26. Sieling P.A., Abrams J.S., Yamamura M. et al. Immunosuppressive roles for IL-10 and IL-4 in human infection. *J Immunol* 1993; 150: 5501-5510.
27. Kennedy M.K., Torrance D.S., Picha K.S. et al. Analysis of cytokine mRNA expression in the central nervous system of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis reveals that IL-10 mRNA expression correlates with recovery. *J Immunol* 1992; 149: 2496-2505.
28. Rapoport M.J., Jaramillo A., Zipros D. et al. Interleukin 4 reverse T cell proliferative unresponsiveness and prevents the onset of diabetes in nonobese diabetic mice. *J Exp Med* 1993; 178: 87-89.
29. Hamano H., Saito I., Haneji N. et al. Expressions of cytokine genes during development of autoimmune sialadenitis in MRL/lpr mice. *Eur J Immunol* 1993; 23: 2387-2391.
30. Firestein G.S., Alvaro-Garcia J.M., Maki R. Quantitative analysis of cytokine gene expression in rheumatoid arthritis. *J Immunol* 1990; 144: 3347-3353.
31. Miyake S., Yagita H., Maruyama T. et al. β 1 integrin-mediated interaction with extracellular matrix proteins regulates cytokine gene expression in synovial fluid cells of rheumatoid arthritis. *J Exp Med* 1993; 177: 863-868.
32. Fox R.I., Kang H., Ando D. et al. Cytokine mRNA expression in salivary gland biopsies of Sjögren's syndrome. *J Immunol* 1994; 152: 5532-5539.
33. Itoh K., Platsoucas C.D., Balch C.M. Autologous tumor-specific cytotoxic T lymphocytes in the infiltrate of human metastatic melanomas. *J Exp Med* 1988; 168: 1419-1441.
34. Homma M., Tojo T., Akizuki M. et al. Criteria for Sjögren's syndrome in Japan. *Scand J Rheumatology* 1986; Suppl. 61: 26-27.
35. Vitali C., Bombardieri S., Moutsopoulos H.M. et al. Preliminary criteria for the classification of Sjögren's Syndrome. Results of a prospective concerted action supported by the

European community. *Arthritis Rheum* 1993; 36: 340-347.

36. Chisholm D.M., Mason D.K. Labial salivary gland biopsy in Sjögren's disease. *J Clin Path* 1986; 21: 656-660.
37. Hiroki A., Nakamura S., Shinohara M. et al. Significance of oral examination in chronic graft-versus-host disease. *Oral Pathol Med* 1994; 23: 209-215.
38. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162: 156-159.
39. Choi Y., Kotzin B., Herron L. et al. Interaction of *Staphylococcus aureus* toxin "superantigens" with human T cells. *Proc Natl Acad Sci* 1989; 86: 8941-8945.
40. Kerckhove C.V., Russell G.J., Deusch K. et al. Oligoclonality of human intestinal intraepithelial T cells. *J Exp Med* 1992; 175: 57-63.
41. Zhang M., Gately M.K., Wang E. et al. Interleukin 12 at the site of disease in tuberculosis. *J Clin Invest* 1994; 93: 1733-1739.
42. Burmester G.R., Jahn B., Gramatzki M. et al. Activated T cells in vivo and in vitro : divergence in expression of Tac and Ia antigens in the nonblastoid small T cells of inflammation and normal T cells activated in vitro. *J Immunol* 1984; 133: 1230-1234.
43. Lehmann P.V., Forsthuber T., Miller A. et al. Spreading of T-cell autoimmunity to cryptic determinants of an autoantigen. *Nature* 1992; 358: 155-157.
44. Lehmann P.V., Sercarz E.E., Forsthuber T. et al. Determinant spreading and the dynamics of the autoimmune T cell repertoire. *Immunol Today* 1993; 14: 203-208.
45. Kaufman D.L., Clare-Salzler M., Tian J. et al. Spontaneous loss of T-cell tolerance to glutamic acid decarboxylase in murine insulin-dependent diabetes. *Nature* 1993; 366: 69-72.
46. Williams W.V., Fang Q., Demarco D. et al. Restricted heterogeneity of T cell receptor transcripts in rheumatoid synovium. *J Clin Invest* 1992; 90: 326-333.
47. Yamamoto K., Sakoda H., Nakajima T. et al. Accumulation of multiple T cell clonotypes in the synovial lesions of patients with rheumatoid arthritis revealed by a novel clonality analysis. *Int Immunol* 1992; 4: 1219-1224.
48. Offner H., Hashim G.A., Celnik B. et al. T cell determinants of myelin basic protein

- include a unique encephalitogenic I-E-restricted epitope for Lewis rat. *J Exp Med* 1989; 170: 355-367.
49. Hashim G.A., Vandenbark A.A., Galang A.B. et al. Antibodies specific for V β 8 receptor peptide suppress experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 1990; 144: 4621-4627.
 50. Vandenbark A.A., Hashim G., Offner H. Immunization with a synthetic T-cell receptor V-region peptide protects against experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nature* 1989; 341: 541-544.
 51. Merrill J.E., Kono D.H., Clayton J. et al. Inflammatory leukocytes and cytokines in the peptide-induced disease of experimental allergic encephalomyelitis in SJL and B10.PL mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992, 89: 574-578.
 52. Sarvetnick N., Shizuru J., Liggett D. et al. Loss of pancreatic islet tolerance induced by β -cell expression of interferon- γ . *Nature* 1990; 346: 844-847.
 53. Campbell I.L., Kay T.W.H., Oxbrow L. et al. Essential Role for interferon- γ and Interleukin -6 in autoimmune insulin-dependent diabetes in NOD Wehi mice. *J Clin Invest* 1991; 87: 739-742.
 54. Stewart T.A., Hultgren B., Huang X. et al. Induction of type I diabetes by interferon- α in transgenic mice. *Science* 1993; 260: 1942-1946.
 55. Chantry D., Turner M., Abney E. Modulation of cytokine production by transforming growth factor- β . *J Immunol* 1989; 142: 4295-4300.
 56. Miller A., Lider O., Robberts A. et al. Suppressor T cells generated by oral tolerization to myelin basic protein suppress both *in vitro* and *in vivo* immune responses by the release of transforming growth factor β after antigen-specific triggering. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 421-425.
 57. Santambrogio L., Hochward G.M., Saxena B. et al. Studies on the mechanisms by which transforming growth factor- β (TGF- β) protects against allergic encephalomyelitis. *J Immunol* 1993; 151: 1116-1127.
 58. Wogensen L., Huang X., Sarvetnick N. Leukocyte extravasation into the pancreatic tissue in transgenic mice expressing interleukin 10 in the islets of Langerhans. *J Exp Med*

- 1993; 178: 175-185.
59. Shull M.M., Ormsby I., Kier A.B. et al. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor- β 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 1992; 359: 693-699.
 60. Hsieh C-S., Macatonia S.E., Tripp C.S. et al. Development of Th1 CD4 $^{+}$ cells through IL-12 produced by *Listeria*-induced macrophages. *Science* 1992; 260: 547-549.

