



CD40-CD40 ligand signal induces the intercellular adhesion molecule-1 expression through nuclear factor-kappa B p50 in cultured salivary gland epithelial cells from patients with Sjögren's syndrome

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2013-08-27 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 齋藤, 美和子 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/349

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 492号	学位授与年月日	平成19年 3月14日
氏名	齋藤 美和子		
論文題目	CD40-CD40 ligand signal induces the intercellular adhesion molecule-1 expression through nuclear factor-kappa B p50 in cultured salivary gland epithelial cells from patients with Sjögren's syndrome (シェーグレン症候群患者より得られた培養唾液腺上皮細胞において CD40-CD40 リガンドのシグナルは nuclear factor-kappa B p50 を介して intercellular adhesion molecule-1 の発現を誘導する)		

博士(医学) 齋藤 美和子

論文題目

CD40-CD40 ligand signal induces the intercellular adhesion molecule-1 expression through nuclear factor-kappa B p50 in cultured salivary gland epithelial cells from patients with Sjögren's syndrome

(シェーグレン症候群患者より得られた培養唾液腺上皮細胞においてCD40-CD40リガンドのシグナルは nuclear factor-kappa B p50を介してintercellular adhesion molecule-1の発現を誘導する)

論文の内容の要旨

[はじめに]

シェーグレン症候群は腺組織を侵す原因不明の全身性結合織疾患である。自覚症状として重要なドライマウスは唾液腺内の自己免疫反応により、唾液腺組織が障害されることにより生じる。これまでに患者の唾液腺細胞や血清においてintercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)やCD40が高発現していることが報告されているが、その発現機序は解明されていない。そこで今回我々は培養唾液腺上皮細胞におけるCD40-CD40リガンド(CD40L)のシグナルを介したICAM-1発現の伝達経路について検討を行った。

[材料ならびに方法]

シェーグレン症候群を疑った患者の口唇唾液腺生検にて得られた小唾液腺上皮細胞及び耳下腺腫瘍手術における摘出耳下腺より得た正常唾液腺上皮細胞を無血清下で培養して用いた。

- 1) ICAM-1の発現をreverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)、リアルタイムPCR、フローサイトメトリーにて可溶性CD40Lおよびinterferon- γ (IFN- γ)による刺激前後で検討した。
- 2) pNF- κ B-Luc、pAP-1-Luc、ICAM-1のプロモーター領域を組み込んだpGL1.3-Luc、およびpGL1.3-Lucのnuclear factor- κ B (NF- κ B)結合部位を変異させたpGL1.3kB-Lucの4種類のプラスミドをリポフェクション法にてトランスフェクションし、可溶性CD40LおよびNF- κ B阻害剤であるpyrrolidinedithiocarbamate (PDTC)添加前後でルシフェラーゼ活性を測定した。
- 3) 2)と同様の系を用いて刺激後の細胞核抽出物の各NF- κ B因子の活性を測定した。

[結果]

- 1) 唾液腺上皮細胞ではPCR、フローサイトメトリーにて可溶性CD40LおよびIFN- γ による刺激後、ICAM-1の発現増強を認めた。
- 2) 可溶性CD40L刺激にてpNF- κ B-Luc活性、pGL1.3-Luc活性が上昇し、PDTCで抑制された。
- 3) NF- κ B p50の活性が可溶性CD40L刺激にて増加し、PDTC添加にて抑制された。
- 4) 以上の結果はシェーグレン症候群患者及び健常コントロールの唾液腺上皮細胞間に明らかな差を認めなかった。

[考察]

近年シェーグレン症候群の病態においてCD40-CD40Lなどの副刺激分子、およびICAM-1などの接着分子の発現の関与が報告されている。我々は口唇唾液腺生検より得られた培養唾液腺上皮細胞を用いて、CD40、ICAM-1の発現を確認した。ICAM-1の発現はCD40Lの刺激にて増強され、さらにはトランスフェ

クションにてICAM-1の発現にはNF- κ Bが関与することが明らかとなった。最後にNF- κ Bの因子の中でp50が特に関与することが示唆された。

以上より、ICAM-1の発現経路は次の様に考えられた。シェーグレン症候群患者の唾液腺にT細胞が浸潤すると、そのT細胞由来のIFN- γ などのサイトカインにより唾液腺細胞表面上にCD40が高発現する。CD40とT細胞上または血清中のCD40Lとの反応により、細胞質内でNF- κ Bを抑制していたinhibitor κ Bがリン酸化される。抑制のとれたNF- κ Bが核内に移動すると、転写が活性化され、ICAM-1発現が誘導される。

これまでもシェーグレン症候群患者の唾液腺ではコントロールに比してICAM-1の高発現が確認されており、ICAM-1がシェーグレン症候群の唾液腺の炎症の発症・進展に関与すると考えられている。今回解明した上述の経路によるICAM-1の発現を阻害することにより、シェーグレン症候群の唾液腺の慢性炎症を減弱できると期待される。

〔結論〕

シェーグレン症候群における唾液腺上皮細胞の炎症反応には、可溶性CD40Lによる刺激によってNF- κ B p50が活性化され、ICAM-1発現が亢進するというシグナル伝達経路が関与していると考えられた。

論文審査の結果の要旨

シェーグレン症候群は腺組織を侵し、しばしば関節リウマチなどの他の自己免疫疾患を合併する全身性結合織疾患である。その病因は不明であるが、これまでに患者の唾液腺細胞にintercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)やCD40が高発現していること、および唾液腺に浸潤しているT細胞にCD40リガンド (CD40L) が高発現していることが報告されている。しかしながら、これらの発現機序は不明である。そこで、申請者は培養唾液腺上皮細胞を用いてCD40-CD40Lの相互作用によるICAM-1発現のシグナル伝達機構について検討した。培養唾液腺上皮細胞はシェーグレン症候群の口唇唾液腺生検および耳下腺腫瘍手術時の正常唾液腺上皮細胞を無血清培地で培養することで得られた。得られた主な結果は以下の通りである。

- (1) 培養唾液腺上皮細胞を可溶性CD40Lおよびインターフェロン- γ (IFN- γ)で刺激したところ、両者共ICAM-1の発現を増強することがpolymerase chain reaction (PCR)およびフローサイトメトリーにて認められた。
- (2) 可溶性CD40Lの刺激により、培養唾液腺上皮細胞のnuclear factor- κ B (NF- κ B) が活性化されることが判明した。即ち、ルシフェラーゼ遺伝子をレポーターとしてNF- κ B結合部位を挿入したプラスミドを培養唾液腺上皮細胞に導入し、可溶性CD40Lで刺激したところルシフェラーゼ活性が上昇した。また、このルシフェラーゼ活性の上昇はNF- κ B阻害剤であるpyrrolidinedithiocarbamate (PDTC) で抑制された。
- (3) 可溶性CD40Lの刺激により活性化されたNF- κ BがICAM-1の発現を上昇させることを以下の実験により証明した。ICAM-1のプロモーター領域のNF- κ Bを変異させたプラスミドを用いたレポーターアッセイでは、野生型に比し、有意にルシフェラーゼ活性が低下した。また、野生型においても、NF- κ B特異的阻害剤であるPDTCを添加することにより、ICAM-1プロモーターによるルシフェラーゼ活性が低下した。
- (4) 可溶性CD40Lで活性化されるNF- κ Bのサブユニットを核抽出液で検討したところ、NF- κ B p50の増加を認めた。

(5) 上記の結果はシェーグレン症候群と健常コントロールの培養唾液腺上皮細胞の間で差を認めなかった。

以上より、申請者はシェーグレン症候群における唾液腺上皮細胞の炎症反応には、CD40Lによって活性化したNF- κ B p50によるICAM-1の発現増強が関与すると考えた。そして、この経路を阻害し、ICAM-1の発現を抑制することにより、シェーグレン症候群の唾液腺の炎症を抑制できる可能性を示唆した。

審査委員会では、シェーグレン症候群における唾液腺上皮細胞の炎症反応に関し、ICAM-1の発現増強がCD40Lの刺激によるNF- κ B p50の活性化によることを詳細に証明した点を高く評価した。

以上の研究に対し、審査委員会では以下の質疑を行った。

- 1) この研究でICAM-1に着目した根拠は
- 2) 唾液腺上皮細胞を培養する際に、細菌の混入はどのようにして防いだか
- 3) 培養した細胞が唾液腺上皮細胞であることはどのように同定したか
- 4) 患者唾液腺上皮細胞に主要組織適合複合体クラスII抗原は発現しているか
- 5) リポフェクチン法でのトランスフェクションの効率について
- 6) レポーター・プラスミドにNF- κ B結合部位を5個タンデムに配置した理由について
- 7) ICAM-1の発現はシェーグレン症候群に特異的か
- 8) 培養唾液腺上皮細胞の性状はシェーグレン症候群と健常コントロールで差が認められたか
- 9) I- κ Bの分解にCキナーゼが関与しているという根拠は
- 10) 患者唾液腺上皮細胞には、CD4+T細胞またはCD8+T細胞のどちらが有意に浸潤しているか
- 11) 自己抗体は症状に影響を与えるか
- 12) Fasは患者唾液腺上皮細胞のアポトーシスに関与するか

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で判定した。

論文審査担当者 主査 小 出 幸 夫
副査 瀧 川 雅 浩 副査 馬 場 聡