

副島和孝 論文内容の要旨

主論文

Activation of MKK4 (SEK1), JNK, and c-Jun in labial salivary infiltrating T cells in patients with Sjögren's syndrome.

シェーグレン症候群患者における唾液腺浸潤 T 細胞上の MKK4 (SEK1)、JNK、
および c-Jun の活性化

副島和孝 中村英樹 玉井慎美 川上純 江口勝美
Rheumatology International 27 巻 4 号 329-333 2007 年

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻
(主任指導教員:江口勝美教授)

緒言

シェーグレン症候群(以下 SS)は唾液腺・涙腺の単核球を中心とした慢性炎症細胞浸潤と腺破壊を特徴とする自己免疫疾患のひとつである。同症候群小唾液腺の浸潤単核球はアポトーシス抵抗性であることが知られている。この理由のひとつとして、Bcl-2 family 蛋白関与が示唆されているが、われわれは以前 CD40-CD40 ligand 系の活性化が浸潤単核球に発現していることを報告し、CD40 と Bcl-2 が浸潤単核球上に共発現していることを示した(Nakamura H et al. Lab Invest 1999;79:261-9)。Mitogen-activated protein kinases(MAP キナーゼ)は遺伝子発現、細胞増殖、アポトーシスなどの多様な生命現象の制御に関与するセリン/スレオニンキナーゼである。CD40 の下流では MAP kinases の活性化が起こっていると考えられているが、われわれは SS 唾液腺組織において、腺組織よりも浸潤単核球優位に MAP kinases 蛋白が発現していることも報告した(Nakamura H et al. Ann Rheum Dis 1999;58:382-5)。患者唾液腺においては、浸潤単核球のサイトカイン産生の増加とアポトーシスの異常がみられるが、これらが c-Jun NH₂-terminal kinase(JNK)カスケードにより制御されている可能性がある。我々は以前、唾液腺浸潤単核球において活性型 JNK の発現を示したが、今回さらにその上流と下流、即ち JNK カスケードの活性化を検討した。

対象と方法

6名の原発性 SS 患者の口唇腺生検により得られた組織を4%のパラホルムアルデヒドにて固定した標本を材料とした。6名の患者は European Community による SS の criteria を満たしており、唾液腺への単核球浸潤を示す Chisholm

and Mason による grading ではすべて Grade4 と強い浸潤を示すものであった。浸潤単核球上の目的蛋白質の同定方法には Streptavidin-biotin (SAB) 法による免疫組織染色法を用いた。まず3%過酸化水素により内因性ペルオキシダーゼを不活化し、10%ヤギまたはウサギ正常血清にてブロッキングを行った。次いで一次抗体、即ち、抗 phospho-c-Jun 抗体、抗 phospho-JNK 抗体、抗 phospho-MKK4 抗体、抗 CD4,抗 CD8 抗体と反応させた。さらにビオチン標識抗ウサギまたはマウス IgG 抗体との反応を行い、次いでペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンと反応させた。そして、DAB と過酸化水素により visualization を行い、Methylgreen にて counterstaining を行った。Negative control は、ウサギまたはマウス正常血清と反応させたものとした。ミラー切片は、連続切片の共通断面を上方に向けてスライドグラスに貼り付けて作成した。分割された細胞の同一面を二つの異なる抗体により染色することにより共発現を検討した。

結果

SS 患者の小唾液腺組織浸潤単核球に、リン酸化(活性型)MKK4,JNK,c-Jun の発現が認められた。SS 患者の小唾液腺組織浸潤単核球における、活性型の MKK4、JNK、c-Jun の発現のまとめを示す。

	p- MKK4	p- JNK	p- c-Jun
Case1	+	+	±
Case2	+	++	+
Case3	+	+	+
Case4	±	++	±
Case5	+	++	+
Case6	+	+	+

(±; 0% to 10%, +; 10% to 50%, ++; >50%)

それぞれの case において、唾液腺組織浸潤単核球に、活性型の MKK4、JNK、c-Jun がどの程度発現しているかを示した。3者の発現にはばらつきがあったが、それぞれの case の連続切片標本は3者の共発現を示唆していた。次に、小唾液腺組織浸潤 CD4 陽性 Tリンパ球に、活性型 JNK が発現しているかミラー法により検討した。これにより CD4 と活性型 JNK の共発現が示され、CD4 陽性 Tリンパ球に活性型 JNK が発現していることが明らかになった。同様に CD8 陽性 Tリンパ球に活性型 JNK が発現しているか検討し、CD8 陽性 Tリンパ球に活性型 JNK が発現していることが明らかとなった。最後に、同一細胞に活性型の c-Jun と JNK が共発現しているか、ミラー切片法により検討し、共発現

していることが確かめられた。

考 察

SS 患者の小唾液腺組織浸潤T細胞は、活性化されており、末梢血のT細胞に比し、炎症性サイトカインの産生能が亢進し、かつアポトーシスに抵抗性であり、これらが慢性炎症の形成に関わっている。JNK カスケード の活性化は、他の因子と共にこれらに関与している可能性がある。JNK カスケードを活性化する刺激は、サイトカインや酸化ストレス、補助刺激分子など多様であり、SS 患者の小唾液腺において、何が中心的かは未だ明らかではないが、JNK カスケードがSS の小唾液腺の病理像の形成に重大な関与があり、治療のターゲットとなる可能性があると考ええる。