

【原著・臨床】

シェーグレン症候群疾患モデルに対する fosfomycin の治療効果

石丸 直澄・羽地 剛雄・柳 久美子・林 良夫

徳島大学歯学部口腔病理*

(平成 12 年 7 月 21 日受付・平成 12 年 8 月 21 日受理)

シェーグレン症候群モデル NFS *sld* マウスに自己免疫病変の発症しはじめる 4 週齢より fosfomycin (FOM) を腹腔内投与すると、12 週齢にて対照群に比較して FOM 投与群に病変の抑制効果が認められた。また、8 週齢および 12 週齢での FOM 投与群の唾液腺組織における TUNEL 陽性腺上皮細胞は有意に減少していた。ヒト唾液腺細胞株 (HSG, HSY) の Fas を介したアポトーシスは低濃度域 (0.001~0.1 $\mu\text{g mL}$) の FOM 前処理にて阻害され、さらに唾液腺特異的自己抗原 α -fodrin の分断化を抑制することが明らかとなり、そのメカニズムとしてカスパーゼ (ICE, CPP 32) 活性の FOM による抑制効果が示された。したがって、FOM が臓器特異的自己免疫疾患の治療に応用可能であることが示唆される。

Key words: fosfomycin, シェーグレン症候群 (SS), 唾液腺細胞, アポトーシス, カスパーゼ

シェーグレン症候群 (SS) は乾燥性角結膜炎, 慢性唾液腺炎による乾燥症候群を主徴とする臓器特異的自己免疫疾患であるが, その病因の詳細は不明であり, 治療についても対症療法が中心で根本的治療法は確立していない。自己免疫疾患にはある種の免疫抑制剤, ステロイドなどによる治療効果の報告があるが¹⁻³⁾, いずれも全身的副作用が強く, 特に臓器特異的自己免疫疾患には適用が限られているのが現状である。一方, fosfomycin (FOM) はきわめて副作用の少ない抗生物質であり従来より免疫抑制効果のあることが知られている⁴⁻⁷⁾。そこで, われわれが確立した SS の疾患モデル NFS *sld* マウス⁸⁾に FOM を投与することにより唾液腺, 涙腺に限局する自己免疫疾患の発症に対する影響を検討したところ, 自己免疫病変の発症を抑制でき, そのメカニズムの 1 つとして FOM が末梢エフェクター細胞のカルシニューリン, PKC を介した活性化経路を阻害することをすでに報告した⁹⁾。今回は標的細胞である唾液腺細胞のアポトーシスにおける FOM の影響について詳細に検討した。

I. 材料および方法

1) マウスおよび投与方法

NFS/*sld* マウスは元愛知がんセンター病理・児島昭徳博士 (現・名古屋市衛生研究所) より供与を受け, 当施設にて SPF (Specific pathogen-free) 下で繁殖飼育した。雌 NFS/*sld* マウスを用い生後 3 日目に胸腺摘出を施し 4 週齢より 8 週齢および 12 週齢まで, FOM (300 mg/kg/週) を腹腔内投与後, 屠殺し全身各臓器を検索した。各群 5~7 匹のマウスを用いた。

2) 病理組織学的検索

全身諸臓器は 10% 中性緩衝ホルマリンにて固定し, 軟パラフィン包埋後 4 μm の組織切片を作成し, ヘマトキシリン・エオジン染色を施した。唾液腺および涙腺に

おける炎症性病変の組織学的評価は White らの分類¹⁰⁾ に準じた。

3) 細胞および処理

ヒト唾液腺細胞株 HSG および HSY 細胞を用い, 抗 Fas 抗体 (100 ng/mL, MBL) にてアポトーシスを誘導した。培養は 10% FCS 含有 MEM 培地にて行った。FOM (0.001~10 $\mu\text{g mL}$) は抗 Fas 抗体処理の 12 時間前に添加した。対照細胞株として Jurkat 細胞を用いた。

4) アポトーシスの検出

唾液腺組織において TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated nick end labeling) 法によるアポトーシスの検出を行った。また, 培養細胞のアポトーシスの検出は Annexin-V PI (Propidium Iodide, Trevigen, Inc.) 染色によりフローサイトメーター (EPICS, COULTER) にて検討した。各解析ともに 3~5 回の実験を行った。

5) ウエスタンブロット法

FOM にて処理された細胞を洗浄後, 細胞溶解液にて溶解, 遠心し上清を 10% SDS-PAGE に展開, PVDF 膜に転写し, 1 次抗体として抗ヒト ICE ポリクローナル抗体 (Upstate Bio. Inc.), 抗ヒト CPP 32 モノクローナル抗体 (Transduction Laboratories), 抗ヒト α -fodrin モノクローナル抗体 (Affiniti) を用い, 2 次抗体にはペルオキシダーゼ標識抗ウサギおよびマウス IgG (Vector Laboratories) を使用し, 発色には ECL 試薬 (Amersham Corp.) を用いた。

II. 結果

SS モデルマウス NFS/*sld* に 4 週齢から 12 週齢まで週 1 回腹腔内に FOM を投与すると, 8 週齢では各臓器

に病変の差は認められなかったが、12週齢において唾液腺の自己免疫性病変の有意な抑制効果がみられた。一方、各実験群における唾液腺導管上皮細胞のアポトーシスを TUNEL 法にて検出した結果、8週齢、12週齢にて FOM 投与群ではアポトーシスの抑制効果が認められた (Fig. 1 a)。FOM 投与群の8週齢では組織学的に投与群と対照群では著変はなかったにもかかわらず、唾液腺細胞のアポトーシスが阻害されていたことから (Fig. 1 b), FOM が直接唾液腺細胞のアポトーシスに影響を与えていることが予想された。なお、正常マウスでの TUNEL 陽性細胞は8週、12週ともに5%以下であった。

そこで、ヒト唾液腺細胞株 HSG, HSY および対照と

して Jurkat 細胞を用い、FOM と各細胞のアポトーシスとの関係を *in vitro* にて検討した。HSY 細胞, HSG 細胞は抗 Fas 抗体の添加によりアポトーシスが誘導されることが知られている。この系に FOM を前処理すると 0.001~0.1 $\mu\text{g mL}$ での低濃度域にて抗 Fas 抗体によるアポトーシスを阻害できることが判明した (Fig. 2)。

一方、われわれは SS 特異的の自己抗原として 120 kD α -fodrin を同定し、SS の病態形成に重要な抗原であることをモデルマウスおよびヒト患者にて報告している¹¹⁾。Fas 刺激を HSY, HSG 細胞に加えアポトーシスを誘導すると α -fodrin の 120 kD への分断化が認められ、この培養系に FOM を添加することにより α -fodrin の分断化が抑制されることが明らかとなった (Fig. 3

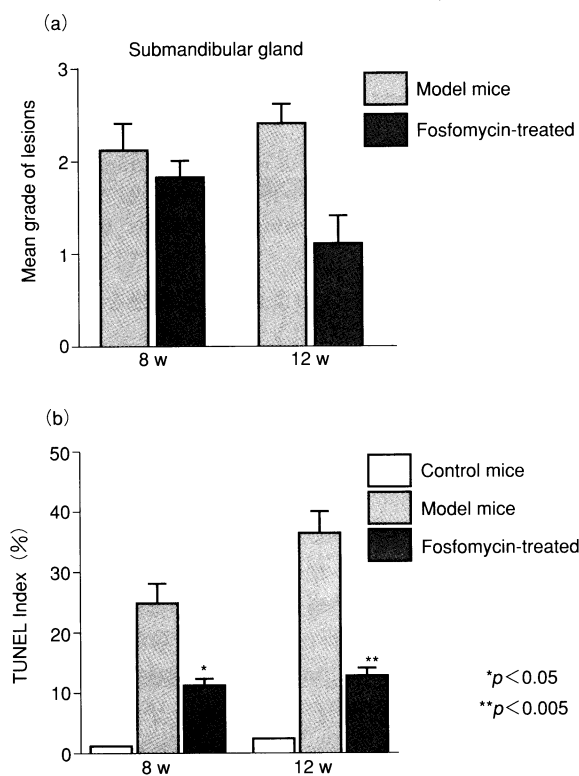


Fig. 1. (a) Mean grade of autoimmune lesions in the salivary gland in fosfomycin (FOM)-treated NFS *sld* mice (FOM-treated) compared with model mice. FOM was administered from 4 weeks to 8 or 12 weeks of age. Grading of the inflammatory lesions was according to the method of White¹⁰⁾. * $p < 0.05$; Mann-Whitney *U* test. (b) Detection of TUNEL⁺ apoptotic epithelial cells in the salivary gland sections from FOM-treated and model mice. The percentage of cells staining positively by TUNEL was determined by using a 10- \times 20-grid net micrometer disk covering an objective with an area of 0.16 mm². Data were analyzed in 10 fields per section and are expressed as mean percentage \pm SD in five mice examined per group. * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$, Student's *t*-test.

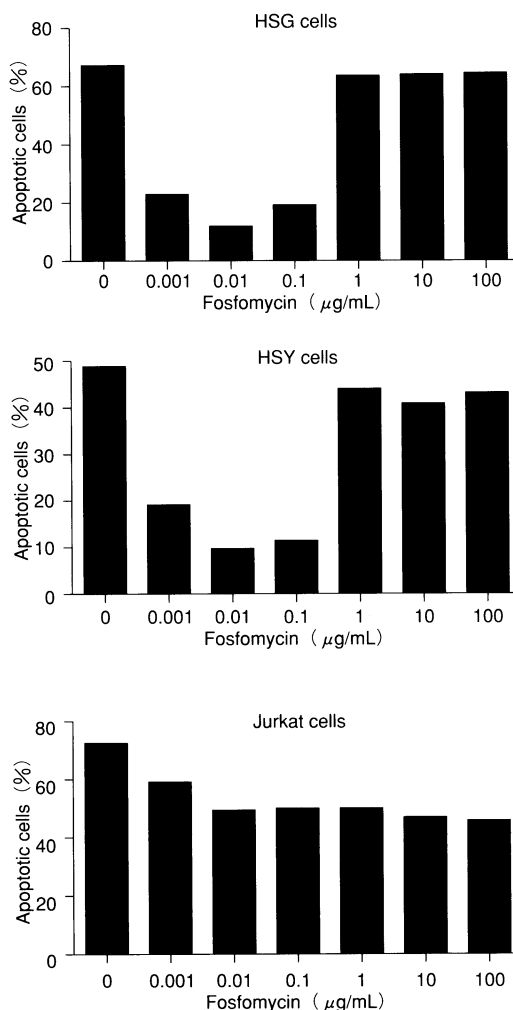


Fig. 2. Effect of fosfomycin (FOM) pretreat on anti-Fas mAb-induced apoptosis of HSG, HSY, and Jurkat cells. Cells were treated with FOM (from 0.001 to 100 $\mu\text{g mL}$) for 12 hours before anti-Fas stimulation. Apoptotic cells were detected with a flow cytometer by using PI (propidium iodide) and annexin V-FITC. Data are representative of 3-5 experiments.

a)。
次に、Fas 刺激にて活性化することがよく知られているカスパーゼ (ICE, CPP 32) についてウエスタンブロット法にて経時的に検討すると、Fas 刺激により 6 時間から活性型 ICE, CPP 32 の発現増強が認められるが、FOM 処理により ICE, CPP 32 ともに発現が抑制され、24 時間後に検出される (Fig. 3 b)。このように FOM はカスパーゼの活性化を抑制することによって唾液腺細胞のアポトーシスを阻害することがわかった。

III. 考 察

臓器特異的自己免疫疾患の治療法は対症療法が中心であり、根本的治療法は確立していない。従来の免疫抑制剤およびステロイド剤は種々の全身的副作用の危険性があり、臓器特異的自己免疫疾患への適用は限られている。シェーグレン症候群は涙腺、唾液腺を標的とする臓器特異的自己免疫疾患の 1 つであり、ドライアイ・ドライマウスを主徴とし、この疾患に関しても各種点眼剤、人工唾液投与などによる対症的治療が中心である。シクロスポリン A などの免疫抑制剤やアンドロジェンなどのステロイドホルモンによる治療法が知られている

が、いずれも全身的副作用の影響が報告されている^{12,13)}。一方、FOM は多くの薬理作用を有する抗生物質で、副作用がきわめて少ないことから種々の感染症への適用が可能で、すでに多くの臨床応用が知られている^{2,14,15)}。さらに、FOM の免疫抑制効果が報告されていることから⁴⁻⁷⁾、自己免疫疾患への治療の可能性が推察されていたが、適切な実験モデルで検証されたことはなかった。われわれの確立したシェーグレン症候群モデルマウスに FOM を投与することにより自己免疫病変の回復が認められ、そのメカニズムには PKC およびカルシニューリンを介した IL-2 の産生に至るエフェクター細胞の活性化を FOM が調節可能であることを示した⁹⁾、以前の報告においても末梢 T 細胞の IL-2 産生機構に FOM が抑制的に働くことが知られており⁴⁻⁷⁾、これらの結果と一致する。一方で、FOM は細胞膜の安定化を保つことが知られていることから¹⁶⁻¹⁸⁾、免疫反応においてエフェクター細胞への影響以外に標的細胞への防御的な作用が想定される。そこで、本研究ではシェーグレン症候群の標的臓器である唾液腺の組織破壊に対する FOM の影響を検討した。

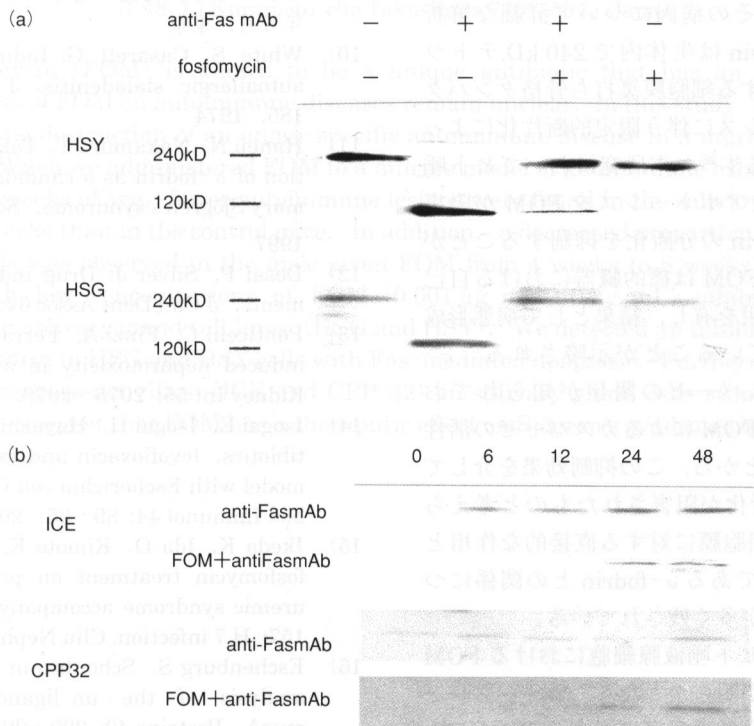


Fig. 3. (a) Effect of fosfomycin (FOM) on α -fodrin cleavage of HSY and HSG cells stimulated with anti-Fas mAb. Protein immunoblot analysis with mouse monoclonal Ab to α -fodrin was performed in the treated cells. (b) Detection of caspase (ICE and CPP 32) in FOM-treated HSY cells. Western blot analysis of ICE (p20 subunit) and CPP 32 in apoptotic HSY cells stimulated with anti-Fas mAb. Cytosolic extracts were prepared from HSY cells treated and not treated with FOM (0.01 μ g/mL) for various times.

本モデルマウスに FOM を投与することにより自己免疫病変の回復傾向が認められ、その際、標的上皮細胞のアポトーシスが有意に抑制されていることが判明したことから、FOM が標的細胞のアポトーシスを直接阻害する可能性が考えられた。この結果を *in vitro* で検証すると、ヒト唾液腺細胞株の Fas を介したアポトーシスに対する FOM の阻害効果が判明した。多くの自己免疫疾患の組織破壊のメカニズムに Fas を介したアポトーシスの関与が知られているが^{19,20)}、シェーグレン症候群においても Fas を介した組織破壊が重要視されている。ヒト培養唾液腺細胞株にも Fas 抗原が発現し、抗 Fas 抗体で容易にアポトーシスが誘導される。Fas の下流に存在するカスパーゼの活性化によってアポトーシス機構が制御されていることが知られていることから²¹⁻²³⁾、FOM のカスパーゼへの影響を検討すると、ICE および CPP 32 の活性が抑制されるという知見を得たが、対照細胞株の Jurkat 細胞においてはカスパーゼの活性化に影響をおよぼさないことから、細胞種により異なる作用が予想される。カスパーゼの活性制御における FOM の至適濃度が 0.001~0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に相当するものと考えられるが、今後の詳細な検討が必要である。

われわれは SS 特異的自己抗原として 120 kD α -fodrin をすでに同定し、その病因について詳細な解析を行ってきた¹¹⁾。 α -fodrin は生体内で 240 kD テトラマーのユビキタスに存在する細胞膜裏打ち骨格タンパクとして知られ、アポトーシスに伴う限定的断片化によって 120 kD になるとされる²⁴⁻²⁶⁾。本研究においてヒト唾液腺細胞の Fas を介したアポトーシスを FOM が阻害することにより、 α -fodrin の断片化を抑制することがわかった。したがって、FOM は標的臓器における自己抗原の形成を回避する作用を有し、結果として病態形成に対して防御的に働いていることが示唆される。 α -fodrin の断片化にはカスパーゼの関与が知られており、唾液腺細胞において FOM によるカスパーゼの活性化抑制効果が示されたことから、この抑制効果を介して間接的に α -fodrin の断片化が阻害されたものと考えられる。しかし、FOM の細胞膜に対する直接的な作用と細胞膜の裏打ちタンパクである α -fodrin との関係についてなど今後の検討課題が多く残されている。

今回の実験結果から、ヒト唾液腺細胞における FOM のアポトーシス阻害効果が明らかとなり、シェーグレン症候群を含むある種の自己免疫疾患に対する FOM の治療効果が期待できる。

文 献

- 1) Tsubota K, Saito I, Ishimaru N, et al.: Use of topical cyclosporin A in a primary Sjögren's syndrome mouse model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39: 1551~1559, 1998
- 2) Sullivan D, Edwards J: Androgen stimulation of

lacrimal gland function in mouse models of Sjögren's syndrome. *J Steroid Biochem Mol Biol* 60: 237~245, 1997

- 3) Matsushita M, Takeda-Hirokawa N, Ogasawara H, et al.: Possible mechanism underlying the efficacy of low dose cyclosporine in autoimmune diseases. *Clin Exp Rheumatol* 17: 265~266, 1999
- 4) Ishizaka S, Takeuchi H, Kimoto M, et al.: Fosfomycin, an antibiotic, possessed TGF-beta-like immunoregulatory activities. *Int J Immunopharmacol* 20: 765~779, 1998
- 5) Morikawa K, Oseko F, Morikawa S, et al.: Immunosuppressive activity of fosfomycin on human T-lymphocyte function in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 37: 2684~2687, 1993
- 6) Morikawa K, Oseko F, Morikawa S, et al.: Immunosuppressive activity of fosfomycin on human T-lymphocyte function in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 37: 2684~2687, 1993
- 7) Morikawa K, Oseko F, Morikawa S: Immunomodulatory effect of fosfomycin on human B-lymphocyte function. *Antimicrob Agents Chemother* 37: 270~275, 1993
- 8) Haneji N, Hamano H, Yanagi K, et al.: A new animal model for primary Sjögren's syndrome in NFS sld mutant mice. *J Immunol* 153: 2769~2777, 1994
- 9) 第 48 回日本化学療法学会総会, シェーグレン症候群モデルマウスにおけるホスホマイシンの効果. 1999 年 5 月, 東京
- 10) White S, Casarett G: Induction of experimental autoallergic sialadenitis. *J Immunol* 112: 178~185, 1974
- 11) Haneji N, Nakamura T, Takio K, et al.: Identification of α -fodrin as a candidate autoantigen in primary Sjögren's syndrome. *Science* 276: 604~607, 1997
- 12) Desai P, Silver J: Drug-induced gingival enlargements. *J Can Dent Assoc* 64: 263~268, 1998
- 13) Ponticelli C, Finzi A, Ferracioli G: Cyclosporine-induced nephrotoxicity in autoimmune diseases. *Kidney Int* 55: 2075~2076, 1999
- 14) Isogai E, Isogai H, Hayashi S, et al.: Effect of antibiotics, levofloxacin and fosfomycin, on a mouse model with Escherichia coli O 157 infection. *Microbiol Immunol* 44: 89~95, 2000
- 15) Ikeda K, Ida O, Kimoto K, et al.: Effect of early fosfomycin treatment on prevention of hemolytic uremic syndrome accompanying Escherichia coli O 157: H 7 infection. *Clin Nephrol* 52: 357~362, 1999
- 16) Eschenburg S, Schonbrunn E: Comparative X-ray analysis of the un-liganded fosfomycin-target murA. *Proteins* 40: 290~298, 2000
- 17) Kim D, Lees W, Kempell K, et al.: Characterization of a Cys 115 to Asp substitution in the Escherichia coli cell wall biosynthetic enzyme UDP-GlcNAc enolpyruvyl transferase (MurA) that confers resistance to inactivation by the antibiotic fosfomycin. *Biochemistry* 35 (15): 4923~4928, 1996
- 18) Murakami H, Matsumaru H, Kanamori M, et al.: Cell wall-affecting antibiotics induce expression of a

- novel gene, drp 35, in *Staphylococcus aureus*. *Biochem Biophys Res Commun* 264: 348~351, 1999
- 19) Ito M, Terasaki S, Itoh J, et al.: Rheumatic diseases in an MRL strain of mice with a deficit in the functional Fas ligand. *Arthritis Rheum* 40: 1054~1063, 1997
- 20) Nishio A, Katakai T, Oshima C, et al.: A possible involvement of Fas-Fas ligand signaling in the pathogenesis of murine autoimmune gastritis. *Gastroenterology* 111: 959~967, 1996
- 21) Rodriguez I, Matsuura K, Ody C, et al.: Systemic injection of a tripeptide inhibits the intracellular activation of CPP 32-like proteases in vivo and fully protects mice against Fas-mediated fulminant liver destruction and death. *J Exp Med* 184: 2067~2072, 1996
- 22) Greidinger E L, Miller D K, Yamin T T, et al.: Sequential activation of three distinct ICE-like activities in Fas-ligated Jurkat cells. *FEBS Lett* 390: 299~303, 1996
- 23) Enari M, Hug H, Nagata S: Involvement of an ICE-like protease in Fas mediated apoptosis. *Nature* 375: 78~81, 1995
- 24) Natha R, Hugginsa M, Glantz S B, et al.: Development and characterization of antibodies specific to caspase-3-produced alpha II-spectrin 120 kDa breakdown product: marker for neuronal apoptosis. *Neurochem* 37: 351~361, 2000
- 25) Vanags D M, Porn-Ares M I, Coppola S, et al.: Protease involvement in fodrin cleavage and phosphatidylserine exposure in apoptosis. *J Biol Chem* 271: 31075~31085, 1996
- 26) Janicke R U, Ng P, Sprengart M L, et al.: Caspase-3 is required for alpha-fodrin cleavage but dispensable for cleavage of other death substrates in apoptosis. *J Biol Chem* 273: 15540~15545, 1998

Therapeutic effect of fosfomycin in animal model of sjögren's syndrome

Naozumu Ishimaru, Norio Haneji, Kumiko Yanagi
and Yoshio Hayashi

Department of Pathology, Tokushima University School of Dentistry,
3-18-15 Kuramoto-cho Tokushima 770-8504, Japan

Although fosfomycin (FOM) is known to be a unique antibiotic that has an immunosuppressive function, the effects of FOM on autoimmune diseases remain unclear. In this study, we report a novel role of FOM in the tissue destruction of an organ-specific autoimmune disease in a murine model of Sjögren's syndrome (SS). When we administered FOM to a murine model of autoimmune exocrinopathy in SS from 4 weeks to 8 or 12 weeks of age, fewer autoimmune lesions were found in the salivary and lacrimal glands of the mice at 12 weeks than in the control mice. In addition, a decreased proportion of TUNEL⁺ apoptotic epithelial duct cells was observed in the mice given FOM from 4 weeks to 8 weeks. We also found that preincubation with low concentrations of FOM (0.001 $\mu\text{g mL}^{-1}$ -1.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) inhibits anti-Fas-induced apoptosis in human salivary gland cell lines (HSG and HSY). We detected an inhibitory effect of FOM on proteolysis of α -fodrin in HSG and HSY cells with Fas-mediated apoptosis. Furthermore, treatment with FOM suppressed caspase activities (ICE and CPP-32) in salivary gland cells stimulated with anti-Fas mAb. These results suggest that FOM has a therapeutic effect on Sjögren's syndrome by inhibiting apoptosis in salivary gland cells.