

口唇腺を用いたシェーグレン症候群におけるヒト β ディフェンシンの発現パターン分析

武田 斉子

Analysis of expression patterns of human β -defensins in labial glands with Sjögren's syndrome

Seiko Takeda

抄録

本研究ではシェーグレン症候群患者の唾液腺におけるヒト β ディフェンシン 1~4(hBD1~4)の発現パターンを明らかにする目的で、シェーグレン症候群患者(SS 群)と非シェーグレン症候群患者(non-SS 群)の口唇腺を標本として用い、免疫組織化学およびリアルタイム RT-PCR 法にてタンパク局在と遺伝子発現の分析を行った。なお、シェーグレン症候群の診断は 1999 年の厚生省の診断基準に従った。

hBD1 は SS 群、non-SS 群いずれにおいても、ほぼ同程度の遺伝子発現が測定されたものの、免疫染色反応では SS 群は non-SS 群と比較して反応が明らかに弱かった。一方、hBD2 は SS 群では免疫染色反応、遺伝子発現ともに non-SS 群と比較すると明らかに強かった。また、hBD4 は、SS 群ではわずかな遺伝子発現が認められ、免疫染色でも同様にわずかな反応が認められたが、non-SS 群では hBD4 遺伝子発現および免疫染色反応もほとんど認められなかった。つまり、hBD1、2 ではシェーグレン症候群で発現が低下する傾向であったが、hBD4 では逆に増加する傾向であった。興味深いことに non-SS 群中には SS 群と近似した hBD4 遺伝子発現および免疫染色反応を示す群があった。即ち、臨床的にはシェーグレン症候群と診断されていないにもかかわらず、シェーグレン症候群と共通する特徴が観察された群が存在したことが判明した。なお、hBD3 に関しては、SS 群 non-SS 群ともに遺伝子発現も、免疫染色も観察されなかった。これらの結果から将来、リアルタイム RT-PCR 法による詳細な分析結果がシェーグレン症候群の診断や罹患リスク評価に有効になる可能性も示唆された。

緒言

シェーグレン症候群とは口腔乾燥、眼乾燥を伴う自己免疫疾患である¹⁾。口腔乾燥や眼乾燥は唾液腺および涙腺の障害によって引き起こされ²⁾、特に口腔内では口腔乾燥による口腔環境の変化が原因となって、カンジダ症や齲蝕リスクの増加を招き、様々な問題が生じる³⁾ことから、自覚症状が少ない早期の段階での診断はこれらの問題の軽減が期待できると言われている⁴⁾。

シェーグレン症候群の診断は非常に複雑であり、国や機構によって診断基準が異なる^{5),6)}。わが国では、1999年に厚生省により改定された診断基準が採用されている。具体的には、(1)口唇小唾液腺の生体組織でリンパ球浸潤がある。(2)唾液分泌量の低下がガムテスト、サクソンテスト、唾液腺造影、シンチグラフィなどで証明される。(3)涙の分泌低下がシャーマーテスト、ローズベンガル試験、蛍光色素試験などで証明される。(4)抗SS-A抗体か抗SS-B抗体が陽性である。以上4項目の中で2項目以上が陽性であればシェーグレン症候群と診断するとされている⁵⁾。

また、シェーグレン症候群は自己免疫疾患とされ、他の膠原病の合併が指摘されている。即ち、シェーグレン症候群以外の膠原病の合併がみられない一次性シェーグレン症候群と、関節リウマチや全身性エリテマトーデスといった、シェーグレン症候群以外の膠原病の合併がみられる二次性シェーグレン症候群とに分類される^{5),6)}。シェーグレン症候群全体で、一次性シェーグレン症候群は70%程度、二次性シェーグレン症候群は30%程度であるといわれている⁷⁾。なお、関節リウマチ患者のうち約30%がシェーグレン症候群を合併しており、全身性エリテマトーデスでは約5~10%、強皮症では約3~8%、多発性筋炎、皮膚筋炎では3%が合併しているという報告がある⁸⁾。しかし、その関係については不明確である。

ディフェンシンは植物、昆虫、動物、あらゆる生物に発現が認められ、生体防御反応のうち、免疫応答に先立って発現する際の重要な抗菌ペプチドの一つとして知られている^{9,10)}。ディフェンシンは恒常的に好中球や上皮細胞で生産、分泌されており、細菌などが上皮や上皮細胞に侵入すると即座に分泌量が増え、細菌の細胞膜に付着しチャージを変えることで細胞膜を穿孔させ破壊する⁸⁾。ヒトディフェンシンは好中球型のヒト α ディフェンシン(hNP)と上皮型のヒト β ディフェンシン(hBD)に分類され¹⁰⁾、さらに、hBDはhBD1、hBD2、hBD3、hBD4のサブタイプに分類される¹¹⁻¹³⁾。いずれのサブタイプも近似した働きを持つが、大きさ、遺伝子配列、作用の強弱、局在性などが異なっていることが報告されている¹⁴⁾。いずれの遺伝子も第8染色体に存在しているが、hBD1は8p23.2-p23、hBD2は8p23.1-p22、hBD3は8p23、hBD4は8p23.1とすべて別々に存在していることが報告されている^{11,14,15)}。口唇腺でもhBDの局在が報告されており¹²⁾、シェーグレン症候群において発現が変化していることが報告されている¹⁶⁾ものの、遺伝子発現変化に関する詳細な分析はなされていない。そこで、本研究ではシェーグレン症候群におけるhBDの遺伝子発現をリアルタイムRT-PCR法を用いて測定し、免疫組織化学染色によるhBDの局在性の変化とともに比較分析を試みた。

材料と方法

本研究に用いた口唇腺は岡山大学病院および広島市民病院を受診した、シェーグレン症候群が疑われる患者から、診断のために口唇生検によって摘出されたものの一部を使用している。尚、シェーグレン症候群の診断は1999年の厚生省の診断基準⁵⁾に従った。

摘出された口唇腺はシェーグレン症候群であると診断されたSS群(n=31)と、

シェーグレン症候群ではないと診断された non-SS 群(n=41)とに分類した。なお、non-SS 群には口唇腺に異常をきたす疾患の罹患者は認められなかった。SS 群の内訳は 4 人が男性、27 人が女性で、平均年齢は 56.8 ± 14.1 歳であった。一方、non-SS 群では 16 人が男性、25 人が女性であり、平均年齢は 59.8 ± 12.6 歳であった。両群に有意差は無かった。

摘出した口唇腺は免疫組織化学染色に供するものと遺伝子発現を分析に供するための標本とに 2 分割した。免疫染色に供する標本は 4%パラフォルムアルデヒドに 4°C で 1 日浸漬した後、定法によりエタノールシリーズで脱水、トルエン透徹後 Paraplast + (Sigma, St Louis, MO, USA)に包埋し 7 μ m の連続切片を作成した。遺伝子発現分析に供する標本は RNAlater solution (Ambion, Austin, TX, USA)に 4°C で一晩浸漬させ、QIAzol Lysis Reagent (Qiagen, Hilden, Germany)中でホモジナイズした後、RNeasy Mini Kit (Qiagen)を用いて totalRNA を抽出し、Ready-To-Go T-Primed First-Strand kit (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Buckinghamshire, UK)を用いて cDNA に逆転写した。

尚、本研究は岡山大学病院、広島市民病院の倫理委員会の承認を得ており、対象となった患者には十分なインフォームドコンセントを行い、本研究への口唇腺の使用の同意を得られ、シェーグレン症候群の診断が下された患者に対しては十分な治療が施されている。

免疫組織化学染色

7 μ m の連続切片はシランコートスライドにマウントした。切片はトルエンで脱パラフィンした後に、PBS 中で氷冷しながら電子レンジで断続的照射して免疫染色を行った(Kaneda et al., 2009)。使用した抗体は抗 hBD1 抗体(1:200; Peptide Institute, Osaka, Japan)、抗 hBD2 抗体(1:200; Peptide Institute, Osaka, Japan)、抗 hBD3

抗体(1:200; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)、抗 hBD4 抗体(1:200; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)である。免疫反応させた後、DAB 反応で可視化し、メチルグリーンでカウンターステインを施して顕微鏡 (Biozero-8000; Keyence, Osaka, Japan)にて観察した。

プライマーの設計

各 *hBD* のプライマーの設計に当たり、*hBDs* の発現が報告されている¹⁷⁾重層扁平上皮細胞癌株(HSC4)を用いて cDNA ライブラリーを作成した。プライマーは National Center for Biotechnology Information(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)に公表されている各 *hBD* の塩基配列をもとに Primer3 を用いて設計した。GenBank ID は *hBD1*、*hBD2*、*hBD3*、*hBD4*、内部標準用の *human β -actin* の順に、NM_005218、AF_040153、NM_018661、NM_004942、NM_001101 であり、各プライマーの配列は Table 1 に示す通りである。リアルタイム RT-PCR に用いた各 *hBD* のプライマーの組み合わせは、合成産物を TOPO ベクター(pCRII-TOPO, Invitrogen, CA, USA)へ組み込んでクローニングした後、合成産物の配列を、CLUSTALW(<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>)を用いてチェックし、100%一致したもののみを本研究に使用した。

リアルタイム RT-PCR による分析

RT-PCR は SYBR Premix Ex Taq(Takara-Bio, Otsu, Shiga, Japan)に記載された方法に従い、LightCycler 1.5 ST300 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)を用いて SYBR Green detection で行った。リアルタイム PCR の条件は初期変性 95°C10 秒間 1 サイクル、PCR 反応 95°C 5 秒間、60°C 20 秒間を 40 サイクル、融解曲線分析 95°C5 秒、65°C 15 秒、72°C 15 秒と設定した。*hBD1*、*hBD2*、*hBD3*、*hBD4* の

発現量はヒト β -actin を内部標準遺伝子として相対定量解析した。なお、段階希釈したそれぞれのプライマーペアの PCR 産物は standard curve の template に用いた。結果は平均値 $\pm$ 標準偏差で示し、有意差判定には Mann-Whitney U 検定を用い、 $P<0.05$ を有意差ありと判定した。

結果

免疫組織化学染色結果

すべての SS 群の標本には、腺房細胞の破壊や線維組織への置換、リンパ球浸潤が認められ、口唇腺は委縮していた。non-SS 群の標本ではこのような異常所見は認められなかった(Fig. 1b)。

hBD1 のシグナルは non-SS 群、SS 群ともに、導管上皮細胞に認められ、腺房には認められなかった(Fig. 1a)。また、hBD1 のシグナルの強さは SS の口唇腺と正常な口唇腺とを比較したところ、ほとんど違いが認められなかった。

hBD2 のシグナルも non-SS 群、SS 群ともに、導管上皮細胞に認められ、腺房には認められなかった(Fig. 1a)。SS 群のシグナルの強度は non-SS 群と比較すると、著しく弱かった。

hBD3 のシグナルは non-SS 群においても SS 群においても認められなかった(Fig. 1a)。

hBD4 のシグナルは non-SS 群では導管上皮細胞に認められるのみならず、腺房細胞にもわずかに認められるものがあつた。SS 群ではすべての標本において導管上皮細胞と腺房細胞にシグナルが認められたが、シグナル強度は non-SS 群で認められたものと比較して弱かった(Fig. 1a,b)。

***hBD1* の遺伝子発現**

本研究では *human β-actin* を内部標準遺伝子として相対量を評価した。

SS 群、non-SS 群いずれにおいても *hBD1* 遺伝子は全ての個体で発現が測定できた。non-SS 群では 0.25 ± 0.19 、SS 群では 0.20 ± 0.20 であった(Table 2)が、有意差は認められなかった($P=0.87$)。

***hBD2* の遺伝子発現**

SS 群、non-SS 群いずれにおいてもすべての標本で *hBD2* 遺伝子発現が測定された。non-SS 群は 0.013 ± 0.018 であり、SS 群の相対量は $0.46 \times 10^{-3} \pm 0.001$ と明確に高く (Table 2)、有意差が認められた($P=0.0031$)。

***hBD3* の遺伝子発現**

免疫染色標本と同様に *hBD3* 遺伝子発現はすべての標本において計測されなかった。

***hBD4* の遺伝子発現**

non-SS 群は *hBD4* 遺伝子発現を測定できた標本($n=9$)と、できなかった標本($n=32$)が存在した。non-SS 群で *hBD4* 遺伝子発現が測定できたものの発現量は 0.16 ± 0.15 であった。SS 群ではすべての個体で *hBD4* 遺伝子発現が測定でき、発現量は $0.32 \times 10^{-3} \pm 0.21 \times 10^{-3}$ であった。また、non-SS 群で *hBD4* 遺伝子発現が測定できた個体群と SS 群間の発現量には有意差が認められた($P=0.0041$)。

考察

本研究ではシェーグレン症候群における hBD の遺伝子発現をリアルタイム

RT-PCR 法を用いて測定し、免疫染色による hBD の局在性の変化とともに比較分析した。

シェーグレン症候群はシェーグレン症候群以外の膠原病の合併を伴わない一
次性シェーグレン症候群と、シェーグレン症候群以外の膠原病の合併を伴う二
次性シェーグレン症候群とに分類される^{5,6)}。SS 群の患者は 1999 年の厚生省の
診断基準⁵⁾を満たしており、すべての患者において口唇腺の破壊、およびリンパ
球浸潤を認めた (Fig. 1-b)。尚、本研究の non-SS 群の患者のうち、21 人(男性
10 人、女性 11 人)はシェーグレン症候群以外の膠原病を罹患していた。また、
SS 群の患者のうち 10 人(男性 1 人、女性 9 人)はシェーグレン症候群以外の膠原
病を合併しており、二次性シェーグレン症候群と判定された。残り 21 人(男性 3
人、女性 18 人)はシェーグレン症候群以外の膠原病の合併は認めず、一次性シェ
ーグレン症候群と判定された。

本研究では hBD がシェーグレン症候群のマーカーとなりえるかを検討した。
金田ら¹⁶⁾が hBD1、hBD2、hBD3 の免疫染色による発現変化を評価しており、シ
ェーグレン症候群では hBD1、hBD2 は減少し、hBD3 は発現が認められなかった
という結果が報告されている。本研究では、より定量的な評価を行うため、リ
アルタイム RT-PCR による *hBD1*、*hBD2*、*hBD3*、および近年その存在が新たに
発見された *hBD4* の遺伝子発現の比較分析を行った。

hBD1 の遺伝子発現は non-SS 群、SS 群と同様であったが、免疫染色では SS
群では抗 hBD1 の反応は non-SS 群と比較すると明らかに弱かった (Fig. 1a)。この
ことは、hBD1 ペプチドのターンオーバーがシェーグレン症候群では正常群の場合
と比較して早い *hBD1* 遺伝子発現そのものは一定である可能性を示唆して
いる。

また、抗 hBD2 抗体の反応は、免疫染色では SS 群では減衰していたが、遺伝

子発現でも同様に *hBD2* の発現は減少していた。このような *hBD2* 遺伝子発現の減少は、正常な小唾液腺に比較して慢性炎症がある小唾液腺において認められることが報告されている¹⁸⁾ことと矛盾しない。non-SS 群の口唇腺では異常な病理学的所見は認められなかった(Fig. 1a, b)。SS 群の *hBD2* 遺伝子発現は、non-SS 群と比較すると著しく少ないことが免疫染色の結果を反映していることが本研究結果でも示された。シェーグレン症候群ではその他の器官においても *hBD2* の局在や発現の分析が報告されており、シェーグレン症候群の結膜上皮では *hBD2* 遺伝子発現の減少が報告されている¹⁹⁾。即ち、シェーグレン症候群では障害をうける各組織において *hBD2* 遺伝子発現が減少する傾向があることが示唆されている。

hBD3 遺伝子発現は免疫染色反応のシグナル同様、SS 群と non-SS 群のすべての標本で認められず、*hBD3* は口唇腺には発現しない可能性が示唆された。免疫染色でも陰性であったことは遺伝子発現のみの研究も遺伝子産物のみの研究も十分では無く、両者の比較検討が重要であることを示している。

本研究ではすべての SS 群で *hBD4* 遺伝子発現が計測されたが、non-SS 群ののうち 9 例においても *hBD4* 遺伝子発現が認められ(Table 2)、仮に、non-SS(4+)とした。しかし、SS 群と non-SS(4+)群の *hBD4* 遺伝子発現には有意差があり、non-SS(4+)群の方が高かった。免疫染色反応でみると、non-SS 群では抗 *hBD4* 抗体のシグナルが認められるもの(Fig.1b-B)とシグナルがほとんど認められないもの(Fig.1b-A)があった。すべての SS 群では抗 *hBD4* 抗体の免疫染色反応も認められており(Fig.1b-C)、これらことが上述の *hBD4* 遺伝子発現の結果を反映しているものと考えられる。また、non-SS 群のうち 32 例の *hBD4* 遺伝子発現が測定されなかった群を non-SS(4-)群とした。non-SS(4+)群は *hBD4* が発現しているという点で SS 群と類似していると考えられるし、non-SS(4+)群の *hBD4* 遺伝子発

現量は、non-SS(4+)群、SS 群の順で高く、いずれとも有意差を認めた。*hBD2* 遺伝子発現の場合が SS 群で減少するのに反し、*hBD4* 遺伝子発現は逆に SS 群で上昇する現象は非常に興味深い。さらに、本研究の non-SS 群の患者のうち、21 人(男性 10 人、女性 11 人)はシェーグレン症候群以外の膠原病を罹患しており、non-SS(4+)群はすべてシェーグレン症候群以外の膠原病に罹患していることが判明していた。シェーグレン症候群と膠原病との関連性が示唆されている^{20,21,22)}ことから、non-SS(4+)群は将来、二次性シェーグレン症候群に罹患する可能性を持っていることが推測される。このように、非シェーグレン症候群(non-SS 群)の中に存在する *hBD4* 遺伝子発現の変化は *hBD2* 遺伝子発現の変化よりも先に生じている可能性が強いことも興味深い。

結論

シェーグレン症候群の口唇腺におけるその他の遺伝子発現の分析の報告はある²³⁾が、*hBD1~4* 遺伝子発現パターンの変化と免疫組織化学染色の比較分析の報告は本研究が最初である。本研究ではより、迅速簡便に遺伝子発現の分析ができるリアルタイム RT-PCR 法を用いて分析したことにより。免疫組織化学的分析のみでは把握できなかった遺伝子レベルでの変化を把握できたと考えている。本研究での分析結果もとに更に詳細に発展させることは、シェーグレン症候群と *hBD* 遺伝子発現パターンの変化との関連を用いてシェーグレン症候群罹患リスクを迅速、確実に診断する鍵を示す可能性があると考ええる。

文献

- 1) Fox, RI.:Sjögren's syndrome. *Lancet*;**366**,321-31,2005.
- 2) Sood, S., Anthony, R., Pease, CT.:Sjögren's syndrome. *Clinical otolaryngology and allied sciences*;**25**: 350-357,2000.
- 3) Greenspan, D.:Xerostomia: diagnosis and management. *Oncology*;**10**: 7-11,1996.
- 4) Bayetto, K., Logan, RM.:Sjogren's syndrome: a review of aetiology, pathogenesis, diagnosis and management. *Australian dental journal*;**55 Suppl 1**: 39-47,2010.
- 5) Fujibayashi, T., Sugai, S., Miyasaka, N., Hayashi, Y., Tsubota, K.:Revised Japanese criteria for Sjögren's syndrome (1999): availability and validity.*Modern rheumatology / the Japan Rheumatism Association*;**14**: 425-434,2004.
- 6) Vitali, C., Bombardieri, S., Moutsopoulos, HM., Coll, J., Gerli, R., Hatron, PY., Kater, L., Konttinen, YT., Manthorpe, R., Meyer, O., Mosca, M., Ostuni, P., Pellerito, RA., Pennec, Y., Porter, SR., Richards, A., Sauvezie, B., Schiodt, M., Sciuto, M., Shoenfeld, Y., Skopouli, FN., Smolen, JS., Soromenho, F., Tishler, M., Wattiaux, MJ., et al. :Assessment of the European classification criteria for Sjogren's syndrome in a series of clinically defined cases: results of a prospective multicentre study. The European Study Group on Diagnostic Criteria for Sjögren's Syndrome. *Annals of the rheumatic diseases*;**55**: 116-121,1996.

- 7) Maeda, N., Yamaji, K., kimura, K., Kim, Y., Tsuda, H., Hirose, S., Hashimoto, H.: Analysis of clinical questionnaire of Tokyo Metropolitan Government for Sjögren's Syndrome. Japan. *J.Clin. immunol*; **28**: 398-406, 2005
- 8) Kauppi, M., Kautiainen, H.: Primary rheumatic diseases of secondary Sjögren's Syndrome. Japanese Journal of Rheumatology; **9**: 65-68, 1999
- 9) Diamond, G., Ryan, L.: Beta-defensins: what are they really doing in the oral cavity? *Oral diseases*; **17**: 628-35, 2011.
- 10) Klotman, ME., Chang, TL.: Defensins in innate antiviral immunity. *Nature reviews. Immunology*; **6**: 447-56, 2006.
- 11) Pazgier, M., Hoover, DM., Yang, D., Lu, W., Lubkowski, J.: Human beta-defensins. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*; **63**: 1294-313, 2006.
- 12) Dale, BA., Krisanaprakornkit, S.: Defensin antimicrobial peptides in the oral cavity. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*; **30**: 321-7, 2001.
- 13) Garcia, JR., Krause, A., Schulz, S., Rodriguez-Jimenez, FJ., Kluver, E., Adermann K., Forssmann, U., Frimpong-Boateng, A., Bals, R., Forssmann, WG.: Human beta-defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of

- antimicrobial activity. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*; **15**: 1819-1821,2001.
- 14) Boniotto, M., Ventura, M., Eskdale, J., Crovella, S., Gallagher, G.: Evidence for duplication of the human defensin gene DEFB4 in chromosomal region 8p22-23 and implications for the analysis of SNP allele distribution. *Genetic testing*; **8**: 325-327,2004.
- 15) Abu Bakar, S., Hollox, E.J., Armour, J.A.: Allelic recombination between distinct genomic locations generates copy number diversity in human beta-defensins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; **106**: 853-858,2009.
- 16) Kaneda, Y., Yamaai, T., Mizukawa, N., Nagatsuka, H., Yamachika, E., Gunduz, M., Sawaki, K., Yamanishi, Y., Matsubara, M., Katase, N., Takagi, S.: Localization of antimicrobial peptides human beta-defensins in minor salivary glands with Sjogren's syndrome. *European journal of oral sciences*; **117**: 506-510,2009.
- 17) Yoshimoto, T., Yamaai, T., Mizukawa, N., Sawaki, K., Nakano, M., Yamachika, E., Sugahara, T.: Different expression patterns of beta-defensins in human squamous cell carcinomas. *Anticancer research*; **23**: 4629-4633,2003.
- 18) Bonass, W.A., High, A.S., Owen, P.J., Devine, D.A.: Expression of beta-defensin

- genes by human salivary glands. *Oral microbiology and immunology*; **14**: 371-374,1999.
- 19) Kawasaki, S., Kawamoto, S., Yokoi, N., Cannon, C., Minesaki, Y., Kinoshita, S., Okubo, K.: Up-regulated gene expression in the conjunctival epithelium of patients with Sjögren's syndrome. *Experimental eye research*; **77**: 17-26,2003.
 - 20) Antero, DC., Parra, AG., Miyazaki, FH., Gehlen, M., Skare, TL.: Secondary Sjogren's syndrome and disease activity of rheumatoid arthritis. *Revista da Associacao Medica Brasileira*; **57**: 319-322,2011.
 - 21) Fox, RI., Liu, AY.: Sjogren's syndrome in dermatology. *Clinics in dermatology*; **24**: 393-413,2006.
 - 22) Theander, E., Jacobsson, LT.: Relationship of Sjogren's syndrome to other connective tissue and autoimmune disorders. *Rheumatic diseases clinics of North America*; **34**: 935-947, viii-ix,2008.
 - 23) Perez, P., Anaya, JM., Aguilera, S., Urzua, U., Munroe, D., Molina, C., Hermoso, MA., Cherry, JM., Alliende, C., Olea, N., Ruiz-Narvaez, E., Gonzalez, MJ.: Gene expression and chromosomal location for susceptibility to Sjögren's syndrome. *Journal of autoimmunity*; **33**: 99-108,2009.

TABLES

Table 1. Oligonucleotide sequences of primers for real-time RT-PCR

Target cDNA	GenBank Accession No.	Forward (5' → 3')	Reverse (5' → 3')	Amplicon size (bp)
<i>hBD1</i>	NM 005218	cgccatgagaacttcctacc	cttctggtcactcccagctc	229
<i>hBD2</i>	AF 040153	atcagccatgaggggtcttgt	gagaccacaggtgccaattt	172
<i>hBD3</i>	NM 018661	ctgttttgggtgcctgttc	tctttctcggcagcatttt	163
<i>hBD4</i>	NM 004942	ctcagctcctggatgaagctc	ggatcgctataaccacaaaa	116
<i>β-actin</i>	NM 001101	agagctaccagctgcctgac	agcactgtgtggcgtacag	184

Table 2. Expression ratios of *hBD1*, *hBD2*, *hBD3*, and *hBD4*

	non-SS(n=41)	SS(n=31)	P-value
<i>hBD1</i>	0.25±0.19	0.20±0.20	0.87
<i>hBD2</i>	0.013±0.018	0.46 x 10 ⁻³ ±0.001	0.0031
<i>hBD3</i>	0	0	
<i>hBD4</i>	non-SS(4+) (n=9)	0.32 x 10 ⁻³ ±0.21x10 ⁻³	0.0041
	0.16±0.15		
	non-SS(4-) (n=32)		
	0		

hBD1 遺伝子発現は non-SS 群および SS 群のすべての標本にて認められ,non-SS 群,SS 群間に有意差はなかった(P=0.87)。

hBD2 遺伝子発現も non-SS 群および SS 群のすべての標本にて認められ,non-SS 群,SS 群間に有意差があった(P=0.0031)。

hBD3 遺伝子発現はすべての標本においてまったく認められなかった。

hBD4 遺伝子発現は non-SS 群の 32 例(年齢:43.4 ± 15.4)に認められず,これらを non-SS(-)群としている。しかしながら,non-SS 群のうち 9 例(年齢: 44.6 ± 14.4)に *hBD4* 遺伝子発現が認められ,これらを non-SS(+)群とした。SS 群のすべての標本にて *hBD4* 遺伝子発現が認められた。non-SS(+)群と SS 群間には有意差が認められた($P=0.0041$)。 P -values は Mann-Whitney U -検定を用い, $P<0.05$ にて有意差ありとみなした。

なお,すべての遺伝子発現量は *human β -actin* にて相対化されている。

FIGURES LEGENDS

Figure 1

1-a)non-SS 群の口唇腺における抗 *hBD1* 抗体(A),抗 *hBD2* 抗体(B),抗 *hBD3* 抗体(C),抗 *hBD4* 抗体(D)の免疫染色反応を低倍率で示す。矢印は導管を指しており,*hBDs* の発現を認める。腺房は a で示している。C,D 上の d は導管を指しており,シグナルを認める。D の二重矢印は腺房を示しており,これらはシグナルを認める。

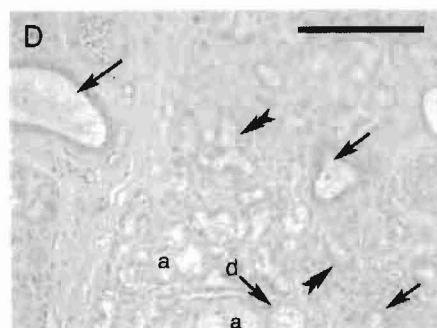
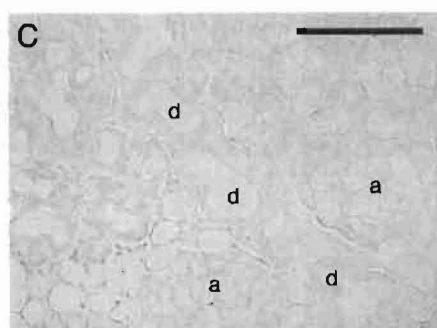
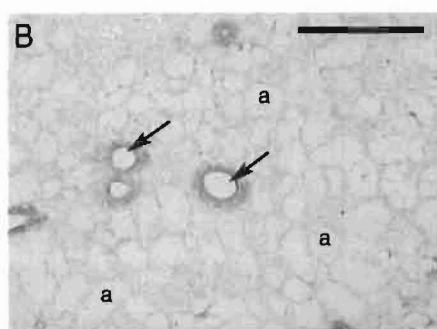
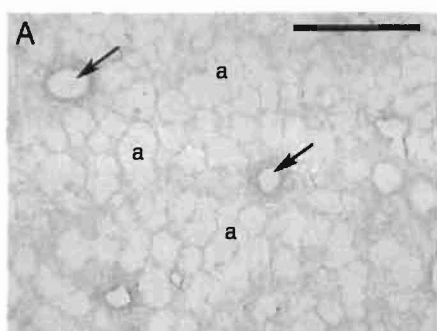
なお,scale bars は 100 μm である。

1-b)SS 群および non-SS 群の口唇腺の抗 *hBD4* 抗体の免疫染色反応を高倍率で示す。A は non-SS(-)群のうち *hBD4* のシグナルを認めるものである。B は non-SS(+)群のうち *hBD4* のシグナルを認める。SS 群では *hBD4* のシグナルが認められた(C,D)。a は腺房,d は導管を指している。da は委縮した腺房を指し,C および D において認められる。B の導管ではシグナルが認められ,C,D の導管でもシグナルが認められる。シグナルの強さは B,C いずれもほとんど同じであった。B,C,D に示す二重矢印はシグナルを認める腺房を指している。

なお, scale bars は 50 μm である。

Figure 1

1-a



1-b

