

令和 2 年 7 月 8 日現在

機関番号：37303

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11500

研究課題名（和文）シェーグレン症候群におけるTLR3活性化とその制御

研究課題名（英文）TLR3 activation and regulation in Sjogren's syndrome

研究代表者

相田 美和 (Sohda, Miwa)

長崎国際大学・薬学部・講師

研究者番号：20258528

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：シェーグレン症候群は、ドライアイ及びドライマウスを主訴とする全身性自己免疫疾患である。これまでに、患者唾液腺においてToll様受容体3（TLR3）発現量が亢進していることが知られている。そこで本研究では、ドライマウス症状を緩解に導く物質の検索を目的として、TLR3抑制作用を有する物質の唾液分泌への影響を検討した。

ヒト顎下腺由来細胞A-253で高いTLR3抑制効を示したLuteolinをシェーグレン症候群モデルマウスのNODマウスに投与したところ、ピロカルピン刺激下の唾液分泌速度が、投与群は対照群と比べて有意に高かった。Luteolinは唾液分泌障害を抑える治療薬になり得ることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本疾患には、他の自己免疫疾患がない一次性と、他の自己免疫疾患（慢性関節リウマチ、全身性エリトマトーデス等）の罹患者が本疾患を併発する二次性に二分される。先行する自己免疫疾患の治療と並行して、発症前から唾液腺障害を予防するような使用法も想定できる。

また、作用機序の検討から、本研究の成果は経年変化による唾液分泌量減少を抑制する効果を有するものとして、健康寿命の延伸への貢献も期待される。

研究成果の概要（英文）：Sjogren's syndrome is a systemic autoimmune disease characterized by dry eyes and a dry mouth. Previous studies have shown that Toll-like receptor 3 (TLR3) expression is enhanced in salivary glands of patients with Sjogren's syndrome. In this study, we examined the effect of substances with TLR3 inhibitory effect on salivary secretion for finding the agent that relieves dry mouth symptoms.

When administering Luteolin, which showed a high TLR3 inhibitory effect in A-253 cells derived from a human submandibular gland, to NOD mice of Sjogren's syndrome model mice, the salivary secretion rate stimulated by pilocarpine was significantly higher in the treated group compared with the control group. These results suggest that Luteolin could be a therapeutic agent for suppressing salivary gland dysfunction.

研究分野：薬学

キーワード：シェーグレン症候群 唾液分泌 フラボノイド

1. 研究開始当初の背景

シェーグレン症候群は、ドライアイ、ドライマウスを主訴とする全身性自己免疫疾患である。唾液量減少により歯周病になりやすくなったり、誤嚥性肺炎を引き起こしやすくなったりする、さらには、慢性炎症性疾患との関連が疑われている認知症を招きやすくなるなど、その影響はQOLの低下に収まらない。2011年の受診者数は7万人弱、ただし急を要する症状ではなく軽く見られがちなこともあり、未受診者を含む推定患者数はこの数字よりかなり多いと推測されている。

しかし、根治できる治療法は確立されておらず、その対応は対症療法に頼っているのが現状である。

シェーグレン症候群の原因究明に関するこれまでの研究から、何らかの感染が契機となり免疫系のバランスが崩れることやアポトーシスによる組織破壊がその発症と密接に関連すると考えられている。

研究の注目点は、疾患研究の進行とともに変化しているが、本研究では、シェーグレン症候群患者唾液腺では健常者唾液腺と比べて自然免疫系の Toll 様受容体の発現量が有意に多いとの知見に着目し、研究を進めることとした。

2. 研究の目的

Toll 様受容体のひとつ TLR3 は、2 本鎖 RNA を認識するパターン認識受容体として知られている。ウイルス由来だけではなく、死細胞由来のものもリガンドになることができるため、唾液腺細胞のアポトーシスにより放出された高次構造をとる自己 RNA もリガンドになり得る。TLR3 活性化の亢進により、アポトーシスが誘導されることも分かっており、唾液腺障害と関連する分子のひとつと考えられている。

本研究では、TLR3 の活性化を抑制する物質を検索し、その物質の唾液分泌量への効果を検討することで、シェーグレン症候群患者の唾液分泌量減少症状の緩解に役立てることを目的とする。

3. 研究の方法

(1)細胞レベルでの候補物質の検討

TLR3 を抑制する候補物質として既報のもの、かつ、動物実験例等から安全性が認められたものの3種を選択した。各物質の効果については異なる実験系での報告であったため、まず、同一の実験系でその効果を比較した。本研究では、TLR を発現するヒト顎下腺導管部由来細胞株 A-253 を用い、TLR3 リガンド poly(I:C)による刺激後の TLR3 の発現量亢進を指標として検討した。

(2)モデル動物での候補物質の検討

(1)の結果、最も高い TLR3 抑制活性を示した Luteolin について、シェーグレン症候群モデルマウスとして使用実績が多数ある NOD/ShiJcl の唾液分泌速度への影響を検討した。

マウスを2群に分け、投与群には Luteolin 10mg/kg 体重/日、対照群には溶媒を経口ゾンデを用いて経口投与した。

体重当たり唾液分泌速度は、ピロカルピンの腹腔内投与による刺激時唾液の採取により算出した。また、このマウスは1型糖尿病モデルマウスでもあるため、尾部から血液を採取し、空腹時血糖値をプレシジョン血糖測定電極で測定した。

24 週経過後、投与群対照群マウスから顎下腺を採取し、HE 染色により炎症の程度を検討した。また、mRNA を採取し、唾液分泌や組織障害に関わるタンパク質群の発現量の差を RT-PCR で検討した。

(3)細胞レベルでの作用機序の検討

(2)で明らかとなった投与群での AQP5 発現亢進について、AQP5 を発現するヒト前立腺由来細胞株 PC-3 を Luteolin 存在下/非存在下で培養し、RT-PCR により発現量の差異を検証した。

4. 研究の成果

(1)細胞レベルでの候補物質の検討

既報論文から候補とした3種を比較すると、最も TLR3 抑制効果が高かったのは、Luteolin であった。

(図1)

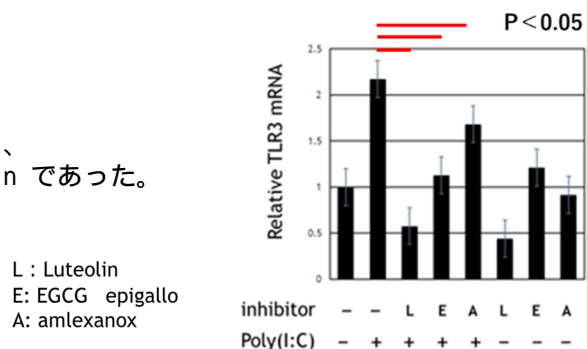


図1. 候補物質の TLR3 活性化抑制効果

(2) モデル動物での候補物質の検討

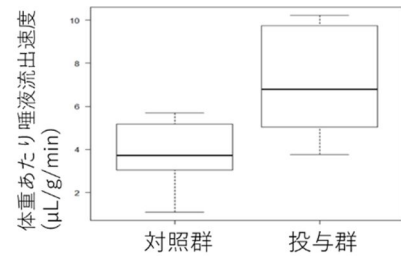
Luteolin 投与群、対照群で刺激時体重当たり唾液分泌速度を比較すると、投与群の方が有意に大きい値を示した。(図 2)

一方、投与群、対照群の体重変化や血糖値には有意差が認められなかった。

また、HE 染色から炎症の程度を比較したところ、投与群、対照群には有意差が認められなかった。

これらの結果から、Luteolin の効果は、唾液分泌に限定的であることが示唆された。

更に、唾液腺組織の RT-PCR の結果から、分泌刺激を受けとるムスカリン受容体 M3 (CHRM3) の発現量には投与の有無による差は認められないが、水輸送体アキュアポリン 5 (AQP5) は、対照群に比べて投与群が有意に高い発現量であることが分かった。



$P < 0.05$

図 2. Luteolin 投与の唾液分泌への影響

(3) 細胞レベルでの作用機序の検討

AQP5 は唾液腺細胞管腔側に発現しており、唾液の水成分分泌に重要な役割を果たす分子である。Luteolin 存在下で培養した PC-3 細胞では、AQP5 発現量の有意な増加が認められた。この結果から、Luteolin 投与による唾液分泌量減少の抑制効果は、AQP5 発現量増加が一因であることが示唆された。

Luteolin は多様な植物に含まれるフラボノイドである。(1) ~ (3)の結果から、Luteolin は AQP5 発現量亢進作用を有し、その摂取により唾液分泌亢進効果が期待できることが示唆された。

AQP5 発現量は炎症や自己抗体産生、アポトーシスによる組織障害に直接的に関わるものとしては知られていない。Luteolin の唾液分泌減少抑制効果は AQP5 発現量亢進作用によるという結果は、Luteolin 摂取によりシェーグレン症候群に限らず、経年変化による唾液分泌量減少を抑制する目的でも効果を期待させる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 相田美和、吉村健	4. 巻 38
2. 論文標題 シェーグレン症候群 発症におけるTLR3の役割を中心として	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 アレルギーの臨床	6. 最初と最後の頁 974-976
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中村允厘、森重遥、金子雅幸、三角佳生、梨田智子、相田美和
2. 発表標題 シェーグレン症候群モデルマウスにおけるルテオリン投与の効果
3. 学会等名 日本薬学会第140回年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	梨田 智子 (Nashida Tomoko) (10133464)	日本歯科大学・新潟生命歯学部・非常勤講師 (32667)	