

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：33703

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18974

研究課題名(和文) RNAシーケンスを用いた外分泌破綻を免れる仕組みの解明

研究課題名(英文) Investigation of fluid secretion mechanism in exocrine by using RNA-seq

研究代表者

大野 雄太 (Ohno, Yuta)

朝日大学・歯学部・助教

研究者番号：30796644

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：シェーグレン症候群は、涙や唾液の分泌が低下しドライアイやドライマウスを引き起こす難病である。これまで涙腺や唾液腺における炎症の視点からの研究が数多くされてきたが、治療薬は対症療法にとどまり、抜本的な病態へのアプローチ法の開発が急がれる。本研究においては、シェーグレン症候群モデルマウスの涙腺を用いて、涙液分泌低下および涙腺炎の発症の前後で網羅的遺伝子発現解析を行い、アルギナーゼ1が発症後に低下していることを見出した。検証の結果、涙腺炎の有無に関わらず、アルギナーゼ1の発現・活性低下が涙液分泌低下につながることを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、シェーグレン症候群の研究は炎症の視点からのものがほとんどであった。実際、炎症が関与することは間違いないが、それだけでは涙液や唾液といった外分泌の低下の全てを説明することができなかった。本研究により、アルギナーゼ1という炎症以外の新たな視点をシェーグレン症候群における涙液分泌低下に導入することができた。このアルギナーゼ1を起点とした研究を推進することで、外分泌低下に対する新たな治療ターゲットを見出すことができる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Sjogren's syndrome shows hyposalivation of tear and/or saliva, which finally induces dry eye and/or dry mouth. Infiltration of inflammatory cells into lacrimal and salivary glands has been considered to induce the hyposalivation, but therapy for SS is limited to symptomatic treatments.

In this study, transcriptome analysis was performed in lacrimal glands in Sjogren's syndrome model mice. The result showed that expression level of arginase 1 was decreased after the onset of lacrimal hyposalivation and inflammation of lacrimal gland (dacryoadenitis). Additional investigation revealed that the decrease of arginase 1 expression level and/or activity induces lacrimal hyposalivation, regardless of dacryoadenitis status.

研究分野：薬理学

キーワード：外分泌 NODマウス RNA-seq シェーグレン症候群 涙腺

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

シェーグレン症候群 (Sjögren's syndrome) は外分泌腺における慢性的な炎症から、ドライアイやドライマウスを呈する難病である。これまで免疫反応に視点を置いた研究から多くの報告があるが、治療は対症療法に限られる。原因療法の開発が実現に至らない背景には、外分泌機構自体に不明な部分があるとされている。

シェーグレン症候群の涙液分泌低下モデル動物として、雄性 non-obese diabetic (NOD) マウスがある。雄性 NOD マウスは、涙腺において高頻度に炎症を認めるが、唾液腺における炎症はほとんど認めないため、同一個体において涙液分泌は低下するが唾液分泌は変化しないと考えられた。そこで本研究は、外分泌の破綻した涙腺と破綻を免れた唾液腺の差を網羅的遺伝子発現解析 (RNA-seq) により検出し、外分泌自体の分子基盤を示すことを目的とした。

2. 研究の目的

本研究は、外分泌の破綻した外分泌腺と破綻を免れた外分泌腺の差を検出し、外分泌自体の分子基盤を示すことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

雄性 non-obese diabetic/ShiJcl (NOD) マウスは日本クレア (Tokyo, Japan) から、雄性 BALB/cCrSlc (BALB/c) マウスは日本エスエルシー (Hamamatsu, Japan) から購入した。雄性 NOD.B6-Myd88^{-/-} (NOD Myd88^{-/-}) マウスは朝日大学歯学部口腔微生物学分野の引頭 毅 教授より供与して頂いた。

(2) 外分泌機能の検討

マウスに三種混合麻酔 (0.75 mg kg⁻¹ medetomidine, 4.0 mg kg⁻¹ midazolam, 5.0 mg kg⁻¹ butorphanol) を体重 10 g 当たり 0.05 mL の量で投与し、麻酔をかけた。ピロカルピン 0.5 mg kg⁻¹ を腹腔内投与し、涙液量および唾液量を測定した。

涙液量は、眼球の縁にフェノールレッド糸 (Zone-Quick®; Ayumi Pharmaceutical Co., Tokyo, Japan) をピロカルピン投与後 2 分毎に 30 秒間当てることにより測定した。涙液が吸収により赤色に変色した糸の長さを涙液量とした。

唾液量は、涙液量の測定と同時に測定した。具体的には、ペーパープラグ (JM paper point®; J. Morita Corp., Osaka, Japan) を用いて、重量法により測定した。上記の麻酔下、ピロカルピン投与後 2 分毎に 30 秒間、口腔内にペーパープラグを挿入し、唾液を吸収させた。唾液を吸収したペーパープラグの重量を測定し、吸収前の重量を差し引くことで、唾液量を算出した。

(3) 組織学的検討

マウスを炭酸ガスにより安楽死させ、涙腺を摘出した。10%ホルマリン溶液で固定し、パラフィン包埋した。1つの涙腺当たり、5 µm 厚の切片を3切片取得し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。組織切片の画像は BX53F 顕微鏡と DP80 デジタルカメラ (Olympus, Tokyo, Japan) で取得した。

(4) 網羅的遺伝子発現解析

マウス涙腺からトータル RNA を抽出した。RNA-seq とその解析はマクロジェン・ジャパン社 (Kyoto, Japan) に外注した。RNA-seq により得られた塩基配列は、日本 DNA データバンク (DDBJ) Sequence Read Archive に DRA010121 の accession number にて登録した。

(4) リアルタイム RT-PCR

トータル RNA から逆転写を行い、一本鎖 cDNA を合成した。リアルタイム PCR はプライマー、テンプレート cDNA および SYBR Premix Ex Taq II (Takara Bio Inc., Shiga, Japan) を混合し、95°C の初期変性を 30 秒間行った後、95°C を 5 秒間と 60°C を 30 秒間の 2 ステップを 40 サイクル行った。プライマーは以下の通りであった。Arg1: 5'-TGGAAGAGTCAGTGTGGTGC-3'(forward)、5'-TGGTTGTCAGGGGAGTGTG-3'(reverse); Gapdh: 5'-TGTGTCCGTCGTGGATCTGA-3'(forward)、5'-TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG-3'(reverse)

(5) ウェスタンブロット解析

マウスを炭酸ガスにより安楽死させ、涙腺を摘出した。摘出した涙腺は氷冷 RIPA lysis buffer (protease inhibitor, phosphatase inhibitor 含有) 中でホモジナイズした。ホモジネートを 14,000 g で 10 分間遠心し、上清を回収した。2 µg のタンパクサンプルを SDS-PAGE により分離、PVDF 膜に転写した。0.05% Tween 20 を含む Tris-buffered saline (pH 7.6; 以下 TBS-T) 中で 5% スキムミルクを用いて室温で 50 分間インキュベートした。一次抗体として 1:2,000 に希釈した rabbit anti-arginase 1 (GeneTex, Inc., Irvine, CA, USA) を 120 分間、もしくは 1:8,000

に希釈した rabbit anti- α -tubulin (Proteintech, Rosemont, IL, USA) を 90 分間室温でインキュベートした。TBS-T で洗浄し、1:10,000 に希釈した anti-rabbit IgG HRP-linked antibody (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) を用いて室温で 90 分間インキュベートし、再度洗浄した。免疫ブロットは化学発光 (ECL Western blotting detection reagents; GE Healthcare, Chicago, IL, USA) させ、Light-Capture II (Atto Co., Tokyo, Japan) により画像を取得した。

(6) アルギナーゼ 1 阻害薬投与

アルギナーゼ 1 阻害薬である CB-1158 dihydrochloride (MedChemExpress Co., Ltd, Monmouth Junction, NJ, USA) を水に溶解した。CB-1158 は 100 mg kg^{-1} (量: $0.1 \text{ mL}/10 \text{ g}$ 体重) の用量で、涙液・唾液量測定の前 2 時間前に経口投与した。対照群には同量の水を経口投与した。

4. 研究成果

研究開始当初、雄性 NOD マウスにおいて、外分泌の破綻した涙腺と、破綻を免れた唾液腺からトータル RNA を抽出し、RNA-seq により比較する予定であった。しかし、雄性 NOD マウスの 4 週齢において、対照群である雄性 BALB/c マウスの同週齢と比して唾液量が予想外に低かった点 (data not shown; 原因として系統差が考えられる)、また涙腺と唾液腺の臓器間の違いが RNA-seq の結果に大きく影響すると思われる点の 2 点を考慮し、雄性 NOD マウスの涙腺における涙液分泌低下後を外分泌破綻状態、NOD マウスの涙液分泌低下前および BALB/c マウスを外分泌破綻を免れた状態として、両者の差を検出する方針に変更した。

(1) 涙液分泌低下時期と涙腺炎発症時期の検討

4、6、10 週齢の雄性 NOD マウスにおいて、ピロカルピン投与による涙液分泌を測定したところ、対照マウス (雄性 BALB/c マウス) と比して涙液分泌量が低下したのは 6 週齢以後であった (図 1A)。また組織学的検討より、6 週齢において雄性 NOD マウス涙腺において炎症性細胞の浸潤を認め、10 週齢においてはその浸潤が増悪した (図 1B)。涙液分泌低下と涙腺炎の発症が同時期に起きたため、本研究では NOD マウスの 4、6、10 週齢をそれぞれ発症前、発症早期、発症後進行期として定義した。

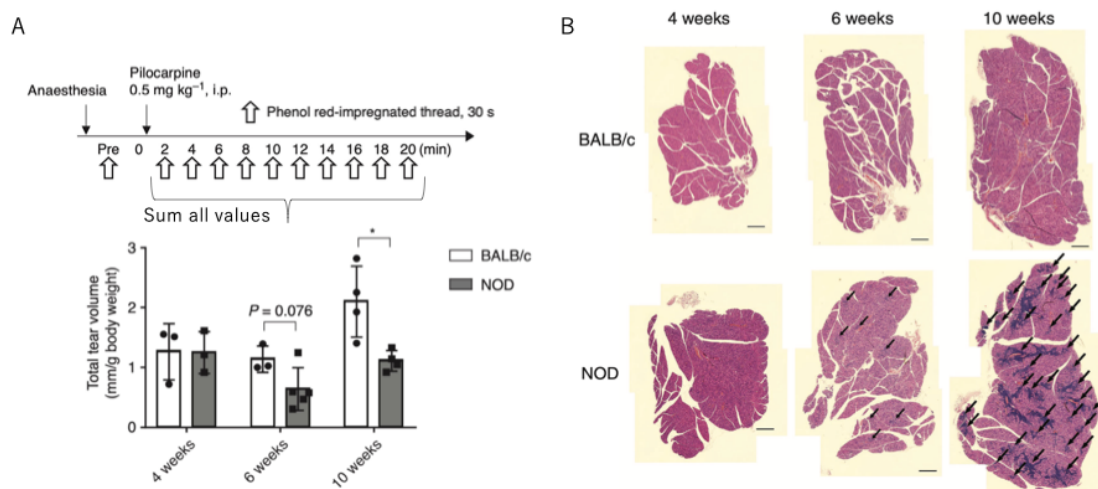


図 1. 雄性 NOD マウスにおいて涙液分泌低下と涙腺炎は 6 週齢ごろから発症する
A. 涙液分泌の測定方法とその結果。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus BALB/c group. B. 涙腺における組織学的検討。涙腺への炎症性細胞の浸潤を矢印で示す。Scale bars represent 0.5 mm. Ohno et al., *J Physiol*, 2020 より引用改変 (文献 1)

(2) 網羅的遺伝子発現解析およびその検証

4、6、10 週齢の雄性 NOD マウス涙腺および同週齢の BALB/c マウス涙腺を用いて、網羅的遺伝子発現解析 (RNA-seq) を行った。その結果、NOD マウスの 6 週齢以後は 4 週齢以前と遺伝子発現パターンが大きく変動することが判明した。詳細に結果を確認したところ、NOD マウス 6 週齢以後に発現が増加した遺伝子は 259 遺伝子存在したが、その多くは炎症関連因子であった。一方、NOD マウス 6 週齢以後に発現が減少した遺伝子は 4 遺伝子のみであり、そのうち代謝酵素である *Arg1* (アルギナーゼ 1) 遺伝子に着目した。

RNA-seq の検証を行うため、着目したアルギナーゼ 1 に関して、リアルタイム RT-PCR およびウェスタンブロットにより発現量を検討した。その結果、NOD マウス 6 週齢以後アルギナーゼ 1 の発現量は mRNA レベルでもタンパクレベルでも低下しており (図 2)、RNA-seq 解析結果と一致した。これらの結果は、アルギナーゼ 1 の発現低下が涙腺炎と涙液分泌低下のどちらか、

もしくは両方に関与する可能性があることを示唆していたため、次にどちらに関与するのかについて検証することとした。

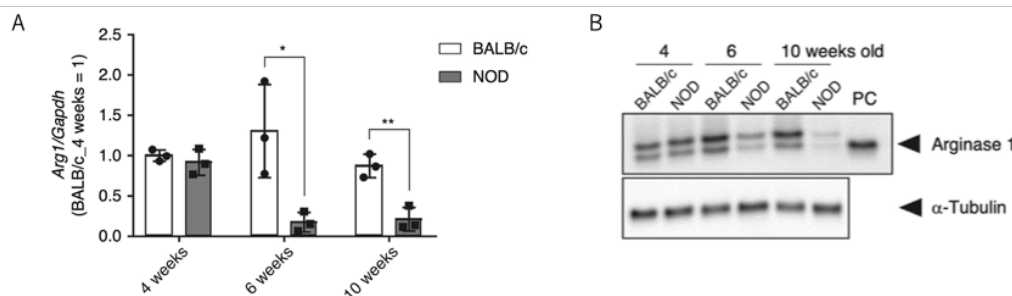


図 2. アルギナーゼ 1 の発現は雄性 NOD マウスの涙腺において 6 週齢以後低下する
A. リアルタイム RT-PCR 結果。B. ウェスタンブロット解析結果。マウスのアルギナーゼ 1 は 2 本のバンドである。PC は positive control を示し、ヒトのアルギナーゼ 1 (バンド 1 本) である。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus BALB/c group. Ohno et al., *J Physiol*, 2020 より引用改変 (文献 1)

(3) 非炎症型 NOD マウスにおける涙液分泌量とアルギナーゼ 1 発現量の検討

引頭らは自然免疫に関わる因子である Myd88 を欠損させた雌性 NOD マウスにおいて、唾液腺における炎症性細胞の浸潤が大幅に抑制されたことを報告した (文献 2)。この NOD Myd88^{-/-}マウスの雄性マウスの涙腺について組織学的検討を行ったところ、雌性マウスの唾液腺と同様に炎症性細胞の浸潤が大幅に抑制された (図 3A)。そこで、本研究においては雄性 NOD Myd88^{-/-}マウスを非炎症型 NOD マウスとして、また雄性 NOD Myd88^{+/+}マウスを炎症型 NOD マウスとしてみなし、次の実験に用いた。

まず、涙液量について検討したところ、NOD マウスの涙液量は、炎症の有無に関わらず、対照群である BALB/c マウスの涙液量に比して低下していた (図 3B)。次にアルギナーゼ 1 の発現量を検討したところ、こちらも炎症の有無に関わらず、BALB/c マウスに比して低下していた (図 3C)。すなわち、雄性 NOD マウス涙腺において、炎症が涙液分泌低下に寄与する割合は低く、むしろアルギナーゼ 1 の発現低下が涙液分泌低下に大きく寄与する可能性が高まった。

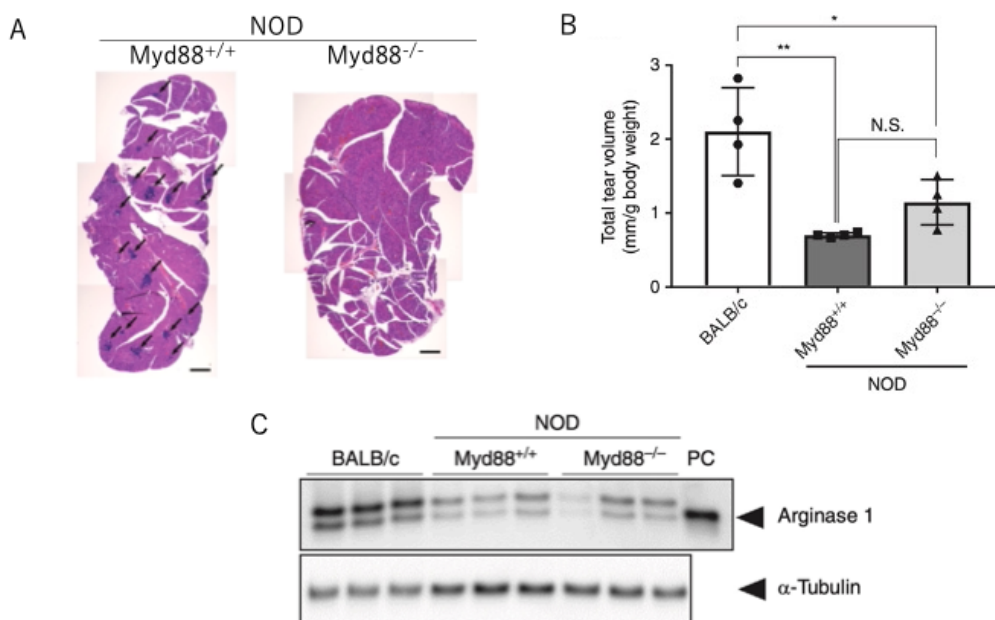


図 3. 雄性 NOD Myd88^{-/-}マウスは涙液分泌低下とアルギナーゼ 1 の低発現を示す
A. 涙腺における組織学的検討。涙腺への炎症性細胞の浸潤を矢印で示す。B. 涙液分泌測定結果。C. アルギナーゼ 1 発現量についてウェスタンブロット解析結果。マウスのアルギナーゼ 1 は 2 本のバンドである。PC は positive control を示し、ヒトのアルギナーゼ 1 (バンド 1 本) である。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus BALB/c group. Scale bars represent 0.5 mm. Ohno et al., *J Physiol*, 2020 より引用改変 (文献 1)

(4) アルギナーゼ 1 阻害薬の涙液分泌に及ぼす影響

最後に、アルギナーゼ 1 阻害薬である CB-1158 を予め投与した条件下にて、涙液分泌量を測定した。CB-1158 投与群において、対照である溶媒（水）投与群と比して有意に涙液分泌量が低下した（図 4）。この結果より、アルギナーゼ 1 が涙液分泌に関与することが示唆された。

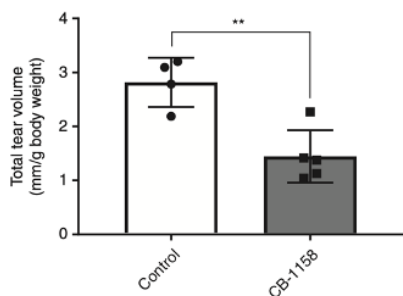


図 4. アルギナーゼ 1 阻害薬は涙液分泌低下を誘発する
涙液分泌測定結果。CB-1158 はアルギナーゼ 1 阻害薬である。**p < 0.01 versus control group. Ohno et al., *J Physiol*, 2020 より引用改変（文献 1）

これらの結果より、マウス涙腺において、非炎症性因子であるアルギナーゼ 1 の発現・活性低下が、炎症の有無に関わらず、涙液分泌低下を誘発することが示された。詳細なメカニズムは不明のままであるが、今後このアルギナーゼ 1 を起点に外分泌の研究を推進することで、シェーグレン症候群ドライ症状に対する新たな治療法の開発を目指すことが可能となるかもしれない。

<引用文献>

- 1) Ohno Y et al., *J Physiol*, 2020; 598, p4907-4925.
- 2) Into T et al., *Sci Rep*, 2018; 8, 14272.

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 1件）

1. 著者名 Ohno Yuta, Satoh Keitaro, Shitara Akiko, Into Takeshi, Kashimata Masanori	4. 巻 598
2. 論文標題 Arginase 1 is involved in lacrimal hyposalivation in male NOD mice, a model of Sjogren's syndrome, regardless of dacryoadenitis status	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Physiology	6. 最初と最後の頁 4907 ~ 4925
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1113/JP280090	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大野 雄太、佐藤 慶太郎、柏俣 正典
2. 発表標題 涙腺炎発症後の雄性NODマウスにおけるAQP5およびYAPの発現の検討
3. 学会等名 第135回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大野 雄太、佐藤 慶太郎、柏俣 正典
2. 発表標題 雄性NODマウスにおける涙腺炎発症と涙液分泌低下の関連性
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大野 雄太、佐藤 慶太郎、柏俣 正典
2. 発表標題 雄性NODマウスにおける涙液分泌低下に関連する因子の探索
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大野 雄太、佐藤 慶太郎、設楽 彰子、柏俣 正典
2. 発表標題 モデル動物を用いた網羅的遺伝子発現解析による涙液分泌能低下原因の探索
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大野 雄太、佐藤 慶太郎、設楽 彰子、柏俣 正典
2. 発表標題 アルギナーゼ1は雄性NODマウスにおいて涙液分泌低下に関与する
3. 学会等名 第94回薬理学会年会
4. 発表年 2021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
研究協力者	佐藤 慶太郎 (Sato Keitaro)		
研究協力者	柏俣 正典 (Kashimata Masanori)		
研究協力者	設楽 彰子 (Shitara Akiko)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	引頭 毅 (Into Takeshi)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関