

機関番号：32710

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390468

研究課題名（和文） 唾液分泌障害におけるクラステリンの治療効果の検討

研究課題名（英文） A study of clustrin for the treatment of hyposalivation

研究代表者

齋藤 一郎（SAITO ICHIRO）

鶴見大学・歯学部・教授

研究者番号：60147634

研究成果の概要（和文）：クラステリンは細胞内および培養上清中に認められ、細胞内に局在するクラステリンは H₂O₂ 添加による活性酸素種（ROS）の発現及び細胞死を抑制したが、培養上清中やリコンビナント蛋白の添加では抑制されなかった。またクラステリンは細胞内に蓄積する酸化産物も抑制した。クラステリンを組み込んだアデノウィルスに感染させた side population (SP)細胞を放射線照射マウスへ移入したが、このマウスでの唾液分泌障害は回復しなかった。しかしながら、クラステリンを組み込んだレンチウィルスに感染した SP 細胞を同様に放射線照射マウスへ移入すると唾液分泌量の回復が認められたが、クラステリンノックアウトマウスやクラステリン shRNA を遺伝子導入した SP 細胞を移入しても唾液分泌の回復は認められなかった。これらの事から、クラステリンは酸化ストレスから防御する作用を持つことにより、放射線照射による唾液分泌低下を改善した可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Clusterin was detected in the cytoplasm and the cell culture supernatant. The cytoplasmic clusterin inhibited reactive oxygen species (ROS) and cell death induced by H₂O₂ treatment. However, clusterin in the culture supernatant or recombinant clusterin could not inhibit ROS production. The clusterin-adenovirus was infected into salivary side population (SP) cells, which transferred into irradiated mouse salivary glands. The irradiated mice revealed defect of salivation, whereas the hyposalivation was restored in the mouse transferred clusterin-Ad infected SP cells. The SP cells from clusterin knock out mice or infected with clusterin shRNA-adenovirus failure to restore the salivation in the irradiated mice. These data suggested that clusterin is useful factor which recover the salivation from ROS induced hyposalivation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
2009 年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2010 年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
年度			
年度			
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：形態系基礎歯科学

キーワード：口腔病理学

1. 研究開始当初の背景

唾液分泌障害により生じる口腔乾燥症は欧米の疫学調査から算出すると日本では3,000万人の潜在患者が想定されている。このような唾液の減少は、歯周病や齲蝕のリスクを上げ、嚥下障害や誤嚥性肺炎の発症等を招くことなど、生活の質(QOL)を著しく低下させ様々な病態を形成することが知られているが現在までのところ有効な治療法は確立されていない。唾液などの外分泌の機能不全の病因も未だ明らかでなく、臓器特異的の自己免疫疾患であるシェーグレン症候群(SS)に代表される腺組織の器質的な傷害によるものの他に、様々な環境要因による酸化ストレスを介した唾液腺の機能不全が指摘されているが、その詳細な発症機構は不明である。

近年、様々な環境要因による酸化ストレスを介した生体の恒常性の破綻が指摘されている。このような酸化ストレスにより組織が損傷されることにより老化の促進や癌などの種々の疾患の原因となることが報告され、加えて、SSの発症や病態形成にその関与が示唆されているEBウイルス感染細胞が高レベルのMAPキナーゼを発現し、ROSの産生も亢進していること、C型肝炎、エイズなどの感染症などにおいても高値のチオレドキシシンが検出されていることから、ウイルス感染を介した酸化ストレスによる発症機構が指摘されている。研究代表者はSS患者唾液腺でEBウイルスの再活性化に伴い酸化ストレスにより生じるチオレドキシシンが増加することを報告すると共に(Arthritis Rheum., 39:773-782, 1996)、SS患者の唾液中に酸化ストレスの指標とされる8-OHdGやHELが有意に高値を示すこと(Pathobiology, 73:252-260, 2006)、また放射線照射により産生される活性酸素種により唾液分泌能が低下することをこれまでに明らかにし(Radiation Research, 159:465-470,

2003)、現在SSを含めた外分泌腺障害機構における酸化ストレスの関与について詳細な検討を進めている。

数年前より予備的検討として手掛けている唾液腺の再生・修復機構の解析ではマウス唾液腺から組織幹細胞に富んだ分画として知られるside population cell(SP細胞)を分取し、放射線照射により誘導された障害腺組織に移入することにより分泌障害が改善することを明らかにし、その機能改善に関与する液性因子としてクラステリンを同定した。加えてこのクラステリンは抗酸化作用を有することも明らかとなり、放射線照射により産生される活性酸素をクラステリンが抑制することにより唾液分泌を改善させる可能性が推定された。

2. 研究の目的

クラステリンは抗酸化作用を有する分泌蛋白であるとともに、細胞死の抑制をはじめ細胞障害に対して防御的に働くことが知られている(Nature Cell Biol, 2005, 7:909-915)。このことから今回、これらの唾液腺におけるアポトーシスに対するクラステリンの有効性についても検討を行う。

さらに唾液分泌機能低下に対するクラステリンの作用を分子病理学的に検討すると共に臨床的なアプローチを具現化する手段としてクラステリンの治療薬としての確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) 安定的発現細胞株の樹立

線維芽細胞由来細胞株のSTO細胞にネオマイシン耐性遺伝子を組み込んだHA、あるいはGSTタグを結合させたクラステリンの発現プラスミドをリポフェクション法を用いて遺伝子導入した。遺伝子導入3日後に細胞を継代し直し、400µg/mLのG418を含んだ培地で培養を開始し、薬剤耐性株を選択し

細胞株とした。

(2) アデノウイルスベクターの作製

Adenovirus expression Vector Kit (Takara)を用いて行った。クラステリンのcDNAをpAxCawititに組み込み、組換えコスミドを構築した。その後、組換えコスミドはPspT104Iで消化したあとLipofectamin 2000を用いて293細胞に遺伝子導入した。ウイルスが増殖し、変性した細胞を回収しウイルス液を得た。

(3) レンチウイルスベクターの作製

CSII-CNV-MCS-IRES-hrGFPベクターにクラステリンのcDNAあるいはshRNAを組み込み、組換えCSII-CNV-MCS-IRES-hrGFPプラスミドを構築した。その後、293T細胞にエンベロープ遺伝子を発現するpCMV-VSV-G-RSV-REVとウイルス粒子構成タンパク質を供給するPCAG-HIVgpと共にリポフェクション法にて遺伝子導入し、ウイルスを産生させた。

(4) マウス顎下腺への放射線照射

マウスにpentobarbital(50 mg/kg)を静脈内投与しリニアック(MEVATRON 74 DX40 Toshiba Medical System, Tokyo)により10MVのX線を15Gy顎下腺局所に照射した。

(5) 活性酸素種の測定

蛍光プローブの酸化反応を指標に検討を行った。

細胞内のROS検出にはfluorescent indicator dichlorofluorescein

(CM-H2DCFDA, Molecular probes, inc)と

Dihydroethidium (DHE, Fluka)を使用した。

CM-H2DCFDAは細胞内において過酸化水素、ヒドロキシラジカル、ペルオキシナイトライトなどと反応することによりH2DCFが速やかに酸化されてDCFを生成し、強い蛍光を発する。またDHEは青色の蛍光プローブでスーパーオキシドと反応するとethidiumに変化しDNAに作用して細胞の核内で赤色の蛍光を発する。10 mMの濃度で蛍光プローブを15分間取

り込ませ、析はFACS Vantage SE flow cytometerとcell Quest software(Becton Dickinson)を使用した。

(6) タンパク質の酸化の同定

タンパク質が酸化されたときに生じるカルボニル化を検出した。タンパク質側鎖のカルボニル基は2,4-フェニルヒドラゾン(DNPH)と反応し2,4-ジニトロフェニルヒドラゾン(DNAP-ヒドラゾン)に誘導化し、その後ウェスタンブロットング法によりDNP-ヒドラゾンを検出した。

(7) 唾液分泌測定

キシラジン(24 mg/kg)とケタミン(36 mg/kg)による麻酔導入を行ったのちpilocarpine(0.1 mg/kg)を腹腔内投与し唾液の分泌を誘導後、15分間測定を行った。唾液はキャピラリー(DURAN)を使用し測定した。15分間の総唾液量をマウスの体重で割り体重1g当たりの唾液分泌量を算出した。

(8) 遺伝子改変マウスの作出

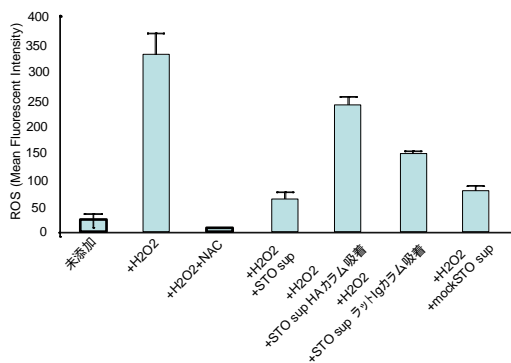
組換えプラスミドはpBlueScript(pBlue)を用いて作製した。唾液腺・涙腺特異的に発現するparotid specific protein (PSP)遺伝子のプロモーターの下流にクラステリンのcDNAをpBlueに組み込んだ。この組換えプラスミドからPSPプロモーターとクラステリンの結合領域のみを切り出し、C57B6マウスに遺伝子導入し、クラステリンのトランスジェニックマウスの作出を試みた。

4. 研究成果

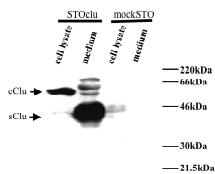
(1) クラステリンの抗酸化作用

クラステリンの抗酸化作用を確認するためにHAタグが結合しているクラステリンを安定して強制発現する細胞株STOCluを樹立した。クラステリンを発現していないSTO細胞を培養し、細胞を播種した次の日に培地をH₂O₂添加した無血清培地あるいはSTOClu細胞の培養上清に交換した。H₂O₂添加24時間後に細胞内に発生したROSを蛍光プローブで標識

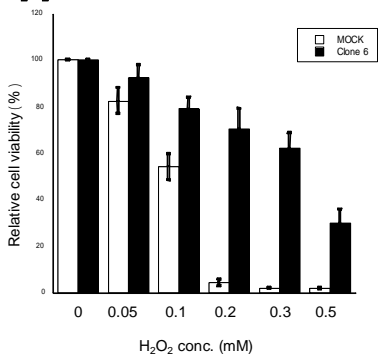
し、フローサイトメーターにて検出した。その結果、ROS のスカベンジャーである NAC では、未添加よりも低い程度まで ROS の産生は抑制された。STOClu 細胞の培養上清で培養した群でも、約 1/7 まで ROS の産生は抑えられ、HA カラムで STOClu 細胞由来のクラステリンを吸着除去するとその活性は弱まった。しかしながら、クラステリンを発現していない細胞の培養上清でも ROS の産生は抑制されたことから、過剰発現していない細胞株からも、クラステリンを含む抗酸化物質が産生されている可能性が示唆された（下図）。



次に、クラステリンは細胞内、培養上清中両方に発現が認められるため（右図）、細胞内に局在するクラステリンの外部からの酸化刺激による細胞障害の程度を検討した。その結果 MockSTO では H₂O₂ 添加により、殆どの細胞が死んでいたが、STOClu 細胞では H₂O₂ による細胞死を回避できた。

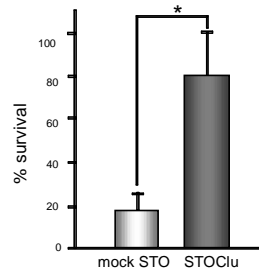


H₂O₂ 刺激による STO clu MOCK STO の生存率

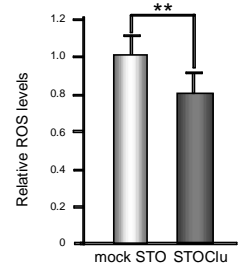


また、この時の ROS の発生量と細胞生存率では逆相関が認められた。（下図）

STOClu 細胞は mockSTO 細胞に比べて H₂O₂ 処理後の細胞の生存率は高かった

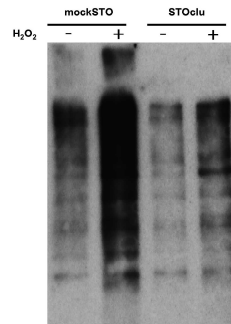


STOClu 細胞は mockSTO 細胞に比べて H₂O₂ 処理後の ROS 活性は低かった



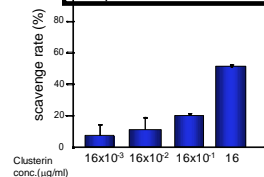
細胞内タンパク質の酸化の程度はニトロ化タンパク質を検出するオキシプロット法にて行った。その結果、クラステリンは H₂O₂ 処理によるタンパク質のカルボニル化を抑制していることが確認できた。

クラステリンは H₂O₂ 処理によるタンパク質のカルボニル化を抑制した

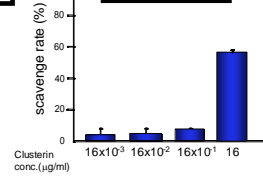


クラステリン自体に ROS を消去する作用があるのか否かについて、電子スピン共鳴法（ESR）により検討を行った。その結果スーパーオキシドラジカルアニオン、及び過酸化水素はクラステリン分子により直接消去されることも明らかにした。

Superoxide anion radical

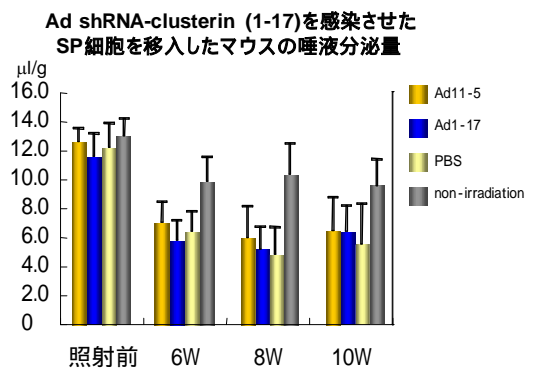
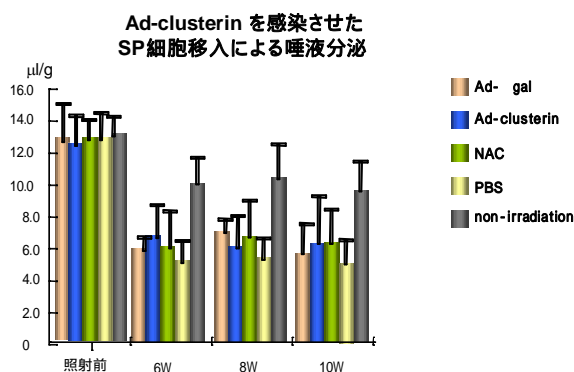


Hydroxyl radical

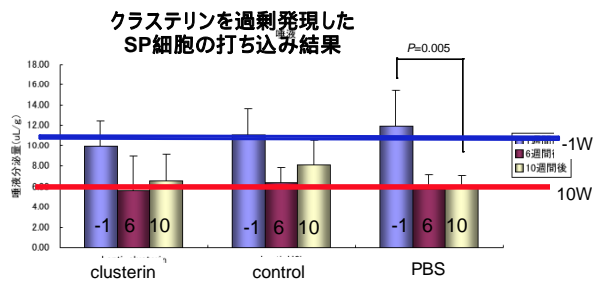


(2) in vivo におけるクラステリンの唾液分泌に与える影響

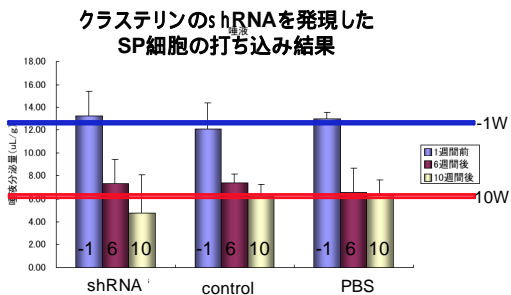
SP 細胞から産生されるクラステリンが放射線照射マウスにおいて、唾液分泌低下を抑制している可能性を推測してきた。このことから、次にクラステリンを過剰発現させた SP 細胞、あるいはクラステリンの shRNA を発現させクラステリン発現を抑制した SP 細胞を顎下腺放射線照射マウスに移入後、唾液分泌の推移を検討した。



アデノウィルスベクターを用いたクラステリン蛋白の過剰発現 SP 細胞の移入では、唾液分泌低下を抑制する作用は認められなかった。これは、アデノウィルス感染による細胞毒性が強いためであると考えられた。次にレンチウイルスを用いて SP 細胞にクラステリンを過剰発現させて、同様の検討を行った。その結果、アデノウィルスベクターによる遺伝子導入と同様にクラステリン過剰発現細胞を移入した群で唾液分泌量の回復は認められなかった。

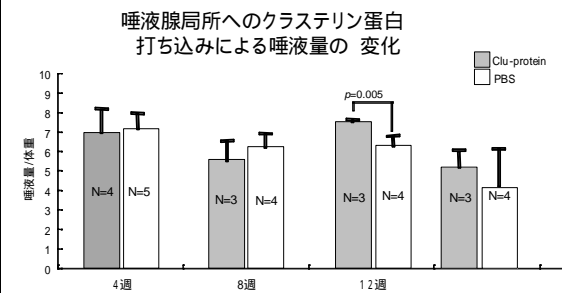
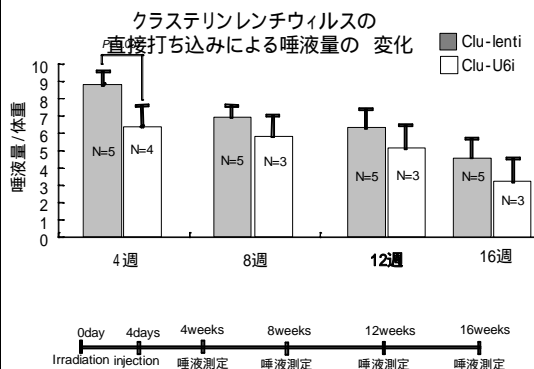


上記の結果も、アデノウィルスベクターの時



と同様にウィルス感染による細胞毒性により、生細胞が少なかった事が原因のひとつであると考えられた。

以上の事から、次にレンチウイルスベクターを直接唾液腺へ打ち込む方法とクラステリンリコンビナント蛋白を打ち込む方法でクラステリンの作用を確認した。



レンチウイルスやリコンビナントタンパク

の打ち込みの結果、顎下腺放射線照射マウスでの唾液分泌低下は抑制された。これらのことから、クラステリンは SP 細胞の非存在下でも唾液腺傷害に対して保護する作用があることが推測された。

現在、クラステリン欠乏マウス、クラステリントランスジェニックマウスを用いてさらに詳細な検討を行っている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計0件)

[学会発表](計3件)

美島健二、井上裕子、住本秀敏、河上裕、坪田一男、齋藤一郎 クラステリンを用いた唾液分泌障害抑制の検討 第19回日本シェーグレン症候群学会、ホテルオークラ東京ベイ、2010.9.9-9.10

美島健二、鎌谷宇明、山田浩之、井出文雄、井上裕子、齋藤一郎 side population 細胞が発現するクラステリンの分泌細胞機能回復の検討 第99回日本病理学会総会、京王プラザホテル 2010.4.27-29

美島健二、井上裕子、坪田一男、齋藤一郎 クラステリン蛋白における酸化ストレス障害抑制機能の検討 第9回日本抗加齢医学会、ホテル日航東京 2009.5.28-29

[その他]

ホームページ

<http://ccs.tsurumi-u.ac.jp/dental/kouza/byouri/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 一郎 (SAITO ICHIRO)
鶴見大学・歯学部・教授
研究者番号：60147634

(2) 研究分担者

美島 健二 (MISHIMA KENJI)
鶴見大学・歯学部・准教授
研究者番号：50275343

井上 裕子 (INOUE HIROKO)
鶴見大学・歯学部・講師
研究者番号：50367306

山田 浩之 (YAMADA HIROYUKI)
鶴見大学・歯学部・講師
研究者番号：902667542