

機関番号：16101  
 研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20592337  
 研究課題名(和文) 腫瘍壊死因子とアクアポリン5を分子標的としたシェーグレン症候群の新規治療法の開発  
 研究課題名(英文) Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  inhibited the expression levels of Aquaporin 5 in the salivary gland acinar cells.  
 研究代表者  
 茂木 勝美 (MOTEGI KATSUMI)  
 徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教  
 研究者番号：20335805

研究成果の概要(和文)：シェーグレン症候群(SS)患者の唾液腺においてはアクアポリン(AQP)5の発現低下や分布異常が生じており、これが唾液分泌低下の一因であると考えられているが、その詳細なメカニズムは不明である。本研究においては培養ヒト唾液腺腺房細胞を腫瘍壊死因子(TNF- $\alpha$ )にて処理するとAQP5の発現が低下することに着目し、そのメカニズムの解析をおこなった。

研究成果の概要(英文)： Sjögren's syndrome (SS) is a systemic autoimmune disease that involves a reduction in salivary and lacrimal secretions, however, the mechanisms underlying the decrease in salivary secretion remains unclear. In salivary glands of SS patients, the expression of aquaporin (AQP) 5, a major water channel present in the apical plasma membrane, was decreased and aberrant distribution of AQP5 from apical to basal membrane was reported. The mechanisms of AQP5 dysfunction in SS salivary glands have not yet fully understood. Since it has been reported that the expression level of AQP5 gene was suppressed by tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  in mouse lung epithelial cells *in vitro*, one of the key factors that reduce AQP5 expression in salivary acinar cells would be TNF- $\alpha$ . In this study, we examined the role of TNF- $\alpha$  in the expression of AQP 5 in human salivary gland acinar cells.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：口腔内科学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：①シェーグレン症候群 ②唾液分泌 ③アクアポリン ④腫瘍壊死因子

## 1. 研究開始当初の背景

我々は、培養ヒト唾液腺腺房細胞を用いて、TNF- $\alpha$ による腺房構造破壊のメカニズムを明らかにし、転写因子である NF- $\kappa$ B が中心

的役割を果たしていることを報告した。しかし、シェーグレン症候群の患者でも唾液腺に腺房が多く残っていることがあり、腺房細胞のアポトーシスだけで全てを説明すること

はできない。そこで、我々は、唾液分泌において重要な役割を果たす水チャネル蛋白質アкваポリン(AQP)5に着目した。AQP5はヒト唾液腺では腺房細胞だけに発現が認められている。我々は、TNF- $\alpha$ が培養ヒト唾液腺腺房細胞において、AQP5の発現を低下させることを確認した。このようにTNF- $\alpha$ はAQP5の発現低下と、腺房構造の破壊といった異なるメカニズムの両方に関与していることが推測される。また、我々はAQP5の発現していない培養ヒト唾液腺導管細胞を、DNA脱メチル化剤にて処理し、導管細胞にAQP5を発現誘導させ、実際に水輸送機能が増強されることを確認した。このメカニズムは、AQP5プロモーター領域の脱メチル化によりAQP5遺伝子発現の再活性化が誘導された結果であった。我々のこれまでの研究成果をもとに、最も効果的なシェーグレン症候群の治療法として、TNF- $\alpha$ とAQP5のプロモーター領域のメチル化をターゲットとした治療法開発の発想に至ったものである。

## 2. 研究の目的

シェーグレン症候群に対する治療戦略として次の方法を立案した。

すなわち、唾液腺腺房の構造破壊による唾液分泌機能の改善法としては、(1)細胞の基底膜を破壊する一因であるTNF- $\alpha$ の機能を阻害する方法、(2)破壊された腺房細胞に代わって、残存する導管細胞にAQP5を発現誘導させ、導管細胞に腺房細胞の機能を付与させる方法である。さらに、唾液腺の機能低下による唾液分泌減少には、(3)TNF- $\alpha$ の機能を制御することによってAQP5の発現低下を回避し、唾液分泌の機能回復を目指す。このような治療戦略により、シェーグレン症候群患者の口腔乾燥を根本的に改善させることを本研究の目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) RT-PCR法および定量的RT-PCR法

培養細胞より抽出したtotal RNAにfirst strand bufferを加え、65°Cにて5分間加熱した後、氷上に5分間静置した。これにランダムプライマー、DTT、dNTPs、逆転写酵素を加え、42°Cにて60分間反応させた後、95°Cにて5分間加熱することによって反応を停止させてcDNAを作製した。PCR反応は1  $\mu$  lのcDNAとAQP5、Dnmt1、Dnmt3a、Dnmt3bあるいはGAPDHのプライマー、Ex-Taq DNAポリメラーゼ、dNTPsおよびPCR緩衝液を混和し、DNA Thermal Cycler TP3000を用いて、次の条件でPCR反応を行った。すなわち94°Cにて5分間反応させた後、94°Cにて1分の熱変性、68°Cにて1分のアニーリング、72°Cにて1分の伸長反応を1サイクルとし、これを35サイクル反応させた。PCR産物は2%アガ

ロースゲルにて電気泳動し、エチジウムブロマイドにて染色し、UV透過光下に観察した。

次に定量的RT-PCRはABI PRIZM 7000の標準的プロトコールに従って行った。AQP5 mRNAの発現はTaqMan® Gene Expression Assay (assay No. Hs 00387048m\_1, Applied Biosystems)を用いて解析した。

### (2) ウエスタンブロット法

培養細胞より調製したタンパク質を $\beta$ -メルカプトエタノールを含むサンプルバッファーに混和した後、10%SDS-ポリアクリルアミドゲルを用い、電気泳動を行った。その後、ニトロセルロース膜に転写した。次に、転写したニトロセルロース膜を2%スキムミルク含有T-TBSにて処理した後、1,000倍希釈濃度の抗AQP5抗体、抗Dnmt1抗体、抗Dnmt3a抗体、抗Dnmt3b抗体あるいは抗 $\beta$ -アクチン抗体と4°Cにて16時間反応させた。T-TBSにて洗浄後、1,000倍希釈濃度のHRP標識ウサギIgG抗体あるいはマウスIgG抗体を用いて室温にて1時間反応させた。T-TBSにて洗浄後、ECL kitにて検出した。

### (3) 細胞の水移動能の解析

直径24.5mmのトランスウェルコル培養チャンバーに細胞を播種して24時間培養した。その後、培養上清にTNF- $\alpha$ を添加し72時間培養した。細胞が完全にコンフルエントになったことを確認した後、チャンバー上方に400  $\mu$  lの高張培養液(400 mOsm)を、またチャンバー下方に2 mlの等張培養液(300 mOsm)を入れ、さらに4時間培養した。その後、チャンバー上方の培養液を回収し、測定用ピペットを用いて容量を計測することによって細胞のnet fluid secretionを算定した。

### (4) Dnmt活性の測定

細胞を培養した後、TNF- $\alpha$ を添加し、1~12時間処理を行った。その後、核蛋白質を試料として細胞のDnmt活性をEpiQuik™ DNA methyltransferase Activity Kitを使用して測定した。シトシン-リッチDNAをコートした96穴マイクロタイタープレートに試料とS-アデノシルメチオニンを添加し37°Cにて1時間反応させた。その後、100倍希釈濃度の抗メチルシトシン抗体を加え、室温にて60分間反応させ、続いて100倍希釈濃度の2次抗体を加え、室温にて30分間反応させた。その後、添付の発色溶液を加え10分間反応させた後、反応停止液を加えて、マイクロプレートリーダーを用い波長450 nmにて吸光度を測定し、Dnmt活性を測定した。

### (5) cDNAマイクロアレイ

唾液腺細胞をTNF- $\alpha$ を添加し6時間処理した後、total RNAを抽出し、逆転写をおこないcDNAを作製した。このcDNAはCy3単色蛍光標識後、29098個のヒト全遺伝子を搭載したマイクロアレイを用いてハイブリダイズ

した。蛍光強度にサンプル間での遺伝子発現の差異を数値化して得られたデータを Applied Biosystems 1700 ケミルミネッセンスマイクロアレイアナライザーにて解析した。

#### 4. 研究成果

(1) TNF- $\alpha$  が NS-SV-AC 細胞の AQP5 発現に及ぼす影響

腺房細胞を 1~50 ng/ml の TNF- $\alpha$  にて 8 時間処理して AQP5 mRNA の発現を解析すると、TNF- $\alpha$  処理により AQP5 mRNA の発現は低下した。AQP5 mRNA の発現を定量的 RT-PCR 法にて測定すると、1 ng/ml 以上の TNF- $\alpha$  によって、AQP5 mRNA の発現は有意に低下した。

腺房細胞を 10 ng/ml の TNF- $\alpha$  にて 1~24 時間処理すると、AQP5 mRNA の発現は経時的に低下した。さらに、AQP5 mRNA の発現を定量的 RT-PCR 法にて測定すると、その発現は TNF- $\alpha$  処理 4 時間後から有意に低下した。

一方、AQP5 蛋白の発現は TNF- $\alpha$  処理 36 時間後から低下した。

(2) TNF- $\alpha$  が腺房細胞の net fluid secretion に及ぼす影響

10 ng/ml の TNF- $\alpha$  にて腺房細胞を 72 時間処理し、腺房細胞の net fluid secretion を測定した。TNF- $\alpha$  で処理した NS-SV-AC 細胞の net fluid secretion は無処理細胞と比較して有意に減少した。

(3) NF- $\kappa$ B の抑制が腺房細胞の AQP5 mRNA の発現に及ぼす影響

腺房細胞と変異型 I $\kappa$ B- $\alpha$  遺伝子を導入して NF- $\kappa$ B を抑制した細胞 (ACMT-6 細胞および ACMT-7 細胞) を 10 ng/ml の TNF- $\alpha$  にて 6 時間処理して AQP5 mRNA の発現を定量的 RT-PCR 法によって測定した。TNF- $\alpha$  無処理では腺房細胞、ACMT-6 細胞および ACMT-7 細胞の AQP5 mRNA の発現は、ほぼ同程度であったが、TNF- $\alpha$  処理により NS-SV-AC 細胞、ACMT-6 細胞および ACMT-7 細胞の AQP5 mRNA の発現は有意に低下した。

(4) MAPK の抑制が腺房細胞の AQP5 mRNA の発現に及ぼす影響

腺房細胞の MAPK を抑制して TNF- $\alpha$  が AQP5 mRNA の発現に及ぼす影響を解析した。細胞を各 MAPK 阻害剤で 1 時間処理した後、10 ng/ml の TNF- $\alpha$  を添加し、さらに 6 時間細胞を処理して AQP5 mRNA の発現を定量的 RT-PCR 法によって測定した。NS-SV-AC 細胞を JNK および ERK 阻害剤にて処理しても AQP5 mRNA の発現は変化しなかったが、TNF- $\alpha$  と併用することによって AQP5 mRNA の発現は有意に低下した。一方、p38 阻害剤で細胞を処理すると AQP5 mRNA の発現は有意に低下し、TNF- $\alpha$  と p38 阻害剤を併用することによって AQP5 mRNA の発現量はさらに低下した。

(5) TNF- $\alpha$  が腺房細胞の Dnmt の発現およ

び活性に及ぼす影響

腺房細胞を 10 ng/ml の TNF- $\alpha$  にて 2~48 時間処理して、Dnmt の発現を解析した。TNF- $\alpha$  処理によって Dnmt1, Dnmt3a, Dnmt3b の mRNA および蛋白質の発現に変化はなかった。次に 10 ng/ml の TNF- $\alpha$  にて 2~12 時間処理して Dnmt 活性を測定したが、Dnmt 活性は上昇していなかった。

(6) TNF- $\alpha$  処理により発現が変動する遺伝子群の解析

TNF- $\alpha$  により発現の変動する遺伝子群について cDNA マイクロアレイにて解析した。AQP5 遺伝子のプロモーター領域には転写因子 Sp1 結合部位が 3 か所ある。Sp1 は TBP、dTAFII130、hTAFII130、TAFII55、CRSP などの核内蛋白質や YY1、E2F、FBI-1、P300、HDAC1、p107 などの転写因子、あるいは SMRT、NCoR、BCoR などの転写調節因子と相互的に作用して遺伝子の発現を調節している。Sp1 に関連したこれら因子の発現を解析したところ、TNF- $\alpha$  により発現が増加する因子には、Nuclear receptor corepressor 2 (NCoR2) があり、その発現は無処理細胞と比較して 3.511 倍であった。一方、TNF- $\alpha$  により発現が減少する因子として、Nuclear receptor coactivator 2 (NCoA2) があり、その発現は無処理細胞と比較して 0.303 倍であった。なお、その他の因子についての発現の増加あるいは減少は確認できなかった。

#### 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 1 件)

1. Motegi K, Harada K, Ohe G, Jones SJ, Ellis IR, Crouch DH, Schor SL, Schor AM, . Differential involvement of TGF- $\beta$ 1 in mediating the motogenic effects of TSP-1 on endothelial cells, fibroblasts and oral tumour cells. Experimental Cell Research 314: 2323-2333 2008. 査読有

[学会発表] (計 3 件)

① 茂木勝美、シェーグレン症候群唾液腺へのリンパ球浸潤における性ホルモン就職酵素の役割、第 47 回日本口腔組織培養学会学術大会、2010 年 11 月 13 日、高知県 高知城ホール

② 茂木勝美、シェーグレン症候群唾液腺へのリンパ球浸潤における性ホルモン就職酵素の役割、第 55 回日本口腔外科学会総会、2010 年 10 月 21 日、千葉県 幕張メッセ

③ 茂木勝美、ヒト唾液腺細胞におけるアクアポリン 5 の発現誘導の解析、第 63 回日本口腔科学会学術総会、2009 年 4 月 16 日、

静岡県 アクトシティ浜松

( )

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

茂木 勝美 (MOTEGI KATSUMI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス

研究部・助教

研究者番号: 20335805

### (2) 研究分担者

東 雅之 (AZUMA MASAYUKI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス

研究部・教授

研究者番号: 20144983

玉谷 哲也 (TAMATANI TETSUYA)

徳島大学・病院・講師

研究者番号: 30274236

内田 大亮 (UCHIDA DAISUKE)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス

研究部・助教

研究者番号: 20335798

藤沢 健司 (FUJISAWA KENJI)

徳島大学・病院・講師

研究者番号: 40228979

### (3) 連携研究者

研究者番号: