

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：27102

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18609

研究課題名（和文）抗VEGF抗体を用いた口腔乾燥症の新規治療イノベーション

研究課題名（英文）Novel treatment innovation for xerostomia applying anti-VEGF antibody

研究代表者

宗政 翔（Munemasa, Takashi）

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：40852489

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：糖尿病にしばしば合併する口腔乾燥症は歯科補綴治療に際し問題となることが多い。本研究では、抗VEGF抗体ラニビズマブ（RBZ）を2型糖尿病モデルマウスKK-Ayに適用し唾液分泌機能の回復に有効か評価することを目的とした。Ex vivo顎下腺灌流実験の結果、非投与（DM）群と比較してRBZ投与（DM+RBZ）群では有意に唾液分泌量が増加することが明らかとなった。また、RBZの投与の影響により水分泌に關与するAquaporin 5の発現位置が変化することが免疫組織化学染色により確認された。以上より、糖尿病患者において抗VEGF抗体を応用することで口腔乾燥症の症状を改善できる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病に合併する口腔乾燥症は、唾液分泌量の低下によりインプラント周囲炎や歯周病の増悪、義歯の維持困難などを引き起こし、歯科補綴治療に際し問題となることも少なくない。本研究では、抗VEGF抗体ラニビズマブ（RBZ）を糖尿病モデルマウスに適用した結果、唾液分泌量が有意に増加することが明らかとなった。そのメカニズムはまだ明らかではないが、水分泌に關与するAquaporin 5の発現位置がRBZ投与群で異なることが一因となっている可能性がある。今後、唾液分泌量がRBZの応用により回復するメカニズムについての詳細が解明できれば、糖尿病患者における口腔乾燥症治療法確立の一助となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Xerostomia, a common symptom of diabetes, often causes various problems in dental prosthetic treatment. This study aims to evaluate the efficacy of applying ranibizumab (RBZ), the anti-vascular endothelial growth factor (anti-VEGF) antibody, for restoring salivary function in KK-Ay mice, a type 2 diabetes model. As a result of the submandibular gland perfusion experiment, saliva secretion in RBZ administrated group significantly increased compared to the non-administrated group. Moreover, immunohistochemistry revealed that the localization of Aquaporin 5, which plays an important role in fluid secretion, was changed under the influence of RBZ administration. Therefore, it was suggested that applying an anti-VEGF antibody may improve the symptoms of xerostomia in diabetic patients.

研究分野：唾液生理学

キーワード：唾液 唾液腺 VEGF 抗VEGF抗体 糖尿病 口腔乾燥症 炎症 AQP5

1. 研究開始当初の背景

糖尿病患者では、しばしば口腔乾燥症が合併し、歯科領域では、インプラント周囲炎や歯周病の増悪、義歯の装着困難などが問題となる。そのため、糖尿病における口腔乾燥症の病態解明および治療法の確立が急がれている。これまでに我々の研究グループでは、2型糖尿病モデルマウス KK-A^y の唾液分泌量が有意に減少しており、その一因が腺房細胞内 Ca²⁺ 濃度上昇の抑制であることを見出したが、高血糖による慢性炎症の影響については明らかになっていない。

糖尿病患者では、炎症性メディエーターである血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF) の異常分泌により糖尿病 3 大合併症の 1 つである糖尿病網膜症が引き起こされることから、唾液腺の漿液性腺房細胞に発現しているとされる VEGF に着目している。VEGF は健常なヒトの全唾液中に約 460 pg/ml の濃度で分泌されていることが知られているが、糖尿病患者の唾液中では VEGF 濃度が高値を示し、糖尿病モデルラットの唾液腺では VEGF の発現が上昇していることが報告されている。また、VEGF を分子標的としたいくつかの抗 VEGF 抗体がすでに厚生労働省に認可され、硝子体内注射薬として広く治療に用いられている。一方で、VEGF と白血球および炎症との関連として、VEGF が白血球を誘導して網膜の血管透過性を亢進させることが明らかとなり、VEGF が血管新生因子としてのみならず炎症性サイトカインとして機能することが示され、VEGF と炎症病態が関連することが解明されている。

2. 研究の目的

糖尿病患者の唾液腺では、慢性炎症が生じることで唾液分泌量が減少すると考えられており、唾液腺における炎症コントロールが実現できれば、唾液腺機能の回復が期待できる。この炎症の一因として VEGF の関与が考えられることから、抗 VEGF 抗体を 2 型糖尿病モデルマウス KK-A^y の唾液腺へ応用するとの着想を得た。

そこで本研究では、抗 VEGF 抗体による炎症メディエーターの抑制が唾液腺の機能回復に有効か検討することを目的とする。

3. 研究の方法

10~12 週齢の雄性 KK-A^y に対し、*ex vivo* 灌流モデルを用いて顎下腺からの唾液分泌量を測定し、回収した唾液中の VEGF、イオン濃度を調べることで、抗 VEGF 抗体の唾液腺への応用が唾液腺性状に与える影響を評価する。また、Hematoxylin-Eosin 染色による組織学的検討により唾液腺に器質的な変化がないか確認する。さらに、免疫組織化学染色を行うことで、唾液腺における各チャンネルの局在を解析する。

これらの評価項目を機能解析 24 時間前に生理食塩水を投与した DM 群と抗 VEGF 抗体ラニズマブ (RBZ) を投与した DM+RBZ 群とで比較検討することで、RBZ が唾液分泌機能の回復に有効かを評価する。

● *Ex vivo* 顎下腺灌流実験 (右図)

麻酔薬である抱水クロラル [400 mg/kg (体重)] をマウス腹腔内に投与し、顎下腺を総頸動脈および導管とともに摘出する。動脈をニードルにつなぎ、生理食塩水を灌流させる。その後、ムスカリン性刺激薬である Carbachol (CCh) 0.3 μM を 1.0 ml/min で灌流し、導管からの分泌唾液量を測定することで、唾液分泌能を評価する。

● 唾液中イオンおよび VEGF 濃度測定

灌流実験で回収した分泌唾液内のイオン濃度 (Na⁺、Cl⁻) を Dri-Chem 7000 (FUJIFILM) を用いて測定した。VEGF 濃度は ELISA 法により測定した。

● 組織学的解析

顎下腺の Hematoxylin-eosin (HE) 染色および免疫組織化学染色を行い、デジタルマイクロスコープ VX-5000 (Keyence) で観察した。免疫組織化学染色では Aquaporin 5 (AQP5) および Na⁺-K⁺-2Cl⁻ co-transporter (NKCC1) の発現を確認する。

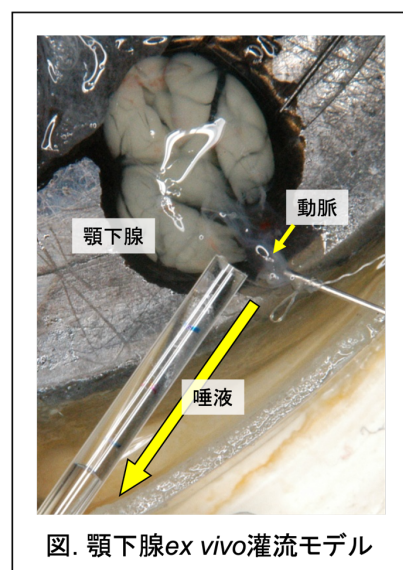


図. 顎下腺 *ex vivo* 灌流モデル

4. 研究成果

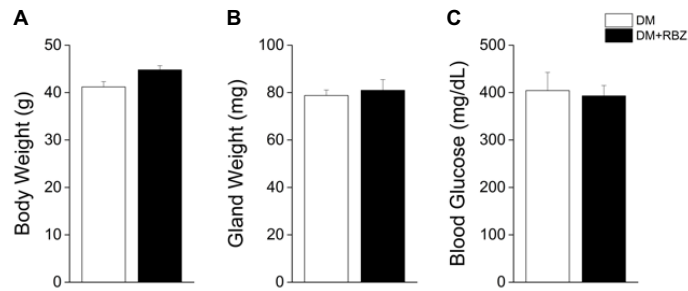


図 1. 体重，唾液腺重量および血糖値

(A-C) 体重，唾液腺重量および血糖値は DM 群と DM+RBZ 群で有意差はなかった。
(体重，血糖値：DM; n = 5, DM+RBZ; n = 7, 唾液腺重量：DM; n = 9, DM+RBZ; n = 13)

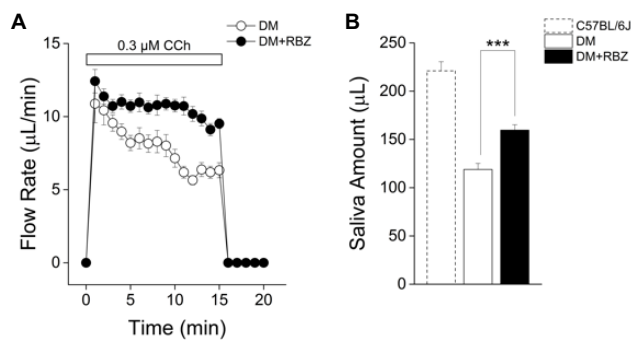


図 2. 唾液分泌速度および唾液分泌量

(A) DM 群と比較し DM+RBZ 群で唾液流量が増加していた。
(B) DM 群と比較し DM+RBZ 群で唾液分泌量が有意に増加していた。参考として C57BL/6J における唾液分泌量を破線で示す。
(DM; n = 9, DM+RBZ; n = 13)

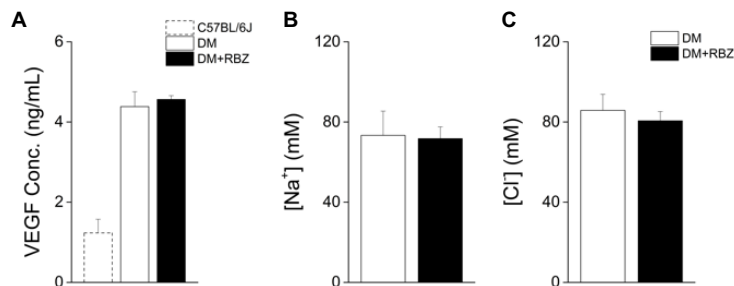


図 3. 唾液中の VEGF および電解質濃度

(A) 分泌唾液中の VEGF 濃度は DM 群と DM+RBZ 群で有意差はなかった。参考として C57BL/6J の分泌唾液中 VEGF 濃度を破線で示す。(B, C) 分泌唾液中の Na⁺および Cl⁻濃度は DM 群と DM+RBZ 群で有意差はなかった。
(DM; n = 9, DM+RBZ; n = 13)

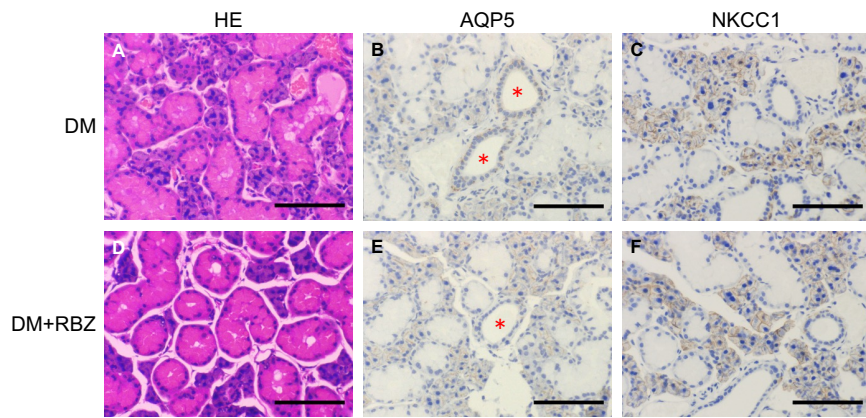


図 4. 組織学的分析

(A, D) HE 染色像では DM 群と比較して DM+RBZ 群で細胞間隙が広がっており，導管細胞のわずかな増大を認めた．(B, E) DM 群では導管（*）に AQP5 が発現しているが，DM+RBZ 群では正常なマウス（右図）と同様 AQP5 の発現は認めなかった．(C, F) 両群における NKCC1 の発現に差はなかった．

本研究より、2型糖尿病モデルマウス KK- A^y において、抗 VEGF 抗体である RBZ を投与することで有意に唾液分泌量が増加することが明らかとなった。唾液中の VEGF 濃度に差はなかったが、RBZ の投与の影響により、水分泌に関与する AQP5 の発現位置が変化することが免疫組織化学染色により確認された。

以上より、糖尿病患者において抗 VEGF 抗体を応用し炎症性メディエーターである VEGF を抑制することで口腔乾燥症の症状を改善できる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高橋祐介, 宗政翔, 永田裕紀, 野代知孝, 向坊太郎, 近藤祐介, 正木千尋, 細川隆司
2. 発表標題 糖尿病に伴う口腔乾燥症への抗VEGF抗体の応用
3. 学会等名 日本口腔インプラント学会第40回九州支部学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高橋祐介, 宗政翔, 野代知孝, 向坊太郎, 近藤祐介, 正木千尋, 細川隆司
2. 発表標題 抗VEGF抗体の応用が糖尿病における唾液分泌機能へ及ぼす影響
3. 学会等名 日本補綴歯科学会第132回学術大会
4. 発表年 2023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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------