

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：33602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09848

研究課題名(和文)唾液蛋白質によるステロイド薬の副作用軽減とウイルス誘発性炎症の抑制機構解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of salivary protein for reducing adverse effects of steroids and suppressing virus-induced inflammation

研究代表者

今村 泰弘 (IMAMURA, Yasuhiro)

松本歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：00339136

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)：ヒスタチンは抗菌作用のある唾液蛋白質であり、唾液中に比較的多く存在するため、宿主に対して生理的機能を果たすことが考えられる。これまでに、ヒスタチンは、1)宿主細胞の増殖・生存を促進する、2)その遺伝子が唾液腺由来細胞で特異的に発現する、また、悪性黒色腫細胞で高発現することを解明した。本研究では、ヒスタチンによる免疫抑制薬(ステロイド薬等)の効果増強作用について示した。これは、唾液蛋白質が免疫抑制薬の投与量減量と副作用軽減に寄与する知見となる。また、ヒスタチンは新型コロナウイルスの炎症誘発を抑制することについて明らかにした。このことは、将来の唾液蛋白質による抗炎症薬の開発に結び付く内容である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫抑制薬(特にステロイド薬)はアレルギー性疾患や新型コロナウイルス感染症の重篤な肺炎等に広く使用されている。しかし、この薬物の副作用発現・重篤性は問題になっている。これまでに唾液成分が免疫抑制薬の効果に影響を及ぼすことは示されていなかった。また、新型コロナウイルスの誘発性炎症に対する唾液成分の影響は未知であった。本研究は、抗菌唾液蛋白質ヒスタチンによる免疫抑制薬の作用増強並びに新型コロナウイルス誘発性炎症の抑制作用を示唆した。これらはヒスタチンの新規機能解明として免疫抑制薬の副作用軽減や抗ウイルス性炎症薬への開発に繋がり、社会的にも重要な知見と考えられる。

研究成果の概要(英文)：Histatin is a salivary protein with antimicrobial properties and is relatively abundant in saliva, which may serve physiological functions for the host. We have previously shown that 1) histatin promotes host cell proliferation and survival, and 2) the histatin gene is specifically expressed in salivary gland-derived cells and is highly expressed in malignant melanoma cells. In this study, we showed that histatin potentiates the effects of immunosuppressive drugs (e.g., steroids). This is a finding that salivary protein contributes to dose reduction and side effect reduction of immunosuppressive drugs. In addition, histatin has been shown to inhibit the induction of inflammation by SARS-Cov-2. This will lead to the future development of anti-inflammatory drugs with the salivary protein.

研究分野：分子生物学・生化学・免疫学・薬理学

キーワード：唾液蛋白質 ヒスタチン

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、免疫抑制薬(特にステロイド薬)はアレルギー性疾患等の多くの患者で使用されている。また、厚生労働省は新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)感染症(COVID-19)で生ずる肺炎に対してステロイド薬(デキサメタゾン(DEX))の使用を認可した。免疫抑制薬には多くの副作用があるが、その中で易感染性は歯周病・う蝕・カンジダ症等の口腔感染症の発症・進行や憎悪と関係している。また、免疫抑制薬の中には副作用として歯肉増殖症があり、歯周病発症・進行のリスクとなる。以上のように使用頻度の高い免疫抑制薬の副作用発現とその重篤性は社会的にも問題となっている。

唾液成分の質・量的変化もまた歯周病、う蝕、カンジダ症等の発症・進行に影響を及ぼす要因である。唾液中のヒスタチンは歯周病原菌やカンジダ菌等に対して抗菌作用を示す蛋白質である。ヒスタチン量が有意に減少するAIDS患者では口腔カンジダ症を発症しやすくなる。これまでに我々は、ヒスタチンがヒト歯肉線維芽細胞(HGFs)の増殖・生存を促進すること<sup>1,2)</sup>、宿主の熱ショック蛋白質(HSP)によるToll様受容体(TLR)を介した炎症性サイトカイン産生をヒスタチンが抑制すること<sup>3)</sup>、ヒスタチン遺伝子は唾液腺由来細胞で優先的に発現すること<sup>4)</sup>を報告した。以上の結果は、ヒスタチンが宿主細胞に対して新たな生理的機能を果たすこと、また、ヒスタチンの新規特性が解明されたことを示している。しかしながら、ヒスタチンの未知なる機能の一端が明らかにされたに過ぎない。従って、今後更なる唾液蛋白質の生理的意義と機能解明が必要であり、期待される。

### 2. 研究の目的

これまでに得られた我々の知見から、ヒスタチンは、1) 免疫抑制薬の作用を増強すること、また、2) SARS-CoV-2による炎症の誘発を抑制することが予想された。実際、これらが明らかにされると、1)では免疫抑制薬の使用に依存した疾患や薬物のリバウンドに対し、ヒスタチンの薬効増強作用により、薬物投与量の減量と副作用の軽減を目指すことが可能となる。また、2)により、SARS-CoV-2に対するヒスタチンの新規機能が明らかになり、新たな知見の取得と将来的な抗炎症薬の開発に繋がる可能性がある。

以上から、本研究では、これまでにない唾液蛋白質の生理的機能とその意義において、薬物の効果・作用やウイルス誘発性炎症の観点に注目し、解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

本研究課題の主な成果についての研究方法は以下である。

#### (1) トランスフェクションとルシフェラーゼ(luc)アッセイ

① グルココルチコイド(GC)受容体(GR)-lucアッセイ: SV40プロモーターとluc遺伝子を含むプラスミド或いはこのプラスミドにGR結合配列を挿入したプラスミド0.5 µgとβ-ガラクトシダーゼ(β-gal)発現ベクター(内部標準)0.05 µgをHEK293細胞に導入した。細胞を1日培養後、コントロールペプチド或いはヒスタチン3, 30 µMで刺激し、更に2時間培養した。細胞をDEX 0.1 µMで24時間刺激後、細胞を回収し、細胞抽出液を調製した。これらを用いてluc及びβ-galの活性を測定し、相対的な転写活性を算出した<sup>5)</sup>。

② nuclear factor of activated T cells(NF-AT)-lucアッセイ: SV40プロモーターとluc遺伝子を含むプラスミドに転写因子NF-AT結合配列を挿入したプラスミド2.5 µgとβ-gal発現ベクター0.25 µgをJurkat細胞に導入した。細胞をコントロールペプチド或いはヒスタチン30 µMで刺激し、6時間培養した。その後、細胞をイオノマイシン2 µM、ホルボール-12-ミリストアト-13-アセアト(PMA)100 ng/ml、免疫抑制薬FK506 0.1 nMで刺激し、17時間培養した。細胞を回収し、上記と同様にluc及びβ-galの活性を測定し、相対的な転写活性を算出した。

③ nuclear factor-kappa B(NF-κB)-lucアッセイ: チミジンキナーゼプロモーターの上流に転写因子NF-κB結合配列が挿入されたlucレポータープラスミド0.5 µgとβ-gal発現ベクター0.05 µgをCalu-3細胞に導入した。細胞を1日培養後、SARS-CoV-2エンベロップ蛋白質(env)1 µg/ml、コントロールペプチド或いはヒスタチン30 µMで刺激し、更に1日培養した。細胞を回収し、上記と同様にluc及びβ-galの活性を測定し、相対的な転写活性を算出した。

#### (2) enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)

① DEX存在下における*Porphyromonas gingivalis*病原体関連分子パターン(pathogen-associated molecular patterns: PAMP)(リポポリサッカライド(LPS)にTLR2リガンド様物質が含有<sup>6)</sup>)刺激でのインターロイキン(IL)-6産生に与えるヒスタチンの影響: CAL27細胞をコントロールペプチド或いはヒスタチン3, 30 µMで刺激し、1日培養した。細胞をDEX 0.1 µMで30

分刺激後、*P. gingivalis* PAMP を 100 ng/ml になるように加え、更に 1 日培養した。培養液を回収後、抗 IL-6 抗体を用いたサンドウィッチ ELISA 法により IL-6 産生量を解析した<sup>3)</sup>。

② env 刺激での IL-6 産生に与えるヒスタチンの影響：Calu-3 細胞を env 1 µg/ml、コントロールペプチド或いはヒスタチン 30 µM で刺激し、1 日培養した。培養液を回収後、上記と同様に IL-6 産生量を解析した。

(3) 免疫沈降法、グルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) プルダウンアッセイとウェスタンブロッティング

① 免疫沈降法：HEK293 細胞をコントロールペプチド或いはヒスタチン 30 µM で 2 時間刺激した。その後、DEX 0.1 µM で 30 分刺激後、細胞を回収した。細胞抽出液を調製し、抗 GRα 抗体で免疫沈降後、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。蛋白質をメンブレンに転写後、抗 HSP90 抗体、抗 HSC70 抗体及び抗 GRα 抗体でウェスタンブロッティングを行った。

② GST プルダウンアッセイ：大腸菌で発現精製した GST 或いは GST-ヒスタチン融合蛋白質<sup>1,2)</sup>と His タグ env 融合蛋白質を混合し、グルタチオンセファロースで沈降させた。これらを電気泳動後、抗 His 抗体及び抗 GST 抗体でウェスタンブロッティングを行った。

#### 4. 研究成果

(1) 免疫抑制薬の効果に対する唾液蛋白質の影響

① GC による GR の転写活性化に対するヒスタチンの影響

これまで明らかにされた機能から、ヒスタチンは免疫抑制薬の効果に影響を与える可能性が考えられた。そこで、HEK293 細胞に GR 結合配列含有 luc レポータープラスミドを導入し、ヒスタチン存在下で DEX による刺激を行い、GR の転写活性化を解析した。DEX は GR を活性化するが、ヒスタチンはこれを量依存的に更に促進する結果となった (図 1)。以上から、ヒスタチンは GC の効果を増強することが明らかとなった。

② GR-HSPs 複合体形成に与えるヒスタチンの影響

GR は HSP90 や HSC70 といった HSP と複合体を形成することにより、不活性化状態となっている。GC がこの複合体の GR に結合すると GR は HSPs から解離し、転写因子として機能する。ここで、ヒスタチンは HSC70 と結合するため、GR-HSPs 複合体の形成状態に影響を及ぼす可能性がある。そこで、ヒスタチン存在下で DEX の刺激を与えた HEK293 細胞の抽出液を調製し、抗 GRα 抗体を用いた免疫沈降法により解析した。その結果、DEX による複合体の解離はヒスタチンにより促進することが明らかとなった (図 2)。このことから、ヒスタチンは薬物の分子レベルでの作用に影響を与えることが示唆された。

③ *P. gingivalis* PAMP の炎症性サイトカイン産生に対する GC の抑制作用に与えるヒスタチンの影響

本実験で使用した PAMP は TLR4 や TLR2 を介して転写因子 NF-κB を活性化し、炎症性サ

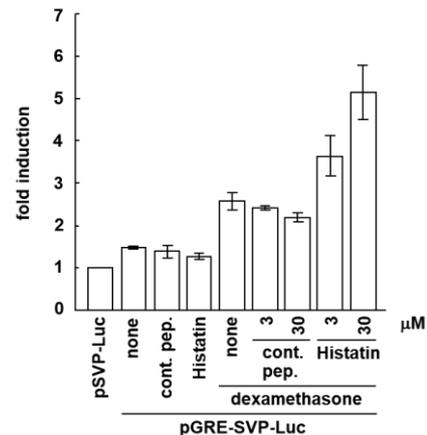


図 1 DEX による GR の転写活性化に及ぼすヒスタチンの影響

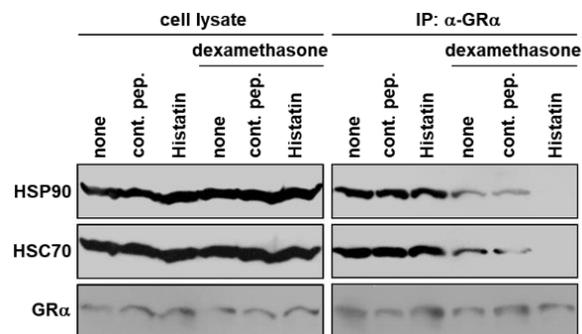


図 2 DEX 存在下における GRα-HSP90-HSC70 複合体の形成状態に与えるヒスタチンの影響

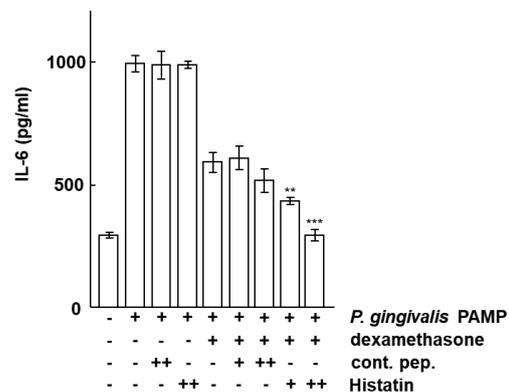


図 3 DEX 存在下での *P. gingivalis* PAMP による IL-6 の産生に及ぼすヒスタチンの影響 \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 vs. *P. gingivalis* PAMP+DEX 刺激

イトカイン IL-6 の産生を促進する<sup>6)</sup>。ヒスタチンは上記 4。

(1) ①、②の作用から、この IL-6 産生抑制に影響を与えることが考えられた。そこで CAL27 細胞をヒスタチンと DEX 存在下で PAMP 刺激後、ELISA 法により IL-6 の産生量を解析した。その結果、DEX は PAMP 刺激による IL-6 の産生を抑制したが、ヒスタチンはこれを更に量依存的に抑制した (図 3)。このことから、ヒスタチンは GC による炎症性サイトカイン産生の抑制を増強することが示唆された。

#### ④ 免疫抑制薬 FK506 の効果に対するヒスタチンの影響

ヒスタチンは FK506 結合蛋白質 (FKBP) の発現を促進することが明らかとなった (データ不掲載)。このことから、ヒスタチンは結果として FK506 の作用に影響を及ぼす可能性が考えられた。そこで、Jurkat 細胞に NF-AT 結合配列含有 luc レポータープラスミドを導入し、ヒスタチン存在下でイオノマイシン、PMA 及び FK506 で刺激後、NF-AT の転写活性化を調べた。その結果、FK506 はイオノマイシンと PMA 刺激による NF-AT の活性化を抑制するが、ヒスタチンはこれを更に抑制した (図 4)。以上から、ヒスタチンは FK506 の効果を増強することが明らかとなった。

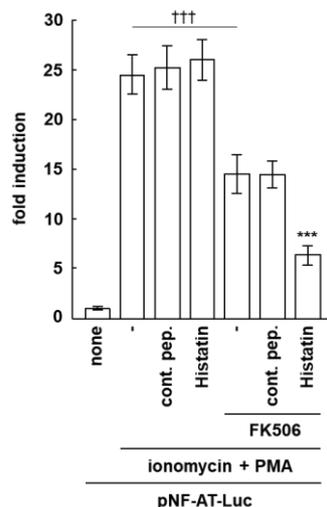


図 4 FK506 による NF-AT 転写活性化の抑制に対するヒスタチンの影響 \*\*\* p<0.001 vs. イオノマイシン+PMA+FK506 刺激、+++ p<0.001

### (2) SARS-CoV-2 の炎症誘発に対する唾液蛋白質の影響

#### ① SARS-CoV-2 env による NF-κB の転写活性化に対するヒスタチンの影響

env は TLR2 を介して NF-κB を転写活性化することが確認された (データ不掲載)。我々はこれまでに、HSP による TLR を介した NF-κB の活性化がヒスタチンにより抑制されることを明らかにした<sup>3)</sup>。ヒスタチンは env に対しても同様の機能を果たす可能性がある。そこで、Calu-3 細胞に NF-κB 結合配列含有 luc レポータープラスミドを導入し、ヒスタチン存在下で env による刺激を行い、NF-κB の活性化を調べた。その結果、ヒスタチンは env による NF-κB の活性化を抑制する結果となった (図 5)。以上から、ヒスタチンは env による NF-κB 活性化に依存した遺伝子の発現を抑制する可能性が示唆された。

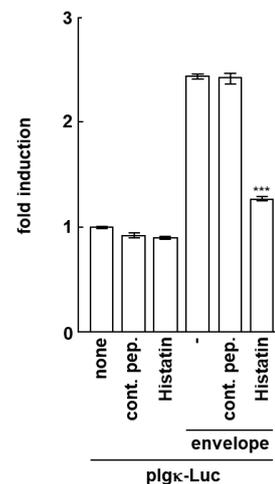


図 5 SARS-CoV-2 env の NF-κB 転写活性化に対するヒスタチンの影響 \*\*\* p<0.001 vs. env 刺激

#### ② SARS-CoV-2 env による炎症性サイトカイン産生に対するヒスタチンの影響

NF-κB は炎症性サイトカイン IL-6 の発現を制御する。また、ヒスタチンは env による NF-κB の活性化を抑制することが判明した (図 5)。そこで、env の作用に対するヒスタチンの影響について IL-6 産生を指標とし、ELISA 法により解析した。その結果、env は IL-6 産生を促進するが、ヒスタチンはこれを抑制することが判明した (図 6)。このことから、ヒスタチンは env による炎症誘発を抑制する生理活性物質であることが示唆された。

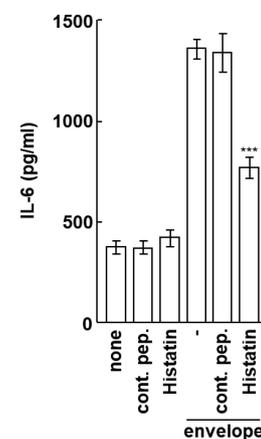


図 6 SARS-CoV-2 env による IL-6 産生に対するヒスタチンの影響 \*\*\* p<0.001 vs. env 刺激

#### ③ ヒスタチンと SARS-CoV-2 env の相互作用

ヒスタチンは env による NF-κB の活性化や IL-6 の産生を抑制することが認められた (図 5、6)。以前に我々は、HSP による TLR を介した炎症性サイトカイン産生をヒスタチンが抑制することを示した<sup>3)</sup>。これは、ヒスタチンと HSP が相互作用することに起因することが判明した。env も同様にヒスタチンと相互作用する可能性が考えられた。そこで、このことを明らかにするために、GST とヒスタチンとの融合蛋白質と His タグと env との融合蛋白質を用いた GST プルダウンアッセイにより解析した。その結果、ヒスタチンは env と直接結合することが明らかとなった (図 7)。

以上をまとめると、ヒスタチンが細胞内に存在する GRα-HSP90-HSC70 複合体の HSC70 に結合することにより、GC の GRαへの結合による複合体解離はより促進されることが明らかとなった。これにより、1) GR の転写因子としての活性化は更に誘

導される、2) *P. gingivalis* PAMP の IL-6 産生に対する GC の抑制効果は更に増強されることが示された。また、ヒスタチンは FK506 による NF-AT の転写活性化抑制をより促進することが示唆された。一方、ヒスタチンは SARS-CoV-2 env と相互作用することにより、NF- $\kappa$ B の転写活性化と IL-6 の産生を抑制することが明らかとなった。

免疫抑制薬は過剰な免疫反応や炎症に、また、臓器移植の拒絶反応を予防するために使用される。炎症誘発性サイトカインには IL-1、IL-6、腫瘍壊死因子 (TNF) があり、これらの発現は NF- $\kappa$ B により制御されている<sup>7)</sup>。GC と結合した GR は NF- $\kappa$ B の p65 サブユニットと相互作用し、NF- $\kappa$ B の転写活性を抑制する<sup>8)</sup>。実際、IL-6 プロモーターを使用したレポーターアッセイでは、GC は *P. gingivalis* PAMP 刺激 (NF- $\kappa$ B の転写活性化) によるプロモーターからの転写を抑制した。ヒスタチンはこれを更に抑制する結果となった (データ不掲載)。これらは IL-6 の産生においても反映されている (図 3)。一方、ステロイド薬以外の免疫抑制薬には FK506 がある。これは FKBP と複合体を形成後、カルシニューリンによる NF-AT の脱リン酸化が阻害されることにより、NF-AT は転写因子として機能できなくなる。その結果、T 細胞や NK 細胞の増殖・活性化と B 細胞の増殖・抗体産生に関わる IL-2 の産生は低下し、FK506 の免疫抑制作用が示されることとなり、ヒスタチンにはこの作用を更に増強する働きがある (図 4)。以上から、ヒスタチンは薬物の作用や効果に多大なる影響を与えていることが伺える。従って、ステロイド薬等の口腔内への投与は投与量と頻度を常に考えることが必要且つ重要となる。

SARS-CoV-2 の構成要素 env は TLR を介して NF- $\kappa$ B を活性化し、炎症性サイトカイン産生を誘導する。これは COVID-19 の肺炎発症に寄与していると考えられる。重篤な肺炎の治療薬として DEX が使用されている。DEX は GR に結合すると GR と相互作用していた HSPs は解離するが、ヒスタチンはこれを更に促進する。その結果、活性化した GR は NF- $\kappa$ B の転写機能を低下させ、炎症誘発を抑制する。一方、ヒスタチンは env と結合することにより、env による TLR シグナルの伝達はブロックされ、結果として NF- $\kappa$ B の転写活性化は抑制される。以上の様に、ヒスタチンは env による炎症誘発を 2つのルートから抑制することが示唆された。これらの知見は、ヒスタチンの数ある未知の機能の一端を解明した重要な内容である。

免疫抑制薬は多くの疾患に適応され、使用頻度が高いため、様々な副作用の発現が問題となる。本研究では、生体内に存在する唾液成分ヒスタチンが免疫抑制薬の効果を促進することについて明らかにした。これは免疫抑制薬の副作用軽減に繋がるヒスタチンの新しい知見となる。また、ヒスタチンは SARS-CoV-2 env による炎症誘発を抑制することが示された。これらは、今までにない唾液蛋白質の新規機能であり、ヒスタチンは生体内の重要な生理活性物質であると考えられる。今後、更なる唾液蛋白質の機能解明が期待される。

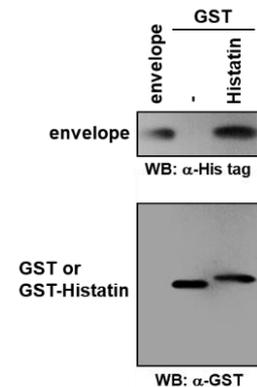


図 7 ヒスタチンと SARS-CoV-2 env の相互作用

#### <引用文献>

- 1) Imamura Y, Fujigaki Y, Oomori Y, Usui S, Wang PL, Cooperation of salivary protein histatin 3 with heat shock cognate protein 70 relative to the G1/S transition in human gingival fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, 284, 14316-14325, 2009
- 2) Imamura Y, Wang PL, Masuno K, Sogawa N, Salivary protein histatin 3 regulates cell proliferation by enhancing p27(Kip1) and heat shock cognate protein 70 ubiquitination. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 470, 269-274, 2016
- 3) Imamura Y, Wang PL, Salivary histatin 3 inhibits heat shock cognate protein 70-mediated inflammatory cytokine production through toll-like receptors in human gingival fibroblasts. *J. Inflamm.-Lond.*, 11, 4, 2014
- 4) Imamura Y, Fujigaki Y, Oomori Y, Ouryouji K, Yanagisawa S, Miyazawa H, Wang PL, Transcriptional regulation of the salivary histatin gene: finding of a strong positive regulatory element and its binding protein. *J. Biochem.*, 145, 279-288, 2009
- 5) Imamura Y, Katahira T, Kitamura D, Identification and characterization of a novel BASH N terminus-associated protein, BNAS2. *J. Biol. Chem.*, 279, 26425-26432, 2004
- 6) Imamura Y, Makita Y, Masuno K, Oh H, Inhibitory mechanism of IL-6 production by oronto in oral squamous cell carcinoma cell line CAL27 stimulated by pathogen-associated molecular patterns from periodontopathogenic *Porphyromonas gingivalis*. *Int. J. Mol. Sci.*, 24, 697, 2023
- 7) Ghosh S, May MJ, Kopp EB, NF- $\kappa$ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *An. Rev. Immunol.* 16, 225-260, 1998
- 8) Ray A, Prefontaine KE, Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF- $\kappa$ B and the glucocorticoid receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 752-756, 1994

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）

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

〔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	三好 智博  (MIYOSHI Tomohiro)  (60534550)	大分大学・グローバル感染症研究センター・講師   (17501)	
研究分担者	雪田 聡  (YUKITA Akira)  (80401214)	静岡大学・教育学部・准教授   (13801)	
研究分担者	十川 紀夫  (SOGAWA Norio)  (30236153)	松本歯科大学・総合歯科医学研究所・教授   (33602)	

	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	王 宝禮  (OH Hourei)		

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