

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 26 日現在

機関番号：32710

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592948

研究課題名(和文)唾液分泌促進ならびに口腔粘膜防御へ果たすシスタチンの役割

研究課題名(英文)Role of cystatin in stimulation of saliva flow and protection of oral mucosa

研究代表者

中川 洋一 (Nakagawa, Yoichi)

鶴見大学・歯学部・講師

研究者番号：90148057

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：シスタチンはシステインプロテアーゼ・インヒビターである。システインプロテアーゼはアポトーシスに関連するため、シスタチンがアポトーシスの制御に関わっている可能性が想定される。シェーグレン症候群では唾液中のシスタチンが減少しており、とくにシスタチンSが減少していた。口唇腺においては、健常者ではシスタチンの強い染色性が認められたが、シェーグレン症候群患者では陽性例が少なく、しかもその染色性はきわめて低かった。以上の結果は、シスタチンがシェーグレン症候群の発症に関与している可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：The cystatins are a family of cysteine protease inhibitors. Cysteine protease inhibitors are assumed to have important roles in apoptosis. Salivary cystatin decreased in Sjogren's syndrome patients, particularly cystatin S. In the labial salivary glands, intense staining of the cystatin was observed in the normal control group, but there were few positive examples in Sjogren's syndrome patients, and the staining was extremely low. These results suggest that the cystatin participates in the regulation of onset of Sjogren's syndrome.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：シェーグレン症候群 シスタチン 唾液分泌

1. 研究開始当初の背景

プロテオミクス解析によって、シェーグレン症候群と健常者の唾液タンパクのプロファイルの違いが明らかとなった。そのタンパクのひとつに、シスタチンがあり、シスタチンはシェーグレン症候群患者で著明に減少していた。

シェーグレン症候群における唾液タンパク増減を測定することの生物学的意義については、多くの検討がある。シェーグレン症候群患者の唾液は、タンパク濃度が高い。そのタンパクの種類として 2-マイクログロブリン、ラクトフェリン、Ig 軽鎖、polyIg 受容体、リゾチーム C などの増加が報告されている。このようにシェーグレン症候群の研究では、唾液中のバイオマーカー探索を中心として、増加する唾液タンパクの検討が主に行われている。ところが、シェーグレン症候群患者においてシスタチンのように減少するタンパクの種類は少ないため、その意義を検討した報告は極めて少ない。

研究開始当初の背景にこのような状況があり、病態解明のためには減少するタンパクの解析が必要と考えられた。

2. 研究の目的

近年、口腔乾燥を訴える患者は増加し、歯科における対処の重要性が認識されてきたが、1. 唾液分泌低下が起きているかどうかの判断、2. 唾液腺機能異常の原因事項の診断、3. 唾液分泌低下の改善方法などは必ずしも確立されておらず、行うべき課題は依然として多い。また、唾液分泌低下に合併するカンジダ症に対しては、その予防方法の確立が求められている。

本研究でシスタチンの唾液分泌のメカニズムと粘膜防御への関与を明らかにすれば、ドライマウス治療への有力なツールとなる。また、唾液分泌機能低下のマーカーとして検討することによりヒューマンセンシングへの応用が可能となる。

当該研究期間における研究目的は、唾液分泌低下へのシスタチンの関与を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) プロテオミクス解析

(2) ドライマウス外来患者の唾液中システインプロテアーゼ・インヒビター活性測定

シェーグレン症候群と非シェーグレン症候群、健常者に分け、活性を比較する。

(3) 減少する唾液シスタチンの種類の Western blotting 法による同定

シェーグレン症候群と非シェーグレン症候群、健常者に分け、タンパク発現を比較する。

(4) 口唇生検の免疫組織化学的検討

シェーグレン症候群の診断のために行った生検組織を、シェーグレン症候群と非シェーグレン症候群にわけ、粘液嚢胞摘出時ならびに健常ボランティアから得られた口唇腺組織を対象とし、免疫組織化学的検討をおこなう。

4. 研究成果

(1) プロテオミクス解析

シェーグレン症候群と健常者の唾液タンパクのプロファイルの違いのうち、シスタチンが特徴的であった(図1)。

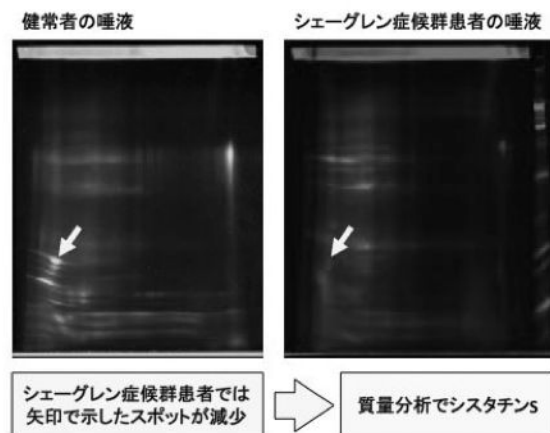


図1. 唾液のプロテイン・プロファイル

(2) 唾液中システインプロテアーゼ・インヒビター活性

ドライマウス外来患者の唾液中システインプロテアーゼ・インヒビター活性は、シェーグレン症候群患者において著明に減少していた(図2)。

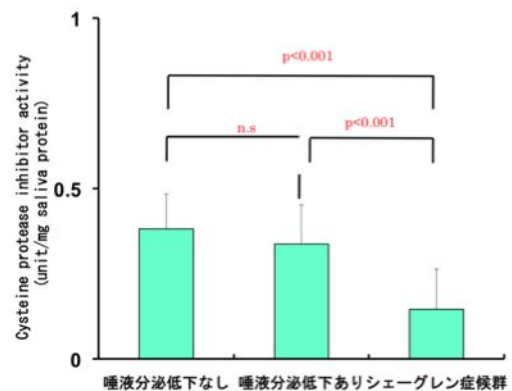


図2. 唾液システインプロテアーゼインヒビター活性

(3) ウェスタンブロッティング

シェーグレン症候群は他の群に比較して唾液中シスタチンSが減少していた(図3)。シスタチン SA, SN は群間に差がなかったため、シスタチンSが唾液分泌にかかわるkeyタンパクと考えられた。

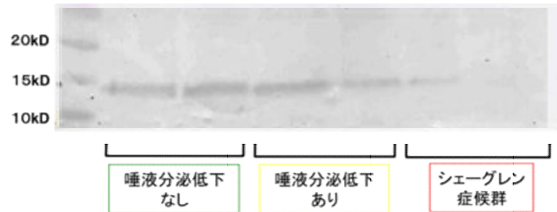


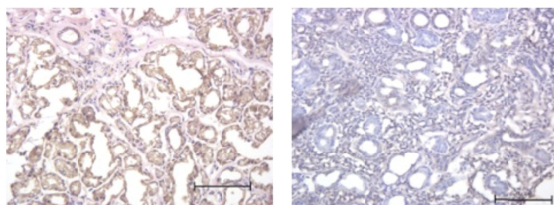
図3. Western blotting法によるシスタチンSの検出

システインプロテアーゼ・インヒビター・シスタチンの自己免疫疾患における役割については以下のように考えられる。シスタチンは、カスパーゼ、カルpain、カテプシン、パpainなどのシステインプロテアーゼを阻害するシステインプロテアーゼ・インヒビターである。シスタチンは、細胞内に存在するファミリーI(シスタチン α ・ β)、分泌性のファミリーII(シスタチンC、S、SA、SN)、ファミリーIII(キニンノーゲン)の3つのスーパーファミリーに分類される。唾液のシスタチンは、ヒト唾液中に見いだされ、顎下腺と耳下腺にSグループのシスタチンが腺房細胞の細胞質(分泌顆粒ではなく)に存在することが分かっている。

Western blottingで唾液のシスタチンSの変化が認められたので、次に口唇生検の材料を用いて免疫組織化学的検討を行った。

(4) 口唇生検の免疫組織化学的検討

口唇生検の免疫組織化学的検討において、健常者の口唇腺ではシスタチンの強い染色性が認められたが、シェーグレン症候群患者では陽性例が少なく、しかもその染色性はきわめて低かった(図4)。このことは、通常働いているシスタチンによる何らかの制御機能が破綻している可能性を示唆している。



健常者の口唇腺

シェーグレン症候群患者の口唇腺

図4. シスタチンの免疫組織化学

細胞レベルでのシスタチンの役割として、カスパーゼ、カテプシンなどアポトーシスに関連するシステインプロテアーゼの阻害が

ある。また、唾液腺以外においては、アルツハイマー、糖尿病、動脈硬化性心臓血管障害など疾患の発症に関連するシスタチンの報告が多数みられる。

ところが、唾液分泌細胞におけるシスタチンは、進化論的観点からパpainなど外来性のプロテアーゼに対する役割や口腔微生物に対して防御因子としての働きが認められているものの、唾液分泌機能や疾患におけるシスタチンの役割の検討はなく、アポトーシス、酸化ストレス、細胞内シグナル伝達に関する報告はみられない。アポトーシスで断片化された細胞成分が抗原性を発揮して自己反応性T-cellが活性化される免疫病理において、システインプロテアーゼとそのインヒビターの検討は病態の本質に迫るものと考えられる。

顎下腺におけるシスタチンSの腺房細胞の細胞質(分泌顆粒ではなく)に存在することが分かっており、本研究においても、その局在が確認された。さらに、シェーグレン症候群においてその局在に変化が起きているという所見は制御機能が破綻している可能性を示唆しているものであり、興味深い。

口唇生検組織の免疫組織学的検討としては、抗シスタチンS抗体(シスタチン量を測定)のほか、抗カスパーゼ3抗体(Anti-ACTIVE@Caspase-3pAbによるin situでのアポトーシス検出)を用い、シェーグレン症候群患者群、非シェーグレン症候群ドライマウス群、健常者に分け、局在と発現強度について比較を行うこと。また、口唇生検組織のシェーグレン症候群におけるタンパクの発現に関する検討として、(1) RT-PCRによって、シスタチンS、SN、SA、DのそれぞれのmRNAの、口唇腺における発現を明らかにし、(2)免疫組織化学ならびにWestern Blottingによって、シスタチンS、SN、SA、Dのそれぞれのタンパクの発現を明らかにすること。上記の染色状態と腺房細胞の破壊、導管細胞の破壊、リンパ球浸潤、脂肪沈着、線維化との関連性を検索し、シスタチンSとカスパーゼ3の相関の年齢による差異を検討し、唾液分泌量、血清抗SS-A抗SS-B値など臨床のパラメーターとの関連性を多変量解析によって関連因子の寄与を統計的に検討することで、明らかにすることができるものと考えられる。

このように、今後、分泌機能制御と抑制のメカニズムを明らかにすることにより、臨床応用可能な治療法の開発に繋がるものと考えられる。

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)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中川 洋一 (Nakagawa Yoichi)

鶴見大学・歯学部・講師

研究者番号：90148057

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし