

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24593006

研究課題名(和文) PTEN臓器特異的ノックアウトシェーグレン症候群モデルによる新規抗原候補の探索

研究課題名(英文) Identification of Sjogren's syndrome-associated antigens using heterozygous mutant mice systematically lacking of the PTEN

## 研究代表者

栗原 清佳(高岡清佳)(KURIHARA, SAYAKA)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：00453639

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、シェーグレン症候群の発症におけるphosphatase and tensin homolog (PTEN)との関連性を検討することを目的とした。シェーグレン症候群の診断を得た唾液腺組織におけるPTENの発現に対して免疫組織学的検索を行った結果、その組織分類でGradeが増すごとにPTENの発現が減弱する傾向を認めた。次に、PTEN遺伝子ノックアウトマウスを作製し、PTENの欠失が唾液腺に及ぼす影響について検索した結果、シェーグレン症候群に特徴的な組織像を認めた。そこで、これらの結果に対する蛋白レベルでのメカニズム解析を行っている。

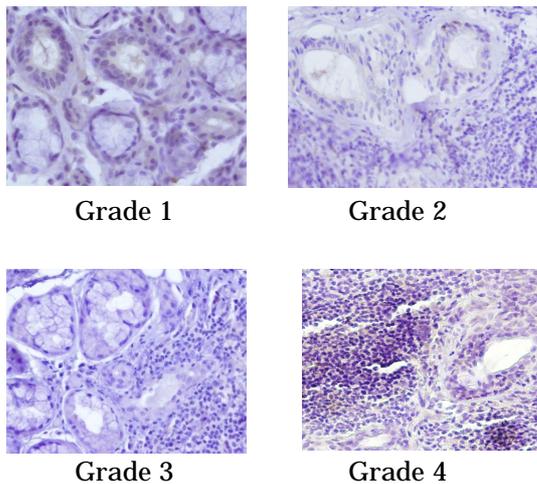
研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to evaluate identification of Sjogren's syndrome-associated antigens using heterozygous mutant mice systematically lacking of the phosphatase and tensin homolog (PTEN). Our results identified that the expression of PTEN of the salivary gland tissue diagnosed with Sjogren's syndrome was attenuated in every increasing Grade in tissue classification. Next, we evaluated the effect of salivary gland in heterozygous mutant mice systematically lacking of PTEN. It showed characteristic histology in Sjogren's syndrome. Accordingly, it is carried out mechanism analysis at the protein level for these results.

研究分野：外科系歯学

キーワード：シェーグレン症候群 PTEN

## 1. 研究開始当初の背景

自己免疫疾患であるシェーグレン症候群は唾液腺が破壊される自己免疫疾患で、口腔乾燥症の原因となり、摂食に著しく支障をきたす疾患であるが、この疾患に対する治療法は対症療法しかなく、疾患特異的な治療法は他の自己免疫疾患同様に確立されていない。phosphatase and tensin homolog (PTEN)は前立腺癌をはじめ数多くの悪性腫瘍において遺伝子変異が認められる癌抑制遺伝子である。甲状腺や乳腺などに高頻度に良性ないし悪性腫瘍を発症する Cowden 病の原因遺伝子は、PTEN であり、この疾病の患者にはシェーグレン症候群が併発することが知られている。そこで申請者らはシェーグレン症候群に PTEN 遺伝子が関与しているのではないかと考え、昭和大学歯科病院口腔外科でシェーグレン症候群の診断を得た 23 例の口唇生検材料で唾液腺組織における PTEN の発現に対して抗ヒト PTEN 抗体を用いて免疫組織学的検索を行った。その結果、シェーグレン症候群においてその組織分類で Grade が増すごとに PTEN の発現が減弱する傾向を認めた(図1)。シェーグレン症候群の治療法は対症療法のみで根治的な方法はなく、また、多くの研究もなされているがその発症の解明には至っていないため、独創的な研究として意義のあるものと考えている。



(図1)

## 2. 研究の目的

上記背景より、申請者らは PTEN を臓器特異的にノックダウンすることでシェーグレン症候群が模倣できるのではないかと

と考えた。そこで、Cre-loxP system により唾液腺特異的 PTEN 遺伝子ノックアウトマウスを作製し、PTEN の欠失が唾液腺に及ぼす影響について検索することを目的とした。また、PTEN は自己免疫抑制作用のある NK 細胞の制御に関連するとの報告や PTEN が T-cell の制御にも関与しているとの報告、さらには T-Cell 特異的 PTEN ノックアウトマウスにおいて末梢自己免疫寛容が障害されるとの報告もあることから、PTEN 欠損シェーグレンマウスモデルを用い、シェーグレン症候群での Androgen と PTEN との関連について解析を行い、さらに、唾液腺における発現蛋白の網羅的な解析を行い、新規抗原候補の探索を目的とした。

## 3. 研究の方法

PTEN 欠損マウスの唾液腺を週令ごとに病理組織学的検索を行い唾液腺炎発症の時期やシェーグレン様病変の存在を確認するとともに、その発症時期における Androgen, Androgen Receptor の発現を免疫組織化学的検索により検討した。また、組織抽出した検体よりイムノプロット法により蛋白発現量に関しても検討する。発症時期の確認を行ったモデルマウスに対して、Androgen の ligand である dihydrotestosterone と拮抗剤である Casodex を腹腔投与し、投与による Androgen, Androgen Receptor, PTEN の発現への影響を病理組織学的に検索する。さらに、PTEN の欠損マウスの唾液腺を週令ごとに病理組織学的検索を行い唾液腺炎発症の時期やシェーグレン様病変の存在を確認するとともに、その発症時期における唾液腺組織を採取し、マイクロアレイによる mRNA レベルの解析を行うと主に SELD TOF/MS を用いてタンパク質の網羅的解析を行う。

ヒト唾液腺導管細胞株においては、siRNA 法により PTEN 遺伝子をノックアウトし、これにより Androgen ならびに Androgen Receptor の mRNA の発現がどのように変化するかを検討し、Androgen の ligand である dihydrotestosterone と拮抗剤である Casodex を添加し、添加による Androgen, Androgen Receptor の発現変動を検索する計画を立案した。

#### 4. 研究成果

我々は本研究に先立ち、予備実験として口唇生検材料で唾液腺組織における PTEN の発現に対して抗ヒト PTEN 抗体を用いた免疫組織学的検索を行った結果、シェーグレン症候群においてその組織分類で Grade が増すごとに PTEN の発現が減弱する傾向を認めた。そのため、PTEN の発現制御が可能となれば、本疾患に対する有効な治療法を見いだせる可能性があると考えた。そこで PTEN 遺伝子欠損マウスの唾液腺にシェーグレン症候群の唾液腺と同じような特徴的な組織像が認められたことから、このマウスをシェーグレン症候群の新しいモデルとし、シェーグレン症候群発症の解明とその治療に役立てたいと考え、モデルの妥当性の評価と PTEN と Sjogren 症候群の関係性に着目した実験体系を作成した。

PTEN の発現抑制に関与するといわれる Androgen の発現と PTEN の発現について、負の相関関係にあるかを蛋白レベルで検証するため、特異的 PTEN 遺伝子ノックアウトマウスにおける Androgen の発現をイムノプロットで行ったが、再現性のある予想と一致した結果を見いだすことができなかった。また、Androgen の ligand である dihydrotestosterone と拮抗剤である Casodex による PTEN への影響についても検討したが同様な結果となった。これらの結果は、仮説とした PTEN と Androgen との相関関係を証明することに至らなかった。原因として、PTEN 遺伝子ノックアウトマウスにおける Androgen の発現メカニズムには PTEN とは別の因子が関与している可能性も否定できないが、現段階では明らかではない。また、PTEN 遺伝子ノックアウトマウスにおける唾液腺における発現蛋白の網羅的な解析においても、シェーグレン症候群と関連性のあると考えられる候補因子の同定は困難であった。以上の結果より、当初の PTEN 遺伝子とシェーグレン症候群の関係性に関しては、臨床検体により、その可能性が示唆されたが、これらの関係性に対する妥当性や相関性を検討するために用いた PTEN 遺伝子ノックアウトマウスにおいて、仮説を証明できなかったことより、現段階では、同マウスをシェーグレン症候群のモデルマウスとして用いることは困難であると考えられた。本研究は、次の段階として、PTEN をノックダウンした培養ヒト唾液腺導管細胞における遺伝子

発現をマイクロアレイ法により網羅的に解析し、発現が変化する遺伝子群を検索することを予定としていたが、今回の研究期間ではそれに至らなかった。しかし、われわれはシェーグレン症候群と診断された臨床検体において、PTEN の発現との挿管を見いだしているため、今回の結果を踏まえ、実験体型から再考し、今後もシェーグレン症候群の発症メカニズムの解析に対して、検討していきたい。

#### 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 0 件)

〔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：  
出願年月日：  
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

栗原 清佳 (SATAKA KURIHARA)  
昭和大学・歯学部・助教  
研究者番号：00453639

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者 ( )

研究者番号：