

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792226

研究課題名(和文) 抗TNF療法による唾液腺機能再生医療の構築

研究課題名(英文) Salivary gland regeneration by anti-TNF regents

研究代表者

青田 桂子 (Aota, Keiko)

徳島大学・大学病院・助教

研究者番号：70437391

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：我々はTNF- α がmatrix metalloproteinase(MMP)-9を活性化させ、シェーグレン症候群(SS)患者の唾液腺腺房細胞の基底膜の分解をもたらす結果、腺房構造が破壊されることを報告している。本研究では抗TNF製剤エタネルセプトとアダリムマブを使用し、不死化ヒト唾液腺腺房細胞におけるTNF- α 誘導MMP-9産生およびアポトーシスに及ぼす影響を調べた。その結果、エタネルセプトまたはアダリムマブ処理により、TNF- α 誘導MMP-9産生の低下を認め、TNF- α 誘導アポトーシスの抑制を認めた。以上より、抗TNF製剤はSSにおける唾液腺腺房構造の破壊を阻止する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Our previous study suggested that TNF- α -induced activation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) resulted in the destruction of acinar tissue in the salivary glands of patients with Sjogren's syndrome (SS) via disruption of the acinar cell-basement membrane. Recently, a wide array of biological agents has been designed to inhibit TNF, including etanercept and adalimumab. In this study, we demonstrated the suppressive effect of anti-TNF agents on TNF- α -induced MMP-9 production in NS-AV-AC, an immortalized human salivary gland acinar cell line.

TNF- α induced the production of MMP-9 in NS-SV-AC cells. However, this production was greatly inhibited by treatment with etanercept or adalimumab. In addition, TNF- α -induced DNA fragmentation was prevented by treatment with etanercept or adalimumab. These results may indicate that anti-TNF agents would have therapeutic efficacy for preventing destruction of the acinar structure in the salivary glands of patients with SS.

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：口腔外科学一般 ドライマウス

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会が到来し、今後 50 年のうちに 65 歳以上の人口は総人口の 50%を超えることが予測されている。自己免疫疾患であるシェーグレン症候群は、閉経期以降の女性に好発することが知られている。このような社会的、病因論的背景により、シェーグレン症候群および加齢に起因した唾液分泌低下症-ドライマウス-の増加が推測される。一般にシェーグレン症候群唾液腺における病理学的特徴としては、小葉内導管周囲の巣状リンパ球浸潤と腺組織破壊が挙げられる。また高齢者唾液腺においても、加齢に伴う免疫調節異常に起因した自己免疫性唾液腺炎としての巣状リンパ球浸潤が観察される。

我々は自己免疫疾患であるシェーグレン症候群患者のドライマウスに対する研究を行ってきた結果、腺組織の破壊は腺組織に浸潤してきたリンパ球から分泌された TNF- α が、腺房細胞特異的に基底膜を分解することにより引き起こされるという病変発症機構を提唱した。そしてこれまでに、(1)唾液分泌減少の原因である腺房構造の消失は、腺房細胞特異的に引き起こされる基底膜の破壊によるものであることを明らかにした (*Lab Invest*, 70:217-227, 1994)。また、培養ヒト腺房細胞と導管細胞を TNF- α で処理した場合、腺房細胞においてのみ MMP-9 と MMP-2 活性上昇がみられ、これは転写因子 NF- κ B の活性化を介していることを報告した (*Lab Invest*, 77:269-80, 1997)。そこで腺房細胞に NF- κ B の恒常的抑制因子である変異型 I κ B- α cDNA を導入した遺伝子導入細胞を樹立したところ、導入細胞は TNF- α にて刺激しても MMP-9 活性化はみられず良好な増殖を示した (*Arthritis Rheum*, 43:1756-1767, 2000)。すなわち腺組織破壊を惹起する原因分子の

一つは TNF- α であることを特定した。

すでに慢性関節リウマチやクローン病などの疾患に対しては抗 TNF 製剤である etanercept や adalimumab が臨床応用されている。Infliximab はヒトとマウスのキメラ型抗 TNF- α 抗体であり、etanercept は抗 TNF- α モノクローナル抗体である。本製剤を用いた Steinfeid らのパイロットスタディによると、16 人の一次性シェーグレン症候群患者に静脈投与を行ったところ、ドライアイやドライマウスの症状が改善したことが報告されている (*Arthritis Rheum*, 44:237-244, 2001)。一方、Mariette らの多施設での一次性シェーグレン症候群患者 103 人を対象としたトライアルにおいては、Infliximab の静脈内投与による有効性は確認できなかったことが報告されている (*Arthritis Rheum*, 50:1270-1276, 2004)。

2. 研究の目的

これまでの報告および我々の研究結果を踏まえ、ドライマウスに対する治療分子標的を考察した場合、本疾患唾液腺病変の発症因子として TNF- α が強く示唆されていることから、ドライマウスに対しても抗 TNF 製剤の治療効果は十分に期待できるものとする。

そこで本研究においては、シェーグレン症候群および加齢により引き起こされる唾液分泌低下に対して抗 TNF 療法を応用し、ドライマウスの改善治療法を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

1) 唾液腺細胞の増殖能に及ぼす抗 TNF 製剤の影響

我々がすでに樹立した不死化正常ヒト唾液腺腺房細胞 (NS-SV-AC) 株および導管細胞 (NS-SV-DC) 株を用いる (*Lab*

Invest, 69:24-42, 1993)。それぞれの細胞を種々の濃度の etanercept あるいは adalimumab にて 4 日間処理し、MTT 法にて細胞数を測定することにより、抗 TNF 製剤の唾液腺細胞の増殖に及ぼす影響につき解析し、etanercept あるいは adalimumab の至適濃度（細胞増殖抑制効果を示さない濃度）を決定する。

2) TNF- α 刺激唾液腺細胞の MMP-9 産生に及ぼす抗 TNF 製剤の影響

上記の方法にて決定した至適濃度の etanercept あるいは adalimumab 単独、また抗 TNF 製剤と TNF- α (10 ng/ml) 共存下に NS-SV-AC 細胞および NS-SV-DC 細胞を培養した後、培養上清中に存在する MMP-9 活性をそれぞれ Western blot 法と Gelatin zymography 法にて解析する。

3) TNF- α 刺激唾液腺細胞のアポトーシスに及ぼす抗 TNF- α 製剤の影響

etanercept あるいは adalimumab 単独、または TNF- α (20 ng/ml) と抗 TNF 製剤共存下に NS-SV-AC 細胞を培養した後、NS-SV-AC 細胞のアポトーシスを DNA fragmentation assay にて解析した。

4. 研究成果

1) ヒト唾液腺腺房細胞の増殖能に及ぼす抗 TNF 製剤の影響：抗 TNF 製剤はヒト唾液腺腺房細胞の増殖能に影響を及ぼさないことが判明した。

2) TNF- α 刺激唾液腺腺房細胞の MMP-9 産生および酵素活性に及ぼす抗 TNF 製剤の影響：抗 TNF 製剤は、TNF- α 刺激唾液腺腺房細胞の MMP-9 mRNA および MMP-9 蛋白発現を抑制し、MMP-9 酵素活性も抑制することが明らかとなった。

3) TNF- α 刺激唾液腺腺房細胞のアポトーシスに及ぼす抗 TNF 製剤の影響：抗 TNF 製剤は、

TNF- α 刺激唾液腺腺房細胞のアポトーシスを抑制することが明らかになった。

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 4 件）

① Aota K, Azuma M. Targeting TNF- α suppresses the production of MMP-9 in human salivary gland cells. *Arch Oral Biol.* 査読有, 58, 2013, 1761-1768.

② 青田桂子、山村佳子、可児耕一、高野栄之、茂木勝美、桃田幸弘、石丸直澄、東雅之. シェーグレン症候群患者の唾液腺腺房構造破壊阻止—セファランチンの有効性に関する臨床病理学的研究—. *日本口腔科学会雑誌.* 査読有, 62, 2013, 254-261.

③ 青田桂子、山村佳子、大守真由子、山田佑子、可児耕一、高野栄之、茂木勝美、桃田幸弘、松本文博、東雅之. 精神科神経科入院患者の口腔環境評価と専門的口腔ケアの有効性について. *日本有病者歯科医療学会雑誌.* 査読有, 62, 2013, 83-90.

④ 青田桂子、高野栄之、細川浩良、可児耕一、山村佳子、東雅之. リツキシマブの投与によって生じた口腔・上部消化管潰瘍の 1 例. *日本口腔外科学会雑誌.* 査読有, 22, 2013, 478-482.

〔学会発表〕（計 7 件）

① 青田桂子、他. ドライマウス患者における唾液中の TNF- α と MMP-9 発現に関する研究. 第 68 回日本口腔科学会学術集会. 2014. 5. 8-5. 9. 京王プラザホテル（東京都）.

② 青田桂子、他. シェーグレン症候群に対する新規治療戦略—唾液腺腺房構造の破壊を阻止する—. 第 67 回日本口腔科学会学術集

会，2013. 5. 23-5. 24. 栃木県総合文化センター（栃木県）。

③青田桂子、他. 抗 TNF 製剤のヒト唾液腺腺房細胞に及ぼす影響. 第 49 回日本口腔組織培養学会学術集会. 2012. 11. 17. 広島大学医学部応仁会館（広島県）

④青田桂子、他. リツキシマブ投与半年後に難治性口内炎を生じた原発性マクログロブリン血症の 1 例. 第 57 回日本口腔外科学会学術集会. 2012. 10. 19-10. 21. パシフィコ横浜（神奈川県）。

⑤青田桂子. シェーグレン症候群におけるセファランチンの唾液分泌促進効果. 第 21 回日本シェーグレン症候群学会学術集会. 2012. 9. 7-9. 8. ウェスティン都ホテル京都（京都府）。

⑥青田桂子、他. 徳島大学病院精神科神経科入院患者における口腔ケアの有用性について. 第 9 回日本口腔ケア学会総会・学術集会. 2012. 6. 16-6. 17. 名古屋学芸大学（愛知県）。

⑦青田桂子、他. シェーグレン症候群患者の唾液腺腺房構造破棄阻止. 第 66 回日本口腔科学会学術集会. 2012. 5. 17-5. 18. 広島国際会議場（広島県）。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青田 桂子（AOTA Keiko）

徳島大学・大学病院・助教

研究者番号：70437391