

平成 30 年 5 月 14 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11067

研究課題名(和文) 緑茶カテキンの抗活性酸素作用によるシェーグレン症候群の新治療法創出についての検討

研究課題名(英文) Study on development of a novel remedy by antioxidative functions of green tea catechin for Sjogren's syndrome

研究代表者

齋藤 恵一 (Saito, Keiichi)

東北大学・歯学研究科・助教

研究者番号：00178477

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：自己免疫疾患モデルマウスであるMRL/lprマウスに緑茶カテキンを投与して、その影響を調べたところ、唾液分泌促進に關与するaquaporin 5 (AQP5)の顎下腺・腺細胞apical siteでの発現、AQP5の発現促進因子であるPKAの顎下腺での発現が、非投与マウスより有意に増大していた。一方、AQP5の産生を阻害する活性型NF- κ Bの発現、NF- κ Bの活性化を促進するJNKおよびHMGB1とそのreceptorであるRAGEの発現が、顎下腺で非投与マウスより有意に減少していた。我々の結果から、緑茶カテキンが自己免疫唾液腺炎において、唾液分泌を刺激する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We administered green tea catechin (epigallocatechin gallate; EGCG) to MRL-Fas (lpr) mice and examined suppressive effects of EGCG on autoimmune sialadenitis. Our results demonstrated that expression of aquaporin 5 (AQP5) at apical plasma membrane of submandibular gland acinic cells and that of protein kinase A (PKA) which promotes AQP5 production increased significantly compared with non-EGCG treated mice. Meanwhile, EGCG-treated mice displayed reduced expression of nuclear factor- κ B (NF- κ B) and its activator, c-Jun N-terminal kinase (JNK) and high-mobility group box-1 (HMGB1) as well as receptor for advanced glycation end products (RAGE) which are receptors of HMGB1 compared with non-EGCG treated mice. Taken together, our study show that EGCG serves as a salivary secretagogue in autoimmune sialadenitis.

研究分野：口腔免疫学

キーワード：シェーグレン症候群 緑茶カテキン aquaporin 5 NF- κ B PKA

1. 研究開始当初の背景

唾液腺は自律神経（交感神経および副交感神経）の支配下にあり、この神経系が唾液腺の唾液分泌機能に関与する。唾液腺の腺細胞には、 α_1 と α_2 アドレナリンレセプター（ α_1 と α_2 ADR）ならびに3型ムスカリン性アセチルコリンレセプター（ M_3R ）が発現しており、交感神経から放出されるノルアドレナリンと副交感神経から放出されるアセチルコリンが、ADRと M_3R に結合することにより唾液分泌を刺激している。

また、唾液分泌の際には、water channelとして作用するAquaporin 5 (AQP5)が、腺細胞のapical plasma membrane (APM)に発現することが知られている。ノルアドレナリンが結合した α_1 ADRとアセチルコリンが結合した M_3R のシグナル伝達系では、endoplasmic reticulumからの Ca^{2+} の放出を促進し、腺細胞内部の Ca^{2+} 濃度を上昇させる。細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇することにより、細胞質に存在しているAQP5がAPMへと移動する。一方、ノルアドレナリンが結合した α_1 ADRシグナル伝達系では、protein kinase A (PKA) - cAMP response element binding protein (CREB)を活性化してAQP5の産生を増大させる。これらの2つのシグナル伝達系が協働することにより、唾液分泌が促進されると考えられる。

自己免疫疾患であるシェーグレン症候群の患者では、唾液分泌が減少して口腔乾燥を呈するが、唾液腺・腺細胞のAPMにおけるAQP5の発現、唾液腺組織のAQP5 mRNAの発現、唾液中のAQP5の濃度が、それぞれ減少していることが報告されている。これらの研究結果は、AQP5の発現の減少が、シェーグレン症候群の唾液分泌の抑制を惹起していることを示唆している。

本疾患でAQP5の発現が阻害される要因としては2つ考えられ、1つは、本疾患の患者の血清中に認められる M_3R に対する自己抗体により M_3R の反応性が低下し、腺細胞内の Ca^{2+} 濃度の上昇を妨げ、結果的にAQP5のAPMへの移動を阻害するということである。他の要因は、多くの研究により報告されている通り、自己免疫疾患の病因とされている活性酸素（ROS）である。我々も、自己免疫疾患モデルマウスMRL-*Fas*^{lpr}マウス（MRL/lprマウス）の唾液腺炎においてROSが過剰に産生されており、それが唾液腺組織のDNA損傷やアポトーシスによる組織破壊の原因となっていることを既に報告している。ROSには、唾液分泌に関連するPKA-CREBを不活化する作用がある。また、

ROSには、c-Jun N-terminal kinase (JNK)を活性化する作用があり、活性化したJNKは、nuclear factor κ B (NF- κ B)を活性化する。そして、活性型NF- κ BはAQP5のgene promoterに結合して、その産生を阻害する。一方で、抗活性酸素物質であるquercetinをマウスに事前投与すると、ROSを大量に発生させるX線を照射したマウスの唾液分泌が、非投与マウスに比較して有意に増加したという報告もある。

我々は、緑茶の成分であるepigallocatechin gallate (EGCG)をMRL/lprマウスに投与したところ、抗酸化分子であるheme oxygenase-1と抗アポトーシス分子であるBcl-2の発現が顎下腺組織で有意に増大し、自己免疫唾液腺炎にみられる唾液腺組織のDNA損傷やアポトーシスによる組織破壊が顕著に抑制されていたことを既に報告している。また、EGCGはROSの産生に関与するgp91phoxの発現を阻害することにより、ROSの産生を減少させることが示されている。さらに、EGCGはROSによるNF- κ Bを不活化させ、PKAを活性化させることが報告されている。NF- κ BはAQP5の発現を阻害し、逆にPKAはAQP5の発現を促進することは、前述したとおりである。これらの研究を勘案すると、EGCGを投与した、自己免疫唾液腺炎を呈するMRL/lprマウスの唾液腺APMにおいては、非投与マウスに比較して、AQP5の発現が増大することが仮定される。しかし、自己免疫唾液腺炎の腺細胞におけるAQP5発現に対するEGCG投与の影響を調べた研究は、我々の知る限り、これまで見当たらない。もし、EGCGが自己免疫唾液腺炎の腺細胞におけるAQP5の発現を促進するならば、シェーグレン症候群の唾液分泌減少に対する治療法の1つに繋がる可能性が出てくる。

2. 研究の目的

今回の我々の研究の目的は、EGCGを自己免疫疾患モデルマウスに投与し、自己免疫唾液腺炎（顎下腺）の腺細胞APMにおけるAQP5の発現ならびにAQP5の発現に関連する7つの分子の発現に対するEGCG投与の影響を調べ、EGCGの投与がシェーグレン症候群様唾液腺炎におけるAQP5発現減少に対する改善効果（唾液分泌能改善効果）に寄与するものであるかどうかを明らかにすることである。AQP5の発現に関連する7つの分子とは以下のものである。すなわち、(1)PKA、(2)NF- κ B、(3)JNK、(4)high mobility group box-1 (HMGB1)、

(5)receptor for advanced glycation end products (RAGE) ((3)(4)(5)は NF- κ B の活性化因子)、(6)inhibitor B (I κ B)、(7)histone deacetylase1 (HDAC1) ((6)(7)は NF- κ B の阻害因子) である。

3. 研究の方法

(1) マウス

自己免疫疾患モデルマウスである MRL-*Fas*^{lpr} マウスを用い、東北大学大学院医学研究科の動物実験施設において、specific pathogen free の環境下で飼育された。今回の動物実験に関しては、東北大学の動物実験に関するガイドラインに則って実施され、動物に対して苦痛を与えないように十分に配慮した。

EGCG (>95%, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) を飲用水 (100 μ g / ml) に溶解し、MRL-*Fas*^{lpr} マウスに 8 ~ 16 週齢にかけ、57 日間に渡って投与した(以後 EGCG 投与マウス)。週齢が同じ 6 匹の MRL-*Fas*^{lpr} には飲用水のみを投与して対照とした(以後 EGCG 非投与マウス)。

(2) 自己免疫唾液腺炎の病理組織所見の評価

16 週齢の EGCG 投与マウス 10 匹及び EGCG 非投与マウス 6 匹から顎下腺を得た。すなわち、マウスは十分な麻酔下で失血によって安楽死させ、摘出した顎下腺を 10% 中性ホルマリンで固定した後パラフィンに包埋し、病理組織切片 (3 μ m) を作製した。

(3) 免疫組織化学的手法ならびに評価

EGCG 投与マウス及び EGCG 非投与マウスから作製した顎下腺組織切片に、ストレプトアビジン・ビオチン法による免疫組織化学的染色 (Histofine SAB-PO(G) または SAB-PO(R) Kit ニチレイ社、東京) を行い、AQP5、PKA、NF- κ B、JNK、HMGB1、RAGE、I κ B、HDAC1 の発現について調べた。用いた一次抗体は、ウサギ polyclonal 抗体 : p-PKA C-subunits, p-NF- κ B p65, I κ B (Santa Cruz Biotechnology 社, Dallas, TX)、ウサギ monoclonal 抗体 : HMGB1 clone No. EPR3506 (abcam 社, Cambridge, UK)、ヤギ polyclonal 抗体 : AQP5, p-JNK, RAGE (Santa Cruz Biotechnology 社, Dallas, TX) であ

る。抗原賦活化のために、0.01 M クエン酸緩衝溶液 (pH 6.0) 中でオートクレーブ処理後 (120 °C、5 分)、一次抗体と overnight 4 °C で反応させた。その後、ビオチン化したヤギ抗ウサギ IgG 抗体またはウサギ抗ヤギ IgG 抗体と反応させ、さらにストレプトアビジン・ペルオキシダーゼ複合体と反応させた。免疫反応は、3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, hydrogen peroxide とアジ化ナトリウムの Tris-HCl buffer (pH 7.6) 溶液により顕在化させ、hematoxylin による核染色を行い、染色所見を光学顕微鏡下で観察した。

免疫組織化学染色所見は、0~3 の 4 段階 (染色レベルスコア) で評価した (0 : 染色が認められない。1 : 染色が無視できるくらいに非常に弱い。2 : 中等度の染色が、部分的に認められる。3 : 顕著な染色が認められる。)

(4) 統計学的分析

AQP5 の発現ならびに AQP5 の発現に関連する 7 分子の発現に関連する分子の染色レベルスコア (0~3) の分布における EGCG 投与マウスと非投与マウスとの間の統計学的分析は Fisher's exact test によって行った。AQP5 の発現ならびにその発現に関連する 7 分子の発現 (染色レベルスコア) との間の相関分析は、Kendall 順位相関分析によって行った。さらに、AQP5 の発現に関連する 5 分子の染色レベルスコアを交絡因子として、その影響を除いた状態で、AQP5 と PKA ならびに AQP5 と p-NF- κ B の染色レベルスコアの間での偏相関分析を行い、両者の関連性と交絡因子の影響の強さについて調べた。

4. 研究の成果

(1) EGCG 投与マウスと EGCG 非投与マウスの顎下腺における AQP5 の発現とその発現に関連する 7 分子の発現

AQP5 と PKA の発現

EGCG 投与マウスの顎下腺・腺細胞の APM に AQP5 が顕著に発現していた一方で、非投与マウスの発現は、無視できるくらいに非常に弱いものであった。同様に、PKA の発現も、EGCG 投与マウスの唾液腺組織では顕著であ

ったが、非投与マウスのそれは、無視できるくらいに非常に弱いものであった。AQP5 と PKA の染色レベルスコアの分布に関しては、EGCG 投与マウスと非投与マウスの間で有意な差を認めた。すなわち、EGCG 投与マウスにおいて、AQP5 と PKA の高スコアの割合が有意に高かった。

p-NF- κ B p65、p-JNK、HMGB1、RAGE の発現
p-NF- κ B p65、p-JNK、HMGB1、RAGE の発現が、EGCG 非投与マウスの唾液腺組織では顕著であったが、投与マウスのそれは、無視できるくらいに非常に弱いものであった。p-NF- κ B p65、p-JNK、HMGB1、RAGE の染色レベルスコアの分布に関しては、EGCG 非投与マウスと投与マウスの間で有意な差を認めた。すなわち、EGCG 非投与マウスにおいて、p-NF- κ B p65、p-JNK、HMGB1、RAGE の高スコアの割合が有意に高かった。

I κ B と HDAC1 の発現
EGCG 投与マウスの顎下腺組織に I κ B と HDAC1 が顕著に発現していた一方で、非投与マウスの発現は、無視できるくらいに非常に弱いものであった。I κ B と HDAC1 の染色レベルスコアの分布に関しては、EGCG 投与マウスと非投与マウスの間で有意な差を認めた。すなわち、EGCG 投与マウスにおいて、I κ B と HDAC1 の高スコアの割合が有意に高かった。

(2) AQP5 の発現ならびにその発現に関連する 7 分子の発現との間 (染色レベルスコア間) の相関分析

Kendall 順位相関による分析

AQP5 と PKA、I κ B、HDAC1 の発現との間に有意な正の相関が、p-NF- κ B p65、HMGB1、RAGE の発現との間に有意な負の相関を認めた。しかし、AQP5 と p-JNK の発現の間には有意な相関は認められなかった。

一方、p-NF- κ B p65 と p-JNK、HMGB1、RAGE の発現との間には有意な正の相関が、PKA、I κ B、HDAC1 の発現との間に有意な負の相関を認めた。p-JNK は直接的に AQP5 を阻害するわけではないが、p-NF- κ B p65 の活性化を通じて AQP5 の発現を間接的に制御していると考えられた。

偏相関による分析

p-NF- κ B p65、HMGB1、RAGE、I κ B、HDAC1 の 5 分

子を交絡因子として、AQP5 と PKA の発現との間の偏相関分析を行ったところ、いずれの交絡因子の場合にも有意な偏相関を認めなかった。これらの結果は、PKA による AQP5 の発現の促進に p-NF- κ B p65、HMGB1、RAGE、I κ B、HDAC1 の交絡因子が影響していることを示唆している。一方、PKA、I κ B、HDAC1、HMGB1、RAGE の 5 分子を交絡因子として、AQP5 と p-NF- κ B p65 の発現との間の偏相関分析を行ったところ、PKA を交絡因子とした場合には有意な負の偏相関を示したが、他の 4 つの交絡因子では有意な偏相関を認めなかった。これらの結果は、p-NF- κ B p65 による AQP5 の発現の阻害に PKA を除く I κ B、HDAC1、HMGB1、RAGE が影響していることを示唆している。

(3) 考察

唾液腺・腺細胞から唾液が分泌されるためには、自律神経のシグナル伝達系の刺激により腺細胞内で産生された AQP5 が、APM に移動して water channel としての役割を果たすことが重要である。シェーグレン症候群の患者では、唾液腺の唾液分泌能が低下し、唾液分泌量の減少に伴う口腔乾燥症が認められる。本疾患の唾液分泌能の低下には、唾液腺における AQP5 の発現の減少が関連するということが示されているが、その原因に関しては十分に解明されているとは言えない。しかし、これまでの研究から、本疾患患者の血中にみられる M₃R に対する自己抗体が M₃R の反応性を低下させること、ならびに腺細胞内で産生される ROS が PKA-CREB を不活化し、また NF- κ B を活性化させることが、AQP5 の APM における発現を抑制すると考えられている。

そこで今回我々は、抗活性酸素作用のある EGCG を自己免疫疾患モデルマウスに投与し、自己免疫唾液腺炎における AQP5 の発現およびその発現に影響を及ぼすと考えられる、PKA、I κ B、HDAC1、p-NF- κ B p65、HMGB1、RAGE の発現を調べたところ、EGCG 非投与マウスに比較して、顎下腺 APM における AQP5 の発現が有意に増加していた。また、PKA、I κ B、HDAC1 の顎下腺組織での発現も、非投与マウスに比較して有意に増加していたが、p-NF- κ B p65、HMGB1、RAGE の発現は、EGCG 投与により有意に抑制されていた。これらの結果は、EGCG が自己免疫唾液腺炎での AQP5 の発現、ならびに AQP5 の発現の促進因子 PKA の発現を増大させ、AQP5

の阻害因子である p-NF- κ B p65 の活性化を抑制することを示している。

さらに、Kendall の順位相関と偏相関による分析では、AQP5 と PKA、I κ B、HDAC1 との発現の間に正の有意な順位相関を認めたと、I κ B、HDAC1 を交絡因子とする AQP5 と PKA との間の偏相関係数は有意ではなかった。同様に、p-NF- κ B p65、HMGB1、RAGE を交絡因子とする AQP5 と PKA との間の偏相関係数は有意ではなかった。p-NF- κ B p65 と I κ B、HDAC1 の間の順位相関が負であり、p-NF- κ B p65 と HMGB1、RAGE の間の順位相関が正であることを勘案すると、偏相関分析の結果は、EGCG が AQP5 の直接的な阻害因子である p-NF- κ B p65 の発現を抑制する事ばかりではなく、p-NF- κ B p65 の阻害因子である I κ B、HDAC1 の発現を増大させ、活性化因子である HMGB1、RAGE の発現を減少させることも、PKA による AQP5 の発現促進作用を強める要因になっていることを示唆している。また、AQP5 と p-NF- κ B p65 の発現との間の偏相関分析からも同様のことが推察される。

一方で、EGCG により活性化される PKA には、endoplasmic reticulum から Ca²⁺の放出を促進する作用のあることが、また EGCG 自体にも細胞外 Ca²⁺の細胞内への取り込みを促進する作用のあることが報告されている。これらの研究から、M₃R に対する自己抗体の存在下にあったとしても、EGCG 投与により細胞内の Ca²⁺濃度が維持され、AQP5 の APM への移動が自己抗体により阻害されることなく行われることが推察される。我々の研究結果では、EGCG 投与マウスの腺細胞 APM における AQP5 の発現が、非投与マウスに比較して増大しており、AQP5 の APM への移動が EGCG の投与によって促進されることが明らかとなった。

以上のことから、抗活性酸素物質である EGCG には、唾液腺腺細胞内の ROS の産生を抑制することで、p-NF- κ B p65 の活性化を阻害し、PKA の活性化を促進することにより、AQP5 の APM における発現を増大させていることが示唆された。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

Shiro Mori (3 番目、他 3 名) Therapeutic effect of cisplatin given with a lymphatic drug delivery

system on false-negative metastatic lymph nodes. *Cancer Sci* 2017 108(11):2115-2121.

doi: 10.1111/cas.13387. 査読有

Shiro Mori (5 番目、他 4 名) New concept for the prevention and treatment of metastatic lymph nodes using chemotherapy administered via the lymphatic network. *Sci Rep* 2016 6:32506.

doi: 10.1038/srep32506. 査読有

Shiro Mori (2 番目、他 2 名) A Novel Treatment Method for Lymph Node Metastasis Using a Lymphatic Drug Delivery System with Nano/Microbubbles and Ultrasound. *J Cancer* 2015 6(12):1282-94.

doi: 10.7150/jca.13028. 査読有

Keiichi Saito (1 番目) Shiro Mori (2 番目) (他 2 名) Epigallocatechin gallate stimulates the neuroreactive salivary secretomotor system in autoimmune sialadenitis of MRL-*Fas*^{lpr} mice via activation of cAMP-dependent protein kinase A and inactivation of nuclear factor κ B. *Autoimmunity* 2015 48(6):379-388.

doi: 10.3109/08916934.2015.1030617 査読有

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 恵一 (SAITO, Keiichi)
東北大学・歯学研究科・助教
研究者番号: 00178477

(2) 研究分担者

森 士朗 (MORI, Shiro)
東北大学・大学病院・講師
研究者番号: 80230069