

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11842

研究課題名(和文) 疾患関連分子群の発現制御を基盤とするシェーグレン症候群治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel treatment for Sjogren's syndrome on the basis of the regulation of molecules related to the syndrome

研究代表者

東 雅之 (AZUMA, Masayuki)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・教授

研究者番号：20144983

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：SjSモデルマウスに対するNF- κ B抑制剤Bortezomib (Bor) の治療効果の検討を行った。その結果、26Sプロテアソーム阻害剤であるBorはSjSモデルマウスにおいて、腺房構造の破壊阻止に有効な治療薬となることが示唆された。HDACインヒビターによる培養腺房細胞株でのAQP5発現増強効果の検討を行った。その結果、培養腺房細胞株を各種HDACインヒビターにて処理することにより、AQP5 mRNAの発現増強が認められた。HDACインヒビターはAQP5遺伝子プロモーター領域におけるヒストンH4の脱アセチル化を阻止することにより、腺房細胞におけるAQP5発現の増強に繋がること示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はSjSの発症に関与する分子群を発現制御することにより、多段階的・多重的な治療法を構築するところにある。すなわち、唾液腺組織へのリンパ球浸潤を阻止するためCXCL10分子を標的とする治療法の構築、また腺房構造破壊に関与する転写因子NF- κ Bを標的とした治療法の構築、さらに腺房細胞における水分分泌機能向上のために、水輸送膜蛋白であるAQP5の発現を誘導する治療法の構築である。本治療法は患者が置かれているあらゆる病期・病態に対応できるシステムである。よって本研究成果は、患者にとって最適な治療法の選択と治療効果の実質的実現につながることから学術的意義や社会的意義は非常に大きいものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We examined the therapeutic effect of Bortezomib, an NF- κ B-inhibitory drug, on the destruction of acinar structure of SjS model mouse. As a result, Bortezomib was shown to improve the destruction of acinar structure by suppressing the NF- κ B activity of acinar cells. We examined the effects of HDAC inhibitors on the expression of AQP5 in cultured acinar cells. As a consequence, increase of the expression of AQP5 mRNA was observed by the treatment of acinar cells with HDAC inhibitors. In addition, it was shown that HDAC inhibitors induce the expression of AQP5 in acinar cells by inhibiting the deacetylation of histone H4 in promoter regions.

研究分野：医歯薬学

キーワード：シェーグレン症候群 腺房細胞 導管細胞 アクアポリン5 ケモカイン サイトカイン 転写因子NF- κ B

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

指定難病であるシェーグレン症候群 (SjS) 患者の唾液腺組織においては、リンパ球浸潤により唾液を産生する腺房細胞が破壊される結果、唾液分泌が低下し口腔乾燥 (ドライマウス) をはじめとして、様々な口腔内・外症状を呈する。このため患者の QOL・ADL は著しい低下を示す。これまで SjS 発症過程には様々な疾患関連分子が関与していることが明らかにされているが、我々はこれまでに 3 種類の疾患関連分子群を明らかにしてきた。そこで当該研究の目的は、病変発症メカニズムに関与する分子群に基づいて新規治療法を構築することである。

2. 研究の目的

(1) 「唾液腺組織へのリンパ球浸潤阻止療法の構築」

SjS 患者においては種々のケモカインが唾液腺組織へのリンパ球浸潤開始において重要な役割を担っていることが報告されている。特に CXCL10 と CXCL9 及び CXCL11 が唾液腺導管細胞より生産され、これらのケモカインがケモカインレセプターである CXCR3 を発現する T リンパ球の唾液腺導管細胞周囲への浸潤開始に深く関与していることが示唆されている。そこで、リンパ球の唾液腺導管周囲への浸潤を阻止するため、培養導管細胞及び SjS モデルマウス導管細胞における CXCL10 発現抑制療法を構築することを目的とする。

(2) 「腺房構造安定化療法の構築」

SjS においては、何らかの原因により腺房細胞周囲において基底膜が分解されることにより腺房細胞はアポトーシスに陥り腺房構造の破壊が引き起こされることが報告されている。すでに我々は、導管細胞株と腺房細胞株を TNF- α にて処理した場合、腺房細胞においてのみ MMP-9 の活性上昇が見られ、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ている。そこで、腺房構造の消失の阻止を目指して、SjS モデルマウスを用いて NF- κ B 活性化抑制剤による腺房構造安定化療法を構築することを目的とする。

(3) 「腺房細胞での水分泌促進療法の構築」

多くの SjS 患者においては、上記のごとく腺組織破壊に伴って唾液分泌低下がみられるが、腺組織破壊を伴わない場合においても唾液分泌低下がみられることが報告されている。正常ヒト唾液腺腺房細胞には水輸送膜蛋白である Aquaporin 5 (AQP5) の存在が確認されている。一方、TNF- α は AQP5 遺伝子プロモーター領域におけるヒストン H4 を脱アセチル化することにより AQP5 遺伝子発現を負に制御している。そこで、ヒストンアセチル化の促進を介した AQP5 の発現増強を目指して、培養唾液腺腺房細胞株及び SjS モデルマウスを用いて AQP5 発現誘導システムを構築することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 「唾液腺組織へのリンパ球浸潤阻止療法の構築」

本研究においては、不死化正常ヒト唾液腺導管細胞株 (NS-SV-DC) と腺房細胞株 (NS-SV-AC) を用いる。それぞれの細胞株を未処理あるいはサイトカイン (TNF- α 、IFN- γ) にて処理した後、ケモカインである CXCL10、CXCL9、CXCL11 及びケモカインレセプターである CXCR3 の発現について、それぞれの一次抗体 (抗 CXCL10 抗体、抗 CXCL9 抗体、抗 CXCL11 抗体、抗 CXCR3 抗体) を用いて Western blotting 法と間接蛍光抗体法にて検索する。またそれぞれの mRNA 発現につき定量的に解析する。次に培養細胞を未処理あるいはサイトカインにて処理した後、培養上清中に存在する各ケモカインを CXCL10 ELISA test kit 及び CXCL9 抗体とビオチン化抗 CXCL9 抗体を用いて定量する。また Western blotting 法にて検証する。抗 CXCL10 モノクローナル抗体製剤 (MDX-1100) による各培養細胞からのケモカイン産生に及ぼす影響につき、Western blotting 法と間接蛍光抗体法、Real-time RT-PCR にて検索する。また、SjS モデルマウスより採血したヘパリン添加末梢血を比重分離法 (Ficoll-Hypaque 液) にて分離し、これにより単核球層を採取し末梢血単核球とする。末梢血単核球を FITC 結合抗 CXCR3 抗体と反応させて後 FACS 解析を行い、CXCR3+単核球数の病変進行に伴う増加を確認する。末梢血単核球を用いて、各ケモカインに対する遊走能を Transwell 法にて検索する。これにより、病変進行に伴う各ケモカインに対する遊走能の亢進を確認する。

(2) 「腺房構造安定化療法の構築」

SjS モデルマウスを用いて、リンパ球浸潤に伴う腺房構造破壊の進行度に対応した Bortezomib の治療効果につき検討する。すなわち、モデルマウスの腹腔内に生後 3 週間後、4 週間後、6 週間後、8 週間後、10 週間後から週 5 回の割合で Bortezomib の投与を開始する。コントロールとして生食投与群を用いる。そして生後 11 週の時点ですべてのマウスを屠殺する。マウスより唾液腺組織を摘出し、通常の方法に従って H&E 組織染色を行う。炎症病変の組織学的 Grading を White と Casarett の方法に従って行う。以上の解析より、唾液腺組織におけるリンパ球浸潤の程度と腺組織破壊の進行度の観点から、Bortezomib の治療効果を判定する。

(3) 「腺房細胞での水分泌促進療法の構築」

SjS 腺房細胞での AQP5 発現増強に及ぼす HDAC インヒビター (SAHA、VPA、TSA) の影響につき解析する。各 HDAC インヒビター単独にて腺房細胞を処理した時の AQP5 発現増強につき、Real-time RT-PCR、Western blotting 法と間接蛍光抗体法にて確認するとともに、アセチル化ヒストン H3、H4 の発現増強について解析する。また、AQP5 遺伝子プロモーター領域におけるアセチル化ヒストン H3、H4 を解析する。TNF-a と各 HDAC インヒビターにて処理した時の AQP5 発現を解析することにより、TNF-a による AQP5 発現抑制と HDAC インヒビターによる発現増強を確認する。

4. 研究成果

「唾液腺組織へのリンパ球浸潤阻止療法の構築」

NS-SV-DC 細胞と NS-SV-AC 細胞の未処理あるいは TNF-a や IFN-g 処理におけるケモカイン CXCL10、CXCL9、CXCL11 mRNA 及びケモカインレセプターである CXCR3 mRNA 発現を Real-time RT-PCR にて検索した結果、ケモカインの発現は NS-SV-DC (導管細胞) において強発現が認められた。なお CXCR3 の発現は両細胞においては認められなかった。間接蛍光抗体法にて各細胞株における未処理あるいは TNF-a や IFN-g 処理におけるケモカイン、ケモカインレセプター発現を蛋白レベル、細胞局在レベルにて検索した結果、ケモカインは導管細胞の細胞質内に認められた。ケモカインレセプターは認められなかった。すでに我々は、SjS 患者の唾液中には CXCL10 が正常人唾液に比較して著明に高値を示していることを明らかにしていることから、CXCL10 に焦点を絞りヒト抗 CXCL10 抗体製剤による培養細胞株へのケモカイン発現に及ぼす影響を解析した結果、抗 CXCL10 抗体により発現量の低下が認められた。SjS モデルマウスから CXCR3+末梢血単核球を採取し、ケモカインへの遊走能を検索した結果、ケモカインへの遊走現象が確認された。以上より、唾液腺導管細胞におけるケモカイン発現によるリンパ球遊走の促進とその制御が詳細に解析できた。

「腺房構造安定化療法の構築」

SjS モデルマウスの腹腔内に生後 3 週後、4 週後、6 週後、8 週後、10 週後から週 5 回の割合で Bortezomib の投与を行なったところ、投与の開始が早い程唾液腺 (顎下腺、耳下腺) 組織における腺房構造破壊の程度が軽減されていることが明らかとなった。また、リンパ球浸潤の程度も軽減していた。以上より、26S プロテアソーム阻害剤である Bortezomib は SjS モデルマウスにおいて、腺房構造の破壊阻止に有効な治療薬となる可能性が示唆された。

「腺房細胞での水分泌促進療法の構築」

培養腺房細胞株 (NS-SV-AC) を各種 HDAC インヒビター (SAHA、VPA、TSA) にて処理することにより、Real-time RT-PCR にて AQP5 mRNA の発現増強が認められた。さらに Western blotting での解析により AQP5 蛋白の発現増強が確認された。間接蛍光抗体法にて AQP5 の局在を確認したところ、細胞膜にその局在が認められた。TNF-a による AQP5 遺伝子プロモーター領域におけるアセチル化ヒストン H3 と H4 を Chromatin immunoprecipitation 法により解析したところ、ヒストン H4 の脱アセチル化が確認された。TNF-a と HDAC インヒビターにて細胞株を処理することにより、ヒストン H4 の脱アセチル化は阻止された。以上より、HDAC インヒビターは TNF-a による AQP5 遺伝子プロモーター領域におけるヒストン H4 の脱アセチル化を阻止することにより、腺房細胞における AQP5 発現の増強につながる事が明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Aota K, Yamanoi T, Kani K, Azuma M.	4. 巻 41
2. 論文標題 Cepharanthine inhibits IFN-g-induced CXCL10 by suppressing the JAK2/STAT1 signal pathway in human salivary gland ductal cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Inflammation	6. 最初と最後の頁 50-58
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10753-017-0662-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Aota K, Kani K, Yamanoi T, Nakashiro K, Ishimaru N, Azuma M.	4. 巻 41
2. 論文標題 Distinct regulation of CXCL10 production by cytokines in human salivary gland ductal and acing cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Inflammation	6. 最初と最後の頁 1172-1181
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10753-018-0764-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Aota K, Yamanoi T, Kani K, Nakashiro K, Ishimaru N, Azuma M.	4. 巻 47
2. 論文標題 Inverse correlation between the number of CXCR3+ macrophages and the severity of inflammatory lesions in Sjogren syndrome salivary glands: A pilot study	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Oral Pathology and Medicine	6. 最初と最後の頁 710-718
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jop.12756	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ushio A, Arakaki R, Otsuka K, Yamada A, Tsunematsu T, Kudo Y, Aota K, Azuma M, Ishimaru N	4. 巻 9
2. 論文標題 CCL22-producing resident macrophages enhance T cell response in Sjogren's syndrome	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmmu.2018.02594	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tomato Yamanoi, Keiko Aota, Yukihiro Momota, Masayuki Azuma	4. 巻 29
2. 論文標題 Treatment with the biscoclaurine alkaloid cepharanthine significantly increases salivary secretion in primary Sjogren syndrome patients.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Oral Health and Biosciences	6. 最初と最後の頁 39-48
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.20738/johb.29.2_39	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Momota Y, Masuda N, Takano H, Azuma M	4. 巻 18
2. 論文標題 A case of well-managed sarcoidosis with cardiac autonomic dysfunction during dental therapy.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Med Dent Sci	6. 最初と最後の頁 27-29
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Momota Y, Takano H, Kani K, Ono S, Azuma M	4. 巻 18
2. 論文標題 Oral lichen Plans well-treated with kakapo medicine.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Med Dent Sci	6. 最初と最後の頁 68-72
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Aota K, Kani K, Yamanoi T, Ninomiya M, Yumoto H, Azuma M	4. 巻 98
2. 論文標題 Management of tooth extraction in a patient with ELANE gene mutation-induced cyclic neutropenia.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Medicine (Baltimore)	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MD.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Aota K, Ono S, Yamanoi T, Kani K, Momota Y, Azuma M	4. 巻 42
2. 論文標題 MMP-9 inhibition suppresses interferon-g-induced CXCL10 production in human salivary gland ductal cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Inflammation	6. 最初と最後の頁 2148-2158
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10753-019-01079-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka J, Mabuchi Y, Hata K, Yasuhara R, Takamatsu K, Kujiraoka S, Yukimori A, Takakura I, Sumimoto H, Fukada T, Azuma M, Akiyama H, Nishimura R, Shimane T, Mishima K	4. 巻 382
2. 論文標題 Sox9 regulates the luminal stem/progenitor cell properties of salivary glands.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Exp Cell Res	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yexcr.2019.05.030	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Goto Y, Ibi M, Sato H, Tanaka J, Yasuhara R, Aota K, Azuma M, Fukada T, Mishima K, Irie T	4. 巻 62
2. 論文標題 PLAG1 enhances the stemless profiles of acinar cells in normal human salivary glands in a cell type-specific manner.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Oral Biosci	6. 最初と最後の頁 99-106
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.job.2020.01.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 青田 桂子
2. 発表標題 ヒト唾液腺細胞株の樹立とその応用—シェーグレン症候群の発症機序の解明と治療—
3. 学会等名 第36回日本ヒト細胞学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 青田桂子、山ノ井朋子、可児耕一、桃田幸弘、東 雅之
2. 発表標題 唾液腺細胞におけるCXCL10発現機構の解析
3. 学会等名 第72回日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 可児耕一、桃田幸弘、高野栄之、青田桂子、東 雅之
2. 発表標題 Docetaxelとg-tocotrienolの時差投与による口腔癌細胞株に対する抗腫瘍効果の検討
3. 学会等名 第63回日本口腔外科学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 可児耕一、桃田幸弘、高野栄之、青田桂子、山ノ井朋子、東 雅之
2. 発表標題 口腔癌移植ヌードマウス腫瘍に対するdocetaxel-g-tocotrienol併用療法による抗腫瘍効果の検討
3. 学会等名 第17回中四国口腔癌研究会学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 桃田幸弘、高野栄之、可児耕一、松本文博、青田桂子、山ノ井朋子、高瀬奈緒、宮本由貴、小野信二、東 雅之
2. 発表標題 三剤併用が奏功した一次性舌痛症の3例ー口腔領域の難治性疼痛への対応ー
3. 学会等名 第62回日本口腔外科学会学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Momota Y, Takano H, Kani K, Matsumoto Y, Aota K, Yamanoi T, Takase N, Miyamoto Y, Ono S, Azuma M
2. 発表標題 A case series of xerostomia treated with kakapo medicines: Assessment of health-related quality of life based on the Japanese version of the short form-8 health survey.
3. 学会等名 23rd International Conference on Oral and Maxillofacial Surgery (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高野栄之、桃田幸弘、小野信二、可児耕一、松本文博、青田桂子、金川裕子、東 雅之
2. 発表標題 口腔機能管理を行った重症多形滲出性紅斑の2例
3. 学会等名 第14回日本口腔ケア学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 桃田幸弘、高野栄之、可児耕一、東 雅之
2. 発表標題 五苓散と加工附子末製剤の併用が奏功した三叉神経痛の1例
3. 学会等名 第71回日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高野栄之、桃田幸弘、可児耕一、椎野 滋、東 雅之
2. 発表標題 混合歯列期にBP製剤が投与された骨形成不全症の1例
3. 学会等名 第27回日本口腔内科学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 青田桂子、山ノ井朋子、可児耕一、石丸直澄、東 雅之
2. 発表標題 シェーグレン症候群の病態形成におけるCXCL10-CXCR 3 の役割
3. 学会等名 第73回日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 青田桂子、山ノ井朋子、可児耕一、東 雅之
2. 発表標題 唾液腺導管細胞のIFN-g誘導性CXCL10過剰発現におけるMMP-9の役割
3. 学会等名 第56回日本口腔組織培養学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計4件

1. 著者名 東 雅之	4. 発行年 2017年
2. 出版社 科学評論社	5. 総ページ数 121
3. 書名 臨床免疫・アレルギー科	

1. 著者名 東 雅之	4. 発行年 2020年
2. 出版社 永末書店	5. 総ページ数 635
3. 書名 口腔内科学（第2版）	

1. 著者名 東 雅之	4. 発行年 2020年
2. 出版社 医歯薬出版株式会社	5. 総ページ数 863
3. 書名 口腔外科学 (第4版)	

1. 著者名 青田桂子、東 雅之	4. 発行年 2020年
2. 出版社 医歯薬出版株式会社	5. 総ページ数 863
3. 書名 口腔外科学 (第4版)	

〔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	青田 桂子 (AOTA Keiko) (70437391)	徳島大学・病院・准教授 (16101)	