

機関番号：32710

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20592161

研究課題名（和文） 活性酸素を介した唾液分泌障害機序の解析と SOD の予防的効果の検討

研究課題名（英文） Protective effect of SOD on reactive oxygen species-induced salivary gland dysfunction.

研究代表者

山田 浩之（YAMADA HIROYUKI）

鶴見大学・歯学部・講師

研究者番号：90267542

研究成果の概要（和文）：Superoxide dismutase (SOD)は、活性酸素種の一つであるスーパーオキシドを消去する抗酸化酵素である。本研究では、活性酸素種を介した唾液分泌機能障害における SOD の予防的効果について検討したところ、唾液腺の分泌障害にはスーパーオキシドを介した機序が推察され、SOD はスーパーオキシドを速やかに過酸化水素へ分解することにより唾液分泌機能障害に対し予防効果を有する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Superoxide dismutase (SOD) is an antioxidant enzyme that eliminates one of reactive oxygen species (ROS) of superoxide. In this study, we examined the ability of SOD to restore ROS-induced salivary gland dysfunction. Our results suggested that SOD may protect against salivary gland dysfunction induced by ROS, presumably by rapidly converting superoxide to hydrogen peroxide.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：活性酸素、SOD

1. 研究開始当初の背景

活性酸素種は、反応性が非常に速く生体の構造や機能の維持に重要な酵素、蛋白質、DNA、脂質に障害を与え、様々な疾患の発症や増悪に関与する事が報告されている。特に近年では型糖尿病や癌、さらには老化の要因としてもその関連が示唆されている。唾液腺においては、唾液の分泌障害を来すシェーグレン症候群患者唾液で酸化ストレスマーカーである 8-OHdG や HEL (hexanoyl-lysine) が健常者群に比べて有意に高値を示すことや、マウスの唾液腺に放射線照射する

ことにより活性酸素種を介した唾液分泌能の低下が示されているが、その詳細な分泌障害の機構や抗酸化剤の有効性については不明な点が多い。

放射線の被曝時には生体内の水からヒドロキシラジカルやスーパーオキシドが発生するが、このスーパーオキシドは細胞内の SOD により過酸化水素となり、続いて過酸化水素はカタラーゼやグルタチオンペルオキシダーゼにより水と酸素に分解され無毒化される。さらに放射線照射は一酸化窒素合成酵素を誘導し生体内の必須アミノ酸である

アルギニンから一酸化窒素の発生を促進するが、この一酸化窒素はスーパーオキシドと反応することにより強力な酸化力や細胞毒性をもつペルオキシナイトライトを生成することが報告されている。さらに放射線照射と同様に UVB 照射でも早期にスーパーオキシドと過酸化水素が生成され、それらに起因して遺伝子の不安定化（染色体異常）が生じるとの報告もあり、加えて上皮細胞や内皮細胞では放射線照射と同様に UVB 照射後に一酸化窒素とペルオキシナイトライトが発生することも明らかにされている。

スーパーオキシドはヒドロキシラジカルやペルオキシナイトライトなど強力な酸化力を有する活性酸素種発生のイニシエーターとなることが知られていることから、これらの連鎖を抑制するために SOD は生体に不可欠な酵素として重要な役割を担っている。一方、抗酸化剤として良く知られる N-アセチルシステイン (NAC) は、肝臓でのグルタチオンの合成を促進するシステイン誘導体であり、グルタチオンは、グルタチオン・ペルオキシターゼの構成要素で細胞障害性のある過酸化水素を水と酸素に分解することで無毒化させる強い抗酸化力を持つことが示されている。しかしながら、どの活性酸素種が唾液分泌障害に関与しているかは明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究では SOD や NAC を用いることで唾液分泌障害に関与する活性酸素種を明らかにし、加えて、これらの抗酸化剤の酸化ストレスにより障害された唾液分泌能に与える効果を検討する目的で放射線照射マウスならびに UVB 照射した培養唾液腺細胞を用いて解析を行った。

3. 研究の方法

(1) 動物

C57BL6J、6 週齢オスは日本クレアから購入し、実験に使用するまで specific pathogen-free 室にて飼育した。全ての動物実験は鶴見大学の実験動物規約に則り実施された。

(2) 放射線照射

マウスに pentobarbital (50 mg/kg) を静脈内投与しリニアック (MEVATRON 74 DX40 Toshiba Medical System, Tokyo) により 10MV の X 線を 15Gy 顎下腺局所に照射した。

(3) 抗酸化剤

レシチン化 SOD は LTT バイオファーマから提供され、5%マンニトールに溶解して用いた。レシチン化により血中半減期の延長と細胞膜親和性を増強することが報告されている。NAC (SIGMA) は pH7.0 に調整後、生

理食塩水で希釈して用いた。

(4) レシチン化 SOD および NAC の投与

レシチン化 SOD はその半減期を考慮し放射線照射の 4 時間前から静脈内投与を開始し、その翌日より毎日 1 回、1 mg/kg 及び 3 mg/kg を投与した。コントロール群に SOD の溶媒である 5%マンニトールを使用した。NAC の腹腔内投与は照射 1 時間前に開始し、その翌日より毎日 1 回 500 mg/kg 投与を行った。NAC のコントロール群は生理食塩水を使用した。

(5) 唾液分泌測定

SOD 投与群で唾液分泌量は照射 1 週間前、照射 1 週間後、照射 2 週間後に測定を行った。NAC 投与群では照射 1 週間前、照射 1 週間後、2 週間後に測定を行った。キシラジン (24 mg/kg) とケタミン (36 mg/kg) による麻酔導入を行ったのち pilocarpine (0.1 mg/kg) を腹腔内投与し唾液の分泌を誘導後、15 分間測定を行った。唾液はキャピラリー (DURAN) を使用し測定した。15 分間の総唾液量をマウスの体重で割り体重 1 g 当たりの唾液分泌量を算出した。

(6) 唾液腺上皮細胞の培養

ヒト唾液腺腫瘍細胞 HSY は 10% FCS (Gibco)、1000 U/ml penicillin (Gibco) を含む DMEM (SIGMA) で培養を行い、継代時は 0.25% trypsin EDTA で細胞を剥離後 10 cm プレートにて培養を行った。

(7) UVB 照射

UVB 照射は Benchtop UV transilluminator、LM-20E (2UV) (フナコシ株式会社) の 302 nm の波長を使用した。UVB の照射線量は UVMeter (Analog)、J-221、365 nm を用いて測定し、照射線量が 60 mJ/cm²、90 mJ/cm² となるように時間を算出し、細胞への照射を行った。

(8) FACS を用いた活性酸素種の測定

今回得られた in vivo における SOD と NAC の唾液腺局所における抗酸化作用の相違を確認するために、ヒト唾液腺上皮細胞である HSY 細胞を用いて放射線照射と同様の酸化ストレス作用を示す UVB 照射における活性酸素種に対する作用を蛍光プローブの酸化反応を指標に検討を行った。

細胞内の ROS 検出には fluorescent indicator dichlorofluorescein (CM-H2DCFDA, Molecular probes, inc) と Dihydroethidium (DHE, Fluka) を使用した。CM-H2DCFDA は細胞内において過酸化水素、ヒドロキシラジカル、ペルオキシナイトライトなどと反応することにより H2DCF が速やかに酸化されて DCF を生成し、強い蛍光を発する。また DHE は青色の蛍光プローブでスーパーオキシドと反応すると ethidium に変化し DNA に作用して細胞の核内で赤色の蛍光を発する。本検索ではこれら

の蛍光を測定することにより活性酸素種の同定を試みた。すなわちレシチン化 SOD (50 $\mu\text{g/ml}$) と NAC (10 mM) を 1 時間前処理した後、それぞれ 10 mM の濃度で蛍光プローブを 15 分間取り込ませ、UVB 照射は培地を取り除いた状態で行った。照射後は PBS で洗浄したのち、trypsin 処理後回収し解析を行った。解析は FACS Vantage SE flow cytometer と Cell Quest software (Becton Dickinson) を使用した。

(9) 統計解析

2 群間の有意差検定には Excel (Microsoft) の t 検定を使用した。p < 0.05 を有意差ありとした。結果は全て平均値 \pm 標準誤差 (mean \pm SE) で示した。

4. 研究成果

(1) 結果

唾液分泌障害への PC-SOD および NAC の比較検討

照射マウスの実験では、レシチン化 SOD 投与群では照射 2 週間後に 1 mg/kg 群で平均 14 $\mu\text{L/g}$ 、3 mg/kg 群で平均 15 $\mu\text{L/g}$ の値を示し、照射 1 週間前 (未照射時) の 1 mg/kg の平均 13.7 $\mu\text{L/g}$ 、3 mg/kg の平均 14 $\mu\text{L/g}$ に比べ明らかな唾液分泌の抑制は認められなかったのに対し、照射 2 週間後のコントロール群 (5%マンニトール) では平均 9.8 $\mu\text{L/g}$ の値を示し、未照射群の平均 13.8 $\mu\text{L/g}$ と比べ有意な唾液分泌量の低下が認められた。照射 2 週間後におけるコントロール群とレシチン化 SOD 投与群の唾液分泌量に有意な差が認められたことから、レシチン化 SOD の放射線照射によって生じた酸化ストレスに対する防御の効果が示された (図 1)。

一方、NAC 投与の検討では放射線照射 2 週間後にはコントロール群で平均 10.7 $\mu\text{L/g}$ 、NAC 投与群は平均 11.4 $\mu\text{L/g}$ の値を示し、照射 1 週間前の平均 14.2 $\mu\text{L/g}$ 、平均 14.7 $\mu\text{L/g}$ に比べコントロール群、NAC 投与群ともに有意な減少が認められたことから、NAC による唾液分泌量に与える効果は認められなかった (図 2)。

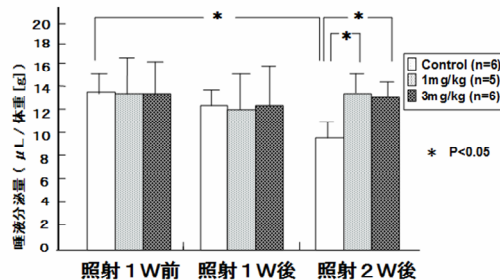


図 1 レシチン化 SOD 投与による放射線照射マウスの唾液分泌量の変化

唾液量は 15 分間の総唾液量をマウスの体重で補正し、体重 1 g 当たりの唾液分泌量で示した。6 週齢の B6 マウスに放射線照射 1 週間前より 5%マンニトール、レシチン化 SOD 1 mg/kg、3 mg/kg の投与を開始した。唾液は照射 1 週間前、1 週間後、2 週間後の 3 回測定を行った。* p < 0.05 を有意差ありとした。結果は平均値 \pm 標準誤差 (mean \pm SE) で示した。

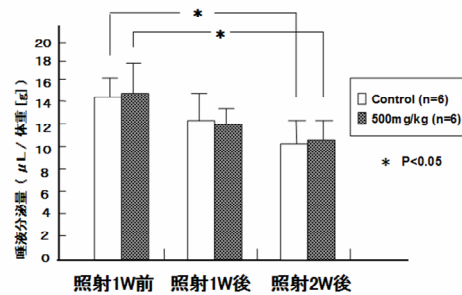


図 2 NAC 投与における放射線照射マウスの唾液分泌量の変化

唾液量は 15 分間の総唾液量をマウスの体重で補正し、体重 1 g 当たりの唾液分泌量で示した。6 週齢の B6 マウスに放射線照射 1 週間前より生理食塩水、NAC 500 mg/kg の投与を開始した。唾液は照射 1 週間前、1 週間後、2 週間後の 3 回測定を行った。* p < 0.05 を有意差ありとした。結果は平均値 \pm 標準誤差 (mean \pm SE) で示した。

FACS flow cytometer を用いたレシチン化 SOD および NAC の抗酸化作用の確認

スーパーオキシドの指標となる DHE を用いて UVB 照射 20 分後の細胞内のスーパーオキシドの生成量を解析した。UVB を照射した HSY 細胞では平均蛍光強度 (MFI, mean fluorescence intensity) は 18 まで増大し、レシチン化 SOD の添加により MFI は 10 と低値になり、スーパーオキシドの減少が認められた。このことからレシチン化 SOD は UVB 照射時に細胞内で発生するスーパーオキシドを速やかに消去している可能性が示された。一方、NAC の添加では UVB 照射時に発生するスーパーオキシドの MFI は 18 であり、コントロールの MFI の 17 に比べほとんど変化がないことが確認され、NAC によるスーパーオキシドの消去作用は認められなかった (図 3)。

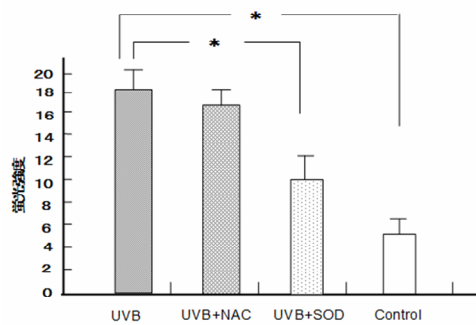


図3 UVB照射におけるHSY細胞内のsuper oxideの発現の検討

細胞内のROS検出にはDHEを使用した。DHEは青色の蛍光プローブでスーパーオキシドと反応するとethidiumに変化しDNAに作用して細胞の核内で赤色の蛍光を発する。レシチン化SODの添加は150 U/ml、NACの添加は10 mMの濃度で1時間の前処理を行った。DHEは10 mMの濃度で15分間細胞に取り込ませた。UVBの照射線量は90 mJ/cm²である。*p < 0.05を有意差ありとした。結果は平均値±標準誤差(mean ± SE)で示した。

一方、過酸化水素、ヒドロキシラジカル、ペルオキシナイトライトなどのスーパーオキシド以外の活性酸素種を検出するCM-H2DCFDAを用いてUVB照射20分後の細胞内の活性酸素種の産生を解析した結果、UVB未照射のMFIが5.5を示したのに対し、UVB照射でのMFIは12であり、レシチン化SODの前処理ではMFIは10であったことから、それぞれに増大傾向がみられた。またNACの前処理ではMFIは4を示し、コントロールでのMFIの4.5と同程度のレベルまで低下がみられた(図4)。UVB照射におけるHSY細胞の活性酸素種の発生についての報告はこれまでにないことから、唾液腺細胞に与える障害作用およびレシチン化SODの効果を評価する目的で培養唾液腺細胞を用いて解析を行ったところ、レシチン化SODはUVB照射によって発生したスーパーオキシドのみを消去し過酸化水素などの他の活性酸素種に対し効果を発揮せず、一方NACはスーパーオキシドを消去せず、過酸化水素などを消去する結果が得られた。

以上のin vivo、in vitroの検討から放射線やUVB照射により生成されるスーパーオキシドが唾液を障害し、SODはそのスーパーオキシドを速やかに消去することで、これらの照射による分泌障害に対し効果を発揮したものと推察された。

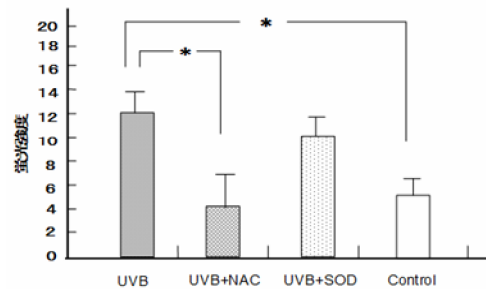


図4 UVB照射におけるHSY細胞内の活性酸素種の発現の検討

細胞内のROS検出にはCM-H2DCFDAを使用した。CM-H2DCFDAは細胞内において過酸化水素、ヒドロキシラジカル、ペルオキシナイトライトなどと反応することによりH2DCFが酸化されてDCFを生成し、強い蛍光を発する。レシチン化SODの添加は150 U/ml、NACの添加は10 mMの濃度で1時間の前処理を行った。CM-H2DCFDAは10 mMの濃度で15分間細胞に取り込ませた。UVBの照射線量は90 mJ/cm²である。*p < 0.05を有意差ありとした。結果は平均値±標準誤差(mean ± SE)で示した。

(2) 考察

唾液分泌不全の原因は、臓器特異的自己免疫疾患であるシェーグレン症候群(SS)に代表される腺組織の器質的な傷害の他に薬剤の副作用、環境汚染や老化などが考えられている。一方、8-OHdGやHELなどの酸化ストレスマーカーがSS患者の唾液中では高値であることや、マウスの唾液腺に放射線照射することにより誘導される唾液分泌能の低下の成立機序に活性酸素・フリーラジカルが起因する事が推測されていることなどから、様々な環境要因から生じたこれらの酸化ストレスによる唾液腺の機能低下が指摘されている。我々の検討においてもマウス唾液腺への放射線照射による酸化ストレスを介して唾液分泌障害が確認されたことから、今回確立した実験モデルの有用性が示された。

放射線被曝や様々な環境要因により発生する活性酸素種のなかでもスーパーオキシドは生体内のSODにより過酸化水素となり、この過酸化水素はカタラーゼやグルタチオンペルオキシダーゼにより水と酸素に分解され無毒化されるが、同様な要因でも、生体内のアルギニンから一酸化窒素が発生し、これがスーパーオキシドと反応することにより強力な酸化力をもつペルオキシナイトライトを生成されることが示されている。今回

の検討では、放射線照射による唾液分泌の機能障害はレシチン化 SOD の作用により唾液分泌の低下に対し防御的な効果を示し、同じく抗酸化剤の NAC では効果は認められなかった。これは、SOD と NAC により消去される活性酸素種の違いによる効果の差であると考えられた。SOD はスーパーオキシドを速やかに過酸化水素へ代謝するが、NAC はグルタチオンの合成を促進することにより過酸化水素を水と酸素へ分解することにより抗酸化作用を示すことが知られている。我々の今回の検討からも SOD は UVB 照射により発生するスーパーオキシドの消去作用を検出できたが、NAC では変化が認められなかったことから、レシチン化 SOD はスーパーオキシドを消去することにより放射線照射で発生した一酸化窒素とスーパーオキシドの反応を減少させて、これに伴いペルオキシナイトライドの生成を結果的に抑制することで唾液分泌障害に対し防御的に作用したものと推察された。

アクアポリン(AQP)は細胞膜の水透過性の調節に働く膜蛋白であり唾液腺には AQP5 が局在することが報告されている。神経伝達物質のアセチルコリンはムスカリン M3 受容体と結合し、G 蛋白の活性化、ホスホリパーゼ C の活性化を経て IP3 の産生を誘導する。それにより連鎖的に Ca^{2+} 、 Cl^{-} 、 Na^{+} などのイオンの移動がおり AQP5 を介した水分移動が生じることが知られている。AQP5 ノックアウトマウスではムスカリン M3 受容体アゴニスト刺激による唾液分泌量の減少量は 60%以上であることが報告されており、AQP5 は水分分泌において重要な役割を担っていると考えられている。一方、ムスカリン M3 受容体にアゴニストが結合することで AQP5 の発現量が増加することが知られているが、一酸化窒素消去剤 (carboxy-PTIO) はその発現量を抑制することから、一酸化窒素は AQP5 を介した水分分泌におけるシグナル伝達を活性化している可能性が示唆されている。しかしながら、スーパーオキシドと一酸化窒素が反応することにより細胞毒性が強いペルオキシナイトライドが生成されることから、carboxy-PTIO は一酸化窒素を消去することにより、スーパーオキシドとの反応を減少させ、それに連鎖するペルオキシナイトライド生成の抑制が水分分泌の維持に影響を与えた可能性も考えられる。事実、Takeda らの報告では、放射線照射マウスで一酸化窒素阻害薬である L-NMMA の投与により唾液分泌量低下が改善されたとしており、この報告では唾液分泌障害に一酸化窒素の唾液分泌障害への関与を示唆しているが、一酸化窒素と、連鎖的に発生する細胞毒性の強いペルオキシナイトライドのどちらが唾液分泌障害に影響を与えているのかは明らか

かにされていない。一方、我々の検討ではレシチン化 SOD を投与することにより唾液分泌障害が抑制されたが、これは一酸化窒素化と反応するスーパーオキシドの減少により産生されるペルオキシナイトライドが連鎖して減少したことに起因する可能性が考えられた。すなわち、一酸化窒素とスーパーオキシドとの反応の低下によりペルオキシナイトライドの生成抑制が生じ唾液分泌障害に防御的に働いたものと考えられる。また今回の検討では過酸化水素や過酸化水素からフェントン反応を介して連鎖的に発生するヒドロキシラジカル、および放射線照射によって直接発生するヒドロキシラジカルなどが唾液腺に障害を与える可能性も考えられたが、NAC の投与の実験で過酸化水素や連鎖的に発生するヒドロキシラジカルの生成量を抑制させ細胞毒性を減弱させても唾液分泌量の減少抑制がみられなかった。また Takeda らの報告でも放射線照射したマウスへの L-NMMA の投与のみで唾液分泌量の減少抑制がみられていることから、これら報告と自験例からの検討から、唾液腺の分泌障害に過酸化水素およびヒドロキシラジカルは関与しない可能性が示唆された。

抗酸化酵素活性と動物種の寿命との関係を調べた研究では、比代謝率(消費熱量/単位体重・単位時間)当たりの SOD 活性が動物種によって異なり、寿命に比例していることが米国国立老年学研究センターにより報告されている。また、最近の報告ではショウジョウバエに SOD を過剰発現させることにより寿命の延長が報告されており、一方でこの SOD 遺伝子を欠損させると老化が促進することも示されている。これらのことは加齢に伴って発生する酸化ストレスが寿命の長さに関与している可能性を示すと同時に、生体内における SOD をはじめとする抗酸化酵素の活性が酸化ストレスによる障害と密接な関連があることを示唆しており SOD 活性の亢進やその投与が病態の改善や老化予防に重要な役割を担うとされている。

現在までに脊髄損傷によっておこる運動機能障害の神経保護作用因子の産生誘導や、肺線維症における線維形成の改善など、生体の酸化反応と抗酸化反応の不均衡に起因すると考えられている疾患に対しレシチン化 SOD の投与での改善の試みがいくつか報告されており、レシチン化 SOD の治療薬としての作用が期待されている。

今回のレシチン化 SOD と NAC の投与の検討ではレシチン化 SOD は酸化ストレスによる外分泌機能障害に予防的効果を有する可能性が示唆された。また、腺障害において SOD の投与によるスーパーオキシドの消去がスーパーオキシドと一酸化窒素の反応を抑制し、それにより連鎖的に生成されたペル

オキシナイトライトの減少を介して唾液分泌促進に影響を及ぼした可能性が示唆された。

唾液の分泌障害は QOL の低下だけでなく様々な機能障害を招き、う蝕、歯周病、上部消化管障害、誤嚥性肺炎、摂食嚥下障害、感染症などの一因となる事が知られていることから唾液分泌機能障害に対する SOD による薬剤の開発は極めて意義のある事と考えられ、今後その詳細な機序の解明を行う予定である。

(3) 今後の検討課題

レシチン化 SOD 添加によるペルオキシナイトライトに与える影響を間接的に明らかにする目的で、SOD 添加時と未添加時における UVB 照射時の HSY 細胞での一酸化窒素の生成量の変化の解析を行う。

in vivo において酸化ストレスによる唾液分泌量の減少の可能性が示唆されていることから、in vitro での唾液分泌量の客観的評価法（アミラーゼ測定、カルシウム測定）による UVB 照射時および、レシチン化 SOD 添加時でのこれらの評価の検討を行う。

レシチン化 SOD の効果を更に検討する目的から、レシチン化 SOD の放射線照射前の投与だけの効果を確認し、照射後の投与を行わないことによる予防効果の検討を行う。

レシチン化 SOD の投与により細胞内、またはミトコンドリア内に到達するのか否かの検討を行う。

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1件)

Tai Y, Inoue H, Sakurai T, Yamada H, Morito M, Ide F, Mishima K, Saito I,
Protective effect of lecithinized SOD on reactive oxygen species-induced xerostomia, Radiation Research、査読有、172 巻、2009、331-338

[学会発表](計2件)

田井良憲
活性酸素種を介した唾液分泌障害機序の解析と SOD による効果の検討
第9回日本抗加齢医学会総会
2009.5.28 東京

田井良憲
活性酸素種を介した唾液分泌障害機序の解析と SOD による効果の検討
第8回日本抗加齢医学会総会
2008.6.6 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 浩之 (YAMADA HIROYUKI)
鶴見大学・歯学部・講師
研究者番号：90267542

(2) 研究分担者

斎藤 一郎 (SAITO ICHIRO)
鶴見大学・歯学部・教授
研究者番号：60147634
美島 健二 (MISHIMA KENJI)
鶴見大学・歯学部・准教授
研究者番号：50275343
井上 裕子 (INOUE HIROKO)
鶴見大学・歯学部・講師
研究者番号：50367306