

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18697

研究課題名（和文）マトリックスメタロプロテアーゼに着目したドライマウス治療の開発研究

研究課題名（英文）Development research for dry mouth treatment focusing on matrix metalloproteinase

研究代表者

小野 信二（ONO, Shinji）

徳島大学・病院・医員

研究者番号：60770576

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：ドライマウス病態形成におけるMatrix metalloproteinase(MMP)-9過剰発現の分子機構を解明し、病態に対応したドライマウス治療の確立を目指すことを目的として研究開発を行った。唾液腺細胞株のうち導管細胞株において、IFN- $\gamma$  刺激によりMMP-9ならびにケモカインCXCL10の発現亢進を認めた。MMP-9阻害薬を共培養したところ、IFN- $\gamma$  誘導性CXCL10発現はmRNA、蛋白質レベルで有意に抑制されることが明らかになった。ドライマウスMMP-9過剰発現の抑制によるCXCL10発現の低下により炎症性細胞のリクルートを制御でき、唾液腺組織の安定性につながる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

加齢や疾病により唾液分泌が低下した病態をドライマウスという。唾液は、食べる、飲み込む、話す、潤すなど円滑な口腔機能に欠かせないもので、ドライマウスは生活の質を著しく低下させる一因となる。本研究では、ドライマウス患者の唾液中に過剰分泌されているMMP-9に着目し、唾液腺細胞を用いてMMP-9阻害により唾液腺導管細胞が産生するケモカインであるCXCL10の発現が抑制されることを明らかにした。この結果は、唾液腺細胞の安定化につながりドライマウスの治療法になりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to elucidate the molecular mechanism of MMP-9 overexpression in the pathogenesis of dry mouth, and to establish a dry mouth treatment corresponding to the etiology. IFN- $\gamma$  stimulation upregulated the expression of MMP-9 and the chemokine CXCL10 in salivary gland cell lines. Co-culture with an MMP-9 inhibitor revealed that IFN- $\gamma$ -induced CXCL10 expression was significantly suppressed at the mRNA and protein levels. It was suggested that suppression of MMP-9 overexpression in patients with dry mouth could reduce CXCL10 expression and control the recruitment of inflammatory cells, leading to the stability of salivary gland tissue.

研究分野：口腔内科学

キーワード：ドライマウス MMP-9 CXCL10

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

食物を咀嚼・嚥下するためには、諸器官の運動機能とともに唾液の存在が重要である。加齢や指定難病シェーグレン症候群 (Sjögren's syndrome, 以下 SS) により唾液腺組織が破壊され唾液分泌が低下した場合、咀嚼・嚥下機能は著しく低下し、生活の質を低下させる一因となる。ドライマウスの原因として唾液腺腺房構造の破壊が挙げられるが、その詳細な分子メカニズムは解明されていない。

研究代表者らは加齢ドライマウス患者および SS ドライマウス患者の唾液中に、蛋白分解酵素である Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) が有意に増加していることを発見した。さらに、SS 患者口唇腺を用いた DNA マイクロアレイ解析で、ケモカイン CXCL10 と MMP-9 の過剰発現を確認した。ドライマウス患者において MMP-9 が過剰発現となるメカニズムや MMP-9 と CXCL10 との関連性は解明されていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、ドライマウス患者口唇腺で MMP-9 が過剰発現となるメカニズムおよび MMP-9 と CXCL10 との関連性に関する分子機構を解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

当科を受診した SS 患者口唇腺における MMP-9 と CXCL10 の局在を蛍光免疫組織化学染色法にて検索した。細胞は当科で樹立した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) を用いた。両細胞の培養上清に種々のサイトカイン (IFN- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-1) を添加し、MMP-9 mRNA 発現を RT-qPCR にて検索した。NS-SV-DC 細胞培養上清に IFN- $\alpha$  単独あるいは IFN- $\alpha$  と MMP-9 インヒビターを添加し、IFN- $\alpha$  誘導性 CXCL10 mRNA および蛋白質発現に及ぼす MMP-9 の影響を解析した。MMP-9 インヒビターが IFN- $\alpha$  レセプター (IFNGR1、IFNGR2) 発現に及ぼす影響を RT-PCR にて確認した。さらに、MMP-9 インヒビターが IFN- $\alpha$  誘導性 CXCL10 発現のシグナル伝達経路に及ぼす影響を Western blot 法にて解析した。統計学的分析は、Mann-Whitney U 検定を用いた。

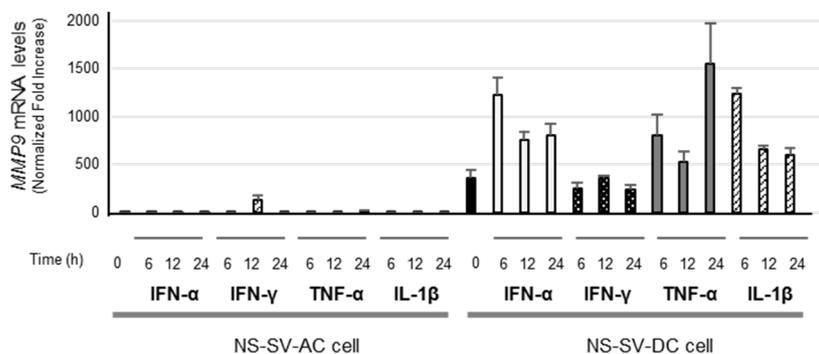
### 4. 研究成果

#### (1) SS 患者口唇腺における MMP-9 と CXCL10 の局在

SS 患者口唇腺の拡張した導管上皮に CXCL10 と MMP-9 は強発現していた。

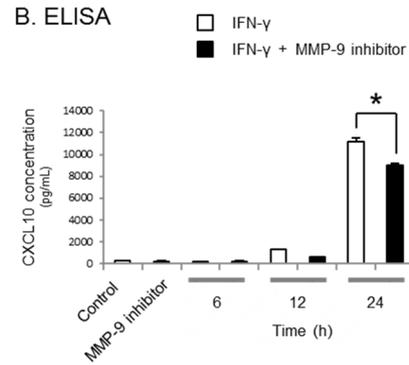
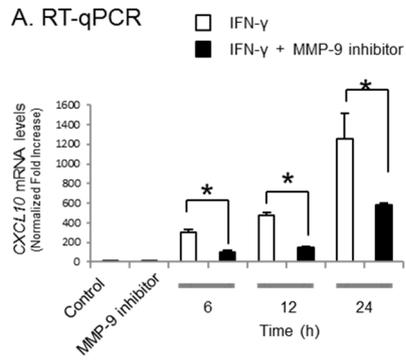
#### (2) 正常ヒト唾液腺細胞株においてサイトカインが MMP-9 mRNA 発現に及ぼす影響

MMP-9 mRNA は、無刺激の状態では NS-SV-AC 細胞に比較して NS-SV-DC 細胞で高発現を示した。サイトカイン刺激を加えたところ、NS-SV-DC 細胞では IFN- $\alpha$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-1 にて MMP-9 mRNA 発現が著明に亢進した。



#### (3) MMP-9 インヒビターが IFN- $\alpha$ 誘導性 CXCL10 発現に及ぼす影響

NS-SV-DC 細胞に IFN- $\alpha$  を添加すると、CXCL10 mRNA および蛋白質発現は著明に亢進するが、MMP-9 インヒビターを添加すると IFN- $\alpha$  誘導性 CXCL10 mRNA および蛋白質発現は有意に抑制された。

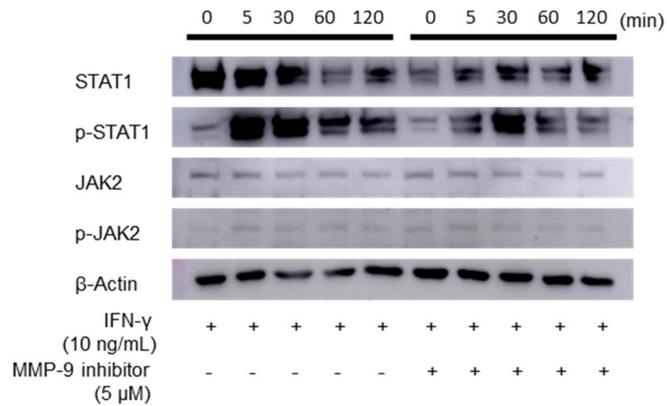


( 4 ) MMP-9 インヒビターが IFN- レセプター ( IFNGR1、 IFNGR2 ) 発現に及ぼす影響

RT-PCR での mRNA 発現解析の結果、MMP-9 インヒビターは IFN- レセプター ( IFNGR1、 IFNGR2 ) 発現に影響を及ぼさなかった。

( 5 ) MMP-9 インヒビターが IFN- の JAK/STAT シグナル伝達経路に及ぼす影響

MMP-9 インヒビターは NS-SV-DC 細胞の IFN- レセプター発現には影響を及ぼさなかった。IFN- は NS-SV-DC 細胞において JAK2/STAT1 シグナルを介して CXCL10 の転写を開始するが、MMP-9 インヒビターを添加すると IFN- による STAT1 のリン酸化が抑制され、これにより CXCL10 の mRNA および蛋白質の発現が低下すると考えられた。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Keiko, Yamanoi Tomoko, Kani Koichi, Ono Shinji, Momota Yukihiro, Azuma Masayuki	4. 巻 44
2. 論文標題 Inhibition of JAK-STAT Signaling by Baricitinib Reduces Interferon- $\gamma$ -Induced CXCL10 Production in Human Salivary Gland Ductal Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Inflammation	6. 最初と最後の頁 206 ~ 216
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10753-020-01322-w	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 青田桂子, 西田真理, 大山博行, 小野信二, 益田奈緒, 浪花耕平, 高野栄之, 可児耕一, 桃田幸弘, 松本文博
2. 発表標題 骨修飾薬投与前に歯科介入をおこなった患者の薬剤関連顎骨壊死発症に関する調査
3. 学会等名 第67回日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------