

機関番号：16101

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791790

研究課題名 (和文) カテプシン阻害剤を用いたドライマウス・I 型糖尿病の治療学的研究

研究課題名 (英文) Therapeutic analysis of xerostomia and type I diabetes using cathepsin inhibitor

研究代表者

山田 安希子 (YAMADA AKIKO)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：70452646

研究成果の概要 (和文)：

シェーグレン症候群などの自己免疫疾患や糖尿病は、ドライマウスの原因疾患であるが、根本的な治療法は確立されていない。本研究では、サイクロフォスファミドの投与により I 型糖尿病を誘導した NOD マウスにカテプシン L 阻害剤を投与した結果、CD8 陽性 T 細胞の細胞傷害活性の抑制を介して、病態が抑制されることを明らかにした。したがって、カテプシン L の阻害は I 型糖尿病の有効な治療法となり、ドライマウスの改善につながる可能性が示された。

研究成果の概要 (英文)：

Xerostomia is caused by several diseases such as Sjögren's syndrome and diabetes mellitus. Symptomatic therapy is mainly applied for xerostomia. In this study, it was found that specific inhibition of cathepsin L affords strong protection from cyclophosphamide-induced insulinitis and diabetes of NOD mice via inhibiting cytotoxic activity of CD8⁺ T cell. Our results showed inhibition of cathepsin L as a powerful therapeutic strategy for autoimmune diabetes and xerostomia.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：自己免疫性疾患、I 型糖尿病、ドライマウス、カテプシン

1. 研究開始当初の背景

(1) ①ドライマウスは舌痛症、口臭、歯周病、カリエスなどの誘因となることが知られているが、現在のところ、対症療法しかなされていない。

②ドライマウスの主な原因疾患として、シェーグレン症候群や糖尿病が挙げられる。

(2) ①カテプシンは抗原提示に関わっていることが知られていることから、自己免疫疾

患発症との関係が注目されている。

②当研究室はこれまでにカテプシン S がシェーグレン症候群の発症に関わっていることを明らかにした。

(3) I 型糖尿病の疾患モデルマウスである NOD (non-obese diabetic) マウスにおいてカテプシン L 遺伝子を欠損すると、胸腺における T 細胞の分化に異常が見られ、自己免疫病態が抑制されたことから、カテプシンが中

枢性トレランスの維持に重要であることが示されたが、末梢の免疫応答におけるカテプシンの役割はまだ明らかでない。

2. 研究の目的

NOD マウスを用いて末梢免疫応答におけるカテプシンの詳細な機能を解明することにより、I 型糖尿病に対するカテプシンを介した新規治療法の開発を目指し、ドライマウスの改善、さらにはQOL (Quality of Life) の向上を行うことが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) カテプシンの発現部位の詳細な解析

NOD マウスおよび正常マウスにおけるカテプシンの mRNA およびタンパク質の発現を、臓器別および各種免疫細胞別にリアルタイム PCR 法、ウェスタンブロット法、共焦点顕微鏡解析などにより詳細に解析した。

(2) NOD マウスを用いた I 型糖尿病発症機序におけるカテプシンの関連性の検索

NOD マウスから分離した免疫細胞に対するカテプシンの作用を明らかにするため、各種特異的カテプシン阻害剤を用い、免疫細胞のサイトカイン産生、増殖反応、活性化などの機能的解析を行った。解析に関しては、フローサイトメトリー、生化学的手法および免疫学的手法など多方面から検討を行った。

(3) カテプシンを介した自己免疫疾患発症の分子メカニズムの解明

カテプシン活性を抑制した場合のシグナル分子の活性化を生化学的あるいは免疫学的手法を駆使して検討し、カテプシンを介した免疫細胞活性化経路の全容解明を目指した解析を行った。

(4) カテプシン関連試薬を用いた I 型糖尿病に対する治療学的検討

サイクロフォスマイド (CY) 投与により糖尿病を誘導した NOD マウスに対して、カテプシン阻害剤やカテプシン siRNA の投与を行い、病態に対する効果を検討した。糖尿病の治療効果については尿糖および血糖値の測定を行った。

4. 研究成果

(1) NOD マウスに対し、CY 投与により糖尿病を誘導する際に、各カ

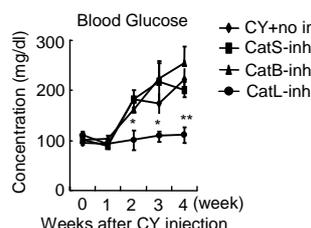


図1 I型糖尿病に対するカテプシンL阻害剤の治療効果

テプシン阻害剤 (カテプシン L、S、B) を投与した結果、カテプシンL阻害剤投与により病態の抑制が認められた (図1)。

(2) ①病態抑制のメカニズムを解明するため、CY 投与により糖尿病を誘導した NOD マウスを用いて、膵周囲リンパ節の各種免疫細胞に対するカテプシンL阻害剤の作用を検討した結果、CD8 陽性 T 細胞において、カテプシンL阻害剤の投与により活性化の抑制が認められた。

②共焦点顕微鏡を用いた解析により、CY 投与により糖尿病を誘導した NOD マウスのランゲルハンス島では、発症していない NOD マウスと比較して、CD8 陽性 T 細胞の浸潤の増加が顕著であることが示された (図2)。

これらのことから、カテプシンL阻害剤が、末梢 CD8 陽性 T 細胞を標的としている可能性が示された。

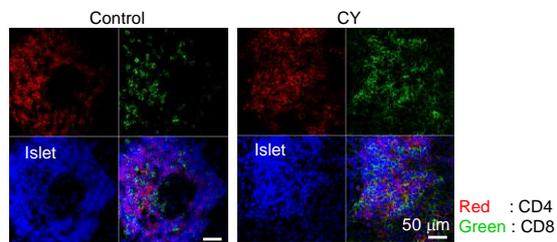


図2 ランゲルハンス島に浸潤しているリンパ球について、共焦点顕微鏡を用いた解析

(3) *in vitro*

で、末梢 CD8 陽性 T 細胞の活性化に伴いカテプシン L 活性の増強が認められることを確認した。さらに、CD8

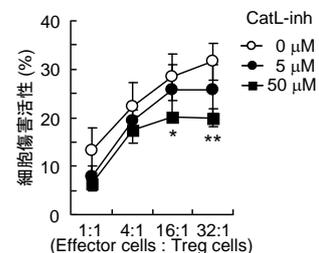


図3 CD8陽性T細胞の細胞傷害活性に対するカテプシンL阻害剤の作用

細胞傷害活性に対するカテプシンL阻害剤の効果を検討した結果、カテプシンL阻害剤は CD8 陽性 T 細胞の細胞障害活性を抑制することが示された (図3)。

(4) CY 投与 NOD

マウスに対し、small interfering RNA を用いてカテプシン L をノックダウンした場合においても、病態抑制が認められた (図4)。

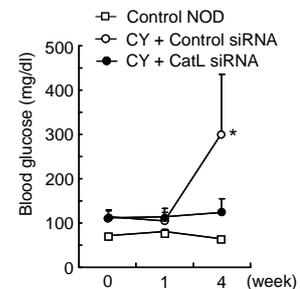


図4 カテプシンL遺伝子をノックダウンした場合のI型糖尿病に対する治療効果

(5) NOD マウスは糖尿病の発症について、個体差が大きいことが知られていることから、糖尿病を発症した群と未発症群とで、末梢血液中のCD8 陽性 T 細胞におけるカテプシン L の mRNA レベルを解析した結果、発症群

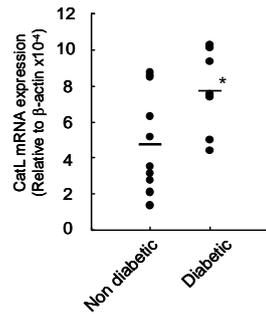


図5 NODマウスの末梢血液中CD8陽性T細胞におけるカテプシンLの発現

で有意に高い発現が認められた (図 5)。したがって、この結果からも、I 型糖尿病の発症にカテプシン L が関与していることが明らかにされた。

(6) 上記 (1) ~ (5) の結果より、カテプシン L は I 型糖尿病の発症に関係していることが明らかにされ、カテプシン L を特異的に阻害することは I 型糖尿病の有効な治療法となり、さらにはドライマウスの改善につながる可能性が示された。

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 8 件)

1. Yamada A, Ishimaru N, Arakaki R, Katunuma N, Hayashi Y: Cathepsin L inhibition prevents murine autoimmune diabetes via suppression of CD8⁺ T cell activity. *PLoS ONE*. 5:e12894, 2010. (査読有)
2. 山本武範, 山田安希子, 篠原康雄: プロテオミクスで探るミトコンドリアからのシトクロム c 漏出機構 *生物物理* 50:124-125. 2010. (review) (査読有)
3. Ishimaru N, Nitta T, Arakaki R, Yamada A, Lipp M, Takahama Y, Hayashi Y.: In situ patrolling of regulatory T cells is essential for protecting autoimmune exocrinopathy. *PLoS ONE*. 5:e8588. 2010. (査読有)
4. 石丸直澄, 小橋真之, 山田安希子, 新垣理恵子, 林良夫: 新生児におけるダイオキシンへの曝露と自己免疫病の発生 *臨床免疫・アレルギー科* 53:92-96. 2010. (review) (査読無し)

5. Arakaki R, Nagaoka A, Ishimaru N, Yamada A, Yoshida S, Hayashi Y.: Role of plasmacytoid dendritic cells for aberrant class II expression in exocrine glands from estrogen-deficient mice of healthy background. *Am J Pathol*. 174:1715-24. 2009. (査読有)

6. Yamada A, Yamamoto T, Yoshimura Y, Gouda S, Kawashima S, Yamazaki N, Yamashita K, Kataoka M, Nagata T, Terada H, Pfeiffer DR, Shinohara Y.: Ca²⁺-induced permeability transition can be observed even in yeast mitochondria under optimized experimental conditions. *Biochim Biophys Acta*. 1787:1486-91. 2009. (査読有)

7. Yamada A, Yamamoto T, Yamazaki N, Yamashita K, Kataoka M, Nagata T, Terada H, Shinohara Y.: Differential permeabilization effects of Ca²⁺ and valinomycin on the inner and outer mitochondrial membranes as revealed by proteomics analysis of proteins released from mitochondria. *Mol Cell Proteomics*. 8:1265-77. 2009. (査読有)

8. Ishimaru N, Takagi A, Kohashi M, Yamada A, Arakaki R, Kanno J, Hayashi Y.: Neonatal exposure to low-dose 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin causes autoimmunity due to the disruption of T cell tolerance. *J Immunol*. 182:6576-86. 2009. (査読有)

[学会発表] (計 15 件)

- 1, 山田安希子, I型糖尿病モデルマウスにおけるカテプシンLの特異的阻害を介した治療戦略、第9回口腔医科学フロンティア、2011年3月5日、九州大学歯学部本館1階 (福岡市)
- 2, 石丸 直澄、Critical Signaling Pathway via CCR7 of Foxp3+CD25+CD4+ Regulatory T Cells for the Egress from Lymph Nodes、第 14 回国際免疫学会議、2010 年 8 月 26 日、神戸ポートピアホテル、神戸国際展示場 (神戸市)
- 3, 大浦 律子、Rapid T cell death via interaction with CD11b+ macrophages in Fas-deficient host、第 14 回国際免疫学会議、2010 年 8 月 24 日、神戸ポートピアホテル、神戸国際展示場 (神戸市)
- 4, 山本武範、Ca²⁺によって酵母ミトコンドリアに誘起される透過性遷移の解析、第 2 回日

本生物物理学会 中国四国支部大会、2010年
5月8日、愛媛

5, 山田安希子、I型糖尿病モデルマウスにお
けるカテプシンL特異的阻害剤を用いた治療
効果の検討、第99回日本病理学会総会、2010
年4月27日～29日、東京

6, 石丸直澄、シェーグレン症候群における調
節性T細胞の役割、第99回日本病理学会総
会、2010年4月27日～29日、東京

7, 新垣理恵子、エストロゲン欠乏依存的に唾
液腺に誘導される膵ラ氏島アミロイドポリ
ペプチドの機能とその意義、第99回日本病
理学会総会、2010年4月27日～29日、東京

8, 松本一真、マウス関節炎モデル樹状細胞の
RANKL/FAS シグナルを介した免疫抑制効果、
第99回日本病理学会総会、2010年4月27日
～29日、東京

9, Yamada A、 Therapeutic Analysis by
Selective Inhibition of Cathepsin L for
Autoimmune Diabetes in NOD Mice、第39回
日本免疫学会総会・学術集会、2009年12月
2日～4日、大阪

10, Oura R、 Immune Regulation by
Macrophages through cross-talk between
Fas and NF- κ B Signaling、第39回日本免疫
学会総会・学術集会、2009年12月2日～4
日、大阪

11, Ishimaru N、 In situ patrolling of
regulatory T cells is essential for
protecting organ-specific autoimmunity、
第39回日本免疫学会総会・学術集会、2009
年12月2日～4日、大阪

12, Kohashi M、 Neonatal exposure to
low-dose
2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin(TCD
D)causes autoimmunity due to the
disruption of Tcell tolerance、第39回日
本免疫学会総会・学術集会、2009年12月2
日～4日、大阪

13, 山田安希子、I型糖尿病マウスにおける
カテプシンLを介した治療学的解析、第98
回日本病理学会総会、2009年5月1日～3日、
京都

14, 石丸直澄、Local Tolerance の破綻による
臓器特異的自己免疫疾患の発症機序、第98
回日本病理学会総会、2009年5月1日～3日、
京都

15, 新垣理恵子、エストロゲン欠乏によって
唾液腺に誘導される樹状細胞の同定とその
機能、第98回日本病理学会総会、2009年5
月2009年5月1日～3日、京都

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 安希子 (YAMADA AKIKO)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研
究部・助教

研究者番号：70452646

(2) 研究分担者

なし

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし

研究者番号：