

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年3月31日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592082

研究課題名（和文）緑茶カテキンによるシェーグレン症候群の新たな治療法の開発についての検討

研究課題名（英文）Study on development of a novel remedy using green tea catechin for Sjögren's syndrome

研究代表者 齋藤 恵一 (SAITO KEIICHI)
 東北大学・大学院歯学研究科・助教
 研究者番号：00178477

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-Fas^{lpr}* マウスに緑茶カテキン（epigallocatechin gallate）を8週齢から16週齢に渡り投与して、自己免疫唾液腺炎に対する効果を調べたところ、組織破壊のある唾液腺炎の割合が非投与マウスより70%減少していた。緑茶カテキンを投与したマウスでは、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 の発現が顕著に認められ、これらの分子が、緑茶カテキンによる唾液腺組織の保護作用に関与しているものと考えられた。

研究成果の概要（英文）：We administered epigallocatechin gallate (EGCG) to *MRL-Fas^{lpr}* mice from age of 8 to 16 weeks and examined suppressive effects of EGCG on autoimmune sialadenitis. Our results demonstrated that the rate of sialadenitis accompanied with tissue destruction decreased in EGCG-administered mice by 70% relative to EGCG-non-administered mice. The protective actions of EGCG were ascribed to expression of heme oxygenase-1 and Bcl-2 which was enhanced by EGCG.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
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・病態科学系歯学・歯学放射線学

キーワード：緑茶カテキン, シェーグレン症候群

1. 研究開始当初の背景

活性酸素（ROS）は貪食細胞、リンパ球、心筋細胞、線維芽細胞、唾液腺細胞等の様々な細胞で生成され、免疫反応などの生体内の生理作用を制御していることが知られてい

る。Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidases は ROS 生成において重要な役割を果たしており、とくに NADPH oxidase (NOX) 2（または gp91phox）は生体に侵入した細菌の貪食ならびにそれに続く免疫反応による生体防御の際には不可欠な酵素として作用する。gp91phox が活性化す

る場合には、6つの subunit (p22phox, p47phox, p67phox, p40phox, Rac1)と細胞膜上で結合して、1つの大きな分子を形成する。加えて、gp91phox は2つの heme 分子を中心部位に持ち、また flavin adenine dinucleotide (FAD)と NADPH に対する結合部位を COOH 末端部位に有する。活性化した p91phox 複合分子は NADPH から2つの電子を受け取り、それを FAD と2つの heme 分子を経由して、酸素2分子に供与する。電子を受け取った酸素2分子は、最終的に superoxide anions ($O_2^{\cdot-}$)となる。 $O_2^{\cdot-}$ は非常に不安定であるために、自然に、または superoxide dismutase (SOD)の触媒作用によって hydrogen peroxide (H_2O_2)に変換される。生成された H_2O_2 には構造的な安定性と細胞膜を自由に通過できるという特徴がある。 $O^{\cdot-}$ と H_2O_2 とからは、その他にも様々な ROS が生成される。すなわち、peroxynitrite (ONCO $^-$), singlet oxygen (1O_2), hypochloric acid (HOCl), hydroxyl radical (OH \cdot)である。ROS は細胞に対して傷害を与えるが、ROS を無害化するための抗酸化酵素 (catalase, heme oxygenase-1, glutathione peroxidase and thioredoxin) が細胞には備わっているために、活性酸素による damage を最小限に止めることができている。

一方、疾病の発症過程においては、酸化-抗酸化反応の恒常性が損なわれ、過剰に生成された ROS のために生体組織が損傷を受けている。過剰産生された ROS により惹起されることが知られている疾病としては、心筋梗塞、アルツハイマー病、パーキンソン病、肝臓がん、慢性閉塞性肺疾患、喘息などがある。最近の研究により ROS が自己免疫疾患 (慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーゼス、全身性強皮症、多発性硬化症、1型糖尿病)の原因となることが明らかとなった。今回研究対象としたシェーグレン症候群もまた自己免疫疾患の1つであり、唾液腺組織における炎症性細胞浸潤と実質性組織破壊を特徴とし、唾液腺機能不全による口腔乾燥を呈する。シェーグレン症候群の発症にも過剰産生された ROS が関与することが知られている。また、この疾患のモデルマウスである MRL/MpJ-lpr/lpr (MRL-Fas^{lpr}) マウスでは、自己免疫反応が ROS により促進されることが認められている。このような疾病発症の過程で、酸化-抗酸化反応のバランスが崩れてしまった場合に、ROS によって DNA が損傷され、アポトーシス促進因子である p53, bax, caspase 3 が過剰発現し、逆にアポトーシス抑制因子である Bcl-2 の発現が減少し、結果的にアポトーシスによる組織損傷が進行することになる。

緑茶カテキンには主に6つのカテキン誘導体が含まれる。すなわち、catechin (C), epigallocatechin (EGC), epicatechin gallate (ECG), epigallocatechin gallate (EGCG), gallicocatechin gallate (GCG)であり、このうち、EGCG の含有量が最も多い。これら6つのカテキン誘導体は抗酸化作用を示すが、EGCG が最も強力な抗酸化物質である。EGCG は酸化ストレスを軽減し、ROS による DNA 損傷を抑制して、p53, Bax, caspase 3 の発現を阻害すると共に Bcl-2 の発現を促進することによって、アポトーシスによる損傷から組織を保護する作用のあることが知られている。実際に、自己免疫疾患 (関節リウマチ、多発性硬化症、ループス腎炎、1型糖尿病) のモデル

マウスに EGCG を投与した実験では、臨床的徴候の軽減や病理組織所見の改善を認めた。シェーグレン症候群のモデルマウスに EGCG を投与した実験においても同様の抑制効果を認めているが、その作用の科学的メカニズムに関しては十分に解明されているとは言えない。

2. 研究の目的

今回の研究の目的は、シェーグレン症候群のモデルマウスに EGCG を投与して、この疾患に関連すると考えられる 11 の分子の発現ならびに病理組織所見に対する影響を調べ、自己免疫唾液腺炎に対する EGCG の抑制および保護作用の科学的メカニズムを解明することである。今回の研究で調べた 11 の分子とは以下のものである。すなわち、(1) heme oxygenase-1 (HO-1) (抗酸化物質), (2) thymidine glycol (DNA 損傷マーカー), (3) gp91phox/ NADPH oxidase 2 (酸化促進物質), (4) single-stranded DNA (ssDNA) and cleaved caspase 3 (アポトーシス細胞のマーカー), (5) p53 and Bax (アポトーシス促進分子), (6) Bcl-2 (アポトーシス抑制分子), (7) SSA/Ro (SSA), SSB/La (SSB), Ifi202 (自己抗原)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)。EGCG の平均投与量は、1日そして1匹当たり 592 μ g であった。EGCG を溶解した飲用水は2日に1度新しいものに交換した。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。EGCG 投与マウス及び EGCG 非投与マウスから作製したこれらの切片に、hematoxylin-eosin 染色を行い、0~3 の4段階で病理組織学的に評価した (0: 炎症性細胞浸潤が認められない。1: 炎症性細胞浸潤を認めるが、実質性組織破壊がみられない。2: 炎症性細胞浸潤と共に実質性組織破壊を認める。3: 2の評価に加えて、肉芽腫様あるいは線維症様病変を認める。)

(3) 免疫組織化学的手法ならびに評価

EGCG 投与マウス 10 匹及び EGCG 非投与マウス 6 匹から作製した切片は、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、Mouse Stain Kit; ニチレイ社、東京) を行い、HO-1, thymidine glycol, gp91phox, ssDNA, p53, Bax, cleaved caspase 3, Bcl-2, SSA (52-kDa SSA), SSB, Ifi202 の発現について調べた。用いた一次抗体は、ウサギ polyclonal 抗体: ssDNA (DAKO JAPAN 社京都), cleaved caspase 3 (Cell Signaling Technology 社 Danvers, MA), Bax and Bcl-2 (Santa Cruz Biotechnology 社, Santa Cruz, CA) ならびにヤギ polyclonal 抗体: HO-1, gp91phox, p53, SSA, SSB and Ifi202 (Santa Cruz Biotechnology 社, Santa Cruz, CA), さらにマウス monoclonal 抗体: thymidine glycol (clone 2E8) (The Japan Institute for the Control of Aging, Nikken Seil 社, 静岡) 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 (120°C, 5 min) 後、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。thymidine glycol に対する免疫組織化学染色は、マウスモノクローナル抗体がマウスの唾液腺組織に特異的に反応するように、染色キットのマニュアルに従って実施した。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、導管上皮細胞に部分的に認められる。3: 顕著な染色が導管上皮のほとんどの細胞に認められる。)

(4) 統計学的分析

唾液腺炎の病理組織学的重症度スコア (0-3) ならびに 11 の唾液腺炎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 EGCG 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。唾液腺炎の重症度と 11 の唾液腺炎に関連する分子の染色レベル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、thymidine glycol の染色レベルを交絡因子として、その影響を除いた状態で、唾液腺炎の重症度とアポトーシス関連分子の染色レベルとの間の偏相関分析を行い、これらの因子の関連性について調べた。同様に、Bcl-2 の染色レベルを交絡因子として、その影響を除いた状態で、HO-1 の染色レベルと唾液腺炎の重症度ならびにアポトーシス関連分子との間の偏相関分析を行い、これらの因子の関連性について調べた。

4. 研究成果

(1) EGCG 投与マウスと EGCG 非投与マウスの顎下腺における唾液腺炎の重症度

唾液腺炎の重症度に関して、EGCG 投与マウスと EGCG 非投与マウスとの間には有意な違いがみられた。すなわち、EGCG 非投与マウスにおいては、6 匹全て (100%) のマウスの唾液腺炎で重症度スコアが 2 または 3 であったのに対し、EGCG 投与マウスのそれでは、スコア 2 のマウスの割合が 30% (10 匹中 3 匹) に抑えられ、スコア 3 のマウスを認めなかった。これらの結果から、EGCG 投与が MRL-Fas^{lpr} マウスの唾液腺炎における組織損傷を抑制することが示唆された。

(2) EGCG 投与マウスと EGCG 非投与マウスの顎下腺における酸化ストレス関連ならびにアポトーシス関連分子および自己抗原の発現

① 酸化ストレス関連分子の発現

EGCG 投与マウスの顎下腺導管上皮細胞において HO-1 の顕著な発現を認めたが、EGCG 非投与マウスでは、無視できるくらいに非常に弱いものであった。一方、EGCG 非投与マウスの顎下腺導管上皮細胞における thymidine glycol と gp91phox の発現は顕著であったが、EGCG 投与マウスのそれは、無視できる程に非常に弱いものであった。HO-1, thymidine glycol, gp91phox の染色スコアの分布に関しては、EGCG 投与マウスと EGCG 非投与マウスとの間に有意な差が認められた。すなわち、HO-1 の染色スコアは、EGCG 投与マウスにおいて高スコアの割合が有意に高く、逆に thymidine glycol, gp91phox の染色スコアは、EGCG 非投与マウスにおいて高スコアの割合が有意に高かった。これらの結果から、EGCG 投与が抗酸化物質である HO-1 の発現を強め、gp91phox による ROS 産生を減弱させることにより、ROS によって引き起こされる DNA 損傷を阻害していることが示唆される。

② アポトーシス関連分子の発現

EGCG 投与マウスの顎下腺導管上皮細胞において Bcl-2 の顕著な発現を認めたが、EGCG 非投与マウスでは、無視できるくらいに非常に弱いものであった。一方、EGCG 非投与マウスの顎下腺導管上皮細胞における ssDNA, p53, Bax, cleaved caspase 3 の発現は顕著であったが、EGCG 投与マウスのそれは、無視できる程に非常に弱いものであった。Bcl-2, ssDNA, p53, Bax, cleaved caspase 3 の染色スコアの分布に関しては、EGCG 投与マウスと EGCG 非投与マウスとの間に有意な差が認められた。すなわち、Bcl-2 の染色スコアは、EGCG 投与マウスにおいて高スコアの割合が有意に高く、逆に ssDNA, p53, Bax, cleaved caspase 3 の染色スコアは、EGCG 非投与マウスにおいて高スコアの割合が有意に高かった。これらの結果から、EGCG 投与がアポトーシス抑制分子 Bcl-2 の発現を増強し、またアポトーシス促進分子である p53, Bax, cleaved caspase 3 の発現を減少させることによって、唾液腺組織のアポトーシス誘導を阻害していることが示唆される。

③ 自己抗原の発現

EGCG 非投与マウスの顎下腺導管上皮

細胞における SSA (52-kDa SSA), SSB, Ifi202 の発現は顕著であったが、EGCG 投与マウスのそれは、無視できる程に非常に弱いものであった。SSA, SSB, Ifi202 の染色スコアの分布に関しては、EGCG 投与マウスと EGCG 非投与マウスとの間に有意な差が認められた。すなわち、SSA, SSB, Ifi202 の染色スコアは、EGCG 非投与マウスにおいて高スコアの割合が有意に高かった。これらの結果から、EGCG 投与が、シェーグレン症候群において認められる自己抗原の発現を抑制することが示唆される。

(3) 唾液腺炎の重症度、酸化ストレス関連分子、アポトーシス関連分子、自己抗原の発現との間における相関分析

① Kendall 順位相関による分析

唾液腺炎重症度と ssDNA, p53, Bax, cleaved caspase 3, thymidine glycol, gp91phox, SSA, SSB, Ifi202 の発現レベルとの間に有意な正の相関が認められ、一方 HO-1、Bcl-2 の発現レベルとの間に有意な負の相関を認めた。また、ssDNA と唾液腺炎重症度ならびに p53, Bax, cleaved caspase 3, thymidine glycol, gp91phox, SSA, SSB, Ifi202 の発現レベルとの間に有意な正の相関が認められ、一方 HO-1、Bcl-2 の発現レベルとの間に有意な負の相関を認めた。さらに、HO-1 と唾液腺炎重症度ならびに ssDNA, p53, Bax, cleaved caspase 3, thymidine glycol, gp91phox, SSA, SSB, Ifi202 の発現レベルとの間に有意な負の相関が認められ、一方 Bcl-2 の発現レベルとの間に有意な正の相関を認めた。加えて、thymidine glycol と唾液腺炎重症度ならびに ssDNA, p53, Bax, cleaved caspase 3, gp91phox, SSA, SSB, Ifi202 の発現レベルとの間に有意な正の相関が認められ、一方 HO-1、Bcl-2 の発現レベルとの間に有意な負の相関を認めた。

② 偏相関による分析

唾液腺炎重症度と ssDNA, p53, Bax, cleaved caspase 3 の発現レベルとの間の偏相関分析 (thymidine glycol を交絡因子とする。)を行ったところ、いずれの場合も有意な偏相関を認めなかった。したがって、DNA 損傷が唾液腺炎の組織破壊の原因となるアポトーシス誘導に強く関連していることが示唆される。さらに、HO-1 と唾液腺炎重症度ならびに ssDNA, p53, Bax, cleaved caspase 3 の発現レベルとの間の偏相関分析 (Bcl-2 を交絡因子とする。)を行ったところ、いずれの場合も有意な偏相関を認めなかった。したがって、Bcl-2 の発現が唾液腺炎やアポトーシス誘導に対する HO-1 の阻害作用に重要な役割を果たしていることが示唆されている。

以上のことから、EGCG 投与により HO-1 と Bcl-2 の発現が増強され、同時に自己抗原の発現が抑制され、そのことが、酸化ストレスにより誘発される DNA 損傷やアポトーシスを妨げ、自己免疫唾液腺炎の組織損傷に対する保護作用に関係していると考えられる。

(4) 考察

シェーグレン症候群の患者の唾液腺組織内では ROS が生成されており、この疾患の

病態の悪化に関係する。自己免疫反応が開始される時に、抗原提示細胞 (APC) と自己反応性 T 細胞との間に免疫学的シナプスが形成され、その中で、自己反応性 T 細胞が、APC の表面に存在する主要組織適合複合体 (MHC) 上に提示された自己抗原を T 細胞レセプターを通して認識し、活性化される。自己反応性 B 細胞も B 細胞レセプターにより自己抗原を認識し、T 細胞との相互作用を通して、あるいは T 細胞非依存的に B 細胞活性化因子 (BAFF) により活性化される。これらの自己免疫反応の過程において、免疫細胞内部では ROS が生成され、その生成された ROS が逆に自己免疫反応をさらに活性化させる。また、活性化した自己反応性 B 細胞により生成された自己抗体が細胞内での ROS の生成を増大させ、組織損傷の原因となる。我々の研究グループと他の研究者らは、シェーグレン症候群の患者やモデルマウスから得られた唾液腺組織の導管上皮細胞に MHC や costimulatory 分子が発現しており、nonprofessional APC として機能し得ることを報告した。実際シェーグレン症候群の患者の唾液腺細胞上には自己抗原が発現がみられる。さらに、アポトーシスの過程においては、SSA と SSB が核から移行して、細胞表面に発現する。これらの研究成果を勘案すると、免疫細胞だけではなく唾液腺の導管上皮細胞も nonprofessional APC として自己免疫反応を活性化させ、シェーグレン症候群の患者の唾液腺組織内での ROS の生成を増大させていると考えられる。唾液腺組織内で生成された ROS は DNA を損傷し、アポトーシス誘導を促進して病態の悪化に繋がる。実際に、シェーグレン症候群の患者の唾液腺組織において、p53, Bax, cleaved caspase 3 の発現の増大と、Bcl-2 の発現の減少が報告され、これらの病理組織学的所見は唾液腺組織の破壊に関連する。加えて、p53 依存性のアポトーシス誘導には ROS の生成を伴うことが明らかとなっており、このことは、2 相性の ROS 生成 (自己免疫反応時とアポトーシス誘導時) がシェーグレン症候群の発症に関係することを意味している。

我々の研究から得られた病理組織学的知見では、唾液腺炎の重症度スコアが EGCG 投与マウスにおいて有意に減少しており、特に、スコア 2 と 3 の割合が EGCG 非投与マウスと比較して 70% 減少した (EGCG 投与マウス 30% vs. EGCG 非投与マウス 100%)。また、EGCG の投与によって、thymidine glycol, gp91phox, ssDNA, p53, Bax, cleaved caspase 3 の発現が減少し、逆に Bcl-2 の発現が増大した。thymidine glycol の発現レベルと唾液腺炎重症度ならびに gp91phox, ssDNA, p53, Bax, cleaved caspase 3 の発現レベルとの間に有意な正の相関が認められたが、一方 thymidine glycol の発現レベルを交絡因子として、その影響を除いた状態で、唾液腺炎重症度と ssDNA, p53, Bax, cleaved caspase 3 の発現レベルとの間の偏相関分析を行ったところ、その全ての偏相関係数が有意ではなかった。この結果は、ROS による DNA の損傷が自己免疫唾液腺炎におけるアポトーシス誘導とそれに付随する組織破壊に重要な役割を果たしていることを意味している。したがって、我々の研究結果は、自己免疫反応の過程で生成された ROS により DNA が損傷を受け、それが p53 を活性化し、活性化した p53 がアポ

トーンシ誘導を促進し、そのアポトーンシの誘導過程で ROS が生成され、その生成された ROS が自己免疫反応をさらに活性化するといいた動的な連鎖反応が病変組織内で繰り返されていることを示唆している。今回の研究結果は同時に、EGCG の投与がその動的な連鎖反応の進行を阻害し、すなわち、EGCG の抗酸化作用によって、thymidine glycol, gp91phox, ssDNA, p53, Bax, cleaved caspase 3 の発現を減少させ、Bcl-2 の発現を増大させることによって、唾液腺組織を酸化ストレスによる DNA 損傷とアポトーンシから保護しているということを示している。

EGCG には実際に NADPH oxidase の subunit である gp91phox, p22phox, p47phox の発現を抑えることで ROS の生成を阻害し、また p53, Bax, caspase 3 の発現を減少させ、Bcl-2 の発現を増大させる作用のあることが示されている。興味深いことに、EGCG は、HO-1 を発現していないがん細胞ではアポトーンシを誘導するが、HO-1 を発現しているがん細胞ではアポトーンシを誘導せず、また p53, Bax, 活性化 caspase 3 の発現を阻害することが明らかとなっている。この研究は、酸化ストレスによるアポトーンシ誘導に対する EGCG の保護作用に HO-1 が不可欠な因子であることを示す。実際、HO-1 には gp91phox, p22phox, p47phox, p67phox を不活性化して ROS の生成を抑制し、細胞の生存率を高める作用がある。また、HO-1 は gp91phox の中心部にある 2 つの heme タンパク質を分解して、ROS 生成システムを破壊する。さらに、HO-1 は Bcl-2 の発現を増強し、Bax と caspase 3 の発現を抑制して、組織を酸化ストレスによる損傷から保護する作用のあることが知られている。以上の研究結果は、我々の研究結果を支持するものである。

我々の研究結果では、HO-1 の発現レベルと唾液腺炎重症度ならびに thymidine glycol, gp91phox, ssDNA, p53, Bax, cleaved caspase 3 の発現レベルとの間に有意な負の相関が認められたが、Bcl-2 の発現レベルを交絡因子として、その影響を除いた状態で、HO-1 の発現レベルと唾液腺炎の重症度ならびに ssDNA, p53, Bax, cleaved caspase 3 の発現レベルとの間で偏相関分析を行ったところ、その全ての偏相関係数が有意ではなかった。このことは、EGCG により誘導された HO-1 による自己免疫唾液腺炎での組織保護効果には、Bcl-2 のアポトーンシ抑制作用が重要な役割を果たしていることを示唆している。

正常な唾液腺細胞を用いた *in vitro* の研究において、EGCG が自己抗原である SSA と SSB の発現を mRNA 転写レベルとタンパク質レベルで抑制することが報告されている。今回の *in vivo* の研究では、EGCG が自己免疫唾液腺炎病変部で SSA, SSB, Ifi202 の発現を阻害することを認めた。最近の研究では、細胞に対する H₂O₂ 処理が細胞質内での 52-kDa SSA タンパク質レベルを上昇させ、その SSA の核への移行を誘導することが示されている。そして、核に蓄積した SSA タンパク質が Bcl-2 の発現を抑制し、アポトーンシを誘導する。これらの結果は、52-kDa SSA がアポトーンシ促進因子として作用することを示唆している。さらに、UV 照射後のアポトーンシ初期段階にある角化細胞においては、SSB タンパク質が凝集した核に発現し、核膜に縁取られるように局在しているのが

認められる。このアポトーンシ細胞にみられる SSB の異常発現は、過剰産生された ROS による DNA 損傷に関係する。加えて、Ifi202 タンパク質を過剰発現させたヒトの肺がん細胞は、TNF α により誘導されるアポトーンシに感受性を示し、Ifi202 タンパク質もアポトーンシ促進因子としての性質を呈する。EGCG の自己抗原に対する発現阻害作用の科学的メカニズムはまだ十分に解明されていないが、細胞質における 52-kDa SSA タンパク質の発現が、H₂O₂ 処理によって増強されることを考えると、EGCG の抗酸化作用が何らかの役割を果たしているのかもしれない。

シェーグレン症候群のモデルマウスに EGCG を投与する研究において、血清中の自己抗体の抗体価が有意に減少することが報告されているが、その減少程度は、自己免疫唾液腺炎の発症を抑えるには十分であるとは言えない。すなわち、EGCG 投与により全身的に自己抗体の生成を阻害するのは難しいということが示唆されている。血清中の異常なレベルの自己抗体が、ROS の生成を促進し、p53 ならびに caspase 3 を活性化して、唾液腺組織のアポトーンシによる組織損傷の原因になるというこれまでの研究報告に対して、我々の研究結果は、EGCG の投与が、唾液腺に特異的な形で、ROS によって誘導される DNA 損傷やアポトーンシ促進因子の発現を抑制し、アポトーンシ抑制因子の発現を増大させて、唾液腺組織を組織損傷から保護することを示した。さらに、自己抗原の発現と thymidine glycol ならびに ssDNA の発現との間に正の有意な相関が認められた。そして、上述したように、SSA と Ifi202 はアポトーンシの促進因子として作用している可能性がある。以上のことから、EGCG 投与による自己抗原の発現阻害作用は、DNA 損傷や p53 依存性アポトーンシ誘導を含む一連の ROS 介在性の病原性連鎖反応の抑制に繋がるものであると考える。そして、その EGCG の抑制効果は、全身的作用というよりも、むしろ唾液腺に特異的な作用であるようにみられる。

結論として、我々の研究は、EGCG 投与による HO-1 と Bcl-2 の発現の増大と自己抗原の発現の減少が、MRL-Fas^{lpr} マウスの自己免疫唾液腺炎における酸化ストレス誘導性の DNA 損傷やアポトーンシから唾液腺組織を保護するという EGCG の作用に重要な役割を果たしていることを明らかにした。この EGCG の抗酸化作用は、緑茶を用いたシェーグレン症候群の新たな治療法の開発を可能にするものであると考える。

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 5 件)

① Keichi Saito, Shiro Mori (他 2 名)
Epigallocatechin gallate inhibits oxidative stress-induced DNA damage and apoptosis in MRL-Fas^{lpr} mice with autoimmune sialadenitis via upregulation of heme oxygenase-1 and Bcl-2.

Autoimmunity 2013 in press (査読有)

② Keiichi Saito, Shiro Mori (他 2 名) Sjögren's syndrome-like autoimmune sialadenitis in MRL-*Fas*^{lpr} mice is associated with expression of glucocorticoid-induced TNF receptor-related protein (GITR) ligand and 4-1BB ligand. Autoimmunity 46:231-237, 2013. DOI: 10.3109/08916934.2012.757307 (査読有)

③ Shiro Mori (他 4 名) Mouse model of lymph node metastasis via afferent lymphatic vessels for development of imaging modelities. Plos One 8: e55797, 2013. doi:10.1371/journal.pone.0055797 (査読有)

④ Keiichi Saito, Shiro Mori (他 2 名) Epigallocatechin gallate disturbs thymidine glycol formation induced by oxidative stress in Sjögren's syndrome-like autoimmune sialadenitis of MRL/lpr mice. Interface Oral Health Science 2011 153-155. (査読無)

⑤ Shiro Mori (他 4 名) Evaluation of antitumor effects following tumor necrosis factor-alpha gene delivery using nanobubbles and ultrasound. Cancer Sci 102:2082-2089, 2011. doi: 10.1111/j.1349-7006.2011.02084.x (査読有)

⑥ Shiro Mori (他 7 名) Volumetric and angiogenic evaluation of antitumor effects with acoustic liposome and high-frequency ultrasound. Cancer Res 71:6957-6964, 2011. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-2389 (査読有)

〔学会発表〕 (計 2 件)

① 齋藤 恵一 緑茶カテキン投与によるシェーグレン症候群類似唾液腺炎における酸化ストレス誘発物質発現に対する抑制効果 日本口腔衛生学会 2011 年 10 月 8 日-10 日 松戸

② 齋藤 恵一 MRL/lpr マウスのシェーグレン症候群類似唾液腺炎における HO-1、Nox2 の発現に対する緑茶カテキン投与の影響 日本口腔衛生学会 2010 年 10 月 6 日-8 日 新潟

〔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 :

出願年月日 :

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

齋藤 恵一 (SAITO KEIICHI)

東北大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号 : 00178477

(2) 研究分担者

森 士朗 (MORI SHIRO)

東北大学・病院・講師

研究者番号 : 80230069

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :