

## 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：13101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592085

研究課題名（和文）シェーグレン症候群の酸化ストレス制御による口腔乾燥症状緩和に向けて

研究課題名（英文）Study on the regulation mechanism of oxidative stress for treatment of dry mouth in Sjogren's syndrome

研究代表者

相田 美和（SOHDA MIWA）

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：20258528

研究成果の概要（和文）：

慢性炎症性の自己免疫疾患のひとつシェーグレン症候群は、主として唾液腺と涙腺が障害されるため口腔乾燥と乾燥眼をきたす。本研究では、唾液腺における酸化ストレスの制御機構を明らかにするため、酸化ストレスの影響をヒト顎下腺由来 A-253 細胞を用いて解析した。ヒト全ゲノム発現解析の結果から、A-253 細胞で H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 存在下では炎症性サイトカインの発現が亢進していた。一方で、抗炎症性サイトカインである IL-11 も誘導されていた。これは、標的組織自体が局所の炎症を制御する機能を有することを示唆している。また IL-11 は補充療法の候補分子だと考えられる。さらに、ヒト唾液腺から可溶性 IL-17 受容体（IL-17RA）の同定に成功した。IL-17 はシェーグレン症候群、慢性関節リウマチおよび炎症性大腸炎クローン病などの炎症性疾患において重要な分子とみなされており、可溶性 IL-17RA は内因性の IL-17 阻害物質となり得る。

研究成果の概要（英文）：

Sjogren's syndrome is a chronic inflammatory autoimmune disorder that affects mainly salivary and lacrimal gland, resulting in dry mouth and dry eyes symptoms. In this study, to understand the regulatory mechanism of inflammation in salivary gland, oxidative stress response was investigated using human submaxillary salivary gland A-253 cells. A whole human genome micro-array analysis showed that the expression levels of pro-inflammatory cytokines such as IL-6, IL-18 and CXCL1 were increased in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treated cells compared with control cells. While, anti-inflammatory cytokine IL-11 was up-regulated in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treated cells. These results suggest that the target tissue itself might have a role on regulation of peripheral inflammation. IL-11 might be a candidate molecule for substitution therapy. Furthermore, a soluble isoform of IL-17 receptor A (IL-17RA) was identified in human salivary gland. IL-17 was supposed to a key molecule of inflammatory disorders such as Sjogren's syndrome, rheumatoid arthritis and Crohn's disease. The soluble isoform of IL-17 RA could be an endogenous antagonist against the IL-17 signaling.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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・歯科放射線学

キーワード：歯学・細胞組織・酸化ストレス・唾液腺

### 1. 研究開始当初の背景

近年、糖尿病や動脈硬化症など、慢性炎症による酸化ストレスと疾病との関連が多数報告されている。シェーグレン症候群は、主に唾液腺と涙腺が障害されるため、口腔乾燥とドライアイを主症状とする自己免疫疾患である。中高年女性に好発し、潜在患者数を含めた総患者数は10万人を超えるとも推定される。患者の多くが慢性関節リウマチなどの他の自己免疫疾患を併発している(二次性シェーグレン症候群)。障害組織は慢性的な炎症状態にあり、酸化ストレスの影響を受けていると考えられる。

シェーグレン症候群の発症や進行には、IL-17やIL-6などの炎症性サイトカインが密接に関連していることが報告されている。それに加えて、ウイルス感染や女性ホルモンの影響など多数の要因が関わっていると考えられている。患者血清中には、診断基準のひとつとなっている抗 Ro/SS-A 抗体、抗 La/SS-B 抗体の他にも多種類の自己抗体が認められている。自己抗体の抗原タンパクのひとつ、M3 ムスカリン作動性アセチルコリン受容体は、唾液の分泌刺激に関与するタンパクであることから、自己抗体と症状の悪化との関連も考えられるようになってきている。しかしながら、精力的に研究が進められているものの、シェーグレン症候群の病因は明らかになっていない。

そのため、現在のところ治療法は確立されておらず、シェーグレン症候群の治療は対症療法に留まっている。人工唾液による症状の改善は必ずしも満足いく成果をもたらしている状況ではないのが、現状である。慢性的な口腔乾燥は、口臭の発生や摂食の障害につながる可能性があるだけでなく、う蝕や歯周病の悪化をまねく要因となることが知られており、口腔乾燥症状の緩和は強く求められている。

### 2. 研究の目的

まず、唾液腺が酸化ストレスにより受ける影響を詳細に解析し、唾液腺の酸化ストレス抵抗システムを明らかにすることを目的とする。さらに酸化ストレス状態を制御する因子の解析をおこない、シェーグレン症候群の口腔乾燥症状緩和のための対策を進めることを目指す。

### 3. 研究の方法

#### (1) 顎下腺細胞 A-253 の酸化ストレス実験 - 条件検討

シェーグレン症候群の初期における Th1 細胞、Th17 細胞の標的組織への浸潤と発症との関連が知られている。モデル動物や患者生検では、唾液腺や涙腺、特に導管周囲への浸潤が観察されている。

そこで本研究では、ヒト顎下腺導管部由来細胞株 A-253 を用いて実験を行なった。酸化ストレス源として H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を用いた。

まず、酸化ストレス条件を検討するため、濃度、処理時間を変えて細胞培養液に H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を添加して培養し、A-253 細胞への影響を細胞増殖能などで検討した。

#### (2) 唾液腺細胞 A-253 の酸化ストレス反応の検討

(1) の結果をふまえ、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理 3 時間、6 時間、および無処理培養した A-253 細胞から全 RNA を抽出し、ヒト全遺伝子型チップを用いた発現遺伝子解析を行った。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 添加による遺伝子発現の増減について、サイトカインやケモカイン等の炎症と関連する分子、成長因子、メタロプロテアーゼ、プロテアーゼ阻害タンパク、および細胞接着因子等の細胞の増殖や組織の維持と関連する分子について特に注目して解析を進めた。また、シェーグレン症候群患者の保有する自己抗体の抗原タンパク等についても注意して解析を行なった。

#### (3) 抗炎症作用を期待できる分子の検索

抗炎症性サイトカインについて (2) の結果を詳細に解析した。

サイトカインの中には、受容体の可溶性型が存在し、それがリガンドとなるサイトカインに対して阻害効果を有する'おとり受容体'として機能すると報告されているものがある。IL-17 はシェーグレン症候群患者血清での増加が報告されている炎症性サイトカインであり、その受容体は IL-17RA/IL-17RC の複合体として機能する。IL-17RC については可溶性が見つかっているが、IL-17RA については不明であった。

そこで、ヒト可溶性 IL-17RA の検索を RNA レベルとタンパク質レベルで行なった。RNA レベルの検索には、正常唾液腺組織全 RNA と A-253 細胞から抽出した全 RNA をテンプレートとし RT-PCR 法を用いた。タンパク質レベルでの解析には、A-253 培養上清を抗 IL-17RA 抗体で免疫沈降し、ウェスタンブロット法で検出した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 唾液腺細胞 A-253 の酸化ストレス感受性

ヒト顎下腺細胞株 A-253 細胞の酸化ストレスに対する抵抗性を H2O2 を用いて検討した。シェーグレン症候群では、主として唾液腺と涙腺が障害される。しかし、報告されている他の組織由来細胞株の受ける影響と比較して、唾液腺由来 A-253 細胞が特に酸化ストレス感受性が高いことを示すような結果は得られなかった。

##### (2) 唾液腺細胞 A-253 のストレス応答

①サイトカイン：ヒト全遺伝子型チップを用いた発現遺伝子解析の結果から、顎下腺細胞株 A-253 は複数のサイトカインを合成していることがわかった。中でも炎症性サイトカイン IL-6、IL-18 および CXCL1 は、H2O2 添加による酸化ストレス条件下において、時間経過と共に発現量の増加が観察された。シェーグレン症候群患者唾液中には、炎症性サイトカインが健常者より優位に多く含まれていることが多数報告されている。唾液中サイトカインは組織に浸潤した免疫担当細胞から分泌されたものなのか、唾液のもとである血清成分に由来するのか、唾液腺で合成分泌されるのか、その由来は不明であったが、解析の結果から一部のサイトカインは唾液腺組織上皮に由来しており、その発現は酸化ストレスにより影響を受けることを明らかにすることができた。

②組織の分化再生に関与する分子：シェーグレン症候群患者の唾液腺では、機能障害だけでなく、組織そのものの障害が観察されている。唾液には上皮成長因子 (EGF) 等が多く含まれていることから、酸化ストレスによる成長因子の発現量の変化を検討したところ、H2O2 添加によるアンフィレギュリンの発現上昇が認められた。現時点ではアンフィレギュリンの唾液腺組織のターンオーバーへの関与は不明であるが、唾液腺組織でのその受容体の発現が認められている。本研究の結果から、腺房組織の分化成長を促進する方向へ影響を与える可能性を有する分子として、アンフィレギュリンを候補に挙げることができた。

③組織の破壊に関与する分子：酸化ストレス下では、メタロプロテアーゼの発現が誘導されて組織破壊に関与することが知られている。A-253 細胞と H2O2 を用いた今回の解析からは、メタプロテアーゼおよびその阻害タンパクの発現の変化はみられなかった。

##### (3) 抗炎症作用を期待できる分子の検索

①抗炎症性サイトカイン：酸化ストレス条件下では、抗炎症性サイトカインである IL-11 の発現も誘導されていた。このことから、標的組織自体が局所の炎症を制御する機能を有すると考えられる。また、これは唾液腺組

織では IL-11 が抗炎症性サイトカインとして重要であることを示唆する結果であり、IL-11 は唾液腺の炎症性疾患に対する補充療法の候補となり得る分子であることが分かった。

②可溶性サイトカイン受容体 (おとり受容体)：可溶性型 IL-17RA について、正常唾液腺および A-253 細胞の全 RNA を RT-PCR 法で探索したところ、選択的スプライシングによって産生されるヒト可溶性型 IL-17RA の存在を明らかにすることができた。さらに、A-253 細胞の培養上清中に IL-17RA タンパクが分泌されていることを確認することができた。また、ヒトでは可溶性型 IL-17RA は唾液腺を含む広範な組織で発現していることを RNA レベルで検出できた。IL-17RA の細胞外領域とイムノグロブリン Fc 領域との融合タンパク質は、IL-17 と結合して、その効果を減弱することが報告されている。可溶性型 IL-17RA は、さまざまな組織で内因性の抗炎症分子としての機能が期待される分子である。ただし、IL-17 は細菌感染防御に重要な役割を果たす分子でもあり、生体内での IL-17 応答の下方制御については慎重に検討する必要がある。

③自己抗体と症状との関連性について 1 研究開始当初の背景の項で触れた。シェーグレン症候群などの自己免疫疾患患者の多くが、コイルドコイル構造をもつゴルジ体タンパクに対する自己抗体を保有している。これらの自己抗原タンパクのほとんどが、サイトカインや増殖因子などの分泌に関わるものであることが知られている。そのような特徴をもつゴルジ体タンパクの機能解析を行ったところ、新生タンパクの糖鎖修飾に必須であることがわかった。正常な糖鎖修飾ができない場合、糖タンパクが重要な役割をもつ細胞接着などに重大な影響を及ぼすと考えられる。

#### 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 1 件)

(1) Interaction of Golgin-84 with the COG complex mediates the intra-Golgi retrograde transport

M. Sohda, Y. Misumi, A. Yamamoto, N. Nakamura, S. Ogata, S. Sakisaka, S. Hirose, Y. Ikehara and K. Oda

Traffic 2010; 11(12): 1552-1566

査読有

DOI: 10.1111/j.1600-0854.2010.01123.x

[学会発表] (計 2 件)

(1) Golgins and the COG complex

Sohda M, Nakamura N, Misumi Y

第 84 回日本生化学会

2011 年 9 月 24 日 京都

(2) Interaction of Golgin-84 with the conserved oligomeric Golgi (COG) complex mediates the intra-Golgi retrograde transport

Sohda M, Misumi Y, Yamamoto A, Nakamura N, Oda K

第 33 回日本分子生物学会・第 83 回日本生化学会 合同学会 BMB2010

2010 年 12 月 7・8 日 神戸

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

相田 美和 (SOHDA MIWA)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：20258528

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし