

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：15301
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2010 ～ 2012
 課題番号：22592215
 研究課題名(和文) β デフェンシンを指標としたシェーグレン症候群の高感度遺伝子診断法の開発
 研究課題名(英文) Development of a highly sensitive genetic diagnosis of Sjogren syndrome based on detection of β defensins
 研究代表者
 水川 展吉 (MIZUKAWA NOBUYOSHI)
 岡山大学・岡山大学病院・講師
 研究者番号：00263608

研究成果の概要(和文)：本研究はシェーグレン症候群の迅速確実な診断法の確立を RT-PCR 法による β デフェンシンの遺伝子発現量を基準にして行うためのものである。シックハウス症候群における β デフェンシンの発現の比較により β デフェンシン 4 では炎症の急性期では発現が増加し、慢性期では発現が減少する特徴が明らかになった。シェーグレン症候群患者は口唇腺に慢性炎症が認められる状態であり、ヒト β デフェンシン 4 がわずかに認められた。シェーグレン症候群の疑いがあり、口唇生検を行ったが、シェーグレン症候群でないとして診断された患者の中に β デフェンシン 4 が強く発現している群があった。 β デフェンシン 4 の上記の特徴を考慮すると、これらの群はシェーグレン症候群に共通する何らかの変化が生じている可能性が考えられることが示唆された。口唇腺のヒト β デフェンシン 4 遺伝子発現を分析することで、シェーグレン症候群の予備軍を診断できる可能性が期待できる。

研究成果の概要(英文)：To analyze the details of changes in expression patterns of human β -defensins in labial glands in Sjögren's syndrome, the present study investigated the immunoreactivity and gene expression of human β -defensin s in patients with and without Sjögren's syndrome. Otherwise, we analyzed the localization patterns of β defensins , in the tracheal epithelium of mouse models of sick building mice. The results of this study indicated that acute inflammation increased β defensin4 and chronic inflammation decreased β defensin4.

Weak gene expression of *human β -defensin4* was detected in labial glands with Sjögren's syndrome, but was almost absent in labial glands without Sjögren's syndrome. Interestingly, a subgroup of labial glands without Sjögren's syndrome showed gene expression of *human β -defensin4* and similar morphology to the Sjögren's syndrome. These findings and the result that acute inflammation increased β defensin4 and chronic inflammation decreased β defensin4 may indicate a potential for future Sjögren's syndrome. These analyses might prove useful in the diagnosing and assessing risk of Sjögren's syndrome.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2011 年度	600,000	180,000	780,000
2012 年度	600,000	180,000	780,000
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・外科系歯学

キーワード：ヒトβデフェンシン、シェーグレン症候群、リアルタイム RT-PCR

1. 研究開始当初の背景

- (1) シェーグレン症候群は代表的な自己免疫疾患のひとつで、原因の詳細は不明である。現在、日本では1999年厚生省改訂の診断基準が用いられているが、アメリカやヨーロッパでは2002年にAmerican-European Consensus Groupによって提唱された診断基準が用いられている。両者に共通するのは唾液腺生検において炎症所見が認められることが診断において最重要であるとされている点である。
- (2) 抗菌ペプチドであるヒトβデフェンシンは感染や炎症を起こした際に部位特異的に強い発現が観察される性質がある。これまで

2. 研究の目的

シェーグレン症候群患者の口唇腺と正常口唇腺におけるヒトβデフェンシンの発現パターンの違いをもとにシェーグレン症候群の早期診断法を確立すること本研究の目的としている。

3. 研究の方法

コントロールとして正常な口唇腺とシェーグレン症候群の口唇腺とを免疫染色によりヒトβデフェンシンの発現を分析した。シェーグレン症候群罹患による発現量の比較をより定量的、精密、迅速に分析するためにRT-PCR法にて遺伝子レベルでの分析を行った。

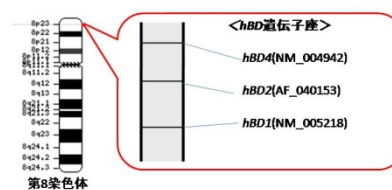
<RT-PCR法に用いるプライマーの設計>
cDNAライブラリーは、前回申請者らによってβデフェンシンの発現が確認されているヒト扁平上皮がん株HSC4を培養してRNA抽出、cDNA転写した。次に、NCBIのデータベースに基づいて各βデフェンシンの遺伝子配列からPrimer3を用いてプライマーを設計合成した。それぞれのプライマーを用い、上述のcDNAをテンプレートにして遺伝子を合成させ、シーケンサーを用いて合成された遺伝子の配列を分析した。CLUSTAL Wを用いてNCBI

のデータベースと100%配列が一致したものを本研究用のプライマーとして採用した。なお、免疫染色ではヒトβデフェンシン3はHSC4が発現していなかったため、ヒトβデフェンシン3のプライマー作成には市販のヒトcDNAライブラリーを用いた。実際口唇腺導管上皮細胞でのヒトβデフェンシン3発現を免疫組織化学法で調べた結果、HSC4同様、発現していないということが判明した。以上から本年度に確定した各ヒトβデフェンシンのプライマー配列は次のとおりである。ヒトβデフェンシン1:

forward;cgccatgagaacttctacc, reverse;cttctggtcactcccagctc、ヒトβデフェンシン2:forward; atcagccatgagggtctgt, reverse; gagaccacagtgccaattt、ヒトβデフェンシン3: 上記の方法で設計したプライマーは全てヒトβデフェンシン3遺伝子発現を検出できなかった。ヒトβデフェンシン4: forward; ctcagctcctggtgaagctc, reverse; ggatcgctataaccacaaa

使用したprimer pairs

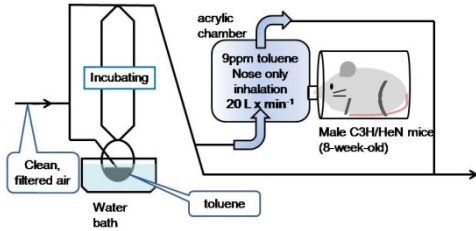
	NCBI AccessionNo.	Primer sequence(5'-3')	
		forward	reverse
hBD1	NM_005218	GTT GCA GCT ACA AGC CAT GA	ACA GGT GCC TTG AAT TTT GG
hBD2	AF_040153	ATC AGC CAT GAG GGT CTT GT	GAG ACC ACA GGT GCC AAT TT
hBD4	NM_004942	CTC AGC TCC TGG TGA AGC TC	GGA TCG CCT AIA CCA CCA AA
β-actin	NM_001101	TCC CTG GAG AAG AGC TAC GA	AGC ACT GTG TTG GCG TAC AG



また、シェーグレン症候群と同様に細菌やウイルス感染を原因としていない炎症を生じる、シックハウス症候群におけるβデフェンシンの発現をシックハウスモデルマウスを用いて、免疫染色にて分析し、βデフェンシンの発現の特性についても分析を行った。

シックハウス症候群モデルとしてトルエン曝露マウスを用いた。トルエン曝露に関しては次に示すシステムを使用した。

Exposure system



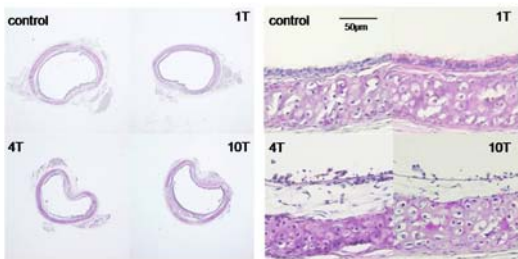
The atmospheric concentration of toluene in the chambers was measured by gas chromatography/mass spectrometry (INFICON, NY). The average levels of toluene in control groups was limited in 0.01 ± 0.001 ppm, and exposure groups was limited in 9.1 ± 0.1 ppm.

4. 研究成果

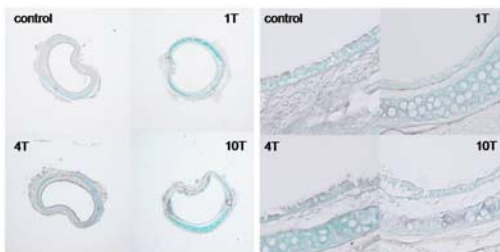
(1) シックハウス症候群でのβデフェンシンの発現 (抗体法)

βデフェンシン1はコントロール群、いずれの曝露群も一定の発現量を認め変化がなかった。βデフェンシン2では1回曝露群では変化はなかったが、4回曝露群では発現量が減少し、10回曝露群では発現量がさらに減少した。βデフェンシン3ではコントロール群も曝露群も発現は認めなかった。βデフェンシン4では4回曝露では発現量が増加したが、10回曝露群では発現量が減少した。以上のようにシックハウス症候群においてもβデフェンシンは特徴的な発現を示した。とくに、βデフェンシン4では炎症の急性期では発現が増加し、慢性期では発現が減少する特徴が明らかになった。

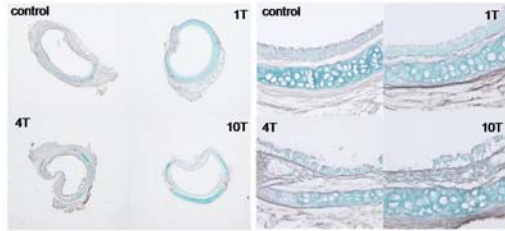
HE



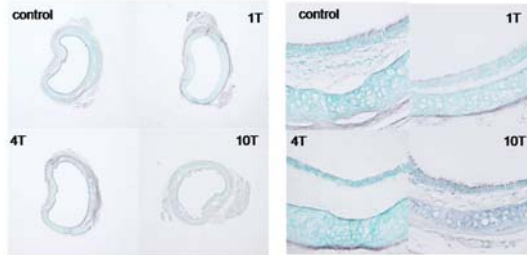
Anti-hBD1



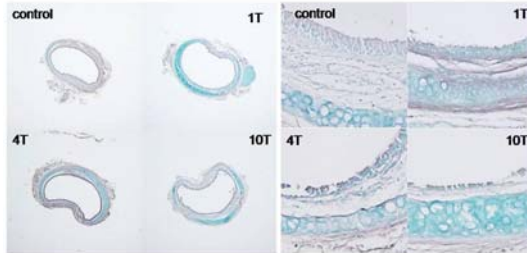
Anti-hBD2



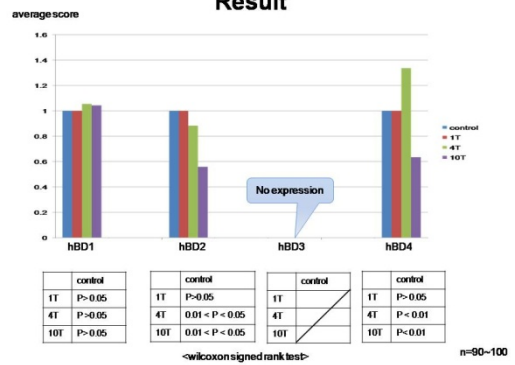
Anti-hBD3



Anti-hBD4



Result

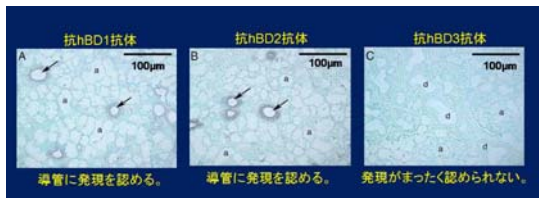


(2) シェーグレン症候群患者の口唇腺におけるヒトβデフェンシンの発現 (抗体法)

ヒトβデフェンシン1のシグナルは正常な口唇腺、シェーグレン症候群患者の口唇腺ともに、導管上皮細胞に認められた。また、ヒトβデフェンシン1のシグナルの強さはSSの口唇腺と正常な口唇腺とを比較したところ、弱くなっていた。

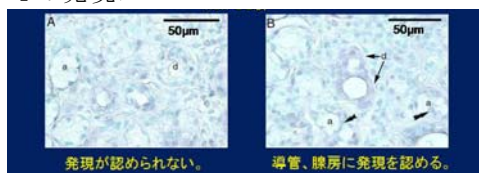
ヒトβデフェンシン2のシグナルも正常な口唇腺、シェーグレン症候群患者の口唇腺ともに、導管上皮細胞に認められ、腺房には認められなかった。シェーグレン症候群患者の口唇腺のシグナルの強度は正常な口唇腺と比較すると、著しく弱かった。

ヒトβデフェンシン3のシグナルは正常な口唇腺においてもシェーグレン症候群患者の口唇腺においても認められなかった。

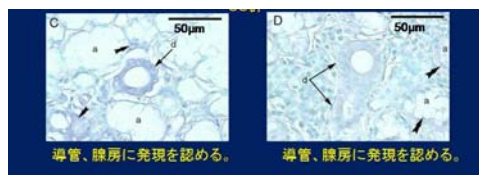


ヒトβデフェンシン4のシグナルは正常な口唇腺では導管上皮細胞に認められるのみならず、腺房細胞にもわずかに認められるものがあった。シェーグレン症候群患者の口唇腺ではすべての標本において導管上皮細胞と腺房細胞にシグナルが認められたが、シグナル強度は正常な口唇腺で認められたものと比較して弱かった。

<正常な口唇腺におけるヒトβデフェンシン4の発現>



<シェーグレン症候群患者の口唇腺におけるヒトβデフェンシン4の発現>



(3) シェーグレン症候群患者の口唇腺におけるヒトβデフェンシンの発現 (RT-PCR法)
ヒトβデフェンシン1ではすべての口唇腺において同程度の遺伝子発現が認められた。ヒトβデフェンシン2ではシェーグレン症候群の口唇腺において遺伝子量が減弱していた。ヒトβデフェンシン4ではシェーグレン症候群において遺伝子発現が認められた。さらに、シェーグレン症候群と診断されなかった群のなかで遺伝子発現が認められた例が存在していた。βデフェンシン4は炎症の急性期では発現が増加し、慢性期では発現が減少する特徴があることを考慮すると、シェーグレン症候群と診断されていないにも関わらず、ヒトβデフェンシン4が発現しているものは何らかの変化が書字している可能性があることが示唆された。口唇腺のヒトβデフェンシン4遺伝子発現を分析することで、シェーグレン症候群の予備軍を診断できる可能性が期待できる。

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 Seiko Takeda, Yuichiro Yamaai, Yoshihiro Kaneda, Nobuyoshi Mizukawa, Seiji Iida, and Hidekazu Fujimaki: Toluene exposure leads to a change in expression patterns of β defensins in the mouse tracheal epithelium. J Toxicol Pathol 2013;26:35-40 (査読あり)

[学会発表] (計3件)

- ① 金田祥弘・水川展吉 シェーグレン症候群患者の口唇腺におけるヒトβデフェンシンの局在と臨床応用 第56回日本口腔外科学会総会・学術大会 2011年10月21日 大阪国際会議場
- ② 武田斉子・水川展吉 デフェンシン遺伝子を標的としたRT-PCR法によるシェーグレン症候群の迅速診断 第56回日本口腔外科学会総会・学術大会 2011年10月21日 大阪国際会議場

- ③ 武田斉子 Change in expression pattern of human β defensins in mouse tracheal epithelium induced by toluene exposure. 第 17 回 日本免疫毒性学会学術大会 2010 年 9 月 10 日 独立行政法人大山記念ホール

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水川 展吉 (MIZUKAWA NOBUYOSHI)
岡山大学・岡山大学病院・講師
研究者番号 : 00263608

(2) 研究分担者

山合 友一郎 (YAMAAI YUICHIRO)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号 : 00158057

高木 慎 (TAKAGI SHIN)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号 : 40116471

長塚 仁 (NAGATSUKA HITOSHI)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号 : 70237535