

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390464

研究課題名(和文) シェーグレン症候群に対する病期対応型テーラーメイド医療の構築

研究課題名(英文) Establishment of tailor-made therapy corresponding to the disease stage of Sjogren's syndrome

研究代表者

東 雅之 (AZUMA, Masayuki)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：20144983

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,700,000円、(間接経費) 4,410,000円

研究成果の概要(和文)：本研究においては、シェーグレン症候群(SS)の病期に対応した3つの治療法を構築することを目的とした。1番目においては、病変初期段階であるリンパ球の唾液腺への浸潤を阻止するものである。この研究成果として、SS患者唾液腺腺房細胞においては、テストステロンからアンドロゲンに変換する酵素が局在異常するためであることを明らかにした。2番目は病変中期段階である腺房構造の破壊を阻止する方法である。この研究成果として、TNF- $\alpha$ が構造破壊の原因分子であることを報告した。3番目は病変後期段階である残存導管細胞にAQP5を発現させる方法である。これは、導管細胞をデシタピンにて処理することにより達成可能であった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we found three findings. First, lymphocytic infiltration in the Sjogren's syndrome salivary glands was achieved by the translocation of 5- $\alpha$ -reductase from the nucleus to cytoplasm. Second, destruction of acinar structure of Sjogren's syndrome salivary gland was induced by the activation of MMP-9 by TNF- $\alpha$ . Third, salivary duct cells lacking the expression of aquaporin (AQP)-5 was induced to express AQP5 by the treatment with DNA demethylating agent, decitabine.

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：シェーグレン症候群 NF-kB MMP-9 アポトーシス アクアポリン5

### 1. 研究開始当初の背景

シェーグレン症候群はドライマウスとドライアイという乾燥症状を主徴候とする自己免疫疾患である。本疾患は未だ発症原因が解明されていないため、その根治的治療法は存在しない。シェーグレン症候群唾液腺における病理学的特徴としては、小葉内導管周囲の巣状リンパ球浸潤と腺組織破壊、そして導管細胞の増殖が挙げられる。そこで病理組織学的変化、すなわち各病変段階に対応した治療法を構築することが求められる。

### 2. 研究の目的

(1) 唾液腺病変の初期段階であるリンパ球浸潤に対する浸潤阻止療法である。すなわち、アポトーシスや $\alpha$ -fodrinなどの臓器特異的自己抗原の成立により、唾液腺導管周囲組織においてリンパ球の浸潤が開始される。そこでこの現象を性ホルモン発現の観点から解析することを目的とする。

(2) 唾液腺病変の中期段階である腺房構造の萎縮・消失に対する腺房構造安定化療法である。すなわち、唾液腺を含む多くの臓器の構築において非常に重要な役割を担っている基底膜が、腺房細胞による異常かつ不完全な laminin  $\alpha$ 1 chain/laminin 1 産生のため、あるいは何らかの原因により腺房細胞周囲の基底膜が分解されることにより、腺房細胞はアノキス(アポトーシス)に陥り、腺組織破壊が引き起こされる。そこでシェーグレン症候群唾液腺組織において発現の認められるサイトカインである TNF- $\alpha$ に焦点を絞り、腺房細胞における TNF- $\alpha$ によって誘導される転写因子 NF- $\kappa$ B および MMP-9 発現の観点から解析するとともに、これらの抑制が腺房構造消失阻止につながることを目的とする。

(3) 唾液腺病変の後期段階である残存導管細胞に対する水(唾液)分泌機能の付与療法である。すなわち、導管細胞周囲の laminin  $\alpha$ 1/laminin は完全な構造をしているため、導管細胞は正常に増殖・分化し、消失した腺房細胞に置き換わる。そこで正常導管細胞には発現のみられない水輸送膜蛋白であるアクアポリン 5 (AQP5)を導管細胞に発現させることにより、唾液分泌機能を消失した唾液腺組織に水分泌機能を付与することを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) 培養唾液腺腺房細胞と導管細胞における性ホルモン代謝酵素群の検索について。血中に存在する前駆物質である dehydroepiandrosterone sulphate (DHEA-S) は steroid sulfate (STS)により DHEA に変わる。細胞内 DHEA は 17- $\beta$ -HSD により testosterone に変化する。そして一部の testosterone は核内に移行し 5- $\alpha$ -reductase によって男性ホルモンである dihydrotestosterone (DHT)に変換する。そし

て残りの testosterone は細胞の分泌側に存在する aromatase によって女性ホルモンである 17- $\beta$ -estradiol に変換する。そこで上記酵素群の発現について、それぞれの抗体を用いて間接蛍光抗体法にて検索する。また酵素群 mRNA 発現につき定量的に解析する。すなわち、それぞれのプライマーを用いて定量的 Real-time RT-PCR にて検索する。

(2) シェーグレン症候群モデルマウスに対する Bortezomib およびアルカロイド製剤の治療効果の検討について。

モデルマウスの腹腔内に生後 3 週後 (n=20)、4 週後 (n=20)、6 週後 (n=20)、8 週後 (n=20)、10 週後 (n=20) から週 5 回の割合で Bortezomib (15  $\mu$ g/マウス, n=25; 150  $\mu$ g/マウス, n=25)あるいはアルカロイド製剤 (10  $\mu$ g/マウス, n=25; 100  $\mu$ g/マウス, n=25)の投与を開始する。コントロール群として生食投与群を用いる。そして生後 11 週の時点ですべてのマウスを屠殺する。マウスより顎下腺、舌下腺、耳下腺と涙腺組織を摘出し、H&E 染色を行う。以上の解析より、唾液腺や涙腺組織におけるリンパ球浸潤の程度と腺組織破壊の進行度の観点から Bortezomib とおよびアルカロイド製剤の治療効果を判定する。次に、薬剤の治療効果のメカニズムを解明するため、基底膜分解のメカニズムに準じて検索する。すなわち、唾液腺および涙腺組織切片を用いて、NF- $\kappa$ B のサブユニットである p65 とリン酸化 I $\kappa$ B- $\alpha$ 、MMP-9 および IV 型コラーゲンの発現につき免疫組織化学的に解析する。

(3) 脱メチル化 AQP5 遺伝子プロモーター結合 AQP5 cDNA の培養導管細胞への遺伝子導入について。

AQP5 プロモーター領域の 24 番目と 31 番目の CpG ジヌクレオチドに着目し、CpG のシトシンがメチル化されているものと脱メチル化されているものを組み合わせた 4 種類の AQP5 プロモーター領域のオリゴヌクレオチドを作成する。これら 4 種類のオリゴヌクレオチドの転写活性については luciferase assay にて検索する。すなわち、プロモーター領域の各オリゴヌクレチドを luciferase reporter plasmid に組み込み、導管細胞に transfection する。これら導入細胞を luciferase 発光基質と反応させ、蛍光強度を測定し AQP5 プロモーター領域の転写活性を評価する。そして最も転写活性の高いオリゴヌクレオチドと AQP5 cDNA を adenovirus vector に組み込む。遺伝子導入された細胞における AQP5 の発現と機能について解析する。

### 4. 研究成果

(1) 唾液腺病変の初期段階であるリンパ球浸潤のメカニズムにつき解析した。その結果、不死化培養唾液腺腺房細胞と導管細胞を TNF- $\alpha$  にて処理することにより、5- $\alpha$ -reductase と aromatase の発現については Real-time RT-PCR にて解析したところ、

導管細胞においては 5- $\alpha$ -reductase mRNA 野  
発現低下が認められた。腺房細胞においては、  
TNF- $\alpha$  処理による 5- $\alpha$ -reductase と  
aromatase の mRNA 発現に変化はみられなかつ  
た。このことは、シェーグレン症候群唾液腺  
において観察される、導管細胞周囲へのリン  
パ球浸潤の所見と合致するものであった。

(2) 腺房機能の安定化療法と唾液分泌機能  
の付与療法について。

シェーグレン症候群唾液腺において認めら  
れる唾液分泌低下に関して解析を行った。一  
般に唾液腺に浸潤したリンパ球から分泌さ  
れるサイトカインである TNF- $\alpha$  が唾液分泌抑  
制に関与していると考えられている。そこで  
腺房細胞における AQP5 発現に及ぼす TNF- $\alpha$   
の影響につき解析した。その結果、TNF- $\alpha$  は  
腺房細胞において AQP5 の発現を mRNA と蛋白  
レベルで抑制するとともに、腺房細胞からの  
水分分泌量の低下を引き起こした。そこで  
TNF- $\alpha$  による AQP5 発現抑制のメカニズムを解  
析したところ、TNF- $\alpha$  は腺房細胞のヒストン  
H4 のアセチル化レベルを低下させるととも  
に、chromatin immunoprecipitation 解析よ  
り、AQP5 プロモーター領域でのヒストン H4  
のアセチル化レベルを低下させることを明  
らかにした。したがって、TNF- $\alpha$  による AQP5  
発現抑制機構には AQP5 遺伝子プロモーター  
領域における脱アセチル化が関与している  
ことが示唆された。

(3) 加齢に伴う AQP5 発現変化について。

シェーグレン症候群は閉経した女性に好発  
することから、加齢に伴う AQP5 発現につき  
解析した。すなわち、モデルマウスの加齢に  
伴う唾液分泌量低下を確認した後、DNA 脱メ  
チル化剤であるデシタピンを投与し、唾液分  
泌量の回復と AQP5 遺伝子プロモーター領域  
における脱メチル化を検索した。その結果、  
デシタピンにより唾液分泌量の回復がみら  
れ、トータル DNA の脱メチル化と AQP5 遺  
伝子プロモーター領域での脱メチル化が MSP  
にて確認された。したがって、シェーグレン  
症候群唾液腺病変における新規治療法の構  
築を示唆しているものと考えられる。

## 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 14 件)

1. Kani K, Momota Y, Harada M, Yamamura Y, Aota K, Yamanoi T, Takano H, Motegi K, Azuma M.  $\gamma$ -tocotorienol enhances the chemosensitivity of human oral cancer cells to docetaxel through the downregulation of the expression of NF- $\kappa$ B-regulated anti-apoptotic gene products. *International Journal of Oncology*, 査読有り, 42, 2013: 75-82. DOI: 10.3892/ijco.2012.1692.
2. Momota Y, Takano H, Kani K, Matsumoto F, Motegi K, Aota K, Yamamura Y, Omori M, Tomioka S, Azuma M. Frequency analysis of heart rate variability: a useful assessment tool of linearly polarized near-infrared irradiation to stellate ganglion area for burning mouth syndrome. *Pain Medicine*, 査読有り, 14, 2013: 351-357. DOI: 10.1111/pme.12008.
3. Momota Y, Tomioka S, Furukita M, Satsuma T, Takano H, Azuma M. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology, 査読有り, 25, 2013: 264-266. DOI: 10.1016/j.ajoms.2013.02.008.
4. Aota K, Azuma M. Targeting TNF- $\alpha$  suppresses the production of MMP-9 in human salivary gland cells. *Archives Oral Biology*, 査読有り, 58, 2013: 1761-1768. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2013.09.004.
5. 山村佳子、桃田幸弘、松本文博、茂木勝美、青田桂子、高野栄之、大守真由子、河野文昭、東 雅之。徳島大学病院の口腔ケア依頼状況。日本口腔ケア学会雑誌, 査読有り, 7, 2013: 31-35. URL: <http://www.oralcare-jp.org>
6. 青田桂子、山村佳子、可児耕一、高野栄之、茂木勝美、桃田幸弘、石丸直澄、東 雅之。Sjogren 症候群患者の唾液腺腺房構造破壊阻止-セファランチンの有効性に関する臨床病理学的研究-。日本口腔科学会雑誌, 査読有り, 62, 2013: 254-261. URL: <http://www.stomatol.umin.jp>
7. 青田桂子、高野栄之、細川浩良、可児耕一、山村佳子、東 雅之。リツキシマブの投与によって生じた口腔・上部消化管潰瘍の 1 例。日本口腔外科学会雑誌, 査読有り, 59, 2013: 478-482. URL: <http://www.jsoms.or.jp>
8. 青田桂子、山村佳子、大守真由子、山田佑子、可児耕一、高野栄之、茂木勝美、桃田幸弘、松本文博、東 雅之。精神科神経科入院患者の口腔環境評価と専門的口腔ケアの有用性について。有病者歯科医療, 査読有り, 22, 2013: 83-90. URL: <http://www.jjmcp.jp>
9. 桃田幸弘、細川浩良、高野栄之、可児耕一、松本文博、茂木勝美、青田桂子、山村佳子、大守真由子、東 雅之。口腔白板症の臨床病理学的検討-悪性化に関する臨床病理学的指標について-。日本口腔検査学会雑誌, 査読有り, 5, 2013: 26-30. URL: <http://www.jsedp.jp>

10. Yamamura Y, Motegi K, Kani K, Takano H, Momota Y, Aota K, Yamanoi T, Azuma M. TNF- $\alpha$  inhibits aquaporin 5 expression in human salivary gland acinar cells via suppression of histone H4 acetylation. *Journal of Cellular and Molecular Biology*, 査読有り, 8, 2012: 1766-1775. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2011.01456.x
11. Yamamura Y, Aota K, Yamanoi T, Kani K, Takano H, Momota Y, Motegi K, Azuma M. DNA demethylating agent decitabine increases AQP5 expression and restores salivary function. *Journal of Dental Research*, 査読有り, 91, 2012: 612-617. DOI: 10.1177/0022034512446343
12. 細川浩良、桃田幸弘、藤澤健司、可児耕一、東 雅之. 上顎に生じた歯牙エナメル上皮腫の1例. *日本口腔外科学会雑誌*, 査読有り, 58, 2012: 480-483. URL: <http://www.jsoms.or.jp>
13. 高野栄之、桃田幸弘、可児耕一、松本文博、茂木勝美、青田桂子、山村佳子、大守真由子、東 雅之. 副オトガイ孔を走行する神経様組織の捻除により口唇感覚異常が改善した症候性三叉神経痛の1例. *日本口腔検査学会雑誌*, 査読有り, 4, 2012: 45-48. URL: <http://www.jsedp.jp>
14. 桃田幸弘、高野栄之、可児耕一、松本文博、茂木勝美、青田桂子、山村佳子、大守真由子、東 雅之. 舌痛などの舌症状を主訴とする患者の臨床統計学的検討-舌痛症の特異性について-. *日本口腔顔面痛学会雑誌*, 査読有り, 5, 2012: 27-35. URL: <http://www.jorofacialpain.sakura.ne.jp>

〔学会発表〕(計 26 件)

1. 山村佳子、茂木勝美、青田桂子、東 雅之. ヒト唾液腺腺房細胞における AQP5 発現機構-MAPK 経路の関与-. 第 50 回日本口腔組織培養学会学術大会, 2013 年 11 月 23-24 日, 日本歯科大学生命歯学部九段ホール(東京都).
2. 可児耕一、桃田幸弘、高野栄之、青田桂子、東 雅之. 下顎歯肉に生じた周辺性エナメル上皮腫の1例. 第 61 回日本口腔科学会中国・四国地方部会, 2013 年 11 月 16 日, 岡山大学鹿田キャンパス(岡山県).
3. 松本文博、桃田幸弘、高野栄之、山村佳子、可児耕一、青田桂子、茂木勝美、東 雅之.

顎関節症と鑑別を要する疾患あるいは障

害に関する実態調査-紹介により顎関節症外来を受診した患者における検討-. 第 61 回日本口腔科学会中国・四国地方部会, 2013 年 11 月 16 日, 岡山大学鹿田キャンパス(岡山県).

4. Kani K, Momota Y, Takano E, Yamamura Y, Aota K, Motegi K, Azuma M.  $\gamma$ -tocotrienol enhances the chemosensitivity of human oral cancer cells to docetaxel through the downregulation of the expression of NF- $\kappa$ B-regulated anti-apoptotic gene products. 18th World Congress on Advances in Oncology and 16th International Symposium on Molecular Medicine. 2013/10/10-12, Creta Maris Hotel, Crete-Greece (Greece).
5. 高野栄之、桃田幸弘、東 雅之. 障害者歯科医療連携によって治療した脊椎損傷後半身不随を後遺する口底癌の1例. 第 58 回日本口腔外科学会総会・学術大会, 2013 年 10 月 11-13 日, 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡(福岡県).
6. 桃田幸弘、高野栄之、東 雅之. いわゆる病病連携による障害者歯科医療連携が奏功した集学的歯科治療について. 第 58 回日本口腔外科学会総会・学術大会, 2013 年 10 月 11-13 日, 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡(福岡県).
8. 桃田幸弘、茂木勝美、青田桂子、高野栄之、可児耕一、東 雅之. ワルファリン療法中に急速に増大・破裂した軟硬口蓋粘膜下血腫の1例. 第 67 回日本口腔科学会学術集会, 2013 年 5 月 22-24 日, 栃木県総合文化センター(栃木県).
9. 青田桂子、山村佳子、可児耕一、高野栄之、茂木勝美、桃田幸弘、松本文博、石丸直澄、東 雅之. シェーグレン症候群に対する新規治療戦略-唾液腺腺房構造の破壊を阻止する-. 第 67 回日本口腔科学会学術集会, 2013 年 5 月 22-24 日, 栃木県総合文化センター(栃木県).
10. 山村佳子、茂木勝美、青田桂子、高野栄之、可児耕一、桃田幸弘、東 雅之. ヒト唾液腺腺房細胞における恒常的 AQP5 発現制御機構. 第 67 回日本口腔科学会学術集会, 2013 年 5 月 22-24 日, 栃木県総合文化センター(栃木県).
11. 山村佳子、桃田幸弘、青田桂子、高野栄之、可児耕一、茂木勝美、松本文博、長井幸二郎、東 雅之. 徳島大学病院腎臓内科との医・歯連携-腎疾患患者の口腔管理について-. 第 42 回日本口腔外科学会中国四国支部学術集会, 2013 年 4 月 27 日, 隠岐島文化会館(島根県).
12. Aota K, Azuma M.

- Effectiveness of professional oral care for the improvement of oral hygiene in inpatients with psychiatry neurology. Asean Plus Tokushima Joint International Conference, 2012/12/7-8, Royal Ambarukmo Hotel (Yogyakarta, Indonesia).
13. Yamamura Y, Azuma M.  
Mechanism involved in the constitutive expression of AQP5 in human salivary gland acinar cells. Asean Plus Tokushima Joint International Conference, 2012/12/7-8, Royal Ambarukmo Hotel (Yogyakarta, Indonesia).
  14. 青田桂子、茂木勝美、山村佳子、高野栄之、大守真由子、山田佑子、可児耕一、桃田幸弘、松本文博、石丸直澄、東 雅之.  
シェーグレン症候群患者におけるセファランチンの唾液分泌促進効果. 第21回日本シェーグレン症候群学会学術集会. 2012年9月7-8日, ウェステイン都ホテル京都(京都府).
  15. 茂木勝美、桃田幸弘、松本文博、青田桂子、高野栄之、山村佳子、可児耕一、山田佑子、東 雅之.  
抜歯後の止血困難をきっかけに発見された後天性血友病の1例. 第57回日本口腔外科学会学術大会. 2012年10月19-21日, パシフィコ横浜会議センター(神奈川県).
  16. 山村佳子、青田桂子、茂木勝美、桃田幸弘、高野栄之、可児耕一、松本文博、東 雅之.  
加齢に伴う唾液腺機能低下に対するDNA脱メチル化剤の有効性. 第57回日本口腔外科学会学術大会. 2012年10月19-21日, パシフィコ横浜会議センター(神奈川県).
  17. 青田桂子、高野栄之、可児耕一、山村佳子、山田佑子、原田道人、山ノ井朋子、茂木勝美、桃田幸弘、松本文博、東 雅之.  
リツキシマブ投与半年後に難治性口底潰瘍を生じた原発性マクログロブリン血症の1例. 第57回日本口腔外科学会学術大会. 2012年10月19-21日, パシフィコ横浜会議センター(神奈川県).
  18. 可児耕一、桃田幸弘、高野栄之、松本文博、茂木勝美、青田桂子、山村佳子、山田佑子、山ノ井朋子、原田道人、東 雅之.  
ドセタキセルと $\gamma$ -トコトリエノールの併用による舌癌細胞株に対する抗腫瘍効果の検討. 第57回日本口腔外科学会学術大会. 2012年10月19-21日, パシフィコ横浜会議センター(神奈川県).
  19. 東 雅之.  
臨床における唾液腺機能再生療法. 第57回日本口腔外科学会学術大会. 2012年10月19-21日, パシフィコ横浜会議センター(神奈川県).
  20. 山村佳子、青田桂子、茂木勝美、山ノ井朋子、可児耕一、原田直人、桃田幸弘、松本文博、東 雅之.  
加齢関連メチル化遺伝子AQP5の機能回復と唾液分泌促進作用. 第60回日本口腔科学会中国・四国地方部会, 2012年10月6日, 広島大学広仁会館(広島県).
  21. 青田桂子、山村佳子、大守真由子、山ノ井朋子、可児耕一、高野栄之、茂木勝美、桃田幸弘、松本文博、東 雅之.  
シェーグレン症候群患者の唾液腺腺房構造破壊阻止-セファランチンの有効性に関する臨床病理学的研究-. 第66回日本口腔科学会学術集会, 2012年5月17-18日, 広島国際会議場(広島県).
  22. 可児耕一、桃田幸弘、高野栄之、松本文博、茂木勝美、青田桂子、山村佳子、大守真由子、東 雅之.  
舌癌細胞株に対するドセタキセルの抗腫瘍効果に及ぼす $\gamma$ -トコトリエノールの影響. 第66回日本口腔科学会学術集会, 2012年5月17-18日, 広島国際会議場(広島県).
  23. 山村佳子、桃田幸弘、青田桂子、大守真由子、松本文博、茂木勝美、高野栄之、可児耕一、河野文昭、東 雅之.  
医科疾患を有する患者の治療前歯科・口腔ケア介入. 第41回日本口腔外科学会中・四国地方会, 2012年4月28日, 愛媛大学総合情報メディアセンター(愛媛県).
  24. 高野栄之、桃田幸弘、可児耕一、青田桂子、大守真由子、松本文博、茂木勝美、山村佳子、河野文昭、東 雅之.  
徳島大学病院ICUにおける口腔ケアで遭遇する舌褥瘡性潰瘍に対する試み. 第41回日本口腔外科学会中・四国地方会, 2012年4月28日, 愛媛大学総合情報メディアセンター(愛媛県).
  25. Azuma M.  
Functional regeneration of salivary gland. The 2nd International Joint Symposium on Oral and Dental Sciences. 2012/3/1, Inna Garuda (Indonesia).
  26. Azuma M.  
TNF- $\alpha$  inhibits AQP5 expression in human salivary gland acinar cells via suppression of histone H4 acetylation. Autoimmunity Congress Asia, 2011/11/17, Suntec Singapore International Convention & Exhibition Centre (Singapore).
- [図書](計 1 件)
1. 松本文博、茂木勝美、高野栄之、可児耕一、東 雅之. 医歯薬出版株式会社. 歯科医

師のための医学ハンドブック. 2014年,  
2-7頁, 180頁, 190-193頁, 総頁数 222頁.

〔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

東 雅之 (AZUMA, Masayuki)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授  
研究者番号: 21144983

### (2) 研究分担者

茂木 勝美 (MOTEGI, Katsumi)  
徳島大学・病院・助教  
研究者番号: 20335805

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: