

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成26年3月10日現在

機関番号：	16101
研究種目：	基盤研究 (C)
研究期間：	2011~2013
課題番号：	23592925
研究課題名 (和文)	サイトカイン療法と唾液腺機能再生療法によるシェーグレン症候群の新規治療法の開発
研究課題名 (英文)	Development of new therapy of Sjögren's syndrome; by using with cytokine and regenerative medicine.
研究代表者	
	茂木 勝美 (MOTEGI KATSUMI)
	徳島大学・病院・助教
	研究者番号：20335805
交付決定額 (研究期間全体)：	(直接経費) 4,000,000 円、(間接経費) 1,200,000 円

研究成果の概要 (和文)： シェーグレン症候群(SS)患者の唾液腺においてはアクアポリン(AQP)5 の発現低下や分布異常が生じており、これが唾液分泌低下の一因であると考えられているが、その詳細なメカニズムは不明である。本研究においては AQP5 の発現していない培養ヒト唾液腺導管細胞を DNA 脱メチル化剤であるデシタビンにて処理すると AQP5 の発現が誘導され、細胞の水輸送能も増強されることに着目し、そのメカニズムの解析を行うとともに、臨床への応用を目的として動物実験における検証をおこなった。

研究成果の概要 (英文)： Sjögren's syndrome (SS) is a systemic autoimmune disease that involves a reduction in salivary and lacrimal secretions, however, the mechanisms underlying the decrease in salivary secretion remains unclear. In salivary glands of SS patients, the expression of aquaporin (AQP) 5, a major water channel present in the apical plasma membrane, was decreased and aberrant distribution of AQP5 from apical to basal membrane was reported. The mechanisms of AQP5 dysfunction in SS salivary glands have not yet fully understood. We demonstrate that an immortalized normal human salivary gland ductal cell (NS-SV-DC) line, lacking the expression of AQP5, acquires AQP5 gene expression in response to treatment with 5-aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-CdR), a DNA demethylating agent. The expressed AQP5 protein was functionally active. We examined the mechanisms of induction of AQP5 in vitro and in vivo, to discuss suggests that a DNA demethylating agent may be a useful drug for restoring hyposalivation in elderly individuals, thereby leading to the resolution of xerostomia.

研究分野：口腔内科学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：①シェーグレン症候群 ②唾液分泌 ③アクアポリン ④DNA 脱メチル化剤

1. 研究開始当初の背景

我々は、培養ヒト唾液腺腺房細胞を用いて、TNF- α による腺房構造破壊のメカニズムを明らかにし、転写因子である NF- κ B が中心的役割を果たしていることを報告した。しかし、シェーグレン症候群の患者でも唾液腺に腺房が多く残っていることがあり、腺房細胞のアポトーシスだけで全てを説明することはできない。そこで、我々は、唾液分泌において重要な役割を果たす水チャネル蛋白質アクアポリン(AQP)5に着目した。AQP5はヒト唾液腺では腺房細胞だけに発現が認めら

れている。我々は、TNF- α が培養ヒト唾液腺腺房細胞において、AQP5の発現を低下させることを確認した。このように TNF- α は AQP5の発現低下と、腺房構造の破壊といった異なるメカニズムの両方に関与していることが推測される。また、我々は AQP5の発現していない培養ヒト唾液腺導管細胞を、DNA 脱メチル化剤にて処理し、導管細胞に AQP5を発現誘導させ、実際に水輸送機能が増強されることを確認した。このメカニズムは、AQP5プロモーター領域の脱メチル化により AQP5遺伝子発現の再活性化が誘導された結果であ

った。我々のこれまでの研究成果をもとに、最も効果的なシェーグレン症候群の治療法として、TNF- α と AQP5 のプロモーター領域のメチル化をターゲットとした治療法開発の発想に至ったものである。

2. 研究の目的

シェーグレン症候群に対する治療戦略として次の方法を立案した。

すなわち、唾液腺腺房の構造破壊による唾液分泌機能の改善法としては、(1)細胞の基底膜を破壊する一因である TNF- α の機能を阻害する方法、(2)破壊された腺房細胞に代わって、残存する導管細胞に AQP5 を発現誘導させ、導管細胞に腺房細胞の機能を付与させる方法である。さらに、唾液腺の機能低下による唾液分泌減少には、(3)TNF- α の機能を制御することによって AQP5 の発現低下を回避し、唾液分泌の機能回復を目指す。このような治療戦略により、シェーグレン症候群患者の口腔乾燥を根本的に改善させることを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

(1) 実験動物と使用薬剤

24 週齢メスの C57BL/6CrSlc マウス（日本 SLC より購入）を使用した。マウスに DNA 脱メチル化剤であるデシタピンを投与し、唾液分泌に及ぼすデシタピンの効果ならびにその際の唾液腺における AQP5 の発現様式を解析した。

デシタピンは 1mg/kg となるように、マウスの腹腔内に投与した。対象群としては生理食塩水を腹腔内に投与した。なお、投与回数は週 3 回、投与期間は 3 週間とした。薬剤の投与終了後、マウスは塩酸ケタミンによる麻酔下で無痛的に屠殺処理し、唾液腺組織を採取した。

(2) 唾液分泌量の測定

マウスの分泌する唾液量の測定は Delporte らが 1997 年に報告した実験方法に準じて行った。すなわち、無麻酔下に唾液分泌促進作用のある塩酸ピロカルピン (5mg/kg) を筋肉内に注射し、その後 15 分間に分泌された唾液をガーゼに染み込ませ、重量を測定することで唾液分泌量を測定した。

(3) 組織切片の作製と AQP5 発現の解析

マウスより摘出した唾液腺（顎下腺、耳下腺、舌下腺）は 4%ホルマリン緩衝液で固定した後、パラフィン包埋し、組織切片を作製した。組織切片をヘマトキシリン-エオジンにて染色して、唾液腺組織の観察を行った。また、マウスの唾液腺組織における AQP5 の発現は、抗マウス AQP5 抗体を用いて、免疫組織学的

染色を行い、その発現様式を解析した。

(4) ウェスタンブロット法

マウスの唾液腺組織より調製したタンパク質を β -メルカプトエタノールを含むサンプルバッファーに混和した後、10%SDS-ポリアクリルアミドゲルを用い、電気泳動を行った。その後、ニトロセルロース膜に転写した。次に、転写したニトロセルロース膜を 2%スキムミルク含有 T-TBS にて処理した後、1,000 倍希釈濃度の抗 AQP5 抗体と 4°C にて 16 時間反応させた。T-TBS にて洗浄後、1,000 倍希釈濃度の HRP 標識ウサギ IgG 抗体を用いて室温にて 1 時間反応させた。T-TBS にて洗浄後、ECL kit にて検出した。

4. 研究成果

(1) デシタピン投与によりマウスの唾液分泌は促進された。

24 週齢メスの C57BL/6CrSlc マウスにデシタピン (1mg/kg) を投与し、1 週間毎にマウスの唾液分泌量を測定したところ、マウスの唾液分泌量は投与回数に相関して増加する傾向が見られ、投与 2 週間後からは統計学的に有意に増加した。(図 1)

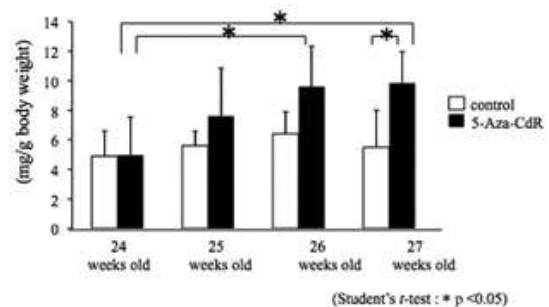


図 1 デシタピン投与によるマウスの唾液分泌の増加

(2) デシタピン投与によりマウス唾液腺における AQP5 の発現は著明に増加した。

デシタピンを 3 週間 (24 週齢～27 週齢まで、週に 3 回腹腔内投与を実施) 投与したマウスから唾液腺組織 (顎下腺、耳下腺、舌下腺) を採取し、組織から蛋白を抽出しウェスタンブロット法により AQP5 の発現を解析した。その結果、デシタピン投与群のマウス唾液腺組織 (顎下腺、耳下腺、舌下腺の全ての組織) において AQP5 蛋白の発現に著明な増強が認められた。(図 2) なお、参考のため 6 週齢メスの C57BL/6CrSlc マウスの顎下腺における AQP5 の発現も解析したが、デシタピン投与群と比較し、その発現は低かった。(図 2 左端のレーン)

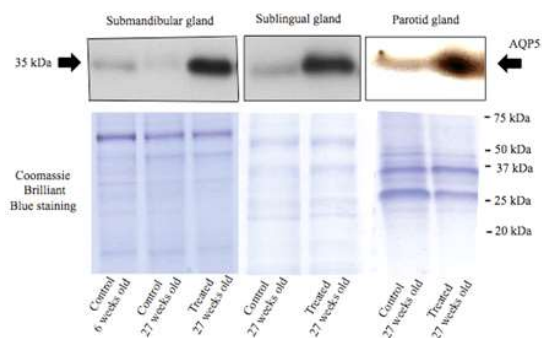


図2 デシタビンによるマウス唾液腺組織でのAQP5の発現増強 (ウエスタンブロット法)

(3) デシタビン投与によりマウス唾液腺におけるAQP5の発現は著明に増加した。(免疫組織学的解析)

デシタビンを3週間(24週齢~27週齢まで)投与したマウスから唾液腺組織(顎下腺、耳下腺、舌下腺)を採取し、組織切片を作製した後、免疫組織学的染色によりAQP5の発現様式とその局在を解析した。その結果の代表例として顎下腺組織での解析結果を図3に示す。デシタビン未投与群の導管構造において、導管の管腔側にAQP5の発現は認められなかった(図3Aの矢印で示す)。しかし、デシタビンを投与することによって導管構造の管腔側においてAQP5の発現誘導が認められた(図3Bの矢印で示す)。なお、本来AQP5を発現している腺房細胞においては、AQP5は腺房細胞の唾液分泌側の細胞膜に局在しており、その発現はデシタビン処理によって著明に増強された(図3C、Dの星印で示す)。なお、図に示していないが、耳下腺組織、舌下腺組織においても同様の所見が認められた。

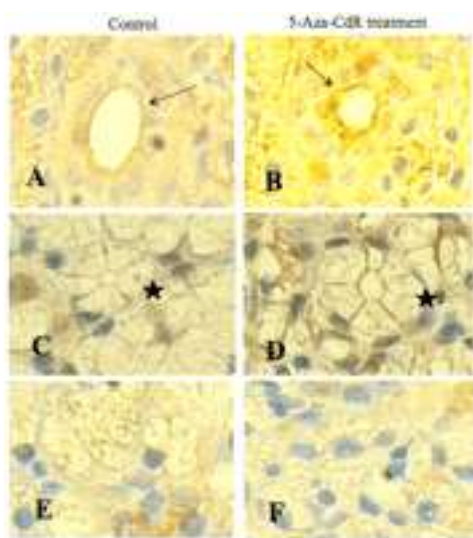


図3 マウス顎下腺組織におけるAQP5の発現様式の解析 A:未処理マウスの導管構造。

矢印は導管の管腔側。B: デシタビン投与マウスの導管構造。矢印は導管の管腔側。C, D: 未処理マウス(C)とデシタビン投与マウス(D)の腺房構造。抗AQP5抗体を用いた免疫組織学的染色を行った。星印は唾液分泌側の細胞膜。E, F: 未処理マウス(E)とデシタビン投与マウス(F)の腺房構造。AQP5抗体の代わりにマウスIgGにて免疫染色を実施。

(4) 本研究の位置づけと今後の展望

本研究は、AQP5の発現の認められない培養ヒト唾液腺導管細胞をデシタビンにて処理すると、AQP5の発現が誘導されるという過去の研究成果に基づき、将来的な臨床応用を視野にいれておこなった。研究成果に示すように *in vitro* の研究結果と同様の現象が *in vivo* でも再現されることが確認された。

DNA脱メチル化剤であるデシタビンはアメリカにおいて2006年に骨髄異形成症候群の治療薬として認可されているが、本邦においての使用は認可されていない。

本研究においてはマウスの腹腔内に投与し唾液分泌が増強されるという良好な結果が得られたが、ヒトに対して臨床応用する場合には薬剤の副作用や投与方法など問題となる点がまだまだ多く存在する。薬剤に関しては細胞毒性の弱いDNA脱メチル化剤の選択が必要と思われる。また、投与方法としては薬剤の全身投与では多くの問題が生じる可能性が懸念されるため、唾液が分泌される導管から薬剤を注入する方法や唾液腺組織自体に薬剤を直接注入する方法などを検討する準備がある。

口腔乾燥症は生命を直接脅かす疾患ではないため、現在まで症状を改善させる根本的な治療法が開発されていないのが現状である。しかし、口腔乾燥は患者のQOLを著しく低下させる疾患であり、医学的な需要は十分にあると考えられる。本研究の成果が、将来的に口腔乾燥症ならびにシェーグレン症候群の治療の一助になることを期待する。

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 3件)

①YAMAMURA Y, MOTEGI K, AZUMA M, DNA demethylating agent decitabine increases AQP5 expression and restores salivary function. *J Dent Res* 91, 612-617 2012. doi: 10.1177/0022034512446343. 査読あり

②YAMAMURA Y, MOTEGI K, AZUMA M, TNF- α inhibits aquaporin 5 expression

in human salivary gland acinar cells via suppression of histone H4 acetylation. J Cell Mol Med 16, 1766-1775, 2012. doi: 10.1111/j.1582-4934. 査読あり

③山村佳子、茂木勝美、東雅之
TNF- α による唾液腺腺房細胞でのヒストン H4脱アセチル化を介したAQP5発現抑制 日本口腔組織培養学会総会雑誌 21 33-34, 2012
査読なし

[学会発表] (計 3件)

①山村佳子、茂木勝美、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66回日本口腔科学会学術集会 2012年5月17日 広島国際会議場 (広島県)

②山村佳子、茂木勝美、東雅之
TNF- α による唾液腺腺房細胞でのヒストン H4脱アセチル化を介したAQP5発現抑制 第48回日本口腔組織培養学会総会 2011年11月19日 明海大学浦和キャンパス(千葉県)

③山村佳子、茂木勝美、東雅之
唾液腺腺房細胞における TNF- α による AQP5 発現抑制機構 第56回日本口腔外科学会総会 2011年10月22日 大阪国際会議場(大阪府)

[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
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者
茂木 勝美 (MOTEGI KATSUMI)
徳島大学・病院・助教
研究者番号：20335805

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：