

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791743

研究課題名(和文) 加齢および慢性炎症による細胞障害が誘導するDアミノ酸発現の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the expression of D-amino acids induced by cellular damage with aging or chronic inflammations

研究代表者

鈴木 祐輔 (Suzuki, Yusuke)

山形大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：50466629

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：生体内に存在しないと考えられてきたが、近年その様々な生理的機能が注目されているDアミノ酸、特にDアスパラギン酸の耳鼻咽喉科領域における発現について検討した。口蓋扁桃、中耳真珠腫、鼻ポリープ、声帯ポリープなど慢性炎症が関わる病変部位にDアスパラギン酸の発現を認め、発現量と年齢にも相関関係を認めた。口蓋扁桃や中耳真珠腫では病態により発現パターンが異なる物もあり、病態の発生機序にD-アスパラギン酸が関与している可能性も示唆された。

研究成果の概要(英文)：While it is considered that D-amino acids were eliminated from living organisms, various physiological functions of D-amino acids have received a lot of attention in recent years. We discussed the expression of D-aspartic acid in various tissues of the otorhinolaryngological field. D-aspartic acid expressed in palatine tonsils, cholesteatomas, nasal polyps and vocal cord polyps, which are involved in the chronic inflammation. It was revealed the correlation between aging and the expression levels of D-aspartic acid. A different expression pattern was identified in different disease states of palatine tonsils and cholesteatomas, so it was seemed that D-aspartic acid is concerned in the mechanism of disease states.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：D-アミノ酸 老化 加齢 慢性炎症

### 1. 研究開始当初の背景

我々の生体にはL体のアミノ酸のみが存在すると考えられてきたが、近年その光学異性体であるD体のアミノ酸(D-アミノ酸)が人の組織内に多量に存在し、様々な生理的機能を担っていることが明らかとなっている。主たるD-アミノ酸としてはD-セリン(D-Ser)とD-アスパラギン酸(D-Asp)が知られている。

D-Serはグルタミン酸受容体の1つであるNMDA受容体の活性調節や統合失調症に関与することが明らかとなっている。

一方D-Aspは出現のピークが臓器の機能・形態の成熟時期と一致するため分化や成熟に関連すると考えられている。またタンパク質中のアスパラギン酸は加齢とともにラセミ化が進みD体となることが知られている。そしてD-Asp含有タンパク質が、老化した水晶体、脳、皮膚、骨、動脈壁など組織に多く蓄積しているため老化や自然放射線や活性酸素などの慢性炎症との関連が研究されている。タンパク質の不溶化や凝集を起こして白内障の原因となることや、アルツハイマー病におけるタンパク質中にD-Aspが認められることが報告されているが、D-AspはD-Serに比べいまだ不明な点が多い。

### 2. 研究の目的

患者のQOLに直結する感覚器を扱う耳鼻咽喉科領域において、アンチエイジングは非常に重要であり、特に老化や長期間のストレスに関連するD-Aspの発現様式、その機能的役割の解明は非常に興味深いところである。しかし、耳、鼻、咽頭、喉頭、頸部など耳鼻咽喉科領域におけるD-アミノ酸発現の検討は未だなされていない。

本研究では、口蓋扁桃・中耳・鼻副鼻腔・喉頭領域の組織におけるD-アミノ酸発現の有無や、発現様式と疾患との関連を検討することにより各疾患の発症機序や新たな治療法の開発の可能性を模索することを目的とした。また耳鼻咽喉科領域の組織におけるD-アミノ酸発現様式と疾患/年齢との関連の解析によりD-アミノ酸、特にD-Aspの機能的役割を解明することも目的とした。

### 3. 研究の方法

耳鼻咽喉科領域の組織のなかでも、慢性炎症の温床となっている口蓋扁桃、上皮の嵌入により慢性炎症が持続していると考えられる真珠腫、慢性炎症が成因と考えられる鼻ポリープ、声帯の酷使による刺激が原因となる声帯ポリープに対し、免疫組織化学的手法を用いてD-アミノ酸の発現様式を解析した。また、口蓋扁桃においては年齢・疾患・治療内容・重症度により、真珠腫においては年齢・成因により分けて解析を行い、D-アミノ酸の作用機序や機能的役割について検討を行った。

対象は手術加療にて摘出した、疾患を特定

せずに年齢で抽出した口蓋扁桃組織 25 症例、IgA 腎症の口蓋扁桃組織 24 症例、鼻ポリープ 10 症例、声帯ポリープ 7 症例、中耳真珠腫 15 症例。

免疫組織化学染色は抗 D-β-アスパラギン酸抗体 (Cosmo Bio Co, LTD, Tokyo) を用いて DAB 発色にて行った。染色面積の評価は 40 倍視野で任意の 4 視野を撮像し、染色部位を Photoshop にて抽出後、Image J にて計測し数値化した。

統計学的手法は、Mann-Whitney の U 検定、スピアマンの順位相関係数を用い、統計値は 5% を有意水準とした。

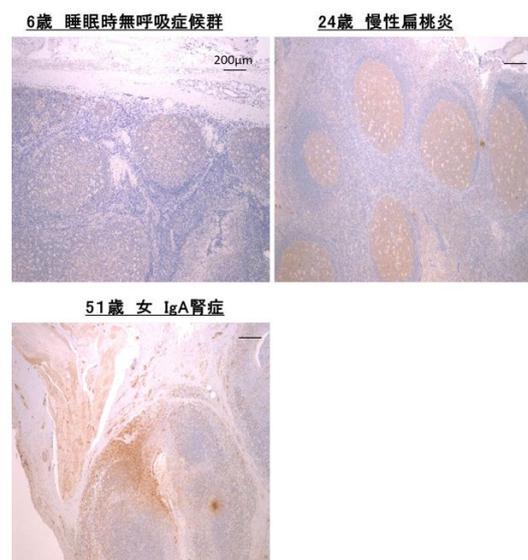
### 4. 研究成果

高齢者の水晶体において、D-Asp を含むクリスタリンが白内障の原因の一つとなるという報告や、幼児の皮膚や高齢者の非露光部皮膚には存在しない D-Asp 含有蛋白が高齢者の露光部には存在するという報告があり、D-Asp はカレイや慢性炎症との関連が示唆されているが耳鼻咽喉科領域の組織における局在の解析は今まで皆無であった。

#### (1) 口蓋扁桃組織における D-Asp 含有蛋白

我々は小児の睡眠時無呼吸症候群症例における口蓋扁桃、若年から中年の慢性扁桃炎症例における口蓋扁桃、中年から高齢者の IgA 腎症症例における口蓋扁桃に対し抗 D-Asp 抗体による免疫組織化学染色を用いた解析を行った。小児の口蓋扁桃にはほぼ認められなかった D-Asp は慢性扁桃炎症例のリンパ濾胞内や IgA 腎症症例の間質や粘膜上皮に発現していることを明らかにした (図 1)。

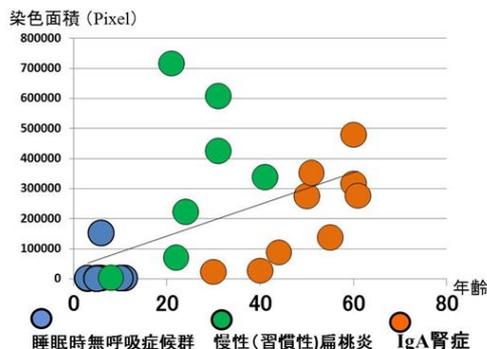
図 1 口蓋扁桃における D-Asp 発現



また、年齢と D-Asp 染色面積との関係をスピアマン順位相関係数にて解析した結果、相関係数 0.72 (P<0.01) と強い相関関係を認め、

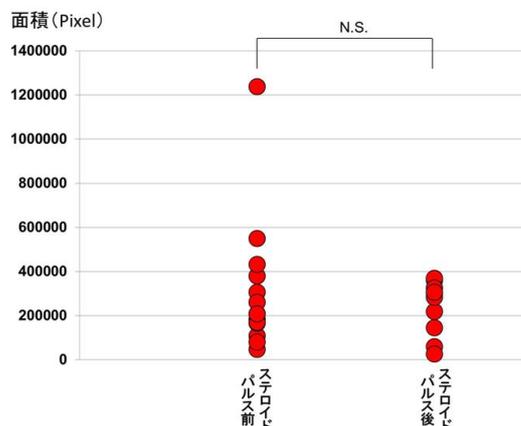
D-Asp の発現が加齢や老化による刺激と関連があることが示唆された (図 2)。

図 2 年齢と D-Asp 染色面積



口蓋扁桃組織のリンパ濾胞内や間質、管腔内に D-Asp の局在が認められたため、単球・リンパ球・IL-6 などのサイトカイン、TNF などのカスケードなどに寄与している可能性や、慢性炎症による組織の繊維化および血管新生における何らかの役割を持つことが示唆された。そこで、ステロイドによる免疫抑制作用や抗炎症作用が D-Asp 発現と関連があるかどうかを検討するために、IgA 腎症症例をステロイドパルス療法施行前 14 症例と施行後 10 症例に分けて検討を行った。その結果、D-Asp 染色パターンに大きな違いは認めず、また染色面積でも統計学的有意差は認めなかった (図 3)。またステロイドパルス施行後の 10 症例について、パルス施行から口蓋扁桃を摘出するまでの期間と D-Asp 染色面積との関連についても解析を行ったが有意な相関関係は認めなかった。以上より、D-Asp 発現の機序はアラキドン酸カスケードの下流にあるプロスタグランジン、ロイコトリエン、また炎症で活性化される NF- $\kappa$ B とは関連が低いことが示唆された。また、D-Asp が慢性的な刺激により徐々に蓄積していく蛋白だとすれば、ステロイドパルスなどの急激な刺激に対する反応に時間がかかる可能性も考えられた。

図 3 D-Asp 発現とステロイドパルスの影響

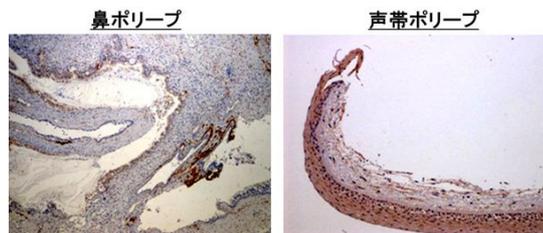


また、D-Asp 発現機序を検討するために IgA 腎症の腎予後を規定するとされる組織学的重症度分類および臨床的重症度分類と、口蓋扁桃における D-Asp 染色面積との関連を解析した。しかし、ともに有意な相関関係は認めず、口蓋扁桃における D-Asp 発現には炎症による刺激以外の機序も関与している可能性が示唆された。

### (2) 鼻ポリープ・声帯ポリープにおける D-Asp 含有蛋白

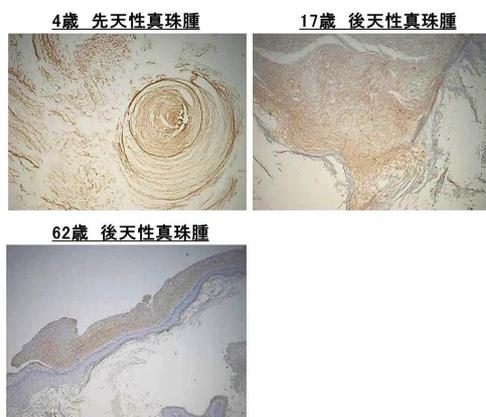
我々は、感染による炎症や発声による刺激が成因とされる鼻ポリープ、声帯ポリープについても免疫組織化学染色を用いて検討を行った。鼻ポリープでは繊毛円柱上皮もしくはその直下の分泌細胞に D-Asp の発現が認められた。強陽性に染色される試料と弱陽性に染まる試料とがあった。声帯は扁平上皮細胞のみが染色された。いずれも炎症などの刺激が発現に関与していることを示唆する結果であった (図 4)。

図 4 鼻ポリープ/声帯ポリープにおける D-Asp 発現



(3) 中耳真珠腫における D-Asp 含有蛋白  
 続いて我々は、上鼓室腔における慢性炎症の持続や増悪が発症の一因と考えられている真珠腫に着目した。先天性真珠腫、若年者の後天性真珠腫、高齢者の後天性真珠腫に分けて解析を行った。その結果、先天性真珠腫では上皮から脱落した角化物 (debris) に強い D-Asp 発現を認めた。扁平上皮や上皮の間質には D-Asp 発現は認められなかった。若年者の後天性真珠腫では角化物 (debris) や間質内など様々な部位に D-Asp の発現を認めた。高齢者の後天性真珠腫では間質内や骨 (硝子化部位) などに D-Asp 発現を認め、角質層 (debris) には発現が認められなかった (図 5)。真珠腫における D-Asp は年齢によって発現パターンが異なり、真珠腫の発症機序の解明の一助となることが期待された。また、他の細胞に結合して細胞機能を調節するマトリセルラータンパク質の一つであり、線維化の病態形成に関与しているとされるペリオスチンとの関連を連続切片による免疫組織化学染色にて検討した結果、高齢者における後天性真珠腫中の間質内にほぼ同様の発現パターンを認めた。D-Asp がペリオスチンと同様に線維化の病態形成に関与している可能性が示唆された。

図5 真珠腫における D-Asp 発現



以上より、様々な耳鼻咽喉科領域においても D-Asp 発現は認められ、これまで言われていたような年齢や炎症による刺激以外にも発現に関わる何らかの要因があると考えられ、D-Asp 発現機序の検討が、疾患の成因の解明につながる可能性が期待された。

#### <引用文献>

Kaji Y, Oshika T ほか: Localization of D-beta-aspartic acid-containing proteins in human eyes. Invest Ophthalmol Vis Sci 48: 2007, 3923-3927.

Fujii N, Satoh K ほか: Simultaneous stereoinversion and isomerization at specific aspartic acid residues in alpha A-crystallin from human lens. J Biochem 116: 1994, 663-669.

Fujii N, Tajima S ほか: The presence of D-beta-aspartic acid-containing peptides in elastic fibers of sun-damaged skin: a potent marker for ultraviolet-induced skin aging. Biochem Biophys Res Commun 294: 2002, 1047-1051.

Fujii N, Shimo-Oka T ほか: Localization of biologically uncommon D-beta-aspartate-containing alphaA-crystallin in human eye lens. Mol Vis 6:2000, 1-5.

#### 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)

Takahashi Y, Ohta N, Suzuki Y, Kakehata S Immunohistochemical Investigation of Otolaryngological Tissues like Tonsils using the Antibody which Specifically recognizes D- -Asp. 査読あり、Viva Origino, 2012.40:57-61

〔学会発表〕(計 3 件)

鈴木祐輔、真珠腫における D-アミノ酸の発現様式の検討、第 24 回日本耳科学会総会・学術講演会、2014 年 10 月 15 日～10 月 18 日、朱鷺メッセ(新潟県 新潟市)

鈴木祐輔、口蓋扁桃組織における D-アミノ酸の発現機序の検討、第 31 回日本耳鼻咽喉科アレルギー学会、2013 年 2 月 7 日～2 月 9 日、倉敷市芸文館(岡山県 倉敷市)

鈴木祐輔、口蓋扁桃組織における D-アミノ酸の発現様式、第 30 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会、2012 年 2 月 16 日～18 日、琵琶湖ホテル(滋賀県 大津市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 祐輔(SUZUKI Yusuke)

山形大学・医学部・非常勤講師

研究者番号: 50466629