

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792001

研究課題名(和文)慢性唾液腺炎に対する内因性リガンドとしての飽和脂肪酸の作用とその制御

研究課題名(英文) Crosstalk between salivary gland chronic inflammation and saturated fatty acids in plasma

研究代表者

四釜 洋介 (SHIKAMA, Yosuke)

徳島大学・病院・特任助教

研究者番号：10588908

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、飽和脂肪酸の唾液腺上皮細胞に対する作用の解明を目的とする。ヒト唾液腺上皮細胞において、飽和脂肪酸の一つであるパルミチン酸刺激により、炎症性サイトカインの一つである interleukin(IL)-6が濃度、時間依存的に産生され、またアポトーシスおよびalpha-fodrinの断片化が誘導される事を解明した。以上より、血清中のパルミチン酸がシェーグレン症候群を代表とする慢性唾液腺炎の病態を増悪する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Elevated concentrations of free fatty acids (FFAs) such as palmitate (Pal) are implicated in the mechanism underlying obesity-associated inflammation and apoptosis. The clinical significance of FFAs in patients with primary Sjogren's syndrome (pSS), which is an autoimmune disease characterized by destruction of salivary gland epithelial cells, is little studied, even though there is evidence linking sicca syndrome with dyslipidemia and diabetes. Here, we show that Pal induces IL-6 production, alpha-fodrin degradation which is an important auto-antigen in pSS, and apoptosis in salivary gland epithelial cell, but not in other types of epithelial cells. These results suggest that Pal may exacerbate the pathogenesis of pSS in salivary glands.

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：シェーグレン症候群 唾液腺 遊離脂肪酸

### 1. 研究開始当初の背景

肥満はメタボリックシンドロームや糖尿病を引き起こすとともに、動脈硬化性心疾患などの様々な生活習慣病の重大なリスクとなる。メタボリックシンドロームの重大なリスク要因として内臓脂肪の増大があげられ、この脂肪組織からの過剰な遊離脂肪酸の放出や、アディポカインとして称される多様な生理活性タンパク質の分泌異常により、全身的な代謝異常や易炎症状態を引き起こすと考えられている。近年、この遊離脂肪酸、特に飽和脂肪酸は内因性リガンドとして toll-like receptor (TLR)4 を刺激し、遠隔組織で炎症シグナルを活性化する事が明らかになってきている。唾液腺上皮細胞においても TLRs が発現しており、さらに唾液腺導管周囲のリンパ球浸潤が特徴の一つであるシェーグレン症候群 (SS) 患者の唾液腺上皮細胞では、TLR4 の発現が上昇している事が報告されている。さらに疫学研究においても、シェーグレン症候群と、2 型糖尿病などの代謝関連疾患との関連性を指摘している報告もある。しかしながら、飽和脂肪酸の唾液腺上皮細胞に対する影響については未だに報告がない。

### 2. 研究の目的

ヒト唾液腺上皮細胞株を用いて、飽和脂肪酸の刺激による炎症性反応と、その反応に対するアディポネクチンの効果を解析する。すなわち、本研究の目的は

- 1) 唾液腺上皮細胞における、飽和脂肪酸による炎症性シグナル伝達機構の解析
- 2) 飽和脂肪酸による炎症反応に対する、アディポネクチンの抗炎症効果の検討の 2 点である。

### 3. 研究の方法

#### (1) 細胞:

本学ヘルスバイオサイエンス研究部口腔分子病態学分野より分与いただいたヒト唾液腺上皮細胞株 (HSY および HSG)、および American Type Culture Collection から購入したヒト唾液腺上皮細胞株(A253)を使用した。また、唾液腺上皮由来ではない上皮細胞として、ヒト口腔扁平上皮細胞株(HSC-2)ヒト不死化ケラチノサイト(HaCaT)を使用した。これら細胞の TLR4 および、炎症性サイトカインの一つである interleukin(IL)-6 mRNA 発現レベルを reverse transcriptional (RT)-PCR 法を用い解析した。

#### (2) Interleukin(IL)-6 産生量の測定:

ウシ血清アルブミン(BSA)に conjugate させた各種脂肪酸で刺激後、培養上清中に含まれる、炎症性サイトカインの一つである IL-6 の濃度を ELISA 法(Human IL-6 ELISA kit, Thermo Scientific)を用いて測定した。

#### (3) パルミチン酸刺激による IL-6 産生に関わる細胞内シグナルの同定:

関与する可能性のあるタンパクとして、nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), mitogen-activated protein kinase (MAPK), c-jun N-terminal kinase (JNK) が考えられた。パルミチン酸刺激による IL-6 産生に対する、これらタンパクの特異的阻害剤(NF- $\kappa$ B 阻害剤: BAY11-7082、p-38 MAPK 阻害剤: SB203580、JNK 阻害剤: SP600125)の効果、または western blotting 法によるこれらタンパクの活性化を解析した。

#### (4) Oil Red O 染色

パルミチン酸刺激による細胞内脂肪滴を測定するために、細胞を 4% パラホルムアルデヒドで固定後、Oil Red O 溶液で 15 分間染色し、位相差顕微鏡を用いて観察した。

#### (5) 細胞生存率およびアポトーシスの評価:

細胞生存率は Cell Counting Kit-8 (Dojindo) を用いて評価した。アポトーシスの評価は TACS Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (R&D Systems)を用いて、flow cytometry 法により評価した。

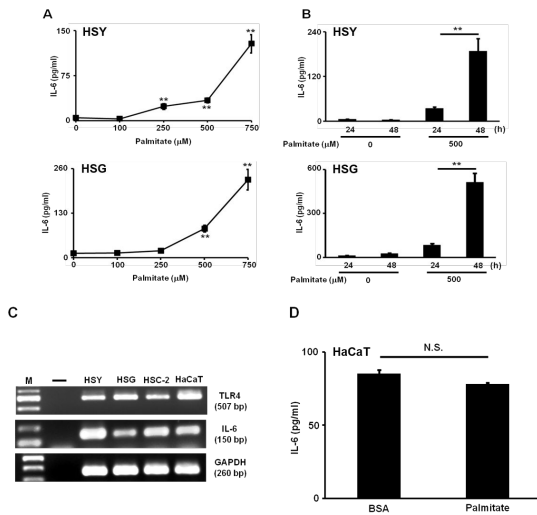
#### (6) 遊離脂肪酸の $\alpha$ -fodrin 断片化に対する効果:

$\alpha$ -fodrin は分子量 240 kDa のとしてユビキタスに存在する膜骨格タンパクである。SS モデルマウスにおいて、唾液腺特異的に断片化した 120 kDa の  $\alpha$ -fodrin が確認され、モデルマウスのみならず SS 患者においても断片化  $\alpha$ -fodrin が自己抗原となっていることが明らかになっている。これをふまえ、 $\alpha$ -fodrin、および断片化に関与するプロテアーゼである caspase-3 および  $\mu$ -calpain を western blotting 法により評価した。

### 4. 研究成果

- (1) パルミチン酸は唾液腺上皮において、IL-6 産生を誘導する:

2 種類の唾液腺上皮細胞において、パルミチン酸濃度 (図 1A:24 時間培養) および培養時間 (図 1B) 依存的に IL-6 産生が誘導された。他の上皮においても、IL-6

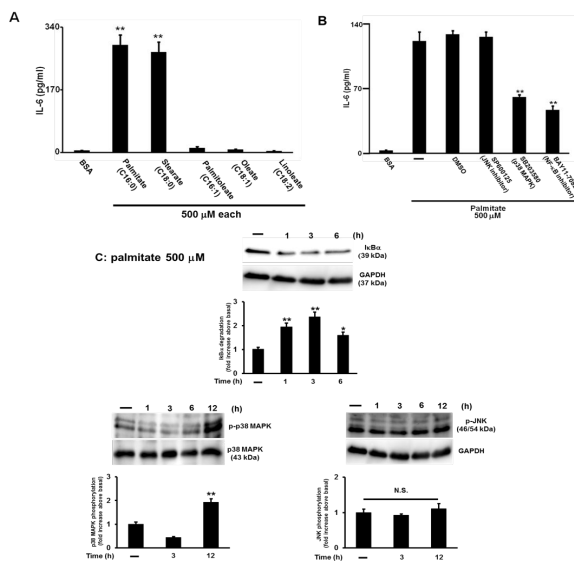


および TLR-4 mRNA は発現していた (図 1C)が、HaCaT を 500 μM パルミチン酸で 24 時間培養しても IL-6 産生は上昇しなかった (図 1D)。これらの結果は、パルミチン酸による IL-6 産生誘導はすべての上皮に起こる反応ではないことを示唆している。

(図 1)

(2) 飽和脂肪酸は HSY において、p38 MAPK および NF-κB を介して IL-6 産生を誘導する:

次に、種々の脂肪酸の IL-6 産生に対する効果を検討した。飽和脂肪酸であるパルミチン酸 (C16:0) およびステアリン酸 (C18:0) 刺激で IL-6 産生が有意に上昇したが、不飽和脂肪酸であるパルミトレイン酸 (C16:1)、オレイン酸 (C18:1)、リノール酸 (C18:2) 刺激は影響を与えなかった (図 2A)。パルミチン

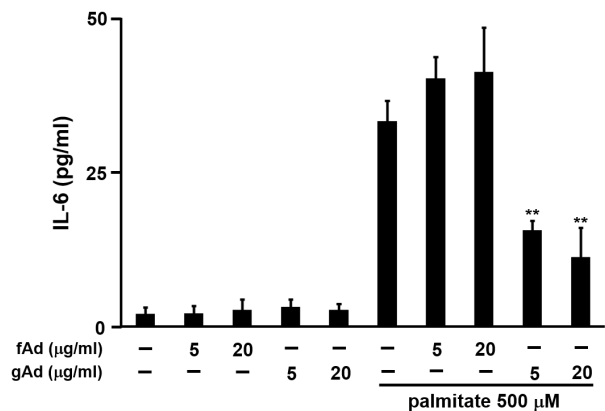


酸刺激による IL-6 産生は、p-38 MAPK

および NF-κB 特異的阻害剤により抑制された (図 2B)。この結果と一致して、パルミチン酸刺激により、NF-κB の活性化に關与するタンパクである IκBα の分解および p-38 MAPK のリン酸化が誘導されたが、JNK はリン酸化されなかった (図 2C)。

(図 2)

(3) パルミチン酸刺激による IL-6 産生に対するアディポネクチンの効果:  
アディポネクチンは、主に脂肪細胞で産生される善玉アディポカインであり、全長アディポネクチン (fAd) と、C 末端球状ドメインが切断されて遊離した球状ア



ディポネクチン (gAd) が存在する事が知られている。アディポネクチンには抗炎症作用を示すことが報告されているため、パルミチン酸刺激による IL-6 産生に対するアディポネクチンの効果を検証した。HSY において、パルミチン酸刺激による IL-6 産生を gAd は有意に抑制したが、fAd は抑制しなかった (図 3)。

(図 3)

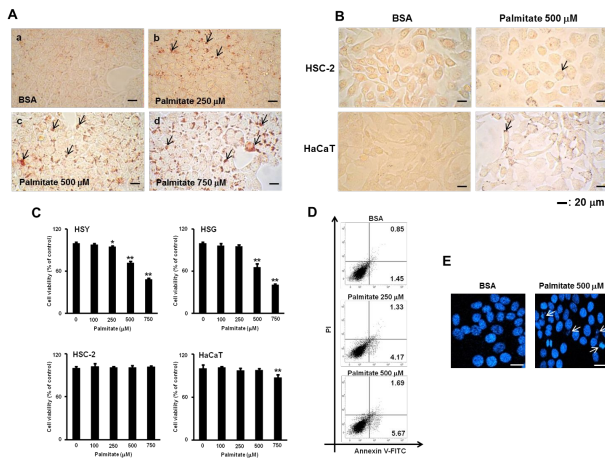
(4) パルミチン酸のアポトーシスに対する効果:

脂肪毒性によるアポトーシスには、脂肪酸が細胞内に取り込まれる必要がある。そのため、まずは各種細胞の脂肪酸取り込み能を Oil Red O 染色で解析した。HSY において、パルミチン酸の濃度依存的に細胞内の脂肪滴 (矢印) は増加した (図 4A) が、HSC-2 および HaCaT では脂肪滴はほとんど形成されなかった (図 4B)。細胞生存率も、HSY および HSG では、パルミチン酸の濃度依存的に低下したが、HSC-2 および HaCaT ではほとんど影響しなかった (図 4C)。HSY において、パルミチン酸刺激により Annexin V 陽性細胞の増加 (図 4D)、および核の濃縮、断片化 (矢印:図 4E) が確認され、アポトーシスが起きていることを示唆した。

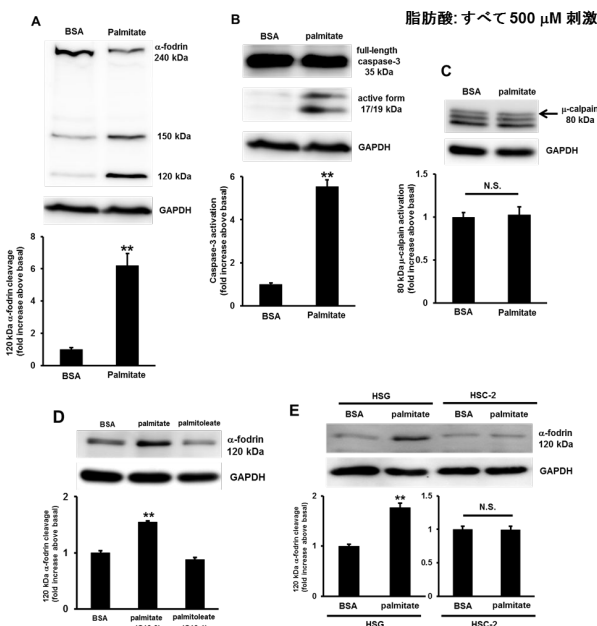
(5) 唾液腺上皮細胞における、パルミチン酸刺激による α-fodrin の断片化:

HSY において、パルミチン酸刺激により

$\alpha$ -fodrin の断片化 (図 5A) および caspase-3 の活性化 (図 5B) が誘導されたが、 $\mu$ -calpain 発現には影響しなかつ



た (図 5C)。この断片化は飽和脂肪酸特異的反応であり (図 5D)、HSC-2 では起



こらなかつた (図 5E)。

以上の結果から、血中飽和脂肪酸はシェーグレン症候群の唾液腺における病態を増悪し、それを gAd によって軽減できる可能性を示唆した。

(図 4)

(図 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 3 件)

1. Naujok O, Bandou Y, Shikama Y, Funaki M, Lenzen S. Effect of substrate rigidity in tissue culture on the function of insulin-secreting INS-1E cells. *J Tissue Eng Regen Med.* 2014 Jan 8. doi: 10.1002/term.1857.

[Epub ahead of print] (査読あり)

2. Jin Q, Bando Y, Miyawaki K, Shikama Y, Kosugi C, Aki N, Funaki M, Noji S. Correlation of fibroblast growth factor 21 serum levels with metabolic parameters in Japanese subjects. *J Med Invest.* 2014;61:28-34. (査読あり)
3. Shikama Y\*, Ishimaru N, Kudo Y, Bando Y, Aki N, Hayashi Y, Funaki M. Effects of free fatty acids on human salivary gland epithelial cells. *J Dent Res.* 2013;92:540-546. (査読あり)  
\* Corresponding author

[学会発表](計 8 件)

- i) ポスター発表
  1. Shikama Y, Ishimaru N, Kudo Y, Arakaki R, Hayashi Y, Funaki. High levels of saturated fatty acids may exacerbate the pathogenesis of primary Sjögren's syndrome. The 5<sup>th</sup> International Symposium for Interface Oral Health Science. 2014.1.21, 片平さくらホール (宮城県、仙台市)
  2. Shikama Y, Ishimaru N, Kudo Y, Bando Y, Aki N, Hayashi Y, Funaki M. High levels of free fatty acids may advance the severity of primary Sjögren's syndrome. American Diabetes Association 73<sup>rd</sup> scientific sessions. 2013.6.22, McCormick Place (Chicago, USA)
  3. Shikama Y, Ishimaru N, Bando Y, Aki N, Funaki M. Palmitate induces IL-6 production and alpha-fodrin degradation in salivary gland epithelial cells. 第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会 2013.5.16, 熊本市現代美術館 (熊本県、熊本市)
  4. 四釜洋介, 安藝菜奈子, 秦明子, 坂東由記子, 西村美穂, 船木真理 ヒト単球における遊離脂肪酸の IL-1 受容体アンタゴニスト(IL-1Ra)産生に対する効果 第 86 回日本内分泌学会学術総会 2013.4.26, 仙台国際センター (宮城県、仙台市)
  5. Shikama Y, Li Q, Bando Y, Aki N, Kosugi C, Funaki M. Crosstalk between Salivary Gland Chronic Inflammation and the Endocrine Function of Adipocytes in Insulin Resistance. American Diabetes Association 72<sup>nd</sup> scientific sessions. 2012.6.9, Pennsylvania Convention Center (Philadelphia, USA)
- ii) 口頭発表
  1. 四釜洋介, 石丸直澄, 新垣理恵子, 工藤保誠, 林良夫, 船木真理 飽和脂肪酸が唾液腺におけるシェーグレン症候群の病態を増悪する可能性 第 22 回日本シェーグ

- レン症候群学会学術集会 2013.9.14, プリーゼプラザ (大阪府、大阪市)
2. 四釜洋介、石丸直澄、李勤凱、坂東由記子、安藝菜奈子、船木真理 遊離脂肪酸の内因性リガンドとしての唾液腺上皮細胞に対する影響:シェーグレン症候群との関連性 第 21 回日本シェーグレン症候群学会学術集会 2012.9.7, ウェスティン都ホテル京都 (京都府、京都市)
  3. 四釜洋介、李勤凱、坂東由記子、安藝菜奈子、小杉知里、西村美穂、船木真理 遊離脂肪酸の内因性リガンドとしての唾液腺上皮細胞に対する影響:アディポネクチンの効果第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会 2012.5.19, パシフィコ横浜 (神奈川県、横浜市)

〔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

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

四釜 洋介 (SHIKAMA, Yosuke)  
徳島大学・病院・特任助教  
研究者番号：10588908

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：