

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 17 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25462914

研究課題名(和文) シェーグレン症候群の克服に向けたヒト唾液腺アポトーシスパスウェイの解析

研究課題名(英文) Analysis of the human salivary-gland apoptotic pass way for Sjogren's syndrome.

研究代表者

室井 梓(酒井梓)(MUROI, AZUSA)

東北大学・歯学研究科・助教

研究者番号：90463778

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、シェーグレン症候群の予防法および治療法を確立することを目的に、IL-18がヒトの唾液腺組織におけるアポトーシスパスウェイへ関与する可能性について検討した。細胞株HSGは前駆体IL-18タンパクならびにcaspase-1を発現していたが、ASCならびにNLRP3は発現していなかった。NLRP3インフラマソームのトリガー因子の一つといわれているATPやnigericinによって細胞内caspase-1の活性は誘発されなかった。このことから本細胞株におけるIL-18の活性化はNLRP3インフラマソームを介さずに起こるものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Sjogren's syndrome is an inflammatory autoimmune disease, predominantly characterized by lymphocytic infiltration of the exocrine glands. In this study, to establish prophylactic and therapeutic strategies for this disorder, we examined the association between interleukin 18 (IL-18) and the apoptosis pathway in the salivary gland tissues of humans. The HSG cell line expresses caspase-1, which processes the IL-18 precursor protein into its mature form. However, ASC and NLRP3, which together with caspase-1 constitute the inflammasome complex, were not detected in these cells. Furthermore, we detected no change in the activity of intracellular caspase-1, even when the cells were stimulated with ATP and nigericin to induce intracellular K⁺, a factor known to trigger the inflammasome. Therefore, we infer that the activation of IL-18 in this cell line occurs without the activation of the inflammasome.

研究分野：口腔診断学

キーワード：IL-18 シェーグレン症候群 唾液腺

1. 研究開始当初の背景

シェーグレン症候群は、唾液腺や涙腺といった外分泌腺にリンパ球浸潤がおり、ドライマウスやドライアイといった症状を呈する自己免疫疾患である。抗原提示やT細胞系の活性化、サイトカインなどの免疫調節物質の産生を介して腺組織の破壊が進行するとされているが、詳細な病因ははまだ不明である。2006年に新たなT細胞サブセット“Th17”が同定されて以降、Th17細胞とこれに関与するサイトカインなどの分子群は、それまで原因不明であった様々な疾患における予防および治療法のターゲット分子として有望視されるようになった。

IL-18はリンパ球が関わる免疫システムの柱となる機能を多く担っている。我々は、シェーグレン症候群患者の血液中にIL-18が検出されたという報告に着目し、ヒトの唾液腺組織ならびに唾液におけるインターロイキン(IL)-18の発現とその役割について研究を行い、シェーグレン症候群患者の唾液腺組織において、IL-18ならびにTh17が病態発現に関与している可能性を報告してきた。

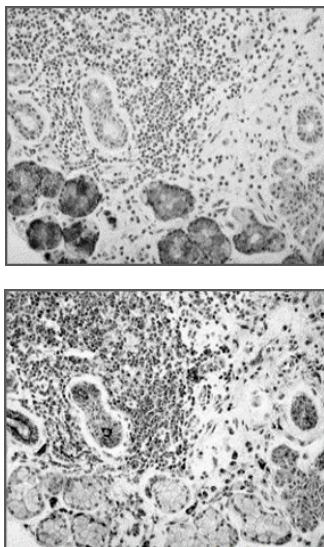
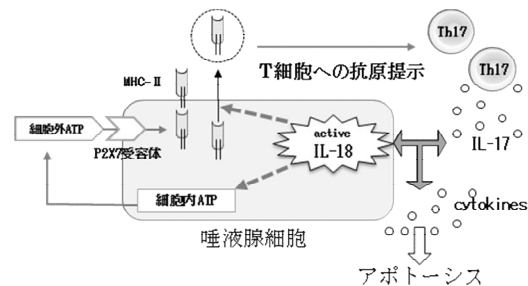


図1：ヒト唾液腺上皮細胞に発現するIL-18（上）、ヒト唾液腺組織に浸潤するTh17（下）

さらに、唾液腺上皮細胞がATP受容体のひとつであるP2X7受容体を発現していること、さらにATP刺激によってTリンパ球に対して抗原を提示するMHC class II分子を内包した小胞体が放出されることを明らかにしたことにより、P2X7受容体を介して唾液腺細胞自身がマクロファージや樹状細胞のように抗原提示細胞として機能し、自身のネクローシスやアポトーシスを惹起する可能性が示唆された。

これより、『シェーグレン症候群患者の唾液腺細胞に発現するIL-18は、唾液腺上皮細胞が抗原提示細胞として機能し、さらに、Th17の分化ならびにサイトカイン産生の促進を惹起することにより、唾液腺組織のアポ



トーシスを引き起こす』との着想に至った。

この仮説を証明するため、シェーグレン症候群患者の唾液腺におけるIL-18とIL-17の相互作用による炎症性サイトカインの放出の可能性や、P2X7受容体の活性化ならびにMHC class II分子を内包した小胞体の放出といったアポトーシスに繋がる変化をIL-18が惹起する可能性、さらにはアポトーシスが誘導されるか否かを明らかにしたいと考えた。

2. 研究の目的

シェーグレン症候群患者の唾液腺におけるIL-18とIL-17の相互作用による炎症性サイトカインの放出の可能性や、P2X7受容体の活性化ならびにMHC class II分子を内包した小胞体の放出といったアポトーシスに繋がる変化をIL-18が惹起する可能性、さらにはアポトーシスが誘導されるか否かを明らかにし、シェーグレン症候群の病態発現機序を解明することを目的に本研究を実施した。

3. 研究の方法

(1) 細胞株HSGにおけるIL-18の発現とその生物活性について検討した。細胞をコンフルエントまで培養したのちにRIPA bufferを用いてcell lysateを作製し、western blottingを用いてcell lysate中のIL-18とその分子量、IL-18のプロセッシングに必要なといわれるcaspase-1の有無をwestern blottingを用いて確認した。また、NLRP3 inflammasomeのトリガー因子の一つといわれているATPやnigericinで細胞を刺激培養し、cell lysateを作製してCaspase-1/ICE Fluorometric Assay Kit (BioVision)を用いて活性を測定した。inflammasomeの構成因子であるASCならびにNLRP3についてもタンパク発現をwestern blottingによって検索した。

(2) ヒト唾液腺組織は、東北大学病院口腔診断科においてシェーグレン症候群が疑われた患者から病理組織診断目的に採取された下唇小唾液腺のうち、サイズや状態が不適当などの理由によって病理組織標本作製に用いられなかったものを試料とし、凍結切片を作製し、対象タンパクの局在を検討した。

4. 研究成果

細胞株 HSG は、24kDa の前駆体 IL-18 タンパクを発現していた(図2)。HSG は caspase-1 を発現していたが、ATP や、nigericin によって細胞内 K⁺の流出を誘発しても caspase-1 の活性は変化しなかった。また ASC ならびに NLRP3 は検出されなかった(図3ならびに図4)。

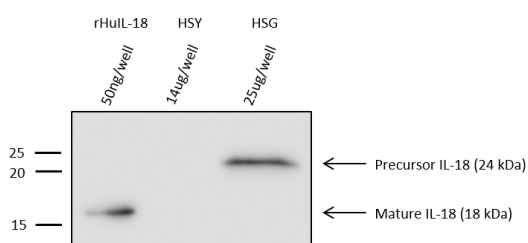


図2：細胞中の IL-18

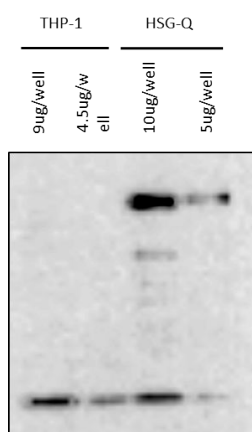


図3：細胞中の caspase-1

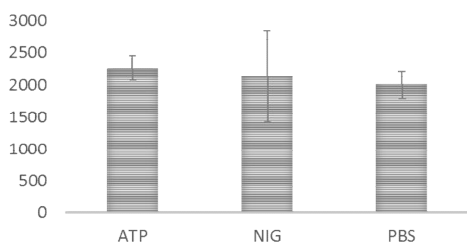


図4：細胞中の caspase-1 活性

これらのことから、HSG に発現している IL-18 の活性化は caspase-1 以外の分解酵素が関与する、あるいは、HSG においては caspase-1 の活性化は NARP3 inflammasome を介さずに起こると考えられた。

なお、その後の細胞認証試験によって本実験に用いた細胞株が HeLa の誤認細胞であることが明らかになり、研究計画は大幅な変更を余儀なくされた。

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)

Kojima, I., Sakamoto, M., Iikubo, M., Kumamoto, H., Muroi, A., Sugawara, Y., Satoh-Kuriwada, S., Sasano, T.: Diagnostic performance of MR imaging of three major salivary glands for Sjögren's syndrome. Oral Disease 23: 84-90, 2017 doi: 10.1111/odi.12577. 査読あり

酒井 椋, 飯久保正弘, 嶋田雄介, 橋本直也, 熊坂 晃, 佐々城 真, 遠藤 雄, 小嶋郁穂, 庄司憲明, 笹野高嗣.: 東北大学病院歯科部門における外来患者の動向 臨床研修ならびに臨床教育に対する意識調査. 日本口腔診断学会雑誌 27: 7-12, 2014. 査読あり

〔学会発表〕(計2件)

室井 椋, 菅原由美子, 及川麻理子, 熊本裕行, 佐々木優, 笹野公伸, 佐々木啓一

口腔粘膜疾患に対する細胞診
第105回 日本病理学会総会・学術集会、仙台、2016年5月12日

室井 椋, 飯久保正弘, 嶋田雄介, 橋本直也, 熊坂晃, 佐々城真, 小嶋郁穂, 庄司憲明, 笹野高嗣

東北大学病院歯科部門における卒前臨床実習および卒後臨床研修に対する外来患者の意識調査

第28回日本口腔診断学会学術大会、東京、2015年9月5日

〔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

室井 梓（酒井梓）（MUR01, AZUSA）
東北大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：90463778

(2) 研究分担者

笹野 高嗣（SASANO, TAKASHI）
東北大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号：10125560

菅原 俊二（SUGAWARA, SHUNJI）
東北大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号：10241639

伊藤 あゆみ（ITOU, AYUMI）
東北大学・大学病院・医員
研究者番号：50622990

西岡 貴志（NISHIOKA, TAKASHI）
東北大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：50641878

(3) 連携研究者

（ ）

研究者番号：

(4) 研究協力者

（ ）