

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 20 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670819

研究課題名(和文)シェーグレン症候群発症におけるtau蛋白の役割について

研究課題名(英文)The role of tau protein in the pathogenesis of salivary gland of SS patients

研究代表者

中村 卓 (NAKAMURA, Takashi)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・教授

研究者番号：30172406

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：低酸素分圧条件下で起こる細胞死とDNA障害にともなう細胞死の基軸となるものはAKT/GSK3 / NAC/ taxilin 経路であるということまで本研究では突き止めた。われわれは以前からcPLA2が細胞膜ではなく核膜あるいはER膜に局在すると推測している。また、本研究ではcPLA2欠損マウスが低酸素分圧ストレスに対して抵抗性であることを確認した。シェーグレン症候群唾液腺病変では低酸素分圧がその病因の1つと考えられている。従ってシェーグレン症候群唾液腺においてもcPLA2が重要な役割を担っていると考えている。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the cell death mechanisms of different cell death types to understand the multiplicity of their mechanisms. We have found that double strand break DNA damage transmits cell death signals via the AKT/GSK3 / NAC/ taxilin pathway that is used when the cell death in hypoxic stress. Our hypothesis is that cPLA2 can exert its action on the ER membrane rather than the plasma membrane in the case of several cell stresses including DNA damage and hypoxia. Hypoxic stress is a candidate for the pathogenesis of degenerative changes in the salivary gland of patients with Sjogren's syndrome (SS) as is generally considered in the pathogenesis of brain degenerative disorders such as Alzheimer's disease. In fact, we found that lung fibroblasts (MLF) established from cPLA2-/- mice are resistant against hypoxic and DNA damage stresses. Therefore, we speculate that cPLA2 a causative factor that involved in the pathogenesis of salivary gland disorders in SS patients.

研究分野：歯科放射線学

キーワード：cPLA2 細胞死

1. 研究開始当初の背景

Sjögren 症候群 (SS) は自己免疫学的異常が原因であるとの前提で診断基準が設定され、治療法が求められている。しかしながら、SS に特異的な生物学的マーカーが見つかっていないことで、診断法がなかなか決定せず、また有効的な治療法もいまだに見つからない。治療法といえば、非常に興味のある事実がある。それは、現在 SS 患者乾燥症状緩和のために広く処方されているムスカリン受容体拮抗剤は、AD 治療薬開発の過程で見つかったというエピソードである。実際にある研究によれば、ムスカリン受容体刺激によって AD 患者の脳に特徴的な組織学的 Triad、すなわち β -amyloid peptide (A β)、tau 蛋白の過剰リン酸化 (hyperphosphorylation)、および paired helical filaments (PHFs) の発現が抑えられるらしい。そこで、いろいろ調べてみると、AD と SS の間には、少なからぬ共通点があることがわかった。その中で、われわれは tau 蛋白に注目した。その理由は、ひとつには、AD の原因の一つとして脳内の持続的な低酸素分圧環境が挙げられていること。さらにはわれわれの研究で、培養細胞を長時間低酸素分圧環境下に放置すると、tau の過剰リン酸化が生じることを見出したことである。(Fig. 1)。

2. 研究の目的

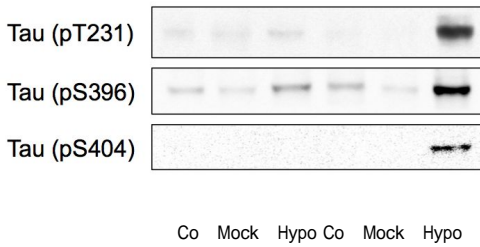


Fig. 1. --低酸素分圧化における tau 蛋白の過剰リン酸化
Threonine 231 (pT231), Serine 396 (pS396), および Serine 404 (pS404) のリン酸化をしめす。
Co, 対照群; Mock, Mock 処理群;
Hypo, 低酸素分圧下培養群

われわれは、Sjögren 症候群 (SS) と Alzheimer 病 (AD) との間に、病態学的および薬理学的に共通部分が多くあることに注目している。一方、AD の原因の一つに脳内の低酸素分圧環境により惹起された小胞体ストレス (ER ストレス) が挙げられている。したがって本研究では SS と AD との共通点を重視し、SS 発症における免疫学的異常は二次的なものであり、発症の根本原因は AD 患者の脳と類似した機構、すなわち唾液腺における広範で持続的な低酸素分圧環境であると推測した。したがって本研究の目的は、この仮説を証明することである。このため、われわれはまず唾液腺における低酸素分圧環境を作り出すために ex vivo での実験系を確立する必要がある (salivary gland slice

culture system, SGSCS)。このシステムを利用して、tau 蛋白の発現およびそれに伴う唾液腺細胞の破壊の程度を解析し、tau 蛋白と SS 発症機構との関連解明に迫りたい。

3. 研究の方法

平成 26 年度

この年度は、(1) ex vivo 実験系 (salivary gland slice culture system, SGSCS) の確立、(2) 長期低酸素分圧化での培養唾液腺内における tau 発現とその過剰リン酸化の解析、(3) 腺房細胞消失の動態とそのメカニズム解析にあてる。

(1) ex vivo 実験系 (salivary gland slice culture system, SGSCS) の確立
われわれはすでに、マウスの脳を用いた slice culture system の確率に成功している。この実験系を用いて低酸素分圧下で培養した脳内で ER ストレスが亢進し、脳細胞がアポトーシスを引き起こすメカニズムについて解析中である。本実験では、基本的に同様の条件にて ex vivo 実験系を確立しようと考えている。その概要は以下のとおりである。

マウス (C57BL/6J) より全摘した耳下腺から ティッシュライサ (Stoelting 社製) を使って得られた薄片 (厚さ 300-400 μ m) を用いる

6-well 培養ディッシュ (Companion Plate, BD Falcon 社製) に装着した Cell Culture Insert (BD Falcon 社製) においたフィルタ (Whatman 3MM CHR) 上にて培養

培地: MEM + 25% Hank's BSS + 25% ウマ血性 (Life Technologies)

低酸素分圧下培養: 1% pO₂ + 5% pCO₂ (低酸素培養キット、三菱ガス) あるいはマルチガスインキュベータ

この培養系が実験に供することができるか否かの評価をする必要がある。この目的で、通常の培養条件 (20% pO₂ + 5% pCO₂) にて 0 - 7 日培養した後、薄片唾液腺腺房細胞が正常の形態および機能を維持していることを確認する。検討項目は以下のとおりである。

形態: 共焦点レーザー顕微鏡を用いた免疫組織学的解析

Alexa Fluor 488-conjugated phalloxin

染色 --- 管腔構造と腺房細胞との区別

4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)

染色 --- 細胞核の同定

Tyrosine hydroxylase antisera + Alexa

Fluor 546-conjugated phalloxin

染色 --- 副交感神経の同定

機能: マルチフォトン共焦点レーザー顕

微鏡をつかった腺房細胞外分泌解析

様々な期間培養した薄片唾液腺を 0.5 mM

sulforhodamine B (SRB) を含んだ生理食塩

溶液に浸漬し、アセチルコリン刺激剤である

10 μ M carbacholamine (CCh) をくわえて

マルチフォトン共焦点レーザー顕微鏡 (830 nm 励起) にて exocytotic fusion を確認する。

(2) 長期低酸素分圧化での培養唾液腺内における tau 発現とその過剰リン酸化の解析
抗非リン酸化 tau 抗体および抗リン酸化 tau 抗体 (tau pT231, tau pS396, tau pS404) を使った Western blotting 解析

(3) 腺房細胞消失の動態とそのメカニズム解析

(1)の項目にて述べた、形態学的ならびに機能学的解析手法をもちいて低酸素分圧下における唾液腺腺房細胞の変化を解析する。

平成27年度

この年度は(3) 腺房細胞消失の動態とそのメカニズム解析を前年度に引き続き行うとともに、あらたに(4) 低酸素分圧環境により唾液腺細胞に誘導されるであろうERストレス応答解析を加える。また、SS患者唾液腺に特異的な形態変化を検証する目的で、(5) EMTに伴い唾液腺の線維化や脂肪化が促進されることを確認したい。

(4) ERストレス応答解析

低酸素分圧下などにより惹起されるERストレスは3次元構造を上手にとることができないままにリボゾーム上から細胞質内に織り出されたペプチドがERやGolgi装置内で蓄積することが原因の一つと考えられている。こうした場合、細胞は自己防御反応的に蛋白質の生産を抑制するように細胞機構を調整する。そのための主たる一連の機構をunfolded protein response (UPR) とよんでいる。UPRには様々なタンパク質が関与するが、PERK、IRE1、およびATF6の3つの経路に分けることができる。本研究では、これら3つの経路についてWestern blotting解析を中心に低酸素分圧下で培養した唾液腺内でUPRが起こっていることを確認する。最近、われわれはこのUPR経路において、nascent polypeptide chain complex -subunit (NAC) や -taxilin が深く関与しており、これら3つの経路の上位にあることを見出した。更にその上位には glucose synthase kinase 3 (GSK3) が存在し、ERストレスに対する反応を制御しているらしい。したがって、これらのタンパク質が今回提唱しているSS発症機構において果たしている役割についても検討する。ここで検討する項目は以下のとおり。

NAC, -taxilin, およびリン酸化型ならびに非リン酸化型GSK3 蛋白レベル解析
NAC, -taxilin に特異的な siRNA をもちいて、またGSK3 については薬理的抑制効果を有する LiCl を培地に加える事でそれぞれのタンパク発現を抑制することにより、低酸素分圧化における培養唾液腺の形態的ならびに機能的変化を阻止することが可能か否かを検討する。

(5) 低酸素分圧培養下唾液腺の線維化・脂肪化

線維化や脂肪化の亢進は、SS患者大唾液腺の特徴の一つである。本研究で用いた ex vivo での唾液腺培養系において、低酸素分圧環境が果たしてそのような形態学的な変化を誘導できるか否かを検討したい。線維化については、線維化促進効果をもつ TGF- β を培地に加えて短期間で線維化をはかり、実験系を構築する。さらに、脂肪化については、TGF- β と同時に oxLDL を培地にくわえ、唾液腺間質線維芽細胞の分化促進と線維芽細胞あるいはマクロファージないへ cholesterol の取り込みを促進させることで実験系としての確率を図る。

4. 研究成果

本研究ではまず種々の要因による細胞死機序について、その多様性を捉えることから始めた。検討した細胞死要因としては、低酸素分圧条件下によって惹起される細胞死、電離放射線照射や抗癌剤治療の結果おこるDNA障害にともなう細胞死、および紫外線照射により誘導される細胞死に焦点を当てた。われわれの研究では意外なことに、低酸素分圧条件下で起こる細胞死とDNA障害にともなう細胞死とはその機序に明らかな共通点があることがわかった。すなわち、ともにERストレス並びにその下流にある共通の細胞内刺激伝達経路を使って death signal を伝えているということである。この時そのシグナル経路の基軸となるものは

AKT/GSK3 / NAC/ taxilin 経路であるということまで本研究では突き止めた。残念なことに、それよりも上流に位置する経路が何であるのかについては本研究機関内に同定することはできなかった。それでもわれわれは、その候補たるタンパク質を幾つかに絞り込んでいる。そのひとつは、ATM/ATR である。この仮説では核内で発生した現象がその起点となるであろう。この場合問題となるのは、ATM/ATR は本来核内で働くタンパク質であり、他方 AKT/GSK3 / NAC/ taxilin 経路は細胞膜に局在していることから、この2者をつなぐメカニズムが必要となる。そこで考えられるのが、核内で活性化された ATM/ATR が核外へ移行して

AKT/GSK3 / NAC/ taxilin 経路と連絡するという仮説である。この仮説によれば、DNA傷害より生じたシグナルはATM/ATRを介してMUC1へ伝えることも可能であり、より広範な外部の環境変化に対応できるという利点がある。一方、低酸素分圧環境下でのストレスは、現時点ではER膜で受容するとする考えが一般的である。したがって、低酸素分圧環境下においてもATR/ATMが深く関与しているという仮説を証明するためには、ER膜上に存在するERストレス受容体と核内で生じたDNA断裂にともなう起こる現象を結びつける必要がある。ここで注目したいのは、核膜と

ER 膜とは連続しており、さらに ER 膜とミトコンドリアとも物理的に接点があり互いに協調して細胞内ストレスに対応しているということである。われわれは以前から cPLA₂ が細胞膜ではなく核膜あるいは ER 膜に局在すると推測している。実際、cPLA₂ 直下で働いている酵素である LOX12/15 は細胞膜には存在せず、核膜で働いていることが確かめられている。さらに、われわれは本研究において、cPLA₂ 欠損マウスより単離した肺線維芽細胞ならびに胎児線維芽細胞では、上記ストレスに対し抵抗性になっていることを突き止めた。この点に関してはまだ十分な解析が進まないままであるが、この結果は、細胞死のメカニズムと cPLA₂ とが大きく関わっていることを示唆している。上記研究結果の一部は、以下の論文として報告した。

1. Hotokezaka Y, Katayama I, van Leyen K, Nakamura T

GSK3 -dependent downregulation of -taxilin and NAC merge to regulate ER stress responses.

Cell Death Dis 2015; 6, e1719;

doi:10.1038/cddis.2015.90

2. Eida S, Van Cauteren M, Hotokezaka Y, Katayama I, Sasaki M, Obara M, Okuaki T, Sumi M, Nakamura T

Length of intact plasma membrane determines the diffusion properties of cellular water.

Sci Rep 2016; 6, 19051;

doi:10.1038/srep19051

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2件)

Eida S, Van Cauteren M, Hotokezaka Y, Katayama I, Sasaki M, Obara M, Okuaki T, Sumi M, Nakamura T

Length of intact plasma membrane determines the diffusion properties of cellular water.

Sci Rep 2016; 6, 19051;

doi: 10.1038/srep19051 査読有り

Hotokezaka Y, Katayama I, van Leyen K, Nakamura T: GSK-3 -dependent downregulation of -taxilin and NAC merge to regulate ER stress responses.

Cell Death Dis. 2015 Apr 16;6:e1719.

doi: 10.1038/cddis.2015.90.

PMID:25880086 査読有り

[学会発表](計3件)

高木幸則、中村 卓: 超音波画像診断によるシェーグレン症候群の治療効果予測。第19回臨床画像大会および教育研修会

岡山大学鹿田キャンパス(岡山市)

2014年11月1日

中村 卓: シェーグレン症候群および IgG4 関連疾患における唾液腺超音波画像診断の有用性。第23回日本シェーグレン症候群学会学術集会 ホテルニュー長崎(長崎市) 2014年9月12日

中村 卓: 歯科の立場から見たシェーグレン症候群: 口腔乾燥症改善の試み。第23回日本シェーグレン症候群学会学術集会 ホテルニュー長崎(長崎市) 2014年9月12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

中村 卓 (NAKAMURA, Takashi)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・教授

研究者番号: 30172406

(2)研究分担者

佛坂 由可 (HOTOKEZAKA, Yuka)

長崎大学・病院(歯学系)・講師

研究者番号: 10244089

片山 郁夫 (KATAYAMA, Ikuo)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・助教

研究者番号: 80295089