

長寿医療研究開発費 2019年度 総括研究報告（総合報告及び年度報告）

「脂質代謝改善」という新たなドライマウス治療のコンセプト構築にむけて（29-19）

主任研究者 四釜 洋介 国立長寿医療研究センター 口腔疾患研究部  
口腔感染制御研究室 室長

#### 研究要旨

##### 3年間全体について

本研究は唾液腺涙腺に慢性炎症を伴う自己免疫疾患であるシェーグレン症候群（SS）モデルマウスおよび老齢マウスを用いて、SSおよび加齢による唾液涙液分泌減少に対する脂質代謝異常の影響を明らかにし、ドライマウスおよびドライアイの治療・予防法開発に役立つ事を目的とした。研究成果として、i) 老齢マウス唾液腺および涙腺に老化関連T（SA-T）細胞が集積する事、ii) 加齢に伴い唾液腺に集積するリンパ球の population に雌雄差がある事、iii) 唾液腺にB細胞およびSA-T細胞が集積するメカニズムとして、唾液腺上皮細胞が発現するケモカインCXCL13が関与する可能性があること、iv) 老齢マウス唾液腺上皮細胞におけるCXCL13発現に、エストロゲンシグナルの減少が関与し得る事、v) SSモデルマウス唾液腺にもSA-T細胞が集積する事を明らかにした。さらに、vi) 老齢マウスを用い、涙液分泌にアディポネクチンシグナルが関与する事を明らかにした。

加齢に伴う、また自己免疫疾患に起因するドライマウスの共通する病態形成基盤として、SA-T細胞の集積が関与する可能性が示唆された。また、涙液分泌能と脂肪組織の「質」に関連性ある可能性が示唆された。

##### 2019年度について

ドライアイはドライマウス同様多因子による疾患であるが、共通するリスクファクターとして加齢が知られている。しかしマウスにおいては加齢に伴い唾液分泌量は低下する(Aging Cell. 2015;14:616)が、涙液分泌量は逆に増加する(Am J Pathol. 2014;184:631)事が報告されている。このヒトとマウスにおける、加齢に伴う涙液分泌量変化の不一致について、そのメカニズムは不明であった。老齢マウスによる解析結果から、加齢に伴う涙液

分泌増加に長寿ホルモンとしても知られ、脂肪細胞から分泌されるアディポネクチンが関与している可能性を見出した。マウスは加齢に伴い脂肪組織が多くなり体重が増加するが、若齢マウスに高脂肪食を負荷し体重を増加させても、涙液分泌量は逆に低下する。すなわち、脂肪組織の「質」がアディポネクチンシグナルを介し涙液分泌に影響を及ぼす可能性が示唆された。

主任研究者

四釜 洋介 国立長寿医療研究センター 口腔疾患研究部 口腔感染制御研究室 室長

分担研究者

山越 貴水 国立長寿医療研究センター 老化機構研究部代謝研究室 室長

研究期間 2017年4月1日～2020年3月31日

#### A. 研究目的

口腔は全身の健康に深く関与し、生きて行くために必要な「食」や「会話」などに唾液は重要な役割を担っている。超高齢社会を迎えた日本は、口腔乾燥症（ドライマウス）患者が増加傾向にあり、これにより味覚障害、嚥下障害、口腔粘膜異常等が引き起こされる。加齢に伴い、唾液腺だけでなく、様々な細胞や組織に機能障害が生じ、糖尿病や脂質異常症、動脈硬化といった老化関連疾患のリスクが上昇する。これら疾患はメタボリックシンドロームの構成疾患であり、主な発症リスク要因として、脂肪組織の機能障害がある。

50-60歳代の女性を中心に好発する、涙腺および唾液腺を標的とする臓器特異的自己免疫疾患であるSSはドライアイおよびドライマウスを主症状とし、日本においてその患者数は10-30万人と推定されている。遺伝的要因、免疫異常、更に女性ホルモンがその要因として考えられているが、その発症メカニズムは不明な点が多い。さらに臨床研究では、糖尿病や脂質異常症との関連性を指摘する報告もあるが、その分子基盤は不明である。近年、様々な代謝性疾患、慢性炎症性疾患の発症や病態に、加齢に伴う免疫系の制御異常が深く関与する事が明らかになってきており、この免疫老化に関与する細胞として、SA-T細胞が、加齢関連疾患発症に重要な役割を担っている事が明らかになっている。

SSおよび加齢に伴うドライマウスの病態を理解し、その治療、および予防法を確立するためには、唾液腺組織の加齢変化、免疫老化、およびエストロゲンの関連性を複合的に考慮する必要がある。本研究では、SSモデルマウス、老齢(約24ヵ月齢)マウス、およびエストロゲン欠乏モデル(OVX)マウスを用い、ドライマウスの病態形成におけるSA-T細胞の役割、およびSA-T細胞とエストロゲン欠乏の関連性を *in vivo* で解析する事を目的とする。

※複数年度の研究期間全体について記載すること。

## B. 研究方法

3年間全体について

### i) SS モデルマウスおよび高脂肪食負荷 (HFD) マウス

SS モデルマウスとして *aly/aly* マウス(Eur J Immunol. 1996;26:2742) を使用した。また HFD マウスは、C57BL/6N マウス 4 週齢から 8 週間 High Fat Diet 32 (日本クレア) を自由摂餌させた。

### ii) マウス唾液腺上皮細胞の単離と遺伝子発現解析

当研究センター動物施設より供給されている老齢マウスおよび若齢マウス(ともに C57BL/6N)を麻酔後、顎下腺を摘出し、コラゲナーゼ処理により細胞懸濁液を作製した。上皮マーカーである Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM)抗体を用いた磁気ビーズ法により上皮細胞を単離し、DNA microarray 法または Real-time PCR 法により遺伝子発現を解析した。

### iii) マウス唾液腺へのリンパ球浸潤および上皮細胞におけるタンパク発現解析

顎下腺の細胞懸濁液を作成し、蛍光標識でラベルされたモノクローナル抗体を用い、Flow cytometry 法により免疫細胞浸潤を評価した。また、マウス顎下腺の凍結切片を作製し免疫組織化学染色法により解析した。

### iv) 唾液腺または唾液腺上皮細胞におけるエストロゲンシグナル欠乏の影響

*in vivo* での唾液腺におけるエストロゲンシグナル欠乏の影響を解析するため卵巣除去 (OVX)を行った。すなわち、生後 1 ヶ月で OVX を行い、1 ヶ月に顎下腺を摘出した。また、*in vitro* で唾液腺上皮細胞におけるエストロゲンシグナル欠乏の影響を解析するために、Am J Pathol 2009;174:1715 に従い上皮細胞を培養した。その後、エストロゲン受容体拮抗薬である Fulvestrant 処理し、2 日後に total RNA を抽出し、遺伝子発現解析を行った。

2019年度について

### i) マウス涙腺上皮細胞の単離と遺伝子発現解析

上記 ii) と同様の方法で行った。

### ii) マウス涙腺へのリンパ球浸潤および涙腺組織におけるタンパク、遺伝子発現解析

リンパ球浸潤に関しては上記 iii) と同様の方法で行った。涙腺組織における遺伝子発現については Real-time PCR 法を用いて、タンパク発現については Western blotting 法または免疫組織化学染色法により解析した。

(倫理面への配慮)

本研究での動物実験に関しては、「国立長寿医療研究センター動物実験取扱規程」を遵守し、倫理面においては「国立長寿医療研究センター動物実験倫理委員会」の承認を得てから実施した。

## C. 研究結果

### 3年間全体について

#### i) マウス唾液腺上皮細胞の単離と遺伝子発現解析

始めに若齢および老齢マウス顎下腺より上皮細胞を単離し、それぞれの遺伝子発現を DNA microarray 法を用い検討した。その結果、若齢マウスと比較し老齢マウスにおいて、数種類のケモカインおよび自然免疫に関与する、インフラマソームとして知られている NLRP の発現レベルが高い値を示した。一方、抗菌ペプチドの1つである defensin の発現レベルは低い値を示した。我々はこの中で、最も発現レベルが高い値を示したケモカインである CXCL13 に着目した。CXCL13 は別名 BLC(B lymphocyte chemoattractant)としても知られており、特に B 細胞の遊走に関与するケモカインである。雌雄老齢マウスより唾液腺上皮細胞を単離し、CXCL13 発現を Real-time PCR 法により検討した所、雄と比較し雌の発現レベルが約 3 倍高い事を明らかにした。

#### ii) 老齢マウス唾液腺へのリンパ球浸潤および上皮細胞におけるタンパク発現解析

唾液腺における免疫細胞の加齢に伴う変化を Flow cytometry 法により網羅的に検討した。自然免疫系を担うマクロファージや樹状細胞は、若齢マウスと比較し老齢マウスにおいてその割合が有意に減少した。一方で獲得免疫系を担う CD4<sup>+</sup>T 細胞および B 細胞は、若齢マウスと比較し老齢マウスにおいてその割合が有意に増加した。興味深い事に、これら老齢マウスで増加する CD4<sup>+</sup>T 細胞数および B 細胞数は、雄と比較し雌において有意に増加する事を明らかにした。SA-T 細胞においても同様の傾向を示した。また、老齢マウス顎下腺を免疫組織化学染色で解析した所、上皮細胞において CXCL13 発現が上昇している事を確認した。

#### iii) 唾液腺または唾液腺上皮細胞におけるエストロゲンシグナル欠乏の影響

唾液腺における CXCL13 発現にエストロゲンシグナルが関与しているかを検討するため、OVX の影響を検討した。その結果、OVX により顎下腺における CXCL13 発現が上昇する事を Real-time PCR 法を用い確認した。さらに *in vitro* において、唾液腺上皮細胞を fulvestrant 処理すると、濃度依存的に CXCL13 発現が上昇した。

#### iv) aly/aly マウス顎下腺における SA-T 細胞の集積

aly/aly マウス唾液腺には主に CD4<sup>+</sup>T 細胞が浸潤する事が知られている。我々は、16 週の aly/aly マウス唾液腺を解析した結果、多くの SA-T 細胞が集積している事を Flow cytometry により確認した。

#### v) マウス涙腺における解析

加齢に伴う涙液分泌増加に長寿ホルモンとしても知られ、脂肪細胞から分泌されるア

ディポネクチンが関与している可能性を見出した。

#### 2019年度について

老齢マウス涙腺には、唾液腺と同様に SA-T 細胞を始め、他のリンパ球も浸潤している事を確認したが、刺激時涙液量は若齢マウスと比較し、老齢マウスで有意に多かった。加齢に伴う脂質代謝変化の影響を検討するため、若齢マウスに高脂肪食を8週負荷後、刺激時涙液量を解析すると、特に雌マウスにおいて、HFD マウスの分泌量が有意に減少した。老齢マウス涙腺に集積する SA-T 細胞数は、雄と比較し雌で有意に多く集積していた。老齢マウス涙腺上皮細胞において、アディポネクチン受容体の一つである AdipoR2 発現が、タンパクレベルで上昇する事を見出した。

#### D. 考察と結論

##### 3年間全体について

老齢マウスを用いた実験から、唾液腺上皮細胞において、細胞老化およびエストロゲンシグナルの欠乏により CXCL13 発現が誘導され、B 細胞が集積、異所性胚中心が形成され、SA-T 細胞が集積するというメカニズムが考えられる。しかし、CXCL13 発現に細胞老化およびエストロゲンシグナルの欠乏が相加、または相乗的に作用するのかは明らかになっていない。今後、ドライマウスの病態形成における SA-T 細胞集積の役割を検討していきたいと考えている。興味深い事に SS モデルマウスにおいても、16 週齢という若齢にも関わらず SA-T 細胞の集積を確認した。特徴的なのは、顎下腺における B 細胞数は、コントロールマウスと比較しほぼ変わらないという点である。この結果は、SA-T 細胞の増殖および集積には、B 細胞依存、非依存両方の経路が存在する可能性を示すものである。加齢に伴う、また自己免疫疾患に起因するドライマウスの共通する病態形成基盤として、SA-T 細胞の集積が関与する可能性が示唆された。

#### 2019年度について

加齢に伴い、涙腺においても SA-T 細胞が集積するにも関わらず刺激時涙液量は増加する。この分泌量増加のメカニズムに、老齢マウス脂肪組織の「質」および涙腺組織における AdipoR2 発現が関与する可能性が示唆された。この結果は、加齢に伴いリンパ球浸潤を伴う涙腺組織破壊が起こったとしても、脂肪組織の「質」が担保されていれば、涙液分泌能は低下しない可能性を示すものである。

#### E. 健康危険情報

なし。

#### F. 研究発表

## 1. 論文発表

2017 年度

- 1) Yang X, Nakamoto M, Shuto E, Hata A, Aki N, Shikama Y, Bando Y, Ichihara T, Minamigawa T, Kuwamura Y, Tamura A, Uemura H, Arisawa K, Funaki M, Sakai T. Associations between intake of dietary fermented soy food and concentrations of inflammatory markers: a cross-sectional study in Japanese workers. *J Med Invest.* 2018;65(1.2):74-80.
- 2) Shikama Y\*, Kudo Y, Ishimaru N, Funaki M. Potential Role of Free Fatty Acids in the Pathogenesis of Periodontitis and Primary Sjögren's Syndrome. *Int J Mol Sci.* 2017 Apr 14;18(4). pii: E836.

2018 年度

- 1) Shikama Y\*. Free fatty acids may be involved in the pathogenesis of oral-related and cardiovascular diseases. *J Oral Biosci.* 2018;60(3):65-69. (Review)
- 2) Nakamoto M, Shuto E, Nakamoto A, Hata A, Aki N, Shikama Y, Bando Y, Ichihara T, Minamigawa T, Tamura A, Kuwamura Y, Funaki M, Sakai T. Soy products and soy isoflavones intake associations with allergic diseases in Japanese workers: rhinitis, dermatitis and asthma. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2018;27(6):1277-1285.

2019 年度

- 1) Shikama Y\*, Kurosawa M, Furukawa M, Ishimaru N, Matsushita K. Involvement of adiponectin in age-related increases in tear production in mice. *Aging (Albany N.Y.).* 2019;11(19):8329-8346.
- 2) Endo Y, Funayama H, Yamaguchi K, Monma Y, Yu Z, Deng X, Oizumi T, Shikama Y, Tanaka Y, Okada S, Kim S, Kiyama T, Bando K, Shima K, Suzuki H, Takahashi T. Basic Studies on the Mechanism, Prevention, and Treatment of Osteonecrosis of the Jaw Induced by Bisphosphonates. *Yakugaku Zasshi.* 2020;140(1):63-79.
- 3) Nakamoto M, Omine M, Yun Y, Shuto E, Nakamoto A, Hata A, Aki N, Shikama Y, Bando Y, Ichihara T, Minamigawa T, Tamura A, Kuwamura Y, Funaki M, Sakai T. Associations of dietary diversity with allergic diseases in Japanese workers: a cross-sectional study. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2019;28(4):857-869.
- 4) Shikama Y\*, Kurosawa M, Matsushita K. IL-29 exhibits antiviral activity by inducing RIG-I and IFI-16 expression in oral epithelial cells. *Endotoxin and Innate Immunity.* 2019;22:40-42

\* Corresponding author

## 2. 学会発表

2017 年度

- 1) 四釜洋介、新垣理恵子、大塚邦紘、石丸直澄、松下健二  
糖脂質代謝異常とシェーグレン症候群の病態：Adipokine の関連性. 第 26 回日本シェーグレン症候群学会学術集会, 2017 年 9 月 8 日, 東京
- 2) Shikama Y, Ishimaru N, Kudo Y, Matsushita K, Funaki M.  
Palmitate may exacerbate the pathogenesis of periodontitis. American Academy of Periodontology 103rd Annual Meeting, Sep 9, 2017, Boston, USA.
- 3) 四釜洋介、工藤保誠、石丸直澄、船木真理  
飽和脂肪酸が歯周病の病態形成に関与する可能性.  
第 59 回歯科基礎医学会学術大会, 2017 年 9 月 18 日, 松本
- 4) 四釜洋介、松下健二  
口腔粘膜での抗ウイルス自然免疫応答における interleukin (IL)-29 の役割. 日本歯周病学会 60 周年記念京都大会, 2017 年 12 月 16 日, 京都

#### 2018 年度

- 1) 四釜洋介  
加齢および脂質代謝異常によるドライマウス発症機序とその病態解明.  
第 60 回歯科基礎医学会学術大会, 2018 年 9 月 7 日, 福岡
- 2) 四釜洋介、黒澤実愛、山田（古川）匡恵、松下健二  
口腔粘膜における IL-29 の抗真菌および抗ウイルス作用：臨床応用の可能性.  
第 61 回秋季日本歯周病学会学術大会, 2018 年 10 月 26 日, 大阪
- 3) 四釜洋介、黒澤実愛、松下健二  
IL-29 は口腔粘膜上皮細胞において RIG-I 発現誘導を介し抗ウイルス活性を増強する.  
第 24 回日本エンドトキシン・自然免疫研究会, 2018 年 12 月 1 日, 横浜  
※年度別に記載すること。

#### 2019 年度

- 1) Kurosawa M, Furukawa M, Matsushita K, Shikama Y. Senescence-associated T-lymphocytes accumulate in the submandibular glands of aged mice. 97th IADR General Session, June 20, 2019, Vancouver, BC, Canada.
- 2) 四釜洋介、黒澤実愛、古川匡恵、松下健二 エストロゲンの欠乏は唾液腺上皮細胞に CXCL13 産生を誘導し、老化関連 T 細胞集積を促進する. 第 42 回日本基礎老化学会大会, 2019 年 6 月 7 日, 仙台
- 3) 黒澤実愛、古川匡恵、松下健二、四釜洋介 免疫老化及び細胞老化による唾液腺への SA-T 細胞集積メカニズムの解析. 第 38 回分子病理学研究会, 2019 年 7 月 19 日, 兵庫
- 4) 黒澤実愛、古川匡恵、松下健二、四釜洋介 唾液腺上皮の細胞老化及び免疫老化が唾液腺機能に与える影響: 老齢マウスおよびモデルマウスを用いた解析. 第 28 回日本シェーグレン症候群学会学術集会, 2019 年 9 月 13 日, 徳島

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし