

## 長寿医療研究開発費 2020年度 総括研究報告

### 免疫老化および唾液腺実質細胞老化と唾液腺機能に関する研究 (20-20)

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 (副部長)

#### 研究要旨

超高齢社会での健康長寿を実現するためには、科学的基盤に立脚した抗加齢医学の発展が課題となる。加齢に伴う唾液分泌障害は口腔乾燥症の原因となり、唾液腺におけるリンパ球浸潤および線維化による組織破壊が病態基盤として存在する。この病理学的所見は自己免疫疾患に起因する唾液分泌障害と共通しているが、その病態形成メカニズムは明らかになっていない。近年、加齢関連疾患には **Inflammaging** という感染を伴わない慢性炎症が関与する事が明らかになってきた。本研究課題は、加齢および自己免疫疾患に起因する唾液分泌障害の病態形成に対する、唾液腺実質細胞の老化および免疫老化の関与を明らかにする事を目的とする。また、予防・原因除去療法が確立されていない口腔乾燥症において、老化細胞を標的にした新たな戦略を提案するための基盤構築を目指す。

#### 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 (副部長)

#### 分担研究者

石丸 直澄 徳島大学 教授

#### A. 研究目的

唾液腺の加齢変化は腺房細胞の減少、線維化、リンパ球浸潤等があり、これに伴い唾液分泌量が減少する。また 50-60 歳代女性に好発し、唾液・涙液分泌障害を伴う自己免疫疾患であるシェーグレン症候群 (SS) 患者唾液腺の病理組織学的所見としても、線維化およびリンパ球浸潤が知られている。SS の唾液腺における病態メカニズム研究は盛んに行われている一方、加齢に伴う唾液分泌障害に関する病態メカニズム解析はほとんど行われていない。しかしながら、SS とは診断されない、口腔乾燥感を訴える高齢者が多数存在す

る。加齢・SSに共通した病態基盤を明らかにし、より多くの口腔乾燥症患者を救える様、老齢マウスおよびSSモデルマウスを用い、ドライマウスの病態形成に対する老化関連T(SA-T)細胞の役割、およびその集積メカニズムを目的とする。

## B. 研究方法

i) SA-T細胞が分泌するオステオポンチンの唾液腺組織におよぼす影響の解析  
SA-T細胞は炎症性タンパクとしても機能するオステオポンチンを大量に分泌することが明らかになっている(Shirakawa et al. J Clin Invest 2016)。オステオポンチンの受容体の1つとしてCD44が知られているため、唾液腺上皮細胞におけるCD44発現を解析する。また、マウス唾液腺初代培養細胞を単離、*in vitro*でオステオポンチン刺激し、炎症性サイトカイン等を誘導する転写因子であるnuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B)の活性化をwestern blotting法で解析する。さらにオステオポンチンは、組織の線維化にも関与しているという報告もある為、線維芽細胞をオステオポンチン刺激し、線維化マーカーとして知られているalpha smooth muscle Actin ( $\alpha$ SMA)発現をwestern blotting法を用い検証する。また、若齢・老齢マウス唾液腺における $\alpha$ SMA発現をwestern blotting法および免疫組織化学染色法を用い検証する。

ii) SSモデルマウスを用いた唾液腺病態に対するSA-T細胞の役割  
転写因子であるNF- $\kappa$ B経路に点変異を有する事でSSを発症するモデルマウス(Kurosawa et al. Arthritis Rheum 2017)を用い、唾液腺に浸潤、集積するSA-T細胞をFlow cytometry法および組織染色法等を用い検討する。

(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

i) SA-T細胞が分泌するオステオポンチンの唾液腺組織におよぼす影響の解析  
・若齢、老齢マウス唾液腺(顎下腺)上皮細胞を磁気ビーズ法により単離し、CD44発現をFlow cytometry法により解析した。いずれの唾液腺上皮細胞においてもCD44は発現していたが、その発現レベルに大きな差はみられなかった。  
・若齢マウス唾液腺から上皮細胞を単離し培養、12well plateサブコンフルエントになった後、serum starvationし、無血清培地でオステオポンチン刺激した。オステオポンチン濃度依存的にNF- $\kappa$ Bのリン酸化が亢進する傾向をwestern blotting法で確認したが、データのブレが大きく、今後詳細な条件検討が必要と考えられた。

・ヒト線維芽細胞 (HFL-III) を用い、上記と同様の条件でオステオポンチン刺激し、 $\alpha$ SMA 発現を western blotting 法で解析した。濃度依存的に $\alpha$ SMA 発現が増加したが、オステオポンチンの至適濃度等詳細に検討する必要があると考えられた。

・若齢、老齢マウス唾液腺における $\alpha$ SMA 発現を western blotting 法で解析したが、その発現レベルに大きな差はみられなかった。また、免疫組織化学染色法を用い解析した結果、若齢、老齢マウス唾液腺腺房周囲に陽性細胞が存在していたが、これは筋上皮細胞であると推察された。老齢マウス唾液腺ではさらに線維化病変周囲にも陽性細胞を確認したが、この頻度および病理学的意義については現在検討中である。

#### ii) SS モデルマウスを用いた唾液腺病態に対する SA-T 細胞の役割

・老齢マウス唾液腺同様、SS モデルマウス唾液腺においても SA-T 細胞が集積しているが、B 細胞集積がない所が老齢マウスと異なる点であった。

・SS モデルマウス唾液腺上皮細胞において、老化マーカーの一つである senescence-associated beta-galactosidase (SA- $\beta$ -gal) 発現が上昇している事を組織学的解析により明らかにした。

・SS モデルマウスの標的組織上皮細胞において、ケモカインの一つである CXCL12 発現が上昇している事を報告している(Kurosawa et al. Arthritis Rheumatol 2017)が、この受容体である CXCR4 が SA-T 細胞表面に発現している事を Flow cytometry 法を用い明らかにした。

#### D. 考察と結論

※「D. 考察」、「E. 結論」としても差し支えないこと。

これまで我々は動物モデルを用い、加齢および自己免疫疾患に関連した唾液分泌障害の病態形成に対する SA-T 細胞の役割を解析し、その成果として論文発表を行った (Kurosawa et al. Int J Mol Sci. 2021)。この研究結果から、加齢および自己免疫疾患に共通した基盤病態として SA-T 細胞集積が関与している事を示唆した。しかしながら、近年ヒトにおいても SA-T 細胞の存在は確認されているが、その phenotype はマウスとは異なり、CD27-CD28-p38+の CD4 陽性細胞である事が報告されている (Alessio et al. Nat Immunol 2014)。今後はドライマウス患者の小唾液腺にこの SA-T 細胞が浸潤しているか、免疫組織化学染色で検討する予定である。リンパ球浸潤同様、唾液腺の線維化に関する解析も動物モデルおよび human sample を用い引き続き解析していく予定である。

#### E. 健康危険情報

なし。

※班のすべての健康危険情報について記載すること。このため、分担項目に係る情報で

あっても分担研究報告ではなく、こちらに記載すること。該当がない場合には「なし」と記載すること。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kurosawa M, Shikama Y, Furukawa M, Arakaki R, Ishimaru N, Matsushita K. Chemokines Up-Regulated in Epithelial Cells Control Senescence-Associated T Cell Accumulation in Salivary Glands of Aged and Sjögren's Syndrome Model Mice. *Int J Mol Sci*. 2021 Feb 25;22(5):2302.
- 2) Furukawa M, Wang J, Kurosawa M, Ogiso N, Shikama Y, Kanekura T, Matsushita K. Effect of green propolis extracts on experimental aged gingival irritation in vivo and in vitro. *J Oral Biosci*. 2021 Mar;63(1):58-65.
- 3) Nakamoto M, Yun Y, Omine M, Mori S, Shuto E, Nakamoto A, Hata A, Aki N, Shikama Y, Bando Y, Ichihara T, Minagawa T, Tamura A, Kuwamura Y, Funaki M, Sakai T. Dietary diversity and characteristics of lifestyle and awareness of health in Japanese workers: a cross-sectional study. *J Med Invest*. 2020;67(3.4):255-264.
- 4) Chaweewannakorn C, Harada T, Nyasha MR, Koide M, Shikama Y, Hagiwara Y, Sasaki K, Kanzaki M, Tsuchiya M. Imaging of muscle activity-induced morphometric changes in fibril network of myofascia by two-photon microscopy. *J Anat*. 2021 Mar;238(3):515-526.
- 5) Matsushita K, Yamada-Furukawa M, Kurosawa M, Shikama Y. Periodontal Disease and Periodontal Disease-Related Bacteria Involved in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *J Inflamm Res*. 2020 Jun 30;13:275-283.
- 6) Furukawa M, Yamada K, Kurosawa M, Shikama Y, Wang J, Watanabe M, Kanekura T, Matsushita K. High concentration of glucose induces filaggrin-1 expression through AP-1 in skin keratinocytes. *J Dermatol Sci*. 2020 May;98(2):137-140.
- 7) Sato M, Arakaki R, Tawara H, Tsunematsu T, Ishimaru N. Formation of Autoimmune Lesions is Independent of Antibiotic Treatment in NOD mice. *Int J Mol Sci*. 2021 Mar 22;22(6):3239.
- 8) Ohigashi I, Frantzeskakis M, Jacques A, Fujimori S, Ushio A, Yamashita F, Ishimaru N, Yin D, Cam M, Kelly M, Awasthi P, Takada T, Takahama Y. Thymoproteasome hardwires TCR repertoire of CD8+ T cells with cortical positive selection independent of negative selection. *J Exp Med*. 2021 Apr

5;218(4):e20201904.

- 9) Tsunematsu T, Arakaki R, Kawai H, Ruppert J, Tsuneyama K, Ishimaru N, Earnshaw WC, Pagano M, Kudo Y. APC/C Cdh1 is required for the termination of chromosomal passenger complex activity upon mitotic exit. J Cell Sci. 2020 Sep 15;133(18):jcs251314.
- 1 0) Kisoda S, Shao W, Fujiwara N, Mouri Y, Tsunematsu T, Jin S, Arakaki R, Ishimaru N, Kudo Y. Prognostic value of partial EMT-related genes in head and neck squamous cell carcinoma by a bioinformatic analysis. Oral Dis. 2020 Apr 11. doi: 10.1111/odi.13351. Epub ahead of print.
- 1 1) 石丸直澄 (分担) わかりやすい病理学 改訂第7版 45-70, 317-322, 2021 ISBN978-4-524-22654-2
- 1 2) 石丸直澄 難病研究の進歩 シェーグレン症候群 生体の科学 71 (5) : 476-747, 2020 ISSN 0370-9531

## 2. 学会発表

### 1) 四釜洋介

加齢に伴う涙液分泌の変化：ヒトとマウスの相違およびアディポネクチンの関連性. 第74回日本臨床眼科学会, 2020年11月5日-12月6日, Web開催

### 2) 黒澤実愛、古川匡恵、松下健二、四釜洋介

老化関連T細胞および唾液腺上皮の細胞老化が口腔乾燥症の病態形成に関与する可能性. 第62回歯科基礎医学会学術大会, 2020年9月11日~10月9日, Web開催

### 3) 新垣理恵子、佐藤真美、木曾田暁、Shao Wenhua、牛尾 綾、常松貴明、工藤保誠、石丸直澄

多層化カーボンナノチューブと酸化チタン吸入暴露による肺胞マクロファージの動態 第109回日本病理学会総会 2020.7.1-31 (ウェブ)

### 4) 石丸直澄

口腔腫瘍の病理と遺伝子異常—癌形質と微小環境—オーバービュー 第109回日本病理学会総会シンポジウム 2020.7.1-31 (ウェブ)

### 5) 佐藤真美、新垣理恵子、牛尾綾、工藤保誠、石丸直澄

シェーグレン症候群の標的臓器におけるIL-33の役割 第109回日本病理学会総会 2020.7.1-31 (ウェブ)

### 6) 常松貴明、新垣理恵子、工藤保誠、石丸直澄

染色体パッセンジャー複合体による胎児性癌の未分化性維持機構 第109回日本病理学会総会 2020.7.1-31 (ウェブ)

### 7) 佐藤真美、牛尾綾、新垣理恵子、常松貴明、工藤保誠、石丸直澄

シェーグレン症候群モデルマウスにおける肺病変の解析 第 62 回歯科基礎医学会学術大会 2020.9.11-10.9 (ウェブ)

8) 常松貴明、工藤保誠、石丸直澄

多角的アプローチによる口腔癌の発生・進展の分子機構の解明 第 62 回歯科基礎医学会学術大会 先端歯学国際教育研究ネットワーク・シンポジウム「歯学研究の今昔と次世代研究」2020.9.11-10.9 (ウェブ)

9) 石丸直澄

自己免疫疾患モデルを用いた発症機序の解明と治療戦略 東京工業大学化学生命科学研究所周辺ウェブ講演会 2021.1.28 (ウェブ)

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

※予定を含めて記載すること。該当がない場合には「なし」と記載すること。