

長寿医療研究開発費 平成 29 年度 総括研究報告

「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

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、ドライマウスの治療・予防法開発に役立てる事を目的とする。当該年度は、i) SS モデルマウス作製の準備、ii) マウス唾液腺初代培養上皮細胞における飽和脂肪酸の炎症性アディポカイン産生に対する影響の解析、iii) CD4 陽性 T 細胞における炎症性アディポカイン受容体の発現解析、iv) 老齢マウス唾液腺へのリンパ球浸潤および組織破壊に対する性差の影響の解析、を行った。

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 平成 29 年 4 月 1 日～平成 30 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シェーグレン症候群 (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。加齢に伴うドライマウス患者も女性が多い事からも、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、加齢、脂質代謝、およびエストロゲン(E2)の関連性を複合的に考慮する必要があると考えられる。

B. 研究方法

i) SS モデルマウス作製の準備

徳島大学口腔分子病態学分野の林良夫教授らが報告したSSモデルマウス(J Immunol. 1994;153:2769)の作製を試みた。すなわち、舌下腺に分化異常を来たすNFS/sldマウスを用い、生後3日目に外科的に胸腺を切除する事によって、比較的若齢期(6-8週齢)に涙腺、唾液腺に限局する自己免疫性病変が観察される。NFS/sldマウスは実験動物中央研究所より購入する予定である。

ii) マウス唾液腺初代培養上皮細胞における飽和脂肪酸の炎症性アディポカイン産生に対する影響の解析

C57BL/6Nマウスから麻酔後唾液腺を外科的に摘出し、コラゲナーゼやヒアルロニダーゼ等を用い分散し、ウォッシュ後メッシュを通し、コラーゲンコートdishで培養した。肥大化脂肪細胞より分泌されるパルミチン酸で刺激後、total RNAを回収し、real-time PCR法を用い解析した。

iii) CD4 陽性 T 細胞における炎症性アディポカイン受容体の発現解析

C57BL/6Nマウス脾臓より磁気ビーズを用い、CD4陽性T細胞を回収し、total RNAを抽出後real-time PCR法を用い解析した。

iv) 老齢マウス唾液腺へのリンパ球浸潤および組織破壊に対する性差の影響の解析

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(約24か月齢)および若齢マウス(約7-8週齢)を麻酔後、唾液腺を取り出し凍結切片を作製し、H-E染色後リンパ球浸潤を観察した。

(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

i) SS モデルマウス作製の準備

NFS/sldマウスは受精卵から作製する必要があったため、当該年度はC57BL/6Nマウスを

用い胸腺摘出を試みた。生後 3 日に胸腺を摘出し、母親マウスに戻し、生後 5 週で末梢血を採取した。Flow cytometry 法により成熟 T 細胞マーカーである CD90.2 および B 細胞マーカーである CD19 抗体を用い展開し、CD90.2 陽性 CD19 陰性細胞の割合を解析した。その結果、外科的にほぼ全ての胸腺を摘出している事を確認した。

ii) マウス唾液腺初代培養上皮細胞における飽和脂肪酸の炎症性アディポカイン産生に対する影響の解析

予備実験より、高脂肪食負荷したマウス唾液腺では、炎症性アディポカインとして知られている血清アミロイド A(SAA)およびリポカリン 2(LCN2)が遺伝子レベルで発現上昇していたため、本実験では *ex vivo* においてもこの結果を再現出来るかを検討するために行った。その結果パルミチン酸 100 μ M で 2 日間刺激する事により、SAA および LCN2 の遺伝子発現が上昇する事を確認した。

iii) CD4 陽性 T 細胞における炎症性アディポカイン受容体の発現解析

Toll-like receptor やケモカイン受容体である CXCR3 が SAA の受容体として機能するという報告があり、これら受容体は T 細胞にも発現している事が知られている。一方 LCN2 の受容体は 24p3R および Megalin があるが、T 細胞におけるこれら受容体の発現については明らかになっていない。Real-time PCR を用いた解析から、CD4 陽性 T 細胞において、24p3R は遺伝子レベルで発現を確認できたが、Megalin は検出限界以下であった。

iv) 老齢マウス唾液腺へのリンパ球浸潤および組織破壊に対する性差の影響の解析

若齢マウスおよび加齢雄マウス唾液腺ではリンパ球浸潤を確認することは出来なかったが、加齢雌マウスにおいてはリンパ球浸潤および軽度の組織破壊が散見された。

D. 考察と結論

時間を要したが、H30 年 5 月より当研究センター動物施設で NFS/*sld* マウスを繁殖開始する予定である。順次 SS モデルマウスを作製し、研究を進める予定である。パルミチン酸刺激により、マウス唾液腺初代培養上皮細胞において SAA や LCN2 がタンパクレベルでも産生されるか今後検討し、またこれらタンパクが T 細胞におよぼす影響も解析したいと考えている。好中球においては、24p3R を介した chemotaxis が報告されているが、T 細胞においては不明である。この点についても検討して行きたいと考えている。老齢マウスのリンパ球浸潤については、まだ解析数が少ないため、統計学的解析はできていないが、今後解析数を増やし、どのような細胞が浸潤しているのか、その集積メカニズム等を解析する予定である。

当該年度の研究結果から、炎症性アディポカインを介した SS 病態増悪の可能性、また加齢による唾液腺組織におけるリンパ球浸潤を伴う組織破壊は、メカニズムは不明だが雌に多いことを明らかにした。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 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.

* Corresponding author

2. 学会発表

- 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

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