

「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) 老齢マウスにおける唾液腺に浸潤するリンパ球の同定および性差の解析、ii) 唾液腺および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、iii) SS モデルマウスにおける老化関連 T(SA-T)細胞の唾液腺での病態形成への関与、について検討した。

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 30 年 4 月 1 日～平成 31 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

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、老化関連T (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E2欠乏の関連性を *in vivo* で解析する事を目的とする。

## B. 研究方法

### i) SSモデルマウス作製の準備

前年度の計画では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)の作製を予定していた。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。しかしこのモデルの作製は非常に技術を要し、かつ胸腺摘出したマウスを親マウスが食べてしまうという予想外のトラブルが生じたため、他のSSモデルマウスのである *aly/aly*マウス(Eur J Immunol. 1996;26:2742)の使用を検討した。

### 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) 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

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ヵ月でOVXを行い、1ヵ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。

(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) 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 細胞および B 細胞は、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。

#### D. 考察と結論

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、このマウスの顎下腺において 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。

以上の結果から、加齢に伴うドライマウス、および自己免疫疾患によるドライマウス両方の病態形成に SA-T 細胞が関与する可能性が示唆された。

#### E. 健康危険情報

なし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

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.

\* Corresponding author

##### 2. 学会発表

###### 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

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