

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：32710

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463027

研究課題名(和文) 唾液分泌促進に果たすシスタチンの役割

研究課題名(英文) Role of cystatin in salivary secretion

研究代表者

中川 洋一 (Nakagawa, Yoichi)

鶴見大学・歯学部・准教授

研究者番号：90148057

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：唾液分泌に果たすシスタチンの役割を検討した。唾液中のシスタチンはシェーグレン症候群患者において著明に減少していた。シェーグレン症候群の口唇腺は、漿液腺房や粘液腺房の形態的变化が大きいほどTUNEL染色陽性細胞が多く、また、形態的变化が強い唾液腺組織では漿液半月のシスタチンSが低下していた。スタウロスポリンで処理してアポトーシスを誘導した培養細胞HSG cellに、シスタチンを添加するとアポトーシス阻害効果が認められた。以上のようなことから、シェーグレン症候群における唾液分泌低下は、アポトーシス制御機能の破綻で生じ、この破壊はシスタチンによって制御できる可能性があること示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to clarify the role of cystatin in the salivary secretion observed in a Sjogren's syndrome patient. The secretion of salivary cystatin significantly decreased in the Sjogren's syndrome patient significantly. In Sjogren's syndrome patients, there were many TUNEL positive cells tend to be observed in the serous and mucous acinar cells of the labial glands. The more morphological change that is observed, the less cystatin S intensity that is seen in the serous demilunes of the salivary gland. The An inhibition of apoptosis was observed when cystatin S was added to the apoptosis-induced cultured HSG cells. These results suggested that one of the causes of hyposalivation in Sjogren's syndrome is likely was the failure of the apoptotic control function by cystatin, and thus the administration of applying cystatin S may have allowed the patient to overcome this problem possibly controlled the failure.

研究分野：口腔外科

キーワード：シェーグレン症候群 シスタチン 唾液分泌 アポトーシス 自己免疫疾患

### 1. 研究開始当初の背景

シェーグレン症候群は主に唾液腺と涙腺に障害を生じる自己免疫疾患であるが、その病因の詳細は明らかになっていないが、アポトーシスによる自己タンパクの変性を契機とする自己免疫病理が想定されている。

シェーグレン症候群における唾液タンパク増減を測定については、多くの検討がある。シェーグレン症候群患者の唾液は、タンパク濃度が高い。そのタンパクの種類として 2-マイクログロブリン、ラクtofフェリン、Ig 軽鎖、polyIg 受容体、リゾチーム C などの増加が報告されている。このようにシェーグレン症候群の研究では、唾液中のバイオマーカー探索を中心として、増加する唾液タンパクの検討が主に行われている。ところが、シェーグレン症候群患者においてシスタチンのように減少するタンパクの種類は少ないため、その意義を検討した報告は極めて少ない。プロテオミクス解析によって、シェーグレン症候群と健常者の唾液タンパクのプロファイルの違いが明らかとなった。そのタンパクのひとつに、シスタチンがあり、シスタチンはシェーグレン症候群患者で著明に減少していた。

研究開始当初の背景にこのような状況があり、病態解明のためには減少するタンパクの解析が必要と考えられた。

### 2. 研究の目的

唾液分泌に果たすシスタチンの関与を明らかにすることであり、シスタチンの減少へのストレスの関与やシスタチン誘導によってアポトーシスを抑制することができるかどうかを検討した。

### 3. 研究の方法

#### (1) プロテオミクス解析

(2) ドライマウス外来患者の唾液中システインプロテアーゼ・インヒビター活性測定

(3) 減少する唾液シスタチンの種類の Western blotting 法による同定

(4) 口唇生検の免疫組織化学的検討  
シスタチンの免疫組織化学

平成 26~28 年度の主な検討は以下に示す。

(5) アポトーシス誘導の小胞体ストレスの影響

シェーグレン症候群においてアポトーシスが起きる原因としての慢性ストレスの影響を検討した。

ストレスモデルとしてマウスに $\alpha_1$  アドレナリン受容体アゴニストのフェニレフリン (PHE) を長期投与した。小胞体ストレス下で応答するシャペロンタンパク Bip のタンパク発現量と翻訳開始因子 eIF2 $\alpha$  のリン酸化上昇を測定し、また、形態学的観察を行った。

(6) シスタチンによるアポトーシス阻害効果

アポトーシスを誘導した培養細胞 HSG cell II にシスタチンを添加によるアポトーシス阻害

### 4. 研究成果

#### (1) プロテオミクス解析

シェーグレン症候群と健常者の唾液タンパクのプロファイルの違いのうち、シスタチンが特徴的であった(図 1)。

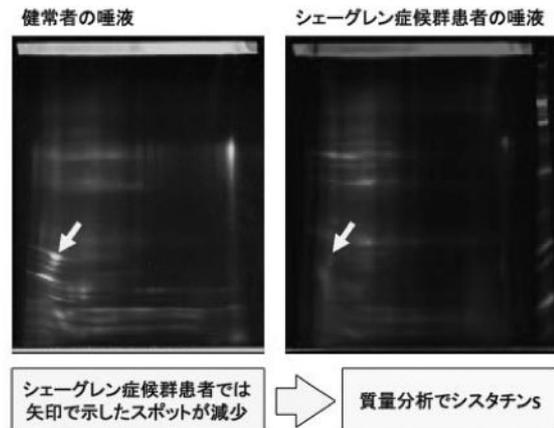


図 1. 唾液のプロテイン・プロファイル

#### (2) 唾液中システインプロテアーゼ・インヒビター活性

ドライマウス外来患者の唾液中システインプロテアーゼ・インヒビター活性は、シェーグレン症候群患者において著明に減少していた(図 2)。

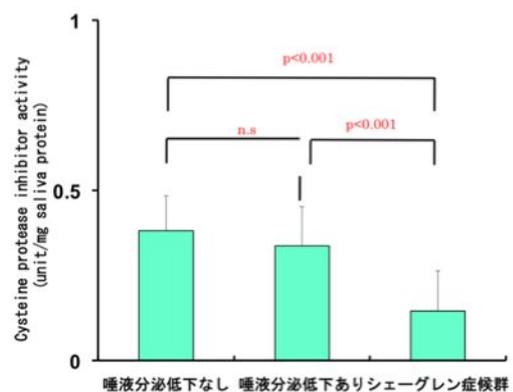


図 2. 唾液システインプロテアーゼインヒビター活性

#### (3) ウェスタンブロッティング

シェーグレン症候群は他の群に比較して唾液中シスタチン S が減少していた(図 3)。シスタチン SA, SN は群間に差がなかったため、

シスタチン S が唾液分泌にかかわる key タンパクと考えられた。

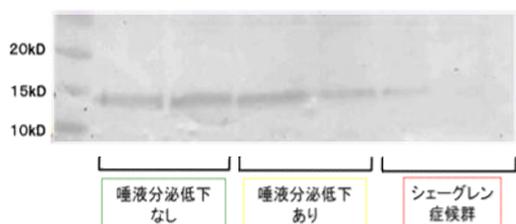


図3. シスタチン S の Western blotting 法

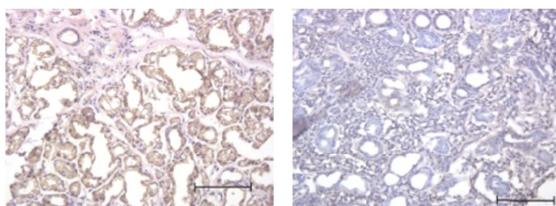
システインプロテアーゼ・インヒビター・シスタチンの自己免疫疾患における役割については以下のように考えられる。

シスタチンは、カスパーゼ、カルパイン、カテプシン、パパインなどのシステインプロテアーゼを阻害するシステインプロテアーゼ・インヒビターである。シスタチンは、細胞内に存在するファミリーI (シスタチン・ )、分泌性のファミリーII (シスタチン C、S、SA、SN)、ファミリーIII (キヌノーゲン) の3つのスーパーファミリーに分類される。唾液のシスタチンは、ヒト唾液中に見いだされ、顎下腺と耳下腺にSグループのシスタチンが腺房細胞の細胞質(分泌顆粒ではなく)に存在することが分かっている。

Western blotting で唾液のシスタチン S の変化が認められたので、次に口唇生検の材料を用いて免疫組織化学的検討を行った。

#### (4) 口唇生検の免疫組織化学的検討

口唇生検の免疫組織化学的検討において、健常者の口唇腺ではシスタチンの強い染色性が認められたが、シェーグレン症候群患者では陽性例が少なく、しかもその染色性はきわめて低かった(図4)。このことは、通常働いているシスタチンによる何らかの制御機能が破綻している可能性を示唆している。



健常者の口唇腺 シェーグレン症候群患者の口唇腺  
図4. シスタチンの免疫組織化学

シェーグレン症候群においてその局在に変化が起きているという所見は制御機能が破綻している可能性を示唆しているものである。ポトースで断片化された細胞成分が抗原性を発揮して自己反応性 T-cell が活性化される免疫病理において、システインプロテアーゼとそのインヒビターの検討は病態の本質に迫るものと考えられる。

#### (5) アポトーシスにおける小胞体ストレスの関与

シェーグレン症候群においてアポトーシスが起きる原因として慢性ストレスの影響を検討した。

慢性ストレスの実験動物モデルとして、PHE 長期投与マウスを用いた。PHE 長期投与マウスの顎下腺では、顎下腺細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度上昇抑制が生じており、エクソサイトーシスが阻害されている可能性が示唆されている。さらに eIF2 $\alpha$ のリン酸化が認められ、このことは過剰な唾液タンパク翻訳抑制が生じている可能性が示唆している。また、PHE マウスでは分泌顆粒の形成不全が生じており、これは唾液タンパクの翻訳抑制の結果としてタンパク合成の抑制が生じたものと推察された。

このメカニズムのシスタチン減少への関与については現在検討中である。

#### (6) シスタチンによるアポトーシス阻害

培養細胞 HSG cell にスタウロスポリンでアポトーシスを誘導し、その培養細胞にシスタチンを導入するとアポトーシス阻害が認められた(図5)。

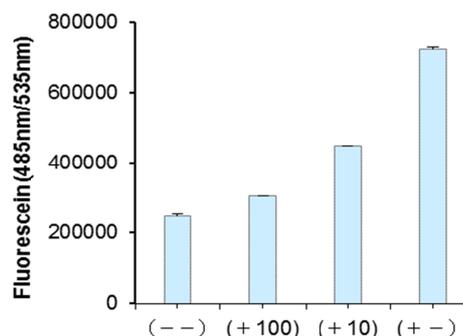


図5. シスタチンのアポトーシス阻害効果

以上のようなことから、シェーグレン症候群における唾液分泌低下は、シスタチンのアポトーシス制御機能が働かなくなり生じること、この破壊はシスタチンによって制御できる可能性があることなどが示唆された。

これまでの結果は、シスタチンをシェーグレン症候群のマーカーとしてヒューマンセンシングへ応用できるばかりでなく、シスタチンによってシェーグレン症候群が制御できる可能性を示唆している。

治療法としては、シスタチンの補充と、シスタチン減少の予防が考えられる。シスタチン減少を抑制する治療法を考えると、シスタチン減少のメカニズムを解明する必要がある。今後の課題は、シスタチン減少のメカニズム解明であり、シスタチンのタンパク発現の制御に関わる因子を、シスタチン mRNA の増減、上述の小胞体ストレス応答を含めて総合的に明らかにして行く必要がある。

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0件)

[学会発表](計5件)

吉野陽子、今村武浩、山近重生、中川洋二:慢性ストレスによる唾液タンパク分泌抑制のメカニズム～小胞体ストレスの関与～、日本口腔外科学会、2015年10月17日、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

吉野陽子、今村武浩、山近重生、前田伸子、齋藤一郎、中川洋一:長期のアドレナリン受容体刺激が及ぼす唾液タンパク分泌低下のメカニズム、日本歯科薬物療法学会、2015年6月15日、鶴見大学会館(神奈川県横浜市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

中川 洋一(Nakagawa Yoichi)  
鶴見大学・歯学部・准教授  
研究者番号:90148057

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

吉野 陽子(Yoshino Yoko)