

## 〔学位論文〕

## マウス自己免疫性唾液腺炎へのToll-like receptor発現の関与

清水 重善

北海道医療大学歯学部歯学研究科・再建学系う蝕制御治療学分野

## Involvement of toll-like Receptor in Autoimmune Sialoadenitis of NOD Mouse

Shigeyoshi SHIMIZU

Division of Clinical Cariology and Endodontology, Department of Oral Rehabilitation, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido

## 緒 言

シェーグレン症候群をはじめとした自己免疫性唾液腺炎は、唾液分泌低下によりドライマウスを引き起こす主要な原因であり、本邦では推定4万人の患者がいるといわれている。自己免疫性唾液腺炎によりドライマウスを引き起こし、易感染性や嚥下困難など、口腔内QOLの著しい低下を引き起こすが、本疾患の病態や疾患発症のメカニズムには未だ不明な点が多く、治療法も確立しているとは言い難い。Toll-like receptor (TLR)は、細胞表面にある受容体タンパク質で、病原微生物を認識して自然免疫機構を発動する働きがある。TLRはヒトでは10種類、マウスでは12種類のもので報告されている。TLRは細菌やウイルス以外にもDNAやRNAを認識することから、自己免疫疾患の発症や進行に関わっていることが近年示唆されてきている。しかしながら、自己免疫性唾液腺炎の発症および、進行過程におけるTLRの関与については不明である。本研究では、自己免疫性唾液腺炎発症および進行過程におけるTLR発現の関与を明らかにするために、本疾患が自然発症するモデル動物を用いて、唾液腺炎の発症および進行過程でのTLRの発現変化について検証した。さらに、TLRのインヒビターとして働くクロロキンにより唾液腺炎が抑制されるか否かについて検討した。

## 材料および方法

動物にはNon-Obese diabetic (NOD) マウス (日本クレア社製, Tokyo, Japan) を用いた。NODマウスは自己免疫疾患によりI型糖尿病が誘発され、膵炎、腎炎と

ともに唾液腺炎が経時的に自然誘発されるマウスである。4, 8, 10, 12, 14および16週齢のNODマウスをジメチルエーテル麻酔下で屠殺し、顎下腺を摘出した。組織学的な観察のため、摘出した顎下腺は10%中性緩衝ホルマリンで固定し、パラフィン包埋したのち、通法に従い組織切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を施した。TLR 1~13 mRNAとTLRの細胞内シグナル分子であるMYD88 mRNAの発現変化を検証するため、顎下腺をトライゾール (GIBCO BRL社, UK) 浸漬法でホモジネートを行い、total RNAを抽出後、Oligo (dt)<sub>12-18</sub>プライマーによる逆転写を行った。得られた逆転写産物cDNAはTaqMan probe (Applied Biosystems, CA, USA) を用いた定量的RT-PCR法にて、それぞれのmRNA発現を定量的に評価した。さらに、TLRインヒビターであるクロロキンによる唾液腺炎の抑制効果を検証するため、クロロキン50mg/kg水溶液 (SIGMA, STL, USA) を経口投与し、生後4週から16週まで毎週、飲水量を測定後、4週齢と16週齢で屠殺した。なお、クロロキンの代わりに蒸留水を飲ませたものをコントロールとした。屠殺後速やかに顎下腺を摘出し、上記と同様にTLRsとMYD88のTaqMan probeを用いた定量的RT-PCR法を行った。同時に、組織をホルマリン固定後、通法に従いパラフィンに包埋し連続切片を作製して、Image Processing and Analysis in Java (imageJ) (NIH) を用いて、唾液腺組織内における炎症細胞の占める割合を算出した。いずれのデータも、Student-t testにより統計学的な解析を行った。

受付：平成22年3月30日

## 結 果

NODマウスの顎下腺の組織像を週齢毎に観察したところ、4週齢において唾液腺組織には炎症所見はみられず正常の組織像を呈していたが、8週齢以降から10週、12週齢と週齢の増加に伴いリンパ球の浸潤像がみられ、12週齢の唾液腺組織ではリンパ球の明らかなfocus形成と腺房の萎縮や破壊消失が認められた。TaqManプローブを用いた定量的RT-PCR法によりmRNAの発現パターンを観察したところ、TLR 1, 2, 3, 4, 9 mRNAは週齢の増加に伴い、著明な発現上昇が認められた。一方、TLR 5, 6, 7, 8, 11, 12および13 mRNAは週齢による有意な発現の変化はみられなかった。また、TLR細胞内シグナル分子であるMyD88 mRNAは、4週齢に比較し16週齢で有意な発現の上昇が認められた。TLRのインヒビターであるクロロキンを経口投与し、TLRs mRNAの発現量と唾液腺組織内における炎症細胞が占める割合について比較検討を行った。クロロキン投与群と蒸留水を経口投与したコントロール群の飲水量を比較すると、クロロキン投与群では有意に飲水量の減少が確認された。16週齢で、クロロキン投与群とコントロール群の顎下腺のTLR mRNAレベルを定量的RT-PCR法により観察したところ、コントロール群に比較してクロロキン投与群では、TLR 1, 2, 9 mRNAの有意な発現減少が確認された。また、16週齢のクロロキン投与群とコントロール群の顎下腺に占めるリンパ球浸潤の割合を、連続切片を用いた画像解析により比較したところ、クロロキン投与群では有意にリンパ球浸潤の割合が減少した。

## 考 察

本研究では、自己免疫性唾液腺炎のモデルマウスであるNODマウスの顎下腺炎の炎症や進行過程に、TLRの発現が関与していることをはじめて明らかにした。顎下腺炎の進行に伴いTLR 1, 2, 3, 4, 9のmRNA発現が上昇し、インヒビターによりTLR 1, 2, 9 mRNAの有意な発現減少が確認されたことから、TLR 1, 2, 9 mRNAの発現がNODマウスの自己免疫性唾液腺炎の発症および進行過程に関与しているものと思われる。また、TLRインヒビター投与により唾液腺炎が抑制されたことから、自己免疫性唾液腺炎の治療としてクロロキンのようなTLRをターゲットとしたものが有効であることが示唆された。

## 結 論

本研究では、自己免疫性唾液腺炎の発症および進行過

程でのToll-like receptor (TLR) 発現の関与を明らかにするために、自己免疫唾液腺炎を自然発症するモデル動物であるNODマウスを用いて、本疾患の発症および進行過程でのTLRの発現変化について検証した。さらに、TLRインヒビターとして働くクロロキンの投与により自己免疫性唾液腺炎が抑制されるか否かについて検討した。

結果をまとめると以下のようになる。

1. NODマウスの4週齢において、唾液腺組織には炎症所見はみられず正常の組織像を呈していたが、8週齢以降から10週、12週齢と週齢の増加に伴いリンパ球の浸潤像が認められた。
2. 炎症に進行に伴い、TLR 1, 2, 3, 4および9 mRNAの有意な発現上昇と、TLRの細胞内シグナル分子であるMYD88 mRNAの発現上昇が認められた。
3. TLRインヒビターであるクロロキンをNODマウスに投与したところ、TLR 1, 2, 9 mRNAの発現低下が認められた。
4. クロロキン投与により唾液腺における炎症細胞浸潤範囲の有意な減少が認められた。

以上のことから、自己免疫性唾液腺炎の進行にはTLRの発現上昇が関与しており、TLRの発現を抑制することが、本疾患の治療法として有効であることが示唆された。