

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20369

研究課題名(和文) 唾液腺の分泌機能と病態における亜鉛トランスポーターZnT4の役割

研究課題名(英文) The role of zinc transporter ZnT4 in secretory function and pathology of salivary glands

研究代表者

福島 美和子 (Matsuki-Fukushima, Miwako)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：90548273

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：唾液に含まれる亜鉛の分泌経路として亜鉛輸送体であるZnT4の唾液腺における役割を検討した。野生型マウスでは、三大唾液腺のうち顎下腺と舌下腺で遺伝子発現量が多く、in situ hybridizationおよび免疫染色において腺房細胞に弱陽性、介在部導管近傍に陽性像がみられた。また、陽性対象である乳腺ではZnT4を示す40 kDaのバンドがみられ、顎下腺では弱陽性を示すことから、ZnT4は唾液腺に発現していることが確認された。一方、ZnT4の自然発症型変異を持つImマウスでは、維持に必須の亜鉛を飲水から除去しても、乳腺で観察されるような退行性変性は唾液腺で生じなかった。

研究成果の概要(英文)：We determined the role of a zinc transporter, ZnT4, in salivary zinc secretion. In major salivary glands of wild type female mouse, expression level of ZnT4 in submandibular (SMG) and sublingual (SLG) glands were higher than parotid gland. Also, in situ hybridization detected that positive reaction in acinar and intercalated duct of SMG and SLG. In western blotting, ZnT4 positive band was detected in both SMG and mammary gland lysates. Therefore, ZnT4 was suggested that expressed in salivary glands. Next we used spontaneous mutant mice of ZnT4 (Im mouse) which is induced mammary gland degeneration by removal of additive zinc in drinking water. In result, removal of additive zinc in drinking water did not induce degeneration of submandibular gland.

研究分野：口腔病理学

キーワード：亜鉛 唾液腺 ZnT

1. 研究開始当初の背景

ZnT4 は細胞質内の亜鉛を細胞外へ輸送する ZnT 亜鉛トランスポーターファミリーに属し、分泌顆粒に亜鉛を輸送することが知られている。亜鉛を豊富に含む唾液腺において亜鉛トランスポーターがどのような役割を演じているのか、ZnT4 をモデル分子として、唾液腺の生理機能および病態における役割を解析することにした。

2. 研究の目的

亜鉛欠乏は味覚障害や歯周疾患などの口腔疾患と強く相関することが知られる。また、唾液中には pH 緩衝作用や抗菌作用を有する亜鉛結合タンパク質が多く含まれることから、亜鉛は唾液の機能に重要であると考えられる。さらに、口腔癌と血清・唾液中亜鉛濃度についても相関すると報告されている。申請者は、唾液腺における亜鉛の輸送経路を通して口腔機能における亜鉛の生理学的・病理学的役割を明らかに出来ると考えた。亜鉛輸送体ファミリーの ZnTs は細胞外や細胞内小器官内への亜鉛分泌を担当し、特に ZnT4 は乳汁中への亜鉛分泌に重要であることが報告されている(1997, Nature Genetics)。そこで、「ZnT4 が唾液腺の分泌顆粒に局在して亜鉛を輸送し、唾液中亜鉛分泌を制御する(図 1、2)」との仮説の元に、唾液腺における ZnT4 の局在と発現を解析し、唾液中亜鉛の分泌における生理的・病理学的役割を明らかにすることを目的とした。

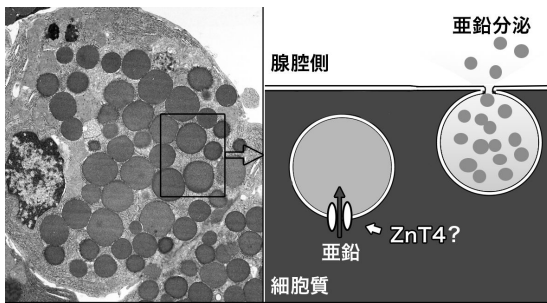


図 1
唾液腺の分泌タンパク質は分泌顆粒に濃縮し、顆粒膜は水や塩素イオン透過性を持つ

図 2
ZnT4 が唾液腺の分泌顆粒に局在し、亜鉛を唾液中に分泌する機能を担う可能性がある

3. 研究の方法

全ての動物実験は昭和大学動物実験委員会の了承を得て行った。(承認番号 15074, 16069, 17073)

【(1)ヒト顎下腺細胞株を用いた hZnT4 の発現と局在の検討】

唾液腺における ZnT4 の役割を In vitro で明らかにするため、正常ヒト顎下腺細胞株を用いて以下の項目を検討した。顎下腺細胞株は NS-SV-AC (AC 細胞、腺房細胞由来)、NS-SV-DC (DC 細胞、導管細胞由来)、NS-SV-MC (MC 細胞、筋上皮細胞由来) の 3 種を同じケラチノサイト培地(EGF, 下垂体抽出物添加)で培養した。各細胞は、6 ウェルプレートへ継代後に 1-2 日間の培養を行った後、サブコン

フルエントの状態以下の実験のサンプルに供与した。

遺伝子発現量は、Trizol による Total RNA 抽出を行った後、逆転写酵素処理で得た DNA テンプレートをを用いた。ヒト ZnT4 に対するプライマーを用い、リアルタイム PCR で検討した。検出には Applied Biosystems 社製 7500 Standard を用いた。

細胞内局在は、4%パラホルムアルデヒド(PFA)固定後、抗 ZnT4 抗体を用いた蛍光免疫染色により観察した(抗体は京都大学 神戸大朋先生から供与)。検出には Nikon 社製 A1 共焦点レーザー顕微鏡を用いた。

【(2)マウス唾液腺における mZnT4 の発現と局在の検討】

野生型マウスとして 6 週齢の雌性 C57BL/6J マウスを用いた。妊娠マウスは胎生 13.5 日齢の時点の母体マウスを用いた。唾液腺および乳腺は三種混合麻酔薬による深麻酔下に摘出し、以下の実験に用いた。

三大唾液腺から抽出した Total RNA を逆転写酵素処理し、得た DNA テンプレートにマウス ZnT4 に対するプライマーを用いてリアルタイム PCR で解析した。

唾液腺を 4%PFA 固定後、ZnT4 に対するプローブを用いた In Situ Hybridization により遺伝子発現を観察した。

タンパク質発現量は、RIPA バッファーによる抽出を行い、抗 ZnT4 抗体(CusaBio 社)を用いた Western blotting で確認した。検出は Bio-Rad 社製 ChemDoc XRS を用いた。

【(3)自然発症型 ZnT4 ミュータント *lm* マウスにおける唾液腺の機能および形態変化】

lm マウスは理化学研究所より受精卵の供与を受けた。昭和大学動物実験施設にて人工授精によりヘテロマウスを作製し、10mg/ℓ sucrose, 80mg/ℓ 塩化亜鉛(pH8.0)を添加した飲水(亜鉛水)で維持した。以下の実験にメスの野生型、ヘテロ、ホモマウスを用いた。

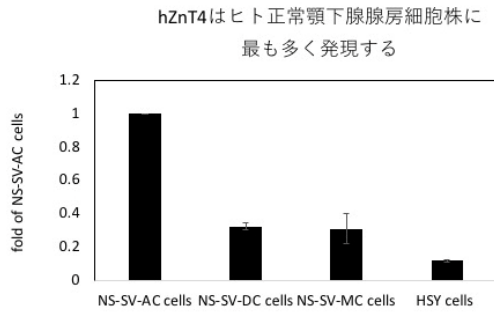
野生型および *lm* ホモマウスの耳下腺からコラゲナーゼ・ヒアルロニダーゼによる急速酵素消化で分離腺房細胞を採取した。分離した腺房細胞を 受容体刺激し、懸濁液中に分泌されたアミラーゼの活性を Bernfeld 法(1979, Method of Enzymology)で検討した。

深麻酔下でそれぞれ野生型、ヘテロマウスの腹腔に 0.1%ピロカルピン(最終濃度)を投与し、15 分間に分泌される総唾液量を 1 分おきに計測した。有意差は ANOVA により検定した。

ホモ *lm* マウスを亜鉛水群と普通水群で 70 週維持後の乳腺および顎下腺の形態を比較した。4%PFA で灌流固定後、一晚浸漬固定した乳腺および顎下腺を用いてパラフィン切片を作製し、HE 染色による形態の観察を行った。

4. 研究成果

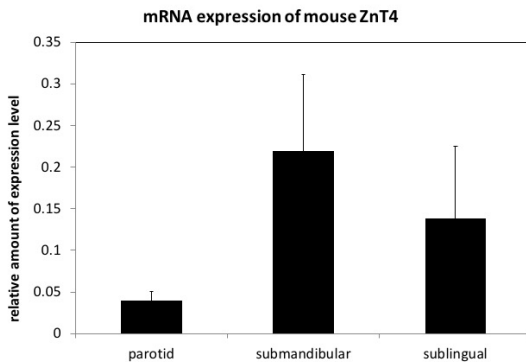
【(1)ヒト顎下腺細胞株を用いた hZnT4 の発現と局在の検討】



ヒト正常顎下腺細胞株および腺様嚢胞癌由来導管様細胞株 HSY 細胞における ZnT4 の mRNA 発現量をリアルタイム PCR で解析した。結果、顎下腺腺房細胞株 AC 細胞で最も高い発現がみられた(上図)。

AC 細胞に対する抗 ZnT4 抗体を用いた蛍光免疫染色の結果、分泌顆粒内容物マーカーの抗アミラーゼ抗体、分泌顆粒膜マーカーの抗 VAMP2 抗体とともにドット状の共局在を示した。

【(2)マウス唾液腺における mZnT4 の発現と局在の検討】



マウス耳下腺、顎下腺、舌下腺における ZnT4 の mRNA 発現量をリアルタイム PCR で解析した。結果、耳下腺に対し顎下腺、舌下腺、涙腺で高い発現がみられた(上図)。

In Situ Hybridization の結果、antisense 群において顎下腺および舌下腺の腺房細胞、介在部導管細胞に陽性反応が検出された。

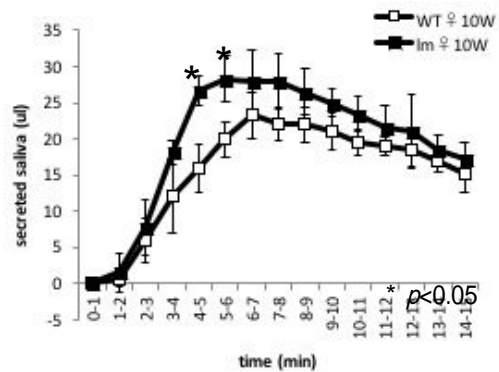
抗 ZnT4 抗体を用いたウェスタンブロットの結果、妊娠マウス乳腺および顎下腺に 41~50 kDa のバンドが検出された。顎下腺における抗 ZnT4 抗体陽性バンドの蛍光強度は乳腺に比較し弱陽性であった。

【(3)自然発症型 ZnT4 ミュータント *lm* マウスにおける唾液腺の機能および形態変化】

分離耳下腺腺房細胞を 1 μ M のイソプロテレノールにより 受容体刺激し、懸濁液中に分泌されたアミラーゼの活性を検討した。結果、野生型と比較してアミラーゼ活性に変化はみられなかった。

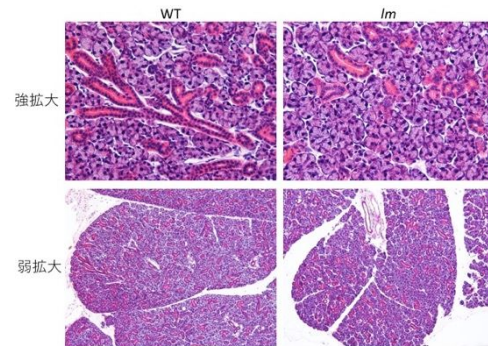
0.1%ピロカルピン誘導性に分泌された 10

週齢 *lm* ヘテロおよび野生型マウスの刺激時唾液量は、雌マウスの 3, 4 分値で有意に増加していた(下図)。



ホモ *lm* マウスを亜鉛水群と普通水群で 70 週維持後の顎下腺の形態を比較した結果、普通水群のホモ *lm* マウスには皮膚炎や乳腺の萎縮・退行性変性がみられ、文献に示される結果と一致していた(2016, Am J Physiol)。一方、顎下腺の形態に有意な差はみられなかった(下図)。

亜鉛除去実験を行った70週齢 lm マウスの外分泌腺 形態変化の観察



【(4)まとめ】

顎下腺腺房細胞株およびマウス顎下腺、舌下腺に ZnT4 の遺伝子発現とタンパク質発現を認めたが、ZnT4 の遺伝子変異および機能不全は耳下腺のタンパク質分泌機能および顎下腺の形態に変化を生じなかった。*lm* ヘテロマウスにおいて水分量が増加したことから、ムスカリン性受容体を介した水分分泌の調節に機能する可能性が考えられた。唾液腺癌由来細胞株では正常細胞株に比較して mRNA 発現量が顕著に減少していたことから、唾液腺細胞の癌化と遺伝子発現に負の相関があるものと推測される。

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 1 件)

Katsumata-Kato O, Yokoyama M,

Matsuki-Fukushima M, Narita T, Sugiya H,

Fujita-Yoshigaki J.他、

Arch Oral Biol、Vol.60, No.4, 2015, pp.642-649 (査読有)

DOI:10.1016/j.archoralbio.2015.01.006

〔学会発表〕(計 7 件)

田中準一、大庭 伸介、北條 宏徳、馬淵洋、安原 理佳、入江 太郎、福島 美和子、河野 葉子、美島 健二、唾液腺初期発生における転写因子の機能解析、第 17 回日本抗加齢医学会総会、2017 年

安原 理佳、田中 準一、川嶋 章弘、福島 美和子、入江 太郎、関沢 明彦、美島 健二、脂肪幹細胞を活用した唾液腺再生メカニズムの解析、第 106 回日本病理学会総会、2017 年

田中準一、大庭 伸介、北條 宏徳、馬淵洋、安原 理佳、入江 太郎、福島 美和子、河野 葉子、美島 健二、唾液腺初期発生における転写因子の機能解析、第 106 回日本病理学会総会、2017 年

安原 理佳、田中 準一、入江 太郎、福島 美和子、河野 葉子、美島 健二、唾液腺由来筋上皮細胞の単離と性質解析、第 61 回日本唾液腺学会、2016 年

安原 理佳、田中 準一、入江 太郎、福島 美和子、河野 葉子、美島 健二、唾液腺由来筋上皮細胞の性質解析、第 88 回日本生化学会大会・日本分子生物学会年会合同大会、2016 年

田中 準一、馬淵 洋、安原 理佳、入江 太郎、福島 美和子、河野 葉子、美島 健二、Sox9 を介したマウス唾液腺組織幹細胞の機能解析、第 105 回日本病理学会総会、2016 年

田中 準一、馬淵 洋、安原 理佳、入江 太郎、深田 俊幸、福島 美和子、河野 葉子、美島 健二、マウス唾液腺における幹細胞の同定とその機能解析、第 104 回日本病理学会総会、2015 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

唾液腺再生医療プロジェクト

<http://www10.showa-u.ac.jp/~oralpath/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福島 美和子 (FUKUSHIMA, Miwako)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号： 90548273

研究者番号：

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

美島 健二 (MISHIMA, Kenji)

昭和大学・歯学部・教授

研究者番号： 50275343

入江 太郎 (IRIE, Taro)

岩手医科大学・歯学部・教授

研究者番号： 00317570

安原 理佳 (YASUHARA, Rika)

昭和大学・歯学部・講師

研究者番号： 20453649

田中 準一 (TANAKA, Junichi)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号： 40710166

深田 俊幸 (FUKADA, Toshiyuki)
徳島文理大学・薬学部・教授
研究者番号： 70373363