

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：32710

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11633

研究課題名(和文) 唾液腺特異的傷害モデルマウスの作出とEGFR2/MUC1経路による修復機構の解明

研究課題名(英文) Generation of salivary gland-specific injury model mouse and elucidation of repair mechanism by EGFR2 / MUC1 pathway

研究代表者

松本 直行 (MATSUMOTO, Naoyuki)

鶴見大学・歯学部・准教授

研究者番号：20386080

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：従来の唾液腺炎モデルマウスは唾液腺以外の諸臓器が傷害されるため、再生医療の効果を正確に評価するのが困難であった。そのため唾液腺が特異的に傷害される動物モデルが求められていた。本研究課題では、唾液腺炎のモデルとしてToxin receptor-mediated cell knockout法を用いた遺伝子改変により唾液腺特異的傷害モデルマウスを作出した。本マウスにジフテリア毒素(DT)を注射しピロカルピン刺激唾液分泌量を計測した結果、DT投与168時間後では約55%まで低下した。さらに唾液腺障害の程度をTUNELにより組織学的に検討した結果、野生型に比べてアポトーシスの増加が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では唾液腺局所に発現するプロモーターによる遺伝子改変マウスを作出し、唾液腺特異的に組織が障害されることを確認した。この遺伝子改変マウスはこれまでにない病態モデルとなり、唾液腺障害に起因する唾液分泌障害のメカニズムの解析や、唾液腺組織再生治療の開発の為に、唾液腺を特異的に障害するモデル動物の開発が極めて有効な研究戦略となると考えられる。今後、この遺伝子改変マウスを利用して組織傷害や再生の詳細を検討する。

研究成果の概要(英文)：It is difficult to accurately evaluate the effect of regenerative therapy in conventional mouse models of salivary gland injury, because various organs other than salivary glands are injured. Therefore, an animal model of salivary gland injury has been required. In this study, we established a salivary gland-specific injury model mouse by gene modification using the Toxin receptor-mediated cell knockout (TRECK) as a model of salivary gland injury. Diphtheria toxin (DT) was injected into the transgenic mouse, and the amount of pilocarpine-stimulated salivary secretion was measured. As a result, it decreased to about 55% 168 hours after the administration of DT. Furthermore, histological examination revealed an increase of TUNEL-positive apoptotic cell as compared with the wild type.

研究分野：病理学

キーワード：唾液腺 組織傷害 遺伝子改変マウス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

口腔は生物としての生命維持に必要な摂食・嚥下という基本的機能を担うとともに、会話や味覚などの高次機能にも関与する。これらの口腔機能の維持には唾液が不可欠であり、唾液の分泌不全が誘因となる高齢者の誤嚥性肺炎や低栄養の増加は社会問題でもある。口腔乾燥症は唾液分泌量が減少する多因子性の疾患で口腔乾燥感、味覚異常、齲蝕、歯周病、口腔内の疼痛など局所的な症状だけでなく、飲水切望感、食物摂取困難による低栄養などを続発するため、QOL (Quality of Life) を著しく低下させ、全身的に様々な影響を与える事が知られている。

(Matsumoto N. et al. Curr Oral Health Rep, doi.org/10.1007/s40496-020-00262-6, 2020)

口腔乾燥症の原因は口呼吸などによる水分喪失と、唾液分泌量低下に大別され、唾液分泌減少の原因は体液の喪失等の全身的要因、唾液腺組織傷害および唾液分泌刺激の抑制に分類できる。これらの原因のうち、唾液腺組織の傷害は重要な病因と考えられている。Sjögren 症候群 (SS) をはじめとする唾液腺傷害の病因は不明な点が多いが、唾液腺組織のアポトーシスによる傷害のメカニズムが想定されている。そのため唾液腺組織傷害の成立機序とその修復機構を解明することは極めて重要である。

従来、唾液腺炎モデルマウスとして自己免疫疾患自然発症マウス、遺伝子改変マウスや T 細胞移入マウスが用いられていたが、唾液腺以外の様々な臓器が傷害されるため唾液腺再生治療の効果を正確に評価するのが困難な事から、唾液腺組織特異的に傷害を生じる動物モデルが求められていた。

### 2. 研究の目的

本研究課題では、口腔乾燥症のモデルとして唾液腺組織を特異的に傷害する動物モデルを確立するため、Toxin receptor-mediated cell knockout (TRECK) 法を用いた遺伝子改変により唾液腺特異的傷害モデルマウスを作成することを計画した。TRECK 法はヒト・ジフテリアトキシン (DT) 受容体として機能するヘパリン結合 EGF 様成長因子 (HB-EGF) の上流に標的細胞または組織に特異的な遺伝子プロモーターを組み込み、遺伝子改変動物を作成する方法であり、DT 投与により標的細胞を特異的に傷害することが可能である。(Saito M, et al. Nat Biotechnol, 746- 750, 2001)

### 3. 研究の方法

TRECK 法を応用して、唾液腺特異的傷害を呈す遺伝子改変マウスを作成する。野生型マウスは DT に対して非感受性であるため DT を投与しても細胞障害は生じない。一方で組織特異的または細胞特異的に DT 受容体を発現する遺伝子改変マウスを作成し、DT を投与すると、DT 受容体を発現した細胞のみが傷害される。TRECK 法では臓器特異的エンハンサー・プロモーター配列の下流にヒト・DT 受容体を組み込んだベクターをマウスに導入するが、本研究では唾液腺組織特異的な組織傷害を目的としているため、アミラーゼ遺伝子 (AMY1C) ならびにムチン-7 遺伝子 (MUC-7) のエンハンサー・プロモーター配列をそれぞれ TA-クローニングし、ヒト・DT 受容体が組み込まれた TRECK ベクターを作製し、受精卵ヘマイクローインジェクションして唾液腺特異的傷害モデルマウスを作成した。

TRECK 法により作成した遺伝子改変マウスの顎下腺を摘出し、DT 投与による唾液腺組織傷害を臓器スライス培養 (organ culture) により検討した。また遺伝子改変マウスに DT を腹腔内投与し、DT 投与による唾液分泌機能を評価するためにピロカルピン誘発唾液を測定した。さらに唾液腺組織傷害を検討するために TUNEL 法により細胞のアポトーシスを検出し、対物レンズ 40 倍で 3 箇所を撮影し TUNEL 陽性細胞率を算出した。

### 4. 研究成果

本研究課題では、口腔乾燥症の動物モデル確立のために TRECK 法を用いた遺伝子改変により唾液腺特異的傷害モデルマウスを作成した。

TRECK ベクターに AMY1C 遺伝子プロモーターを組み込んで作成したマウス (AMY1Cp-TRECK) 48 系統のうち 16 系統の顎下腺にヒト DT 受容体の発現を確認したが、唾液腺以外の複数の臓器にも発現が見られた。マウス生体に DT を投与すると多臓器に傷害が出ると推測されたため、臓器スライス培養で唾液腺障害を検討したところ、培養液への DT 添加により高度の細胞死が誘導された (図 1)。

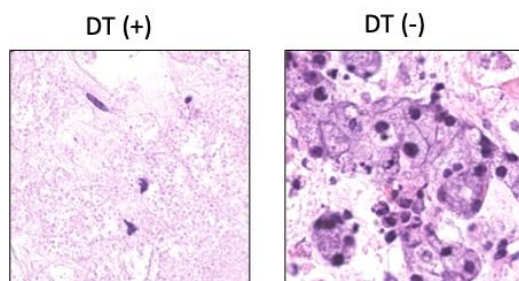


図 1 AMY1Cp-TRECK マウス顎下腺のスライス培養による DT 誘発組織傷害の検討

AMY1Cp-TRECK マウスの顎下腺スライス培養では、培養液に DT を添加した群では唾液腺組織の顕著な傷害が見られたが、DT 非添加群では唾液腺組織が保たれていた。

一方、MUC-7のプロモーター配列を組み込んで作出したマウス(MUC7p-TRECK)は99系統が得られ、そのうち1系統に顎下腺特異的なヒトDT受容体の発現を確認した(図2)。

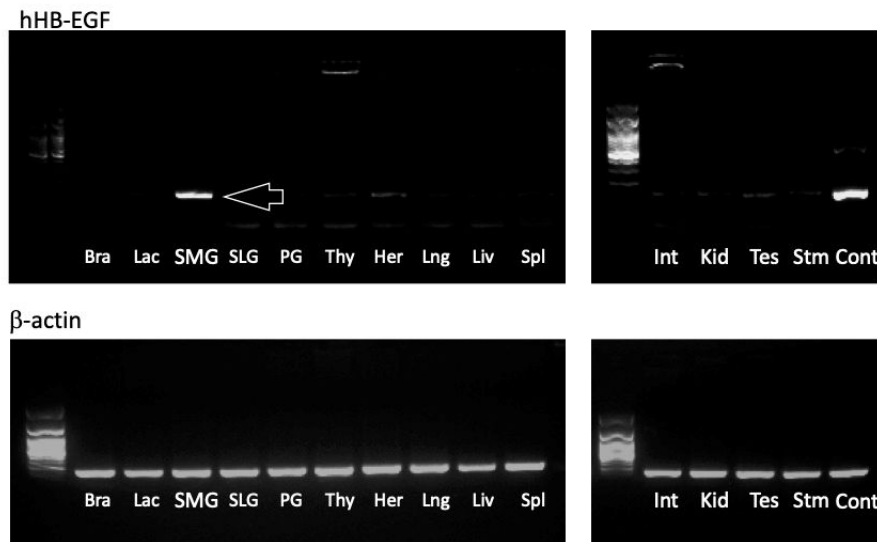


図2 MUC7p-TRECK マウスにおけるDT受容体(hHB-EGF)の発現状況

MUC7p-TRECKマウスの顎下腺にDT受容体の強い発現を認める(矢印)。

Bra; 脳、Lac; 涙腺、SMG; 顎下腺、SLG; 舌下腺、PG; 耳下腺、Thy; 胸腺、Her; 心臓、Lng; 肺、Liv; 肝臓、Spl; 脾臓、Int; 腸、Kid; 腎臓、Stm; 胃、Cont; 陽性コントロール、hHB-EGF; ヒトHB-EGF(DT受容体)、β-actin; ローディングコントロールとして使用。

MUC7p-TRECKマウスにDT(50 ng/Kg)を腹腔内に投与し、7日後に顎下腺を摘出してHE染色により組織傷害を検討したところ、野生型(wild type)および遺伝子改変マウス(hetero)の組織像に明らかな違いは見られなかったが、TUNEL法では遺伝子改変マウスは野生型に比べTUNEL陽性細胞が多く存在していた(図3)。

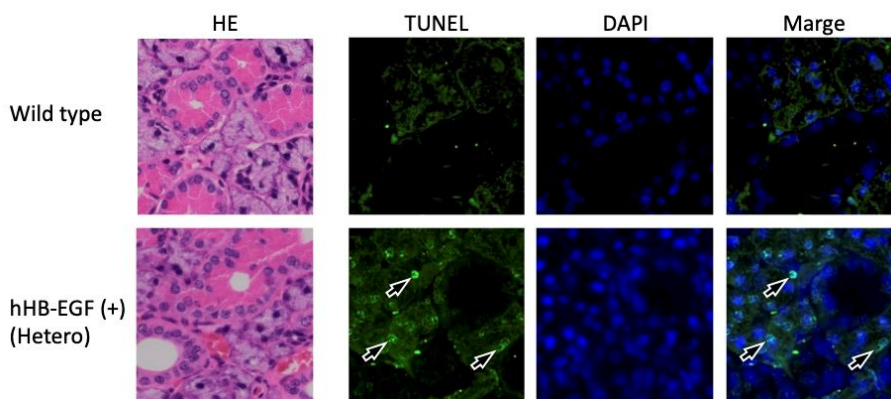


図3 DT投与によるMUC7p-TRECKマウス顎下腺の組織障害

MUC7p-TRECKマウス(hetero)にDTを投与し、顎下腺組織傷害をHE染色とTUNEL法で検討したところ、HE染色では野生型と遺伝子改変マウス(hetero)に明らかな組織傷害の違いは認めないが、TUNELでは遺伝子改変マウスは野生型に比べ多数のTUNEL陽性細胞を認めた(矢印)。

DTの投与量を最適化するために、DT(5~500 ng/Kg)をMUC7p-TRECKマウスに腹腔内投与し、顎下腺組織におけるTUNEL陽性細胞率を検討した。野生型に比べ遺伝子改変マウス(Homo)はDT投与によるTUNEL陽性細胞率が高値を示したが、遺伝子改変マウスではDT投与量とTUNEL陽性細胞率に明らかな違いが見られなかったことから、DT投与量を50 ng/Kgに設定した。(図4)

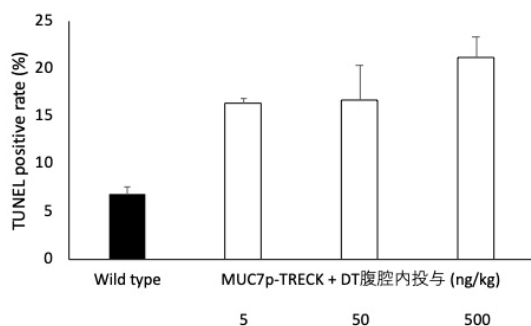
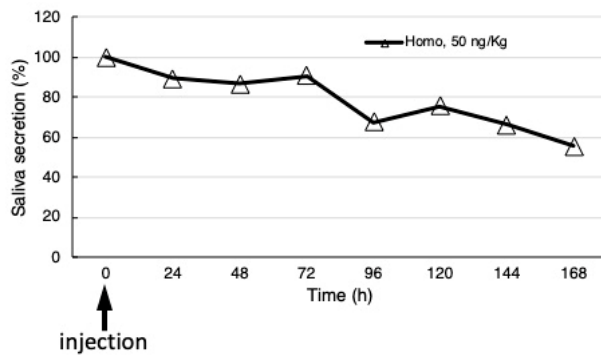


図4 MUC7p-TRECKマウスへのDT投与量と顎下腺TUNEL陽性細胞率の相関

MUC7p-TRECKマウスに種々の量のDTを投与し、顎下腺組織障害を検討したところ、投与量の違いによるTUNEL陽性細胞率の明らかな変化は見られなかった。

MUC7p-TRECK マウスに DT を腹腔注射し、ピロカルピン刺激唾液分泌量を経時的に計測した結果、DT 投与の 7 日後では約 55%まで唾液分泌量が低下し、唾液分泌機能の低下が確認された( 図 5 )。



**図 5 MUC7p-TRECK マウスへの DT 投与量と唾液分泌量の相関**

MUC7p-TRECK マウスに DT ( 50 ng/Kg ) を投与し、唾液分泌量を経時的に測定したところ、投与 7 日後では投与前の 55%にまで低下した。

これらの結果から本研究では唾液腺局所に発現するプロモーターによる遺伝子改変マウスを作成し、唾液腺特異的に組織が障害されることを確認した。この遺伝子改変マウスはこれまでにない病態モデルとなり、唾液腺障害に起因する唾液分泌障害のメカニズムの解析や、唾液腺組織再生治療の開発の為に、唾液腺を特異的に障害するモデル動物の開発が極めて有効な研究戦略となると考えられる。今後、この遺伝子改変マウスを利用して組織傷害や再生の詳細を検討する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Matsumoto Naoyuki, Ushikoshi-Nakayama Ryoko, Yamazaki Tomoe, Kaneko Mie, Saito Ichiro	4. 巻 -
2. 論文標題 What Are the Major Causes of Dry Mouth in Elderly Adults?	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Current Oral Health Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s40496-020-00262-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tsujiro Ichiro, Ushikoshi-Nakayama Ryoko, Yamazaki Tomoe, Matsumoto Naoyuki, Saito Ichiro	4. 巻 65
2. 論文標題 Pulmonary activation of vitamin D <sub>3</sub> and preventive effect against interstitial pneumonia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition	6. 最初と最後の頁 245 ~ 251
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3164/jcbn.19-48	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamazaki T., Ushikoshi-Nakayama R., Shirone K., Suzuki M., Abe S., Matsumoto N., Inoue H., Saito I.	4. 巻 10
2. 論文標題 Evaluation of the effect of a heat-killed lactic acid bacterium, Enterococcus faecalis 2001, on oral candidiasis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Beneficial Microbes	6. 最初と最後の頁 661 ~ 669
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3920/BM2018.0115	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ushikoshi-Nakayama Ryoko, Ryo Koufuchi, Yamazaki Tomoe, Kaneko Mie, Sugano Tomoko, Ito Yumi, Matsumoto Naoyuki, Saito Ichiro	4. 巻 14
2. 論文標題 Effect of gummy candy containing ubiquinol on secretion of saliva: A randomized, double-blind, placebo-controlled parallel-group comparative study and an in vitro study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0214495
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0214495	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松本直行, 中山亮子, 斎藤一郎
2. 発表標題 2型糖尿病に見られる唾液分泌障害成立機序の検討 -GlcNAc修飾を介した腺組織傷害の関与-
3. 学会等名 第28回 日本臨床口腔病理学会総会・学術大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

鶴見大学歯学部 病理学講座 <a href="http://ccs.tsurumi-u.ac.jp/dental/kouza/byouri/originalpaper.html">http://ccs.tsurumi-u.ac.jp/dental/kouza/byouri/originalpaper.html</a>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	梁 洪淵 (KOUFUCHI Ryo)  (10298268)	鶴見大学・歯学部・講師  (32710)	削除:2019年3月8日
研究分担者	内田 仁司 (UCHIDA Hitoshi)  (20736996)	鶴見大学・歯学部・学内講師  (32710)	削除:2017年9月20日
研究分担者	井上 裕子 (INOUE Hiroko)  (50367306)	日本薬科大学・薬学部・教授  (32425)	

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	中山 亮子  (NAKAYAMA Ryoko)  (50749843)	鶴見大学・歯学部・助教    (32710)	
研究 分担者	斎藤 一郎  (SAITO Ichiro)  (60147634)	鶴見大学・歯学部・教授    (32710)	削除:2018年5月10日