

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：27102

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K17032

研究課題名(和文)新規陰イオン交換輸送体に焦点を当てた分子医学的アプローチによる唾石症の病態解明

研究課題名(英文) Etiology of sialolithiasis associated with a novel anion exchanger activity

研究代表者

向坊 太郎 (Mukaibo, Taro)

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：50635117

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)：本研究ではシュウ酸ナトリウムをマウスに経口投与し、唾液腺に発現するSLC26A6の機能と唾石形成の因果関係について調査した。12週齢FVB/Njマウスを2群に分け、シュウ酸ナトリウムの2週間の経口投与する群と、生理食塩水を同量経口投与する群(コントロール群)に対し、組織中のシュウ酸カルシウム結晶沈着を確認した。腎臓、顎下腺、舌下腺組織をPizzolato染色したところ、全ての組織でシュウ酸ナトリウム経口摂取群のみでシュウ酸カルシウム結晶の沈着が認められた。舌下腺においては腺房細胞の一部に現局して大型の結晶が偏在しており、Slc26a6が舌下腺組織唾石の形成に関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの研究によりSLC26A6が生体内でシュウ酸の代謝に関わっており、SLC26A6の機能不全によりシュウ酸カルシウムが腎臓組織に沈着し、尿路結石の原因となる可能性が指摘されてきた。しかし、一方で同じくSLC26A6が高発現する唾液腺組織においてはその機能が不明であった。申請者は唾石症の原因がSLC26A6の機能と関連しているのではないかと仮説を立て、研究を行った。その結果、シュウ酸ナトリウムの過剰摂取が唾液腺組織中のシュウ酸カルシウム沈着に関与している可能性が示唆されたことから、本研究結果によりこれまで不明であった唾石症発症のメカニズムの一端を示すことができた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the causal relationship between the function of SLC26A6 expressed in salivary glands and salivary stone formation in mice orally administered sodium oxalate. 12-week-old FVB/Nj mice were divided into two groups, one group was orally administered sodium oxalate for 2 weeks and the other group was orally administered the same amount of saline (control group). The deposition of calcium oxalate crystals in the tissues of the two groups of 12-week-old FVB/Nj mice was examined. Pizzolato staining of kidney, submandibular and sublingual gland tissues revealed calcium oxalate crystal deposition in all tissues only in the oral sodium oxalate group. In the sublingual gland, the large crystals were localized and unevenly distributed in some of the glandular cells, suggesting that Slc26a6 may be involved in the formation of sublingual gland tissue salivary calculus.

研究分野：補綴系歯学

キーワード：唾石症 シュウ酸カルシウム Oxalate

## 1. 研究開始当初の背景

SLC26A6はこれまでに膵臓、および小腸上皮刷子縁に発現が報告されている陰イオン交換輸送体であり、小腸ではシュウ酸イオンの腸管腔側への排出機能を担っていると考えられている。尿路結石や尿管結石とSLC26A6の関連がノックアウトマウスで確認されている<sup>(1)</sup>。ヒトにおいては遺伝子多形との関連を調査した研究もあり<sup>(2)</sup>、尿路結石とSLC26A6が関連していることが強く示唆されていた。一方、申請者らはマウス顎下腺組織において唾液腺腺房細胞の腺腔側に局在していること、またCl<sup>-</sup>蛍光指示薬SPQを使用したCl<sup>-</sup>イオンの動態観察からSLC26A6がCl<sup>-</sup>/oxalate (シュウ酸)交換輸送を担っており、*Slc26a6*ノックアウトマウスでCl<sup>-</sup>とoxalate (シュウ酸)の交換輸送活動が著しく減弱することを明らかにした<sup>(3)</sup>。シュウ酸の約90%は肝臓によるアミノ酸の代謝過程で生成され、残りの10%がホウレン草などのシュウ酸を含む食品群摂取によって腸から体内に吸収される。これまでの研究により、食品によるシュウ酸摂取の方が血中シュウ酸濃度に与える影響が大きいこと分かっていた。唾石の成分としては尿路結石と異なり、リン酸カルシウムを主成分とする報告がある一方、一部構成要素としてシュウ酸カルシウムも報告されていた。従って当初シュウ酸の経口摂取が血中シュウ酸濃度の上昇を引き起こし、唾石症の発症に関与しているのではないかと仮説を立てた。

## 2. 研究の目的

マウス動物実験によりシュウ酸を強制経口投与し、唾液腺に発現する SLC26A6 の機能と唾石形成の因果関係について調査することを目的として研究を行った。

## 3. 研究の方法

12週齢 FVB/Nj マウスを2群に分け、0.1, 1, 10, 100mg/Kg シュウ酸ナトリウムの2週間の経口投与する群と、生理食塩水を同量経口投与する群に対し、尿路結石および唾石形成を確認する実験を行った。経口投与にはフィーディングニードルを使用し、過去の報告に従って意識下にて行った (Machholz, E. et al. J. Vis. Exp. (67), e2771, doi:10.3791/2771 (2012).)。投与は期間中毎日投与した。2週間の実験終了後、安楽死させ、マウス顎下腺、舌下腺、および腎臓を摘出し、パラフィン包埋を行った後5μmの組織切片を作製し、シュウ酸カルシウム染色である Pizzolato 染色を行った。Pizzolato 染色では1. 脱パラフィン後、硝酸銀・過酸化水素溶液をスライドに滴下。2. 切片から約15cmのところを60Wの電球を置き、30分放置。4. 蒸留水で洗浄後、核をファストレッド溶液で5分間染色。5. 蒸留水で洗浄。6. 脱水

## 4. 研究成果

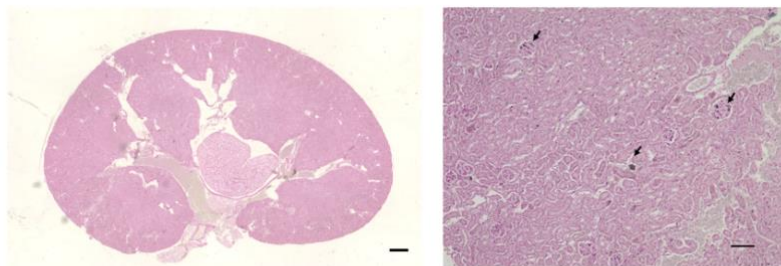
### シュウ酸カルシウム染色 (Pizzolato 染色)

しかし2週間生存したマウスの舌下腺、顎下腺、そして腎臓組織切片を Pizzolato 染色法により染色したところ、黒色のシュウ酸カルシウム結晶の沈着が全ての組織において認められた。以上の結果より、シュウ酸カルシウムの経口投与は腎臓だけでなく、顎下腺、舌下腺においてシュウ酸カルシウムを沈着させることから、シュウ酸の過剰摂取は腎結石同様、唾石症の原因にもなり得ることが示唆された。

### (1) 腎臓組織

主に糸球体内部にシュウ酸カルシウムと考えられる黒色の結晶構造が認められる (図1右図)。一方、尿細管の管腔内には顕著なシュウ酸カルシウム結晶の構造物はほとんど認められない。また免疫細胞の浸潤は認められない。

図1. 10mg/Kgシュウ酸ナトリウム投与群マウス腎臓組織像



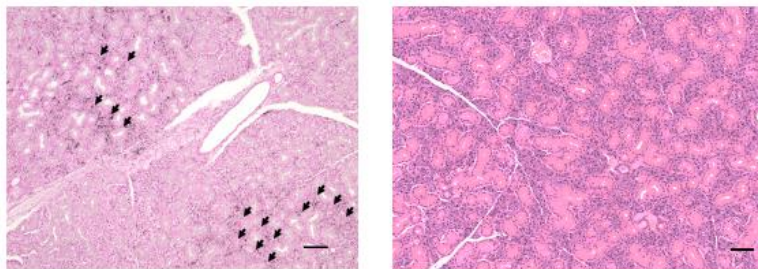
10mg/Kgシュウ酸ナトリウムにより、マウス腎臓中の糸球体を中心にシュウ酸カルシウム結晶の沈着 (黒色矢印) が認められる。(スケールバー左:500μm 右:100μm)



## (2) 顎下腺組織

顎下腺組織においては10mg/Kg シュウ酸ナトリウム経口投与群と生理食塩水経口投与群（コントロール群）の組織像を比較した。シュウ酸ナトリウム経口投与群においては顎下腺腺房細胞中に多数のシュウ酸カルシウム結晶が確認（図2. 左図）された一方で、コントロール群においてはシュウ酸カルシウムの沈着は認められなかった。また導管細胞の腺房細胞内、および腺腔内にもシュウ酸カルシウムの沈着は起きていなかった。また腎臓と同じく免疫細胞の浸潤は認めず、炎症を疑う組織像は確認しなかった。

図2. 10mg/Kgシュウ酸ナトリウム投与群(左)コントロール群 (右) 顎下腺組織像

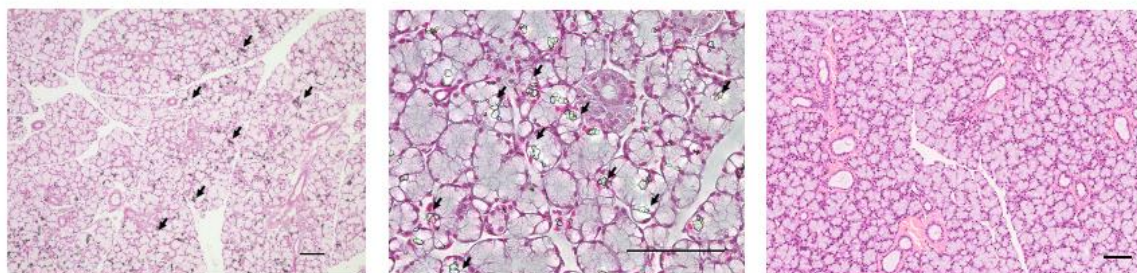


10mg/Kgシュウ酸ナトリウム投与群においては顎下腺腺房細胞中にシュウ酸カルシウム結晶の沈着が認められるが、コントロール群には結晶は認められない。(スケールバー100μm)

## (3) 舌下腺組織

舌下腺組織においては10mg/Kg シュウ酸ナトリウム経口投与群と生理食塩水経口投与群（コントロール群）の組織像を比較した。顎下腺と同じく、腺房細胞内に現局してシュウ酸カルシウム結晶の沈着が認められ、導管細胞および腺腔内には沈着は認めなかった。（図3.左, 中央）またコントロール群舌下腺組織ではシュウ酸カルシウム結晶の沈着はなく、シュウ酸ナトリウムの経口投与により組織中のシュウ酸カルシウムが沈着したことが確認できた。現局している像が確認できた。

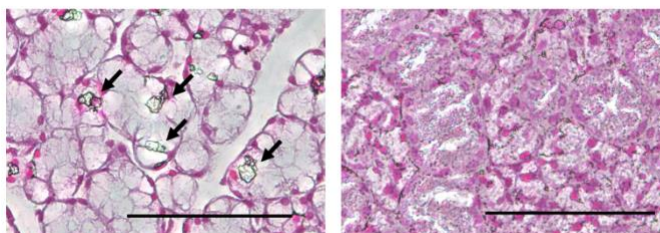
図3. 10mg/Kgシュウ酸ナトリウム投与群(左), 強拡大像 (中央), コントロール群 (右) 舌下腺組織像



10mg/Kgシュウ酸ナトリウム投与群においては舌下腺腺房細胞中にシュウ酸カルシウム結晶の沈着（黒色矢印）が認められる（左, 中央）。シュウ酸カルシウム結晶は腎臓、顎下腺よりも明らかに大きい。コントロール群には結晶は認められない（右）。（スケールバーは全て100μm）

図4. 10mg/Kgシュウ酸ナトリウム投与群の強拡大像：舌下腺組織像（左）顎下腺組織（右）

また結晶構造の大きさは腎臓組織および顎下腺組織中に見られる構造よりも明らかに大きく、腺房細胞の一部に偏在していることが確認できる。（図4.左）  
また他組織と同様、炎症細胞浸潤は認められなかった。



10mg/Kgシュウ酸ナトリウム投与群の舌下腺組織中に確認できるシュウ酸カルシウム結晶は顎下腺組織中の結晶に比べて大きく、腺房細胞内の一部に現局している。（スケールバー100μm）

## <参考文献>

1. Jiang Z, Asplin JR, Evan AP, Rajendran VM, Velazquez H, Nottoli TP, et al. Calcium oxalate urolithiasis in mice lacking anion transporter Slc26a6. *Nature genetics*. 2006;38(4):474-8.
2. Monico CG, Weinstein A, Jiang Z, Rohlinger AL, Cogal AG, Bjornson BB, et al. Phenotypic and functional analysis of human SLC26A6 variants in patients with familial hyperoxaluria and calcium oxalate nephrolithiasis. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*. 2008;52(6):1096-103.
3. Mukaibo T, Munemasa T, George AT, Tran DT, Gao X, Herche JL, et al. The apical anion exchanger Slc26a6 promotes oxalate secretion by murine submandibular gland acinar cells. *The Journal of biological chemistry*. 2018;293(17):6259-68.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 T. Mukaibo , M. Yamada , T. Nodai , T. Munemasa , A. Tamura , Y. Kondo , C. Masaki , R. Hosokawa
2. 発表標題 MUC Gene Alteration of Salivary Gland in Response to Inflammation
3. 学会等名 2020 IADR/AADR/CADR GENERAL SESSION & EXHIBITION Washington D.C. USA (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 向坊太郎, 宗政翔, 近藤祐介, 正木千尋, 細川隆司
2. 発表標題 唾液腺における Slc26a6 チャネルの発現と機能
3. 学会等名 第8回補綴若手研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 M. Yamada, T. Mukaibo, T. Nodai, T. Munemasa, Y. Kondo, C. Masaki, R. Hosokawa
2. 発表標題 Sexually Dimorphic Effects of Aging on Rheological Properties in Saliva
3. 学会等名 2021 IADR/AADR/CADR GENERAL SESSION & EXHIBITION (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------