

令和 5 年 6 月 4 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K10287

研究課題名（和文）ミトコンドリアダイナミクス異常が唾液腺機能に及ぼす影響の検討

研究課題名（英文）Investigation of the effects of abnormal mitochondrial dynamics on salivary gland function.

研究代表者

樋口 仁 (Hitoshi, Higuchi)

岡山大学・大学病院・准教授

研究者番号：30423320

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：Tmem135遺伝子はミトコンドリアダイナミクスを制御している遺伝子であり、本研究でTmem135変異マウスおよびTmem135トランスジェニックマウス（Tg）の唾液分泌機能を調べる事により、唾液分泌におけるミトコンドリアダイナミクスの関わりを調べた。その結果Tmem135変異マウスでは唾液分泌の減少傾向、Tmem135Tgマウスでは唾液分泌の増加傾向がみられ、Tmem135は唾液分泌機構に関連した遺伝子であり、ミトコンドリアダイナミクスは唾液分泌にも関連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

本研究はTmem135遺伝子およびミトコンドリアダイナミクスが唾液分泌機能に関わっている可能性を示した最初の報告である。唾液分泌機構はまだまだ解明されていない点が多く、臨床現場においても唾液分泌減少による口腔乾燥症には有効な治療法はなく、多くの臨床医がその対応に苦慮している。本研究成果は唾液分泌の制御機構を解明するための新たな糸口となる可能性がある

研究成果の概要（英文）：Tmem135 is a gene that regulates mitochondrial dynamics. In this study, we investigated the involvement of mitochondrial dynamics in salivary secretion by examining the salivary function of Tmem135 mutant mice and Tmem135 transgenic mice (Tg). The results showed a decreasing trend in salivary secretion in Tmem135 mutant mice and an increasing trend in salivary secretion in Tmem135Tg mice, suggesting that Tmem135 is a gene related to the salivary secretion mechanism and that mitochondrial dynamics may also be involved in salivary secretion.

研究分野：歯科麻酔学

キーワード：ミトコンドリア 唾液腺 Tmem135

1. 研究開始当初の背景

唾液は食物の摂取時に分泌される消化酵素を含んだ消化液であるが、口腔内の潤滑作用、抗菌・殺菌作用、緩衝作用、粘膜保護作用、抗脱灰作用、自浄作用など多くの役割を担っており、口腔内が唾液によって湿潤に保たれることにより健全な口腔内環境が維持されており、唾液分泌の低下は口腔内環境を著しく悪化させる。この唾液分泌低下（口腔乾燥症）を引き起こす要因としては、加齢、様々な薬剤やストレス、あるいはシェーグレン症候群といった疾患が挙げられる。口腔乾燥の自覚症状に関する調査研究によると、65歳以上の高齢者のうち27.6%が常時口腔乾燥を自覚していることが報告されている。さらに歯科臨床現場でも、唾液分泌の減少が原因と考えられるう蝕、歯周疾患、義歯不適合、摂食嚥下障害の悪化にしばしば遭遇するが、唾液分泌を改善する有効な手立てはなく、対応に難渋している。このように口腔乾燥症は早急に対応が迫られている口腔疾患の一つであるにも関わらず、その病態やメカニズムはほとんど明らかとなっていない。

世界的なゲノムプロジェクトの進展により、ヒト、マウスをはじめとする様々な生物種でゲノム塩基配列が決定され、いまだに膨大な数の機能未知の遺伝子が存在していることが明らかとされている。申請者の研究協力者である米国ウイスクンシン州立大学マディソン校のDr. Ikedaの研究室では、様々な遺伝子変異マウスを用いて、これら機能未知の遺伝子の機能解析および疾患への関わりについての研究を行っている。これら遺伝子変異マウスのなかで大変興味深いマウスに、Transmembrane135 (Tmem135)の変異マウスがあげられる。本遺伝子変異マウスは視覚や聴覚に加齢性変化が通常より早期に認められ、また線虫の研究においては本遺伝子をノックアウトすることにより、寿命が短くなることが報告されているなど、本遺伝子が加齢に関わる重要な遺伝子の1つである事が示唆されている。申請者らは近年、このTmem135変異マウスにミトコンドリアダイナミクスの異常が生じ、この異常により酸化ストレスが生じやすくなっていることで早期老化を引き起こされていることを突き止めた。

ミトコンドリアは分裂(fission)と融合(fusion)を頻繁に繰り返す(ミトコンドリアダイナミクス)、動的な細胞小器官である。融合が活性化すると長くつながった構造が形成され、逆に分裂が活性化すると小さな断片化した形状が増えるが、この分裂と融合の適切なバランスがミトコンドリア機能に重要と考えられている。申請者らはこのミトコンドリアダイナミクスがTmem135変異マウスでは融合方向に、またTmem135を過剰発現させたトランスジェニック(Tg)マウスでは分裂方向に傾くことを突き止め、Tmem135がミトコンドリアダイナミクスを制御している新たな遺伝子であることを明らかにした。このミトコンドリアダイナミクスの異常は近年、老化、癌、心疾患等の疾患との関連が明らかとなっており、唾液腺においてもその機能異常を引き起こすことが推測される

2. 研究の目的

唾液分泌は口腔機能の保持において極めて重要な生体機能であるが、それを制御しているメカニズム等はまだまだ不明な点が多い。唾液腺においても口腔乾燥症を引き起こす様々な病態に酸化ストレスの関与が示されているが、ミトコンドリアの異常が唾液腺機能に及ぼす影響は検討されておらず、ミトコンドリアダイナミクスが唾液分泌にどのように関わっているかも不明である。

そこで本研究課題は、Tmem135変異マウスおよびTmem135Tgマウスを用い、両マウスの唾液分泌量、組織学的変化、ミトコンドリアの構造変化を検討することにより、ミトコンドリアダイナミクス異常が唾液腺機能に及ぼす影響を検討する。さらにマイクロアレイにより、唾液腺の遺伝子発現を網羅的に解析し、関連する遺伝子パスウェイの変化についても検討を加える。

3. 研究の方法

(1) Tmem135変異マウスおよびTmem135Tgマウスの唾液分泌量の検討

各マウスは前日より絶食とした。ペントバルビタール 40mg/kg 腹腔内注射による全身麻酔の後、唾液分泌を誘発するために塩酸ピロカルピン 1mg/kg を皮下注射した。事前に重量を量った綿線を口腔内に挿入し唾液を綿線に吸収させ、5分間隔で計30分間の唾液採取を行った。唾液採取後の綿線の重量を測定し、マウスの体重で標準化した重さを唾液量とした。

(2) Tmem135変異マウスおよびTmem135Tgマウスの顎下腺の組織学的検討

①ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色による検討

各マウスをCO₂吸入により安楽死させた。顎下腺を摘出し、4%パラホルムアルデヒドにて固定後、パラフィンに包埋し、厚さ4μmのパラフィン切片を作成した。その後HE染色を行い光学顕微鏡にて観察を行った。

②電子顕微鏡によるTmem135変異マウス顎下腺のミトコンドリアの形態学的検討

野生型マウスおよびTmem135変異マウスを電子顕微鏡用切片作製専用の灌流液にて灌流し、

唾液腺を摘出した。摘出した唾液腺は岡山大学医学部共同実験室に依頼し、電子顕微鏡用切片の作製後、同実験室に設置されている電子顕微鏡にて、顎下腺のミトコンドリアの形態を観察し比較を行った。

(3) マイクロアレイによる Tmem135 変異マウスの顎下腺発現遺伝子の網羅的検討

野生型マウスおよび Tmem135 変異マウスを CO₂ 吸入により安楽死させた後、顎下腺を摘出した。株式会社 DNA チップ研究所に摘出した唾液腺のマイクロアレイ解析を依頼し、Tmem135 変異マウスの顎下腺において発現が増加している遺伝子、発現が減少している遺伝子の検討を行った。

4. 研究成果

(1) Tmem135 変異マウスおよび Tmem135Tg マウスの唾液分泌量の検討

① 野生型マウスと Tmem135 変異マウスの唾液量の比較

総唾液量および唾液分泌の経時的变化を図 1 に示す。Tmem135 変異マウスにおいて唾液量の減少傾向が見られた。

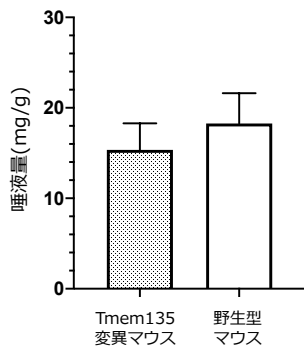


図1-1 唾液分泌の総量

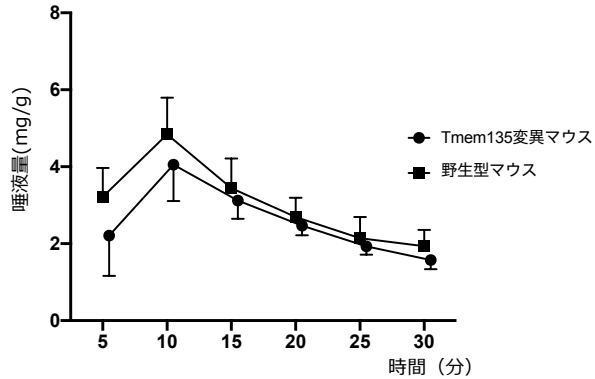


図1-2 唾液分泌の経時的变化

② 野生型マウスと Tmem135Tg マウスの唾液量の比較

総唾液量および唾液分泌の経時的变化を図 2 に示す。Tmem135Tg マウスにおいて唾液分泌量は有意に増加していた。

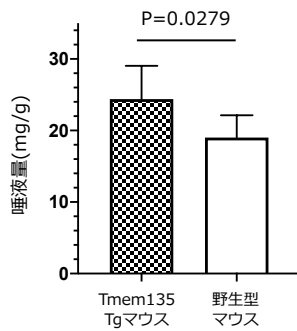


図2-1 唾液分泌の総量

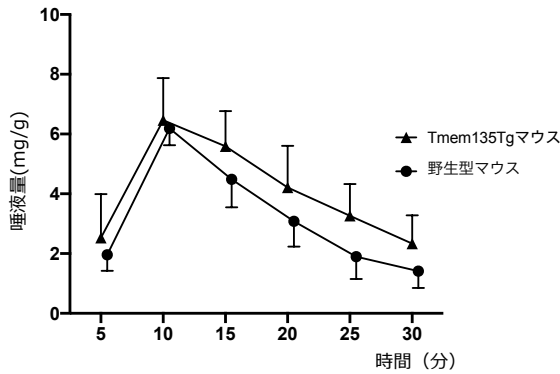
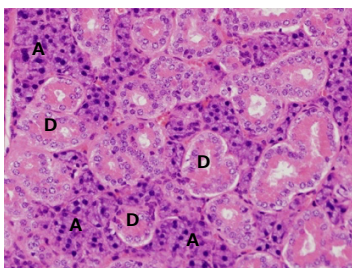


図2-2 唾液分泌の経時的变化

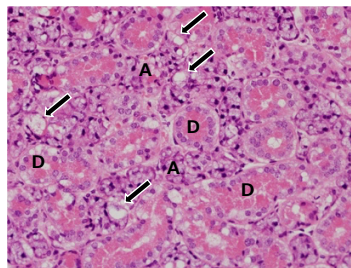
(2) Tmem135 変異マウスおよび Tmem135Tg マウスの顎下腺の組織学的検討

① ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色による検討

Tmem135 変異マウスでは加齢等に伴って唾液腺に観察される空胞化が認められたが(図 3)、明確な所見は得られなかった。これに対し Tmem135Tg マウスにおいては組織像において導管が占める割合が減少し (図 4-1)、相対的に腺房が占める割合が有意に増加していた (図 4-2)。



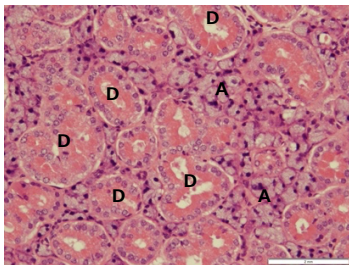
野生型マウス



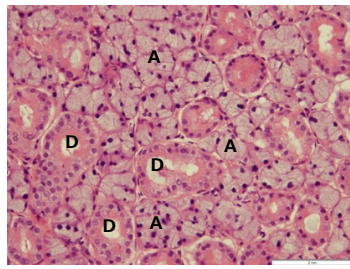
Tmem135 変異マウス

図 3 Tmem135 変異マウスの顎下腺の HE 染色 Tmem135

変異マウスの腺房には空胞化 (→) が認められる
A:腺房 D:導管



野生型マウス



Tmem135Tg マウス

図 4-1 Tmem135Tg マウスの顎下腺の HE 染色
Tmem135Tg マウスにおいては組織像における導管の割合が少なくなっている
A:腺房 D:導管

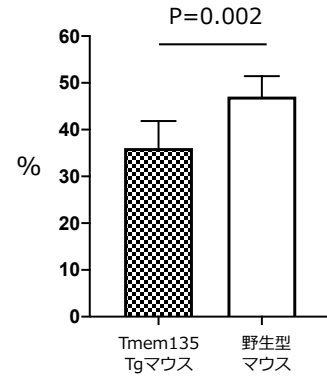
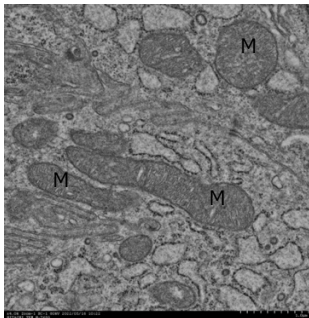


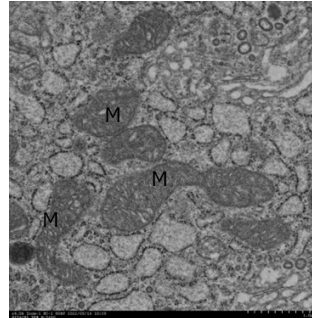
図4-2 顎下腺組織像において導管が占める割合

②電子顕微鏡による Tmem135 変異マウスの顎下腺のミトコンドリアの形態学的検討

Tmem135 変異マウスおよび野生型マウスの顎下腺の電子顕微鏡写真を図 5-1 に示す。Tmem135 変異マウスの顎下腺においてミトコンドリア数は野生型マウスと比較し変化は見られなかった (図 5-2)。しかし、有意差はなかったものの、ミトコンドリアの面積、周長、長径、短径全てにおいて Tmem135 変異マウスで大きく、野生型と較べてミトコンドリアが大きい傾向が見られた (図 5-3、図 5-4、図 5-5、図 5-6)。



野生型マウス



Tmem135 変異マウス

図 5-1 Tmem135 変異マウス顎下腺の電子顕微鏡写真 (4000 倍)
M:ミトコンドリア

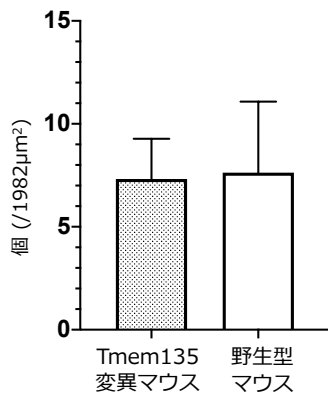


図5-2 顎下腺におけるミトコンドリア数

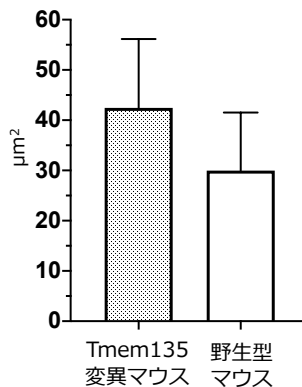


図5-3 顎下腺におけるミトコンドリアの平均面積

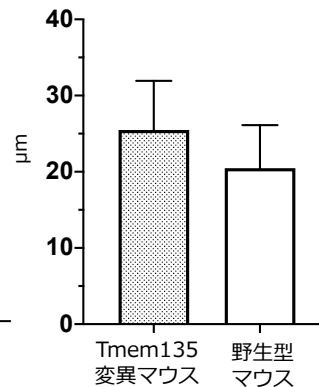


図5-4 顎下腺におけるミトコンドリアの平均周長

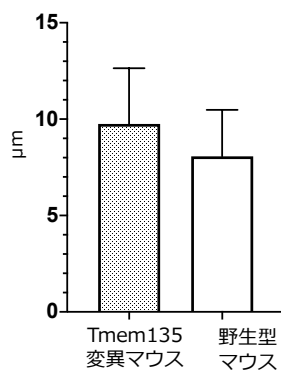


図5-5 顎下腺におけるミトコンドリアの平均長径

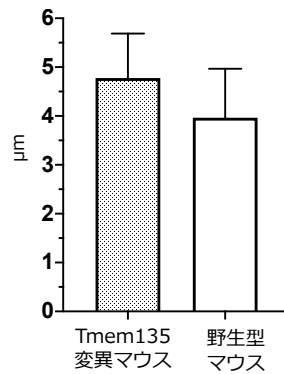


図5-6 顎下腺におけるミトコンドリアの平均短径

(3) マイクロアレイによる Tmem135 変異マウスの顎下腺発現遺伝子の網羅的検討

マイクロアレイ解析による発現変動遺伝子の抽出および変動遺伝子の結果を用いた Gene Ontology (GO) 解析を行った。その結果、GO 解析において「Biological Process」で small molecule metabolic process、carboxylic acid metabolic process、lipid metabolic process、fatty acid metabolic process、oxidation-reduction process、「Molecular Function」で oxidoreductase activity、「Cellular Component」で mitochondrion、mitochondrial envelope、mitochondrial membrane の GO Term の充進を認めた。これらの結果より、Tmem135 は細胞における代謝、酸化ストレスに関与し、ミトコンドリアと関連が深い遺伝子であることが考えられた。これらの結果は、これまでに我々が同遺伝子に関して得てきた所見と極めて合致するものであった。

まとめ

Tmem135 変異マウスおよび Tmem135Tg マウスで唾液分泌の変化がみられ、Tmem135Tg マウスでは唾液腺の組織学的変化も確認できた。このことは Tmem135 は唾液分泌機構に関連した遺伝子であり、ミトコンドリアダイナミクスは唾液分泌機構にも関連している可能性が示唆された。今後ミトコンドリアダイナミクスがどのようなメカニズムで唾液分泌に関わっているか、更なる検討が必要である。

参考文献

1. Lee WH, Higuchi H, Ikeda S, Macke EL, Takimoto T, Pattnaik BR, Liu C, Chu LF, Siepka SM, Krentz KJ, Rubinstein CD, Kalejta RF, Thomson JA, Mullins RF, Takahashi JS, Pinto LH, Ikeda A. *Elife*. 2016 Nov 15;5:e19264.
2. Landowski M, Bhute VJ, Takimoto T, Grindel S, Shahi PK, Pattnaik BR, Ikeda S, Ikeda A. A mutation in transmembrane protein 135 impairs lipid metabolism in mouse eyecups. *Sci Rep*. 2022 14;12(1):756
3. Landowski M, Bhute VJ, Grindel S, Haugstad Z, Gyening YK, Tytanic M, Brush RS, Moyer LJ, Nelson DW, Davis CR, Yen CE, Ikeda S, Agbaga MP, Ikeda A. Transmembrane protein 135 regulates lipid homeostasis through its role in peroxisomal DHA metabolism. *Commun Biol*. 2023 4;6(1):8.

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Lee Wei-Hua, Bhute Vijesh J, Higuchi Hitoshi, Ikeda Sakae, Palecek Sean P, Ikeda Akihiro	4. 巻 245
2. 論文標題 Metabolic alterations caused by the mutation and overexpression of the Tmem135 gene	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Experimental Biology and Medicine	6. 最初と最後の頁 1571 ~ 1583
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/1535370220932856	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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究協力者	Ikeda Akihiro (Ikeda Akihiro)	ウィスコンシン大学 マディソン校・Department of Medical Genetics・Professor	

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		
米国	Univesity of Wisconsin - Madison		