

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16475

研究課題名(和文)唾液腺発生時における細胞間接着分子の解析

研究課題名(英文)Functional analysis of cell adhesion molecules in mouse submandibular glands

研究代表者

北山 美登里(吉田)(Midori, Kitayama)

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：20636427

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):マウスの顎下腺において細胞間接着分子であるネクチン-1を欠損するとサイズの縮小、腺房構造異常やアミラーゼ分泌低下を認めた。ネクチン-2、-3を欠損したマウスでは顎下腺サイズに変化を認めなかったが、ネクチン-3の欠損マウスではネクチン-1欠損マウスと同様にアミラーゼ分泌低下を認めた。この結果より、顎下腺の形態形成および機能維持のためにネクチン-1が関与している可能性が強く示唆された。これまでに、唾液腺の発生・維持にはFGF関与が報告されている。FGFRのシグナル伝達経路の活性制御にネクチン-1が関与する可能性が十分に考えられ、特にFGFR1がネクチン-1と密接に関わっ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

口腔乾燥症は難治性疾患であり、疾患特異的な治療法がない。投与薬剤の副作用、口呼吸、シェーグレン症候群、放射線治療の後遺症、老化、糖尿病、更年期障害などにより引き起こされる身近な疾患である。唾液分泌能の低下はう蝕、細菌感染、咀嚼機能障害、嚥下機能障害、味覚障害、口臭、歯周病、舌痛症などの臨床症状や著しいQOLの低下を招く。これまでに様々な細胞接着分子欠損マウスで唾液腺の形成異常が報告されているが、その発症メカニズムは解明されていない。本研究では、細胞間接着分子ネクチンに着目し、唾液腺の発生・維持におけるこれらの機能を分子レベルで解明し、再生医療の進歩に貢献したい。

研究成果の概要(英文):Morphological abnormalities and histological abnormalities were observed in the N1KO submandibular glands, and also the expression amylase in the N1KO submandibular glands was lower than that of WT. The expression amylase was reduced in the submandibular glands of Nectin-3 KO, although there was no morphological and histological difference between the Nectin-2, -3 KO and the WT submandibular glands. Our result suggest that nectins, especially nectin-1 is involved in the maintenance and development of the salivary glands. Fibroblast growth factors (FGFs) and their receptors (FGFRs) are important in many developmental events, including in submandibular glands development. It was suggested that nectin-1 is involved in the regulation of FGFR signaling pathway.

研究分野：歯科口腔外科

キーワード：cell adhesion molecules nectin submandibular gland

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

口腔乾燥症は難治性疾患の一つであり、疾患特異的な治療法は開発されていない。投与薬剤の副作用、口呼吸、シェーグレン症候群、放射線治療の後遺症、老化、糖尿病、更年期障害などが原因とされ、誰にでも起こりうる身近な疾患である。本邦では推定 800~3000 万人が発症している。唾液には、抗菌作用、粘膜保護作用、pH 緩衝作用、歯の再石灰化作用、消化作用、自浄作用があり、唾液分泌能の低下はう蝕、細菌感染、咀嚼機能障害、嚥下機能障害、味覚障害、口臭、歯周病、舌痛症など様々な臨床症状を引き起こし、著しい QOL の低下を招く。人口唾液や保湿剤などの対処療法や副交感神経作動薬を用いた残存唾液腺の刺激が一般的な治療法であるが、組織破壊が重度に進んだ唾液腺では十分な効果が得られない。このためこれまでとは異なる新たな治療法の開発が急がれている。

2. 研究の目的

口腔乾燥症は対処療法が治療の主体であり、唾液分泌の回復や唾液腺の再生に関する研究は重要である。これまでに P120 catenin、Integrin 5、Integrin 3 と Integrin 6 などの細胞接着分子のノックアウト (KO) マウスで唾液腺の形成異常が報告されているが、その発症メカニズムは解明されていない。本研究では、組織・器官の構造と機能を形成・維持し、シグナル伝達に關与する細胞間接着分子ネクチンに着目し、唾液腺の発生・維持におけるこれらの機能を分子レベルで解明し、再生医療の進歩に貢献したいと考える。

3. 研究の方法

本研究では、ネクチンとその関連分子に着目して唾液腺発生・維持における機能を解析する。基礎的な研究として野生型マウスとネクチン KO マウスを用いて外分泌腺である唾液腺の細胞間接着構成分子の同定を行う。また、ネクチンに關連するシグナル伝達を観察する。

(1) 野生型マウスとネクチン KO マウスの器官における差異の確認

出生後 70 日目のマウス解剖時に外分泌腺である、顎下腺、涙腺、ハーダー腺を観察した。顎下腺は雌マウス、涙腺、ハーダー腺は雄マウスを用いた。

(2) 野生型マウス、ネクチン-1KO マウスの外分泌腺の構造解析

顎下腺、ハーダー腺の凍結切片を作成し組織染色を行った。顎下腺では HE 染色、PAS 染色を、ハーダー腺では HE 染色、PAS 染色、Oil Red O 染色を行った。

(3) 野生型マウス、ネクチン KO マウスの外分泌腺における細胞間接着構成分子の同定

免疫組織学染色、ウエスタンブロット (WB) 法を行い、発現している細胞間接着分子を解析した。

(4) 野生型マウス、ネクチン KO マウス顎下腺の機能解析

野生型マウス、ネクチン-1, -3KO マウスのアミラーゼ発現を WB 法を用いて評価した。

4. 研究成果

(1) 野生型マウスとネクチン KO マウスの器官における差異の確認

野生型マウスと比較して、ネクチン-1KO マウスでは顎下腺、涙腺のサイズが小さく、ハーダー腺もやや小さい傾向を認めた。ネクチン-2KO, -3KO マウスでは野生型マウスと顎下腺、涙腺、ハーダー腺ともにサイズの差異を認めなかった。この結果より、ネクチン-1 はマウスにおける顎下腺、涙腺、ハーダー腺の発生・維持に關与していることが示唆された (図 1)。

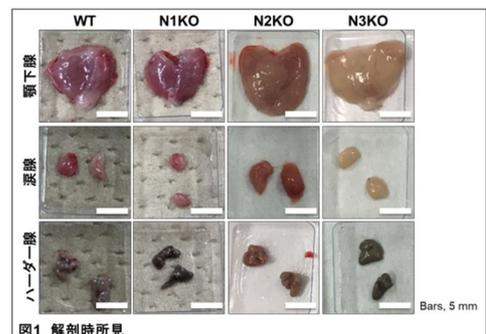


図1 解剖時所見

(2) 野生型マウス、ネクチン-1KO マウスの顎下腺の構造解析

ネクチン-1KO マウスにて顎下腺のサイズに変化が認められたため、顎下腺の組織構造に差異があるかを組織学的に観察した。HE 染色では、野生型マウスでは腺房が密に配列しているが、ネクチン-1KO マウスでは腺房間に間隙が認められ、腺房のサイズが小さかった。また、野生型マウスでは線条部導管上皮細胞、腺房細胞が PAS で染色されたが、ネクチン-1KO マウスでは染色されなかった。ネクチン-1KO マウスでは顎下腺の構造に変化が生じており、唾液生成および分泌機能にも問題が生じている可能性が示唆された(図2)。

野生型マウス、ネクチン-1KO マウスのハーダー腺の構造解析

ネクチン-1KO マウスにてハーダー腺の軽度のサイズの変化が認められたため、ハーダー腺の組織構造に差異があるかを組織学的に観察した。HE 染色にてネクチン-1KO マウスの腺房細胞には野生型マウス腺房細胞よりも空胞が多数認められた。野生型マウス、ネクチン-1KO マウスともに腺房細胞が PAS および Oil Red O で染色され、PAS 染色と Oil Red O 染色では大きな差異は認めなかった。腺房構造のサイズに違いがないことから、ネクチン-1 はハーダー腺の発生ではなく、維持に関与している可能性が示唆された(図3)。

(3) 野生型マウス、ネクチン KO マウスの外分泌腺における細胞間接着分子の同定

野生型マウス顎下腺で発現している細胞間接着構成分子を同定するため、アドヘレンスジャンクション(AJ)構成分子であるネクチン-1、-2、-3、Afadin、E-Cadherin とタイトジャンクション(TJ)構成分子である ZO-1 の免疫染色を行った。線条部導管上皮では、TJ 構成分子である ZO-1 と AJ 構成分子であるネクチン-1、-2、-3、Afadin、E-Cadherin は、隣り合う導管上皮細胞の頭頂部で観察された。線房部上皮では TJ 構成分子である ZO-1 と AJ 構成分子であるネクチン-1、-2、-3、Afadin は、管腔側の細胞膜で観察された。E-Cadherin のシグナルは管腔側の細胞膜と隣り合う腺房上皮細胞の間で観察された(図4、5)。

この結果より、これらの細胞間接着分子はほかの細胞膜タンパク質と共同し、腺房部上皮細胞の細胞接着や唾液分泌の制御に関与することが示唆された。ネクチン-1KO マウス顎下腺でも同様の観察を行ったところ、ネクチン-1、-3 のシグナルは観察されなかったが、ネクチン-2、Afadin、E-cadherin、ZO-1 のシグナルに変化は認めなかった(図6)。

また、ネクチン-1 が顎下腺のどの細胞に発現しているかを確認するために、ネクチン-1 ノックイン(NI)マウスの免疫組織染色を行い、線条部導管上皮細胞にネクチン-1 が局在することを確認した(図7)。ネクチン-2KO マウス顎下腺では、ネクチン-1、-3 のシグナルは減少していたが

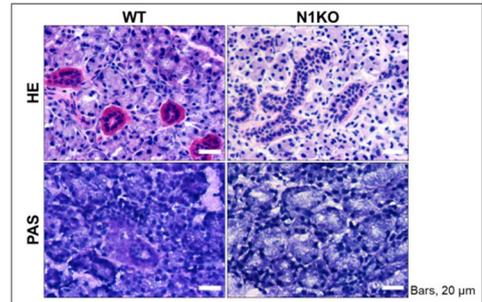


図2 マウス顎下腺の組織染色

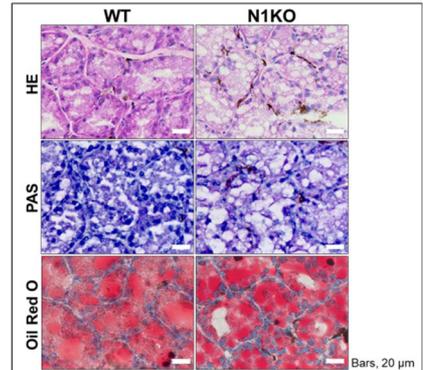


図3 マウスハーダー腺の組織染色

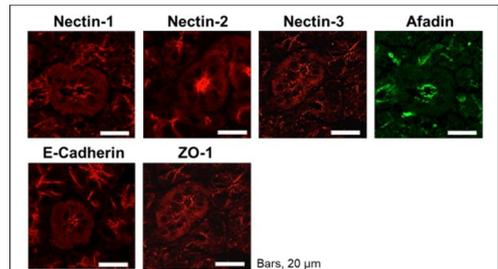


図4 野生型マウス顎下腺の免疫組織染色

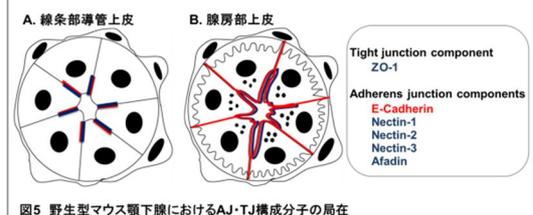


図5 野生型マウス顎下腺におけるAJ・TJ構成分子の局在

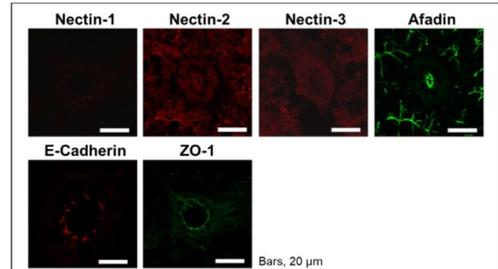


図6 ネクチン-1 KOマウス顎下腺の免疫組織染色

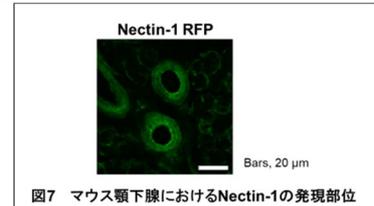


図7 マウス顎下腺におけるNectin-1の発現部位

認められたが、ネクチン-2のシグナルは観察されず、Afadin, E-cadherin, ZO-1のシグナルに変化は認めなかった(図8)。これらの結果より、ネクチン-1が顎下腺の発生・維持に関与しており、ネクチン-2KOマウスではネクチン-1があることによって、顎下腺に大きな異常を来さないと示唆された。涙腺、ハーダー腺ではネクチン-1, -2, -3の局在をWB法を用いて解析した。野生型マウス涙腺では、ネクチン-1, -2, -3ともに認められ、ネクチン-1KOマウスではネクチン-1のみが、ネクチン-3KOマウスではネクチン-3のみが消失した(図9)。野生型マウスハーダー腺では、ネクチン-1, -2のみ認められ、ネクチン-3は認めなかった。ネクチン-1KOマウスではネクチン-1のみ消失し、ネクチン-3KOマウスでは大きな変化を認めなかった(図10)。ネクチン-3KOマウスの涙腺、ハーダー腺でネクチン-1が発現していること、ネクチン-3KOマウスではサイズに問題がなかったこと、ネクチン-1KOマウスの涙腺とハーダー腺に構造的に大きな異常を認めなかったことから、ネクチン-1が発生ではなく、維持に関与していることがさらに示された。

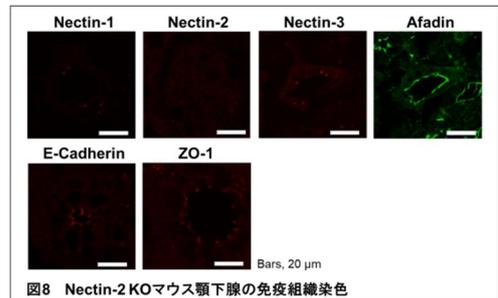


図8 Nectin-2 KOマウス顎下腺の免疫組織染色

(4) 野生型マウス、ネクチン KO マウス顎下腺の機能解析
 唾液を構成するたんぱく質であるアミラーゼの発現をWB法を用いて評価した。野生型マウスではアミラーゼの発現が強く認められたが、ネクチン-1KOマウスではアミラーゼの発現が減弱していた。また、ネクチン-3KOマウスでもネクチン-1KOマウスと同様にアミラーゼの発現が減弱していた(図11)。ネクチン-3KOマウスでは顎下腺のサイズや構造に大きな異常を認めないが、機能的には異常を来していることが確認された。この結果より、ネクチン-1が顎下腺の発生に必要不可欠であるが、顎下腺の機能維持にネクチン-3が関与していることが示唆された。ネクチン-1KOマウス顎下腺ではネクチン-1の欠損によって、野生型で観察されていたネクチン-3のシグナルも消失している。そのためネクチン-1KOマウスでは顎下腺のサイズも小さく、アミラーゼの発現も減少し、構造的・機能的な異常が表現型として認められたと考察される。

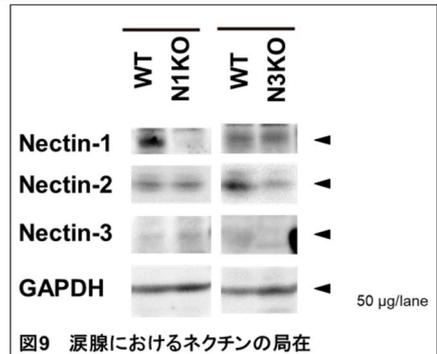


図9 涙腺におけるネクチンの局在

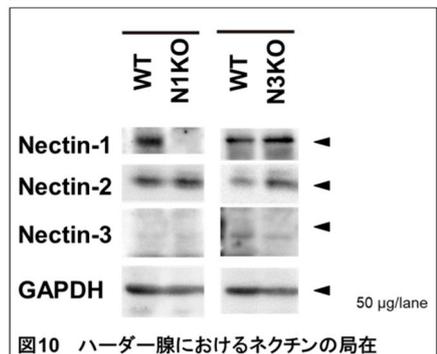


図10 ハーダー腺におけるネクチンの局在

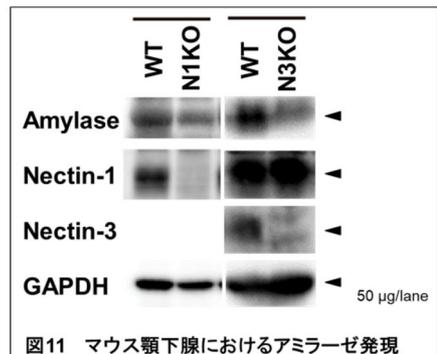


図11 マウス顎下腺におけるアミラーゼ発現

(5) 考察・今後の展望

顎下腺の形態形成と機能維持にネクチン-1が関与している可能性が強く示唆された。これまでに、唾液腺の発生・維持にはFGF (fibroblast growth factor) 関与が報告されている。FGFR (fibroblast growth factor receptor) のシグナル伝達経路の活性制御にネクチン-1が関与する可能性が十分に考えられた。特にFGFR1は唾液腺発生初期に高く発現していることが確認でき、ネクチン-1と密接に関わっている可能性が示唆された。また、細胞実験にてネクチン-1がFGFR1, FGFR2, FGFR3と相互作用することを見出したが、欠損マウスの個体が少なく、予定通りの解析が困難であった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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