

機関番号：32703

研究種目：基盤研究B

研究期間：2008～2010

課題番号：20390467

研究課題名（和文） 唾液腺由来 BDNF のストレス性病変抑制メカニズムについての研究

研究課題名（英文） The study on stressful lesion suppression mechanism of the BDNF derived from a salivary gland

研究代表者

槻木 恵一 (TSUKINOKI KEIICHI)

神奈川歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：00298233

## 研究成果の概要（和文）：

唾液腺に BDNF を高発現する Tg マウスの作製を行った。Tg マウスのプロモーターとしては耳下腺特異的蛋白 PSP のプロモーターを用い、さらに HA タグを結合させたコンストラクトを作製した。この Tg マウスの特徴は、唾液腺で産生された BDNF は HA タグが付加された蛋白として合成されることから、内因性の BDNF と区別ができ唾液腺産生 BDNF の生体内での挙動を証明できる画期的な Tg マウスである。この Tg マウスはストレス負荷に対して強い傾向が認められた。

## 研究成果の概要（英文）：

We developed the Tg mouse with high BDNF expression in the salivary gland. We manufactured the construct composed of PSP parotid gland-specific for the promoter, mouse BDNF and HA tag. Because the BDNF produced with a salivary gland is composed as the protein which an HA tag was added to as for the characteristic of this Tg mouse, it is the epoch-making Tg mouse which it is possible for intrinsic BDNF and distinction, and can prove in vivo behavior of the salivary gland production BDNF. This Tg mouse had a defense tendency for stress load.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	9,400,000	2,820,000	12,220,000
2009年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2010年度	2,500,000	750,000	3,250,000
年度			
年度			
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

研究分野：唾液腺健康医学・口腔病理診断学

科研費の分科・細目：形態系基礎歯科学

キーワード：(1)唾液腺 (2)BDNF (3)Tg マウス (4)ストレス性病変 (5) 血漿 BDNF

## 1. 研究開始当初の背景

唾液腺の口腔機能への貢献についての研究は極めて多数認められる。一方、唾液腺は内臓器であり神経系、血管系において全

身と連絡しており唾液腺と全身との関連は密接である。しかし、世界的に見ても唾液腺と全身との関連についての研究は非常に立ち遅れている。特に、全身のストレス応

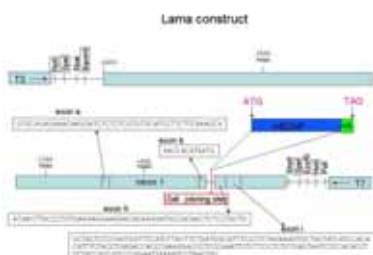
答への唾液腺の関与を検討した研究は国内および国外ともにほとんどない。

## 2. 研究の目的

BDNF がストレスで変動する点に注目し、拘束ストレスを負荷したラットの顎下腺において BDNF の発現を検討した。その結果、急性ストレスによってラット顎下腺に BDNF mRNA および蛋白が増加した。さらに BDNF レセプターである TrkB は口腔粘膜および唾液腺にストレス負荷後にも発現していないことから、唾液腺 BDNF は遠隔臓器に影響を与えている可能性が示唆された。そこで、血漿 BDNF 量がストレスによって変動するかどうか検討した。その結果、ストレス負荷1時間後に血漿 BDNF は著明に増加し、その増加は3大唾液腺摘出により抑制された。すなわち、急性ストレス時、唾液腺は血中 BDNF 量に影響を与える主な臓器であることが明らかになった。これらの過去の我々の研究結果は、ストレスに反応して唾液腺が全身に影響を及ぼしている可能性があるという重要な発見をした。そこで、本申請では胃潰瘍抑制をはじめとした様々なストレス性変化における唾液腺由来血中 BDNF の役割を解明する。

## 3. 研究の方法

唾液腺に BDNF を高発現する Tg マウスの作製を行った。Tg マウスのプロモーターとしては耳下腺特異的蛋白 PSP のプロモーターを用い、さらに HA タグを結合させたコンストラクトを作製した。

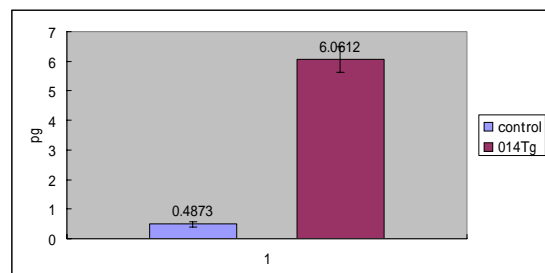


マウス BDNF 遺伝子は PCR で作製し、

発現ベクターに導入後、BDNF 蛋白の産生を確認後遺伝子導入に用いる。

## 4. 研究成果

Tg マウスの特徴は、唾液腺で産生された BDNF に HA タグが付加された蛋白として合成されることから、内因性の BDNF と区別ができ唾液腺産生 BDNF の生体内での挙動を証明できる画期的な Tg マウスである。この Tg マウスは、形態的に奇形は認められなかった。導入遺伝子発現組織は PCR による検索で耳下腺に強く発現が認められた。一方、ウェスタンブロットでは、肝臓・腎臓・脳・脾臓・唾液腺・血漿に特異的なシグナルが認められた。一方、コントロールマウスでは血中 BDNF は検出限界以下であり、Tg マウスでは血中 BDNF 濃度が上昇するので、唾液腺 BDNF は、耳下腺で主に産生され、血中に移行後、肝臓・腎臓・脳・脾臓に移行することが証明できた。



これは唾液腺産生物質が全身へ移行するという世界で初めての成果である。さらに、本作 Tg マウスはストレス負荷に対して強く、胃粘膜病変の抑制や肝障害の部分的抑制をする傾向が認められた。このメカニズムについて検討を行い、ストレスホルモンの分泌調節が関与していることが証明されつつある。さらに、水迷路試験により学習記憶脳に差があるかどうか検討中である。また、本マウスは加齢的に体重が増加する傾向が認められている。BDNF は脂質代謝や摂食調節に関与していることから興味ある

フェノタイプが観察されている。

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 10 件)

- 1 Saruta J, Sato S, Tsukinoki K. The role of neurotrophins related to stress in saliva and salivary glands. *Histol Histopathol.* 2010 Oct;25(10):1317-30.
- 2 Saruta J, Kondo Y, Sato C, Shiiki N, Tsukinoki K, Sato S: Salivary glands as the source of plasma BDNF in stressed rats engaged in biting behavior. *Stress* 13(3): 238-247, 2010.
- 3 Saruta J, Lee T, Shirasu M, Takahashi T, Sato C, Sato S, Tsukinoki K: Chronic stress affects the expression of BDNF in rat submandibular glands. *Stress* 13(1): 53-60, 2010
- 4 Kondo Y, Saruta J, Tsukinoki K Expression and role of the BDNF receptor-TrkB in rat adrenal gland under acute immobilization stress. *Acta Histochem Cytochem* 2010. accepted
- 5 Ozawa S, Kate Y, Ito S, Komori R, Shiiki N, Tsukinoki K, 以下 7 名省略: Restoration of BRAK / CXCL14 gene expression by gefitinib is associated with antitumor efficacy of the drug in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Science.* 100(11):2202-9. 2009.
- 6 Kim Y, Hamada N, Takahashi Y, Sasaguri K, Tsukinoki K, Onozuka M,

Sato S : Cervical sympathectomy causes alveolar bone loss in an experimental rat model. *J Periodontal Res.* 44(6):695-703 2009.

- 7 Lee T, Saruta J, Sasaguri K, Sato S, Tsukinoki K : Allowing animals to bite reverses the effects of immobilization stress on hippocampal neurotrophin expression. *Brain Res*, 1195, 43-49, 2008.
- 8 Okamura M, Yoshida A, Saruta J, Tsukinoki K, Sasaguri K, Sato S : Effect of bruxism-like activity on the salivary Chromogranin A as a stress marker. *Stomatologie*, 105, 33-39, 2008.
- 9 Okuyama T, Kurata S, Tomimori Y, Fukunishi N, Sato S, Osada M, Tsukinoki K, 以下 7 名省略: p63(TP63) elicits strong trans-activation of the MFG-E8/lactadherin/BA46 gene through interactions between the TA and DeltaN isoforms. *Oncogene*, 10; 27(3), 308-317, 2008.
- 10 Bhawal UK, Sugiyama M, Nomura Y, Kuniyasu H, Tsukinoki K : Loss of 14-3-3 sigma protein expression and presence of human papillomavirus type 16 E6 in oral squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head and Neck Surg*, 134(10):1055-1059, 2008.

以上全て査読のある国際誌

[学会発表](計 20 件)

1. Saruta J, Sato C, Kondo Y, Shiiki N, Sasaguri K, Tsukinoki K, Sato S :

- Basic studies about development of metabolic syndrome diagnostic method to using saliva. Iaaid-Asia 3rd, 3.20-21, 2010. Kyoto, Japan.
2. Kamata Y, Saruta J, Onozawa N, Kondo Y, Tsukinoki K, Yamaguchi S, Tamura T : In vivo experimental model of human gingival mucosa using immunodeficient mice. 96th Annual Meeting American Academy of Periodontology in collaboration with the Japanese Society of Periodontology. 10.30-11.5, 2010. Honolulu, HI, America.
  3. 佐藤允俊,東雅啓,近藤裕介, 猿田樹理, 槻木恵一 : 唾液腺産生物質の血中移行による全身への影響についての検討 . 第134回神奈川歯科大学学会例会,横須賀,2011.01.13.
  4. 近藤裕介,猿田樹理,佐藤允俊, 東雅啓, 吉野文彦,小林杏,吉田彩佳,李昌一,槻木恵一 : 唾液腺BDNFの病態生理学的意義についての研究 第9報 : In vivoにおけるストレス応答に対するTrkBの役割について 第134回神奈川歯科大学学会例会, 横須賀, 2011.01.13.
  5. 近藤裕介,東雅啓,椎木直人,佐藤允俊, 猿田樹理,槻木恵一 : 唾液腺BDNFの病態生理学的意義についての研究 第8報 : ラット副腎におけるBDNFとTrkBの役割 第133回神奈川歯科大学学会例会,横須賀,2010.10.14.
  6. 近藤裕介, 猿田樹理, 佐藤允俊, 東雅啓, 槻木恵一 : 唾液腺 BDNF の病態生理学的意義についての研究・第8報 : ラット副腎におけるBDNFとTrkBの役割. 第133回神奈川歯科大学学会例会,横須賀,2010.10.14.
  7. 猿田樹理,近藤裕介,佐藤貞雄,槻木恵一 : 噛むことはラット唾液腺においてストレスで誘導されたBDNFを増加させる . 第21回日本臨床口腔病理学会総会・学術集会,大阪, 2010.7.31-8.1
  8. 猿田樹理,近藤裕介,椎木直人,佐藤貞雄,槻木恵一 : 噛むことは拘束ストレスによる海馬のニュートロフィン発現減少を抑制する . 第64回日本口腔科学会学術集会,札幌,2010.6.24-25
  9. 近藤裕介,猿田樹理,李昌一,佐藤貞雄,槻木恵一 : ストレス性病変におけるBDNFの役割 . 第64回日本口腔科学会学術集会,札幌,2010.6.24-25
  10. 猿田樹理, 近藤裕介, 椎木直人, 佐藤貞雄, 槻木恵一 : 噛むことは拘束ストレスによる海馬のニュートロフィン発現減少を抑制する . 第64回日本口腔科学会学術集会, 札幌, 2010.6.24-25
  11. 猿田樹理, 佐藤允俊, 近藤裕介, 笹栗健一, 槻木恵一, 佐藤貞雄 : 急性拘束ストレスモデルはラット副腎のTrkB 発現に影響を与える 第68回日本矯正歯科学会大会, 福岡, 2009.11.16-18.
  12. 近藤裕介,猿田樹理,佐藤貞雄,槻木恵一 : 唾液腺 BDNF の病態生理学的意義についての研究 第7報 : ストレス性病変における BDNF の役割 第130回 神奈川歯科大学学会例会, 横須賀, 2009.10.15
  13. 猿田樹理,近藤裕介,笹栗健一,槻木恵一, 佐藤貞雄 : ヒト唾液腺におけるBDNF 発現と局在 第51回日本歯科基礎医学会総会・学術集会, 新潟, 2009.9.10-11
  14. 猿田樹理,近藤裕介,槻木恵一 : 慢性拘束ストレスはラット唾液腺において神

- 経栄養因子の発現に影響を与える 第 20 回日本臨床口腔病理学会総会・学術集会, 札幌, 2009.7.30-31
15. 槻木恵一, 佐藤一芳, 窪田展久, 三好代志子, 猿田樹理, 近藤裕介: 刺激性線維種における発生由来についての免疫組織学的検討 第 20 回日本臨床口腔病理学会総会・学術集会, 札幌, 2009.7.30-31
16. 近藤裕介, 猿田樹理, 佐藤貞雄, 槻木恵一: ヒト唾液腺および唾液における BDNF 発現 第 20 回日本臨床口腔病理学会総会・学術集会, 札幌, 2009.7.30-31
17. 猿田樹理, 近藤裕介, 佐藤貞雄, 槻木恵一: 噛むことはラット唾液腺においてストレスで誘導された BDNF を増加させる 第 63 回日本口腔科学会学術集会, 浜松, 2009.4.15-17
18. 近藤裕介, 猿田樹理, 椎木直人, 佐藤貞雄, 槻木恵一: ヒト唾液腺における BDNF 発現と局在 第 63 回日本口腔科学会学術集会, 浜松, 2009.4.15-17
19. Saruta J, Sasaguri K, Tsukinoki K, Sato S: Allowing animals to bite reverses the effects of immobilization stress on hippocampal neurotrophin expression. *Iaaid-Asia 2<sup>nd</sup>*, 3.19-20, 2009. Tokyo, Japan.
20. 槻木恵一, 猿田樹理, 椎木直人, 近藤裕介, 佐藤貞雄: 唾液腺 BDNF の病態生理学的意義についての研究・第 5 報: 急性拘束ストレスモデルにおけるラット全身臓器の BDNF receptor, TrkB mRNA 発現の変動についての検討: 神奈川歯科大学学会第 126 回例会: 神奈川, 2008.6.12

〔図書〕(計 1 件)

槻木恵一: 歯科国歯完全攻略 わかる病理組織像. 第 3 版, 学建書院, 東京, 2011.

〔その他〕

ホームページ

<http://www.kdcnet.ac.jp/college/byour/index.html>

記事

槻木恵一: - 唾液腺由来 BDNF - ストレスによる胃粘膜病変を抑制. *メディカルトリビューン*, 2007.9.27.

成果公開

槻木恵一(代表): 唾液のスーパーな威力をみよう. *ひらめきときめきサイエンス*, HT21087, 平成 21 年度.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

槻木恵一 (TSUKINOKI KEIICHI)  
神奈川歯科大学・歯学部・教授  
研究者番号: 00298233

(2) 研究分担者

斉藤 一郎 (SAITO ICHIRO)  
鶴見大学・歯学部・教授  
研究者番号: 60147634

(3) 連携研究者

猿田 樹理 (SARUTA JURU)  
神奈川歯科大学・歯学部・講師  
研究者番号: 30454151