

機関番号：17301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20592204

研究課題名（和文） FEN1 欠損マウスの自己免疫疾患

研究課題名（英文） Autoimmune Disease of FEN1 Transgenic Mouse

研究代表者

木村 泰男（KIMURA YASUO）

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：30253686

研究成果の概要（和文）：FEN1 トランスジェニックマウスにおいて各種の検討を行ったが、自己免疫疾患が発現しているかどうかについて確認することができなかった。代わりに自己免疫疾患のマウスである IQ1 マウスにおいて唾液腺（顎下腺、舌下腺）のリンパ球浸潤を確認した。しかしながらこれらの唾液腺の微細な変化に関して MR イメージング（拡散強調撮像）にて、正常マウスとの間に有意な差を確認することは困難であった。

研究成果の概要（英文）：I performed various examination in FEN1 transgenic mouse, but was not able to confirm it whether autoimmune disease developed. I confirmed the lymphocyte permeation of the salivary gland (submandibular gland, sublingual gland) in the IQ1 mouse which was a mouse of the autoimmune disease instead. However, it was difficult to confirm a meaningful difference between a normal mouse by MR imaging (diffusion emphasis imaging) about the minute change of these salivary glands.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	800,000	240,000	240,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：FEN1、自己免疫疾患、MRI、拡散強調撮像

1. 研究開始当初の背景

FEN1 は、ゲノムの恒常性を維持するために必要な多機能酵素である。酵母でこの酵素を働かなくしてやると、DNA の損傷を引き起こす薬剤に対する感受性や遺伝子変異の出現頻度が高くなることが知られている。FEN1 に

は、腫瘍の成長を抑制する働きがあるとともに、免疫機能を正常に維持するはたらきがあることがわける結果が報告されている (Zheng et al2007)。我々は、FEN1 endonuclease 活性をなくした T24 細胞に methylmethane sulfonate (MMS) のようなアル

キル化剤あるいは紫外線で DNA 損傷を与えてやると DNA 修復が効率よく進まず細胞周期の遅延を引き起こすことを以前に報告した(J Biol Chem 277, 746, 2002)。さらに我々は、endonuclease 活性をなくした変異型の FEN1 をコラーゲンプロモータのもと発現させたトランスジェニックマウスを作成し、老化や発癌の仕組みについても解析中である。準備段階における我々の研究では、endonuclease 活性を欠損した FEN1 を発現したトランスジェニックマウスでは、造血系細胞の増殖に何らかの異常があることを示唆する変化を確認している。

2. 研究の目的

本研究では FEN1 トランスジェニックマウスにおいて自己免疫疾患が発現しているかどうかの根拠を求めて形態的、機能的解析を行い、FEN1 と自己免疫疾患の関係についての知見を得ることを目的とする。

またマウス唾液腺の生体内の変化を MR イメージングによる画像診断学的手法をもちいて唾液腺に起こっている器質的および機能的な変化をとらえることを目的に行った。

3. 研究の方法

生体内での唾液腺（舌下腺と顎下腺）の微小変化をとらえるために MR イメージングによる解析を行った。MR の撮像法は、細胞内に自由水の変化に敏感で早期の炎症変化をとられることに優れた撮像法である拡散強調撮像を用いた。マウスはエーテルにて麻酔を行い舌下腺と顎舌腺の拡散強調像を撮像し b-factor500 と 1000 における見かけの拡散強調係数 (ADC) を算出した。

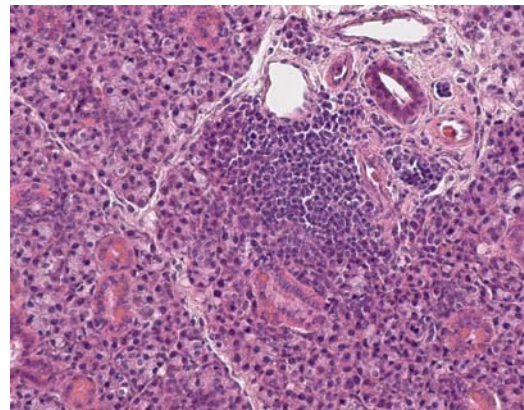
また撮像後は IQ1 マウスおよび正常マウスの唾液腺を摘出し、各月齢ごとに病理組織像を作成し、正常マウスとの比較検討をおこな

った。

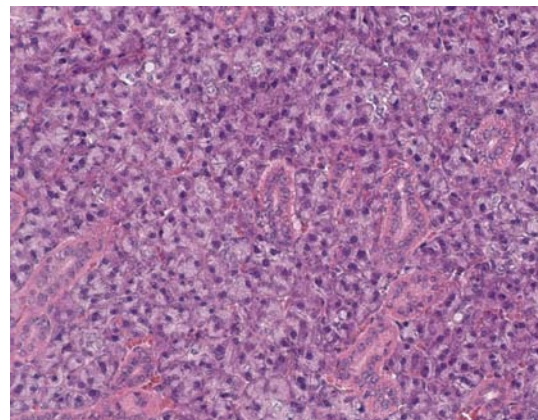
4. 研究成果

IQ1 マウスと正常マウスの舌下腺の病理組織像を示す。正常マウスと比較して IQ1 マウスの唾液腺では腺細胞の周囲にリンパ球の浸潤が多くみられた。

以下に HE 染色を行った、IQ1 マウスの顎下腺と正常マウスの病理組織像を示す。



IQ1 マウスの顎下腺 (H&E 染色)



正常マウスの顎下腺 (H&E 染色)

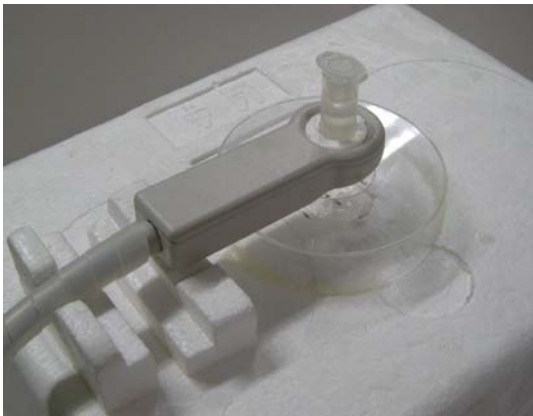
IQ1 マウスの唾液腺は、同じ月齢の正常マウスと比較して、唾液腺の腺細胞周囲に多数のリンパ球浸潤を認めた。ただ実質組織の破壊像はみられなかった。

生きた IQ1 マウスと正常マウスにおいて、

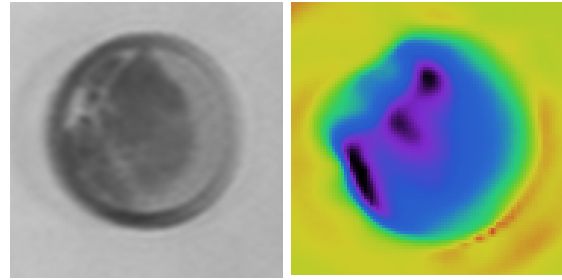
MR を用いて唾液腺の拡散強調撮像を行った。撮像を行ったのは生後7週、7ヶ月、8ヶ月、9ヶ月、10ヶ月、15ヶ月、18ヶ月のマウスの顎下腺と舌下腺である、みかけの拡散強調係数(ADC)において IQI マウスと正常マウスとを比較した結果、有意差を認めず、MR イメージングにおいては唾液腺に顕著な炎症の存在は指摘できなかった。

IQI マウスの唾液腺は、同じ月齢の正常マウスと比較して、唾液腺の腺細胞周囲に多数のリンパ球浸潤を認めた。ただ実質組織の破壊像はみられなかった。

生きた IQI マウスと正常マウスにおいて、MR を用いて唾液腺の拡散強調撮像を行った。撮像には直径23mmの小口径表面コイルを用いた。

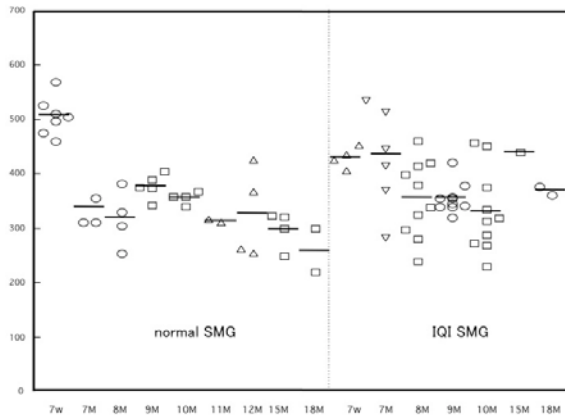


摘出したマウスの顎下腺

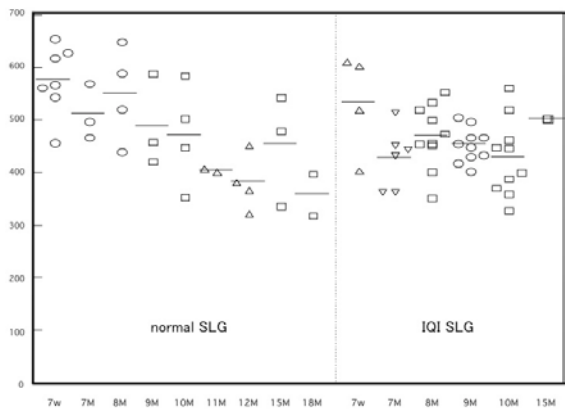


マウス顎下腺の拡散強調像とADCマップ

撮像には生後7週、7ヶ月、8ヶ月、9ヶ月、10ヶ月、15ヶ月、18ヶ月のマウスより摘出した顎下腺と舌下腺を用いた。撮像に際しては、摘出した腺をリン酸緩衝液(PBS)を満たしたエッペンドルフチューブの底に沈め、拡散強調撮像を実施した。In vivoでのイメージングであるため、perfusionによる影響を考慮しなくてもよいのでbファクターは0s/mm²と1000s/mm²を用いた。このin vivoでの計測システムの有用性は以前学会でも報告した(日本歯科放射線学会、第51回学術大会、2010年)。このin vivoシステムを実施し測定した apparent diffusion coefficient (ADC、ここではperfusionの影響を無視できるため diffusion coefficient、DCとする)の結果を次のグラフに示す。顎下腺においても、舌下腺においても、DCの値には正常マウスと、IQIマウスの間で有意差を認めなかった。したがってDCで判断する限りにおいては、唾液腺に顕著な炎症の存在は指摘できなかった。しかしながらこのシステムで検知可能な下限を下回る変化がおこっている可能性を否定できない。



顎下腺の ADC 値 (IQ1 マウスと正常マウス)



舌下腺の ADC 値 (IQ1 マウスと正常マウス)

T24 培養細胞において FEN1 を siRNA で発現抑制した場合これらの細胞は老化を示す形態学的特徴を有していた。炎症をともなった T24 細胞においては、テロメアに結合している FEN1 が消失し、これに合わせて H2AX のリン酸ならびにそれに伴って DNA 損傷修復反応が惹起されていることを確認した。またマウス個体において FEN1 の活性を抑えることで一部の臓器での老化が進むことを確かめている。

これらのことから推察して、シェーグレン症候群等の自己免疫疾患においては、通常よりも老化が進んだ状態になっていると考えられる。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 泰男 (KIMURA YASUO)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：30253686

(2) 研究分担者

中村 卓 (NAKAMURA TAKASHI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：30172406

佛坂 由可 (HOTOKEZAKA YUKA)

長崎大学・大学病院・講師

研究者番号：10244089

田代 茂樹 (TASHIRO SHIGEKI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：20300882

高木 幸則 (TAKAGI YUKINORI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：30295084