

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 12 月 25 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592363

研究課題名（和文）ヒト唾液腺分泌蛋白サリバチンの機能解析とインクレチン模倣薬としての可能性

研究課題名（英文）Analysis of the salivatin function as incretin mimetics

研究代表者 水澤 典子（MIZUSAWA NORIKO）

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：80254746

研究成果の概要（和文）：

消化管ホルモンはインクレチンと総称され、特に GLP-1 は糖代謝改善の多様な作用があることから、糖尿病治療として GLP-1 模倣薬や GLP-1 の分解酵素を阻害する薬剤が期待されている。

ヒト唾液腺から分泌されるサリバチンは、インクレチン様の効果が既に報告されているが、作用機序は未だ不明だったため、細胞株および単離膵島を用いて検討した。インクレチン模倣薬として知られる Exendin-4 (Ex-4) については、マウス膵β細胞株での cAMP レベル上昇を伴うインスリン分泌促進効果が確認された一方で、サリバチンについては、マウス膵β細胞株での cAMP レベル上昇およびインスリン分泌促進が確認されず、糖代謝に関わる顕著な有用性は本研究では認められなかった。

ヒト顎下腺腺房由来細胞株では、インクレチンの一種である GIP の発現が認められたため、今後の発現調節解析および機能解析への展開が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Incretin mimetics are a new class of pharmacological agents with multiple antihyperglycemic actions that mimic several of the actions of incretin hormones originating in the gut, such as glucagon-like peptide (GLP)-1. Salivatin supplied from salivary gland is a candidate to be new incretin mimetics. But the significant anti-hyperglycemic actions were unclear.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
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・機能系基礎歯科学

キーワード：糖尿病、膵島、唾液、インクレチン

1. 研究開始当初の背景

2 型糖尿病の治療薬の新たなジャンルとして、インクレチンの維持・増強が注目されている。インクレチンは食餌由来の刺激に应答して消化管内分泌細胞から分泌されるホル

モンの総称で、主に GLP-1 (glucagon-like peptide-1) と GIP (glucose-dependent insulinotropic polypeptide) がある。

我々は、GLP-1 をコードするプログルカゴン遺伝子、および、プロセッシングを行う

変換酵素 PC1/3、さらに GLP-1 や GIP の半減期に関わる DPP-4 (Dipeptidyl Peptidase-4) の各遺伝子発現調節を研究し、本研究では、サリバチンのインクレチン模倣薬としての有用性を検討した。

2. 研究の目的

膵β細胞特異的発現遺伝子インスリンに影響を与える分子としてインクレチンに注目し、インクレチン発現機構およびインスリン分泌刺激や膵β細胞維持に関する研究を通し、膵β細胞株および単離膵島、糖尿病モデルマウスを用いて、サリバチンのグルコース応答性インスリン分泌能への関与を検討した。

3. 研究の方法

ヒト顎下腺、腺房由来細胞株; AC、および導管由来細胞株; DC における、サリバチン遺伝子の発現および GIP の発現について、qRT-PCR 法により検討した。

Ex-4 およびサリバチン合成ペプチド(1-44)を用い、マウス膵β細胞株 MIN6、βHC-9、マウス単離膵島におけるグルコース応答性のインスリン分泌を ELISA 法により検討した。

細胞内での cAMP レベル変動の検討には、MIN6 を用い、pGL3-6xCRE (cAMP-responsive element) プラスミドおよび補正のための pGL4.74 プラスミドを導入し、各種合成ペプチド添加によるレポーター解析を行った。

細胞周期およびアポトーシス関連する遺伝子発現の変化は、MIN6 の維持培地に各種合成ペプチドを添加し、24 時間後に抽出した RNA より、qRT-PCR で検討した。

4. 研究成果

唾液腺でのサリバチンおよび GIP の発現

細胞株 AC および DC において、サリバチン遺伝子の発現は認められた。高グルコース刺激による発現変化は認められなかった。唾液腺において、インクレチンの一種である GIP の発現はすでに報告されていたが、AC 細胞株でもその発現は認められ、通常培地 (5 mM グルコース含) に 5 mM~25 mM のグルコースを添加することでその発現は高度に誘導された。

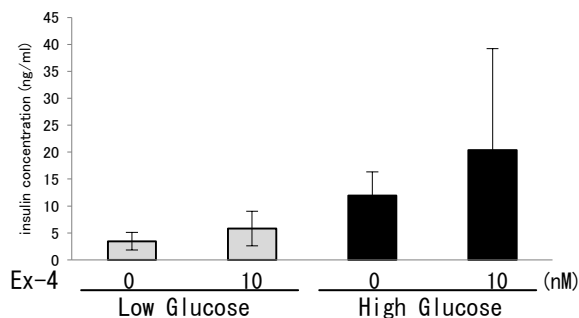
グルコース応答性 cAMP レベル上昇およびインスリン分泌への関与

MIN6 およびマウス単離膵島におけるグルコース応答性のインスリン分泌促進効果について検討した。Ex-4 では、cAMP レベルの上昇やインスリン分泌の上昇が高グルコース処理時に認められたが、サリバチンでは、認められなかった。

Ex-4、サリバチンの膵保護作用の検討

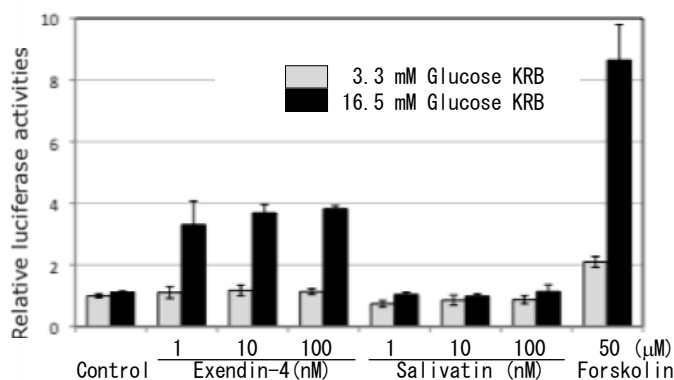
MIN6 において、Ex-4 およびサリバチン合成ペプチドを添加した結果、Ex-4 (10 nM) 処理により、インスリン遺伝子発現の上昇傾向は認められたが、有意差はなかった。また、アポトーシス関連遺伝子である Bax、カスパーゼ 3、細胞周期関連遺伝子 p27Kip、さらに、インスリン受容体、IGF1 および IGF2 受容体、いずれにおいても、遺伝子発現レベルでの有意な変動は認められなかった。

マウス単離膵島での Ex-4 によるインスリン分泌刺激



Ex-4 による高グルコース (16.5 mM) 時のインスリン分泌の促進効果は確認された。

MIN6 におけるグルコース応答性 cAMP レベル上昇への影響



Ex-4 では高グルコース時の cAMP レベル上昇効果が認められたが、サリバチンでは認められなかった。

まとめ

Ex-4 の cAMP レベル上昇を介したインスリン分泌刺激は、高グルコース時のみに発揮され、培養細胞レベルでは、1 nM でも高度な cAMP レベル上昇を誘導していた。また、慢性的に、高グルコース環境で維持される MIN6 においては、常に、Ex-4 によるインスリン分泌刺激がもたらされている事が明らかとなった。低グルコース環境でのインスリン分泌誘導が認められなかった事は、インクレチン模倣薬が重篤な低血糖状態を起しにくい薬剤であるという利点を示す結果となった。その一方で、サリバチン合成ペプチドの新たな模倣薬としての効果は、確認されなかった。

唾液腺における GIP の発現は既に報告され

ている (Mol Cell Endocrinol, 1993) が、消化管での発現調節機構や機能における共通性あるいは口腔内での役割については明らかにされていない。我々は、唾液中の microRNA (miRNA) の解析を現在進めている。唾液腺で発現している miRNA の変動および唾液中でのレベル変動の結果とあわせ、唾液腺由来のインクレチン様物質について今後検討を加える。

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. S Hatakeyama, N Mizusawa, K Yoshimoto, Y Takeda (他 4 名, 2 番目): Establishment of human dental epithelial cell lines expressing ameloblastin and enamelins by transfection of hTERT and cdk4 cDNAs. J Oral Pathol Med 40:227-234, 2011 査読有
2. MG Hossain, T Iwata, N Mizusawa, SW Shima, T Okutsu, K Ishimoto, K Yoshimoto: Compressive force inhibits adipogenesis through COX-2-mediated down-regulation of PPAR γ 2 and C/EBP α . J Biosci Bioeng 109:297-303, 2010 査読有
3. EL Wang, ZR Qian, K Yoshimoto, T Sano (他 5 名, 5 番目): High expression of Toll-like receptor 4/myeloid differentiation factor 88 signals correlates with poor prognosis in colorectal cancer. Br J Cancer 102:908-915, 2010 査読有
4. EL Wang, ZR Qian, MM Rahman, K Yoshimoto, S Yamada, E Kudo, T Sano: Increased expression of HMGA1 correlates with tumour invasiveness and proliferation in human pituitary adenomas. Histopathology 56:501-509, 2010 査読有
5. MM Rahman, ZR Qian, EL Wang, K Yoshimoto, T Sano (他 7 名, 4 番目): DNA methyltransferases 1, 3a, and 3b overexpression and clinical significance in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. Hum Pathol 41:1069-1078, 2010 査読有
6. MG Hossain, T Iwata, N Mizusawa, ZR Qian, SW Shima, T Okutsu, S Yamada, T Sano, K Yoshimoto : Expression of p18^{INK4C} is down-regulated in human pituitary adenomas. Endocr Pathol 20:114-121, 2009 査読有
7. T Iwata, M Kuwajima, A Sukeno, N

Ishimaru, Y Hayashi, M Wabitsch, N Mizusawa, M Itakura, K Yoshimoto : YKL-40 secreted from adipose tissue inhibits degradation of type I collagen. Biochem Biophys Res Commun 388:511-516, 2009

8. M Yoshida, N Harada, H Yamamoto, Y Taketani, T Nakagawa, K Yoshimoto, Y Nakaya (他 12 名, 18 番目): Identification of cis-acting promoter sequences required for expression of the glycerol-3-phosphate acyltransferase 1 gene in mice. Biochim Biophys Acta 1791:39-52, 2009 査読有

9. ZR Qian, SL Asa, H Siomi, MC Siomi, K Yoshimoto, S Yamada, T Sano (他 12 名, 5 番目): Overexpression of HMGA2 relates to reduction of the let-7 and its relationship to clinicopathological features in pituitary adenomas. Mod Pathol 22:431-441, 2009, 査読有

[学会発表] (計 14 件)

1. ワンナザトルシマ、水澤典子、岩田武男、吉本勝彦 (2011) Analysis of microRNA in saliva 第84回日本生化学会大会 平成23年9月21-24日 国立京都国際会館 (京都市)

2. 水澤典子、岩田武男、吉本勝彦 (2011) マウス脾島における isletasin の機能解析 第54回日本糖尿病学会年次学術集会 平成23年5月19-21日 さっぽろ芸術文化の館 (札幌市)

3. Wan Nazatul Shima, Noriko Mizusawa, Takeo Iwata, Katsuhiko Yoshimoto (2010) Analysis of microRNA in saliva and submandibular gland cell lines. International Joint Symposium: The University of Tokushima, Universitas Gadjah Mada, Niigata University, 2010 December 17-18, Denpasar, Bali.

4. 木戸理恵、水澤典子、ワンナザトルシマ、岩田武男、吉本勝彦 (2010) マウス脾島の単離. 126回徳島生物学会 平成22年12月4日 徳島大学 (徳島市)

5. 岩田武男、石本恭子、水澤典子、吉本勝彦 (2010) D-dopachrome tautomerase は脂肪細胞での中性脂肪量を制御する, 第52回歯科基礎医学会学術大会・総会 平成22年9月20-22日 タワーホール船堀 東京 (船堀)

6. Wan Nazatul Shima, 水澤典子、岩田武男、吉本勝彦 (2010) 唾液 microRNA の解析, 第52回歯科基礎医学会学術大会・総会 平成

22年9月20-22日 タワーホール船堀 東京
(船堀)

7. 岩田武男, Md. Golam Hossain, 水澤典子, 吉本勝彦 (2010) 持続的圧縮力は前駆脂肪細胞からの脂肪細胞への分化を抑制する. 第53回日本糖尿病学会年次学術集会、平成22年5月27日-29日、岡山コンベンションセンター (岡山市)

8. 水澤典子, 岩田武男, ワン ナザトル シマ、吉本勝彦 (2010) LXR アゴニストによるプログルカゴン遺伝子産生への影響. 第53回日本糖尿病学会年次学術集会、平成22年5月27日-29日、岡山コンベンションセンター (岡山市)

9. Katsuhiko Yoshimoto, Md. Golam Hossain, Takeo Iwata, Noriko Mizusawa, Schadan Wan Nazatul Shima, Toru Okutsu, Kyoko Ishimoto, Zhi Rong Qian, Toshiaki Sano, Shozo Yamada (2010) Down-regulated expression of p18INK4C in pituitary adenomas. 14th International Congress of Endocrinology, March 26-30, 2010. Kyoto. Kyoto International Conference Center 平成22年3月29日発表

10. 岩田武男, 石丸直澄, 林良夫, 水澤典子, 吉本勝彦 (2009) 脂肪組織における YKL-40 の役割、第51回歯科基礎医学会学術大会、平成21年9月9日-11日、白鷺メッセ (新潟市)

11. Wan Nazatul Shima, 水澤典子, 岩田武男, 吉本勝彦 (2009) Liver X receptor アゴニストによる消化管ホルモン発現調節、第51回歯科基礎医学会学術大会、平成21年9月9日-11日、白鷺メッセ (新潟市)

12. 水澤典子, 岩田武男, ワン ナザトル シマ、吉本勝彦 (2009) LXR アゴニスト T0901317 によるプログルカゴン遺伝子発現への影響 第52回日本糖尿病学会年次学術集会、平成21年5月22日 大阪国際会議場 (大阪市)

13. 畠山節子, 堤玲子, 水澤典子, 吉本勝彦, 安本茂, 武田泰典 (2009) hTERT および cdk4 遺伝子導入による不死化歯原性上皮細胞の樹立、日本組織培養学会第82回大会 平成21年5月18日~19日 獨協医科大学創立30周年記念館 (栃木県壬生町)

14. Iwata T, Kuwajima M, Sukeno A, Ishimaru N, Hayashi Y, Wabitsch M,

Mizusawa N, Itakura M, Yoshimoto K (2009) YKL-40 secreted from macrophages infiltrating into adipose tissue inhibits degradation of type I collagen. International symposium on diabetes, Tokushima University, Tokushima (Japan) 2009 Mar 16

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水澤典子 (MIZUSAWA NORIKO)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・助教
研究者番号：80254746

(2) 研究分担者

岩田武男 (IWATA TAKEO)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・助教
研究者番号：10350399

吉本勝彦 (YOSHIMOTO KATSUHIKO)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・教授
研究者番号：90201863