

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：34428

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15336

研究課題名(和文)唾液腺機能の回復を目指した唾液産生・唾液腺形成メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of the machinery for saliva production and salivary gland formation aimed at the recovery of salivary gland function

研究代表者

海堀 祐一郎(Kaibori, Yuichiro)

摂南大学・薬学部・助教

研究者番号：70845776

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文):口腔内は外界であり、唾液腺から分泌される唾液が口腔粘膜の保護に大きく貢献している。ケモカインは、免疫細胞の動きを制御する液性因子であり、ケモカインCCL28は外分泌腺組織へのIgA産生細胞の集積を誘導し、粘膜保護に寄与している。本解析において、CCL28欠損マウスの唾液腺では、野生型と比較して粘性唾液の減少や細菌の浸潤が観察された。さらに、CCL28欠損マウスでは、唾液腺構成分子であるMUC2やAQP5の発現、幹細胞マーカー候補分子であるc-KitやEpCAMの発現量が低下していた。以上のことから、CCL28は唾液腺幹細胞の分化制御を介して、適切な唾液産生に寄与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ケモカインは細胞の「動き」を制御する液性因子であり、主に免疫学の分野において着目されてきた。しかし、本研究成果から、唾液産生や幹細胞の分化といった、ケモカインの全く新しい機能を見出すことが出来た。これにより、新しい概念を提供できたのではないかと考える。これまでのところ、CCL28の発現を誘導する化合物は同定されていない。今後、本研究の発展により、CCL28の発現を誘導する化合物の同定出来れば、加齢やシェーグレン症候群などの口腔内乾燥症患者の口腔内環境の改善に応用できることが期待できる。また、CCL28の発現そのものが唾液腺の機能を評価するバイオマーカーとなる可能性も秘めている。

研究成果の概要(英文):The oral cavity serves as an external environment, and saliva secreted from the salivary glands provides physical protection to the oral mucosa against pathogenic microorganisms. Chemokines primarily control the movement of immune cells, and the chemokine CCL28 mainly mediates the accumulation and induction of IgA-producing cells in exocrine gland tissues, contributing to mucosal protection. In salivary glands of CCL28-deficient mice, a reduction in mucous saliva secretion and infiltration of bacteria were observed compared to wild-type mice. Furthermore, in CCL28-deficient mice, the expression of salivary gland constituent molecules such as MUC2 and AQP5, as well as the expression levels of stem cell marker candidate molecules such as c-Kit and EpCAM, were decreased. From these findings, it is suggested that CCL28 contributes to the production of mucous saliva through the regulation of salivary gland stem cell differentiation.

研究分野：解剖学、生化学

キーワード：唾液腺 幹細胞 分化 ケモカイン 唾液 CCL28

### 1. 研究開始当初の背景

口腔は、様々な役割を有するが、食べるための機能(摂食・咀嚼・嚥下機能)が、食品に含まれる栄養の摂取と、それによる健康を考える上では最も重要になってくることは明確であり、生命維持に直接的に関わる機能である。また、口腔内は、常に外界に晒されており、膨大な数の細菌やウイルスなどの病原微生物が存在する。それらから口腔粘膜を物理的に保護しているのが、唾液腺から分泌される「唾液」である。健康な成人で1日あたり1.0~1.5リットルにも及ぶ大量の唾液が唾液腺から供給されている。唾液の働きは多岐に渡っており、代表的なものでは、口腔内の粘膜の保護、口腔内の自浄、消化、歯の修復や抗菌などが挙げられる。口腔内の唾液量が低下すると、口腔内細菌が増殖し、虫歯や味覚障害を引き起こす。このような口腔乾燥症を抱える患者は、国内だけでも800万人以上も存在すると言われていたにも関わらず、根本的に唾液量を増やす方法は存在しない。

### 2. 研究の目的

ケモカインは、主に生体内における免疫細胞の動きを制御しており、ヒトではおおよそ50種類同定されている。ケモカイン CCL28 は大腸、乳腺、唾液腺といった主に外分泌腺組織に発現しており、それらの外分泌腺組織へ IgA 産生形質細胞を集積させ、粘膜保護に寄与している。CCL28 の機能解析において、免疫学的な生体防御機構としての広く行われているが、「唾液」という外分泌液という観点からの生体防御に関する報告はない。そこで、本研究課題では、唾液腺に豊富に発現しているケモカイン CCL28 が唾液腺の機能に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

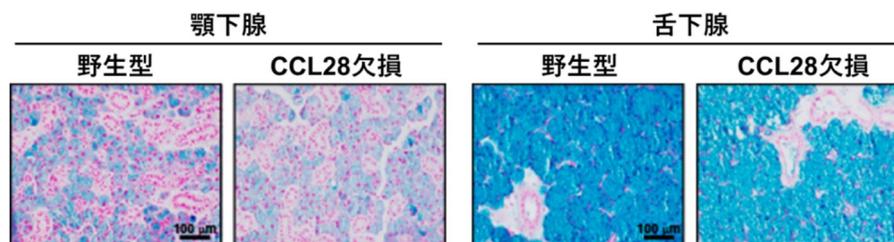
### 3. 研究の方法

8-11週齢の C57BL/6 の野生型または CCL28 遺伝子欠損マウスから採取した唾液腺組織(顎下腺、舌下腺)をそれぞれ1%パラホルムアルデヒドで24時間、4℃にて固定した後、OCTコンパウンドまたはパラフィンに包埋した。8µmに薄切した後、HE染色、アルシアンブルー染色、グラム染色を行った。また、薄切したサンプルを UEA-1 によるレクチンの蛍光染色や MUC2 c-Kit、EpCAM、CD31 による蛍光免疫染色を行った。詳細な分子メカニズムを解析するため、MUC2、AQP5、α-Amylase、α-SMA、CK18、c-Kit、EpCAM、CCR10、CD31 の発現変動について、野生型と CCL28 欠損マウスで RT-PCR 法により比較・定量を行った。

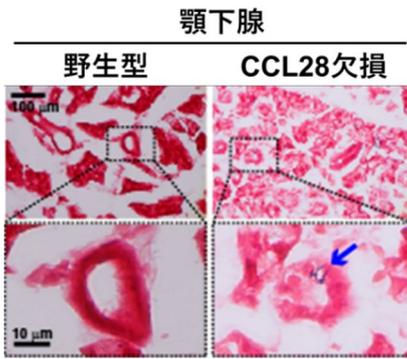
### 4. 研究成果

本研究課題では、上記の研究目的に沿ってケモカイン CCL28 が唾液腺機能に及ぼす影響の解析を主に実施した。

ケモカイン CCL28 は、形質細胞の動きを制御する液性因子であるが、対応する受容体に結合できるリガンドでもあることから、CCL28 が唾液腺組織に及ぼす影響を解析した。まず、アルシアンブルー染色により、唾液腺組織(顎下腺ならびに舌下腺)における酸性粘液の検出を行った(図1)。その結果、顎下腺・舌下腺の両組織とも、CCL28 欠損マウスではアルシアンブルーの染色強度が低下している様子が観察された。また、グラム染色を行ったところ、顎下腺内へのグラム陽性細菌の浸潤が認められた(図2)。これらのことから、CCL28 は、唾液腺において、特に酸性の粘液性唾液の産生を誘導することで、唾液腺内への細菌の浸潤から保護していることが示唆された。

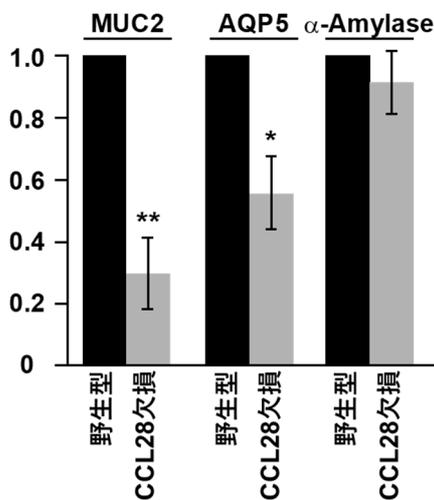


(図1)野生型と CCL28 欠損マウスにおける顎下腺および舌下腺組織のアルシアンブルー染色像の比較

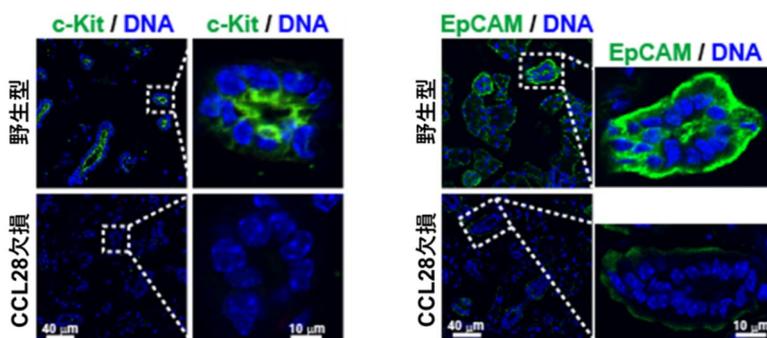


(図2)野生型とCCL28欠損マウスにおける顎下腺組織のグラム染色像の比較

次に、CCL28が唾液腺の構成分子に及ぼす影響を解析したところ、唾液腺内における分泌型ムチン MUC2 や水チャネル AQP5 の発現が有意に低下していることが分かった。一方で、 $\alpha$ -Amylase の発現に変動は認められなかった(図3)。このことから、CCL28欠損マウスでは、唾液腺の機能が低下している可能性が考えられた。また、CCL28欠損マウスの顎下腺組織では、野生型と比べて導管の数が有意に減少していた。これらのことから、CCL28欠損マウスでは、唾液腺の組織構築そのものが破綻している可能性が示唆された。



(図3)野生型とCCL28欠損マウスにおける顎下腺構成分子の発現の比較



(図4)野生型とCCL28欠損マウスにおける顎下腺組織の幹細胞マーカー候補分子の発現の比較

CCL28欠損マウスでは唾液腺の組織構築が脆弱化していることが示唆されたことから、CCL28が唾液腺幹細胞の分化に関与するか解析を行った。唾液腺幹細胞のマーカー分子は明確には同定されていないものの、*ex vivo* 実験系などからいくつかの幹細胞のマーカー候補分子が報告されている。そこで、それらのマーカー分子をいくつか調べてみたところ、CCL28欠損マウスでは、c-KitやEpCAMの発現量が減少する様子が観察された(図4)。

以上のことから、CCL28は唾液腺幹細胞の分化制御を介して唾液腺組織構築を適切に行うことで、粘性唾液の産生に寄与することを見出した。

現在、CCL28の発現を誘導する化合物は同定されていない。今後、本研究課題の発展により、CCL28の発現を誘導する化合物の同定や、CCL28の発現そのものが唾液腺の機能を評価するバイオマーカーとなる可能性を秘めている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kaibori Y, Nagakubo D	4. 巻 30
2. 論文標題 CCR3 blockage elicits polyploidization associated with the signatures of epithelial-mesenchymal transition in carcinoma cell lines.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Gene Ther	6. 最初と最後の頁 137-148
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41417-022-00532-8	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 -
1. 著者名 Kaibori Y, Yamashita K, Nagakubo D	4. 巻 87
2. 論文標題 The altered production and property of saliva induced by ingesting fermented food ingredients affect the oral microbiome composition in mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biosci Biotechnol Biochem	6. 最初と最後の頁 228-235
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/bbb/zbac186	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 -
1. 著者名 Matsuo Kazuhiko, Kitahata Kosuke, Kaibori Yuichiro, Arima Yuka, Iwama Arisa, Ito Mana, Hara Yuta, Nagakubo Daisuke, Quan Ying-Shu, Kamiyama Fumio, Oiso Naoki, Kawada Akira, Yoshie Osamu, Nakayama Takashi	4. 巻 141
2. 論文標題 CCR4 Involvement in the Expansion of T Helper Type 17 Cells in a Mouse Model of Psoriasis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Investigative Dermatology	6. 最初と最後の頁 1985 ~ 1994
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jid.2020.12.034	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 -
1. 著者名 Honzawa Tatsuma, Matsuo Kazuhiko, Hosokawa Shunya, Kamimura Mayu, Kaibori Yuichiro, Hara Yuta, Nagakubo Daisuke, Oiso Naoki, Kawada Akira, Otsuka Atsushi, Yoshie Osamu, Nakayama Takashi	4. 巻 34
2. 論文標題 CCR4 plays a pivotal role in Th17 cell recruitment and expansion in a mouse model of rheumatoid arthritis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 635 ~ 642
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxac041	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 -

1. 著者名 Nagakubo Daisuke, Kaibori Yuichiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Oral Microbiota: The Influences and Interactions of Saliva, IgA, and Dietary Factors in Health and Disease	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 2307 ~ 2307
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/microorganisms11092307	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kaibori Yuichiro, Tamoto Saho, Okuda Sayoko, Matsuo Kazuhiko, Nakayama Takashi, Nagakubo Daisuke	4. 巻 13
2. 論文標題 CCL28: A Promising Biomarker for Assessing Salivary Gland Functionality and Maintaining Healthy Oral Environments	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Biology	6. 最初と最後の頁 147 ~ 147
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biology13030147	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計16件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 海堀 祐一郎、松尾 一彦、中山 隆志、長久保 大輔
2. 発表標題 ケモカインCCL28 によるCCR10/YAP経路を介した大腸粘液産機構の解明
3. 学会等名 第68回 日本生化学会近畿支部例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 海堀 祐一郎、松尾 一彦、中山 隆志、長久保 大輔
2. 発表標題 ケモカインCCL28はHippo経路を介して大腸杯細胞分化を誘導する
3. 学会等名 第95回 日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長谷川七海、天野多詠、海堀祐一郎、片山桐子、池田有紀、安武隆司、幸龍三郎、齊藤洋平、中山祐治
2. 発表標題 EphA2阻害による多核細胞の増加
3. 学会等名 第95回 日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 海堀祐一郎、長久保大輔
2. 発表標題 ケモカイン受容体CCR3の阻害によるがん悪性化への影響
3. 学会等名 第67 回日本生化学会近畿支部例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 海堀祐一郎、松尾一彦、中山隆志、長久保大輔
2. 発表標題 大腸杯細胞への分化におけるケモカインの関与
3. 学会等名 第71回 日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小川実香、海堀祐一郎、幸龍三郎、齊藤洋平、中山祐治
2. 発表標題 リン酸化EphA2 (Ser897)の細胞分裂における役割と局在解析
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 海堀祐一郎、長久保大輔
2. 発表標題 ケモカイン受容体CCR3の阻害によるがん悪性化機構の解明
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安武 隆司、海堀 祐一郎、小川 実香、幸 龍三郎、齊藤 洋平、中山 祐治
2. 発表標題 リガンドに依存しないEphA2のリン酸化はRhoGの活性制御を介して細胞分裂に關与する
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長谷川 七海、池田 有紀、安武 隆司、片山 桐子、海堀 祐一郎、幸 龍三郎、齊藤 洋平、中山 祐治
2. 発表標題 EphA2ノックダウンによる二核細胞の形成
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 栗島弘喜、安武龍司、海堀祐一郎、中山祐治
2. 発表標題 低分子量Gタンパク質RhoGによる細胞分裂制御
3. 学会等名 第69回 日本生化学会近畿支部例会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 堀江皓貴、梶栗有紗、谷口将済、海堀祐一郎、久家貴寿、山岸伸行
2. 発表標題 B細胞受容体シグナル活性化における亜鉛トランスポーターの役割
3. 学会等名 第73回 日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岡本水琴、久家貴寿、海堀祐一郎、山岸伸行
2. 発表標題 ヒト大腸癌由来HCT116細胞の細胞遊走性および浸潤性獲得におけるc-Srcチロシンキナーゼの関与
3. 学会等名 第73回 日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 海堀祐一郎、山岸伸行、長久保大輔
2. 発表標題 疑似的低酸素状態における分泌型ムチンMUC2の発現制御機構の解明
3. 学会等名 第73回日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 海堀祐一郎、山岸伸行、長久保大輔
2. 発表標題 プロリン水酸化酵素PHDはHIF-1、YAPならびにNotchシグナルを介して大腸杯細胞分化を制御する
3. 学会等名 第96回 日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 海堀祐一郎、松尾一彦、中山隆志、山岸伸行、長久保大輔
2. 発表標題 ケモカインCCL28はCCR10/YAP経路を介して大腸杯細胞分化を誘導する
3. 学会等名 第23回 日本再生医療学会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 山岸 伸行、岡本 水琴、海堀 祐一郎、久家 貴寿
2. 発表標題 Srcチロシンキナーゼは転写共役因子YAP/TAZと協働してがん悪性化に関与する
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

姫路獨協大学薬学部 衛生化学研究室 <a href="https://www.himeji-du.ac.jp/faculty/f_lab/hhs/">https://www.himeji-du.ac.jp/faculty/f_lab/hhs/</a> 姫路獨協大学薬学部 衛生化学研究室 <a href="https://www.himeji-du.ac.jp/faculty/f_lab/hhs/">https://www.himeji-du.ac.jp/faculty/f_lab/hhs/</a>
--

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