

令和 6 年 4 月 15 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K17003

研究課題名（和文）唾液腺の分化と恒常性維持機構におけるId4の役割

研究課題名（英文）The role of Id4 in salivary gland differentiation and homeostasis

研究代表者

矢野 恵奈（清川恵奈）（Yano, Ena）

九州大学・歯学研究院・共同研究員

研究者番号：40805678

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、幼若マウスと老齢マウスの唾液腺を用いたmiRNA-RNA網羅的統合解析で同定しているId4、およびその発現を制御するmiR486-5pに着目し、唾液腺恒常性維持におけるId4の役割について解析した。その結果、加齢に伴う唾液腺の変化としてmiR486-5p発現上昇、Id4発現減少が生じていること、miR486-5pが直接Id4の発現を制御していること、Id4欠損によって唾液腺細胞の分化異常が生じていることが判明した。これより、Id4が唾液腺において、分化や恒常性維持に必須であることが強く示唆され、唾液腺の分化・老化やホメオスタシス制御機構を理解する上で重要な知見を提示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに、骨芽細胞や脂肪細胞、乳腺上皮細胞の分化制御にId4が寄与しているという報告はあるものの、唾液腺におけるId4の解析は全く行われてこなかった。そのため、本研究の研究結果が、唾液腺の分化・老化やホメオスタシス制御機構を理解する上で非常に重要な知見が提示された。また、本研究によって得られる知見は、加齢による口腔乾燥症の治療法や、唾液腺再生研究の発展に寄与することとなり、有意義である。

研究成果の概要（英文）：The principle investigator of this research focused on Id4, which was identified through miRNA-RNA comprehensive integrated analysis using the salivary glands of young and old mice, and miR486-5p, which regulates the expression of Id4 to investigate the regulation of salivary gland differentiation and homeostasis. As a result, it was revealed that the increased expression of miR486-5p and decreased expression of Id4 were induced during aging processes in the salivary glands, and that miR486-5p directly controls the expression of Id4, and Id4 deficiency causes abnormal differentiation of salivary gland cells. These data strongly suggests that Id4 is essential for differentiation and maintenance of homeostasis in salivary glands.

研究分野：生化学

キーワード：Id4 唾液腺

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

唾液腺は咀嚼、消化、味覚、正常な粘膜の維持に必要な唾液のみならず、ホルモンや成長因子の産生・分泌などの機能があり、身体の恒常性維持に重要な役割を担っている。近年、唾液腺機能低下に伴う加齢による口腔乾燥症(ドライマウス)の頻度増加が報告されている。

唾液の分泌障害は、各種疾患や放射線治療、薬物治療などによっても生じるが、背景を問わず、唾液の減少は、う蝕や歯周病、味覚異常、会話困難、嚥下障害、誤嚥性肺炎などを引き起こす要因となり著しいQOL低下をもたらす。現在、重度の口腔乾燥症に対しては、人工唾液を用いた代替療法や、唾液腺分泌を促進させる副交感神経刺激薬、マッサージなどの対症療法が行われているが、必ずしも治療効果が得られない場合もあり、根本的な唾液腺の機能回復を支持する治療法の開発が期待されている。しかし、現在までに、唾液腺のライフステージに応じた恒常性変容機構の全貌は明らかとなっておらず、口腔乾燥症との関連も明確に証明されていない。

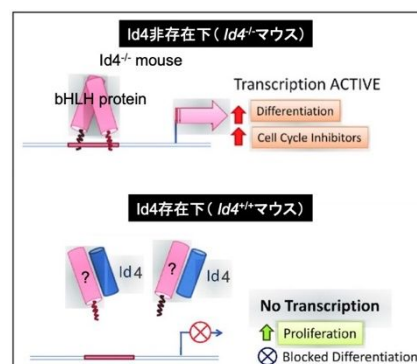
申請者は、現在までに、加齢による口腔乾燥症の増加原因を解明するアプローチとして、幼若マウスと老齢マウスの顎下腺における遺伝子変化を網羅的解析によって調べ、加齢による唾液腺組織機能低下に関わる遺伝子として、*Id4*(*Inhibitor of differentiation 4*)を同定し、*Id4*欠損マウスを用いた唾液腺解析に着手した。

2. 研究の目的

*Id4*は、細胞分化に重要な役割をもつ *Id*ファミリー (*Id1*~*Id4*)の1つであり、bHLH(basic helix-loop-helix)モチーフをもつ転写因子の機能阻害因子として知られている【図1】。

bHLH型転写因子はHLH領域を介して、ヘテロまたはホモ二量体を形成した後、塩基性アミノ酸に富む領域を介してDNA上のE-box配列に結合して、下流遺伝子の転写調節を行っている。そこに、*Id*が存在すると、*Id*はDNA結合能をもたないため、bHLH型転写因子の機能を蛋白レベルで抑制的に調節することとなり、細胞の分化と機能発現が抑制されると考えられている。これまでに、*Id*ファミリーが各種組織や細胞において細胞分化抑制・増殖促進作用をもつことが示唆されているが、それらが制御するbHLH型転写因子はほとんど明らかになっていない。また、*Id*ファミリーのうち、これまでに*Id4*についての解析は非常に少なく、唾液腺に着目した報告は皆無であった。

なお、これまでの申請者の実験から、*Id4*欠損マウスでは、唾液腺の構造や唾液成分に異常が認められることから、唾液腺恒常性維持に関わるbHLH型転写因子の存在が示唆されていた。そこで本課題では、唾液腺における*Id4*の生理的意義、特に唾液腺の分化・老化機構と恒常性維持における*Id4*の役割について、その分子基盤を追究することを目的として研究を遂行した。



【図1】*Id4*の標的転写因子の探索

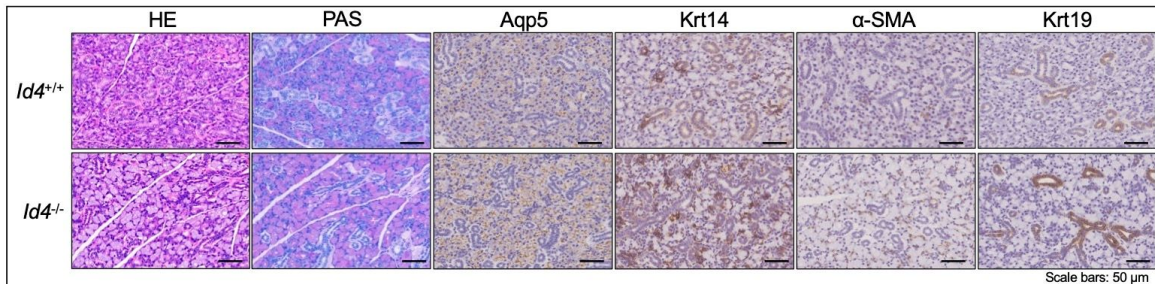
3. 研究の方法

まず個体レベルで、野生型マウスに見られる正常な分化・増殖過程における*Id4*の時間空間的発現パターンについて、*Id4*欠損マウスでどのような異常をきたしているのか、各種分化マーカーを用いた組織学的解析で明らかにした。また、また、初代マウス顎下腺細胞を用いた実験で、組織学的データの検証を行った。さらに、(安静時唾液は採取困難であるため)ピロカルピン刺激による唾液を採取し、野生型マウスと*Id4*欠損マウスの唾液の量・性状の相違について、生化学的に解析した。

続いて、*in vitro*初代細胞培養系で、*Id4*の標的分子(bHLH型転写因子)Xの探索を行った。具体的には、*Id4*に結合する候補分子を免疫沈降、分離、アミノ酸解析により検出した。また、同定した転写因子Xが制御する下流遺伝子を探索した。さらに、*Id4*の存在下/非存在化で発現が変動する分化制御遺伝子をRNAseqによって検出した。また、この【*Id4*-X axis】が、*Id4*の上流にあるmiR486-5pを制御することでレスキューされるのか、生理的に*Id4*減少が認められる野生型老齢マウス個体、および初代顎下腺細胞に対して、miR486-5p阻害剤を投与することで検証した。

4. 研究成果

Id4 欠損マウス顎下腺の組織学的解析では、*Id4* が腺房細胞に特に強く発現していることが観察された。また、腺房細胞(Aquaporin 5)、筋上皮細胞(α-smooth muscle actin、Keratin 14)、導管細胞(Keratin 19)のそれぞれのマーカーについて、野生型マウスに比べ、*Id4* 欠損マウス顎下腺で強発現していた。さらに、*Id4* 欠損マウス顎下腺では、腺房内のPAS陽性物質(粘液成分)の貯留が顕著に認められ、唾液腺組織の明らかな構造異常が生じていた。これらの組織学的所見から、*Id4* が唾液腺の構造や生理的恒常性維持に重要であることが示唆された【図2】。さらに、*in vitro*での唾液腺細胞分化誘導実験で、*Id4* 蛋白の発現量が分化とともに変動する(分化48時間後に発現減少のピークが見られ、72時間後に再び発現量が回復する)ことから、*Id4* が唾液腺において、分化に必要なbHLH型転写因子の働きを制御していることが示唆された。

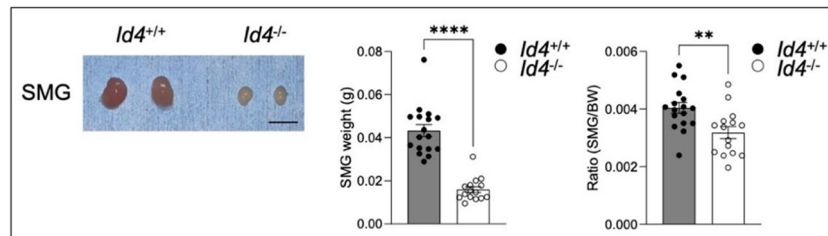


【図2】マウス顎下腺組織(野生型、*Id4*欠損マウス)

個体レベルでは、*Id4* 欠損マウスの顎下腺が野生型マウスの顎下腺に比べて、非常に小さいこと、そのため、唾液量も非常に少ないことも分かった。ピロカルピン刺激による唾液を採取し、野生型マウスと*Id4* 欠損マウスの唾液の量・性状の相違について生化学的に解析したところ、免疫グロブリンの含有量等が異なることが判明した。

また、唾液腺分化・増殖過程における*Id4*の局在の解析、初代マウス顎下腺細胞を用いた生化学的解析から、bHLH型転写因子が結合するE-box配列を有し、唾液腺分化に関わるとされている遺伝子の候補を絞り、*Id4*の存在下/非存在化で発現が変動する分化制御遺伝子の候補を複数見出した(未発表)。

研究期間を通じた研究成果としては、加齢に伴う唾液腺の変化としてmiR486-5p発現上昇、*Id4*発現減少が生じていること、miR486-5pが直接*Id4*の発現を制御していることを明らかにした。また、*Id4*欠損によ



【図3】マウス唾液腺重量

って唾液腺細胞の分化異常が生じており、その原因となるbHLH型転写因子の候補を複数同定することができた。これらのことから、*Id4*が唾液腺において、分化や恒常性維持に必須であることが強く示唆された。これまでに、骨芽細胞や脂肪細胞、乳腺上皮細胞の分化制御に*Id4*が寄与しているという報告はあるものの、唾液腺における*Id4*の解析は全く行われてこなかった。そのため、本研究の研究結果が、唾液腺の分化・老化やホメオスタシス制御機構を理解する上で非常に重要な知見となると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hayashi Y, Kimura S, Yano E, Yoshimoto S, Saeki A, Yasukochi A, Hatakeyama Y, Moriyama M, Nakamura S, Jimi E, Kawakubo-Yasukochi T.	4. 巻 1870(2)
2. 論文標題 Id4 modulates salivary gland homeostasis and its expression is downregulated in IgG4-related disease via miR-486-5p	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochim Biophys Acta Mol Cell Res	6. 最初と最後の頁 119404
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbamcr.2022.119404	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 林慶和、木村宗惟、吉本尚平、矢野恵奈、自見英治郎、安河内（川久保）友世
2. 発表標題 唾液腺恒常性維持におけるId4の役割と唾液腺疾患への関与
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kimura S, Hayashi Y, Yano E, Saeki A, Yasukochi A, Moriyama M, Nakamura S, Jimi E, Kawakubo-Yasukochi T.
2. 発表標題 The role of Id4 in salivary gland and its involvement in the pathology of IgG4-related disease
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 安河内（川久保）友世、矢野恵奈、木村宗惟、溝上顕子、林慶和、安河内篤、中村誠司、自見英治郎、平田雅人
2. 発表標題 妊娠母体栄養がもたらす産仔の肝グリコーゲン分解異常とオステオカルシンによる回避
3. 学会等名 第9回日本DOHaD学会
4. 発表年 2022年

〔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
---------	---------