

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462874

研究課題名(和文) 唾液腺の発生と再生における亜鉛トランスポーターの役割解明

研究課題名(英文) Elucidation of zinc transporter's role for salivary development and regeneration

研究代表者

山本 剛 (Yamamoto, Go)

昭和大学・歯学部・兼任講師

研究者番号：80384189

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内の亜鉛レベルの恒常性は亜鉛トランスポーター(ZIP)により制御されている。我々はZIPファミリーが唾液腺の発生・再生に重要であるとの仮説を立てその検証を行った。ZIP6遺伝子欠損マウスの解析では、唾液腺の組織構造に著変はみられず、蛋白質分泌にも影響を与えなかったが、水分泌に関わる機能を有することが示唆された。一方ZIP10はヒト唾液腺由来培養細胞株を用いた解析では、ZIP10は細胞増殖には関与しないが、導管上皮細胞の放射線細胞障害による細胞死の抑制に関与することが明らかとなった。本研究成果はZIP10の発現コントロールによる唾液分泌障害の新たな治療法開発への一助となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Homeostasis of intracellular zinc level is regulated by zinc transporter (ZIP). We hypothesized that zinc transporter family is involved in salivary gland development and regeneration. In the analysis of ZIP6 knockout mouse, there is no morphological difference of salivary glands between knockout mouse and wild one. It is suggested that ZIP6 may participate in water secretion but not in protein secretion. ZIP10 was found to be inhibition of cell death of NS-SV-DC (human normal salivary gland cell lines showing ductal cell phenotype) induced by irradiation. These results may be expected to give important finding for ZIP10 to be a promising target molecule of dry mouth and be of some benefit for renewed medical treatment of saliva secretion disorder by using control of ZIP10 expression.

研究分野：口腔病理学

キーワード：唾液腺 亜鉛輸送体

1. 研究開始当初の背景

亜鉛は外環境から摂取する必要がある微量必須金属元素であり、その欠乏は成長遅延や免疫不全を引き起こす。また、口腔組織の機能維持とも密接に関わっており、亜鉛欠乏が味蕾の恒常性の維持に破綻を来し味覚障害を招くことや、舌痛症などの口腔灼熱症候群の原因となること、さらに胎児の発育に必須であることが明らかとなっている。亜鉛の細胞内の恒常性は亜鉛トランスポーターにより制御されており、細胞内の亜鉛レベルを上昇させる ZIP ファミリーと細胞内の亜鉛レベルを減少させる ZnT ファミリーに大別される。一部の ZIP ファミリーの遺伝子欠損マウスでは胚発生異常や胎生致死が生じることや骨代謝障害により成長遅延が生じることから、我々は ZIP ファミリーがより胎生期の組織発生に深く関与するのではないかと考え、唾液腺の組織発生と ZIP ファミリーの関わりについて検討を行った。その結果胎生 14 日目の顎下腺において ZIP6 と ZIP10 が成体マウス比較して 5 倍以上の高い発現を示すことを見いだした。加えて、唾液腺と同じ外分泌腺である膵臓においては、発生の過程で重要な因子が、成熟組織においても再生の誘導に重要な役割を担っていることが明らかとなっていた(Cell 132:197-207, 2008)。これらのことから我々は、ZIP ファミリーによる亜鉛輸送は唾液腺の発生・再生に重要であるとの仮説を立て、本研究を遂行した。

2. 研究の目的

唾液腺の発生メカニズムには未だ不明な点が多く、より確実な再生医療技術の確立のためには発生から再生までの一連の過程を詳細に解析する必要がある。我々は前述の背景に基づいて亜鉛トランスポーター、特に ZIP に焦点を当て、唾液腺の発生再生過程のメカニズムの詳細について検討する。

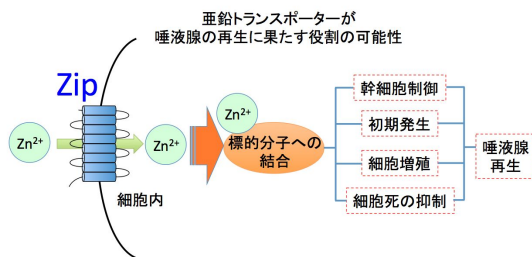


図1 亜鉛トランスポーター-ZIP が唾液腺の再生に果たす役割(仮説)

3. 研究の方法

(1) 唾液腺外分泌機能における ZIP ファミリーの機能解析 - 形態学および生理学的検討 -

唾液腺に亜鉛が果たす役割を形態形成、水・タンパク質分泌機能の観点から評価することを目的として以下の解析を行った。

ZIP6 遺伝子欠損がマウス顎下腺に与える影響について形態学的な検討を行った。Zip6

ノックアウトマウスは理化学研究所より C57BL/6J-Zip6 null マウス(Zip6-null)の譲渡を受けた。8 週齢の雄性 ZIP6-KO マウスおよびコントロールとして C57BL/6 マウスから顎下腺を摘出し、パラホルムアルデヒド固定後に通法に従って HE 染色標本を作成し検討した。

ZIP6 遺伝子欠損マウスにおける水分分泌機能を解析した。深麻酔下の ZIP6 遺伝子欠損マウスとコントロールの野生型マウスに 1% ピロカルピン 50 ug/g を腹腔内注射し、投与 1 分後から分泌唾液を 1 分ずつマイクロキャピラリーで回収し、15 分間の経時的唾液分泌量を測定した。

Zip6 遺伝子欠損マウスにおけるアミラーゼ分泌機能について検討を行った。酵素処理により調製したラット耳下腺腺房細胞を用いてイソプロテレノールを用いた受容体刺激によるアミラーゼ分泌量を経時的に測定した。

(2) 唾液腺細胞の細胞増殖能に対する Zip10 の関与についての検討

ZIP10 過剰発現用プラスミドベクターを複製した。ヒト Zip10(hZip10)全長配列の ORF クローンプラスミドは DNAform 社より購入した。このプラスミドをテンプレートとして PCR により hZip10 を増幅後、pMX-IRES-GFP プラスミドのマルチクロニングサイトに挿入し、pMX-IRES-GFP-hZip10 プラスミドベクター(hZip10 ベクター)を得た。

*In vitro*の検討にはヒト正常顎下腺由来培養細胞株 3 種を用いた。すなわち腺房細胞の性格を有する NS-SV-AC、導管細胞の性格を有する NS-SV-DC、筋上皮細胞の性格を有する NS-SV-MC である。これらの細胞に hZip10 ベクターとコントロールベクターをリポフェクション法にて導入し、96 穴プレートに各細胞を播種し、0,1,2,7 日後の細胞数を MTT アッセイにより計測した。

(3) 唾液腺障害時における ZIP10 機能についての解析

唾液腺障害時における Zip10 の mRNA の発現量の変化を検討した。6 穴プレートに NS-SV-AC, NS-SV-DC, NS-SV-MC の 3 種類の細胞株をそれぞれ播種した。播種 1 日後、放射線照射装置 MBR-1520R-3 を用いて放射線を対照群に 0 Gy, 実験群に 10 Gy 照射し、48 時間後に mRNA を抽出した。mRNA 発現量は定量的 PCR 法で確認した。

唾液腺障害時に ZIP10 が細胞死の抑制に関与するの否かを検討した。hZip10 ベクターを用いて NS-SV-AC, NS-SV-DC, NS-SV-MC の 3 種類の細胞株に hZip10 遺伝子を過剰発現させた後、96 穴プレートに各細胞を播種した。播種 1 日後、放射線照射装置 MBR-1520R-3 を用いて 0, 10, 30 Gy の放射線を照射し、48 時間後の細胞生存率を MTT アッセイにより計測した。

4. 研究成果

(1) 唾液腺の外分泌機能への ZIP ファミリーの役割の検討 - 形態学および生理学的検討 -

Zip6 遺伝子欠損がマウス顎下腺に与える影響について形態学的な検討を行ったところ、Zip6 ノックアウトマウスの唾液腺の組織構造は野生型と比較して顕著な差は認められなかった。

Zip6 遺伝子欠損マウスにおける水分分泌機能について検討を行ったところ、ピロカルピン刺激により誘導された唾液量は、対照群と比較して若干減少する傾向が認められた(図2)。

この結果から ZIP10 により細胞内に流入する亜鉛イオンが水唾液の分泌に重要な働きを

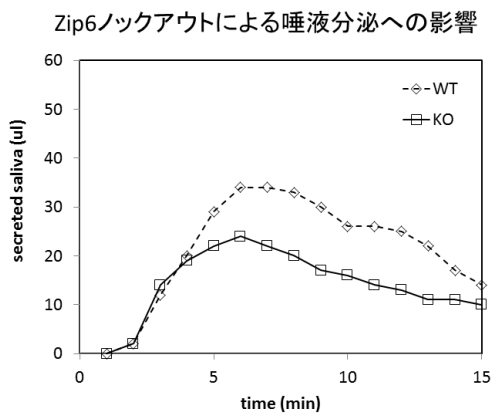


図2 Zip6 遺伝子欠損マウス(KO)と野生型(WT)マウスとのピロカルピン刺激による唾液分泌量の経時変化の比較

有している可能性が示唆された。

Zip6 遺伝子欠損マウスにおける受容体刺激によるアミラーゼ分泌能について解析した結果、Zip6 遺伝子欠損マウスでは野生型と比較して分泌量に有意な差は認められなかった。Zip6 は蛋白質分泌よりも水分分泌の経路に重要な役割がある可能性が示唆された。

(2) ZIP10 の唾液腺細胞の細胞増殖への機能的役割の有無についての検討

ZIP10 過剰発現用プラスミドベクターを NS-SV-AC, NS-SV-DC, NS-SV-MC の3種類の細胞株に導入し、Western blot にて ZIP10 の過剰発現が生じることを確認した。

hZip10 ベクターとコントロールベクターを NS-SV-AC, NS-SV-DC, NS-SV-MC の3種類の細胞株にそれぞれ導入し、細胞増殖を MTT アッセイにて検討したところいずれの細胞においても有意な差は認められなかった(図3)。ZIP10 はヒト正常唾液腺組織においては、腺房細胞、導管上皮細胞、筋上皮細胞のいずれにおいても細胞増殖への関与はないことが示唆された。

(3) 唾液腺障害時における Zip10 の機能解析

ZIP10の過剰発現が各種ヒト唾液腺由来細胞の増殖に及ぼす影響

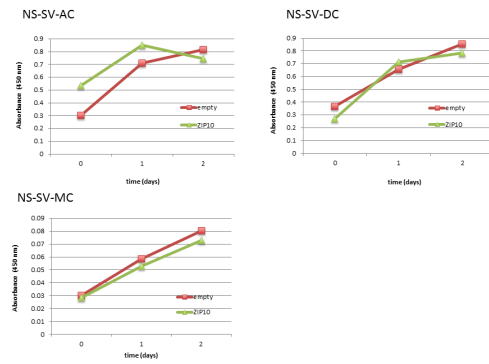


図3 ZIP10 過剰発現が各唾液腺由来細胞株(NS-SV-AC, NS-SV-DC, NS-SV-MC)の細胞増殖に与える影響についての検討

唾液腺障害時における Zip10 の mRNA の発現量の変化を NS-SV-AC, NS-SV-DC, NS-SV-MC の3種類の細胞株への放射線照射により検討したところ、放射線未照射群と比較して特に NS-SV-DC の照射群で有意な発現量の減少が認められた。一方、NS-SV-AC と NS-SV-MC においては有意な差が認められなかった。

この結果は細胞の分化の違いによる放射線感受性の差をみている可能性が考えられるものの、ヒト正常唾液腺組織においては、導管上皮細胞に比べて腺房細胞や筋上皮細胞において障害時に ZIP10 の恒常性を維持しなくてはならない何らかの理由とそのためメカニズムが存在する可能性が考慮された。

唾液腺障害時に ZIP10 が細胞死の抑制に関与するの否かを検討したところ、Zip10 を過剰発現させた NS-SV-DC において細胞死が抑制された(図4)。

NS-SV-AC と NS-SV-MC においては有意な差が

ZIP10過剰発現による放射線による細胞死の抑制

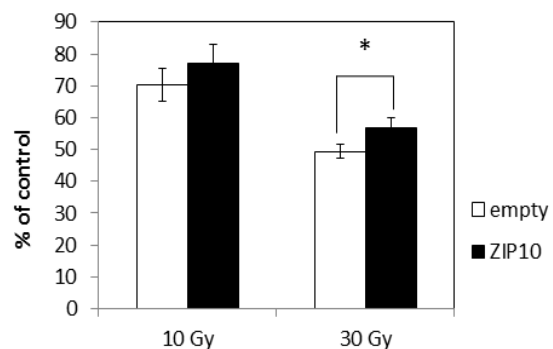


図4 Zip10 を過剰発現した NS-SV-DC において、放射線による細胞死が抑制された。

認められなかった。

ZIP10 がヒト正常唾液腺組織において導管上皮細胞の細胞障害による細胞死の抑制に関わる可能性と、でも考慮された導管上皮細胞とは異なる腺房細胞と筋上皮細胞における細胞障害時に ZIP10 の恒常性を維持する仕組みが既に備わっている可能性が示唆された。

ZIP10 の発現をコントロールすることにより、特に器質的な唾液腺の破壊を伴う疾患に対して患者の唾液分泌機能障害の進行を抑制する新たな手段の確立への一石となることが期待し得るものと考える。

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 7 件)

Jorge-Nebert LF, Galves-Peralta M, Figueroa JL, Somarathna M, Fukada T, Hojyo S, Nebert DW, Comparing Gene Expression during Cadmium Uptake and Distribution: Untreated vs Oral Cd-Treated Wild Type and ZIP14 Knockout Mice, *Toxicological Sciences*, 査読有り, Vol.204, 2014, pp.26-35
DOI:10.1093/toxsci/kfu204

Hojyo S, Miyai T, Fujishiro H, Kawamura M, Yasuda T, Hijikata A, Bin BH, Irie T, Tanaka J, Atsumi T, Murakami M, Nakayama M, Ohara O, Himeno S, Yoshida H, Koseki H, Ikawa T, Mishima K, Fukada T, Zinc transporter SLC39A/ZIP10 controls humoral immunity by modulating B cell receptor signal strength, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 査読有り, Vol.111, 2014, pp.117886-11791
DOI:10.1073/pnas.1323557111

Bin BH, Hojyo S, Hosaka T, Bhin J, Kano T, Miyai T, Ikeda M, Kimura-Someya T, Shirouzu M, Cho EG, Kambe T, Ohashi W, Kim KH, Seo J, Choi DH, Nam YJ, Hwang D, Fukunaka A, Fujitani Y, Yokoyama S, Superti-Furga A, Ikegawa S, Lee TR, Fukada T, Molecular pathogenic basis of Spondylocheirodysplastic Ehlers-Danlos syndrome caused by mutant ZIP13 proteins, *EMBO Molecular Medicine*, 査読有り, Vol.9, 2014, pp.1028-1042
DOI:10.15252/emmm.201303809

Miyai T, Hojyo S, Ikawa T, Kawamura M, Irie T, Ogura H, Hijikata A, Bin BH, Yasuda T, Kitamura H, Nakayama M, Ohara O, Yoshida H, Koseki H, Mishima K, Fukada T, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 査読有り, vol.111, 2014, pp.11780-11785
DOI:10.1073/pnas.1323549111

Hojyo S, Miyai T, Fukada T, B-cell receptor signal strength and zinc signaling: unravelling the role of zinc transporter ZIP10 in humoral immunity, *Receptors & Clinical Investigation*, 査読有り, Vol.2, 2014,

pp.1-4

DOI:10.14800/rci.387

Hayashi S, Tanaka J, Okada S, Isobe T, Yamamoto G, Yasuhara R, Irie T, Akiyama C, Kohno Y, Tachikawa T, Mishima K, *Experimental Cell Research*, 査読有り, Vol.319, No.8, 2013, pp.1220-1228

DOI:10.1016/j.yexcr.2013.03.004

Maruyama T, Miyamoto Y, Yamamoto G, Yamada A, Yoshimura K, Suzawa T, Takami M, Akiyama T, Hoshino M, Iwasa F, Ikumu N, Tachikawa T, Mishima K, Baba K, Kamijo R, Downregulation of carbonic anhydrase IX promotes Col10a1 expression in chondrocytes, *PLoS One*, 査読有り, Vol.8, No.2, 2013, pp.e56984
DOI:10.1371/journal.pone.0056984

[学会発表](計 4 件)

深田俊幸、亜鉛シグナル:生体恒常性を統御する新しい情報伝達機構、第 87 回日本内分泌学会学術総会、2014年4月24日～26日、(福岡国際会議場・福岡サンパレス、福岡県)

深田俊幸、亜鉛による情報伝達:健康と病気への関与、第 56 回歯科基礎医学会学術大会・総会シンポジウム、2014年9月25日～27日、(福岡国際会議場、福岡県)

深田俊幸、亜鉛シグナル:B細胞の恒常性を司る新しい制御機構、心血管膜輸送研究会 2014、2014年9月4日～9月5日、(生理学研究所、愛知県)

Miyai T, Hojyo S, Ikawa T, Irie T, Tanaka J, Fukada T, Mishima K, ZIP10-mediated zinc signaling is required for B-cell maintenance, 第 104 回日本病理学会総会、2015年4月30日～5月2日、(名古屋国際会議場、愛知県)

[図書](計 1 件)

Fukada T, Hojyo S, Bin BH, Springer, *Signals in Cellular Functions and Disorders*, 2014, 345

[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

唾液腺再生医療プロジェクト

<http://www10.showa-u.ac.jp/~oralpath/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

山本 剛 (YAMAMOTO, Go)
昭和大学・歯学部・兼任講師
研究者番号：80384189

(2)研究分担者

美島 健二 (MISHIMA, Kenji)
昭和大学・歯学部・教授
研究者番号：50275343

河野 葉子 (KOHNO, Yohko)
昭和大学・歯学部・准教授
研究者番号：40195681

入江 太郎 (IRIE, Tarou)
昭和大学・歯学部・講師
研究者番号：00317570

安原 理佳 (YASUHARA, Rika)
昭和大学・歯学部・助教
研究者番号：20453649

田中 準一 (TANAKA, Junichi)
昭和大学・歯学部・助教
研究者番号：40710166

深田 俊幸 (FUKADA, Toshiyuki)
徳島文理大学・薬学部・教授
研究者番号：70373363

杉谷 博士 (SUGIYA, Hiroshi)
日本大学・生物資源科学部・教授
研究者番号：20050114

福島 美和子 (FUKUSHIMA, Miwako)
昭和大学・歯学部・助教
研究者番号：90548273

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし