

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：27102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463011

研究課題名(和文) 2型糖尿病に伴うドライマウス発症メカニズムをターゲットとした新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel therapy for type 2 diabetes induced xerostomia

研究代表者

近藤 祐介 (Kondo, Yusuke)

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：00611287

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)：糖尿病は口腔乾燥症と関連があるとされるが、その詳細なメカニズムについては不明な点が多い。本研究では2型糖尿病モデルマウスであるKK-Ayを用い、糖尿病が口腔乾燥症を引き起こすメカニズムを解明することを目的とした。

その結果、小胞体からのCa²⁺放出が低下することによりCa²⁺濃度の上昇が抑制され、唾液分泌が低下していることが明らかになった。また唾液中のNa⁺およびCl⁻濃度は有意に低値を示し、導管細胞の増加による再吸収促進の関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Xerostomia has been reported to be closely associated with diabetes. We have analyzed salivary gland function in KK-Ay, a diabetes mouse model, to explore how diabetes induces xerostomia.

Ca⁺ release from endoplasmic reticulum was significantly less in KK-Ay than control, which might result in decreased salivary secretion from KK-Ay submandibular gland. result in a decreased concentrations of Na⁺ and Cl⁻ in the secreted saliva.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：口腔乾燥症 糖尿病

1. 研究開始当初の背景

口腔乾燥症はカリエスリスクの上昇、歯周病の増悪、義歯の装着困難等、口腔環境に大きな影響を及ぼし、歯科補綴治療を行う上でリスク因子となる疾患である。その原因は頭頸部悪性腫瘍に対する放射線治療やシェーグレン症候群だけでなく、さまざまな薬剤の副作用としても発症する。それ以外の代表的な原因として、糖尿病が挙げられる。糖尿病患者は本邦に700万人程度いわれており、境界型糖尿病(糖尿病予備軍)を含めると2000万人に及ぶとされる。これまでに糖尿病患者において口腔乾燥症状が発生するといった報告は多数あるものの、その詳細な原因は不明である。

2. 研究の目的

本研究では2型糖尿病モデルマウスを用いて、その唾液分泌低下の原因を解明し、口腔環境改善につながる治療法の開発を目指した。

3. 研究の方法

糖尿病モデルマウスとしてKK-Ayを、コントロールとしてC57Bl/6Jを用いた。

Ex vivo モデルによる唾液分泌機能の評価

腺レベルでの唾液分泌機能の評価のため、生体から取り出した顎下腺を用いた Ex vivo マウス顎下腺灌流モデルでの、ムスカリン性刺激薬 Carbachol による唾液分泌量および唾液中イオン濃度の測定を行った。

顎下腺の組織学的評価

Hematoxylin-Eosin(HE)染色を行い、デジタルマイクロスコブを用いて腺房細胞と導管細胞の割合を評価した。

イオン輸送膜タンパク質の発現評価

免疫組織化学を用いて、唾液分泌に重要なチャネルやトランスポーター (Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter (NKCC1)、Aquaporine5 (AQP5)、TMEM16A) の発現を評価した。

細胞内 Ca²⁺濃度の評価

コラーゲナーゼ処理により単離した顎下腺腺房細胞に Ca²⁺指示薬である Fura2-AM を導入し、イオンイメージング法にて Carbachol もしくは Thapsigargin により引き起こされる Ca²⁺濃度の変化を評価した。

4. 研究成果

Ex vivo モデルにおける Carbachol による唾液分泌量を4週齢、6週齢、8週齢のKK-AyとC57Bl/6Jにおいて評価した。その結果、すべての週齢においてKK-Ayでは唾液分泌量は有意に低値であった (Fig. 1)。

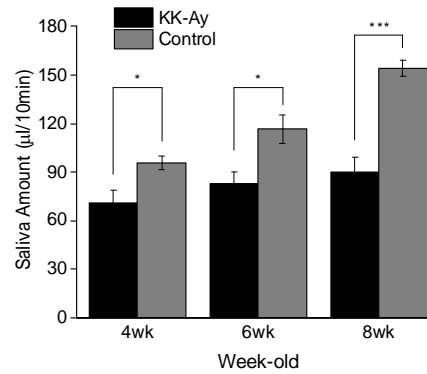


Fig. 1

また、唾液中のイオン濃度 (Na⁺、Cl⁻) を測定した。その結果、6週齢・8週齢においてNa⁺濃度とCl⁻濃度はKK-Ayにおいて有意に低下していた (Fig. 2A・B)。

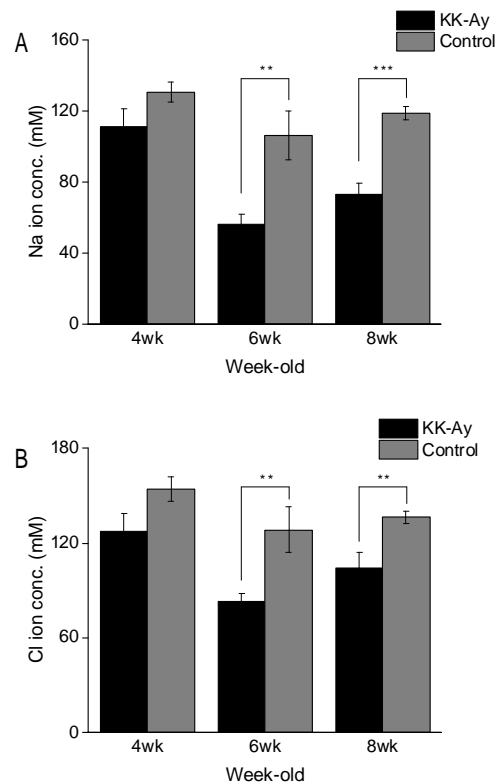


Fig. 2

次に、唾液腺重量と HE 染色からの腺房細胞と導管細胞の割合から、腺房細胞量と導管細胞量を KK-Ay と C57BL/6J において算出した。

その結果、腺房細胞量は KK-Ay と C57BL/6J でほぼ同程度であった。一方、導管細胞量は KK-Ay において有意に高値であった (Fig. 3)。

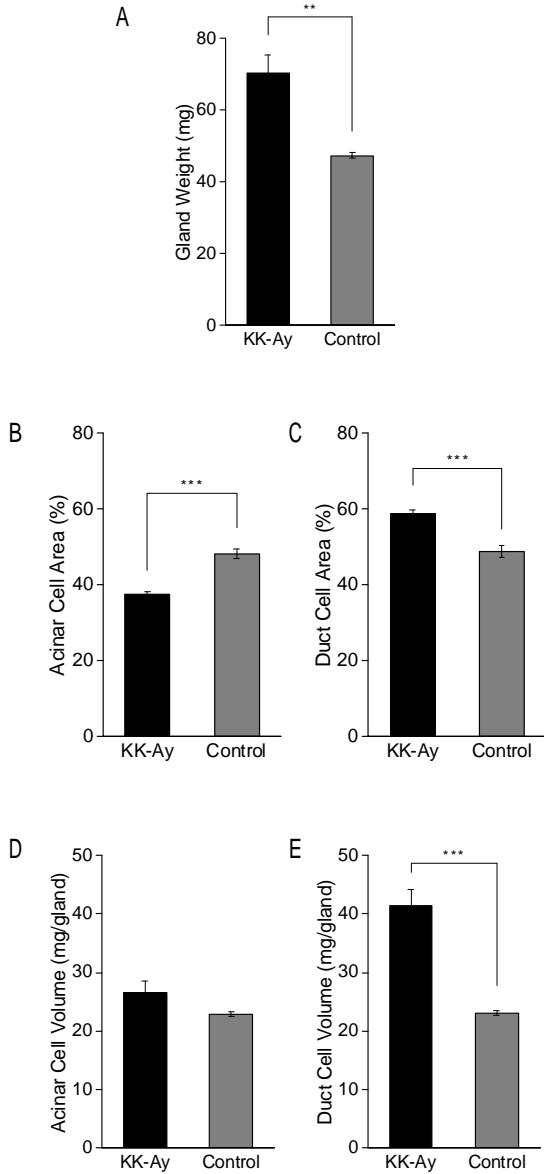


Fig. 3

免疫組織化学において、腺房細胞へ Cl^- を供給する NKCC1、水チャネルである AQP5、 Ca^{2+} 依存性 Cl^- チャネルである TMEM16A の発現を比較したところ、いずれも KK-Ay と C57BL/6J での発現が確認された (Fig. 4)。

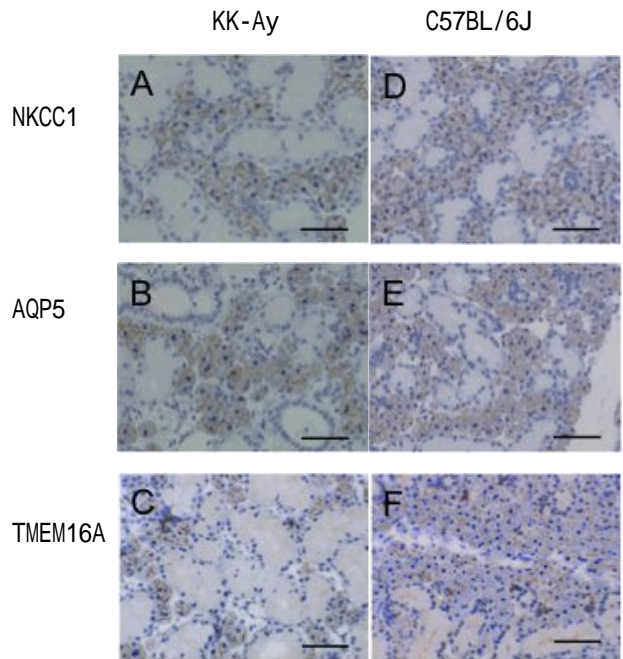


Fig. 4

ムスカリン性刺激薬、Carbachol 刺激による細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇は、細胞外 Ca^{2+} の有無に関わらず、KK-Ay において C57BL/6J より有意に低値であった (Fig 5A-D)。

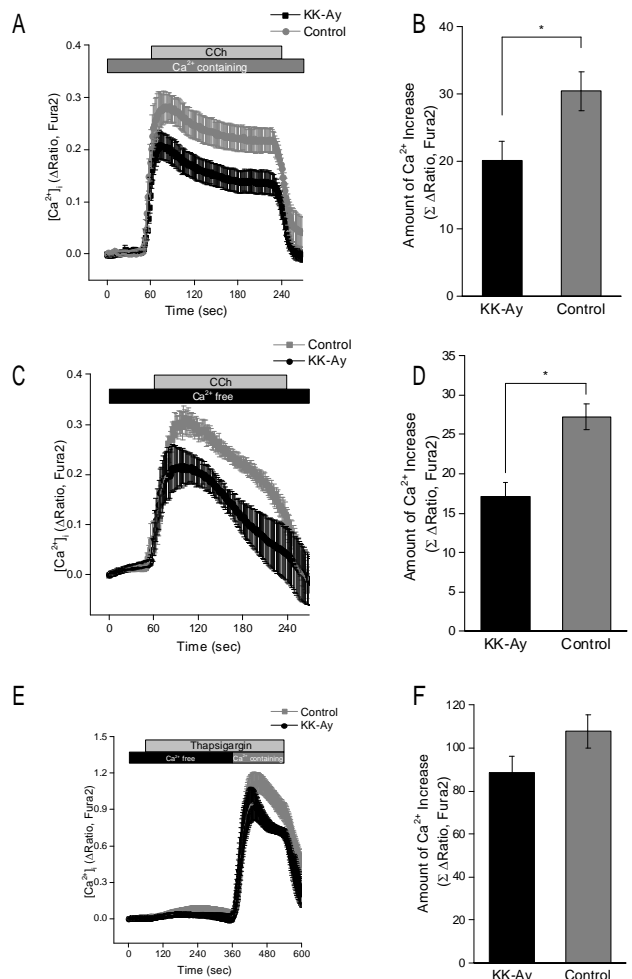


Fig. 5

一方、Thapsigargin による細胞外からの Ca^{2+} 流入は KK-Ay と C57Bl/6J において同程度であった (Fig. 5E-F)。

以上の結果より、糖尿病モデルマウスである KK-Ay において唾液腺腺房細胞において小胞体からの Ca^{2+} 放出が低下し、そのため唾液分泌が有意に低下することが明らかになった。また、KK-Ay において唾液中の Na^+ と Cl^- 濃度が低下しており、その原因として導管細胞の増加の関与が示唆された。

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 4 件)

宗政 翔, 近藤祐介, 向坊太郎, 楠田優一郎, 宮城勇大, 柄 慎太郎, 正木千尋, 中本哲自, 細川隆司. 糖尿病による口腔乾燥症発症メカニズムの解明. 日本補綴歯科学会第 125 回学術大会. 金沢. 2016.

Munemasa T, Kondo Y, Mukaibo T, Kusuda Y, Miyagi Y, Tsuka S, Masaki C, Nakamoto T, Hosokawa R. Diminished $[Ca^{2+}]_i$ Increase Induces Salivary Dysfunction in Diabetic Mouse Model. 2016 IADR/APR General Session & Exhibition. Seoul. 2016.

Kondo Y, Nakamoto T, Mukaibo T, Munemasa T, Kusuda Y, Miyagi Y, Tsuka S, Masaki C, Hosokawa R. Physiological analysis of mouse salivary gland fluid secretion. 第 58 回歯科基礎医学会学術大会 サテライトシンポジウム 13. 札幌. 2016.

宗政 翔, 近藤祐介, 向坊太郎, 楠田優一郎, 宮城勇大, 柄 慎太郎, 正木千尋, 中本哲自, 細川隆司. 2 型糖尿病モデルマウスにおける唾液分泌能の解析. 第 58 回歯科基礎医学会学術大会. 札幌. 2016.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤 祐介 (KONDO YUSUKE)
九州歯科大学・歯学部・助教
研究者番号：00611287

(2) 研究分担者

向坊 太郎 (MUKAIBO TARO)
九州歯科大学・歯学部・助教
研究者番号：50635117

細川 隆司 (HOSOKAWA RYUJI)
九州歯科大学・歯学部・教授
研究者番号：60211546

正木 千尋 (MASAKI CHIHIRO)
九州歯科大学・歯学部・准教授
研究者番号：60397940

(3) 連携研究者

()

研究者番号：