

令和 2 年 7 月 7 日現在

機関番号：33703

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16H05527

研究課題名(和文)上皮膜イオン濃縮機構による全身水収支診断とドライマウス治療戦略

研究課題名(英文) Strategy of xerostomia by measurement of whole body water balance with ion transport in epithelial tissue

研究代表者

中本 哲自 (Nakamoto, Tetsuji)

朝日大学・歯学部・教授

研究者番号：30514989

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病における唾液分泌減少のメカニズムをモデルマウスを用いて検討した。唾液腺全体に占める分泌細胞の割合減少と個々の分泌細胞における分泌シグナルの減少に起因していることが判明した。

耳下腺、顎下腺、舌下腺とそれぞれの雌雄差について遺伝子レベルの解析したところ、舌下腺で性差特異性があることが証明された。顎下腺唾液はNaCl濃度が非常に低値という特徴は唾液腺導管細胞の再吸収に寄与するClチャンネルとナトリウムチャンネルの遺伝子に起因していることが証明された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病により生じる口腔乾燥症を根本的に改善するためには、組織の再生や組織の反応性の上昇などを行わなければならない可能性が高い。再生医療までの遠い道りを踏まえると、現状では診断技術の向上と補充療法などの対症療法の拡充が必要と考えられる。雌雄差や唾液成分と一部の遺伝子との間に密接な関係が存在することより、唾液成分分析から遺伝子あるいは膜タンパクの障害を探索できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Decreased saliva secretion in diabetes was investigated using model mice. It was caused by a decreased proportion of secretory cells in the entire salivary gland and a decreased secretory calcium signal in individual secretory cells.

Gene-level analysis of male and female differences among the three major salivary glands, parotid gland, submandibular gland, and sublingual gland, revealed that the sublingual gland had sex-specificity. Submandibular saliva has very low NaCl concentration due to the high expression of chloride channel and sodium channel genes.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：唾液 糖尿病 イオンチャンネル 口腔乾燥症

1. 研究開始当初の背景

全身疾患の発症(とくに脳血流性疾患)と共に、突如として口腔管理がうまくいかなくなり、加速度的に歯を失うことがある。口腔乾燥症の併発による高齢者の根面う蝕は歯周疾患と並んで歯を失う要因となる。健康寿命と平均寿命との差は男性で9年、女性で13年近くあり、全人口の8%前後も占める広義の「団塊の世代」(1947~54年生まれ)が健康寿命を迎えつつある現実を加味すると、上水道のフッ素化のような、より大規模で適用可能な口腔環境改善技術の開発が急務である。高齢者に多発する口腔乾燥症は唾液腺の機能障害により引き起こされるが、その要因は多岐にわたる。腺組織から体腔へと放出される液体は常に低張性でそれを制御するのは細胞膜を介した陰イオンの移動である。中でも塩素イオン(Cl^-)は主要な役割を担い、その移動は TMEM16A/Ano1 と命名された陰イオンチャネルにより腺細胞より放出される。しかしながら、一般の体細胞では5~20mM と低く、チャネルが開いても水分子は細胞外に出ないために分泌は起こらない。一方、腺細胞では $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}^-$ 共輸送担体によりその濃度が60mM 程度に保持されチャネルが開くとすれば Cl^- は細胞外へと移動し、それが Na^+ を引き寄せ、生じた NaCl を希釈するように水分子の移動が起こり、水分分泌が成立する。現在、口腔乾燥症の臨床的対応は多くが人工唾液などの対症療法であり、唾液分泌の ON/OFF を司るムスカリン性レセプターへの薬物療法(セビメリン、ピロカルピン)はシェーグレン症候群など一部疾患に対して認められるのみでその適用は極めて限定される。一方で、我が国は総人口の25%が65歳を超えたと推計される超高齢社会にある。秋下らの報告では大学病院を受診した75歳以上の高齢者は平均4.5剤の薬剤を服用しており、入院患者ではさらに増えると指摘し、投与薬剤の中で特に注意を喚起される薬剤の中に抗コリン作用、つまりムスカリン性レセプターを直接阻害する薬剤を多数挙げている。臨床実験で水分子をコントロールする水チャネル(AQP)を過剰発現させる試みもされているが結果は安定せず、我々も過去の研究で AQP5 を AQP5 欠損マウスに遺伝子導入により発現に成功したが、同時に細胞死を誘発し、機能回復までには至らなかった。主要なチャネルやトランスポーター単独の作用は比較的解明されているものの、口腔乾燥症は多因子により発症することから、疾患モデルなどを用いて上皮膜を介した水分子の移動を多角的に解析し、病因解析から治療まで展開することが求められていた。また、ムスカリン性レセプター刺激以外の機能改善方法の可能性が組織再生法による改善とともに求められていた。

2. 研究の目的

外分泌を制御するのは上皮膜に存在するイオンチャネルやトランスポーターを介したイオン輸送であることから、各疾患モデルを用いて唾液腺機能障害のメカニズムを検証することにより、機能回復のために必要な知見を得ることを目的とした。上皮などに発現するチャネルやトランスポーターが嚥下機能に果たす役割を検証することも併せて目的とした。

3. 研究の方法

疾患モデルとして糖尿病マウス(KK-Ay マウス)を用い、糖尿病の臨床症状として存在する口腔乾燥について、顎下腺を用いた灌流腺組織、分散処理後の細胞を用いた細胞内シグナル伝達および免疫組織学的手法を用いて解析した。

三大唾液腺のイオン輸送を伴う膜タンパクをコードする遺伝子発現量を検索し、各分泌唾液中のイオン濃度との関係について解析した。

イオンチャネルと嚥下反射との関係について、酸感受性チャネルの関与について生理学的手法を用いて解析した。

外分泌の起点となる陰イオン輸送について制御メカニズムをマウス顎下腺で細胞生理学的手法を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) 糖尿病マウスでは発症進行に伴って分泌障害が生じる。

KK-Ay 糖尿病モデルマウスではコントロールと比較して6週から血糖値が有意に上昇し、それと合わせて有意な体重増加と顎下腺重量増加が生じている。灌流腺組織モデルで腺組織重量単位の分泌減少を副交感刺激(Carbachol:0.3 μM) 検証したところ、同様に6週齢以降でおおよそ30%の分泌減少を観察した。

(2) 分泌減少を観察した糖尿病マウスの唾液中の NaCl 濃度変化は組織学的な変化を伴う。

Carbachol 刺激による分泌減少を観察した唾液中の成分を解析したところ Na^+ と Cl^- が有意に減少していた。その原因を組織学的に検証したところ、KK-Ay 糖尿病モデルではコントロールと比較して、腺房細胞の重量は変化しないものの、 NaCl 再吸収を担う導管細胞の割合増加を観察した。

(3) 糖尿病マウスでは分泌に重要なチャネルやトランスポーターの発現は変化しない。

腺房細胞において分泌に重要な役割を果たす陰イオンチャネルである TMEM16A/Ano1、唾液腺の水チャネルである Aquaporin 5 および $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ 共輸送担体の免疫組織学的に発現を確認したところ糖尿病モデルマウスでの障害は観察されなかった。

(4) 糖尿病マウスでは腺房細胞の分泌刺激への反応が低下していることが分泌減少の主要因である。

KK-Ay 糖尿病モデルマウスでの分泌減少の原因を分泌シグナルである細胞内カルシウムイオンで計測したところ、Carbachol 刺激によるカルシウム上昇は 30%程度阻害されていた。一方でカルシウムストア枯渇 (Thapsigargin 刺激) による上昇メカニズムは温存されていた。

(5) 顎下腺唾液中の NaCl が低値であるのは他の腺組織に比較して特定のチャネル発現の上昇に起因する。

耳下腺、顎下腺、舌下腺の遺伝子発現を網羅的に検証した。顎下腺唾液における NaCl が低値は他の腺組織に比較し CFTR Cl⁻ チャネルと SCNN1Na チャネルの発現上昇に起因する。

(6) 嚥下反射に関わる上皮と神経線維に酸感受性チャネル 3 が存在している。

嚥下反射は弱酸の摂取により改善するとされるがその詳細なメカニズムは不明であった。酸感受性イオンチャネル 3 の局在を嚥下領域で確認したところ上咽頭神経支配領域の上皮細胞と神経線維中に発現を認めた。

(7) 酸感受性イオンチャネル 3 は嚥下反射に関与する。

酸感受性イオンチャネル 3 の活性化剤である 2-グアニジン 4-メチルキナゾリンおよびアグマチンにより嚥下反射は上昇するが、その阻害剤の局所投与により嚥下反射は抑制されたことから、同チャネルの嚥下反射への関与が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Takasi Munemasa, Taro Mukaibo, Yusuke Kondo, Chihiro Masaki, Yuichiro Kusuda, Yuta Miyagi, Shintaro Tsuka, Ryuji Hosokawa, Tetsuji Nakamoto	4. 巻 10(1)
2. 論文標題 Salivary gland hypofunction in KK-Ay type 2 diabetic mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Diabetes	6. 最初と最後の頁 18-27
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1753-0407.12548	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 Mohammad Zakir Hossain, Hiroshi Ando, Shumpei Unno, Tetsuji Nakamoto, Junichi Kitagawa	4. 巻 32(1)
2. 論文標題 Functional involvement of acid-sensing ion channel 3 in the swallowing reflex in Rats.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neurogastroenterology and motility	6. 最初と最後の頁 e13728
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/nmo.13728	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 3件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 James E. Melvin, Taro Mukaibo, Yusuke Kondo, Tetsuji Nakamoto
2. 発表標題 Basic research: Future directions to restore the salivary gland hypofunction
3. 学会等名 第59回歯科基礎医学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tetsuji Nakamoto
2. 発表標題 Analysis of electrolyte and water transport by the ex vivo mouse submandibular gland perfusion technique in genetically modified mice
3. 学会等名 第4回ニールスステンセン記念国際唾液腺シンポジウム（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 中本 哲自
2. 発表標題 唾液腺水分泌における膜タンパクの役割
3. 学会等名 第17回松本ポーンフォーラム (招待講演)
4. 発表年 2018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
研究分担者	富士 岳志 (FUJI TAKESHI) (20549323)	松本歯科大学・歯学部・講師 (33602)	
研究分担者	北川 純一 (KITAGAWA JUNICHI) (50373006)	松本歯科大学・歯学部・教授 (33602)	
研究分担者	黒岩 昭弘 (KUROIWA AKIHIRO) (10195571)	松本歯科大学・歯学部・教授 (33602)	
研究分担者	山口 正人 (YAMAGUCHI MASATO) (30410434)	松本歯科大学・歯学部・講師 (33602)	
研究分担者	小町谷 美帆 (KOMACHIYA MIHO) (00387432)	松本歯科大学・歯学部・助教 (33602)	