

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：32667

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11327

研究課題名(和文) 新たなシェーグレン症候群疾病因子の解明に向けた唾液腺の病態特異的タンパク質の解析

研究課題名(英文) Analysis of the novel protein specifically expressed in salivary glands of non-obese diabetic mouse for elucidating pathological factors of Sjogren's syndrome

研究代表者

梨田 智子 (NASHIDA, TOMOKO)

日本歯科大学・新潟生命歯学部・准教授

研究者番号：10133464

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：抗菌タンパク質BPIFB1は肺における発現が報告されているが、シェーグレン症候群モデル動物である非肥満型糖尿病(NOD)マウスにおいては耳下腺に極めて高い発現が認められた。BPIFB1はコントロール(C57BL/6およびICR)マウス成獣においては肺の他の器官では発現が低かったが、幼若期(5週齢)の耳下腺において一過性で高発現しており、また胎生後期(15,17days)においても一過性に高発現していた。NODマウス耳下腺腺房細胞においてBPIFB1は分泌顆粒内に存在しており、唾液中に分泌されていた。ヒト唾液でも高度にBPIFB1を発現する例があった。その発現意義は今後検討する必要がある。

研究成果の概要(英文)：BPIFB1, an anti-bacterial protein, was highly expressed in the acinar cells of parotid glands of non-obese diabetic (NOD) mice, an animal model for Sjogren's syndrome, whereas, a low level of BPIFB1 expression was detected in the salivary glands of the control (C57BL/6) mice. The expression of BPIFB1 in C57BL/6 mice and ICR mice was as high as that in NOD mice at 5 weeks old, and in the control mouse embryo at the stage of 15 to 17 days. In parotid glands of NOD mice, BPIFB1 was localized in the secretory granules of the acinar cells and was secreted into saliva. BPIFB1 had N-linked glycan that reacted with Aleuria aurantia lectin. BPIFB1 was also detected in human objectives. Further studies would be required for the implication of BPIFB1 expression.

研究分野：医歯薬学

キーワード：BPIFB1 唾液 耳下腺 非肥満型糖尿病マウス シェーグレン症候群モデル動物

1. 研究開始当初の背景

唾液中の機能性タンパク質の中で、抗菌タンパク質は教科書にも取り上げられ一般によく知られている。しかし、平常時には発現せず、病態時になって初めて発現する抗菌タンパク質の存在はほとんど知られておらず、その役割は異常に対する防御的役割を持っているものと考えられる。1型糖尿病モデル動物である NOD(non-obese diabetic)マウスはシェーグレン症候群のモデル動物として使用されている。これまでの NOD マウス耳下腺における mRNA 発現の解析から、NOD マウスにおいて数種類の抗菌タンパク質の発現量が変化していることを見出された。特に、抗菌タンパク質の一種である BPIFB1 の遺伝子 (*Bpifb1*) 発現が正常マウスの 900 倍以上の著しい上昇を示すことから発症マーカーとなる可能性があると考えた。BPIFB1 は、bactericidal/permeability-increasing protein (BPI)-domain-containing PLUNC family member の 1 つで、別名 LPLUNC1 とも呼ばれている。PLUNC family は口蓋、鼻、肺上皮に発現している抗菌タンパク質の一種であるが、BPIFB1 は正常な唾液腺には発現していないという報告がある (*Cell Tissue Res*; 350(3):455-64, 2012)。しかし、ヒトの唾液腺および唾液における病態時の発現変化は報告されていない。

2. 研究の目的

本研究は、*Bpifb1* に焦点を当て、シェーグレン症候群モデルマウスの耳下腺における抗菌タンパク質の発現を確認し、その挙動を明らかにすることを目標とする。また口腔乾燥症患者において、唾液におけるこれらのタンパク質発現との関連性を調べ、バイオマーカーとしての臨床応用の可能性を検討する。

3. 研究の方法

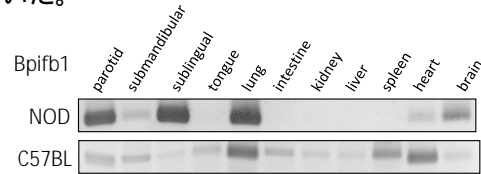
(1) 非肥満型糖尿病(NOD)マウスを用い、糖尿病発症および非発症 NOD マウスにおける BPIFB1 タンパク質と mRNA の発現上昇をリアルタイム PCR と *in situ* hybridization により解析し、タンパク質発現を Western blotting と免疫染色法で調べ、コントロール(C57BL/6)マウスと比較した。

(2) NOD マウスおよびコントロールマウスの生育過程における *Bpifb1* の発現上昇を調べた。

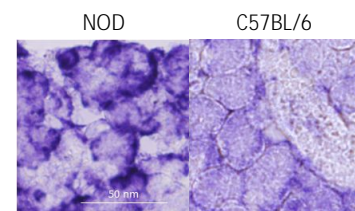
(3) ヒト唾液から mRNA を抽出し、*Bpifb1* を検出した。また、Western blotting により BPIFB1 タンパク質を検出し、mRNA の発現と比較した。臨床応用として、小児および高齢者からの唾液における BPIFB1 の発現を調べた。

4. 研究成果

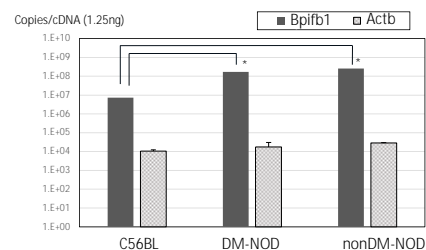
(1) BPIFB1 の mRNA (*Bpifb1*) の発現レベルを RT-PCR で調べた。これまでマウスの肺での発現が報告されているが、NOD マウスにおいては、肺以外に耳下腺および舌下腺で高発現していた。



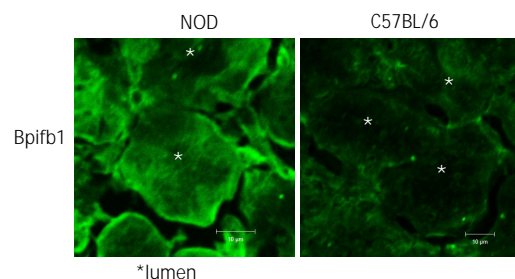
さらに、*in situ* hybridization で、NOD マウス耳下腺において腺房細胞に特異的に *Bpifb1* が高発現していることが示された。



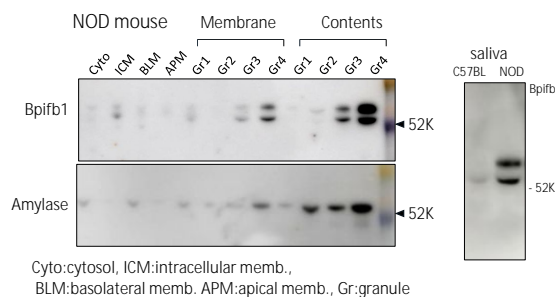
耳下腺腺房細胞から抽出した RNA について、real time PCR を行ったところ、NOD マウスにおける *Bpifb1* の発現レベルは糖尿病の有無および週齢に関わらず、コントロールマウス(C57BL/6)と比較して著しく高かった。



BPIFB1 タンパク質の発現もまた、NOD マウス耳下腺腺房細胞で高発現していた。

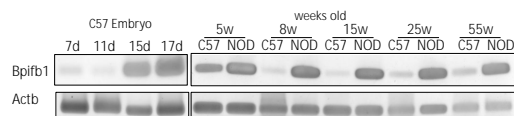


NOD マウス耳下腺腺房細胞の細胞分画により得られた画分についても、BPIFB1 は分泌顆粒内に存在しており、唾液中に分泌されていた。



唾液中の BPIFB1 タンパク質は分子量がわずかに異なる 2 つの型の BPIFB1 を含んでいた。これらは *Aleuria aurantia* レクチン (AAL) に結合する糖鎖を含んでおり、フコースを含む糖鎖を持つことが示唆された。フコース含有糖鎖は生理活性を有するものが知られており、BPIFB1 も抗菌作用とは別の生理活性を持つ可能性があると考えられた。

(2) C57BL/6 および SLR 種の成獣コントロールマウスでは *Bpifb1* の発現は極めて低いものの、5 週齢までの幼若マウス耳下腺腺胞細胞および胎生後期においてはいずれも高発現を示し、BPIFB1 は生育過程において何らかの役割を持つことが示唆された。



(3) ヒト唾液 3 例から二次元電気泳動および Western blotting で BPIFB1 の検出を試みたところ、使用抗体はアミラーゼと弱く交差するものの、分子量のわずかな相違から解析が可能であることがわかった。また、ヒト唾液試料の BPIFB1 含有量には著しい差が認められた。ヒト全唾液を用いた Western blotting による BPIFB1 タンパク質の検出と同時に、唾液から RNA を抽出し、RT-PCR により mRNA (*BPIFB1*) の検出を試みた。BPIFB1 タンパク質のバンドの定量値と *BPIFB1* 発現量は同傾向ではあるものの必ずしも一致しなかった。ヒト唾液中の BPIFB1 発現については、小児および高齢者からの唾液におけるタンパク質と RNA の解析を行い、学会にて発表した (投稿準備中)。唾液中の BPIFB1 が反映する体質および疾患についてさらに詳細な検討が必要と考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

1. Nashida T, Yoshimura K, Shimomura-Kuroki J, Mizuhashi F, Yoshie S. Up-regulation of *Bpifb1* expression in the parotid glands of non-obese diabetic mice. *Oral Dis* 22(1):46-52, 2016. doi: 10.1111/odi.12377.

2. Nashida T, Shimomura-Kuroki J, Mizuhashi F, Haga-Tsujimura M, Yoshimura K, Hayashi-Sakai. Presence of BPIFB1 in saliva from non-obese diabetic mice. *Odontology* 106(2):117-124, 2018. doi: 10.1007/s10266-017-0312-7.

3. Shimomura-Kuroki J, Nashida T, Miyagawa Y, Sekimoto T. The Role of Genetic Factors in the Outbreak Mechanism of Dental Caries. *J Clin Pediatr Dent* 42(1):32-36, 2018. doi: 10.17796/1053-4628-42.1.6.2017.

4. Mizuhashi F, Koide K, Toya S, Nashida T. Salivary level of antimicrobial protein chromogranin A in relation to the salivary flow rate and swallowing function. *Med Res Arch* 4(7): 1-13. 2016. doi: <http://dx.doi.org/10.18103/mra.v4i7.726>

5. Mizuhashi F, Koide K, Toya S, Nashida T. Oral dryness caused by calcium blocker -Comparison with saliva of healthy elderly persons and patients with Sjögren's syndrome-. *Med Res Arch* 5(9):1-12, 2017. <http://www.journals.ke-i.org/index.php/mra/article/view/1516/1262>.

6. 坂井幸子, 坂本信, 林孝文, 坂井淳, 下村-黒木淳子, 梨田智子: マイクロ CT による脱落歯のミネラル密度評価-低フォスファターゼ症例への応用-, *実験力学* 16: 122-126, 2016.

〔学会発表〕(計 9 件)

1. 梨田智子, 吉村建, 水橋史, 黒木淳子, 佐藤律子: *Bpifb1* expression in non-obese diabetic mice. 日本生化学会関東支部例会 (第 56 回新潟生化学懇話会) 講演要旨集 2015, 56 p26.
2. 梨田智子, 吉江紀夫, 辻村麻衣子, 吉村建, 下村-黒木淳子, 佐藤律子: 幼若マウス耳下腺腺胞細胞における抗菌タンパク質 *Bpifb1* の一過性発現上昇. 第 57 回歯科基礎医学会 Journal of Oral Biosciences Supplement 2015, P383, 2015.
3. 梨田智子, 吉村建, 水橋史, 下村-黒木淳子, 吉江紀夫: 幼非肥満糖尿病 (NOD) マウス唾液には 2 つの型の抗菌性タンパク質 *Bpifb1* が存在する. 第 88 回日本生化学会 Web 要旨閲覧システム, 3P-1147, 2015.
4. 佐藤律子, 梨田智子, 水橋史, 吉村建, 下村-黒木淳子: 2D-PAGE analysis of saliva from non-obese diabetic (NOD) mice and xerostomia patients. 第 58 回歯科基礎医学

会学術大会, Journal of Oral Biosciences Supplement 2016, p.40, 2016.

5. 下村 - 黒木淳子, 梨田智子, 島田路征, 林 - 坂井幸子, 関本恒夫; 小児の唾液流量とタンパク質解析によるバイオマーカーの検討, 日本小児歯科学雑誌, 55 巻 2 号, 202, 2017.

6. 梨田智子, 森田貴雄, 辻村麻衣子, 佐藤律子, 下村-黒木淳子, 吉村建: small membrane A-kinase anchoring protein (smAKAP) のマウス耳下腺における発現. 第 58 回新潟生化学懇話会, 2017.

7. 梨田智子, 森田貴雄, 水橋史, 下村-黒木淳子, 吉村建: マウス耳下腺における small membrane A-kinase anchoring protein (smAKAP) の発現. 第 59 回歯科基礎医学会学術大会, Journal of Oral Biosciences Supplement 2017, 470, 2017.

8. 水橋史, 小出馨, 梨田智子, 戸谷収二: カルシウム拮抗薬による口腔乾燥症患者の唾液タンパク質の分析. 第 59 回歯科基礎医学会学術大会, J Oral Biosci Suppl 2017, 473, 2017.

9. 水橋史, 小出馨, 梨田智子, 戸谷収二, 近藤敦子, 浅沼直樹, 佐藤利英, 渡會侑子, 栗田 武: Ca 拮抗薬による口腔乾燥症 - 健常高齢者とシェーグレン症候群患者の唾液との比較 -, 日補綴歯会誌 9 巻 126 回特別号: 291, 2017.

〔図書〕(計 1 件)

1. Yoshimura K, Nashida T, Mikami M and Kageyama I: A simple electroporation method of green fluorescent protein-transfection and in vitro imaging of organ-cultured embryonic lingual tissue. Microscopy and imaging science: practical approaches to applied research and education A. Méndez-Vilas Ed. Microscopy Book Series No. 7 pp.11-17, (Formatex Research Center. Badajoz, Spain ISBN-13: 978-84-942134-9-6).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梨田 智子 (NASHIDA, TOMOKO)
日本歯科大学・新潟生命歯学部・准教授
研究者番号: 10133464

(2) 研究分担者

下村 淳子 (SHIMOMURA, JUNNKO)
日本歯科大学・新潟生命歯学部・准教授

研究者番号: 00386286

水橋 史 (MIZUHASHI, FUMI)
日本歯科大学・新潟生命歯学部・准教授
研究者番号: 60386266

(3) 連携研究者

辻村 麻衣子 (TSUJIMURA, MAIKO)
日本歯科大学・新潟生命歯学部・准教授
研究者番号: 60535219

(4) 研究協力者

佐藤 律子 (SATO, RITSUKO)
日本歯科大学・新潟短期大学・准教授
研究者番号: 50178787