

平成 30 年 6 月 17 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20411

研究課題名(和文)細胞間接着分子を介した新たな唾液腺疾患の病態解明

研究課題名(英文)Functional analysis of nectins in mouse submandibular glands

研究代表者

北山 美登里(吉田)(KITAYAMA, MIDORI)

神戸大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：20636427

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文):自己免疫性唾液腺はドライマウスを引き起こす主たる原因である。細胞間接着分子は隣接する細胞、あるいは細胞外基質との接着を介して、生体の恒常性を保つ重要な役割を担っている。また、細胞間接着分子の発現異常が本疾患発症に関与していることが示唆されている。本研究では、唾液腺の発生・維持における細胞間接着分子の機能を分子レベルで明らかにすることを目的としている。ネクチン1欠損マウスでは顎下腺において形態異常が確認され、消化酵素であるアミラーゼの発現が減少し、ネクチン1欠損マウスではネクチン1だけでなく、ネクチン3のシグナルも消失しており、ネクチン1,3が顎下腺の形態形成に関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文):The epithelial cells are linked to each other by cell adhesion molecules that form cell-cell junctions,such as adherens junction(AJ) and tight junction(TJ).The abnormalities of the AJ and TJ components in the salivary gland are associated with the onset of inflammatory diseases or histological abnormalities.We investigated the expression and localization of AJ and TJ components,especially focusing on the localization and roles of nectin family members.The AJ components were located at the apical portion of the boundary between neighboring striated duct cells.Although N1KO submandibular glands were morphologically diminished,There is no significant alteration of the localization of AJs and TJs molecules.The expression level of amylase in the N1KO submandibular glands was lower than that of WT.The serum levels of thyroid hormone thyroxin(T4) were not different between WT and N1KO.Our results suggest that nectins are involved in the maintenance and development of the salivary glands.

研究分野：歯科口腔外科

キーワード：nectin submandibular gland

1. 研究開始当初の背景

唾液腺の破壊・萎縮によるドライマウスを主症状とする自己免疫性唾液腺炎は、口腔外科領域における難治性疾患の一つである。本邦では推定4万人の患者がいるといわれている。自己免疫性唾液腺炎によりドライマウスを引き起こし、易感染性や嚥下困難、口腔内異常感症など、口腔内QOLの著しい低下につながる。本疾患の発症には、細菌やウイルス感染症などの何らかの先行因子により唾液腺組織の一部が破壊されることで、慢性炎症が誘導されると考えられている。そして自己抗体産生やリンパ増殖性病態による唾液腺炎、唾液腺破壊のため、唾液腺分泌低下がおこると考えられている。自己免疫性唾液腺炎の病態には、細胞接着因子であるICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) /LFA-1 (leukocyte function associated antigen-1) が、免疫細胞が組織内へ遊出するために必要な免疫細胞と血管内皮の接着に重要な役割を担っていることが示されてきた。また、タイトジャンクション (TJ) 構成分子であるオクルーディンを欠損したマウスで唾液腺の異常が認められることが報告されている。このことから、少なくとも一部の自己免疫性唾液腺炎には、細胞接着分子による唾液腺の発生、維持機構の破綻が関与していることが示唆される。

細胞接着分子は、細胞と細胞あるいは細胞外基質との接着を担うことで、組織構築や生体の恒常性維持に重要な機能を有する。また、上皮細胞は免疫細胞との結合を介して、炎症性疾患の発症にも関与する。

私たちは細胞接着分子であるネクチンが上皮の形成や機能制御に関わる機構を、欠損マウスを用いた解析にて明らかにしてきた。唾液腺と同様に管腔組織構造をとる乳腺組織で、ネクチン-1が管腔上皮細胞と筋上皮細胞間で新しい細胞間接着装置を形成していることを見出した。これらの知見から、管腔組織構造をとる外分泌腺である唾液腺の形成および維持に関わる細胞間接着分子を解析し、唾液腺炎における細胞接着分子発現の異常の解明を目指す本研究計画の着想に至った。

2. 研究の目的

自己免疫疾患は難治性疾患の一つであり、自己免疫性唾液腺炎はドライマウスを引き起こす主たる原因である。発症の分子機構はいまだ不明な点が多く、疾患特異的な治療法は開発されていない。本研究では、組織・器

官の構造と機能を形成・維持し、シグナル伝達や感染の成立に関与する細胞接着分子に着目し、唾液腺の発生・維持におけるこれらの機能を分子レベルで明らかにし、唾液腺炎の発症機構を解明することを目的とする。病因解明、発症機序に基づく疾患特異的治療の開発は急務であると考ええる。

3. 研究の方法

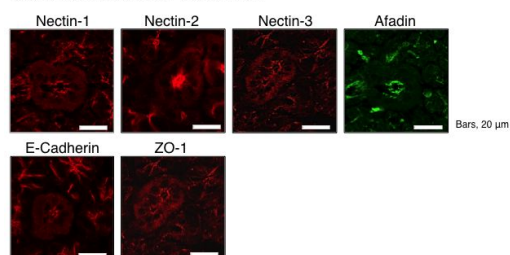
本研究では、唾液腺の発生・維持に果たす機能をネクチンとその関連分子に着目して解析する。基礎的研究として野生型マウス唾液腺の接着装置構成分子の同定を行う。また、ネクチン欠損マウスを用いて、唾液腺の発生・維持にネクチンがどのような機能を担っているのかを解析する。これらの結果をもとに唾液腺発生・維持におけるシグナル伝達を解明する。最終的には唾液腺炎発症モデルマウスにおける細胞接着タンパク質発現の組織学的評価を行い、ネクチン-1とFGF (fibroblast growth factor) 受容体を介したシグナル伝達に変化がないかを観察する。

4. 研究成果

(1) 野生型マウス顎下腺における細胞間接着タンパク質発現の組織学的評価

AJ構成分子であるネクチン-1、-2、-3、アフアディン、E-カドヘリンやTJ構成分子であるZO-1のシグナルは線条部導管の隣り合う上皮細胞の間の頭頂部細胞膜で観察された。これらの結果より、アドヘレンスジャンクション (AJ) はTJと同様にこの部位に存在することが考えられた。TJ構成分子であるZO-1やAJ構成分子であるネクチン-1、-2、-3、アフアディン、E-カドヘリンのシグナルが腺房部管腔側細胞膜で認められた。これらの結果より、これら細胞接着分子は他の細胞膜タンパク質と協同し、腺房部上皮細胞の細胞接着や唾液分泌の制御に関与することが示唆された。

Expression and Localization of Nectins, Afadin, E-Cadherin, and ZO-1 in the Epithelium of the Submandibular Glands

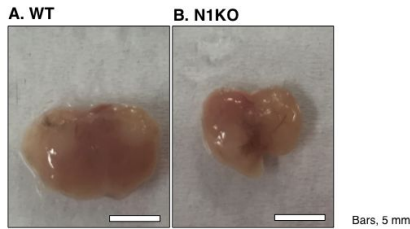


The signals for nectin-1, -2, -3, afadin, E-cadherin, and ZO-1 were observed at the apical portion of adjacent striated duct cells.

(2) ネクチン-1 欠損マウス顎下腺の解析

野生型マウスと比較するとネクチン-1 欠損マウスの顎下腺のサイズは小さかった。

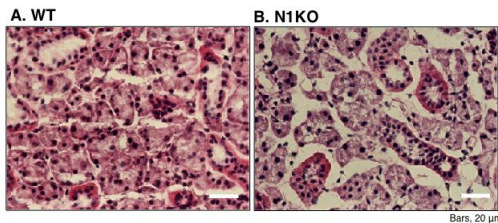
Reduced size of the Submandibular Glands in N1KO Mice



Representative images of the submandibular glands at 10-weeks old WT and N1KO female mice.

ヘマトキシリンエオジン染色を用いて顎下腺組織観察をおこなったところ、野生型マウスでは腺房が密に配列していたが、ネクチン-1 欠損マウスでは腺房間に間隙が認められた。また、細胞数の減少も認められた。

HE Staining of the Submandibular Glands

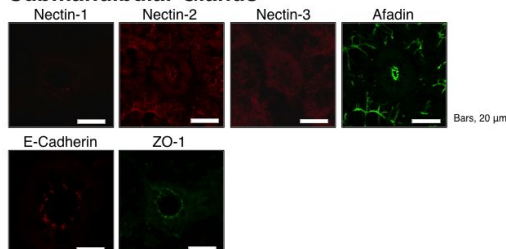


The submandibular gland atrophy was observed in N1KO mice.

(3) ネクチン-1 欠損マウス顎下腺における細胞間接着タンパク質発現の組織学的評価

ネクチン-1、-3、アファディンのシグナルは線条部導管では観察されなかった。ネクチン-2 のシグナルは線条部導管の上皮細胞にびまん性に観察された。E-カドヘリン、ZO-1 のシグナルは線条部導管の隣り合う上皮細胞の間の頭頂部細胞膜で観察された。

Expression and Localization of Nectins, Afadin, E-Cadherin, and ZO-1 in the N1KO Submandibular Glands

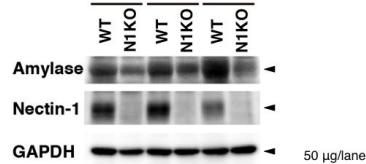


The signals for nectin-1 and -3 were not observed at the striated duct cells. The signals for nectin-2, afadin, E-cadherin, and ZO-1 were observed at the apical portion of the boundary between neighboring striated duct cells.

(4) 顎下腺の機能評価

唾液を構成するタンパク質であるアミラーゼの発現をウエスタンブロット法を用いて評価した。野生型マウスではアミラーゼの発現が強く認められたが、ネクチン-1 欠損マウスではアミラーゼの発現が減弱していた。

Expression of Amylase in Mouse Salivary Glands

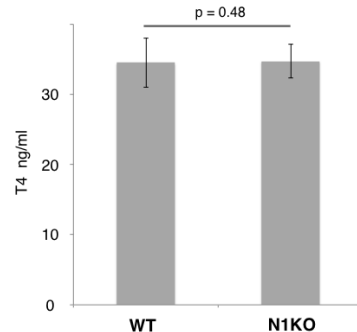


Amylase expression was decreased in the submandibular glands of N1KO mice.

(5) 甲状腺ホルモン (T4) の解析

唾液線の成長と分化に T4 が影響すると報告されているため、野生型マウスとネクチン-1 欠損マウスとに差異があるかを血清を用いて T4 濃度の解析をおこなった。野生型マウスとネクチン-1 欠損マウスでは血清における T4 濃度に差を認めなかった。

Serum Concentrations of T4



Serum levels of T4 was not altered in N1KO mice.

(5) これまでのまとめ

唾液線の発生・維持には FGF、TNF (tumor necrosis factor)、EGF (epidermal growth factor)、HGF (hepatocyte growth factor) などのシグナル分子の関与が報告されている。私達はこれまでに、ネクチンが PRLR と相互作用し、PRLR (prolactin receptor) シグナル伝達を促進することを見出し、同様に FGFR 1 にも相互作用することを見出している。

これらの結果を鑑みると、FGF は唾液腺の発生・維持に寄与することがすでに報告されており、FGFR のシグナル伝達経路の活性制御にネクチン-1 が関与する可能性が十分に考えられ、唾液腺発生時におけるネクチン-1 の分子機能を FGF 受容体を介したシグナル伝

達に注目して解析をおこなったが、欠損マウスの個体数が少なく、予定通りの解析を実施することが不可能であった。

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 1 件)

M. Kitayama, K. Mizutani, M. Maruoka, K. Mandai, S. Sakakibara, Y. Ueda, T. Komori, Y. Shimono, Y. Takai,
A Novel Nectin-mediated Cell Adhesion Apparatus That Is Implicated in Prolactin Receptor Signaling for Mammary Gland Development.
J. Biol. Chem. 291. 2016. 5817-5831.
10.1074/jbc.M115.685917

[学会発表](計 2 件)

(1) M. Kitayama, M. Maruoka, K. Mizutani, H. Suzuki, Y. Takai, T. Komori,
Funcional Analysis of Nectins in Mouse Submandibular Glands.
23rd International Congerence on Oral and Msxillofacial Surgery 2017. Hong Kong.
2017.3.31-2017.4.3

(2) 北山美登里、圓岡真宏、鈴木泰明、古森孝英
マウス顎下腺の漿液腺上皮における細胞接着分子ネクチンの発現と機能
第 61 回公益社団法人 日本口腔外科学会総会・学術大会 2016 幕張
2016.11.25-2016.11.27

[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]
なし

6. 研究組織

- (1)研究代表者
北山 美登里 (KITAYAMA, Midori)
神戸大学・医学研究科 医学研究員
研究者番号：20636427
- (2)研究分担者
なし
- (3)連携研究者
なし
- (4)研究協力者
なし