

機関番号：32667

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20592380

研究課題名（和文）モデルマウスにおける唾液腺非刺激分泌タンパク質の解明と口腔乾燥症への臨床応用

研究課題名（英文）Identification of characteristic salivary proteins from disease mouse and application on diagnosis of xerostomia

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

研究成果の概要（和文）：NOD（I型糖尿病発症）マウスをシェーグレン症候群モデル動物として用いて、免疫不全を原因とする糖尿病発症によって唾液中の発現量が変化するタンパク質を決定した。いくつかの候補から、キチナーゼに注目した。キチナーゼは耳下腺房細胞に存在し、唾液中に分泌されていた。NOD マウスにおいて、耳下腺のキチナーゼは糖尿病発病により増加し、唾液中でも増加することがわかった。

研究成果の概要（英文）：We determined the proteins showing characteristic expression in parotid glands from non-obese diabetic (NOD) mouse which shows autoimmune diabetes and is used as a model for Sjögren syndrome. Chitinase was selected by cDNA microarray analysis as a characteristic secretory protein. Chitinase was expressed in the parotid glands and secreted in saliva. After diabetes onset, the expression of chitinase was increased in the parotid glands and the concentration of chitinase in saliva was increased.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
20年度	1,500,000	450,000	1,950,000
21年度	1,600,000	480,000	2,080,000
22年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・病態検査学

キーワード：唾液腺，口腔乾燥症，唾液，NOD マウス

1. 研究開始当初の背景

唾液分泌量減少は、薬物副作用や情動不安など神経障害に因るものと、老化やシェーグレン症候群などの器質的な変化に因るものがある。器質変化によるものはその後の治療が重要であるため、早期診断が必要とされている。

しかし、口腔乾燥症患者唾液には量的質的にかかなりの不均一性があり、症状も多様であることから、変化する分泌タンパク質も多種

にわたると考えられる。それには、疾患モデル動物を用いた詳細な研究が必要である。I型糖尿病モデル動物として開発されたNOD(non-obese diabetic)マウスは、唾液分泌減少およびヒトシェーグレン症候群と同様の組織像を示すので、NODマウスをモデルとして用いて、唾液腺から恒常的に分泌されるタンパク質から、口腔乾燥症患者唾液におけるマーカータンパク質を検索することが必要と考えた。

2. 研究の目的

1) 雌糖尿病発症 NOD マウス (NOD/ShiJcl) と正常マウス (C57BL/6JJcl) 耳下腺に発現する分泌タンパク質の質的量的相違を明らかにし、マーカーとなり得るタンパク質の遺伝子を選択する。

2) 加齢による標的タンパク質発現と発病との関連を調べる。

3) 正常および NOD マウスの唾液腺細胞内における標的タンパク質の局在性を調べ、分泌機構を推定する。さらに、標的タンパク質の発現量が発症により変化することを明らかにする。

4) マウス全唾液中から標的タンパク質を検出し、病態と正常との相違を明らかにする。

3. 研究の方法

1) 糖尿病を発症した雌の NOD/ShiJcl マウスと同週令のコントロールマウスから耳下腺を採取し、cDNA マイクロアレイ法により発現に変化が認められた遺伝子を選択した。

2) 雌の NOD/ShiJcl マウスおよびコントロールとして C57BL/6JJcl マウスを購入し、血糖値を測定して、約 50 週令まで飼育した。8, 15, 25, 50 週令において耳下腺を採取し、腺房細胞から RNA を調製した。選択した遺伝子についてリアルタイム PCR により発現量を定量した。

3) 血糖値および週令を参考にして、糖尿病発症により変化したと考えられる遺伝子をピックアップした。

4) マウス耳下腺ホモジネートにおける選択した遺伝子のコードするタンパク質 (標的タンパク質) の発現を調べる。

5) 免疫組織染色により、標的タンパク質の発現の相違および局在性を調べる。

6) マウス全唾液中から標的タンパク質を検出し、コントロール、発病および非発病間の相違を調べた。

4. 研究成果

1) 糖尿病発症 NOD マウスとコントロールマウスとの間で cDNA アレイによる遺伝子発現の違いを調べた。糖尿病 NOD で高度に発現している遺伝子として、Ifi27, B2m など免疫関連タンパク質、K1f2 などアポトーシス関連タンパク質がピックアップされた。これ以外では、糖

尿病マウス耳下腺において Chia および Cst10 の発現亢進が観察された。これらの遺伝子について、リアルタイム PCR にて発現を確認した。

唾液中に分泌されると予想されると予想されるタンパク質をコードする遺伝子として、Chia (chitinase) および Cst10 (cystatin10) を選び、ホモジネートの Western blotting および免疫染色によりタンパク質の発現を検討した。いずれの方法でも、糖尿病 NOD および発病予想 NOD で chitinase が高発現することがわかった。Cystatin10 は NOD マウスで高発現していたが、糖尿病と非糖尿病の差は確認されなかった。

唾液中におけるこれらのタンパク質の検出を試みた。糖尿病 NOD からは唾液採取が不可能であったので、体重測定により発病が予想される NOD マウスと健康な NOD マウスから唾液を採取して比較した。Western blotting により、chitinase および cystatin10 は非糖尿病 NOD およびコントロールマウス (C57BL/6) から得られた唾液中にいずれも含まれており、NOD の方がコントロールよりも多かった。発病が予想される NOD と健康な NOD からの唾液の比較では、cystatin10 にはほとんど差がみられなかったが、chitinase は発病が予想される NOD の方に多く含まれていた。

以上から、口腔乾燥症を誘導する糖尿病 NOD マウスの耳下腺において chitinase の発現が増加すること、唾液中においても含量の増加が見られることがわかった。しかし、ヒトにおいては chitinase は発現しておらず、これに代わる遺伝子あるいはタンパク質が存在していると考えられ、さらなる研究が必要である。Cystatin10 の発現については、発病・非発病 NOD マウス間では差がなかったものの、NOD マウスと C57BL/6JJcl との差が大きかった。これがストレイン特有なものか、あるいは発病と関連のあるものなのか、さらなる研究が必要である。

2) Aquaporin8 のタンパク質発現の変化を調べた。Aquaporin8 は耳下腺腺房細胞を取り巻く筋上皮細胞に存在していた。糖尿病発症 NOD マウスでは筋上皮細胞が衰退していること、それに伴い aquaporin8 が減少することがわかった。筋上皮細胞の耳下腺における役割は未だ確定されていない。また、aquaporin8 の役割も明らかとなっていない。筋上皮細胞の衰退は糖尿病発症 NOD マウスにおける唾液分泌機能低下の一因であると考えられるが、さらなる研究が必要である。

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 8 件)

1. Nashida T, Sato R, Imai A, Shimomura H. Gene expression profiles of the three major salivary glands in rats ☆ Biomedical Research 2010; 31: 387-399
2. Nashida T, Yoshie S, Imai A, Shimomura H. Transferrin secretory pathways in rat parotid acinar cells ☆ Arch Biochem Biophys 2009; 487: 131-138.
3. Imai A, Yoshie S, Nashida T, Fukuda M, Shimomura H. Redistribution of small GTP-binding protein, Rab27B, in rat parotid acinar cells after stimulation with isoproterenol ☆ Eur J Oral Sci 2009; 117: 224-230.
4. Imai A, Fukuda M, Yoshie S, Nashida T, Shimomura H. Redistribution of Rab27-specific effector Slac2-c, but not Slp4-a, after isoproterenol-stimulation in rat parotid acinar cells ☆ Arch Oral Biol 2009; 54: 361-368.
5. Paco S, Margel MA, Olkkonen VM, Imai A, Blasi J, Fischer-Colbrie R, Aguado F. Regulation of exocytotic protein expression and Ca²⁺-dependent peptide secretion in astrocytes ☆ J Neurochem 2009; 110: 143-156.
6. Sadik G, Rashid Md H, Nashida T, Ishii K, Sato Y, Shiraishi T, Uda Y. Chemical and immunological characterization of the two α -N-acetylgalactosaminidases from squid liver ☆ Biol Pharm Bull 2009; 32: 1469-1472.
7. Nashida T, Imai A, Yoshie S, Shimomura H, Yokosuka H, Kumakura M. Unstimulated amylase secretion is proteoglycan-dependent in rat parotid acinar cells ☆ Arch Biochem Biophys. 2008; 469: 165-173.
8. Hiroto T, Yoshihara A, Ogawa H, Ito K, Igarashi A, Miyazaki H. Salivary spinability and periodontal disease progression in an elderly population ☆ Arch Oral Biol. 2008; 53:1071-6.

[学会発表] (計 20 件)

1. Fukushima T, Nashida T, Mataga I: Gene expression of parotid glands in non-obese diabetic mouse. 88th General Session and Exhibition of the IADR, 2010年7月14日 バルセロナ (スペイン)
2. Shimomura H, Imai A, Nashida T: Evidence of amylase release by CDK5 in rat parotid 88th General Session and Exhibition of the IADR, 2010年7月15日 Bバルセロナ (スペイン)
3. Imai A, Fukuda M, Yoshie S, Haga M, Ishibashi K, Nashida T, Shimomura H: EPI64 functions as a Rab27-GTPase-activating protein in parotid acinar cells. 88th General Session and Exhibition of the IADR, 2010年7月15日 バルセロナ (スペイン)
4. Sato R, Nashida T, Imai A, Shimomura H: Gene expression of the three major salivary glands. 88th General Session and Exhibition of the IADR, 2010年7月16日 バルセロナ (スペイン)
5. 梨田智子, 吉江紀夫, 今井あかね, 羽下麻衣子, 下村浩巳: NOD マウス耳下腺におけるアクアポリンファミリーの発現. 第52回歯科基礎医学会学術大会, 2010年9月22日 タワーホール船堀 (千葉県)
6. 今井あかね, 吉江紀夫, 羽下麻衣子, 梨田智子, 下村浩巳: 耳下腺腺房細胞における Rab-GTPase 活性化タンパク質 (EPI64) の働き. 第52回歯科基礎医学会学術大会, 2010年9月22日 タワーホール船堀 (千葉県)
7. 佐藤律子, 梨田智子, 今井あかね, 下村浩巳: Gene expression profiles of the three major salivary glands in rats. 第52回歯科基礎医学会学術大会, 2010年9月22日 タワーホール船堀 (千葉県)
8. 福島琢士, 梨田智子, 又賀 泉: Gene expression of parotid glands in non-obese diabetic mouse. 第52回歯科基礎医学会学術大会, 2010年9月22日 タワーホール船堀 (千葉県)
9. 今井あかね, 吉江紀夫, 石橋弘太郎, 福田光則, 羽下麻衣子, 梨田智子, 下村浩巳: イソプロテレノール刺激時の耳下腺腺房細胞における EPI64 の Rab27-GTPase-activating protein (Rab27-GAP) としての働きと発現について. 第55回日本唾液腺学会 2010年

12月4日 文京学院大学 (東京都)

10. 今井あかね, 梨田智子, 下村浩巳: ラット耳下腺腺房細胞の Exocyst メンバーの検索と開口分泌に対する関与. 第83回日本生化学会合同大会 (BMB2010), 2010年12月7日 神戸ポートアイランド (兵庫県)

11. 梨田智子, 羽下麻衣子, 吉江紀夫, 今井あかね, 下村浩巳: NODマウス耳下腺におけるアクアポリン8の発現減少. 第83回日本生化学会合同大会 (BMB2010), 2010年12月10日 神戸ポートアイランド (兵庫県)

12. 梨田智子, 吉江紀夫, 今井あかね, 下村浩巳: ラット耳下腺トランスフェリンのトランスサイトーシスにおける細胞骨格の役割. 第51回歯科基礎医学会学術大会, 2009年9月11日 朱鷺メッセ (新潟県)

13. 今井あかね, 梨田智子, 下村浩巳: イソプロテレノール刺激による耳下腺腺房細胞の Sec6 と Sec8 の相互作用について. 第51回歯科基礎医学会学術大会, 2009年9月11日 朱鷺メッセ (新潟県)

14. 今井あかね, 梨田智子, 下村浩巳: ラット耳下腺腺房細胞における Exocyst メンバーの検索と相互作用について. 第50回歯科基礎医学会年会, 2008年9月25日 TOC有明コンベンションホール (東京都)

15. 梨田智子, 今井あかね, 下村浩巳, 吉江紀夫: ラット耳下腺からのトランスフェリン非刺激分泌経路の解明. 第50回歯科基礎医学会年会 2008年9月25日 TOC有明コンベンションホール (東京都)

16. 佐藤律子, 梨田智子, 今井あかね: 唾液腺における転写因子 Mist1 mRNA の発現. 第50回歯科基礎医学会年会, 2008年9月25日 TOC有明コンベンションホール (東京)

17. NASHIDA, T., YOSHIE, S., IMAI, A., SHIMOMURA, H., YOKOSUKA, H.: Secretion of transferrin from rat parotid acinar cells. 86' th General Session of IADR, 2008年7月4日 トロント (カナダ)

18. IMAI, A., YOSHIE, S., FUKUDA, M., YOKOSUKA, H., NASHIDA, T., SHIMOMURA, H.: Isoproterenol-dependent redistribution of Rab27, Slac2-c and Slp4-a in parotid glands. 86' th General Session of IADR, 2008年7月4日 トロント (カナダ)

19. 今井あかね, 吉江紀夫, 福田光則, 梨田

智子, 下村浩巳: β 刺激後の耳下腺腺房における Rab27B、Slac2-c および Slp4-a の細胞内局在について. 第81回生化学会大会, 2008年12月10日 神戸ポートアイランド (兵庫県)

20. NASHIDA, T., IMAI, A., SHIMOMURA, H., YOSHIE, S.: Secretory pathway of transferrin in rat parotid acinar cells. 第81回生化学会大会, 2008年12月13日 神戸ポートアイランド (兵庫県)

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

今井 あかね (IMAI AKANE)
日本歯科大学・新潟生命歯学部・准教授
研究者番号: 60180080

下村 浩巳 (SHIMOMURA HIROMI)
日本歯科大学・新潟生命歯学部・教授
研究者番号: 40139259

吉江 紀夫 (YOSHIE SUMIO)
日本歯科大学・新潟生命歯学部・教授
研究者番号: 30095278

(3) 連携研究者

五十嵐 敦子 (IGARASHI ATSUKO)
新潟大学大学院・医歯学総合研究科・准教授
研究者番号: 90168097

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