

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：33703

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462803

研究課題名(和文)小胞輸送制御因子「インターセクチン」による唾液腺での抗菌因子産生制御機構の解析

研究課題名(英文) Study on the regulatory mechanisms of production of antimicrobial factors in salivary glands by the vesicular transport protein intersectin

研究代表者

引頭 毅 (Into, Takeshi)

朝日大学・歯学部・准教授

研究者番号：10360918

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)：インターセクチン(ITSN)は小胞形成と輸送を制御する細胞質タンパク質であると考えられている。研究代表者は自然免疫応答を担うシグナル伝達分子MyD88の遺伝子欠損マウスの唾液腺においてITSNの発現が増加することを見出したが、その役割は不明である。本研究では、唾液腺における抗菌因子の産生におけるITSNの役割の解明を目指した。ITSN遺伝子欠損マウスを用いて研究推進する予定であったが、表現型上の問題から思うようにマウス数が確保できず、進展しなかった。そこで本来の課題とは異なるが、MyD88遺伝子欠損マウスの唾液腺におけるMyD88の役割を探索し、重要な成果を得たのでここに報告する。

研究成果の概要(英文)：Intersectin (ITSN) is known as a cytoplasm protein that controls vesicular formation and transportation. The representative of this project previously found that the expression level of ITSN is upregulated in the salivary gland of mice deficient in the gene encoding the innate immune signaling molecule MyD88, but the role of ITSN in the salivary gland is unknown. In this project, I aimed at the elucidation of the role of ITSN in the production of the antibacterial factors in the salivary gland. This project had been planned to investigate using ITSN-deficient mice, but did not progressed because it was very hard to get hold of the expected number of ITSN-deficient mice because of the problems in the phenotype of ITSN deficiency. Therefore, the aim of the project was modified to investigate the role of MyD88 in the salivary gland using MyD88-deficient mice, and I here report important results obtained during the research period.

研究分野：口腔免疫学・微生物学

キーワード：インターセクチン 唾液腺 抗菌因子 MyD88 自然免疫

1. 研究開始当初の背景

インターセクチン (Intersectin) はヒトやマウスを含む哺乳類など、様々な動物種で保存される細胞質タンパク質である。哺乳類では2つの遺伝子にコードされるアイソフォーム、インターセクチン1 (ITSN1) とインターセクチン2 (ITSN2) が存在する。インターセクチンはクラスリンで覆われた小胞やカベオリンで覆われた小胞と共局在し、また多様なエンドサイトーシス関連タンパク質と結合するため、エンドサイトーシスの制御因子であると考えられている。実際 ITSN1 の発現を RNAi でノックダウンすると、カベオラ数が減少したり、トランスフェリンのインターナリゼーションが抑制されることも知られている。一方、インターセクチンは Cdc42 の活性化によってエキソサイトーシスを誘導するという知見等もあり、エンドサイトーシスのみの制御というよりは、むしろ小胞形成と小胞輸送の制御を行うスカフォールドとして機能する可能性もある。しかし、インターセクチン研究に携わっている研究グループは極限られており、知見の進展はみられていないのが現状である。

インターセクチンの機能と役割を解明するためには、ノックアウトマウスを利用するのが最も効果的と思われる。*Itsn1* ノックアウトマウスは2008年の時点でオーストラリアの研究グループによって作成されたが、予想されていたような表現型は確認されていない¹⁾。その原因として ITSN1 のアイソフォーム ITSN2 の存在により、ITSN1 欠損が補償された可能性が考えられているものの、その後は追及されていない状況にある。

唾液の「免疫作用」は唾液腺で産生される抗菌因子や IgA に依存しているが、その産生機構や産生制御機構、分泌制御機構に関する理解はあまり進んでいない。研究代表者らは最近、自然免疫応答を誘導する重要なシグナル伝達分子である MyD88 の遺伝子を欠如させたノックアウトマウスの唾液腺において *Itsn1* の発現が増加していることを見出した (未発表データ)。また DNA マイクロアレイのデータ解析から、SLPI などのいくつかの抗菌因子をコードする遺伝子発現にも変化が認められることが分かった。これに加え、上記のインターセクチンの小胞制御に関連するエビデンスから、唾液腺での抗菌因子の産生制御や分泌制御にインターセクチンが関与している可能性が非常に高いと考えている。このように、研究代表者は独自の研究経緯から ITSN に着目し、*Itsn1* ノックアウトマウスを作成した上記研究グループからマウスの分与を受けており、さらに独自に *Itsn2* ノックア

ウトマウスを作成し、その維持も行っている。さらに、*Itsn1*・*Itsn2* ダブルノックアウトマウスの作成も行っている。これらのマウスを活用しながら、唾液腺の口腔免疫作用において、インターセクチンがどのように機能し、どのような役割を担うのか詳細に解析していきたいと考えている。

<引用文献>

1) Yu, Y. et al., Hum Mol Genet (2008) 17: 3281-3290.

2. 研究の目的

本研究課題の目的は、唾液腺における抗菌因子産生機構においてインターセクチンがどのような役割を果たしているのか、その制御機構を解析することである。本研究では特に、*Itsn1* ならびに *Itsn2* ノックアウトマウスを活用し、インターセクチンの唾液腺での抗菌因子や IgA の産生・分泌制御に関わる未知の機能・役割をマウスの表現型の解析を介して解明する。抗菌因子と IgA の産生に関わるマウス表現型の遺伝子発現による *in silico* 解析、抗菌因子と IgA の分泌に関わるマウス表現型の解析と *in situ* 解析を行っていく予定とする。

3. 研究の方法

本研究計画では、マウスから得られる唾液、唾液腺組織、種々の細胞を用い、細分化された課題 (下記) に沿って実験計画を進める予定とする。マウスは豪 Monash 大学の Pritchard 教授らの研究室で開発され、応募者の研究室に分与された 129/Sv をバックグラウンドとした *Itsn1* 欠損マウス (*Itsn1* KO マウス) ならびに応募者の研究室で作成された C57BL/6 をバックグラウンドとした *Itsn2* 欠損マウス (*Itsn2* KO マウス) を用いる。また、*Itsn1* KO マウスの C57BL/6 系統へのコンジェニック化とそのマウスと *Itsn2* KO マウスを交配して得られるダブル欠損マウスの樹立を進める予定であり、本研究計画において使用する予定とする。いずれのマウスも比較対象は野生型 C57BL/6J マウスとする。

唾液腺は基本的に耳下腺、顎下腺ならびに舌下腺の三大唾液腺について解析を行うが、顎下腺の IgA 産生には所属リンパ節の機能が密接に関わることから、顎下腺リンパ節も調査対象とする。また、マウスの唾液腺の組織構造は性差が大きく、また雌の唾液腺ではリンパ球浸潤が促進することがあるため、一定齢のマウスのみでの解析ではなく、様々な月齢の雌雄のマウスでの解析を行う予定とする。

1) 唾液の産生レベルと唾液タンパク質産生の解析 (*in vivo*, *ex vivo*)

ピロカルピン塩酸塩を腹腔投与した各マウスから分泌唾液を採取し、唾液分泌量の時間経過を計測する。また唾液中の IgA は ELISA で定量的に検出し、野生型マウスとの差異を解析する。さらに各マウスから採取した唾液中タンパク質を SDS-PAGE で展開して銀染色を行い、野生型マウスとの差異を検討する。差異の大きいタンパク質が存在する場合には質量分析によりターゲットの特定を試みることにする。また、種々の抗菌因子をウェスタンブロット法により検出し、野生型マウスとの発現の差異を検討する。

2) 唾液腺の抗菌因子遺伝子発現の解析 (*in situ*, *in silico*)

各マウスから採取した唾液腺組織 (顎下腺) をホモジナイザーで破碎し、Trizol を用いて RNA を抽出した後、DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析 (受託) を行い、野生型マウスとの遺伝子発現の差異を比較解析する。発現の差異が大きい遺伝子については、別途リアルタイム RT-PCR によって再現性を確認する。また、抗菌因子遺伝子の発現については耳下腺、顎下腺ならびに舌下腺から抽出した RNA を用いてリアルタイム RT-PCR での解析を行うことにする。

3) 唾液腺での抗菌因子タンパク質発現の解析 (*in vivo*, *ex vivo*, *in situ*)

遺伝子発現の解析結果を最大限に活用し、エビデンスに基づきながら、各マウスから採取した唾液腺組織からサンプル調整し、抗菌因子のタンパク質の発現解析を行う。発現解析は主に、採取した唾液腺の急速凍結試料から組織切片を作成した後、蛍光標識抗体による免疫組織学的方法により行う。これにより、どのような種類の抗菌因子が主にどの部位でインターセクチンの影響を受けているのかを明らかにする。また、破碎した唾液腺組織をコラゲナーゼ処理ならびに DNase I 処理し、単一細胞浮遊液にした状態で、フローサイトメトリーによるタンパク質の発現解析も行う。これにより、発現に影響が出ている細胞種のポピュレーションを特定する。

4) 唾液腺での IgA 発現機構の解析 (*in vivo*, *ex vivo*, *in situ*)

IgA は形質細胞により産生された後、腺房細胞のトランスサイトーシスにより細胞内を運搬されると考えられるため、小胞輸送の制御因子であるインターセクチンの影響を大きく受ける可能性がある。ここでは

唾液腺における IgA 産生に特化した解析を行う。解析は主に、採取した唾液腺 (顎下腺) の組織切片を作成し、蛍光標識抗体による免疫組織学的方法により行う。これにより、IgA がどの部位でインターセクチンの影響を受けているのかを明らかにする。また、破碎した唾液腺組織得られた単一細胞浮遊液から、フローサイトメトリーによる IgA の動向についての解析も行っていく予定とする。

4. 研究成果

(1) 小胞輸送制御因子「インターセクチン」による唾液腺での抗菌因子産生制御機構の解析に関する研究成果

本研究ではインターセクチンの口腔自然免疫系での役割の解明を目的とし、ノックアウトマウスを使用し、採取した組織や検体の解析を行うことで目的を達成する努力を行ってきた。当初 129 系統の *Itsn1* ノックアウトマウスを主体として研究を進行させる予定であったが、*Itsn1* ミュータントマウスのうち、ヘテロ接合体の確保は全く問題ないが、ホモ接合体はメスが全く確保できない、あるいは得られたオスが生後 3 ~ 4 週以内に死亡するといったケースが相次ぎ、研究が進行しない状況が続いた。そこで状況打開の可能性を求め、129 系統のヘテロ接合体を C57/BL6 と交配してコンジェニック化を進めた。コンジェニック化の途中で試しにホモ接合体同士を交配したところ、問題なくホモ接合体が得られる傾向がみられたため、この計画を続行してきたが、最終的にコンジェニック化成功後、*Itsn1* ミュータントのホモ接合体を得ようとしたところ、129 系統でみられた現象と同様の出生傾向が現れ、結果として *Itsn1* KO マウスがまともに得られてないという状況に陥ってしまい、研究に進展が得られなかった。

一方、このような状況に陥ることは平成 27 年度の時点である程度予測できていたため、本来の課題を変更しながら、可能な限り内容の近い研究を進行させる工夫を行ってきた。特に、インターセクチンと同様に、口腔自然免疫系で重要な役割を果たすと思われる、MyD88 の役割について、その役割や発現、機能に関する分子機構の解明を目指すことにした。2 つの成果が得られたので以下にそれらについて記述する。

(2) 自然免疫系のシグナル伝達分子 MyD88 による唾液腺での抗菌因子産生制御機構の解析
研究代表者は上記 *Itsn1* の発現が *Myd88* 遺

伝子欠損マウスの唾液腺で上昇していることを見出していた。MyD88 は Toll 様受容体 (TLR) などの下流で細胞内シグナル伝達を始動するアダプター分子であり、主に自然免疫応答において重要な役割を果たしている。腸管では TLR が腸内細菌を認識して発動される MyD88 を介したシグナルは、IgA 産生や Reg3γ などの抗菌性タンパク質の発現において重要であり、腸管粘膜の恒常的免疫応答に大きく寄与している。一方、口腔には腸管とは異なる細菌叢が存在しており、TLR と MyD88 を介したシグナルは口腔の自然免疫、特に唾液腺における IgA 産生や抗菌性タンパク質の発現においても何らかの役割をもつことが予測されるものの、これまで報告はなされていない。そこで本研究では Myd88 遺伝子欠損マウスを利用し、唾液中の抗体クラスの産生レベルと唾液腺における抗菌性タンパク質の発現を調査した。

MyD88 KO マウスではコントロールの野生型 (WT) マウスと比較して唾液中の IgA のベースレベルが若干上昇していたが、IgM、IgG1、IgG3 は減少していた。その他の抗体クラスは検出されなかった。マウス下顎腺から調整した細胞のフローサイトメトリーでは、CD138+IgA+形質細胞数は、MyD88 KO マウスでは WT マウスと比較して若干増加していた。血清中の IgM、IgG1 ならびに IgG3 のレベルは MyD88 KO マウスでは WT マウスと比較して減少していたことから、これらの抗体クラスの唾液中レベルに反映している可能性が考えられる。またマウス下顎腺から抽出した全 RNA のマイクロアレイ解析では、MyD88 KO マウスにおいて、α ディフェンシン、β ディフェンシン、S100a8 などの特定の抗菌性タンパク質の遺伝子発現が減少していた。以上の結果より、MyD88 を介したシグナルは唾液腺における IgA 産生には直接的に関与していないようであるが、いくつかの種類の抗菌性タンパク質の発現には寄与していることが分かった。従って、MyD88 の役割は口腔と腸管ではかなり異なっていることが示唆された。

<文献>

[Into T.](#), Takigawa T., Niida S., and Shibata K.

MyD88 deficiency alters expression of antimicrobial factors in mouse salivary glands.

PLoS One, 9(11): e113333 (2014)

(3)MyD88 の発現制御機構におけるオートファジーの役割の解明

MyD88 は Toll 様受容体や TACI の下流で

細胞内シグナル伝達を始動するアダプター分子であり、自然免疫やB細胞の機能調節などにおいて重要な役割を果たしている。ヒト MyD88 の L265P 変異は MyD88 の自己活性化を引き起こし、シグナル伝達を惹起してびまん性大細胞型B細胞リンパ腫の原因となることが知られている。また MyD88 は細胞に過剰発現させると多量体化して自己活性化する。これらのエビデンスより、定常状態で MyD88 を抑制する機構の存在が想定されるが、未だ明らかにはされていない。本研究では定常状態における MyD88 の発現制御機構としてオートファジーの役割について検討を行った。

研究成果として、細胞内シグナル伝達を担う MyD88 は「基礎的オートファジー」とよばれるリソソームにおける分解経路により恒常的に分解を受けていることが見出された。この経路を人工的に遮断すると、MyD88 は細胞内に蓄積し、自己活性化を起こして炎症性シグナルを発生させてしまうことが分かった。リソソームの機能不全は様々な状況下で起こりうるのが近年明らかになっており、種々の炎症性疾患を考える上で重要な知見であると考えられる。

マウスから分離、培養したマクロファージにおいて、液胞型プロトンポンプ阻害剤やシステインプロテアーゼ阻害剤でリソソームの機能を抑制したところ、緩徐ながら TNF などの炎症性サイトカインが誘発されたが、MyD88 を欠損した細胞ではそのような応答性が認められなかった。リソソームの機能を阻害すると MyD88 の細胞内蓄積が起きていたことから、MyD88 発現の過剰化が応答の原因であると考えられた。人工的に一量体化と二量体化を制御可能な MyD88 のフュージョンタンパク質を用いて解析したところ、一量体の MyD88 は分解されやすく、二量体化すると分解されにくくなることが分かった。一量体の状態で免疫沈降を行ったところ、TRAF6 や Beclin1 と会合していることが分かった。TRAF6 を欠損した細胞やノックダウンした細胞では、MyD88 の分解が促進され発現が低下していたことから、TRAF6 は MyD88 を二量体化させ安定化させる役割を担っていると考えられた。以上より、一量体の MyD88 は基礎的オートファジーによって分解されることで発現レベルが調節されており、これにより MyD88 の自己活性化が防止されていることが示唆された。リソソーム異常における炎症の誘発はこのような機能の破綻と関連している可能性があると考えられる。

<文献>

[Into T.](#), Horie T., Inomata M., Gohda J.,

Inoue J., Murakami Y., and Niida, S.
Basal autophagy reverts autoactivation or enhancement of inflammatory signals by targeting monomeric MyD88.
Scientific Reports, 7(1): 1009 (2017)

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2件)

Into T., Takigawa T., Niida S., and Shibata K.
MyD88 deficiency alters expression of antimicrobial factors in mouse salivary glands.
PLoS One, 9(11): e113333 (2014)

Into T., Horie T., Inomata M., Gohda J., Inoue J., Murakami Y., and Niida, S.
Basal autophagy prevents autoactivation or enhancement of inflammatory signals by targeting monomeric MyD88.
Scientific Reports, 7(1): 1009 (2017)

[学会発表](計5件)

引頭 毅、猪俣 恵、稲葉 裕明、村上幸孝 .
唾液腺における抗体ならびに抗菌性タンパク質産生におけるシグナル伝達分子 MyD88 の役割の検討 .
第 56 回歯科基礎医学会学術大会 (福岡)
2014.9.26

Into T., and Shibata K.
MyD88 deficiency alters expression of antimicrobial factors in mouse salivary glands.
The 43rd Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology (Kyoto)
2014.12.12

引頭 毅、猪俣 恵、稲葉裕明、村上幸孝、柴田健一郎 .
マウス唾液腺における抗菌性因子産生におけるシグナル伝達分子 MyD88 の役割の検討 .
第 88 回日本細菌学会総会 (岐阜)
2015.3.28

引頭 毅、堀江 俊、猪俣 恵、村上幸孝 .
TRAF6 によって制御される基礎的オー

トファジーは MyD88 の細胞内蓄積により誘導される炎症性シグナルの自己活性化を抑制している .
第 58 回歯科基礎医学会学術大会 (札幌)
2016.8.26

Into T.
TRAF6-regulated basal autophagy prevents MyD88 accumulation and autoactivation of proinflammatory signaling.
The 45th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology (Ginowan)
2016.12.7

[図書](計0件)

[産業財産権]
出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

[その他]

データベース登録
Gene Expression Omnibus (National Center for Biotechnology Information)
Accession number, GSE61339
Into T., Takigawa T., Niida S., Shibata K.
Gene expression profile of the Myd88 gene depletion on mouse salivary glands.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE61339>

6. 研究組織

(1)研究代表者

引頭 毅 (Into, Takeshi)
朝日大学・歯学部・准教授
研究者番号：10360918

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし