

氏名	三宅 康太
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与番号	博甲第7430号
学位授与の日付	令和8年3月25日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科機能再生・再建科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	<i>Tmem135</i> の過剰発現が唾液分泌に与える影響の検討
論文審査委員	吉田 竜介 教授      丸山 貴之 准教授      中野 敬介 准教授

## 学位論文内容の要旨

### 【緒言】

唾液は消化酵素、ムチン、抗菌成分などの生理活性物質を含む重要な分泌液であり、口腔内の潤滑、抗菌、緩衝、保護、抗脱灰、洗浄など多くの役割を担っている。唾液腺からの唾液分泌は交感神経と副交感神経の二重支配により制御されており、特に副交感神経を介した刺激がムスカリン性アセチルコリン受容体を活性化させ、イノシトール3リン酸 (IP3) を介した小胞体からのカルシウムイオン (Ca<sup>2+</sup>) の放出をもたらす、唾液分泌を促進する。しかし、受容体活性化から実際の唾液分泌までの細胞内メカニズムは未解明な点が多い。

*Tmem135* (Transmembrane protein 135) はミトコンドリアやペルオキシソームに局在する膜貫通型タンパク質で、細胞小器官の調節因子として注目されている。*Tmem135*の変異や過剰発現により網膜、脂肪組織、心臓、骨組織、聴覚器など多くの組織でミトコンドリアダイナミクスの変化と疾患の発症が関連することが報告されているが、唾液腺などの分泌組織における*Tmem135*の役割はほとんど検討されていない。本研究では、*Tmem135*を過剰発現させたトランスジェニック (*Tmem135*Tg) マウスモデルを用いて*Tmem135*が唾液腺機能に及ぼす影響を包括的に検討することを目的とした。

### 【方法】

ワイルドタイプ (Wt) C57BL/6Jマウスを対照群とし、*Tmem135*Tgマウスと比較した。3か月齢前後の雄マウスを使用した。唾液分泌量はペントバルビタール麻酔後、塩酸ピロカルピン投与により刺激唾液を採取し、体重で標準化して測定した。唾液中のタンパク質はBradford法で測定した。顎下腺をH-E染色し、導管面積比をImage J (NIH) で定量化した。RNAシーケンスを実施し、差次的発現遺伝子 (DEG) を抽出し、Gene Ontology (GO) エンリッチメント解析を行った。小胞体構造の変化はCalreticulin免疫組織化学により観察した。

### 【結果】

*Tmem135*Tgマウスは、Wtマウスと比較して塩酸ピロカルピン投与後30分間の唾液総量が有意に増加した (Wt: 21.5±2.4 mg/g, *Tmem135*Tg: 26.2±2.3 mg/g)。初期15分間の唾液中タンパク質濃度は有意に減少した (Wt: 682.4±123.5 μg/ml, *Tmem135*Tg: 523.5±136.2 μg/ml) が、16~30分間では有意な差はなかった。組織学的観察では、*Tmem135*Tgマウスの導管面積比が有意に低かった (Wt: 56.5±2.9%, *Tmem135*Tg: 50.8±4.5%)。 *Tmem135*Tgマウスの顎下腺は、RNAシーケンス解析では97個の有意なDEGが同定され、46個が上方制御、51個が下方制御されていた。GOエンリッチメント解析により、小胞体ストレス応答関連遺伝子が有意に上方制御されていた。これらの遺伝子は*Hspa5*、*Pdia6*、*Pdia4*、*Sdf211*、*Hyoul1*であった。免疫組織化学により、*Tmem135*Tgマウスで小胞体の大きさに有意な差は認められなかったが、数が有意に多かった。

### 【考察】

塩酸ピロカルピン投与により、*Tmem135*Tgマウスでは唾液分泌量が増加し、タンパク質濃度が低下したことから、副交感神経刺激に対する唾液分泌応答が強化され、水成分の分泌が相対的に増加してタンパク質濃度が希釈された可能性が考えられた。また、小胞体ストレス応答関連遺伝子が上方制御されていることから、小胞体ストレス応答がこの過程に重要な役割を果たしていることが考えられた。小胞体ストレス

応答により活性酸素種（ROS）の生成を誘導し、ROSはIP<sub>3</sub>受容体1を活性化し小胞体から細胞質へのカルシウムイオン漏出を引き起こすと報告されている。これにより細胞内カルシウムイオン濃度が上昇し、唾液分泌が促進されたのではないかと考えられた。しかし今回の研究では、ROSや細胞内カルシウムイオン動態の評価をしておらず、今後の実証が必要である。

#### 【結語】

本研究により、*Tmem135* の過剰発現によって、唾液分泌量の増加、唾液中のタンパク質濃度の減少、顎下腺導管面積比の低下、小胞体ストレス応答関連遺伝子の発現増加が認められた。これらの結果から、*Tmem135* の過剰発現が小胞体ストレス応答を介して唾液分泌に影響を及ぼしている可能性が示唆された。ただし、詳細なメカニズムについては今後の研究課題である。

## 論文審査結果の要旨

【緒言】唾液は口腔内環境の維持に不可欠な分泌液である。唾液分泌は副交感神経刺激によるムスカリン性アセチルコリン受容体の活性化で制御されるが、受容体シグナリングから実際の分泌までの細胞内メカニズムは未解明な点が多い。Transmembrane protein 135 (*Tmem135*) はミトコンドリアに局在する膜貫通型タンパク質で、多くの組織でミトコンドリアダイナミクスの異常と関連することが報告されているが、唾液腺における役割は未検討である。本研究は、*Tmem135*過剰発現したトランスジェニック(*Tmem135-Tg*)マウスを用いて唾液腺機能に及ぼす影響を検討することを目的とした。

【方法】ワイルドタイプマウスを対照群とし、*Tmem135-Tg*マウスと比較した。塩酸ピロカルピン投与による唾液分泌量、唾液中タンパク質濃度を測定した。顎下腺のH-E染色で導管面積を定量化し、RNAシーケンス解析で差次的発現遺伝子を抽出してGene Ontologyエンリッチメント解析を行った。Calreticulin免疫組織化学で小胞体構造の変化を観察した。

【結果】*Tmem135-Tg*マウスの唾液総量は有意に増加し(*Tmem135-Tg*群  $740.9 \pm 50.6$  mg、対照群  $569.7 \pm 64.3$  mg)、初期15分間のタンパク質濃度は低下していた(*Tmem135-Tg*群  $523.5 \pm 136.2$   $\mu$ g/ml、対照群  $682.4 \pm 123.5$   $\mu$ g/ml)。導管面積は縮小し(*Tmem135-Tg*群  $50.8 \pm 4.5\%$ 、 $56.5 \pm 2.9\%$ )、RNAシーケンス解析では97個の有意な差次的発現遺伝子が同定され、小胞体ストレス応答関連遺伝子(*Hspa5*、*Pdia6*、*Pdia4*、*Sdf2l1*、*Hyou1*)が上方制御されていた。免疫組織化学により、小胞体の数が有意に増加していることが確認された。

【考察】*Tmem135-Tg*マウスでは唾液分泌量が増加し、タンパク質濃度が低下したことから、漿液性成分が選択的に増加したと考えられた。小胞体ストレス応答関連遺伝子が上方制御されていることから、小胞体ストレス応答がこの過程に重要な役割を果たしていることが示唆された。ただし、活性酸素種や細胞内カルシウムイオン濃度の直接測定は行われておらず、詳細なメカニズムについては今後の検証が必要である。

本研究によって*Tmem135*が唾液分泌機能と関連していることが明らかになった。詳細なメカニズムの検討は必要であるが、研究成果には新規性が認められた。唾液分泌量低下疾患の病態解明や標的治療の開発に貢献できる可能性が示唆され、今後の発展が期待できる。

よって、審査委員会は本論文に博士（歯学）の学位論文としての価値を認める。