

長寿医療研究開発費 平成25年度 総括研究報告

唾液腺ホメオスタシス維持機構の破綻による唾液腺機能低下メカニズムの解明
(24-13)

主任研究者 山越 貴水

国立長寿医療研究センター 老化機構研究部 代謝研究室 (室長)

研究要旨

加齢による口腔乾燥症状の増加原因を解明するアプローチとして、唾液を分泌する顎下腺組織に焦点を当てて研究を進めた。動物モデルを用いた解析から、加齢による顎下腺組織機能低下の分子機序の一つとして、ポリコーム蛋白質 **Bmi-1** による **p16** の発現調節機構の破綻が関与している可能性が示された。これらの知見は、将来の口腔乾燥症（ドライマウス）の治療に寄与することが期待された。

主任研究者

山越 貴水 国立長寿医療研究センター 老化機構研究部 代謝研究室 (室長)

分担研究者

なし

A. 研究目的

高齢者の多くは口腔乾燥症状（ドライマウス）を示すことが様々な研究により明らかになっている。この原因の一つとして、唾液分泌量の減少が挙げられるが、その実態は不明のままである。私達は動物モデルを用いた解析から、唾液を産生・分泌する唾液腺の一つで唾液分泌の大部分を占める顎下腺組織において、ポリコーム蛋白である **Bmi-1** が顎下腺機能に重要な役割を果たしていることを見出している。また、加齢により顎下腺組織では **Bmi-1** の標的遺伝子であると同時に、重要な癌抑制遺伝子として知られる **p16** の発現が著しく上昇する知見も得ている。そこで、本研究では、加齢による顎下腺組織機能低下の分子機序に **Bmi-1/p16** 経路が関与している可能性について検討を行う。

B. 研究方法

(1) 顎下腺組織における Bmi-1/p16 制御経路の加齢変化

成体の野生型マウス（若齢、老齢）の顎下腺組織を用いて、Bmi-1 と p16 の蛋白レベル及び mRNA レベルをウェスタンブロットと RT-qPCR により評価した。また、酵素処理により若齢マウス及び高齢マウスの顎下腺組織から顎下腺細胞を単離し、*in vivo* クロマチン免疫沈降 (*in vivo* ChIP) 法を用いて p16 遺伝子プロモーター領域周囲に結合している Bmi-1 のレベルやヒストン修飾 (H3K27me3 レベル) 等について解析した。

(2) Sphere (球状の浮遊細胞塊) における Bmi-1/p16 制御経路の加齢変化

In vitro 顎下腺幹/前駆細胞モデルを用いて、若齢群と老齢群から形成された sphere (球状の浮遊細胞塊) における Bmi-1 と p16 の mRNA レベルを RT-qPCR により、また、Bmi-1, p16 及びリン酸化 Rb 蛋白質のレベルをウェスタンブロットにより各々評価した。また、若齢群と老齢群から形成された sphere を用いて、ChIP 解析により、p16 遺伝子プロモーター領域周囲に結合している Bmi-1 のレベルやヒストン修飾 (H3K27me3 レベル) 等について評価した。

(3) 3D コラーゲンゲル包埋培養方法を用いた分化能力の加齢変化の評価

In vitro 顎下腺幹/前駆細胞モデルにより得られた sphere をコラーゲンゲルへ包埋培養することにより branch を形成させる。コラゲナーゼ処理により、ゲル内に形成された branch を回収し、最終分化を遂げた腺房細胞のマーカーとして知られる Amylase 及び Muc19 の発現を RT-qPCR により評価した。

(4) 顎下腺細胞における p16 の過剰発現の影響

若齢マウスの顎下腺から単離した顎下腺細胞へレトロウイルスベクターを用いて p16 遺伝子導入を行い、p16 を過剰発現させた。感染後、p16 を過剰発現した sphere のサイズ、増殖能力や分化能力について、BrdU 取り込み率や 3D コラーゲンゲル包埋培養方法を用いて各々、p16 過剰発現の影響を評価した。

(倫理面への配慮)

本研究計画の遂行にあたっては、独立行政法人国立長寿医療研究センターにおける遺伝子組換え実験安全規程に従って行われ、適切な拡散防止措置が取られる。動物実験に際しては独立行政法人国立長寿医療研究センター動物実験規則に従い行う。

C. 研究結果

(1) 加齢による顎下腺組織での Bmi-1/p16 経路の制御異常

加齢により、p16 は mRNA レベルと蛋白レベルの両方において著しく上昇する一方で、Bmi-1 のレベルは mRNA レベルと蛋白レベルのどちらにおいても殆ど変化しないことが示された。Bmi-1 はポリコーム複合体構成因子の一つで、p16 遺伝子プロモーター領域近傍のメチル化されたヒストン H3 の 27 番目のリジン残基(H3K27me3)を認識して結合することにより、p16 遺伝子の転写抑制状態を維持していることが明らかになっている。そこで、若齢マウスと老齢マウスの顎下腺組織から単離した顎下腺細胞を用いて、ChIP 解析により p16 遺伝子プロモーター領域周辺の H3K27me3 レベルと Bmi-1 レベルを調べたところ、老齢群ではこれらのレベルが減少することが示された。これらの結果から、加齢により顎下腺組織の実質細胞では Bmi-1 による p16 の転写抑制状態が解除され、p16 の発現が上昇することが示唆された。

(2) 加齢による顎下腺組織幹/前駆細胞での Bmi-1/p16 経路の制御異常

In vitro 顎下腺幹/前駆細胞モデルにより、若齢マウスと老齢マウスの顎下腺から調製した sphere を用いて Bmi-1 と p16 のレベルを調べたところ、mRNA レベルと蛋白レベルの両方において p16 の顕著な発現上昇を認めしたが、一方、Bmi-1 は mRNA レベルと蛋白レベルの両方において発現に殆ど変化を認めなかった。そこで、ChIP 解析により sphere における p16 遺伝子プロモーター領域周辺の H3K27me3 レベルと Bmi-1 レベルを調べたところ、*in vivo* ChIP の結果と類似して、老齢群ではこれらのレベルが減少することが示された。これらの結果から、加齢により顎下腺幹/前駆細胞では Bmi-1 による p16 の転写抑制状態が解除され、p16 の発現が上昇することが示唆された。また、CDK インヒビターである p16 は細胞周期のストッパーである Rb 蛋白質をリン酸化して不活性化する cyclinD-CDK4/6 に結合し、その機能を阻害することにより Rb 蛋白質を活性化することが明らかになっている。そこで、sphere におけるリン酸化 Rb 蛋白質のレベルを調べたところ、老齢群ではリン酸化された Rb 蛋白質が減少した。このことから、加齢により Bmi-1 による p16 の発現抑制経路が正常に機能しなくなることで p16 の転写抑制状態が解除され、p16 の発現が上昇した結果、Rb 蛋白質が活性化されることが示唆された。

(3) 3D コラーゲンゲル包埋培養方法を用いた分化能力の加齢変化

In vitro 顎下腺幹/前駆細胞モデルにより得られた sphere をコラーゲンゲルへ包埋培養し、sphere から枝状に分岐した branch 数をカウントしたところ、老齢群由来の sphere から分岐した branch 数はコントロールに比べて著しく減少することが示された。また、コラゲナーゼ処理によりゲル内で branch を形成した細胞を回収し、Amylase 及び Muc19 の発現を sphere におけるそれらの発現と比較したところ、老齢群では若齢群に比べて Amylase 及び Muc19 の発現上昇の程度が少し低くなることが示された。これらの結果から、加齢により顎下腺幹/前駆細胞の増殖能力と分化能力は低下することが示唆された。

(4) p16 過剰発現による顎下腺幹/前駆細胞の増殖能力と分化能力への影響

In vitro 顎下腺幹/前駆細胞モデルを用いて p16 を過剰に発現した sphere を作製し、これらの sphere の増殖能力と分化能力を BrdU 取り込み率と 3D コラーゲンゲル包埋培養方法を用いて各々評価した。p16 を過剰に発現した sphere はコントロールに比べて BrdU の取り込み率が顕著に低下した。また、*in vitro* 顎下腺幹/前駆細胞モデルにより得られた sphere をコラーゲンゲルへ包埋培養し、sphere から枝状に分岐した branch 数をカウントしたところ、p16 を過剰発現した sphere から分岐した branch 数はコントロールに比べて著しく減少することが示された。更に、これらの細胞における Amylase 及び Muc19 の発現を RT-qPCR により調べた。その結果、p16 を過剰に発現した sphere から分化した細胞群では Amylase 及び Muc19 の発現がコントロールに比べて少し低くなることが分かった。以上の結果から、顎下腺幹/前駆細胞において p16 の発現が高くなることで、増殖能力と分化能力が低下する可能性のあることが示唆された。

D. 考察と結論

長寿医療研究開発費 平成 24 年度の研究において、私達は加齢により顎下腺組織と顎下腺幹/前駆細胞において増殖能力が低下することや顎下腺幹/前駆細胞の自己複製能力が低下することを報告した。本年度、加齢により顎下腺組織機能が衰えるメカニズムの一つとして、Bmi-1/p16 制御経路の破綻により細胞増殖を負に調節している p16 の発現が著しく上昇することを明らかにした。また、*in vitro* 3D コラーゲンゲル包埋培養実験から、加齢は顎下腺幹/前駆細胞の分化能力を低下させる可能性のあることが分かった。更に、p16 過剰発現系においても同様の現象が認められた。昨年度、私達は加齢により顎下腺幹/前駆細胞の細胞数が減少することと自己複製能が低下することを見出しており、今回明らかになった加齢による分化能低下の事実とを考えると、Bmi-1/p16 制御経路は、自己複製能を維持することにより幹細胞プールを保持する働きや増殖能と分化能をコントロールすることによって顎下腺機能を調節している可能性のあることが示唆された。加齢の過程では、Bmi-1/p16 制御経路の破綻によって顎下腺幹/前駆細胞の多様な機能が次第に衰えていくものと考えられる。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Doi, R., Endo, M., **Yamakoshi, K.**, Yamanashi, Y., Nishita, M., Fukada, S., Minami, Y.
Critical role of Frizzled1 in age-related alterations of Wnt/ β -catenin signal in myogenic cells during differentiation.
Genes Cells, 19(4), 287-296, (2014)

2. 学会発表

- 1) **山越 貴水**, 片野 諭, 木村 広美, 丸山 光生, van Lohuizen, M.
加齢過程での顎下腺組織機能低下における p16^{Ink4a} の役割
第65回日本細胞生物学会大会
2013年6月21日 (名古屋)
- 2) **Yamakoshi, K.**, Katano, S., Kimura, H.
The role of p16^{INK4a} in the age-related functional decline of the submandibular gland.
文部科学省 新学術領域研究「上皮管腔組織形成」 The 1st International Meeting
2013年6月23日 (札幌)
- 3) **Yamakoshi, K.**
The role of p16 in the age-related functional decline of the submandibular gland.
平成25年度 文部科学省 新学術領域研究 公開シンポジウム
2014年1月31日 (東京)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし