

長寿医療研究開発費 2019年度 総括研究報告

高齢者ドライマウスの原因究明とその克服に向けた基盤研究（30-14）

主任研究者 山越 貴水 国立長寿医療研究センター 室長

研究要旨

本研究課題では、高齢者においてドライマウス症状が発生するメカニズムを解明するため、老化過程における顎下腺のムチンとその糖鎖に着目し、本年度は、25歳から69歳までの若中年齢者と85歳以上の高年齢者の顎下腺を用いた組織化学的解析及び分子マトリックス電気泳動法を用いたムチン分析を実施した。組織化学的解析から、高齢者では、Muc5bとMuc7を含む酸性の粘液物質がやや増加すること、老化により酸性の粘液物質が産生される細胞が新たに増える可能性が示唆された。分子マトリックス電気泳動を用いた分析では、老化に伴いムチンは減少傾向にあること、core-1型の糖鎖にシアル酸が結合していることが明らかとなった。

主任研究者

山越 貴水 国立長寿医療研究センター 室長

分担研究者

亀山 昭彦 国立研究開発法人産業技術総合研究所 上級主任研究員

村山 繁雄 東京都健康長寿医療センター 特任研究員

A. 研究目的

高齢者の多くが罹患する口腔乾燥症状（ドライマウス）は、唾液粘性の亢進を伴い、高齢者のQOLを低下させるだけでなく、高齢者の死亡原因の上位である肺炎の発症リスクを高める。このため、高齢者ドライマウスの原因究明が急務となっている。

本研究では、主任研究者がこれまで行ってきた老齢マウスの顎下腺における粘性物質のムチンとその糖鎖プロファイルについての解析をマウスからヒトへ展開し、ヒト顎下腺を用いて粘液物質の分離と糖鎖構造解析を行い、ドライマウスの発症機序解明へ繋げることを目的とする。また、高齢者に特徴的な糖鎖が高齢者ドライマウスの指標となり得る可能性についても探る。

B. 研究方法

(1) ヒト顎下腺のパラフィン包埋薄切切片試料の作製

パラフィン包埋ブロックの作製方法は、昨年度の研究報告書の通りである。昨年度に作製したパラフォルムアルデヒド固定パラフィン包埋試料を用いて、薄切装置（マイクロトーム）により 6 μ m の厚さに薄切された。69 歳までの若中年齢者（女性 2 名、男性 7 名）と 85 歳以上の高年齢者（女性 5 名、男性 9 名）のヒト顎下腺は、各 10 切片、作製された。

(2) ヒト顎下腺試料の各種染色

提供された薄切切片を用いて、ヘマトキシリン&エオジン(HE)染色、酸性糖（カルボキシ基・硫酸基を含む糖）とイオン結合することで酸性の粘液多糖類を特異的に染めるアルシアンブルー (AB) 染色、AB に加えて中性ムチンを同時に染める AB-PAS 染色、Muc5b 免疫染色、Muc7 免疫染色を行った。

(3) 顎下腺組織からの水溶性ムチンの抽出

顎下腺組織片をアセトン中でホモジナイズすることによりアセトンパウダーとし、PBS にて水溶性成分を抽出した。この水溶液に飽和酢酸カルシウム溶液を添加後、エタノールを加えて冷却し沈殿物を得た。これに 2M ウレア溶液を加えて得られた溶液を別のチューブに移したのち、さらにエタノールを加えて冷却し沈殿物を得た。この沈殿物を 8M ウレアに溶解し水溶性ムチン抽出液とした。

(4) 分子マトリックス電気泳動 (SMME) によるムチンの分離

顎下腺組織から抽出した水溶性ムチン抽出液を SMME にて電気泳動した。SMME は 0.1 M ピリジン/ギ酸緩衝液 (pH 4.0) を泳動緩衝液として、1 mA/cm の定電流にて 30 分間通電した。泳動後の膜をアルシアンブルーおよびシアル酸認識レクチン MAL-II で染色することによりムチンを可視化した。

(5) アルシアンブルー染色

泳動分離後の SMME 膜を 30% 酢酸-メタノール溶液に浸漬後、アルシアンブルー染色液 (pH4.0) 中で 30 分間、振盪した。その後、メタノールで脱色しムチンを可視化した。さらにこの膜を乾燥後、エチレングリコールに浸し透明化した。ポリプロピレンフィルムに挟み、イメージングシステム ChemiDoc (バイオラッド社) を用いて染色像を画像化した。

(6) MAL-II 染色

泳動後の SMME 膜を 5%BSA を用いてブロッキング処理を行った後、ビオチン化 MAL-II 溶液またはビオチン化 ABA 溶液 (各 2 μ g/mL) 中で 1 時間振盪した。洗浄後、HRP 標識したストレプトアビジン溶液 (4000 倍希釈) 中で 1 時間振盪し、洗浄後、化学発光試薬 ECL-plus(GE ヘルスケア社)を用いて可視化した。ポリプロピレンフィルムに挟み、イメー

ジングシステム ChemiDoc (バイオラッド社) を用いて染色像を画像化した。

(倫理面への配慮)

本研究計画の遂行にあたっては、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に則り、国立研究開発法人国立長寿医療研究センター 倫理・利益相反委員会、東京都健康長寿医療センター 倫理委員会及び国立研究開発法人産業技術総合研究所 生命倫理委員会ヒト試料実験部会の承認を得て、個人情報保護を徹底し行われる。

C. 研究結果

ヒト顎下腺の組織病理学的観察と各染色

東京都健康長寿医療センターより提供されたパラフィン包埋薄切切片を用いて、HE 染色、アルシアンブルー (AB) 染色、AB-PAS 染色、Muc5b 抗体染色、Muc7 抗体染色を行い、組織構造及び酸性糖とムチンを含む粘液多糖類の大まかな量について可視化し、染色結果を陽性率と陽性度で示した。検体毎の陽性率と陽性度から各染色結果における若中年齢者と高齢者を比較し、以下のことが示唆された。

1) AB 染色において、高齢者では陽性率・陽性度の両方で若・中年齢者よりも高くなった。従って、高齢者の顎下腺では酸性の粘液物質が増加していることが示唆された。

2) 高齢者では、Muc5b と Muc7 の陽性度が増加した。従って、AB 染色で観察された酸性粘液物質の増加は、Muc5b と Muc7 に由来している可能性が示唆された。

3) しかし、高齢者における AB 陽性率の増加とは対照的に、Muc5b と Muc7 の陽性率は高齢者において減少した。つまり、Muc5b 及び Muc7 陽性細胞以外の細胞において、酸性の粘液物質が産生されている可能性が示唆された。

4) AB-PAS は陽性率・陽性度ともに高齢者で減少した。従って、老化により中性の粘液物質は減少する可能性が示唆された。

分子マトリックス電気泳動法を用いたヒト顎下腺のムチン分析

若中年齢者 (9 例) と高齢者 (14 例) の顎下腺試料から抽出したムチンを SMME にて分離しアルシアンブルー染色した。市販ブタ胃ムチン (PGM) は泳動マーカーとして使用した。いずれもムチンの染色は薄くマウスの顎下腺に比較してムチン含量が少ないことが示唆された。次に、SMME にて分離したムチンをレクチンで染色した。若中年齢者では、ほぼ同じ位置にムチンが染色されたが、高齢者ではバンドの位置が上方にあるものが散見された他、染色が非常に希薄な試料があった。また、MAL-II と ABA ではほぼ同様な染色像が得られたことから、これらのヒト顎下腺ムチンは core-1 型の糖鎖にシアル酸が付加された構造を有することが示唆された。

D. 考察と結論

組織化学的解析から、老化により、**Muc5b** 及び **Muc7** がヒト顎下腺において増加することが示唆された。これらのムチンは粘液性細胞において産生されると考えられるが、興味深いことに、**Muc5b** 及び **Muc7** を産生する細胞以外の細胞において、主にムチンと考えられる酸性の粘液物質が老化により新たに産生される可能性が示唆された。しかしながら、分子マトリックス電気泳動を用いた解析から、ヒト顎下腺ムチンはマウスの場合と同様、老化に伴い減少傾向にあることが示唆された。2つの方法を用いたムチン解析により、老化によるムチン量の変化について異なる結果が得られたため、今後、ムチンの定量実験と老化によりムチンを新たに発現するようになる細胞種の特定制を行っていく予定である。また、ヒト顎下腺ムチンの糖鎖は、マウスの場合と同様に **core-1** 型の糖鎖にシアル酸が結合していることが明らかとなった。マウスでは老化に伴いムチンに結合する糖鎖のシアル酸結合様式が **Galβ1-3(NeuAcα2-6)GalNAc** から **NeuAcα2-3Galβ1-3GalNAc** に変化しており、ヒトにおいても同様に糖鎖の結合様式が変化している可能性がある。その為、今後、ヒト顎下腺のムチンに結合する糖鎖についても構造の詳細を調べると同時に、老化に伴う構造変化を明らかにしていく予定である。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 亀山 昭彦, 松野 裕樹, 飯田 真由, 丸山 光生, 渡邊 淳, 山越 貴水
分子マトリックス電気泳動で解明する唾液腺ムチンの老化に伴う変化
電気泳動, Vol.63, No.2, 55-61 (2019)
- 2) Ishiura H, Shibata S, Yoshimura J, Suzuki Y, Qu W, Doi K, Almansour MA, Kikuchi JK, Taira M, Mitsui J, Takahashi Y, Ichikawa Y, Mano T, Iwata A, Harigaya Y, Matsukawa MK, Matsukawa T, Tanaka M, Shirota Y, Ohtomo R, Kowa H, Date H, Mitsue A, Hatsuta H, Morimoto S, Murayama S, Shiio Y, Saito Y, Mitsutake A, Kawai M, Sasaki T, Sugiyama Y, Hamada M, Ohtomo G, Terao Y, Nakazato Y, Takeda A, Sakiyama Y, Umeda-Kameyama Y, Shinmi J, Ogata K, Kohno Y, Lim SY, Tan AH, Shimizu J, Goto J, Nishino I, Toda T, Morishita S, Tsuji S: Noncoding CGG repeat expansions in neuronal intranuclear inclusion disease, oculopharyngodistal myopathy and an overlapping disease. Nat Genet 2019, 51:1222-32.
- 3) Matsubara T, Oda M, Takahashi T, Watanabe C, Tachiyama Y, Morino H, Kawakami H, Kaji R, Maruyama H, Murayama S, Izumi Y: Amyotrophic lateral sclerosis of long clinical

- course clinically presenting with progressive muscular atrophy. *Neuropathology*. 2019; 39: 47-53
- 4) Matsubara T, Oda M, Takahashi T, Watanabe C, Tachiyama Y, Morino H, Kawakami H, Kaji R, Maruyama H, Murayama S, Izumi Y: Amyotrophic lateral sclerosis of long clinical course clinically presenting with progressive muscular atrophy. *Neuropathology*. 2019 Feb;39(1):47-53. doi: 10.1111/neup.12523. Epub 2018 Dec 3.
- 5) Tanaka H, Homma H, Fujita K, Kondo K, Yamada S, Jin X, Waragai M, Ohtomo G, Iwata A, Tagawa K, Atsuta N, Katsuno M, Tomita N, Furukawa K, Saito Y, Saito T, Ichise A, Shibata S, Arai H, Saido T, Sudol M, Muramatsu SI, Okano H, Mufson EJ, Sobue G, Murayama S, Okazawa H: YAP-dependent necrosis occurring in early stages regulates Alzheimer's-like pathology in mice. *Nature Comm*. 2020 Jan 24;11(1):507. doi: 10.1038/s41467-020-14353-6.

2. 学会発表

- 1) 山越貴水、亀山昭彦、西島里咲、飯田万由、丸山光生.
ポリコームタンパク質 Bmi-1 による顎下腺ムチン糖鎖構造の制御
第 42 回日本基礎老化学会大会, 2019 年 6 月 8 日, (仙台)
- 2) 山越貴水、亀山昭彦、西島里咲、飯田万由、丸山光生.
ポリコーム蛋白質 Bmi-1 による顎下腺ムチン糖鎖構造の制御
第 13 回日本エピジェネティクス研究会, 2019 年 5 月 28 日, (横浜)
- 3) Takata T, Suely M, Izumi Y, Saito Y, Murayama S: Limbic TDP 43 proteinopathy, clinically mimicking Alzheimer disease. 95th ANNUAL MEETING American Association of Neuropathologists, Atlanta, Georgia, 2019.6.6-9
- 4) Matsubara T, Izumi Y, Miyamoto R, Oda M, Nodera H, Higashihara M, Sengoku R, Oki R, Fujita K, Kawarai T, Watanabe C, Saito Y, Kaji R, Murayama S: Validation study of clinical diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis: the Brain Bank for Aging Research (BBAR) Project. 30th International Symposium on ALS/MND, Australia, 2019.12.4-6
- 5) 村山繁雄 (特別講演): 認知症の動的神経病理. 第 22 回中・四国老年期認知症研究会, 岡山, 2019.4.13
- 6) 村山繁雄, 松原知康, 仙石鍊平, 齊藤祐子: 2019 Annual Report, the Brain Bank for Aging Research, Tokyo, Japan. 第 60 回日本神経病理学会総会学術研究会, 名古屋, 2019.7.14-16
- 7) 村山繁雄, 松原知康, 仙石鍊平, 齊藤祐子: レビー小体病理伝搬仮説の検証. 第 13 回パーキンソン病・運動障害疾患コンgres. 東京, 2019.7.25-27
- 8) 村山繁雄: (Dementia CPC)非流暢性失語で発症した経過 13 年の 77 歳女性剖検例. 第 38 回日本認知症学会学術集会, 東京, 2019.11.7-9

- 9) 村山繁雄：高齢者タウオパチー．第 38 回日本認知症学会学術集会，東京，2019.11.7-9
- 1 0) 村山繁雄：老化に伴う TDP43 蛋白蓄積症．第 38 回日本認知症学会学術集会，東京，2019.11.7-9
- 1 1) 亀山昭彦、Analaysis of viscous glycoprotein mucins: SMME and a breakthrough of glycan analysis、第 69 回日本電気泳動学会総会シンポジウム、2019 年 7 月 26 日、宮崎フェニックスシーガイアリゾート

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