

唾液腺機能に対するアディポネクチンと加齢との関連性 (30-39)

主任研究者 黒澤 実愛 国立長寿医療研究センター 口腔疾患研究部 (流動研究員)

研究要旨

ドライマウス患者は加齢とともに増加し、その原因として加齢や薬の副作用、全身疾患などが考えられる。adiponectin (AP)は善玉アディポカインとして知られ、唾液腺及び涙腺にはAPの受容体が発現していることから、加齢による脂肪組織の機能変化や細胞老化が唾液腺及び涙腺機能に何らかの影響を及ぼす可能性が考えられる。本年度は涙腺におけるPPAR γ 及びAP受容体であるAdipoR2のタンパク発現の検討と、内臓脂肪の肥大化によるCD4陽性T細胞の細胞老化に関する検討、CD4陽性T細胞が涙腺及び唾液腺に集積する機序を検討した。

A. 研究目的

ドライアイやドライマウスの患者は加齢とともに増加し、患者のQOLを著しく低下させるが根本的な治療法は見つかっていない。疾患発症の原因として加齢や薬の副作用、糖尿病などの全身疾患が考えられるが、加齢変化は免疫老化、細胞老化など多岐にわたり、加齢に起因するドライアイやドライマウスの発症機序は明らかになっていない。長寿ホルモンとして知られているAPの受容体は、唾液腺及び涙腺上皮細胞に発現しているおり、自己免疫疾患であるシェーグレン症候群では主に唾液腺と涙腺が標的臓器になる事から、それらの外分泌機能に共通の影響を及ぼす可能性がある。また、APは主に脂肪細胞から産生されるが、肥満などにより脂肪細胞が肥大化すると産生量が低下する。加齢によるエネルギー代謝の変化や女性ホルモンであるエストロゲン産生の低下によって内臓脂肪などが増加するリスクがあることから、加齢に伴いAP産生量が低下する可能性がある。マウスにおいても加齢に伴い内臓脂肪が蓄積することから、本研究では老齢マウスと高脂肪食を負荷したマウス(HFDマウス)、卵巣を摘出する事で内臓脂肪が肥大化したOVXマウスを比較することで、加齢による脂肪組織の変化が涙腺と唾液腺組織に与える影響を検討する事が可能であると考えられる。また、免疫機能は加齢とともに変化し、炎症性サイトカイン産生亢進や慢性炎症を誘発する。特にCD4陽性T細胞ではメモリーT細胞が増加し、その中でも慢性炎症などに関与すると言われている老化関連T(SA-T)細胞が増加するが、HFDマウスにおいても肥大化した内臓脂肪にSA-T細胞が集積する事が報告されている(K Shirakawa et al. *J Clin Invest.* 2016. 126(12):4626-4639)。そのため、CD4陽性T細胞の

細胞老化には内臓脂肪の肥大化が関与している可能性がある。よって、本研究では老齢マウス及び HFD マウス、OVX マウスを比較することで脂肪組織の変化が唾液腺及び涙腺、免疫老化に与える影響を検討することを目的とした。前年度の研究結果から、唾液腺では AP 発現量は老齢マウスと若齢マウスで変化は見られなかった事から、AP 及び AP 関連因子の発現等は涙腺を中心に解析を行った。

B. 研究方法

老齢マウスとして生後 22 ヶ月、若齢マウスとして生後 8 週のマウスを使用した。HFD マウスは生後 4 週から高脂肪食を 8 週間負荷した。OVX マウスは生後 4 週に処置し、処置後 1 ヶ月後と 3 ヶ月後に解析した。

1) 唾液量及び涙液量の測定

刺激時唾液量及び涙液量の測定のため、麻酔後に副交感神経作動薬としてピロカルピンを腹腔から投与した。唾液は末梢血採取用のリングキャップスで採取、測定し、涙液測定用のゾーンクイックで涙液量を測定した。

2) 涙腺における AP 関連因子の解析

唾液腺及び涙腺における AP に関連した因子を解析するために、各マウスの唾液腺と涙腺を摘出し、total RNA 又はタンパク抽出後、リアルタイム PCR 及びウエスタンブロットにて各因子の発現を比較した。

3) 老齢マウスの涙腺試料における組織学的解析

唾液腺と涙腺における各因子の局在を検討するために各組織を迅速凍結し、凍結マイクロトームで 7 μ m の厚さで薄切した。薄切した試料はメタノール及びアセトンにて固定・浸透処理し、Can Get Signal immunostain (TOYOBO)にて PPAR γ と AdipR2、上皮マーカーである EpCAM の各抗体を希釈、蛍光免疫染色した。

4) 唾液腺及び涙腺に浸潤する免疫細胞の解析

唾液腺及び涙腺に浸潤する免疫細胞を解析するために、老齢マウスや HFD マウスなどから唾液腺と涙腺を摘出し、コラゲナーゼで分散した。末梢における免疫細胞を検討するために二次リンパ組織として脾臓と頸部リンパ節を摘出、分散後、脾臓は溶血剤にて赤血球を溶血した。各組織の免疫細胞は FACS にて免疫細胞の各細胞分画を解析した。

5) CD4 陽性メモリーT 細胞における遊走能検討

CD4 陽性メモリーT 細胞が唾液腺及び涙腺に集積するメカニズムを検討するために、老齢マウス及び若齢マウスの脾臓から CD4 陽性 T 細胞を単離し、ケモカインに対する CD4 陽性 T 細胞の遊走能を検討した。また、遊走した CD4 陽性 T 細胞の細胞分画は FACS で解析した。

(倫理面への配慮)

動物実験に関しては、長寿医療研究センターにおける動物実験取扱規程、動物の愛護及び管理に関する法律、実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準、動物の殺処理方法に関する指針、研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針に係る関係法規を十分に遵守する研究を実施する。

C. 研究結果

1) 唾液量及び涙液量の測定

老齢マウスではオスメスともに体重や涙腺組織の重さが増加し、刺激時唾液量は若齢マウスと比較して老齢マウスで減少したが、涙液量は増加した。一方、HFD マウスではコントロールマウスと比較してオスでは体重が増加したが、メスでは変化せず、唾液量はオスメスともに減少したが涙液量はメスのみで減少した。OVX マウスでは涙液量はコントロールとの差は見られず、唾液量は減少傾向を示したが、有意な差は見られなかった。

2) 唾液腺及び涙腺における AP 関連因子の解析

前年度では、涙腺におけるピロカルピンの受容体である M3R 発現は各マウスで変化なかったが、若齢マウスと比較して老齢マウスでは AP 受容体の一つである AdipoR2 mRNA 発現が増加しており、AP 発現に関与する PPAR γ mRNA 発現も上昇した事を見出した。PPAR γ はアイソフォームとして主に PPAR γ 1 と PPAR γ 2 が報告されており、PPAR γ 1 は多くの組織で発現が見られるが、PPAR γ 2 は脂肪細胞で発現する事が知られている。ウエスタンブロットで PPAR γ のアイソフォームを検討すると、涙腺では PPAR γ 1 が発現していた。

リアルタイム PCR にて若齢マウスと比較して老齢マウスの唾液腺及び涙腺では老化マーカーである p16 発現及びケモカインの一つである CXCL13 発現が増加した。

3) 涙腺における組織学的解析

蛍光免疫染色にて涙腺における PPAR γ 及び AdipoR2 発現の局在を検討すると、PPAR γ は上皮細胞の細胞質に多く発現し、核内移行している細胞は少数であった。また、AdipoR2 は腺房細胞及び導管周囲に多く発現していた。

4) 脂肪組織の肥大化と免疫細胞の細胞老化に関する解析

老齢マウスの唾液腺及び涙腺では SA-T 細胞数がオス、メスともに増加したが、オスよりもメスの老齢マウスで増加した。一方、HFD マウスではオス、メスともに二次リンパ組織及び唾液腺、涙腺における SA-T 細胞は増加しなかった。処置後 1 ヶ月の OVX マウスでは免疫細胞に関してコントロールマウスと比較して変化は見られなかった。しかし、処置後 3 ヶ月の OVX マウスでは脾臓における CD4 陽性 T 細胞数が増加しており、SA-T 細胞の細胞数も増加したが、細胞の割合はコントロールマウスと同様であり、唾液腺及び涙腺における免疫細胞の集積は見られなかった。

5) ケモカインに対する遊走解析

老齢マウスの唾液腺及び涙腺では CXCL13 発現が増加しており、CXCL13 の受容体である CXCR5 は SA-T 細胞に発現している事が報告されている。そのため、CXCL13 に対する遊走能を検討すると、CD4 陽性ナイーブ T 細胞と比較して CD4 陽性メモリー T 細胞では遊走能が有意に上昇しており、CD4 陽性メモリー T 細胞で比較すると若齢マウスよりも老齢マウスで亢進していた。

D. 考察と結論

加齢に伴い唾液腺や涙腺の実質細胞では脂肪変性する事が報告されているが、老齢マウスの涙腺における PPAR γ のアイソフォームは PPAR γ 1 であり、凍結試料では細胞内に多く発現していた事から、PPAR γ 1 や AdipoR2 を介して老齢マウスの涙液量を促進している可能性が示唆された。

老化した細胞では senescence-associated secretory phenotype (SASP)により炎症性サイトカイン産生が亢進するが、PPAR γ はリガンドと結合する事で NF- κ B 活性を抑制し、抗炎症作用を示す。老齢マウスの涙腺においても NF- κ B によって発現が誘導される IL-6 や TNF α の発現は若齢マウスと有意な差は見られない事から、老齢マウスにおける PPAR γ 発現の増加は涙腺における炎症性サイトカイン発現を抑制している可能性がある。しかし、老齢マウスの涙腺には SA-T 細胞が集積しており、涙腺の上皮細胞における細胞老化により CXCL13 発現が亢進することで、SA-T 細胞が遊走される可能性が示唆された。また、唾液腺及び涙腺における SA-T 細胞集積はメスの老齢マウスで増加し、HFD マウスでは内臓脂肪に SA-T 細胞が集積する事から、脂肪細胞の肥大化に伴う AP 産生の低下またはエストロゲンの低下によって SA-T 細胞が増加する可能性がある。しかし、HFD マウスでは二次リンパ組織や涙腺などにおいて SA-T 細胞の増加は見られなかった。また、OVX マウスではエストロゲンの低下に伴い内臓脂肪が肥大化し、二次リンパ組織では SA-T 細胞が増加する事から、内臓脂肪の肥大化ではなく、エストロゲンの低下が SA-T 細胞の増加に関与する可能性が示唆された。

E. 健康危険情報

該当無し

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Shikama Y[#], **Kurosawa M[#]**, Furukawa M, Ishimaru N, Matsushita K.

Involvement of Adiponectin in Age-Related Increases in Tear Production in Mice.

Aging (Albany NY). 2019 Oct 8;11(19):8329-8346. #: Equally contribution

2. 学会発表

1) **黒澤実愛**、古川匡恵、松下健二、四釜洋介

加齢およびエストロゲンシグナル欠乏は唾液腺における老化関連 T 細胞集積を促進する

第 61 回歯科基礎医学会学術大会(口頭/ポスター)、2019 年 10 月 東京

2) **黒澤実愛**、古川匡恵、松下健二、四釜洋介

唾液腺上皮の細胞老化及び免疫老化が唾液腺機能に与える影響:老齢マウスおよびモデルマウスを用いた解析

第 28 回日本シェーグレン症候群学会学術集会(口頭)、2019 年 9 月 徳島

3) **黒澤実愛**、古川匡恵、松下健二、四釜洋介

免疫老化及び細胞老化による唾液腺への SA-T 細胞集積メカニズムの解析

第 38 回分子病理学研究会(ポスター)、2019 年 7 月 兵庫

4) **Kurosawa M**, Furukawa M, Matsushita K, Shikama Y. Senescence-associated

T-lymphocytes Accumulate in the Submandibular Glands of Aged Mice. 97th

International Association for Dental Research General session, Vancouver,

Canada, June 2019 (Oral presentation).

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

第 38 回分子病理学研究会 優秀ポスター賞, 2019 年 7 月