

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（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。善玉アディポカインとして知られる **adiponectin (AP)**は、インスリン感受性の亢進や抗炎症作用があり、正常な脂肪細胞から産生されるが、肥満などによって脂肪細胞が肥大化する事で AP 産生量は低下する。唾液腺及び涙腺において AP 受容体が発現しており、唾液や涙液の分泌に関与することが報告されている。しかし、老齢マウスは加齢によってエネルギー代謝や女性ホルモンであるエストロゲン産生の低下などから、内臓脂肪の増加に伴う体重増加が見られ、AP 産生が低下している可能性がある。また、加齢に伴う細胞老化は炎症性サイトカインの分泌促進や、老化による特異的な免疫細胞の増加など、加齢は全身において様々な影響を及ぼしており、唾液腺及び涙液の分泌機能にも影響を与える可能性がある。そのため、若齢マウスに高脂肪食を負荷した (HFD)マウスと比較する事で、唾液腺と涙腺における加齢変化や、AP 産生低下の影響を検討し、加齢に伴う口腔乾燥症などの機序を明らかにすることを目的とする。老齢マウスにおいて、唾液量が減少する一方で、体重と涙液量は増加しており、若齢マウスと比較して、AP 発現は唾液腺で減少しておらず、涙腺では AP 発現が増加していた。そのため、①「涙腺における AP 関連因子の検討」、老齢マウスの唾液腺及び涙腺には免疫細胞が集積している事から、②「涙腺に集積している老化した免疫細胞の解析」、また、卵巣摘出によって脂肪組織が肥大化する卵巣摘出(OVX)マウスや、若齢で涙腺に免疫細胞が集積する自己免疫疾患モデルマウス(*aly/aly*マウス)を用いて、③「加齢によるエストロゲン減少と自己免疫疾患モデルマウスの解析」を行った。

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（研究員）

研究期間 2018年4月1日～2021年3月31日

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、唾液腺及び涙腺において AP 受容体が発現しており、唾液腺では腺房細胞における透過性の亢進、涙腺では AP 点眼による涙液量の増加が報告されている (Ding C et al. *J Mol Histol.* 2018、Li Z et al. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013)。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ことから、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。また、シェーグレン症候群は唾液腺や涙腺に免疫細胞が浸潤する自己免疫疾患の一つであり、ドライマウスやドライアイを主症状とする。シェーグレン症候群患者の唾液腺などでは、CD4 陽性 T 細胞が集積する事が報告されている。加齢に伴うドライマウスでは、シェーグレン症候群の診断基準に満たない患者においても唾液腺に免疫細胞が集積する事が報告されている (Clio P Mavragani et al. *J Rheumatol.* 2009)。そのため、シェーグレン症候群モデルマウスである *aly/aly* マウスを用いて、CD4 陽性 T 細胞の老化を検討し、加齢による唾液腺と涙腺への免疫細胞集積のメカニズムを検討した。

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、*aly/aly* マウス

は生後 10 週前後を使用した。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 Adipor2、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した。

C. 研究結果

1) 涙液量及び唾液量の測定

老齢マウスではオスメスともに体重と涙腺、唾液腺の重さが増加していた。HFD マウスはコントロールマウスと比較してオスでは体重の増加が見られたが、メスでは有意な体重増加は認められなかった。刺激時涙液及び唾液量を測定するため、各マウスに副交感神経作動薬としてピロカルピンを腹腔内に投与し、涙液量と唾液量を測定した。老齢マウスではオスメスともに若齢マウスと比較して涙液量は増加したが、唾液量は減少した。一方、HFD マウスにおいて唾液量はオスとメスで減少したが、涙液量はメスのみで減少した。OVX マウスでは体重の増加が見られたが、唾液量や涙液量は減少傾向を示したが、有意な差は見られなかった。*aly/aly* マウスでは唾液量と涙液量の減少が見られるが、コントロールマウスと比較して体重は増加しなかった。ピロカルピンの受容体である M3R の発現量はそれぞれのマウスで有意な差は認められなかった。

2) 涙腺及び唾液腺における AP 関連因子の解析

涙腺と唾液腺における AP とその関連因子を解析するために、若齢マウスと老齢マウス、HFD マウス、*aly/aly* マウスから涙腺と唾液腺を摘出し、リアルタイム PCR を用いて各因子の発現を検討した。また、涙腺と唾液腺の上皮細胞における各因子の発現を比較するために、各マウスから摘出した涙腺と唾液腺をコラゲナーゼなどの酵素処理により分散し、Miltenyi の mouse CD326 (EpCAM) マイクロビーズにて EpCAM 陽性の上皮細胞を単離した。なお、単離した細胞の 80%以上が EpCAM 陽性の上皮細胞であることを FACS にて確認した。各因子におけるタンパクの発現量はウェスタンブロットで比較し、組織におけるタンパク発現の局在は免疫染色にて検討した。

唾液腺における AP と AP receptor の発現量をウェスタンブロットで検討したが、若齢マウスと比較してそれぞれのタンパク量は老齢マウスで変化はなかったため、その後は涙腺に焦点を絞って研究を進めた。

涙腺では、若齢マウスと比較して老齢マウスで AP と AP receptro2 の発現が増加していた。また、AP の産生に関与する PPAR γ の発現も老齢マウスの涙腺で上昇した。一方、HFD マウス及び *aly/aly* マウスの涙腺では AP 及び AP receptor、PPAR γ の発現は変化しなかったことから、老齢マウスの涙腺におけるこれらの変化は涙腺組織の細胞老化が関与している可能性が示唆された。

AP は主に脂肪細胞で産生されるが、肥満などによって脂肪細胞が肥大化すると AP の産生量は低下する。老齢マウスでは加齢とともに内臓脂肪や皮下脂肪が増加し、体重も上昇する。しかし、老齢マウスの内臓脂肪における AP の発現量をリアルタイム PCR で検討すると若齢マウスより増加していた。

3) 涙腺及び脂肪細胞における AP の解析

老齢マウスの涙腺及び脂肪細胞では若齢マウスと比較して AP の発現が増加していた。また、老齢マウスの血清における AP の総量を ELISA で測定したが、若齢マウスよりも

老齢マウスで増加していた。しかし、*aly/aly* マウスでは血清における AP の総量は変化しなかった。

涙腺における免疫細胞の解析

老齢マウスの涙腺において多くの免疫細胞が浸潤していることを HE 染色で確認した。涙腺に浸潤している免疫細胞と、加齢に伴う二次リンパ組織における免疫細胞分画の変化を検討するために、老齢マウス及び HFD マウスから涙腺及び二次リンパ組織として脾臓を採取し、免疫細胞を FACS で解析した。その結果、HFD マウスの涙腺及び二次リンパ組織ではコントロールマウスと比較して顕著な変化はなかった。老齢マウスの脾臓において effector memory CD4 陽性 T 細胞が増加しており、加齢とともに二次リンパ組織で増加する老化関連 T 細胞(SA-T 細胞)が若齢マウスと比較して増加していることを確認した。涙腺では多くの免疫細胞が浸潤しているが、CD4 陽性 T 細胞の中では SA-T 細胞が増加しており、オスよりメスでより顕著にであった。

OVX マウスでは、卵巣摘出处置後 1 ヶ月及び 3 ヶ月のマウスにおける唾液腺では免疫細胞の集積が見られなかった。脾臓においては脾臓の肥大化に伴う細胞数の増加が見られたが、SA-T 細胞の割合は増加しなかった。

若齢の *aly/aly* マウスでは二次リンパ組織で SA-T 細胞が増加しており、涙腺には多く野 SA-T 細胞が集積していた。

5) SA-T 細胞における細胞遊走能の解析

老齢マウスの涙腺では多くの SA-T 細胞が集積していたことから、SA-T 細胞の遊走能を検討した。老齢マウスの唾液腺上皮細胞では、若齢マウスと比較して、CXCL13 発現が有意に増加しており、SA-T 細胞には CXCL13 の受容体である CXCR5 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、SA-T 細胞を含む effector memory CD4 陽性 T 細胞で若齢マウスと比較して有意に遊走能が亢進していた。また、*aly/aly* マウスでは SA-T 細胞が増加していることから、以前の研究で *aly/aly* マウス effector memory CD4 陽性 T 細胞が CXCL12 に対する遊走応答が亢進している事を報告しているため(M kurosawa et al. *Arthritis Rheumatol*, 2017)、CXCL12 に対する遊走応答も検討した。その結果、SA-T 細胞において CXCL12 に対する遊走応答が増加する傾向を示した。

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ことから、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、唾液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** 細胞の割合はコントロールマウスと比較して有意差は見られないことから、内臓脂肪の肥大化は二次リンパ組織における **SA-T** 細胞の増加には影響しない可能性が示唆された。一方、**aly/aly** マウスでは、涙腺の上皮細胞における **AP** 関連因子の増加が見られず、涙液量が減少することから、涙腺における免疫細胞の浸潤が影響している可能性がある。

よって、若齢マウスにおける内臓脂肪の肥大化は **SA-T** 細胞の割合や、涙腺における **AP** 関連因子の発現を増加しない。しかし、加齢に伴い涙腺に **SA-T** 細胞が集積しても、涙腺の上皮細胞では **AP** 関連因子の増加によって涙液量が増加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

2019 年度

- 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

2020 年度

- 1) Furukawa M, Yamada K, **Kurosawa M**, Shikama Y, Wang J, Watanabe M, Kanekura T, Matsushita K.

High Concentration of Glucose Induces filaggrin-1 Expression Through AP-1 in Skin Keratinocytes.

J Dermatol Sci. 2020 Apr 14; S0923-1811(20)30135-3

- 2) Matsushita K, Yamada-Furukawa M, **Kurosawa M**, Shikama Y.
Periodontal Disease and Periodontal Disease-Related Bacteria Involved in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease.
J Inflamm Res. 2020 Jun 30; 13:275-283.
- 3) **Kurosawa M**[#], Shikama Y[#], Furukawa M, Arakaki R, Ishimaru N, Matsushita K.
Chemokines Up-Regulated in Epithelial Cells Control Senescence-Associated T Cell Accumulation in Salivary Glands of Aged and Sjögren's Syndrome Model Mice.
Int J Mol Sci. 2021 Feb 25;22(5):2302. #: Equally contribution
- 4) Furukawa M, Wang J, **Kurosawa M**, Ogiso N, Shikama Y, Kanekura T, Matsushita K.
Effect of green propolis extracts on experimental aged gingival irritation in vivo and in vitro.
J Oral Biosci. 2021 Mar;63(1):58-65

2. 学会発表

2018 年度

- 1) Ishimaru N, **Kurosawa M**, Arakaki R, Yamada A, Tsunematsu T, Kudo Y and Jonathan Sprent.
NF- κ B2 Controls Migratory Activity of Memory T Cells by Regulating Expression of CXCR4 in A Mouse Model of Sjögren's Syndrome.
14th International Sjögren's Syndrome Symposium, Washington, USA, April 2018 (Oral/poster presentation)
- 2) 四釜洋介、**黒澤実愛**、山田（古川）匡恵、松下健二
口腔粘膜における IL-29 の抗真菌および抗ウイルス作用：臨床応用の可能性。
第 61 回秋季日本歯周病学会学術大会, 2018 年 10 月, 大阪
- 3) 四釜洋介、**黒澤実愛**、松下健二
IL-29 は口腔粘膜上皮細胞において RIG-I 発現誘導を介し抗ウイルス活性を増強する。
第 24 回日本エンドトキシン・自然免疫研究会, 2018 年 12 月, 横浜

2019 年度

- 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).

2020 年度

- 1) **黒澤実愛**、古川匡恵、松下健二、四釜洋介

老化関連 T 細胞および唾液腺上皮の細胞老化が口腔乾燥症の病態形成に関与する可能性、第 62 回歯科基礎医学会学術大会、Web 開催、9 月

- 2) **黒澤実愛**、古川匡恵、松下健二

加齢による口腔乾燥症の病態形成における老化関連 T 細胞の関与
第 20 回日本抗加齢医学会総会、Web 開催、9 月

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

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