

長寿医療研究開発費 2024年度 総括研究報告

必須脂肪酸・副交感神経をターゲットとした唾液腺機能制御

：口腔機能維持・向上法の開発（24-4）

主任研究者 四釜 洋介 国立長寿医療研究センター 口腔疾患研究部（副部長）

研究要旨

口腔の老化に伴う咀嚼・摂食・嚥下機能の低下は栄養障害や運動機能低下に繋がるため、全身のフレイルに多大な影響を及ぼす。したがって、口腔の老化を制御し口腔機能を維持あるいは回復することは、高齢者の健康を増進し健康寿命を延伸するための重要な方策となり得る。加齢に伴う唾液腺機能低下は、う蝕、歯周病、口腔カンジダ症や誤嚥性肺炎等、病原性微生物感染による疾患の発症や増悪をきたし、それらには唾液の量・質が関連することが知られている。申請者らはこれまで、老齢マウスによる解析結果から、老化に伴う唾液腺実質細胞および免疫系の変化が唾液分泌量・質に影響することを明らかにしてきた。本研究ではこれまでの研究成果を更に発展させ、脂肪酸・自律神経を介した免疫制御・唾液腺機能制御に着目し、口腔乾燥症の病態に及ぼす影響を明らかにするとともに、耳介温熱・電気刺激による副交感神経刺激による唾液腺の組織学的変化・機能変化を解析することを目的とする。

2024年度は唾液腺初代培養細胞を用い、細胞老化が1)アドレナリン受容体やムスカリン受容体発現に及ぼす影響や2)上皮間葉転換(EMT)を介し唾液腺線維化およびリンパ球集積に及ぼす影響を解析し、生体内での発現を免疫組織化学染色法により検討した。動物モデルや臨床研究に関しては、分担研究者とともに倫理申請・研究デザインについて準備を進めた。

主任研究者

四釜 洋介 国立長寿医療研究センター 口腔疾患研究部（副部長）

分担研究者

中村 純也 国立長寿医療研究センター 歯科口腔外科（歯科医師）

村上 正治 国立長寿医療研究センター 歯科口腔外科（歯科医師）

A. 研究目的

本研究では、唾液腺機能を制御し口腔機能を維持あるいは回復するための新しい方策を開発するために、脂肪酸や温熱・電気による自律神経刺激が唾液の質・量に及ぼす影響を分子生物学的、細胞生物学的、生理学的、免疫学的に明らかにする。

申請者はこれまで加齢関連疾患としても知られている糖尿病や脂質異常症が歯科領域疾

患の病態形成に及ぼす影響を研究してきており、自然免疫系を介し慢性炎症を惹起する事が報告されている飽和脂肪酸が、自己免疫疾患であるシェーグレン症候群(SS)の唾液腺病態を増悪することを明らかにしている(PMID:23603335)。また自然老化マウスを用いた解析から、唾液腺実質細胞の老化および T 細胞の老化が唾液分泌機能に影響を及ぼすメカニズムを明らかにしている(PMID:33669065)。さらに長寿医療研究開発費の前課題(21-6)では、加齢および糖・脂質代謝に関与するキナーゼである AMPK が唾液分泌量やウイルス感染に関与する唾液中タンパク (Angiotensin-converting enzyme 2(ACE2)・Transmembrane protease, serine 2(TMPS2))に及ぼす影響を見出し、論文発表した(PMID: 39865553)。

唾液分泌および炎症の制御には、交感神経と副交感神経で構成される自律神経が重要な役割を担っている。唾液腺では交感神経刺激により粘性(ネバネバ)唾液が、副交感神経刺激により漿液性(サラサラ)唾液が分泌され、加齢に伴い交感神経優位になる事で唾液の質が変化・分泌量も低下し、口腔乾燥感に繋がると考えられている。近年、免疫制御に重要な神経として迷走神経が注目されており、この神経を刺激する事により炎症性疾患の病態が制御できる事が動物実験で多数報告されている。迷走神経は副交感性線維を含んでおり、嚥下機能、唾液分泌機能にも関与していることから、高齢者の口腔機能維持・向上には副交感神経がターゲットになると考えられる。オメガ 3 脂肪酸の摂取が多い被験者は副交感神経優位になることが報告されており(PMID:25869497, 18285566)、摂取する脂肪酸を介した自律神経調節の可能性も示唆されている。

以上の背景から、高齢者において唾液腺機能低下が生じる原因を自律神経系・免疫系・唾液腺組織細胞の老化といった視点から、栄養学的、神経生理学的に解析し、その結果をもとに新しい口腔機能の維持・向上法をヒト臨床試験で探索することを目的とする。

B. 研究方法

(1) 全体計画

本研究では、高齢者において唾液腺機能低下が生じる原因を自律神経系・免疫系・唾液腺組織細胞の老化といった視点から、栄養学的、神経生理学的に解析し、その結果をもとに新しい口腔機能の維持・向上法をヒト臨床試験で探索する計画である。

(2) 年度別計画

2024 年度

①マウス唾液腺上皮細胞の複製老化による神経伝達物質受容体発現の変化(四釜)

マウス唾液腺上皮細胞の初代培養を試みた。3 週齢 C57BL/6N マウスから唾液腺(顎下腺および舌下腺)を摘出し、gentle MACS Dissociator(ミルテニー)により分散した。その後 EpCAM(CD326)結合磁気ビーズを用い上皮細胞を単離し、5%CO₂ incubator で培養した。継代を 9 回行い、遺伝子発現を real-time PCR 法、タンパク発現を western blot 法、免

疫細胞染色法、フローサイトメトリー法で解析した。

②細胞老化が部分的上皮間葉転換(EMT)を介し唾液腺線維化およびリンパ球集積に及ぼす影響（四釜）

上皮間葉転換(epithelial-mesenchymal transition ; EMT)とは上皮細胞が間葉系細胞の形質を獲得する現象であり、初期胚の発生、臓器形成、組織修復時などでみられるが、病理学的には組織の線維化、がんの浸潤や転移に関与している。①同様、マウス唾液腺上皮細胞を複数回継代することにより複製老化を誘導した。上皮マーカー、間葉マーカー、その他遺伝子・タンパク発現をPCR アレイ、real-time PCR 法、western blot 法、免疫細胞染色法で解析し、*in vivo* での発現を免疫組織化学染色法により評価した。

③臨床応用を見据えた迷走神経刺激マウスモデルの構築（中村）

現在臨床応用されている迷走神経刺激によるニューロモデュレーション法として、カフ電極と電源を体内に取り付け、左側頸部迷走神経を刺激する方法があるが、外科的侵襲が伴ってしまう。動物モデルではラットが良く用いられるが、分子生物学的な解析に用いる抗体等を考慮するとマウスでのモデル構築が理想となる。さらに非侵襲でのニューロモデュレーション法を確立するため、迷走神経耳介枝をターゲットとしたマウスモデル構築を目指す。電気刺激装置およびアイソレーターについては株式会社ミユキ技研に、刺激電極については株式会社ユニークメディカルに相談し、動物実験に関しては主任研究者の四釜とともに実施する。

④ヒト迷走神経耳介枝の電気・温熱刺激の唾液分泌促進作用に関する臨床試験（村上）

例えば酸っぱいもの食べて唾液分泌が促進される神経経路は下記の通りである。

1. 味覚刺激が延髄の孤束核に入力
2. 孤束核から介在ニューロンを介し唾液核(上唾液核・下唾液核)へ投射
3. 唾液核から副交感神経線維を介した(サラサラ)唾液分泌促進

すなわち孤束核への入力が重要であると考えられる。本研究では、温熱刺激または電気刺激により迷走神経耳介枝を刺激することで唾液分泌が促進するか、臨床研究をおこなうことを目的とする。歯科・口腔外科を受診し同意を得た 65 歳以上の高齢者を対象とし、歯科治療中に温熱・電気刺激をおこない、その後安静時の唾液分泌量を測定する。

(倫理面への配慮)

【動物実験】

実験動物の取り扱いについては使用する動物の苦痛軽減や安楽死の方法等、動物実験倫理の 3R（削減:Reduction、代替:Replacement、苦痛軽減の為の改善:Refinement）を徹底する様に努める。なお、国立長寿医療研究センター動物実験倫理委員会の承認を得てか

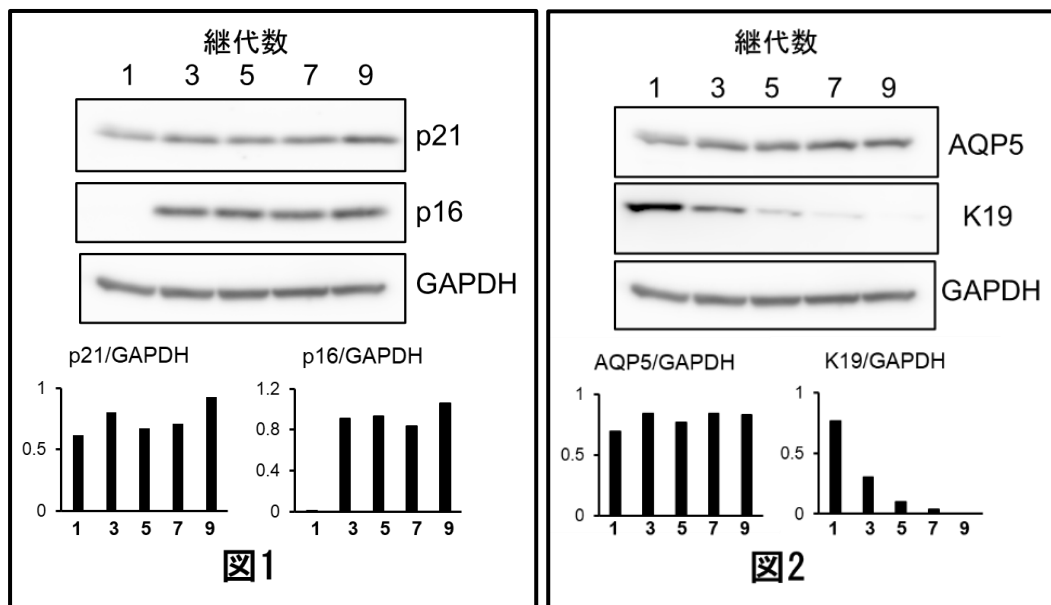
ら実施する。

【臨床試験・個人情報】

国立長寿医療研究センター倫理・利益相反委員会に申請準備中であり、承認後実施する。検体採取は、口頭・文書による説明後、本試験参加について本人の自由意思による同意(インフォームドコンセント)を文書で取得した場合のみ行い、解析に用いる。患者検体を用いた実験の記録は個人情報を匿名化し、専用のPC端末でデータを管理する。これらサンプルを用いた研究成果を学会や学術雑誌等で発表する場合は、被験者のプライバシー等に十分配慮し、関係法令指針を遵守しデータを取り扱う。研究計画に変更が生じた場合は、新たに上記各種委員会の承認を得た後に実施する。

C. 研究結果

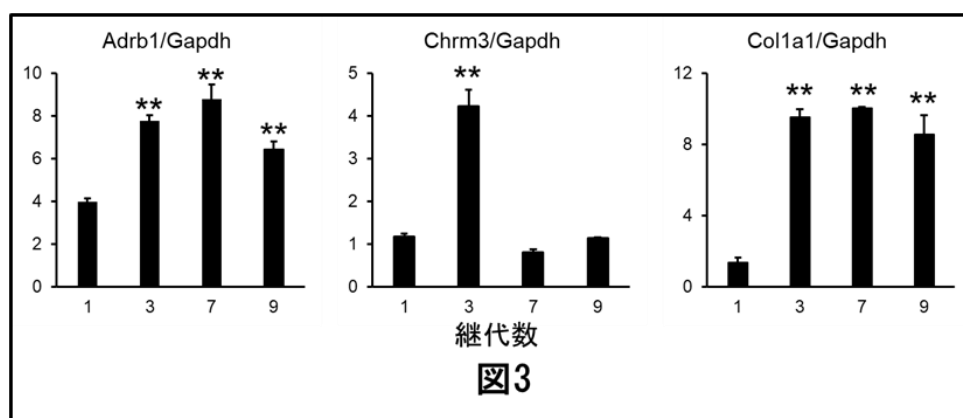
①マウス唾液腺上皮細胞の複製老化による神経伝達物質受容体発現の変化（四釜）



老化マーカーである p21 タンパクは継代を重ねるに従い徐々に発現増加する傾向を示したが、p16 はその発現が 3 回の継代で著しく上昇し、その後継代を重ねても発現レベルに大きな変化は確認されなかった (図 1)。唾液腺には上皮細胞として、唾液を産生する腺房細胞、その唾液を口腔まで運ぶ導管細胞があり、それぞれのマーカーとしてアクアポリン 5 (AQP5)、およびケラチン 19 (K19) が知られている。これらタンパク発現を解析した結果、両タンパクの発現が確認された。また、AQP5 の発現レベルは継代数に依存せずほぼ一定であったが、K19 は継代数に依存して発現レベルが減少した (図 2)。これら結果から、この初代培養細胞には、腺房、導管両細胞が存在し、導管上皮細胞は複製老化により上皮細胞としての形質を失う、すなわち EMT が誘導される可能性が示

唆された。腺房細胞で産生される唾液は自律神経により制御されており、交感神経刺激によりタンパクの多いネバネバ唾液、副交感神経刺激により水分・イオンの多いサラサラ唾液が分泌される。神経伝達物質受容体の遺伝子発現を解析した結果、交感神経受容体 (Adrb1) 発現は 3 回継代以降高いレベルを維持していたが、副交感神経受容体 (Chrm3) は 3 回の継代でピークになり、その発現レベルは低下した。また、線維化マーカー (Col1a1) 発現は 3 回継代以降高いレベルを維持していた (図 3)。

以上から、細胞老化により腺房細胞は交感神経刺激に対する感受性が高くなり、導管上皮細胞の EMT やコラーゲン産生により線維化が誘導される可能性が示された。



②細胞老化が部分的 EMT を介し唾液腺線維化およびリンパ球集積に及ぼす影響 (四釜)

①と同じ細胞を用いた解析から、複製老化を誘導すると間葉系マーカーである Vimentin の発現は増加 (図 4) し、この結果は細胞老化に伴い EMT が誘導されることを示唆している。この間葉転換した細胞が直接線維化の原因になるのであれば、導管の基底膜を破壊・間質への移動が必要となるため、基底膜の構造解析が今後の検討課題である。一方で、基底膜が完全に破壊されていなくても、間接的に周囲の線維化・リンパ球浸潤を誘導する可能性もある。すなわちこれは部分的 EMT という概念であり、EMT による分泌形質の変化が基底膜を通過し、間質細胞へ作用することにより線維化・リンパ球浸潤を促進する。この可能性を検討するために、1 回および 10 回継代した唾液腺上皮細胞の遺伝子発現を PCR アレイで比較したところ、10 回継代群で部分的 EMT マーカーである TWIST1、線維化・リンパ球浸潤を促進する SPARC, SERPINE1 発現の上昇が確認された。免疫組織化学染色法により検証したところ、若齢マウスと比較し老齢マウス唾液腺で TWIST1 および SPARC 発現が上昇していた。以上により、加齢に伴う唾液腺の線維化・リンパ球集積に上皮細胞の部分的 EMT が関与している可能性が示唆された。

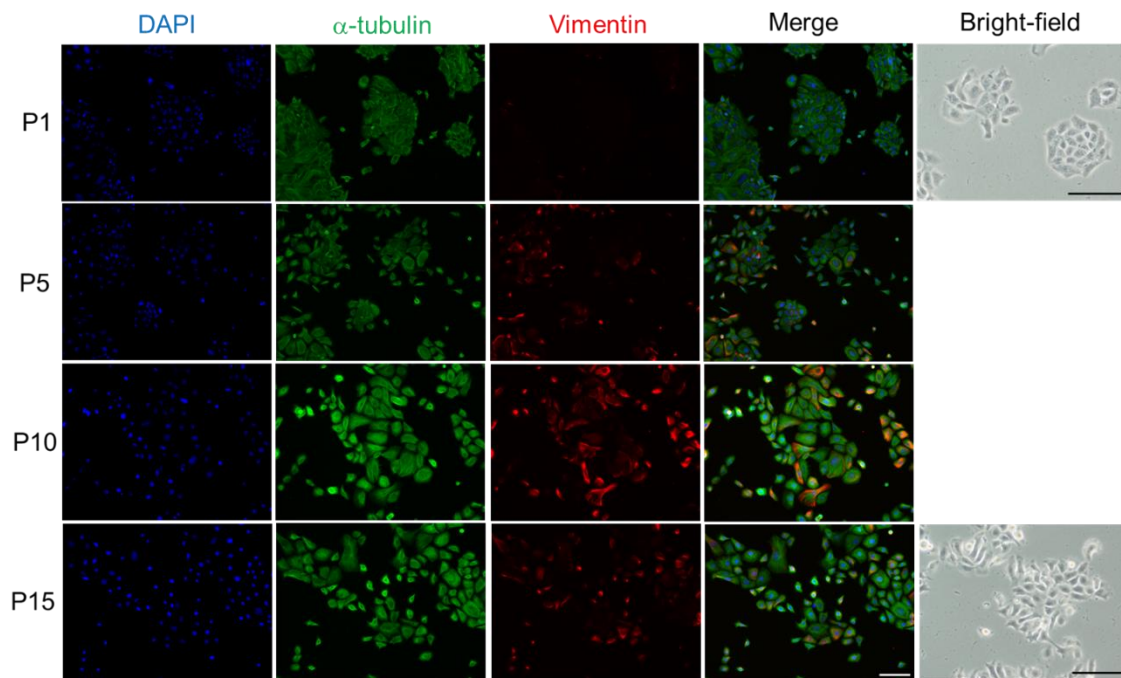


図4: 複製老化に伴うVimentinの発現上昇

③臨床応用を見据えた迷走神経刺激マウスモデルの構築（中村）

18 か月齢(老齢)マウスはイソフルラン(導入時 2%、維持時 1.5%)で 30 分間吸入麻酔する。麻酔中は加温パッドを用いて正常体温を維持する。耳介経皮的迷走神経刺激は心臓への影響を避けるために、2mm 径の皿電極は左耳の耳甲介に装着する。これは、迷走神経の右枝が洞房結節を支配しており、心拍数に悪影響を及ぼす可能性があるためである。Sham (偽刺激) 群では、電極は左耳介の耳輪に装着し、迷走神経耳介枝の支配領域外を刺激する。未刺群では、マウスは麻酔のみで、電気刺激は行わない。矩形の双極性パルスは、電気刺激装置を用い、矩形の双極性パルス、刺激パラメータは、1mA、1 秒あたり 20 パルス、30 秒間の通電(ON)と 5 分間の休止(OFF)を繰り返し、総刺激時間は 30 分、パルス幅は 330 マイクロ秒とするが、適宜微調整する。この刺激を 1 日 1 回、計 3 日おこない、4 日目に刺激唾液分泌量を測定、唾液腺を摘出し、分子生物学的解析を行う。この分子生物学的解析は四釜および口腔疾患研究部研究員が担当する予定である。当該年度は電気生理学的解析に慣れていなかったこともあり、これら条件設定に時間を費やした。次年度より本格的に動物試験を実施する予定である。

④迷走神経耳介枝の電気・温熱刺激による唾液分泌促進作用に関する臨床試験（村上）

先行研究では、健常成人 20~40 代男女に対し、耳介を約 40℃20 分温めると唾液中分泌型 IgA 濃度が有意上昇したという報告(https://www.kobayashi.co.jp/newsrelease/2022/post_23/?utm_source=chatgpt.com)もあるが、唾液分泌量については定かではない。本研究では、スクレーリング(歯石除去)および PMTC(専門的機械歯面清掃)などの歯周基

本治療時に耳介を温熱または電気刺激する。その後、安静時唾液分泌量を測定し、耳介刺激の効果を評価する。当該年度は臨床研究のデザインや倫理申請書類作成に関する打ち合わせ等に時間を費やした。次年度には申請書類の提出・研究参加者のリクルート等おこなっていく予定である。

D. 考察と結論

- ・ 本研究成果から、唾液腺上皮細胞の細胞老化によりノルアドレナリン感受性が強くなり、分泌される唾液の質に影響する可能性が示唆された。
- ・ 複製老化による EMT 誘導は、特に導管上皮細胞で観察され、これは組織学的に観察されるリンパ球集積・線維化の場所と一致していた。
- ・ 部分的 EMT による分泌形質の変化も確認され、これも導管上皮細胞で起きている可能性が示唆された。

次年度は栄養学的、または神経生理学的介入の唾液腺機能への影響を動物モデルで検討していきたいと考えている。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shikama Y, Otsuka K, Shikama Y, Furukawa M, Ishimaru N, Matsushita K. Involvement of metformin and aging in salivary expression of ACE2 and TMPRSS2. BioFactors, 51(1):e2154, 2025.
- 2) Bui TT, Nakamoto M, Yamada K, Nakamoto A, Hata A, Aki N, Shikama Y, Bando Y, Ichihara T, Minagawa T, Tamura A, Kuwamura Y, Funaki M, Sakai T. Longitudinal associations between dietary diversity and serum lipid markers in Japanese workers. Eur J Clin Nutr, 79(3):273-282, 2025.
- 3) Nakamoto M, Torami K, Bui TT, Tojyo A, Yamada K, Nakamoto A, Hata A, Aki N, Shikama Y, Bando Y, Ichihara T, Minagawa T, Tamura A, Kuwamura Y, Funaki M, Sakai T. Associations between dietary diversity and high sensitive C-reactive protein

among Japanese workers: findings of a cross-sectional and longitudinal study.
Eur J Nutr, 63(5):1915-1927, 2024.

- 4) Bui TT, Nakamoto M, Yamada K, Nakamoto A*, Hata A, Aki N, Shikama Y,
Bando Y, Ichihara T, Minagawa T, Tamura A, Kuwamura Y, Funaki M, Sakai T.
Associations between dietary diversity and dyslipidemia among Japanese
workers: cross-sectional study and longitudinal study findings.
Eur J Nutr, 63(6):2109-2120.

2. 学会発表

- 1) 四釜洋介、大塚邦紘、石丸直澄、松下健二
唾液腺 ADAM17 発現に対する肥満・加齢の影響とメトホルミンの効果.
第 66 回歯科基礎医学会学術大会、2024 年 11 月 4 日、長崎

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