

## 長寿医療研究開発費 2025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、老齢マウスを用いた解析結果から、加齢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・電気刺激を介した副交感神経刺激によるヒト唾液腺機能の変化を解析することを目的とする。

### 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

吉田 佳世 国立長寿医療研究センター 口腔疾患研究部（研究員）

中村 純也 国立長寿医療研究センター 歯科・歯科口腔外科（歯科口腔外科医師）

村上 正治 国立長寿医療研究センター 歯科・歯科口腔外科（歯科口腔外科医師）

### 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・電気による副交感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、神経生理学的に実験動物・唾液腺上皮初代培養細胞・ヒト唾液腺標本を用いて解析し、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、神経生理学的に実験動物・唾液腺上皮初代培養細胞・ヒト唾液腺標本を用いて解析し、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

#### 2025 年度

##### ①高脂肪食およびオメガ 3 脂肪酸含有飼料の唾液腺機能への影響 (四釜・吉田)

- i) 若齢マウスに通常餌、高脂肪餌、およびアマニ油含有餌を給餌し、唾液・唾液腺をサンプリングし、前年度の研究結果から候補となった遺伝子・タンパクを分子生物学的手法により解析する。
- ii) 老齢マウスに通常餌およびアマニ油含有餌を給餌し、i)同様に解析を行う。給餌開始時には、唾液腺にリンパ球集積・線維化が確認されるため、集積促進・抑制効果を組織学的に検討する。同様に SS モデルマウスを用いた解析も予定している。神経伝達物質や

その合成に関与する酵素発現、神経終末と神経伝達物質受容体の位置関係も組織学的に解析する。

## ②迷走神経刺激モデルや温熱刺激を用いた唾液分泌量・質の変化の解析（四釜・吉田）

埋め込み式や可撤式デバイスまたはオプトジェネティクスを用い、ラット（マウス）覚醒下で迷走神経を刺激し、唾液・唾液腺の解析を試みる。手技的に困難な場合は、温熱刺激による副交感神経刺激の効果を解析する。

唾液腺解析に関しては、Visium 空間解析を用い網羅的に分析後、real-time PCR 法や western blotting 法を用いた定量分析を行う。唾液を用いた実験は、①i)同様に解析する。

（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た。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した。

### 【臨床試験・個人情報】

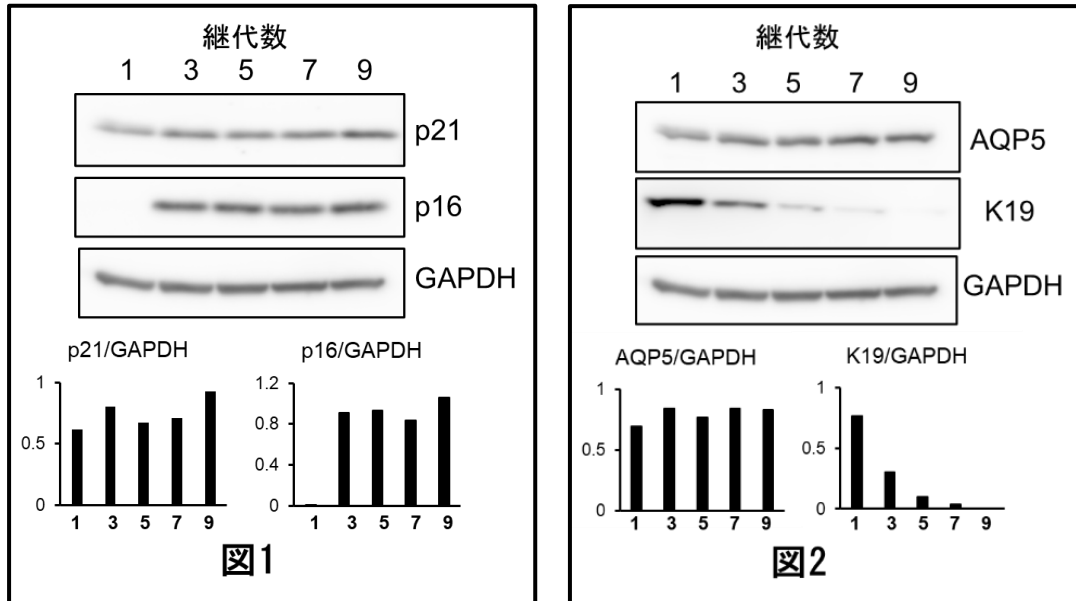
ヒト小唾液腺（口唇腺）未染標本の二次利用については、国立長寿医療研究センター倫理・利益相反委員会の承認を得ている（No.1763）。

他の生体試料・臨床データについては申請準備中であり、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。

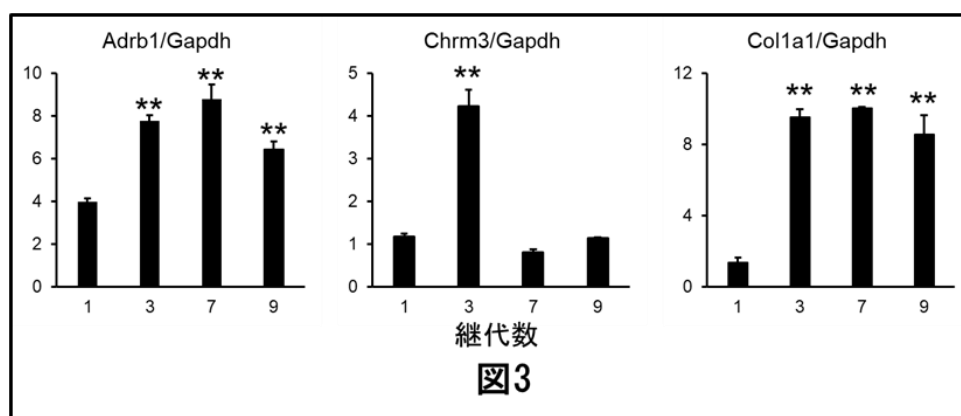
### C. 研究結果

#### 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と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低下した(図 2)。これらの結果から、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(Epithelial-Mesenchymal Transformation)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唆された。



## 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** の発現が増加(図 4)し、この結果も細胞老化に伴い **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。

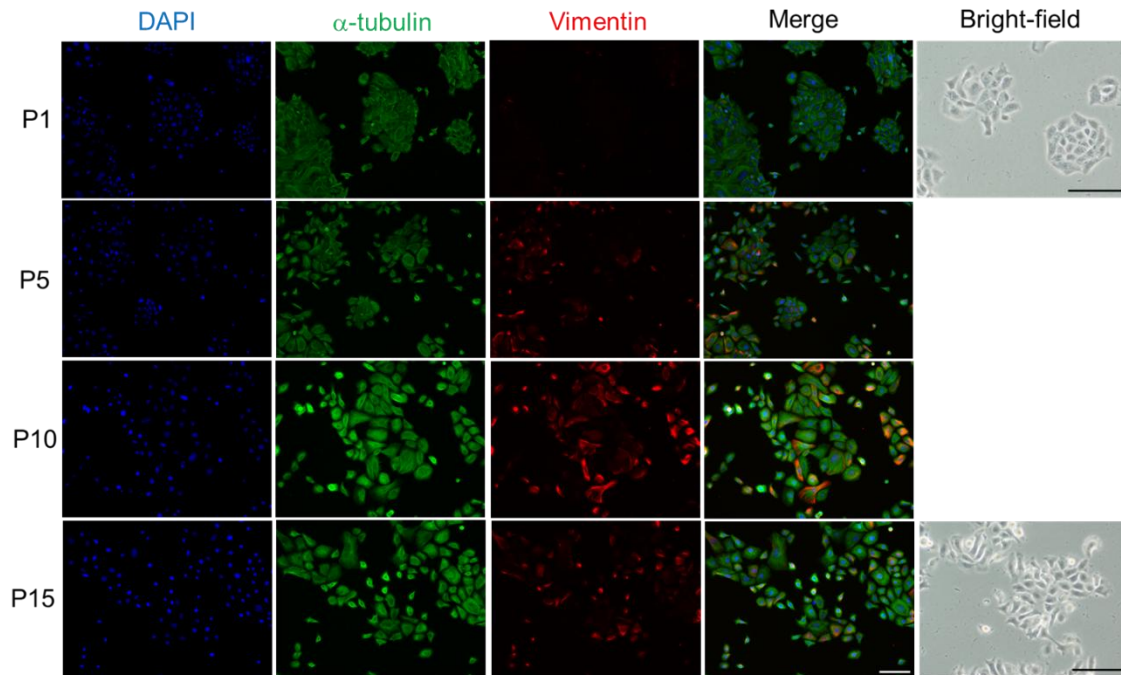


図4: 複製老化に伴うVimentinの発現上昇

### ③加齢および高脂肪食負荷が唾液腺 lipocalin-2(LCN2)発現に及ぼす影響（四釜、吉田）

LCN2 は好中球ゼラチナーゼ関連リポカリンとしても知られ、免疫・炎症反応に関与する。LCN2 は、細菌感染時に鉄を隔離することによって作用する抗菌タンパク質としても機能し、最近では腎臓や骨髄、皮膚、さらに唾液腺など様々な臓器や組織において多様な病態生理学的機能をもつことが報告されている。一方で中枢神経系では、アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患患者において LCN2 の増加が観察され、最終的にこれらの疾患の神経病態生理を悪化させると考えられている。この LCN2 は脳グリア細胞で産生されるものと、血中 LCN2 が血液脳関門を介する 2 つの経路が考えられている。加齢および肥満はアルツハイマー病のリスク因子、かつ血中 LCN2 レベルを増加させることが知られているため、本テーマでは唾液腺および口腔粘膜における LCN2 発現に及ぼす影響を解析することを目的とした。組織学的解析から、老齢マウス唾液腺では若齢マウスと比較し漿液腺房細胞基底側で、口腔粘膜においては特に被覆粘膜の上皮細胞基底側で LCN2 発現が増加していた。唾液 LCN2 も若齢と比較し、老齢マウスで約 6 倍高い濃度であった。10 週間高脂肪食を負荷したマウス唾液腺においても、LCN2 発現が増加していた。以上の結果から、加齢および高脂肪食負荷により唾液腺 LCN2 発現は増加することが明らかとなった。

また、唾液腺や口腔粘膜初代培養細胞を用いて、細胞老化が LCN2 発現に及ぼす影響を解析した。複製老化およびドキシソルビシンによる DNA 損傷誘導性細胞老化モデルで検討したが、興味深いことに細胞老化により LCN2 発現増加は誘導されなかった。この理由として、我々は生体では上皮細胞近傍に存在する線維芽細胞などの間葉系細胞

胞からの SASP(senescence-associated secretory phenotype)因子が LCN2 発現を誘導しているのではと考えた。そこで SASP 因子の一つである interleukin(IL)-1b で刺激すると、たとえ細胞老化している上皮細胞であっても LCN2 発現増加が誘導された。これら結果の一部を論文発表した(PMID:41708343)。

一方で高脂肪食負荷を模すために、唾液腺上皮細胞を飽和脂肪酸の 1 つであるパルミチン酸で刺激すると LCN2 タンパク発現が誘導された。さらに *in vivo* で唾液腺に対する高脂肪負荷と加齢の影響を検討することにした。すなわち、若齢マウスに 10 週間高脂肪食を負荷したのち、通常食に戻し、1 年飼育した。高脂肪食負荷 10 週間後、唾液分泌量を測定すると、通常食群と比較し、有意に唾液分泌量が減少していた。さらに 1 年経過後、高脂肪食非負荷群と体重に有意な差は確認されなかったが、唾液分泌量は高脂肪食負荷群で有意に減少していた。この唾液腺を脂肪滴関連タンパクである Perilipin-2 抗体および LCN2 抗体で組織学的に解析すると、高脂肪食負荷群で発現が増加していた。

以上の結果から、高脂肪食負荷(肥満)の影響は唾液腺に残存し得る可能性が示唆された。

#### ④唾液腺オルガノイド作製プロトコルの構築 (四釜、吉田)

唾液腺オルガノイド研究の第一人者である、昭和医科大学歯学部口腔病理学の美島健二教授にご協力いただき、四釜が現地で作製法を学び、当研究部で作製を試みたが現時点で再現に至っていない。原因は調査中であるが、当面は上記マウス唾液腺初代培養細胞を用い研究を進めていく予定である。

#### ⑤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、四釜)

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、吉田が担当する。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。また、⑥にも記載したが、臨床応用されている経皮的耳介迷走神経刺激装置(taVNS)は、個人差もあるが疼痛を伴うこともあるため、今後は温熱刺激や栄養学的に自律神経に介入する方法も動物モデルを用い検討する予定である。具体的には、温熱刺激に関しては、小型温

熱プローブを表面温度：40℃に設定し、刺激パターン：30 秒 ON/5 分 OFF、総刺激時間 30 分を 1 日 1 回×3 日間、迷走神経耳介枝の支配領域に刺激を行った後、刺激唾液分泌量の測定、唾液腺の分子生物学的解析を行う。栄養学的アプローチでは、食餌内容（高脂肪食／普通食）と咀嚼刺激の有無（固形/粉砕）を独立した要因として 2×2 要因実験を行い、刺激唾液分泌量および唾液腺を評価することで、栄養と咀嚼が自律神経を介して唾液腺機能に及ぼす影響を明らかにする。

#### ⑥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、四釜）

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](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、スケーリング(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。また、taVNS のデモ機を借り、実際に使用してみたが、一般的な出力モードでも若干疼痛を伴った。メーカー担当者の話では個人差があるとのことだったが、疼痛を伴ってしまうと本来目的としている効果が得られない可能性があるため、今後は温熱刺激および栄養学的介入を主軸に検討しようと考えている。唾液分泌が低下し口腔内が乾燥していると、本来持っている口腔機能を十分に発揮できていない可能性がある。今後は、耳介刺激による唾液分泌促進が口腔機能全体に及ぼす影響に着目した検討を行いたい。自律神経活動指標や唾液成分に加え、舌圧、咀嚼機能、舌口唇運動機能、咬合力、嚥下機能、口腔衛生状態などの口腔機能指標との関連を評価する。

#### D. 考察と結論

- ・本研究により、新たな脳-唾液腺関連メカニズムとして、加齢・肥満に起因する唾液腺 EMT や LCN2 発現・分泌増加が認知機能に及ぼす影響が明らかになれば、認知症・オーラルフレイル予防において、唾液腺機能の重要性を示すことができ、自律神経をターゲットとした温熱刺激や栄養学的介入法の開発に繋がると考えられる。
- ・今後は自律神経の神経伝達物質が唾液腺 LCN2 発現に与える影響、また LCN2 が神経伝達物質受容体機能に与える影響も検討したいと考えている。
- ・加齢・肥満に起因する唾液腺 LCN2 発現誘導メカニズムは異なると考えられることから、その適切な介入法も異なる可能性が示唆された。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakamoto M, Yamada K, Bui TT, Nakamoto A, Hata A, Aki N, Shikama Y, Bando Y, Ichihara T, Minagawa T, Kuwamura Y, Funaki M, Sakai T.  
Association between total soy product intake and metabolic syndrome in middle-aged Japanese workers: Cross-sectional and longitudinal study findings.  
J Med Invest, 72(3.4):343-353, 2025.
- 2) Shikama Y, Yoshida K, Shikama Y.  
Impact of cellular senescence on LCN2 expression in salivary gland epithelial cells and oral keratinocytes.  
BioFactors, 52(1):e70087, 2025.

2. 学会発表

1) 四釜洋介

唾液腺・歯肉上皮の細胞老化と組織慢性炎症・線維化の関連性  
シンポジウム 2 ” 高齢者の口腔内変化を考えるー2040 年問題に向けてー”  
第 162 回日本歯科保存学会 2025 年度春季学術大会, 2025 年 6 月 5 日, 松山 (ハイブリッド開催)

2) 四釜洋介, 吉田佳世、大塚邦紘、石丸直澄

加齢および自己免疫疾患に起因する唾液腺の線維化・リンパ球集積に対する上皮間葉転換(EMT)・partial EMT の関与  
第 67 回歯科基礎医学会学術大会, 2025 年 9 月 7 日, 北九州

3) 四釜洋介

唾液腺 ACE2・TMPRSS2 発現に対する加齢の影響: メトホルミンによる制御  
第 4 回日本唾液ケア科学会学術集会, 2025 年 11 月 23 日, 横浜

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