

長寿医療研究開発費 平成26年度 総括研究報告（総合報告及び年度報告）

唾液腺ホメオスタシス維持機構の破綻による唾液腺機能低下メカニズムの解明
(24-13)

主任研究者 山越 貴水 国立長寿医療研究センター 老化機構研究部（室長）

研究要旨

3年間全体について

加齢による口腔乾燥症状（ドライマウス）の増加原因を解明するアプローチとして、唾液を分泌する唾液腺の一つである顎下腺に焦点を当てて研究を進めた。動物モデルを用いた解析から、加齢による顎下腺機能低下の分子機序の一つとして、ポリコーム蛋白質 **Bmi-1** による癌抑制遺伝子 **p16** の発現調節機構の破綻が関与していることが明らかになった。これらの知見は、口腔乾燥症の将来の治療に寄与することが期待された。

平成26年度について

平成26年度は、**Bmi-1** 遺伝子欠損マウスで観察される唾液分泌量の減少が **Bmi-1** に加えて **p16** を欠損させることで唾液分泌量の減少が一部回復することを明らかにし、顎下腺の恒常性維持に **Bmi-1/p16** 制御経路が重要であることを証明した。

主任研究者

山越 貴水 国立長寿医療研究センター 老化機構研究部（室長）

分担研究者

なし

研究期間 平成24年4月1日～平成27年3月31日

A. 研究目的

高齢者の多くは口腔乾燥症状（ドライマウス）を示し、生活の質（Quality of life）を低下させる要因となる。加齢により口腔乾燥症状を示すようになる一つの原因として、唾液分泌量の減少が挙げられるが、その実態はよく分かっていない。

唾液を産生する唾液腺には組織を構成する細胞を供給する源となる幹細胞が存在する。老齢個体では様々な組織に存在する組織幹細胞の機能が低下していることが報告されているが、唾液腺幹細胞については全く解析されていないため、唾液腺幹細胞と加齢に伴う唾液腺の機能低下との関係については不明である。

本研究では、唾液腺の一つで唾液分泌の大部分を担う顎下腺の幹/前駆細胞に着目し、加齢に伴う顎下腺幹/前駆細胞の機能低下が唾液腺ホメオスタシスを破綻させ、唾液分泌量の減少等を引き起こす原因となるか、また、顎下腺幹/前駆細胞の機能が加齢に伴い低下する詳細な分子メカニズムを明らかにすることを目的にしている。

B. 研究方法

3年間全体について

加齢による顎下腺の組織形態学的変化及び顎下腺細胞数を調べるために、野生型マウス（若齢、老齢）の顎下腺を用いてヘマトキシリン&エオジン染色及び酵素処理による顎下腺細胞の分離を行った。また、顎下腺幹/前駆細胞機能における加齢の影響を評価するため、*in vitro* 顎下腺幹/前駆細胞モデルを用いて、若齢マウス群と老齢マウス群から形成される胚葉体の数、サイズ、増殖能、自己複製能や分化能について比較・検討を行った。

これまでの研究から、私達はポリコーム蛋白である **Bmi-1** が顎下腺機能に重要な役割を果たしていることを示唆する知見を得ている。そこで、**Bmi-1** の標的遺伝子であると同時に、加齢により様々な組織で発現上昇することが知られている **p16** との **Bmi-1/p16** 制御経路が顎下腺の恒常性維持に必要であるかどうかを調べるために、顎下腺や顎下腺幹/前駆細胞における **Bmi-1** と **p16** の蛋白レベル、mRNA レベルでの発現、**p16** 遺伝子領域への **Bmi-1** の結合状態等を *in vivo* **ChIP**により解析した。また、若齢マウスの顎下腺から単離した顎下腺細胞へレトロウイルスベクターを用いて **p16** 遺伝子導入を行い、**p16** を過剰発現させた際の胚葉体のサイズ、増殖能力や分化能力を **BrdU** 取り込み率や **3D** コラーゲンゲル包埋培養方法を用いて評価した。

平成26年度について

顎下腺の恒常性維持に **Bmi-1/p16** 制御経路が重要であることを証明するために、**Bmi-1** 遺伝子欠損マウスと **p16** 遺伝子欠損マウスを交配し、**Bmi-1** 遺伝子と **p16** 遺伝子の両方を欠損させた **Bmi-1;p16** ダブルノックアウトマウスを作製した。作製したダブルノックアウトマウスを用いて唾液分泌量や顎下腺細胞数の測定及び組織形態学的解析を行った。

(倫理面への配慮)

動物実験に際しては、国立長寿医療研究センター動物実験倫理委員会及び遺伝子組換え実験安全委員会で承認を受けた後に独立行政法人国立長寿医療研究センター動物実験規則及び遺伝子組換え実験安全規定に則り実施した。

C. 研究結果

3年間全体について

若齢個体と老齢個体を用いた顎下腺の組織学的解析と顎下腺細胞数の解析から、加齢により顎下腺細胞数が減少することが示され、老齢群において認められた唾液分泌量の減少は、唾液を分泌する実質細胞数の減少により生じる可能性のあることが示唆された。顎下腺幹/前駆/実質細胞の機能解析では、加齢により増殖能力、分化能力や自己複製能力が低下するだけでなく、実質細胞の増殖能の低下により実質細胞数が減少することが示唆された。

ポリコム複合体構成因子の一つである Bmi-1 は p16 遺伝子領域のメチル化されたヒストン H3 の 27 番目のリジン残基(H3K27me3)を認識して結合することにより、p16 遺伝子の転写抑制状態を維持している。私達は既に Bmi-1 遺伝子を欠損したマウスの顎下腺では p16 のレベルが著しく上昇すると同時に、唾液分泌量も顕著に減少することを見出している。加齢により顎下腺での p16 レベルは著しく上昇することから、加齢過程において Bmi-1/p16 制御経路に異常が生じているかどうかを ChIP 解析により調べたところ、老齢群では p16 遺伝子プロモーター領域周辺の H3K27me3 レベルと Bmi-1 レベルが減少した。また、加齢による Bmi-1/p16 制御機構の破綻は顎下腺幹/前駆細胞においても認められ、p16 により活性化される細胞周期ストッパー Rb 蛋白質の不活性化型であるリン酸化 Rb 蛋白質は老齢群において減少した。すなわち、加齢により Bmi-1 による p16 の発現抑制機能が破綻することで p16 の転写抑制状態が解除され p16 の発現が上昇した結果、Rb 蛋白質が活性化されることが示唆された。更に、p16 を過剰に発現した顎下腺幹/前駆細胞を作製し、これらの細胞の増殖能力や分化能力を調べた。p16 を過剰発現した胚葉体はコントロールに比べて増殖能力と分化能力が低下した。

平成 26 年度について

Bmi-1 遺伝子と p16 遺伝子の両方を欠損したダブルノックアウトマウスでは、Bmi-1 シングルノックアウトマウスで認められる唾液分泌量と顎下腺細胞数の著しい減少が一部回復し、組織形態学的解析からもダブルノックアウトマウスの顎下腺は Bmi-1 シングルノックアウトマウスに比べて野生型マウスの顎下腺の組織形態に少し近くなった。

D. 考察と結論

頭頸部領域の悪性腫瘍に対する放射線治療は正常な唾液腺組織を傷害し、結果として唾液分泌障害を引き起こし患者の **Quality of life(QOL)**に重大な影響を及ぼす。低線量の照射により損傷が一過的である場合には、機能的な唾液腺組織が再構築され唾液分泌が回復することから唾液腺幹細胞の役割は非常に重要である。本研究により、*in vitro*において唾液腺の一つである顎下腺の幹/前駆細胞は加齢により幹細胞の特徴である自己複製能力や分化能が低下することが示され、放射線治療後の唾液分泌の回復に年齢を考慮したケアが必要になってくるかもしれないことが示唆された。また、本研究は加齢により顎下腺機能が衰えるメカニズムの一つとして、ポリコーム蛋白質 **Bmi-1** による癌抑制遺伝子 **p16** の発現制御機構の破綻が関与していることを明らかにした。実際には、加齢による口腔乾燥症状の増加原因として筋力の低下、糖尿病やストレスなどの病因が複合的に作用しているものと考えられ、今後、口腔乾燥症状の発症原因を解明していく上で、本研究から明らかになった事実とこれらの病因との関わりを考慮しながら研究を進めていく必要がある。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

平成26年度

- 1) Yamakoshi, K., Katano, S., Iida, M., Kimura, H., Okuma, A., Ikemoto-Uezumi, M., Ohtani, N., Hara, E., Maruyama, M. Dysregulation of the Bmi-1/p16^{Ink4a} pathway provokes an aging-associated decline of submandibular gland function. **Ageing Cell**, (2015), in press, DOI: 10.1111/accel.12337

平成25年度

- 1) Doi, R., Endo, M., Yamakoshi, K., Yamanashi, Y., Nishita, M., Fukada, S., Minami, Y. Critical role of Frizzled1 in age-related alterations of Wnt/ β -catenin signal in myogenic cells during differentiation. **Genes Cells**, 19(4), 287-296, (2014)

2. 学会発表

平成26年度

- 1) Iida, M., Katano, S., Kimura, H., Maruyama, M., Yamakoshi, K. Dysregulation of the Bmi-1/p16^{Ink4a} pathway provokes aging-associated decline of submandibular gland function. 第37回日本基礎老化学会大会, 2014年6月

27日(愛知)

- 2) 山越貴水. 唾液腺の制御機構と老化, 第56回日本老年医学会学術集会 シンポジウム, 2014年6月12日(福岡) 招待講演

平成25年度

- 1) Yamakoshi, K. The role of p16 in the age-related functional decline of the submandibular gland. 平成25年度 文部科学省 新学術領域研究 公開シンポジウム, 2014年1月31日(東京)
- 2) Yamakoshi, K., Katano, S., Kimura, H. The role of p16^{INK4a} in the age-related functional decline of the submandibular gland. 文部科学省新学術領域研究「上皮管腔組織形成」第1回国際会議, 2013年6月23日(札幌)
- 3) 山越貴水, 片野諭, 木村広美, 丸山光生, van Louizen Maarten. 加齢過程での顎下腺組織機能低下における p16^{Ink4a} の役割, 第65回日本細胞生物学会 シンポジウム, 2013年6月21日(名古屋)

平成24年度

- 1) Katano, S., Kimura, H., Ohtani, N., Hara, E., Maruyama, M., Yamakoshi, K. p16^{Ink4a} contributes to the age-dependent fate of stem/ progenitor cells in the submandibular gland. Gordon Research Conferences Salivary Glands & Exocrine Biology, 2013年2月4-5日(米国テキサス州ガルベストーン市)
- 2) Yamakoshi, K. Role of p16^{INK4a} in the age-related functional decline of the submandibular gland. KEYSTONE SYMPOSIA Aging and Diseases of Aging, 2012年10月25日(東京)

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