

長寿医療研究開発費 平成27年度 総括研究報告

口腔乾燥症の原因究明とその予防・克服に向けた基礎研究（27-15）

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

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、唾液腺の一つで口腔内へ唾液を分泌する役割を担う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、加齢により、顎下腺において粘性物質の主要な成分であるムチンが増加することが示された。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。

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

A. 研究目的

高齢者の多くは口腔乾燥症状（ドライマウス）を示すことが様々な研究により明らかになっている。この原因を究明するべく、主任研究者が H24-26 年度の長寿医療研究開発費（課題番号 24-13）「加齢に伴い唾液腺組織機能が低下するメカニズムの解明」において行った研究遂行過程で、加齢による顎下腺組織機能の低下は唾液分泌細胞内に粘性物質を蓄積させることで唾液の量だけでなく唾液の質をも低下させることを見出した。

また、加齢により唾液腺ではリンパ球浸潤を伴う炎症状態が誘導されるが、近年、細胞老化を起こした細胞から炎症反応を誘導する分泌性蛋白質が分泌され周囲の細胞へ影響を及ぼしていることが明らかになってきており、粘性物質が蓄積した唾液分泌細胞においても炎症性蛋白質の発現が高くなっている可能性が考えられる。

そこで、本研究課題では、粘性物質の蓄積が炎症を誘導する可能性や炎症を持続させ病態の慢性化を促進する可能性を追求することにより、新たな観点から加齢による口腔乾燥症状の発症メカニズムを解明することを目的とし、平成 27 年度は、加齢により顎下腺にお

いて増加する粘性物質の実態解明に取り組む。

B. 研究方法

(1) 分子マトリクス電気泳動 (SMME) によるマウス顎下腺の高分子糖蛋白質の分離

Matsuno et al., *Electrophoresis*, 2011 に従い、成体の野生型マウス (若齢、老齢) の顎下腺からサンプル調製を行った。簡単に述べると、顎下腺をアセトン、ウレアで順番にホモジナイズし可溶性画分の蛋白質を定量した。1mg の蛋白質を使用してトリプシン消化後、100 kDa cut フィルターで濃縮したものを SMME に用いた。0.1 M ピリジン/ギ酸緩衝液 (pH 4.0) で SMME を行い、アルシアンブルー染色により検出した。

(2) SMME により分離された高分子糖蛋白質の質量分析 (MALDI-TOF MS) による糖鎖シグナルの分析

SMME により分離した各スポットを切り出し、膜状でのアルカリ還元β脱離により σ グリカンを遊離後、完全メチル化し質量分析により分析した。

(倫理面への配慮)

本研究計画の遂行にあたっては、国立研究開発法人国立長寿医療研究センターにおける遺伝子組換え実験安全規程に従って行われ、適切な拡散防止措置が取られる。動物実験に際しては国立研究開発法人国立長寿医療研究センター動物実験規則に従い行う。

C. 研究結果

(1) 分子マトリクス電気泳動 (SMME) によるマウス顎下腺の高分子糖蛋白質の分離

SMME により高分子糖蛋白質をプロテオグリカン、ヒアルロン酸、ムチンに分離することが可能になるが、マウス顎下腺は酸性ムチンを豊富に含むことが分かった。また、老齢マウスから調製したサンプルの泳動パターンは若齢マウスと顕著に異なり、酸性ムチンが泳動される位置に検出されるスポットは、若齢マウスでは一つであるのに対し、老齢マウスでは二つに分離したスポットが観察された。

(2) SMME により分離された高分子糖蛋白質の質量分析 (MALDI-TOF MS) による糖鎖シグナルの分析

(1) の解析により若齢マウスと老齢マウスの間で違いの認められた 3 つのスポットを切り出し糖鎖組成を分析した結果、全てのスポットからムチン型糖鎖が検出された。老齢

マウスから検出された二つのスポットのうちの一つは若齢マウスの糖鎖組成とかなり類似したパターンを示した。しかし、老齢マウスから検出されたもう一つのスポットからは、若齢マウスと異なり、糖鎖構造末端にシアル酸を付加したシアロ糖鎖が検出された。このことから、老齢マウスのスポットはシアロ糖鎖をもつ酸性ムチンと考えられ、この酸性ムチンのコア蛋白と糖鎖シグナルは若齢マウスや若齢マウスと類似した糖鎖シグナルをもつ老齢マウスのムチンと異なることが推察された。

これらの結果から、加齢によりマウス顎下腺では新たな酸性ムチンが発現するようになることが示唆された。

D. 考察と結論

本年度の研究結果から、加齢により新たな酸性ムチンが発現し、そのムチンの糖鎖構造末端にシアル酸が付加されることが分かった。今後、加齢により発現するようになるムチンのコア蛋白質の種類を同定し、そのムチンが加齢により増加するメカニズムについて検討する予定である。ムチンには分泌型と膜結合型が存在することが知られており、加齢により発現するムチンが生体にとって有利に働く可能性もあるが、一方で口腔内環境の悪化に働いている可能性もあるものと考えている。従って、今後、加齢により発現するムチンの生理学的意義について明らかにしていく必要がある。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sato, S., Kawamata, Y., Takahashi, A., Imai, Y., Hanyu, A., Okuma, A., Takasugi, M., **Yamakoshi, K.**, Sorimachi, H., Kanda, H., Ishikawa, Y., Sone, S., Nishioka, Y., Ohtani, N., Hara, E.
Ablation of the p16^{INK4a} tumour suppressor reverses ageing phenotypes of klotho mice.
Nat. Commun., 6:7035, (2015)

- 2) **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.
Aging Cell, 14(4), 616-624, (2015)

2. 学会発表

- 1) **山越 貴水**, 片野 諭, 飯田 万由, 木村 広美, 大熊 敦史, 池本-上住 円, 大谷 直子, 原 英二, 丸山 光生
加齢に伴う顎下腺機能低下は Bmi-1/p16^{Ink4a} 経路の破綻によって生じる
第 38 回日本基礎老化学会大会
2015 年 6 月 14 日 (横浜)
- 2) **Yamakoshi, K.**, Katano, K., 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.
EMBO Workshop, Developmental Circuits in Aging
2015 年 5 月 26 - 27 日 (ギリシャ、クレタ)

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