

長寿医療研究開発費 平成28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。唾液粘性物質の主要な成分としてムチンが知られており、動物モデルを用いた解析から、①老化により、顎下腺において新たなムチンが発現することが分かった。②老化によりシアロ糖鎖を含有する酸性ムチンが増加することが示された。③シアル酸をムチン糖鎖末端へ付加する幾つかのシアル酸転移酵素遺伝子の発現が老化により上昇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。

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、老化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 28 年度は、動物モデル（老齢マウス）を用いて、老化により顎下腺で起こる現象についての情報を蓄積するため、新たなムコ多糖類（ムチン）が発現するメカニズムと糖鎖構造変化のメカニズムの解明に取り組む。本年度の成果を基に、来年度、口腔乾燥症状の詳細な原因を炎症の側面から明らかにする計画に取り組みたい。

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（再現性の確認）

Matsuno et al., *Electrophoresis*, 2011 に従い、成体の野生型マウス（若齢、高齢）の顎下腺からサンプル調製を行った。簡潔に述べると、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、100kDa cut フィルターで濃縮したものを SMME に用いた。0.1M 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（再現性の確認）

SMME により分離した各スポットを切り出し、膜上でのアルカリ還元β脱離により *o*-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。

（3）老化により新たに発現すると考えられるムチンのコア蛋白質の同定

若齢マウスと老齢マウスの顎下腺を用いて qPCR によるムチン遺伝子の発現解析を行った。次に、候補となるムチンに対する抗体を用いて SMME により作製したメンブレンのブロットを行った。

（4）老化によりムチン糖鎖構造が変化するメカニズムの解明

（3）の分析により予想される糖鎖構造を推測した。老化特異的に働く可能性のあるシアル酸転移酵素遺伝子の発現レベルとシアル酸を切り離す作用をもつ酵素のシアリダーゼ活性について調べた。

（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 (再現性の確認)

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。前年度の解析から、若齢マウスと老齢マウスの泳動パターンは異なり、老齢マウスでは若齢マウスに認められないバンドが検出された。取り扱う糖蛋白質が巨大で SMME の条件設定にも難航したことから、今年度、新たにマウスの個体数を増やして再現性を確かめた。その結果、前年度の解析結果と同様、酸性ムチンが泳動される位置に老化特異的なバンドが検出された。

(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 (再現性の確認)

SMME 解析により、老齢マウスのサンプルにおいてのみ観察されるバンドが酸性ムチンであることを確かめるため、MALDI-TOF MS 分析により糖鎖解析を行った。その結果、バンドからムチン型糖鎖が検出された。従って、SMME により老化特異的に観察されるバンドは酸性ムチンであることが分かった。

(3) 老化により新たに発現すると考えられるムチンのコア蛋白質の同定

ムチンは上皮細胞などから分泌される粘性物質で、コア蛋白質と呼ばれる蛋白質が無数の糖鎖によって修飾されてできた巨大分子の総称である。ムチンのコア蛋白質をコードする遺伝子はマウスではおよそ 20 種類存在することが知られている。質量分析を用いて、老化したマウス顎下腺において新たに発現すると考えられるムチンのコア蛋白質の同定を試みた。しかしながら、ムチンは豊富な糖鎖によって修飾されており、この糖鎖の存在が原因で立体構造解析によるムチンの同定は困難であった。そこで、SMME により作製したメンブレンを用いてムチン抗体によるムチンの検出を試みることにした。ムチンのコア蛋白質をコードする遺伝子はマウスではおよそ 20 種類存在するため、検出に用いる抗体を選択するためのムチンの情報がある程度必要となる。そこで、まず、老化したマウスの顎下腺で新たに発現するムチンをコードするムチン遺伝子を絞り込むため、若齢マウスと老齢マウスの顎下腺を用いて qPCR によるムチン遺伝子の発現解析を行った。その結果、8 遺伝子にまで絞り込むことが出来た。次に、SMME により作製したメンブレンを用いて、候補となるムチンを認識する抗体によりメンブレンをブロットした。現在までのところ、老化特異的に出現するバンドについてムチンの種類を特定できていないが、今後、ムチン抗体の種類を増やすなどして老化により新たに発現するようになるムチンを特定する予定である。

(4) 老化によりムチン糖鎖構造が変化するメカニズムの解明

SMMEにより酸性ムチンと予想されたバンドについて、質量分析法を用いて糖鎖分析を行ったところ、以下のことが明らかとなった。

- ① ムチンの糖鎖は、老齢マウスではシアロ糖鎖が増える傾向にある。
- ② ムチンの糖鎖は、老齢マウスでは長い糖鎖が増える傾向にある。

老化により上記の現象が生じるメカニズムについて調べることにした。まず、①老化によりマウス顎下腺ムチンのシアロ糖鎖が増えるメカニズムについて調べるため、糖鎖解析の結果から予想される糖鎖構造を推測した。シアロ糖鎖は、酸性の糖のシアル酸を含む糖鎖で、シアル酸転移酵素の働きにより通常、糖鎖末端に付加される。そこで、推測される糖鎖構造をもとに、働いている可能性のあるシアル酸転移酵素遺伝子の発現レベルとシアル酸を切り離す作用をもつ酵素のシアリダーゼ活性について調べた。シアリダーゼ活性については、若齢マウスと老齢マウスとの間に違いは認められなかった。一方、シアル酸転移酵素遺伝子については、幾つかのシアル酸転移酵素遺伝子の発現が老齢マウスで有意に上昇していた。このことから、老化により、幾つかのシアル酸転移酵素遺伝子の発現が上昇することによってシアロ糖鎖をもつムチンが増えるものと考えられる。

D. 考察と結論

本年度の研究結果から、老化により、マウスの顎下腺では、新たな酸性ムチンが発現することの再現性が得られた。また、シアロ糖鎖をもつムチンの割合が増加する傾向にあることが前年度の解析から分かっていたが、本年度、ムチンの糖鎖末端へシアル酸を付加する幾つかのシアル酸転移酵素遺伝子の発現が、老化により上昇していることが明らかになった。シアル酸を含むシアロ糖鎖は全般に強い負電荷を帯びており、分子内に水を多く保持できる性質をもつため、酸性ムコ多糖類は高い粘性を示すことが知られている。このことから、老化により、新たなムチンが発現することやシアロ糖鎖を含有する酸性ムチンが増える点が、口腔乾燥症状の大きな特徴の一つとして知られる唾液粘性増加の原因となっていることが示唆される。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 山越貴水

細胞老化と慢性炎症

日本老年医学会雑誌, Vol.53, No.2, 88-94 (2016)

2. 学会発表

なし

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