

長寿医療研究開発費 平成29年度 総括研究報告（総合報告及び年度報告）

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

##### 3年間全体について

老化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、マウス顎下腺において分泌型の新たな酸性ムチンが発現する
  - ②顎下腺ムチンの糖鎖は、老齢マウスではシアロ糖鎖が増える傾向にある
  - ③老齢マウスにおける顎下腺ムチンのシアロ糖鎖の増加は、シアリダーゼ活性の減少ではなく、シアル酸転移酵素遺伝子の発現上昇に起因する可能性がある
  - ④若齢マウスと老齢マウスの顎下腺に共通して発現するムチンは **Prol1/Muc10** である
  - ⑤顎下腺の炎症状態は、シアル酸転移酵素遺伝子の発現を誘導する可能性がある
- 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29年度について

若齢マウスと老齢マウスの顎下腺に共通して観察されたバンドは **Prol1/Muc10** であることが明らかになり、老齢マウスにおいてのみ検出されるバンドと若齢マウスと老齢マウスに共通して検出されるバンドのムチンコアタンパク質は異なることが分かった。また、老齢マウスにおいてのみ検出される酸性ムチンは、分泌型ムチンであることが示唆された。更に、顎下腺において、炎症状態がシアル酸転移酵素遺伝子の発現を誘導する可能性のあることが示唆された。

#### 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

研究期間 平成27年4月1日～平成30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、唾液腺の一つである顎下腺の老化に伴う機能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反応の作用を受けている可能性が考えられる。

そこで、本研究課題では、炎症状態が唾液腺の唾液分泌細胞における粘性物質の蓄積を促進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：動物モデル（野生型老齢マウス）を用いて、老化により、顎下腺において増加する粘性物質の実態解明

平成 28 年度：動物モデル（老齢マウス）を用いて、老化により、顎下腺で新たな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

平成 29 年度：老化により顎下腺で生じる現象と炎症との関係解明

に取り組む。これらにより、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。

## B. 研究方法

3 年間全体について

(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  $\sigma$  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。

平成 29 年度について

(1) ヒアルロン酸結合蛋白質 (HABP) 及び Muc10 抗体を用いた SMME 膜の染色  
SMME 膜を 5%BSA でブロッキング後、ビオチン標識されたヒアルロン酸結合蛋白質 (HABP) (BC41, コスモバイオ) と室温で 1 時間反応させた。PBS-T で洗浄後、SMME 膜を HRP-streptavidin と反応させ、化学発光試薬を用いてシグナルを検出した。

Muc10 抗体を用いた染色については、SMME 膜を 5%BSA でブロッキング後、Muc10 抗体 (ab119999, Abcam) と 4°C で一晩反応させた。PBS-T で洗浄後、SMME 膜を HRP-conjugated Donkey anti-goat IgG(H+L) と反応させ、化学発光試薬を用いてシグナルを検出した。

(2) 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。

(3) 炎症性サイトカイン刺激による培養細胞のシアル酸転移酵素遺伝子発現解析

SCA-9 (mouse submandibular gland neoplasm) 及び MEFs (murine embryonic fibroblasts) 細胞の培養液中に IL-1 $\beta$  を添加し、添加後 30 分から 48 時間まで経時的に細胞を回収した。細胞から RNA 抽出、cDNA 合成を行い、シアル酸転移酵素遺伝子の発現を調べた。

(倫理面への配慮)

3 年間全体について

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

### 3年間全体について

(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。マウス顎下腺サンプルを SMME により分析したところ、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。興味深いことに、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。すなわち、老齢マウスでは若齢マウスに見られない特徴的なバンドが検出された。

この現象について、再現性が得られるかどうかを調べるため、マウスの個体数を増やし同様の実験を行った。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 により老齢マウスにおいてのみ検出されるバンドの糖鎖分析

(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バンド (老齢マウスにおいてのみ検出されるバンド) が酸性ムチンであることを確かめるため、膜からバンドを切り出して糖鎖を遊離し、MALDI-TOF MS により糖鎖分析を行った。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。また、SMME 泳動パターンの再現性を調べた膜の老化特異的バンドからもムチン型糖鎖が検出された。

### (3) ヒアルロン酸結合蛋白質 (HABP) を用いた SMME 膜の染色

(2) の糖鎖分析により、老齢マウスにおいてのみ検出されるバンドは酸性ムチンであることが予想された。このバンドと、更にバンドのすぐ上に検出されるヒアルロン酸と予想されるバンドが近接していることから、老齢マウスにのみ共通して検出されるバンドがヒアルロン酸である可能性を否定するため、ヒアルロン酸に特異的に結合するヒアルロン酸結合タンパク質 Hyaluronan binding protein (HABP) を用いて、ヒアルロン酸の検出を試みた。その結果、ヒアルロン酸と予想されたバンドがきれいに染色され、老齢マウスにのみ共通して検出されるバンドは染色されなかった。従って、老齢マウスにのみ共通して検出されるバンドは、やはりヒアルロン酸でないことが証明された。これらの結果から、マウス顎下腺では、若齢マウスでは発現せず、老齢マウスでのみ発現すると考えられる酸性のムチンが存在することが示唆された。

#### (4) 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。しかし、老齢マウスにおいてのみ検出されるバンドと、特異的に反応する抗体はなかった。

#### (5) SMME により、若齢マウスと老齢マウスに共通して検出されるバンドの糖鎖分析

若齢マウスと老齢マウスに共通して検出されるバンドについて糖鎖分析したところ、O-グリカン（ムチン型糖鎖）を検出すると同時に、これらのバンドは比較的類似した糖鎖プロファイルを示すことが分かった。このことは、若齢マウスと老齢マウスに共通して検出されるバンドはムチンであり、そのムチンのコア蛋白質は同じである可能性を示唆した。

#### (6) Muc10 抗体を用いた SMME 膜の染色

若齢マウスと老齢マウスに共通して検出されるバンド（泳動位置からも糖鎖分析の結果からも酸性ムチンと予想されるバンド）について質量分析を行ったところ、Prol1/Muc10 が候補タンパク質として得られた。そこで、Muc10 に対する抗体を用いて SMME 膜と反応させたところ、バンドは特異的に Muc10 抗体と反応した。このことから、若齢マウスと老齢マウスに共通して観察されるバンドは、Muc10 であることが分かった。

#### (7) 老化により顎下腺で新たに発現する酸性ムチンの糖鎖の殆どはシアロ糖鎖である

(2) の糖鎖分析により、老齢マウスにおいてのみ検出されるバンドから O-グリカンが検出されたが、糖鎖の殆どが、糖鎖の非還元末端に酸性糖の一種のシアル酸が付加したシアロ糖鎖であった。つまり、この結果は、老化特異的に検出されるムチンの糖鎖の殆どは、シアロ糖鎖であることを示唆した。

#### (8) 老化によりシアロ糖鎖の含量が増加するメカニズムの解明

老化により、シアロ糖鎖の含量が増加するメカニズムを明らかにするため、シアル酸を糖鎖末端に付加するシアル酸転移酵素遺伝子の発現と、シアル酸のグリコシド結合を切断するグリコシダーゼのシアリダーゼ活性について調べた。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4つの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、2つのシアル酸転移酵素遺伝子 (ST6GalNAcI 及び ST6GalNAcII) の発現レベルが若齢マウスに比べて老齢マウスの顎下腺において有意に上昇していた。特に、ST6GalNAcI は、老齢マウスでは若齢マウスの約 11 倍の発現量であった。これらの結果から、老化により、マウス顎下腺ではシアル酸転移酵素遺伝子、ST6GalNAcI 及び ST6GalNAcII の発現が高くなることにより、老化特異的に発現する酸性ムチンのシアロ糖鎖の量が増加する可能性が示唆された。

#### (9) 炎症性サイトカイン刺激による SCA-9 及び MEFs 細胞のシアル酸転移酵素遺伝子発現解析

(8) の解析結果から、老齢マウスの顎下腺では、2つのシアル酸転移酵素遺伝子の発現が上昇することが分かった。そこで、老化に伴うシアル酸転移酵素遺伝子の発現上昇が炎症によって誘導される可能性を検討するため、SCA-9 (mouse submandibular gland neoplasm) 及び MEFs (murine embryonic fibroblasts) 細胞に炎症性サイトカイン刺激を与え、シアル酸転移酵素遺伝子発現に対する影響を検討した。SCA-9 及び MEFs 細胞を IL-1 $\beta$  で刺激後、30 分から 48 時間まで経時的に細胞を回収し、シアル酸転移酵素遺伝子の発現を解析したところ、発現変化の見られないシアル酸転移酵素遺伝子もあったが、刺激にตอบสนองして発現が上昇するシアル酸転移酵素遺伝子も幾つか存在した。

#### 平成 29 年度について

##### (1) ヒアルロン酸結合蛋白質 (HABP) を用いた SMME 膜の染色

前年度の SMME 解析結果から、老齢マウスにおいてのみ検出されるバンドは酸性ムチンであることが予想された。このバンドと、更にバンドのすぐ上に検出されるヒアルロン酸と予想されるバンドが近接していることから、老齢マウスにのみ共通して検出されるバンドがヒアルロン酸である可能性を否定するため、ヒアルロン酸に特異的に結合するヒアルロン酸結合タンパク質 Hyaluronan binding protein (HABP) を用いて、ヒアルロン酸の検出を試みた。その結果、ヒアルロン酸と予想されたバンドがきれいに染色され、老齢マウスにのみ共通して検出されるバンドは染色されなかった。従って、老齢マウスにのみ共通して検出されるバンドは、やはりヒアルロン酸でないことが証明された。これらの結果か

ら、マウス顎下腺では、若齢マウスでは発現せず、老齢マウスでのみ発現すると考えられる酸性のムチンが存在することが示唆された。

#### (2) 老化により新たに発現すると考えられる酸性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。前年度、質量分析を用いた老化特異的ムチンのコア蛋白質の同定を試みたが、ムチンを覆う豊富な糖鎖の存在により、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、前年度に引き続き、本年度も SMME により作製したメンブレンを用いて、ムチンを認識する抗体と反応させることでムチンの検出を試みた。前年度、qPCR 法を用いたムチン遺伝子の発現解析から明らかになった、老齢マウスの顎下腺において新たに発現するムチンの候補について、ムチンを認識する抗体の種類を増やすなどしてコア蛋白質の同定を試みたが、やはり、ムチンを特定することはできなかった。

#### (3) Muc10 抗体を用いた SMME 膜の染色

若齢マウスと老齢マウスに共通して検出されるバンド（泳動位置からも糖鎖分析の結果からも酸性ムチンと予想されるバンド）について質量分析を行ったところ、Prol1/Muc10 が候補タンパク質として得られた。そこで、Muc10 に対する抗体を用いて SMME 膜と反応させたところ、バンドは特異的に Muc10 抗体と反応した。このことから、若齢マウスと老齢マウスに共通して観察されるバンドは、Muc10 であることが分かった。

#### (4) 炎症性サイトカイン刺激による SCA-9 及び MEFs 細胞のシアル酸転移酵素遺伝子発現解析

前年度の解析結果から、老齢マウスの顎下腺では、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が分かった。そこで、老化に伴うシアル酸転移酵素遺伝子の発現上昇が炎症によって誘導される可能性を検討するため、SCA-9 (mouse submandibular gland neoplasm) 及び MEFs (murine embryonic fibroblasts) 細胞に炎症性サイトカイン刺激を与え、シアル酸転移酵素遺伝子発現に対する影響を検討した。SCA-9 及び MEFs 細胞を IL-1 $\beta$  で刺激後、30 分から 48 時間まで経時的に細胞を回収し、シアル酸転移酵素遺伝子の発現を解析したところ、発現変化の見られない遺伝子もあったが、刺激に応答して発現が上昇する遺伝子も幾つか存在した。

#### D. 考察と結論

3年間全体について

糖鎖分析の結果から、老齢マウスにおいてのみ検出される SMME 膜のバンドは酸性ムチンであることが示唆された。また、ヒアルロン酸結合蛋白質を用いた SMME 膜の染色においても、老齢マウスの顎下腺においてのみ検出されるバンドは HABP で染まらず、アルシアンブルーでのみ染色された。これらの結果から、マウス顎下腺では、若齢マウスで発現せず、老齢マウスでのみ発現する酸性ムチンが存在すると考えられる。

質量分析とムチン抗体を用いた SMME 膜のプロットにより、老齢マウスの顎下腺においてのみ検出された酸性ムチンのコアタンパク質同定を試みたが、困難であった。ムチンは豊富な糖鎖によって覆われており、この糖鎖の存在が立体構造解析や抗体による抗原部位の認識を困難にしたものと考えられる。また、ムチンを認識する良い抗体が少ないことも理由の一つとして考えられる。これらの理由により、コア蛋白質の同定は困難であったが、ムチンには、分泌型ムチンと膜結合型ムチンがあることが知られており、本研究で実施した SMME 分析では、分泌型ムチンと膜結合型ムチンの両方を分析できる処理、及び分泌型ムチンのみを分析する処理を行った。両方の分析において、同じような位置に老齢マウスに共通したバンドが検出された。従って、老化により、マウス顎下腺ムチンは、分泌型ムチン、または可能性は低いですが、分泌型と膜型の両方に何らかの変化が現れるものと考えられる。

また、質量分析とムチン抗体を用いた SMME 膜のプロットにより、若齢マウスと老齢マウスの顎下腺に共通して観察されたバンドは Prol1/Muc10 であることが明らかになった。この結果はすなわち、老齢マウスにのみ検出されるバンドは Prol1/Muc10 ではなく、老齢マウスにのみ検出されるバンドと若齢マウスと老齢マウスに共通して検出されるバンドのムチンコアタンパク質は異なることを示している。

更に、老齢マウスの顎下腺においてのみ検出された酸性ムチンを修飾する糖鎖の殆どはシアロ糖鎖であることと、老齢マウスの顎下腺ではシアル酸転移酵素遺伝子の発現が上昇することが分かったが、培養細胞を用いた実験により、炎症状態がシアル酸転移酵素遺伝子の発現を誘導する可能性のあることが示唆された。

以上の結果から、老化により誘発される顎下腺組織の炎症状態は、老齢マウスの顎下腺において新たに発現する分泌性の酸性ムチンの発現に関与している可能性があると考えられる。

#### E. 健康危険情報

なし



## F. 研究発表

### 1. 論文発表

平成27年度

原著論文

- 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<sup>INK4a</sup> 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<sup>Ink4a</sup> pathway provokes an aging-associated decline of submandibular gland function.  
Aging Cell, 14(4), 616-624, (2015)

平成28年度

和文総説

- 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)

平成29年度

原著論文

- 1) Takahashi, D., Suzuki, H., Kakei, Y., Yamakoshi, K., Minami, Y., Komori, T., Nishita, M.  
Expression of Ror2 Associated with Fibrosis of the Submandibular Gland.  
Cell Struct. Funct., 42(2), 159-167, (2017)

和文総説

- 1) 山越貴水  
糖鎖制御異常を介したポリコーム蛋白質のがん促進機構  
日本基礎老化学会会誌, Vol.41, No.3, 37-40 (2017)

### 2. 学会発表

平成27年度

- 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<sup>Ink4a</sup>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<sup>Ink4a</sup> pathway provokes an aging-associated decline of

submandibular gland function.

EMBO Workshop, Developmental Circuits in Aging, 2015 年 5 月 26-27 日 (Greece)

平成 29 年度

1) Yamakoshi K, Iida M, Kimura H, Kameyama A, Maruyama M.

Bmi-1 controls cancer cell motility and invasion through the glycosyltransferase

C2GnT2. Gordon Research Conferences (Aging), 2017 年 7 月 12 日 (Switzerland)

2) Yamakoshi K, Iida M, Kimura H, Kameyama A, Maruyama M.

Bmi-1 controls cancer cell motility and invasion through the glycosyltransferase C2GnT2

第 40 回日本基礎老化学会大会, 2017 年 6 月 15-16 日 (名古屋)

3) Yamakoshi K, Iida M, Kimura H, Kameyama A, Maruyama M.

Bmi-1 controls cancer cell motility and invasion through the glycosyltransferase C2GnT2.

Keystone Symposia, 2017 年 5 月 18 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