

長寿医療研究開発費 平成30年度 総括研究報告

高齢者ドライマウスの原因究明とその克服に向けた基盤研究（30-14）

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

本研究課題では、高齢者においてドライマウス症状が発生するメカニズムを解明するため、老化過程における顎下腺のムチンとその糖鎖に着目し、本年度は、ヒト顎下腺を用いた老化過程での組織病理学的解析、ヒト顎下腺を用いたムチンの多検体分析を実施する前段階としてマウス顎下腺をモデルとした多検体分析方法論の確立、炎症と糖鎖プロファイル変化の関係解明に向けたヒト顎下腺試料からのRNA抽出・精製方法について検討した。

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

村山 繁雄 東京都健康長寿医療センター 神経内科（部長）

亀山 昭彦 産業技術総合研究所 創薬基盤研究部門（上級主任研究員）

A. 研究目的

高齢者の多くが罹患する口腔乾燥症状（ドライマウス）は、唾液粘性の亢進を伴い、高齢者のQOLを低下させるだけでなく高齢者の死亡原因の第三位である肺炎の発症リスクを高める。このため、老化に伴い唾液粘性が亢進するメカニズムの解明が急務となっている。しかし、唾液の粘液成分は、高分子量のコア蛋白質に大量の糖鎖が高密度に結合した巨大分子であり、その取扱いの難しさから、一体何故、老化により唾液粘性が亢進するかについての研究は全く行われてこなかった。我々は最近、動物モデルを用いた研究から、高分子糖蛋白質を分離分析できる新たな技術（分子マトリクス電気泳動：SMME）を利用して、マウスでは老化により唾液腺の一つの顎下腺において唾液粘性物質の主成分であるムチンの糖鎖の末端構造や長さに変化する結果を得た（Iida et al., Arch. Oral Biol., 12(97), 52-58, 2019; Kameyama et al., Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteom., 1867(1), 76-81, 2019）ことから、老化により生じる糖鎖シグナル異常が粘性物質の糖鎖プロファイルを変化させることで唾液粘度を増加させる可能性を見出した。顎下腺は口腔内へ唾液を分泌する機能をもつことから、唾液粘性物質

の糖鎖シグナルの解析は口腔乾燥症の発症機序を解明するうえで大変重要である。そこで、本研究では、ヒトが老化した場合においても類似のメカニズムにより唾液粘度が亢進する可能性について、ヒト顎下腺を用いて粘液成分の分離と各分量及び糖鎖構造の解析を行い、ドライマウス症状が発生するメカニズムの解明を目指す。また、老化の過程では様々な組織において炎症状態が惹起され、慢性的な炎症環境が構築されることが知られているため、炎症と糖鎖プロファイル変化の関係についても検証することを目的とした。

B. 研究方法

(1) ヒト顎下腺の凍結試料採取

69歳までの若中年齢者（女性2名、男性7名）と85歳以上の高年齢者（女性5名、男性9名）のヒト顎下腺は、摘出後半割し、そのうちの一つをドライアイスパウダー法による迅速凍結標本の方法で凍結した。

(2) ヒト顎下腺のパラフィン包埋薄切切片試料の作製

69歳までの若中年齢者（女性2名、男性7名）と85歳以上の高年齢者（女性5名、男性9名）のヒト顎下腺は、摘出後半割し、そのうちの一つを4%パラフォルムアルデヒドにより固定した。固定した顎下腺はtwo overnight後、脱水、脱脂を行いパラフィンに包埋した。パラフィン包埋ブロックは、薄切装置（ミクロトーム）により、**Kluever Barrera**染色と中枢神経系免疫染色と合わせるため、6 μ mの厚さに薄切された。

(3) ヒト顎下腺試料のヘマトキシリン&エオジン(HE)染色及びアルシアンブルー染色

若中年齢者（69歳まで）と高年齢者（85歳以上）のヒト顎下腺ホルマリン固定パラフィン包埋薄切切片は東京都健康長寿医療センター・高齢者ブレインバンクから提供された。これらの試料を用いて、HE染色及び酸性糖（カルボキシ基・硫酸基を含む糖）とイオン結合することで酸性の粘液多糖類を特異的に染めるアルシアンブルー染色（武藤化学 4085-2）を行った。

(4) 顎下腺組織を試料とした水溶性ムチンの抽出

ブタ顎下腺およびマウス顎下腺をモデルとして水溶性ムチンを抽出した。顎下腺組織片をアセトン中でホモジナイズすることによりアセトンパウダーとし、PBSにて水溶性成分を抽出した。この水溶液に飽和酢酸カルシウム溶液を添加後、エタノールを加えて冷却し沈殿物を得た。これに2Mウレア溶液を加えて得られた溶液を別のチューブに移したのち、さらにエタノールを加えて冷却し沈殿物を得た。この沈殿物を8Mウレアに溶解し水溶性ムチン抽出液とした。

(5) 分子マトリックス電気泳動 (SMME) によるムチンの分離

マウス顎下腺組織から抽出した水溶性ムチン抽出液を SMME にて電気泳動した。SMME は 0.1 M ピリジン/ギ酸緩衝液 (pH 4.0) を泳動緩衝液として、1 mA/cm の定電流にて 30 分間通電した。泳動後の膜をアルシアンブルーで染色することによりムチンを可視化した。

(6) SMME により分離されたアルシアンブルー陽性バンドのデンストメトリー

アルシアンブルーで染色した膜を乾燥後、エチレングリコールに浸し透明化した。ポリプロピレンフィルムに挟み、イメージングシステム ChemiDoc (バイオラッド社) を用いて染色像を画像化した。得られた画像のアルシアンブルー陽性バンドを Image J(NIH)にてデンストメトリー解析した。

(7) SMME により分離されたムチンの糖鎖抽出および完全メチル化

SMME 膜上のアルシアンブルー陽性バンドを切り取り、50 mM 水酸化ナトリウムを含む 0.5 M 水素化ホウ素ナトリウム溶液に浸し、45°Cにて一晩放置した。氷冷後、少量の酢酸を添加し水素化ホウ素ナトリウムを分解した後、イオン交換樹脂 Dowex C-50 (H⁺) を加えて攪拌後、固相抽出カートリッジ SepPak-C18 に通じてろ液を回収した。遠心エバポレーターにてろ液を濃縮乾燥後、1%酢酸を含むメタノール溶液を加えて再度濃縮乾燥した。得られた残渣をヨードメタンと水酸化ナトリウムを用いて完全メチル化し、固相抽出カートリッジ SepPak-C18 に吸着後、50%アセトニトリル溶液にて溶出し、質量分析に供した。

(8) SMME により分離されたムチンの糖鎖解析

完全メチル化された糖鎖を MALDI-TOF 型質量分析計にて解析した。レーザーは窒素ガスレーザー、マトリックスは 2,5-ジヒドロキシ安息香酸(DHB)を使用し、リフレクターを用いた陽イオンモードにて測定した。また、詳細な構造解析のために MALDI-QIT-TOF 型質量分析計によるタンデム質量分析も行った。

(9) ヒト顎下腺試料の Total RNA 抽出・精製

約 50mg のヒト顎下腺試料からホモジナイザー(IKA, T10 basic ULTRA-TURRAX)と TRI Reagent(Molecular Research Center, Inc. TR118)を用いて、acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction 法により、破碎した試料から Total RNA を抽出した。混入したゲノム DNA は、RNase-Free DNase Set(Qiagen, 79254)を用いて除去された。その後、Total RNA は RNeasy Mini Kit (Qiagen,74104)を用いて精製された。

(倫理面への配慮)

本研究計画の遂行にあたっては、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に則り、国立研究開発法人国立長寿医療研究センター 倫理・利益相反委員会、東京都健康長寿医療センター 倫理委員会及び国立研究開発法人産業技術総合研究所 倫理委員会の承認を得て、個人情報の保護を徹底し行われる。

また、遺伝子組換え生物等の使用については、国立研究開発法人国立長寿医療研究センター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

ヒト顎下腺の組織病理学的観察とアルシアンブルー染色

ヒト顎下腺試料の HE 染色及びアルシアンブルー染色を行い、組織構造及び酸性糖と酸性粘液多糖類の大まかな量についてそれぞれ可視化した。アルシアンブルー染色では、若中年齢者と高年齢者との間に顕著な染色濃淡の違いは観察されなかったものの、若中年齢者に比べ、高年齢者では染まりの良い腺房と細胞核が散見された。

マウス顎下腺をモデルとしたムチンの多検体分析方法論の確立

ヒト顎下腺を用いたムチンの多検体分析を実施する前段階として、顎下腺からの水溶性ムチン抽出の手法およびマウス顎下腺をモデルとしたムチンの多検体分析を行った。まず、顎下腺からの水溶性ムチン抽出方法について、ブタ顎下腺を用い、多検体試料を処理するためにビーズ式破砕機を用いてアセトンパウダーを作製する方法と従来の方法の手動式ホモジナイザーを用いる方法を比較した。ビーズ式破砕機を用いた場合、手動式ホモジナイザーを用いた場合よりヒアルロン酸とプロテオグリカンは多く回収されるがムチンの回収量は低かった。このことから、実験全体の操作性を考えると、ムチン分析を目的とする場合には、従来通り、手動式ホモジナイザーを用いる方法が適当と判断された。次に、上記のムチン抽出法に従い、マウス顎下腺をモデルとしたムチンの多検体分析を行った。月齢の異なるマウス (3、6、12、18、24 ヶ月齢) を各 3 個体用いて、顎下腺からムチンを抽出し、SMME によるムチンの泳動分離を行った。いずれの月齢においても、全ての個体に共通して出現するバンド (バンドー1) が観察された。このバンド以外にも、3 ヶ月齢と 6 ヶ月齢のマウスにのみ検出されるバンド (バンドー2)、12 ヶ月齢以上のマウスに高頻度に検出されるバンド (バンドー3) が観察された。すなわち、老化により顎下腺ムチンに変化が生じることが示唆された。また、本実験により分離されたアルシアンブルー陽性バンドのデンストメトリー解析を行い、老化との関連を調べた。バンド (バンドー1, 2, 3) の

強度の合計の平均値の比較では、統計的な有意差は検出されなかったものの、6ヶ月齢においてアルシアンブルー陽性バンドのシグナルが最も強くなり、その後、老化に伴って減弱した。更に、ムチンの糖鎖種と老化との関連について調べるため、SMMEにより分離されたムチンの糖鎖抽出と誘導体化を行い、完全メチル化された糖鎖を質量分析計により測定した。バンドー1, 2, 3のいずれも NeuAcGalGalNAc の組成を有する糖鎖が主成分であったが、バンドー1は老化とともに NeuAcGalGalNAc が減少し、NeuAcGalGlcNAcGalNAc の組成を有する糖鎖が増加する傾向が観察された。

炎症と糖鎖プロファイル変化の関係解明に向けたヒト顎下腺試料からの RNA 抽出・精製方法の検討

ヒト顎下腺試料から Total RNA を抽出する方法を確立するため、25歳男性の顎下腺を用いて条件検討を行った。およそ 50mg の試料を TRI Reagent(Molecular Research Center, Inc. TR118)中でホモジナイザー(IKA, T10 basic ULTRA-TURRAX)により破砕し、acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction 法により破砕した試料から Total RNA を抽出した。抽出した Total RNA からゲノム DNA を除去するための反応条件を検討するため、Total RNA を RNase-Free DNase で3分間、5分間、10分間処理した。その後、RNeasy Mini Kit (Qiagen, 74104)を用いて Total RNA を精製し、1%アガロースゲルによる電気泳動を行うことで、混入ゲノム DNA の挙動を観察した。3分間、5分間、10分間、全ての反応条件において、RNase-Free DNase で処理することによりゲノム DNA は観察されなくなった。このことから、3分間の RNase-Free DNase 処理によりゲノム DNA は十分分解されることが示唆された。

D. 考察と結論

ヒト顎下腺試料のアルシアンブルー染色では、若中年齢者と高年齢者との間に顕著な染色濃淡の違いは観察されなかったものの、若中年齢者に比べ、高年齢者の顎下腺では染まりのやや良い腺房が散見されたことから、酸性糖と酸性粘液多糖類の量に違いのある可能性が示唆された。また、本研究により、マウス顎下腺をモデルとしたムチンの多検体分析方法論の確立に成功した。マウスでは、全体のムチン量は老化に伴い減少する傾向にあったが、若齢時にのみ発現するムチンや老化に伴い発現するムチンが存在することが分かった。ムチンの糖鎖はシアリル T (NeuAc α 2-3Gal β 1-3GalNAc) を主としたものだったが、老化に伴い GlcNAc がさらに付加した構造が増えることから、マウス顎下腺では老化に伴いムチン遺伝子及び糖鎖合成に関わる遺伝子群の発現が変化する可能性が示唆された。今後は、ヒト顎下腺試料を用いて検討していく。更に、ヒト顎下腺の RNA 抽出方法の条件が決定したので、今後、残りの試料についても同様に処理し RNA を抽出する。これらの試料

をもとに、老化に伴い変動するムチンとムチン糖鎖の合成に関わるムチン遺伝子及び糖鎖合成関連遺伝子について解析を進めていく。この解析により、各検体における炎症の程度と糖鎖プロファイルの詳細な関係を明らかにできると考えられる。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Iida, M., Matsuno, YK., Watanabe, A., Maruyama, M., Kameyama, A., Yamakoshi, K.
A sialo-oligosaccharide-rich mucin-like molecule specifically detected in the submandibular glands of aged mice.
Arch. Oral Biol., 12(97), 52-58, (2019)
2. Kameyama, A., Yamakoshi, K., Watanabe, A.
A rapid separation and characterization of mucins from mouse submandibular glands by supported molecular matrix electrophoresis
Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteom., 1867(1), 76-81, (2019)
3. Sano K, Atarashi R, Satoh K, Ishibashi D, Nakagaki T, Iwasaki Y, Yoshida M, Murayama S, Mishima K, Nishida N : Prion-Like Seeding of Misfolded alpha-Synuclein in the Brains of Dementia with Lewy Body Patients in RT-QUIC. Mol Neurobiol. 2018. 55(5): 3916-3930.
4. Ren Q, Ma M, Yang J, Nonaka R, Yamaguchi A, Ishikawa KI, Kobayashi KS, Murayama S. Hwang H, Saiki S, Akamatsu W, Hattori N, Hammock BD, Hashimoto K: Soluble epoxide hydrolase plays a key role in the pathogenesis of Parkinson's disease. Proc Natl Acad Sci U S A. 2018. 115(25): E5815-E5823.

2. 学会発表

1. Murayama S, Sengoku R, Saito Y. The Brain Bank for Aging Research Project, Tokyo, Japan. 2019 Alzheimer's & Parkinson's Congress. March 26- 31, Lisbon
2. 村山繁雄 (教育講演) : オールジャパンプレインバンクネットワークに基づく動的・分子・疫学神経病理. 第9回日本神経病理学会中国・四国地方会, 高知, 2018.11.4
3. 鎌田正紀, 松原知康, 土居智和, 川北梨愛, 青江真吾, 野中和香子, 國土曜平, 高田忠幸, 久米広大, 串田吉生, 村山繁雄. 地方にて生前高齢者ブレインバンクに登録していた前頭側頭型認知症の1例. 第9回日本神経病理学会中国・四国地方会, 高知, 2018.11.4
4. 森島真帆, 柿田明美, 吉田眞理, 矢部博興, 國井泰人, 入谷修司, 寺田整司, 横田

- 修, 大島健一, 田中紀子, 井上悠輔, 村山繁雄, 齊藤祐子. 日本ブレインバンク (JBBN) の構築とその運用. 第 37 回日本認知症学会学術集会, 札幌, 2018.10.12-14
5. 亀山昭彦, 松野裕樹, 飯田真由, 丸山光夫, 渡邊淳, 山越貴水, 分子マトリックス電気泳動を用いたマウス顎下腺ムチンの加齢変化解析, 第 37 回日本糖質学会年会, 2018 年 8 月 30 日, 仙台国際センター
 6. 亀山昭彦, 松野裕樹, 飯田真由, 丸山光夫, 渡邊淳, 山越貴水, 分子マトリックス電気泳動で解明する唾液腺ムチンの加齢変化, 第 68 回日本電気泳動学会総会シンポジウム, 2018 年 8 月 9 日, 北里大学相模原キャンパス
 7. Murayama S, Saito Y, Sengoku R. Annual Report of the Brain Bank for Aging Research Project: Tokyo, Japan. Alzheimer's Association International Conference (AAIC 2018), Chicago, USA, 2018.7.22-26
 8. Yamakoshi K, Iida M, Nishijima R, Kameyama A, Maruyama M. Bmi-1 controls cancer cell motility and invasion through the glycosyltransferase C2GnT2. International Cell Senescence Association, July 10, 2018, Canada.
 9. 村山繁雄: (教育講演) . α シヌクレインの伝播を止めればパーキンソン病を根治できるか. 第 12 回パーキンソン病・運動障害疾患コンgres, 京都, 2018.7.5-7
 10. 村山繁雄, 齊藤祐子. α シヌクレインの伝播を止めればパーキンソン病を根治できるか-YES. 第 12 回パーキンソン病・運動障害疾患コンgres抄録集 Page50 ディベート. 2018.07 京都
 11. Iida M, Matsuno Y, Watanabe A, Maruyama M, Kameyama A, Yamakoshi K. A sialo-oligosaccharides rich mucin-like molecule is specifically detected in the submandibular glands of aged mice. 第 41 回日本基礎老化学会大会, 2018 年 6 月 2 日, (東京)
 12. 坂下泰浩, 新井富生, 仙石鍊平, 齊藤祐子, 村山繁雄. Lewy 小体病生検診断における顎下腺の有用性の検討. 第 59 回日本神経学会学術大会, 札幌, 2018.5.23-26
 13. 村山繁. オールジャパンプレインバンクネットワーク構築に向けて. 第 17 回都立病院神経内科合同症例検討会. 東京, 2018.4.18

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