

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：32710

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11091

研究課題名(和文) エストロゲンによるミトコンドリアを介した唾液分泌制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the salivary secretion regulation mechanism through mitochondrial function control by estrogen

研究代表者

中山 亮子 (Nakayama, Ryoko)

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号：50749843

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、エストロゲンの唾液分泌能への関与とその分子機構を明らかにするために、OVXによる早期更年期マウスをモデル動物として解析した。OVXの血中エストロゲン濃度の低下に伴って唾液分泌が低下し、閉経時の口腔乾燥症のモデル動物を作製することができた。さらに、エストロゲンの補給は唾液分泌量および腺房収縮量を改善し、エストロゲンは唾液腺の唾液分泌能と大きく関連することが示された。この現象のメカニズムとして、エストロゲンによるミトコンドリア機能の制御に着目して解析を行なった。結果、エストロゲン量の変化に伴ってミトコンドリアの質的变化、おそらくは形態変化が起こることが示唆された。

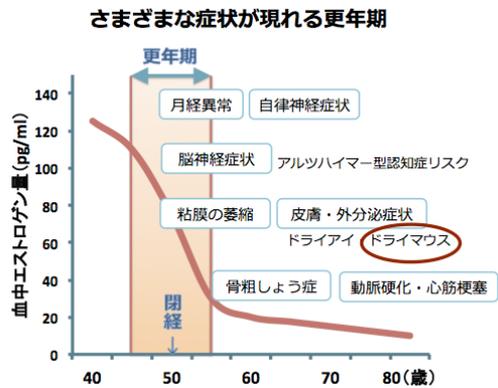
研究成果の概要(英文)：In this study, in order to clarify the involvement of estrogen in salivary secretion ability and its molecular mechanism, early menopausal mice by OVX were analyzed as model animals. Salivary secretion decreased with OVX decrease of blood estrogen concentration, and model animal of xerostomia in menopause could be constructed. Furthermore, supplementation of estrogen improved the amount of saliva secretion and acinar shrinkage, and it was shown that estrogen is greatly related to the salivary secretion ability of the salivary glands. As a mechanism of this phenomenon, focusing on the control of mitochondrial function by estrogen, we analyzed mitochondrial function and others. As a result, it was suggested that a qualitative change in mitochondria, probably a change in morphology, accompanying the change in the amount of estrogen occurred.

研究分野：病態系口腔科学

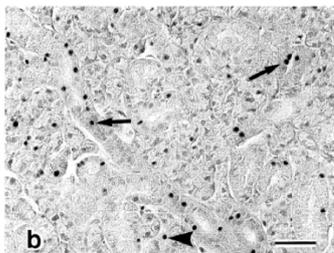
キーワード：口腔乾燥症 ドライマウス 女性ホルモン エストロゲン ミトコンドリア 唾液 マウス OVX

1. 研究開始当初の背景

女性の生涯のうち閉経前後の10年間は更年期とされ、卵巣機能の低下に伴う女性ホルモンの減少を主な原因として、いわゆる更年期障害と呼ばれる様々な症状のほか、骨粗鬆症や動脈硬化、アルツハイマー型認知症(AD)のリスクも高まるとされている。



一方、唾液分泌障害による口腔乾燥症(ドライマウス)も更年期障害の一つとして知られ、唾液分泌の減少による口腔内の諸症状によりQOL(Quality of Life)を著しく低下させるだけでなく、全身的に様々な影響を与える事が知られている。エストロゲンレセプター(ER)は生殖腺以外に唾液腺上皮細胞にも存在し(Maturitas. 2000;36:131-7.)、その発現が歯周病の病態に影響を及ぼす可能性や(Methods Find Exp Clin Pharmacol. 2007;29:329-35.)、卵巣摘出したマウスで生じた唾液腺由来の神経成長因子量の低下がエストロゲンを補充することにより改善することが知られている(Neuroscience. 110:155-67, 2002)。また、卵巣摘出したラットの唾液腺でアミラーゼの活性が低下する(Arch Oral Biol. 1993;38:779-84.)という報告や、エストロゲンの欠乏が閉経後の女性にSS様の自己免疫性唾液分泌障害を引き起こす可能性をマウスで検証した報告(Am J Pathol. 2003;163:1481-90.)もあり、エストロゲンが唾液分泌能に及ぼす分子機構において検討が進められている。



ラット顎下腺におけるエストロゲン受容体の免疫組織染色像  
Cell Struct Funct. 1994 Oct;19(5):335-40.

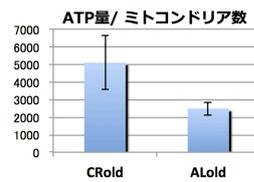
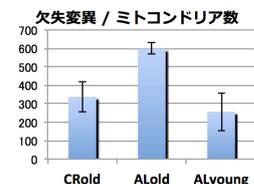
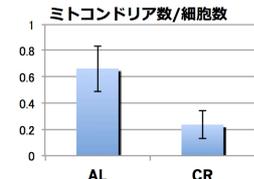
加えて、核内受容体とされているERはミトコンドリア内部にも存在し(PNAS. 2004;101:4130-5)、エストロゲンがミトコンドリアの数を増加させる

ことや(Biochim Biophys Acta. 2009;1793:1540-70.)、ミトコンドリアで産生した活性酸素種はエストロゲンにより酸化酵素を介して抑制されること(Free Radic

Res. 2006;40:111-9.)など、近年の研究においても密接な関係があることが明らかとなってきた。さらに、Ikedaらは、骨格筋においてミトコンドリア内に局在するエストロゲン応答遺伝子であるCOX7RPが、ミトコンドリア呼吸鎖のスーパー複合体の形成を促進し、ATP産生を増加させることを明らかにしている。

また、研究分担者らはこれまでに、長寿遺伝子とされるSirtuinの発現に関するカロリー制限

(Caloric Restriction: CR)を行ない、唾液分泌量の亢進した老齢マウスの顎下腺では、自由給餌(AL)群と比較してミトコンドリアDNAの変異率が低く、ミトコンドリア数に対するATP産生能が増強されていることを予備的実験で見いだした(右図)。



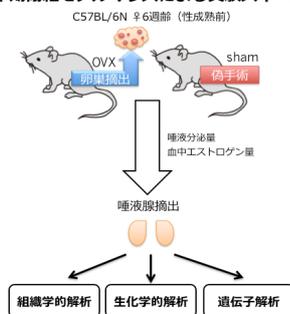
予備的実験で得られたCRとミトコンドリア機能の関係

2. 研究の目的

上記の研究背景より、唾液腺におけるエストロゲンによるミトコンドリア内ERを介した唾液分泌制御機構の存在が示唆されており、エストロゲンによるミトコンドリア機能の制御による唾液分泌能への関与とその分子機構を明らかにすることを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

早期閉経モデルマウスによる実験スキーム



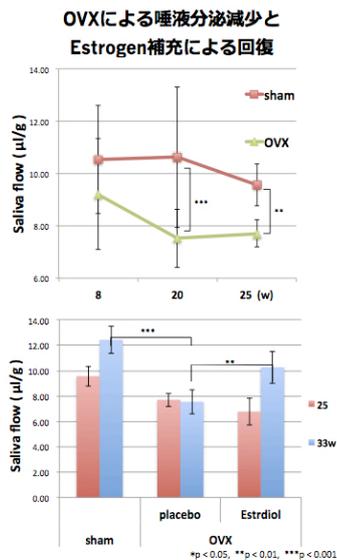
生後6週齢のC57BL6/N雌性マウスに卵巣摘出(OVX)を施し早期閉経モデルマウスとする。controlは偽手術(sham)を行ない、同様に飼育する。

経時的にピロカルピン刺激時唾液分泌量の測定と、部分採血した血液より分離した血清中のエストロゲン量の測定を行なった。一定期間飼育後に安楽死の上解剖し、顎下腺を摘出した。

摘出した顎下腺の一部はホルマリン固定後、組織切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色による形態学的観察を行った。グルタルアルデヒド固定した組織より作成した試料で電子顕微鏡観察を行なった。また、顎下腺組織より『組織の』ATP 測定キット(東洋インキ)にて ATP 量を測定した。Mitochondria Isolation Kit for Tissue (Thermo Scientific™) により得られたミトコンドリア分画は、エストロゲン受容体  $\alpha$  および  $\beta$  (ER $\alpha$ , ER $\beta$ ) 抗体によるウェスタンブロット解析に供した。顎下腺組織より抽出した RNA 試料を用いて遺伝子発現解析も行なった。

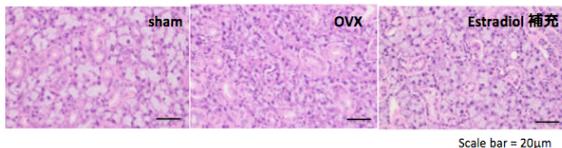
#### 4. 研究成果

6 週齢で OVX を施したマウスは sham 群と比較して 8 週齢(術後 2 週)で唾液分泌量が低下し始め、20 週齢(術後 14 週)以降は有意に減少した。25 週齢以降 OVX 群に対しエストロゲン (17- $\beta$ Estradiol) タブレットによるホルモン補充を行なったところ、33 週齢(補充後 8 週) placebo と比較して唾液分泌量の有意な回復が観察された。



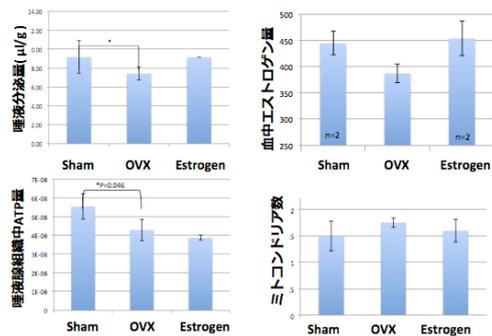
HE 染色による顎下腺組織の観察では、OVX によって縮小の見られた腺房がエストロゲンの補充により改善する様子が観察された。

#### 組織学的観察 (HE染色)

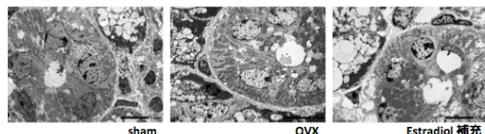


OVX により血中エストロゲン濃度の低下したマウスは唾液分泌量も低下し( $p < 0.001$ )、エストロゲンの補充により血中エストロゲン濃度と唾液分泌量は回復した( $p < 0.01$ )。唾液腺組織の形態学的には OVX により腺房細胞の萎縮が観察されたが、エストロゲン補充により改善がみられた。唾液腺組織中の ATP 量は OVX により減少するが( $p < 0.05$ )、ミトコンドリアコピー数は変化がなく、エストロゲンの減少によるミトコンドリアの質的変化が ATP 量の減少をもたらすことが示唆された。電子顕微鏡による観察でも、OVX あるいはエストロゲンの補充によるミトコンドリアの数の目立った違いは観察されなかった。

これら唾液分泌量や ATP 量の変化とミトコンドリア数に相関がないことから、OVX による ATP 量の減少はミトコンドリアの質的変化によるものと考えられた。

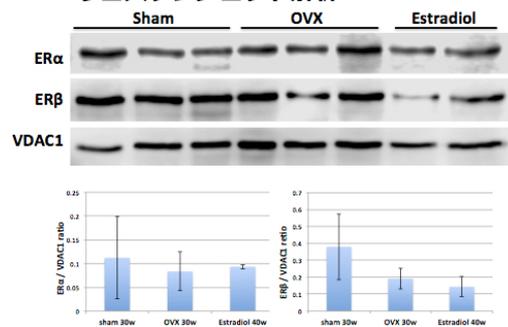


#### 電子顕微鏡による観察



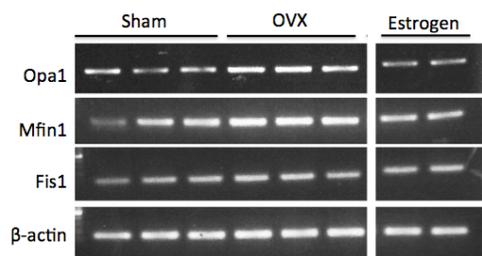
顎下腺組織ミトコンドリア分画のウェスタンブロット解析では唾液腺のミトコンドリア内 ER $\beta$  は OVX により発現に減少傾向が見られ、ATP 量と相関しているように見えるたが、ともにエストロゲン補充による増加は見られなかった。

#### 顎下腺組織ミトコンドリア分画のウェスタンブロット解析

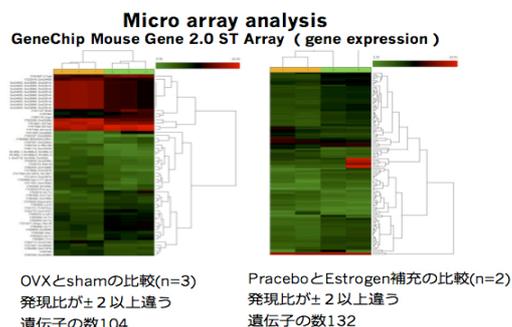


ミトコンドリアダイナミクスに関わる遺伝子の RT-PCR による解析では、ミトコンドリアの融合に関与する遺伝子 Opa1 や Mfin1 の発現が OVX により増加し、エストロゲンの補充で減少したことから、OVX やエストロゲン補充による血中エストロゲン量の増減や唾液分泌量の増減とミトコンドリアの形態との関与が示唆された。今後さらに詳細な解析が必要であると考えられる。

#### ミトコンドリアダイナミクスに関わる分子の発現



GeneChip® Mouse Gene 2.0 ST Array による網羅的遺伝子発現解析では、発現比が 2 以上異なる遺伝子が OVX と sham の比較では 104、placebo とエストロゲン補充群では 132 個ピックアップされた。



KEGG Mapper によるパスウェイ解析では、OVX と sham の比較において全身性エリスマトーデス(SLE)のパスウェイが関連づけられ、若年閉経と SLE の関与がうかがわれた。placebo とエストロゲン補充群の比較においては、細胞周期や卵母細胞減数分裂、p53 シグナル伝達経路、細胞生老化などのパスウェイが関連づけられ、エストロゲンのゲノム作用による増殖関連遺伝子の転写促進や、非ゲノム作用である抗アポトーシスおよび抗酸化作用などの関連が示唆された。

また、OVX によるエストロゲン欠乏と、エストロゲン補充時を比べると Kinesin スーパーファミリー 7 種の増減が逆行を示した。Kinesin は細胞内小器官の輸送に関わるモータータンパク質であるが、ミトコンドリアの細胞内空間配置や形態の変化への関与が考えられた。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Inoue H, Kishimoto A, Ushikoshi-Nakayama R, Hasaka A, Takahashi A, Ryo K, Muramatsu T, Ide F, Mishima K, Saito I. Resveratrol improves salivary dysfunction in a non-obese diabetic (NOD) mouse model of Sjögren's syndrome. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 59, 107–112 (2016) DOI:10.3164 / jcbn.16-31 (査読あり)
- ② Takahashi A, Inoue H, Mishima K, Ide F, Nakayama R, Hasaka A, Ryo K, Ito Y, Sakurai T, Hasegawa Y, Saito I. Evaluation of the Effects of Quercetin on Damaged Salivary Secretion. *PLoS One* 10, e0116008 (2015) DOI : 10.1371 / journal.pone.0116008 (査読あり)

[学会発表] (計 3 件)

- ① 金子三恵, 梁洪淵, 中山亮子, 玉置洋, 齋藤一郎. エクオール含有大豆イソフラボンの唾液分泌に与える効果の検討. 第 17 回日本抗加齢医学会総会, 2017 年
- ② 中山亮子, 井上裕子, 金子三恵, 梁洪淵, 伊藤正孝, 齋藤一郎. 早期閉経モデルマウスを用いた唾液分泌障害におけるミトコンドリアの解析. 第 17 回日本抗加齢医学会総会, 2017 年
- ③ 中山亮子, 井上裕子, 金子三恵, 梁洪淵, 齋藤一郎. ミトコンドリアのエストロゲンを介した唾液分泌制御機構の検討. 第 16 回日本抗加齢医学会総会, 2016 年

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中山 亮子 (NAKAYAMA, Ryoko)  
鶴見大学・歯学部・助教  
研究者番号 : 50749843

### (2) 研究分担者

齋藤 一郎 (SAITO, Ichiro)  
鶴見大学・歯学部・教授  
研究者番号 : 60147634

井上 裕子 (INOUE, Hiroko)  
日本薬科大学・薬学部・教授  
研究者番号 : 50367306

梁 洪淵 (RYO, Koufuchi)  
鶴見大学・歯学部・講師  
研究者番号 : 10298268

内田 仁司 (UCHIDA, Hitoshi)  
鶴見大学・歯学部・学内講師  
研究者番号 : 20736996