

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K12059

研究課題名(和文) 唾液腺の老化における時計遺伝子の関与

研究課題名(英文) Involvement of clock genes in aging of salivary glands

研究代表者

有川 量崇 (ARIKAWA, Kazumune)

日本大学・松戸歯学部・教授

研究者番号：50318325

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：高齢化の進展に伴い口腔乾燥症は増加傾向にある。加齢は唾液腺の機能低下に影響を及ぼすが、その具体的なメカニズムは明らかでない。本研究は、唾液腺の老化による体内リズムの変化に関する時計遺伝子DEC1の細胞調節機構に焦点を置き、唾液の老齢化過程に関わる新たな遺伝子の解明を目的とした。その結果、加齢における唾液腺のmiRNA発現を解析し、miRNA標的の可能性のある遺伝子を同定した。また、DEC1によるE-cadherin制御機構の可能性が推察された。DEC1とE-cadherinの分子機構を解明することから、唾液腺の老化メカニズムにフィードバックが可能になった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢化に伴う唾液分泌障害者の増加は歯周病のリスクを上げるだけでなく、嚥下障害や誤嚥性肺炎の発症を招くなど、全身にも悪影響を与える。唾液腺樹状細胞が唾液腺健康維持に重要な働きをしていることが明らかになり、シェーグレン症候群や加齢など唾液腺疾患の発症機序の解明にも大きく貢献することが期待されている。本研究において、唾液腺の老化のメカニズムを解明するだけでなく、唾液分泌障害の診断や対処法の確立に役立つと思われる。

研究成果の概要(英文)：Difficulty swallowing is quite common among the elderly. Aging is a normal physiological phenomenon that affects almost all organs including the salivary glands. The purpose of this study is to elucidate salivary function disparities in submandibular gland aging profiles focusing on two major areas - microRNAs (miRNAs) and their target genes - that are most significantly affected in the aging process. With the comprehensive analysis of mRNAs and miRNAs, a great number of pairs have been identified, suggesting abnormally expressed miRNAs have functions in the salivary glands aging, and the function may be achieved through the post-transcriptional regulation of certain genes on the related pathways. Transcription factor DEC1 strongly repressed the promoter activity of E-cadherin. We further identified a possible DEC-response element in the E-cadherin promoter region and confirmed the direct binding of DEC1 to that element providing feedback on the aging mechanism of salivary glands.

研究分野：予防歯科学

キーワード：唾液腺 抗加齢 ドライマウス 老化 口腔乾燥 時計遺伝子 DEC1 体内時計

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

唾液分泌障害により生じる口腔乾燥症は欧米の疫学調査から算出すると日本では 3,000 万人の潜在患者が想定されている。唾液分泌障害は、歯周病や齲蝕のリスクを上げ、嚥下障害や誤嚥性肺炎の発症等を招くことなど、QOL を著しく低下させ、様々な病態を形成することが知られている。しかし、現在までのところ有効な治療法は確立されず、唾液などの外分泌の機能不全の病因も未だ明らかでない。申請者が担当する鶴見大学歯学部附属病院ドライマウス専門外来では現在までに受診した 5,800 人の統計学的な解析が行われ、様々な要因から老化に伴い唾液分泌量は減少することが示唆された。老化現象に酸化ストレスが大きく関与していることが示されており、申請者は歯周病患者において *P.g* 抗体価等の口腔環境と酸化ストレス度との間に相関関係があることを報告している (有川量崇 他, 日歯医療管理誌, 2013)。また、抗酸化物質である CoenzymeQ10 によって唾液分泌が促進されることをドライマウス患者と唾液分泌障害モデルマウスによって明らかにし (Arikawa et al., *Clinical Biochemistry*, 2011)、薬剤以外による唾液分泌促進効果の可能性を示唆し、老化と唾液分泌能の関連性の研究を進めている。

老化に伴い、血圧や心拍数、体温、睡眠など様々な生理機能の日内変動が変化し、これら日内変動は視交叉上核で制御され、時計遺伝子とその制御に関与している。時計遺伝子の一つである塩基性ヘリックス・ループ・ヘリックス型転写因子 (以下:bHLH) DEC1 は、老化マーカーとして広く知られている。申請者らはこれまでの報告で、細胞老化に伴い細胞周期の恒久的停止が見られるが、DEC1 が細胞周期調節因子である Cyclin D1 の E-box への結合を介して Cyclin D1 転写活性化を抑制する機能を有することを明らかにした (Bhawal et al., *Journal of Pathology*, 2011)。また、ヒト角化歯肉上皮細胞 (NHOK) の継代培養において、分化マーカーである Involucrin, Transglutaminase および老化マーカーである p16 の発現増加、細胞の巨大化、扁平化が認められた。網羅的発現解析 (DNA マイクロアレイ法) により老化マーカーである DEC1 の発現増加を明らかにした (Jang and Bhawal et al., *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.*, 2015)。さらに最近、申請者らは、DEC1 と唾液の関連性について、高齢者の唾液中に DEC1 の発現が高くなることを見出した。したがって、DEC1 は老化による唾液分泌量低下に影響を与えている可能性がある。申請者らは今までの経験を生かし、本研究は唾液腺の老化における唾液分泌障害に対する DEC1 の関与を検討することとした。ドライマウス外来における統計解析によると、唾液分泌量低下を訴える患者の中で臓器特異的自己免疫疾患であるシェーグレン症候群によるものの割合は 1 割にも満たない。大半は糖尿病、精神的ストレス、薬剤の副作用など老化からくる環境要因による唾液腺の機能不全が要因である。老化の影響で唾液分泌障害になり、歯周病、上部消化器障害や摂食嚥下障害が発生し、より老化を加速させると推測できる。

唾液分泌量低下による分泌型免疫反応の減退から歯周病発症リスクは上昇する。申請者らは歯周疾患のような慢性炎症において、口腔粘膜上皮細胞に DEC1 の発現が亢進することを報告している (Bhawal et al., *Journal of Cellular Biochemistry*, 2012)。また唾液分泌量低下に影響を与える糖尿病においては様々な末梢組織の時計遺伝子発現が阻害されていることが知られている。さらにドライマウス患者では、その涙腺の免疫組織学的検討から CD8+T 細胞の約 55% が Integrin  $\alpha E/\beta 7$  と腺細胞表面に発現される E-cadherin との接着を介して、腺細胞と接着していることを発表した。

本研究において、老化モデルマウスの唾液腺を用いて網羅的遺伝子及び microRNA 発現解析により同定された遺伝子を、ヒト唾液サンプルで分子生物学的に検討することは、唾液腺の老化のメカニズムを解明するだけでなく、唾液分泌障害の診断や対処法の確立に役立つと思われる。

## 2. 研究の目的

高齢化に伴う唾液分泌障害者の増加は歯周病のリスクを上げるだけでなく、嚥下障害や誤嚥性肺炎の発症を招くなど、全身にも悪影響を与える。時計遺伝子である Differentiated embryo chondrocytes 1 (以下:DEC1) は、全身に発現しており、様々な生理現象に関与し、特に老化の中心的な役割を担っている。申請者らはこれまでに、老化と唾液分泌障害に関することを報告している。また、申請者らはこれまでに、DEC1 が細胞機能を調節するメカニズムの重要な因子であることを発表した。本研究は、唾液腺の老化による体内リズムの変化に関する DEC1 の細胞調節機構に焦点を置き、唾液の老齢化過程に関わる新たな遺伝子の解明を目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 唾液腺（顎下腺）における老齢化過程のメカニズムの解明

#### 動物作成

生後3ヵ月齢、24ヵ月齢の C57BL/6 および DEC1 ノックアウトマウスの唾液腺（顎下腺）を採取し、RNA およびタンパクを抽出した。

#### DNA マイクロアレイおよび miRNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析

採取した唾液腺組織から RNA を miRNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて抽出し、DNA マイクロアレイおよび miRNA マイクロアレイを用いて網羅的遺伝子発現解析を行う。DNA マイクロアレイは Low Input Quick Amp Labeling kit (Agilent) を用いて蛍光標識 cRNA を合成した。標識 cRNA を SurePrint G3 Mouse GE マイクロアレイ (Agilent) にてハイブリダイゼーションさせた。また、miRNA マイクロアレイ解析は、Agilent Complete Labeling and Hyb Kit (Agilent) を用いて蛍光標識 miRNA を合成した。蛍光標識 miRNA を SurePrint G3 Mouse (Agilent) にてハイブリダイゼーションを行った。DNA マイクロアレイおよび miRNA マイクロアレイの解析は GeneSpring 解析ソフト (Agilent) を用いた。さらにマイクロアレイで得られたデータは IPA (Ingenuity Pathway Analysis) 解析から予測される生物学的過程、転写経路およびネットワークの探索を行った。

#### リアルタイム PCR 法による mRNA および miRNA の定量

RNA は逆転写酵素 VILO SuperScript™ (Invitrogen) で cDNA を合成後、特異的 TaqMan® プローブを用いて QuantStudio 6 Flex リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems) により定量化した。TaqMan® ケミストリーを使用して miRNA を定量するための設計済みプライマーセットで、前駆体ではなく成熟 miRNA のみを標的とする。TaqMan Reverse Transcription Kit、TaqMan MicroRNA Assays、QuantStudio 6 Flex リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems) を用いて miRNA をリアルタイム RT-PCR で定量し、miRNA を基準として相対量を算出した。

#### ウェスタンブロットング法によるタンパクの検討

タンパク抽出には RIPA Lysis Buffer (Pierce) を用いた。抽出したタンパク質をポリアクリルアミドゲルで分離 (SDS-PAGE) し、PVDF 膜へ電氣的に転写したのち、5% BSA を用いて1時間ブロッキングを行った。TBS (-) - 0.1% Tween 20 (TBS-T) で洗浄した後、5% BSA で希釈した一次抗体を加え、4 オーバーナイトインキュベートする。TBS-T で洗浄した後、5% BSA で希釈した二次抗体を加え、室温で1時間反応させる。TBS-T で洗浄した後、ECL-Plus Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare Japan Corporation) により検出し、ImageQuant Las 4000 Mini で観察した。

#### DNA マイクロアレイ解析により同定された遺伝子の免疫組織化学染色

一次抗体はウサギポリクローナル抗 DEC1 抗体 (1:100; 広島大学大学院医歯薬総合研究科 加藤幸夫教授より寄贈) およびウサギポリクローナル抗 E-cadherin 抗体 (1:100; abcam) を使用する。断片は12分間 97 10× Citrate buffer (abcam) に浸し、製造元の説明書に準じて行った。

## (2) DEC1 による E-cadherin 制御機構の解明

### ルシフェラーゼアッセイ

E-cadherin プロモーターレポーター上に E-box mutant を作成し、DEC1 の発現ベクターと co-transfection を行い、ルシフェラーゼアッセイにより E-cadherin のプロモーターの活性化を比較して、応答配列を同定する。リアルタイム PCR 法およびウェスタンブロットング法により、トランスフェクションの 24 時間後に DEC1 の発現を確認した。

### リアルタイム PCR 法による mRNA および miRNA の定量

RNA は逆転写酵素 VILO SuperScript™ (Invitrogen) で cDNA を合成後、特異的 TaqMan® プローブを用いて QuantStudio 6 Flex リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems) により定量化した。TaqMan® ケミストリーを使用して miRNA を定量するための設計済みプライマーセットで、前駆体ではなく成熟 miRNA のみを標的とした。TaqMan Reverse Transcription Kit、TaqMan MicroRNA Assays、QuantStudio 6 Flex リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems) を用いて miRNA をリアルタイム RT-PCR で定量し、miRNA を基準として相対量を算出した。

### ウェスタンブロットング法によるタンパクの検討

タンパク抽出には RIPA Lysis Buffer (Pierce) を用いた。抽出したタンパク質をポリアクリルアミドゲルで分離 (SDS-PAGE) し、PVDF 膜へ電氣的に転写したのち、5% BSA を用いて 1 時間ブロッキングを行った。TBS (-) - 0.1% Tween 20 (TBS-T) で洗浄した後、5% BSA で希釈した一次抗体を加え、4 オーバーナイトインキュベートした。TBS-T で洗浄した後、5% BSA で希釈した二次抗体を加え、室温で 1 時間反応させる。TBS-T で洗浄した後、ECL-Plus Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare Japan Corporation) により検出し、ImageQuant Las 4000 Mini で観察した。

### クロマチン免疫沈降法 (ChIP) による転写因子結合の解析

ChIP を用いて DEC1 が E-box を介して E-cadherin の発現を制御していることを確認した。

## 4 . 研究成果

生後 3 ヶ月齢および加齢モデルの 24 ヶ月齢の C57BL/6 マウスを使用し、それらの遺伝子発現および miRNA 発現所見は、GeneSpring および Ingenuity Pathways Analysis と組み合わせ、DNA マイクロアレイおよび miRNA アレイを用いて解析した。シグナル経路で、cAMP 媒介シグナル、上皮接着結合シグナル、タイトジャンクションシグナル、ギャップジャンクションシグナル、カルシウムシグナル、およびサーチュインシグナルが唾液腺老化に関与していることも明らかにした。RT-qPCR によりさらに解析したところ、時計遺伝子が、miR-30c-1-3p、miR-34a-5p、miR-92a-3p、miR-181a-5p および miR-550a-3p の制御に関与していることを示した。多数の組み合わせが識別された mRNA と miRNA の網羅的解析は、miRNA の異常発現は唾液腺加齢において重要であることを示唆した。そして、その機能は関連シグナル上の特定遺伝子の転写を通して誘導されることが考えられた。また、生後 3 ヶ月齢、24 ヶ月齢の C57BL/6 および DEC1 ノックアウトマウスの顎下腺を検討し、遺伝子 (S100A8, AQP5, MUC7, MUC7, HIN3, STATH, MYB, NFIB 等) および miRNA (miR-15a, miR-21, miR-Let7c, miR-143, miR-146b, miR-150, miR-378a) が候補遺伝子および miRNA として同定された。さらに、ルシフェラーゼアッセイにて DEC1 強制発現による E-cadherin 転写制御機構の解析を行った。Promoter は E-box を含む約 E-cadherin promoter を使用した。E-cadherin 転写活性が約 3.5 倍抑制され、その抑制された活性は DEC1 発現 plasmid を濃度依存的に強制発現しても抑制がみられた。また E-cadherin 遺伝子上流の E-box に mutation を

作製し、luciferase assay で DEC1 強制発現によっても、E-cadherin 転写活性は影響を受けなかった。DEC1 強制発現によって E-cadherin の発現をリアルタイム PCR 法およびウェスタンブロットティング法にて明らかにした。さらに、Chromatin immunoprecipitation (ChIP assay) を用いて DEC1 が E-cadherin の E-box に影響を及ぼすか調べた。コントロールと比べ、DEC1 強制発現により E-cadherin の precipitate する量が増加した。また、ChIP assay を用いて癌細胞に DEC1 siRNA 導入することによって E-cadherin の precipitate する量が抑制した。以上のことから、DEC1 による E-cadherin 制御機構の可能性が推察された。DEC1 と E-cadherin の分子機構を解明することから、唾液腺の老化メカニズムにフィードバックが可能になった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yoshiaki Nomura, Erika Kakuta, Ayako Okada, Ryoko Otsuka, Mieko Shimada, Yasuko Tomizawa, Chieko Taguchi, Kazumune Arikawa, Hideki Daikoku, Tamotsu Sato, Nobuhiro Hanada	4. 巻 20(1)
2. 論文標題 Effects of Self-Assessed Chewing Ability, Tooth Loss and Serum Albumin on Mortality in 80-year-old Individuals: A 20-year Follow-Up Study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Oral Health	6. 最初と最後の頁 122
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12903-020-01113-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kazumune Arikawa, Fengzhu Zhang, Chieko Taguchi, Ujjal K. Bhawal	4. 巻 17(1)
2. 論文標題 Circadian expression of differentiated embryonic chondrocytes expressed genes 1 and 2 in human oral squamous cell carcinoma HSC-3 cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Oral-Medical Sciences	6. 最初と最後の頁 33-37
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.5466/ijoms.17.33">https://doi.org/10.5466/ijoms.17.33</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 竹内麗理, 有川量崇, 田口千恵子, 末光正昌, 森川美雪, 丸山満博, 渡邊信幸, 久山佳代, 平塚浩一	4. 巻 44(2)
2. 論文標題 水素水の抗炎症作用による口腔粘膜炎の治療・予防効果の検討	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日大口腔科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 39-46
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 田口千恵子, 有川量崇, 小林清吾	4. 巻 44(1)
2. 論文標題 上顎前歯部に関する審美評価	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日大口腔科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 8-15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ryuji Nakayama, Kazumune Arikawa, Ujjal K.Bhawal	4. 巻 8/ 15
2. 論文標題 The epigenetic regulation of CXCL14 plays a role in the pathobiology of oral cancers	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 3014-3027
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7150/jca.21169	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 和田康志, 川上智史, 植原治, 有川量崇, 大久保一郎	4. 巻 52/ 3
2. 論文標題 介護保険施設における歯科訪問診療の実施による口腔機能等に対する効果	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 日本歯科医療管理学会雑誌	6. 最初と最後の頁 130-141
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 有川量崇, 谷野 弦, 田口千恵子, 竹内麗理, 小林良喜, 内山敏一, Ujjal K.Bhawal, 那須郁夫	4. 巻 12/ 2
2. 論文標題 高齢者の口腔環境に対する中鎖脂肪酸とビタミンDを含有するオイルの効果の検討	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本口腔ケア学会雑誌	6. 最初と最後の頁 11-16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 小林良喜, 瀧澤智美, 有川量崇, 田口千恵子, 後藤田宏也, 落合智子
2. 発表標題 脂質代謝異常が歯槽骨吸収に与える影響
3. 学会等名 日大口腔科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田口千恵子, 有川量崇, 斎藤真規, 小林良喜, 内山敏一, 後藤田宏也, 落合智子, 金田隆
2. 発表標題 歯科用チェアユニット給水システムにおけるナノバブル水の応用に関する研究
3. 学会等名 日大口腔科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Bhawal UK, Arikawa K, Taguchi C, Uchiyama T, Hiratsuka K, Arakawa H, Nasu I
2. 発表標題 Micromolar level of sodium fluoride promote osteoblast differentiation through Runx2 signaling
3. 学会等名 第66回日本口腔衛生学会・総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Bhawal UK, Suzuki M, Uchiyama T, Arikawa K, Hiratsuka K, Shibutani K
2. 発表標題 Basic helix-loop-helix transcription factors DEC1 and DEC2 modulates P.gingivalis-induced inflammation
3. 学会等名 Penn Periodontal Confernce (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Bhawal UK, Uchiyama T, Arikawa K, Oka S, Hiratsuka K, Hiratsuka K, Arakawa H, Nasu I, Shibutani K
2. 発表標題 The effects of low-power laser irradiation in submandibullar glands of diabetes-induced rats
3. 学会等名 IUPS38ht World Congress (国際学会)
4. 発表年 2017年



1. 発表者名 パワール ウジャール、有川量崇、内山敏一、平塚浩一、久保山昇、渋谷鑛
2. 発表標題 低出力レーザー照射によるSTZ誘発糖尿病ラットのAGE-RAGE系に及ぼす影響
3. 学会等名 日本大学口腔科学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	B h a w a l U j j a l  (BHAWAL Ujjal)  (50433339)	日本大学・松戸歯学部・助教    (32665)	
研究分担者	田口 千恵子  (TAGUCHI Chieko)  (80434091)	日本大学・松戸歯学部・専修研究員    (32665)	