

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：83903

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K11785

研究課題名（和文）糖鎖プロファイリングによるドライマウス発生機序の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of xerostomia occurrence by glycan profiling

研究代表者

山越 貴水（YAMAKOSHI, Kimi）

国立研究開発法人国立長寿医療研究センター・研究所 研究推進基盤センター・研究員

研究者番号：50423398

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：25歳から69歳までの若・中年齢者と85歳以上の高齢者の顎下腺を用いて、免疫組織化学的解析、分子マトリクス電気泳動法（SMME）を用いたムチン分析を実施した。本研究では、主にムチンと考えられる酸性の粘液物質が、通常、ムチンを産生する細胞以外の細胞において老化により新たに産生される可能性があること、ヒト顎下腺ムチンの糖鎖は、マウスの顎下腺ムチンと同様、core-1型の糖鎖にシアル酸が 2-3 結合で付加された構造を有することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

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誤嚥性肺炎の発症リスクを高める。本研究では、唾液分泌組織である顎下腺の構成細胞のなかでムチン非産生細胞と考えられている細胞において高齢者ではムチンが産生されている可能性やムチン糖鎖構造に関する知見を得た。これらの知見は、高齢者の口腔乾燥症状の機序解明の新たな糸口となり、将来の治療に寄与することが期待される。

研究成果の概要（英文）：Using the submandibular glands (SMGs) of young and middle-aged people aged 25 to 69 and elderly people aged 85 and over, we performed immunohistochemical analysis and mucin analysis using molecular matrix electrophoresis (SMME). In this study, it was suggested that acidic mucous substances, mainly considered to be mucin, may be newly produced by cells other than those that normally produce mucin due to aging, and that mucin glycans of human SMG have a structure with sialic acid attached by 2-3 linkage to core-1 type structure, similar to mouse SMG mucin.

研究分野：分子細胞生物学、糖鎖生物学

キーワード：口腔乾燥症状 ムチン 顎下腺 唾液粘度 糖鎖 炎症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

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誤嚥性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、老化により唾液粘性が亢進する機序についての研究は全く行われてこなかった。これまでに私達は、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)を用いて、マウスでは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を見出している(Iida et al., *Arch. Oral Biol.* 97: 52-58, 2019)。また、糖鎖は炎症刺激により構造が大きく変化することが知られており、糖鎖の構造や量の変化は分子の物理化学的性質(粘性)に關与する。

そこで、高齢者においても糖鎖シグナル異常により粘性物質の糖鎖プロファイルに変化が生じているか、糖鎖プロファイルの変化が唾液粘度増加の一因となっているか、老化により惹起される慢性的な炎症環境が糖鎖シグナルの制御異常を誘発しているか、を明らかにすることが高齢者におけるドライマウス症状の発生メカニズムを解明する上で重要であると考え、本研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ヒトの老化過程における顎下腺の糖鎖プロファイルを解析することにより、ドライマウスの代表的な症状の一つである唾液粘性が亢進するメカニズムの詳細を解明することである。本研究では、ヒトの顎下腺の粘液成分の量と糖鎖構造の分析、老化により糖鎖構造変化を生じさせる糖鎖シグナル制御因子の解明、老化により惹起される炎症状態と糖鎖シグナルの制御異常との関係解明に取り組む。

3. 研究の方法

(1) ヒト顎下腺試料の各種染色

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)のヒト顎下腺ホルマリン固定パラフィン包埋薄切切片を用いて、ヘマトキシリン&エオジン(HE)染色、酸性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(AB)染色、ABに加えて中性ムチンを同時に染めるAB-PAS染色、Muc5b免疫染色、Muc7免疫染色を実施した。

(2) 顎下腺試料からの水溶性ムチンの抽出

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尿素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尿素に溶解し水溶性ムチン抽出液とした。

(3) 分子マトリクス電気泳動(SMME)によるムチンの分離

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および各種レクチン類で染色することによりムチンを可視化した。

(4) 唾液の曳糸長測定

NEVA METER IMI-0501を使用し、採取した唾液を測定速度10mm/sec, 50mm/secにてウエット測定法により測定した。

4. 研究成果

(1) ヒト顎下腺の免疫組織学的観察

パラフィン包埋薄切切片を用いて、HE染色、アルシアンブルー染色、AB-PAS染色、Muc5b抗体染色、Muc7抗体染色を行い、組織構造及び酸性糖とムチンを含む粘液多糖類のたまかな量について可視化し、染色結果を陽性率と陽性度を指標にして評価した。その結果、AB染色において年齢による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ややよい腺房が散見された。高年齢者のAB染色で観察された酸性粘液物質の増加は、Muc5bとMuc7に由来している可能性がある。Muc5b及びMuc7陽性細胞以外の細胞において、酸性の粘液物質が産生されている可能性がある。老化により中性の粘液物質は減少する可能性があることを示唆する結果を得た。

以上より、ヒト顎下腺では、通常、ムチンを産生する細胞以外の細胞において、老化により、主にムチンと考えられる酸性の粘液物質が新たに産生される可能性と老化により中性の粘液物質は減少する可能性が示唆された。

(2) 老化に伴うヒト顎下腺ムチンの変化

若・中年齢者(9例)と高齢者(14例)の顎下腺試料からムチンを抽出し、分子マトリクス電気泳動(SMME)とAB染色、レクチン(MAL-11, ABA)染色によりムチン分析を行った。その結果、マウスの顎下腺と比較してヒト顎下腺はムチン含量が少ないこと、ヒト顎下腺ムチンの糖鎖はcore-1型の糖鎖にシアル酸が2-3結合で付加された構造を有することが示唆された。

(3) 唾液の曳糸性の検討

老化により発現変動するムチン及びその糖鎖変化と唾液粘度の関係を調べるため、唾液の曳糸長について分析を試みた。ヒト検体を調べる前段階として、老齢マウスの顎下腺と同様に、老化マーカーの上昇が認められる老化モデルマウスのBmi-1ノックアウトマウスを用いた。野生型マウスとBmi-1ノックアウトマウスから唾液を採取し、各々の曳糸長を測定したところ、両者の曳糸長に差は認められなかった。曳糸長側速度等の条件検討の必要性和唾液粘度評価法として曳糸性は適さない可能性があることが示唆された。

(4) 老化により惹起される顎下腺の炎症状態の解析

マウスの顎下腺における炎症性メディエーターレベルをmulti-plexを用いて測定した。若齢マウスに比べて老齢マウスではIL-1, MCP-1, TNF-等の炎症性サイトカインのレベルが顕著に上昇した。マウス顎下腺におけるムチンの糖鎖はシアリルTを主としているが、老化に伴いGlcNAcやNeuAcがさらに付加した構造が増加し、老化により糖鎖プロファイルが変化することを私達は既に見出している(Iida et al., *Arch. Oral Biol.* 97: 52-58, 2019; Kameyama et al., *Arch. Oral Biol.* 121, 2021)。炎症状態と糖鎖プロファイルの変化には相関があり、老化により惹起される炎症環境が糖鎖シグナルの制御異常を引き起こしている可能性があることが予想される。加えて、本研究から、ヒト顎下腺ムチンの糖鎖はcore-1型の糖鎖にシアル酸が2-3結合で付加された構造を有することが示唆されており、マウス顎下腺ムチンと同様の構造であることから、ヒトにおいても同様の現象が生じている可能性があることが示唆される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kameyama, A., Nishijima, R., Yamakoshi, K	4. 巻 16
2. 論文標題 Bmi-1 regulates mucin levels and mucin O-glycosylation in the submandibular gland of mice.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0245607
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0245607	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 Kameyama, A., Thet Tin, WW., Nishijima, R., Yamakoshi, K.	4. 巻 121
2. 論文標題 Alteration of mucins in the submandibular gland during aging in mice.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Archives of Oral Biology	6. 最初と最後の頁 104967
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.archoralbio.2020.104967	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 亀山 昭彦, 松野 裕樹, 飯田 真由, 丸山 光生, 渡邊 淳, 山越 貴水	4. 巻 63
2. 論文標題 分子マトリックス電気泳動で解明する唾液腺ムチンの老化に伴う変化	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 電気泳動	6. 最初と最後の頁 55-61
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4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yamakoshi K, Kameyama A, Nishijima R, Maruyama M.
2. 発表標題 Analyses of mucins in submandibular gland during aging in mice
3. 学会等名 第71回日本電気泳動学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yamakoshi K, Kameyama A, Nishijima R, Maruyama M
2. 発表標題 Analyses of mucins in submandibular gland during aging in mice
3. 学会等名 第43回日本基礎老化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山越貴水、亀山昭彦、西島里咲、飯田万由、丸山光生
2. 発表標題 ポリコームタンパク質Bmi-1による顎下腺ムチン糖鎖構造の制御
3. 学会等名 第42回日本基礎老化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山越貴水、亀山昭彦、西島里咲、飯田万由、丸山光生
2. 発表標題 ポリコーム蛋白質Bmi-1による顎下腺ムチン糖鎖構造の制御
3. 学会等名 第13回日本エピジェネティクス研究会
4. 発表年 2019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
研究協力者	村山 繁雄 (MURAYAMA Shigeo)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	亀山 昭彦 (KAMEYAMA Akihiko)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関