

令和 4 年 5 月 17 日現在

機関番号：32650

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18953

研究課題名（和文）唾液分泌概日リズム制御機構の解明および概日リズム唾液検査法の開発

研究課題名（英文）Salivary circadian rhythm mechanism in the submandibular gland

研究代表者

佐藤 涼一（Satou, Ryouichi）

東京歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：80801472

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：唾液は口腔機能において歯や口腔粘膜の保護、食塊形成、消化吸収、抗菌作用や緩衝作用など重要な機能を有する体液であり、日中に増加し、夜間に減少をするサーカディアンリズムを有する。本研究の目的は顎下腺の末梢時計機構とイオンチャンネルに着目し、唾液分泌のサーカディアンリズム形成メカニズムを解明することである。本研究の成果により唾液腺の末梢時計の存在と唾液分泌に関与するイオンチャンネルが時計遺伝子により制御を受けていることが示唆された。また、顎下腺細胞株をベースとしたレポーターアッセイ系を構築し、唾液腺の末梢時計リズムに影響を与える因子の検索が可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果より唾液腺に末梢時計が存在しており、唾液分泌量の日内リズムが唾液腺細胞の水分分泌関連イオンチャンネルの発現リズムで制御されていることが示唆された。また、周囲の光環境や生活リズムが唾液腺の末梢時計に影響を与えることが明らかとなった。唾液腺の末梢時計機構や時計遺伝子から唾液腺の生理機能である分泌・再吸収へのインプット方法を解明する事で、ドライマウスや齲蝕予防の新たなアプローチが可能になると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Saliva has a circadian rhythm that increases during the day and decreases at night. The purpose of this study is to elucidate the circadian rhythm formation mechanism of salivary secretion by focusing on the peripheral clock mechanism and ion channels of the submandibular gland. The results of this study suggest that the presence of the peripheral clock of the salivary glands and the ion channels involved in salivary secretion are regulated by the clock gene. In addition, a reporter assay system based on the submandibular gland cell line was constructed, and it became possible to search for factors that affect the peripheral clock rhythm of the salivary glands.

研究分野：歯学

キーワード：唾液腺 概日リズム 時計遺伝子 末梢時計

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、肝臓や腎臓などにおける、末梢時計の存在や末梢時計と臓器固有生理機能の関連性が報告されている。しかし、唾液腺の末梢時計と生理機能を検討した研究の報告はない。唾液は口腔機能において歯や口腔粘膜の保護、食塊形成、消化吸収、抗菌作用や緩衝作用など重要な機能を有する体液である。安静時唾液量は日中に増加し、夜間に減少をするサーカディアンリズムが存在しているが、唾液分泌のサーカディアンリズムが唾液腺内のどの部位で、どのような遺伝子やイオンチャンネルによってコントロールされているのか、といったメカニズムは未だ明らかにされていない。本研究の目的は顎下腺の末梢時計機構とイオンチャンネルに着目し、唾液分泌のサーカディアンリズム形成メカニズムを解明することである。

### 2. 研究の目的

本研究は時計遺伝子による唾液分泌の概日リズム作成機構の解明、および唾液腺の概日リズム調節因子の検索を目的とした。また、唾液腺の末梢時計リズムに影響を与える因子の検索やリズム調節薬剤のスクリーニングに有用な顎下腺細胞株をベースとした新規長期間レポーターアッセイ系の構築を目指した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 概日リズムを有する顎下腺 水分泌・浸透圧調節関連イオンチャンネルの検索

顎下腺内で水分泌・浸透圧調節に関連する複数のイオンチャンネル mRNA およびタンパク発現を経時的に測定し、概日リズムの存在を明らかにした。6 時間おきに 6 週齢オスの Wistar ラットから両側の顎下腺を摘出し、RNA 抽出後に定量 RT-PCR により相対発現量を求めた。タンパク抽出も併せて行い Western Blot 法による時計遺伝子の制御下にあるイオンチャンネルを検索した。

#### (2) 顎下腺細胞株をベースとした新規長期間レポーターアッセイ系の構築

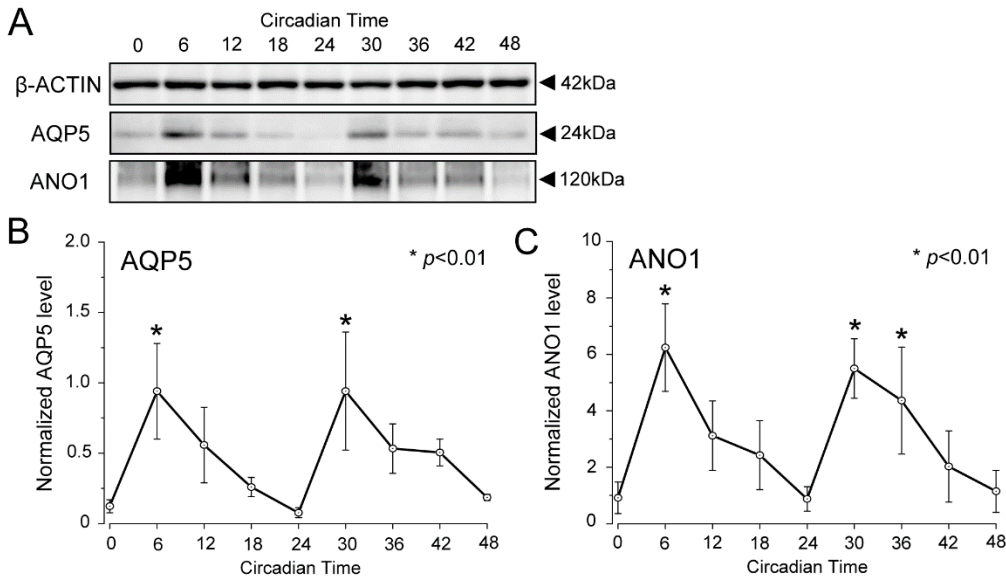
現在までにラットから単離した唾液腺細胞が細胞特性を維持したまま、48 時間以上の長期培養が可能であるという報告はない。よって、リアルタイムに長期間の唾液腺概日リズムを測定するためには、発光レポーターを組み込んだ安定化細胞株の作成が必要不可欠である。そこで、申請者は新たに時計遺伝子 Bmal1 プロモーター領域にホタルの発光酵素であるルシフェラーゼとタンパク質分解配列 (PEST) をつないだベクターを設計した。本ベクターはラットの唾液腺細胞にトランスフェクションすることで、細胞の時計遺伝子 Bmal1 のプロモーター活性を発光の強さによってリアルタイムに測定可能である。

#### (3) 光環境による唾液腺末梢時計とイオンチャンネルのリズム変化

4 週齢オスの Wistar Rat を 12 時間ごとの明暗環境下・自由飲食で 2 週間飼育後、24 時間高照度光下 (800-1000 lux) の恒明環境 (12h/12h : Light/Light, LL 条件) で 3 週間飼育し、光による体内時計のリセットを行わせないフリーラン (free-run, 自由継続) ラットを作成した。フリーラットの顎下腺を 6 時間おきに摘出し、水分泌・浸透圧調節に関連する複数のイオンチャンネル mRNA およびタンパク発現を経時的に測定した。

### 4. 研究成果

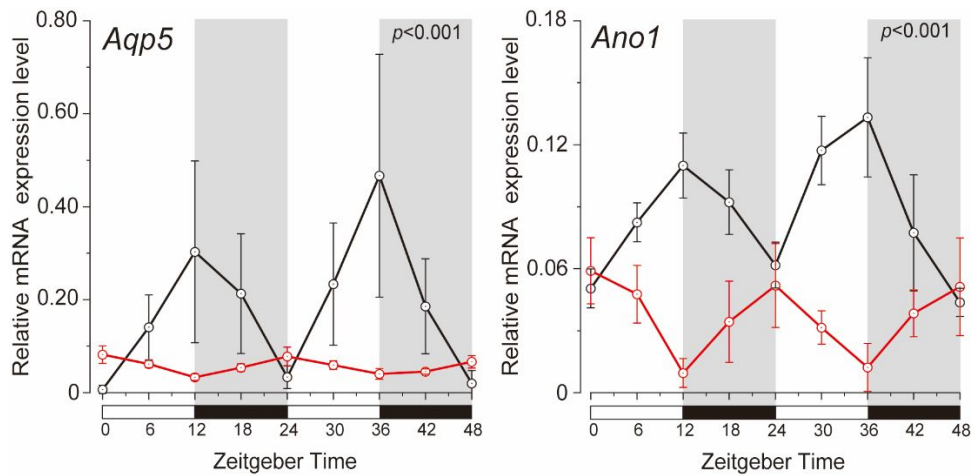
(1) ラット顎下腺の時計遺伝子 Bmal1, Per1, Per2, Cry1, Cry2, Ror, Rev-erb に 24 時間周期のリズムを認め、顎下腺の時計遺伝子にネガティブフィードバック機構の存在が確認できた。これは唾液腺に自律的にリズムを刻む末梢時計が存在することを示唆している。顎下腺水分泌に関連するイオンチャンネル Aquaporin5 (Aqp5) およびカルシウム依存性クロライドチャンネル Anoctamin1 (Ano1) の mRNA 発現には日内変動が認められ、ピーク時刻は ZT12, ZT36 で一致していた。また、各イオンチャンネルのピーク間隔は 24 時間であり、時計遺伝子 Per2 のプロファイルと近似していた。Ano1 と Aqp5 が時計遺伝子により発現制御を受ける時計遺伝子制御遺伝子 (clock-controlled genes ; CCG) であるかを検討するため、プロモーター解析と恒暗環境でのリズム恒常性の維持ができるかを検討した。4 週齢オスの Wistar ラットを 12 時間毎の明暗環境下で 2 週間飼育後、Zheng らの方法に従い実験 48 時間前に恒暗環境 (< 1Lux) に移し飼育し、8 : 00 (ZT0) から 6 時間ごとに 48 時間連続して顎下腺 total RNA およびタンパクを抽出した。恒暗飼育ラット顎下腺において時計遺伝子 (Bmal1, Per2, Cry1) は明暗環境で飼育したラットと同様に明確な日内変動を示した。Aqp5, Ano1 は明暗環境下、恒暗環境下の両群にて 24 時間周期の発現リズムを認めたが、恒暗環境下ではピーク時刻が 6 時間前方シフトしていた。Western Blotting 解析より同様のシフトはタンパク発現においても認められ、Aqp5 と Ano1 の RNA 発現とタンパク発現のピーク時刻は一致していた (図 1)。



(図1) 恒暗環境飼育ラット顎下腺における ANO1, AQP5 タンパクの相対発現量  
 (A) Western Blot 法による各タイムポイントのタンパク発現 (B) AQP5 タンパクの  $\beta$ -actin に対する相対発現量の経時変化 (C) ANO1 タンパクの  $\beta$ -actin に対する相対発現量の経時変化

(2) ラット顎下腺導管細胞株 (SMIE) に Bmal1 ルシフェラーゼレポータープラスミドを遺伝子導入した安定株を作成し、微小発光量測定を行った。37 °C に設定したインキュベーター内に微小発光計測装置を設置し、48 時間のリアルタイムルシフェラーゼレポーターアッセイが実施できることを確認した。今後は本アッセイ系を用いて唾液腺の時計遺伝子に影響を与える薬剤を探索する。

(3) 我々は概日リズムの不全が唾液腺の末梢時計にも影響を与え、唾液腺の生理機能を阻害するのではないかと仮説を立て、上記方法によるフリーランラットを作成した。回転かごによる輪回し運動のモニタリングからダブルプロットアクトグラムを作成し、Chi-Square periodgram 解析により周期性を解析した結果、12 時間明暗環境で飼育したラット群 (Light:Dark, LD 群) の行動リズム周期は 23.98 時間であったが、フリーランラット (Light:Light, LL 群) の周期は 24.38 時間に延長していた。ラット種本来の体内時計は 24 時間よりも長く、周囲光変化によるリセットがないためダブルプロットの 14 日目以降で行動リズムの開始時刻がシフトしていた。35 日目に顎下腺を摘出し Total RNA (ZT0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48) を抽出後、定量 RT-PCR 法にて時計遺伝子 (Bmal1, Per2, Clock, Cry1) および Aqp5, Ano1 の  $\beta$ -actin 発現量に対する相対発現量を計測し LD 群と比較した。実験の結果、フリーランラット (LL 群) の顎下腺において Bmal1, Per2 は LD 群から 12 時間シフトし逆位相を示した。また、ピーク時刻における発現量を比較すると Per2, Cry1 は LL 群が有意に低下していた。水分分泌関連イオンチャネルである Aqp5, Ano1 は Per2 同様に LD 群から 12 時間シフトし、Ano1 のピーク発現量が LL 群で有意に低下していることが明らかになった (図2)。



(図2) 唾液腺水分分泌関連イオンチャネル発現リズムのLD群とLL群の比較

各タイムポイントにおけるAqp5, Ano1のmRNA相対発現量を示す(平均値±標準偏差, n=5)。黒線がLD群、赤線がフリーランラットのLL群を示す。LD群から約12時間のシフトが認められ、Ano1のピーク発現量がLL群で有意に低下していることがわかる。

これらの結果は行動リズムがフリーランすることで唾液腺の末梢時計も影響を受け、唾液分泌に関連するイオンチャネルの発現リズムや量も変化することを示唆している。つまり、光環境の変化によって唾液腺の末梢時計リズムや、時計遺伝子を介した唾液分泌関連イオンチャネルの発現調節がある可能性が示された。もし体内時計から唾液腺イオンチャネルへのインプットが存在するならば、シフトワークや不規則な生活習慣による体内時計の乱れはドライマウスの原因となる可能性があり、逆にリズムを正常化することで唾液分泌の改善を見込める可能性もある。今後、唾液腺の末梢時計機構や時計遺伝子から唾液腺の生理機能である分泌・再吸収へのインプット方法を解明する事で、ドライマウスや齲蝕予防の新たなアプローチが可能になると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Ryouichi Satou, Yoshiyuki Shibukawa, Maki Kimura, Naoki Sugihara	4. 巻 5 (11)
2. 論文標題 Light conditions affect rhythmic expression of aquaporin 5 and anoctamin 1 in rat submandibular glands	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heliyon.2019.e02792	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 佐藤涼一、澁川義幸、杉原直樹	4. 巻 122-1
2. 論文標題 「顎骨疾患プロジェクトからの情報発信」18.顎下腺における唾液分泌量サーカディアンリズム機構の解明	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 歯科学報	6. 最初と最後の頁 1-7
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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐藤涼一、鈴木誠太郎、小野瀬祐紀、江口貴子、杉原直樹
2. 発表標題 恒暗飼育ラット顎下腺におけるAQP5およびANO1タンパクの日内変動
3. 学会等名 第69回 日本口腔衛生学会・総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤涼一、杉原直樹
2. 発表標題 明暗・恒暗飼育ラット顎下腺におけるAqp5およびAno1サーカディアンリズム変動
3. 学会等名 第62回 歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤涼一、鈴木誠太郎、小野瀬祐紀、江口貴子、石塚洋一、杉原直樹
2. 発表標題 ラット顎下腺におけるNkcc1およびAtp1発現リズム検討
3. 学会等名 第68回日本口腔衛生学会・総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤涼一、木村麻記、鈴木誠太郎、小野瀬祐紀、澁川義幸、杉原直樹
2. 発表標題 明暗および恒暗環境におけるラット顎下腺水分分泌サーカディアンリズム機構の検討
3. 学会等名 第307回東京歯科大学学会例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤涼一
2. 発表標題 ラット顎下腺の唾液分泌サーカディアンリズム形成機構の解明
3. 学会等名 東京歯科大学 若手サイエンスアカデミー
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木村麻記、黄地健仁、佐藤涼一、国分栄仁、黒田英孝、安藤正之、河野恭佑、野村幸恵、澁川義幸
2. 発表標題 象牙芽細胞における細胞膜 Ca <sup>2+</sup> -ATPase は象牙質石灰化を調節する
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤涼一, 杉原直樹
2. 発表標題 Temporal Expression Pattern of Clock Genes and AQP5/TMEM16A in Rat SubmandibularAcinar and Ductal Cells
3. 学会等名 第28回日本時間生物学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤涼一, 杉原直樹
2. 発表標題 フリーランラットにおける唾液腺末梢時計およびイオンチャネルのサーカディアンリズム解析
3. 学会等名 第65回日本唾液腺学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 高柳篤史、相田 潤、遠藤眞美、佐藤涼一、鈴木誠太郎、山岸 敦	4. 発行年 2021年
2. 出版社 クインテッセンス出版	5. 総ページ数 116
3. 書名 セルフケア指導 脱！誤解と思い込み	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------