

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K18494

研究課題名（和文）加齢に伴う唾液腺への老化関連T細胞集積メカニズムの解析

研究課題名（英文）Analysis of the mechanism of senescence-associated T cell accumulation in the salivary gland with aging.

研究代表者

黒澤 実愛（Kurosawa, Mie）

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：70815802

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：加齢に伴う口腔乾燥症と自己免疫疾患の一つであるシェーグレン症候群(SS)による口腔乾燥症の機序を明らかにすることを目的とする。老齢マウスと若齢のSSモデル(aly/aly)マウスでは唾液腺に老化関連T(SA-T)細胞が集積していた。老齢マウスの唾液腺上皮細胞では老化マーカー遺伝子発現が上昇し、CXCL13/CXCR5を介してSA-T細胞が唾液腺に集積した可能性が示唆された。一方、aly/alyマウスの唾液腺上皮細胞では酸化ストレスマーカーが上昇し、CXCL12/CXCR4を介して唾液腺にSA-T細胞が浸潤した可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

加齢とシェーグレン症候群における口腔乾燥症は共にSA-T細胞の集積によって腺房細胞が破壊され、唾液量が減少することで発症する可能性が示唆された。しかし、加齢に伴う唾液腺へのSA-T細胞の集積は性ホルモンの影響を強く受ける可能性がある。唾液腺上皮細胞におけるエストロゲン添加ではCXCL13などの発現に影響を与えないことから、女性ホルモンであるエストロゲンは免疫細胞に影響を与える可能性がある。一方シェーグレン症候群モデルマウスの唾液腺上皮細胞では酸化ストレスのマーカーが上昇することから、加齢とシェーグレン症候群では、唾液腺にT細胞が集積するメカニズムが異なり、治療方針も異なる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：In this study, to clarify the mechanism of dry mouth (xerostomia) caused by aging or Sjogren's Syndrome (SS), we used aged mice or young aly/aly, a model of SS, mice. we found that the accumulation of senescence-associated T cells (SA-Ts) related with dry mouths were observed in the salivary gland (SG) of both aged mice and aly/aly mice. To reveal the mechanism of SA-Ts accumulation, we focused on the epithelial cells in the SG. Epithelial cells of aged mice expressed senescence marker gene and Cxcl13 but that of aly/aly mice expressed oxidative stress gene and Cxcl12. These results suggest that SA-Ts accumulation was occurred via engagement of CXCR13/CXCR5 triggered by aging in aged mice and CXCL12/CXCR4 triggered by oxidative stress in aly/aly mice.

研究分野：老化

キーワード：唾液腺 免疫老化 細胞老化

1. 研究開始当初の背景

唾液は唾液腺の腺房細胞から分泌され、導管を介して口腔内に分泌される。唾液は多くの抗菌作用を有し、口腔内細菌の安定に寄与し、食塊の形成を促す事で食事の際に嚥下の円滑化を促進するなど様々な機能を有する。そのため、口腔乾燥症は誤嚥性肺炎の潜在的なリスクを高め、口腔内の乾燥により齲蝕や歯周病の発症が増加するなど患者のQOLを著しく低下させる。

口腔乾燥症は加齢に伴い女性に多く発症する事が知られている。加齢変化は唾液腺の腺房細胞などの老化や脂肪化、免疫細胞の老化、senescence-associated secretory phenotype (SASP)によって血中のサイトカイン濃度上昇などが起こり、唾液腺の機能に影響する可能性がある。一方で、口腔乾燥症は自己免疫疾患の一つであるシェーグレン症候群患者の主症状の一つである。シェーグレン症候群では唾液腺や涙腺などの外分泌腺において自己反応性の免疫細胞によって、腺房細胞が破壊され、口腔乾燥症の症状が見られる。そのため、加齢に伴う口腔乾燥症とシェーグレン症候群による口腔乾燥症のメカニズムは異なる可能性がある。

2. 研究の目的

細胞老化や免疫老化など加齢変化は様々であることから、シェーグレン症候群モデルマウスと比較しながら、加齢に伴う口腔乾燥症の発症機序を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

C57BL/6 マウスの若齢マウス(生後 8 週)と老齢マウス(生後 20 ヶ月)を用いて解析した。また、シェーグレン症候群モデルマウスとして NF- κ B 経路の NIK に点変異を有し、全身のリンパ節が欠損した *aly/aly* マウス(生後 10 週)とコントロールマウスは *aly/+* マウスを使用した。

(1)免疫細胞野解析

各マウスの唾液腺と脾臓、頸部リンパ節における免疫細胞の細胞分画を検討するために、各マウスから脾臓と頸部リンパ節、唾液腺を摘出した。脾臓は分散後に溶血剤で赤血球を溶血した。頸部リンパ節はガラスホモジナイザーで、唾液腺はコラゲナーゼにて分散した。

(2)凍結切片および蛍光免疫染色

組織学的な検討を行うために、唾液腺として顎下腺を各マウスから摘出し、O.C.T コンパウンドにて包埋、凍結した。各組織は 5 μ m の厚さで切り出し、HE 染色および蛍光免疫染色を行った。

4. 研究成果

(1)老齢マウスの唾液腺における免疫細胞の動態

老齢マウスの唾液腺では若齢マウスと比較して、自然免疫細胞である樹状細胞やマクロファージが減少していた。しかし、唾液腺では CD19⁺B 細胞や CD4⁺T 細胞、CD8⁺T 細胞が増加していた。特に CD4⁺T 細胞は加齢と共に全身で増加する老化関連 T 細胞 (SA-T 細胞) がメスのマウスで増加していた。加齢に伴い唾液腺では異所性の胚中心が形成される傾向があることから、老齢マウスの唾液腺でも B 細胞や T 細胞が誘導された可能性がある。*aly/aly* マウスの脾臓及び唾液腺においてコントロールマウスと比較して SA-T 細胞が有意に増加しており、一方で CD19⁺B 細胞が減少していた。これは *aly/aly* マウスが NIK に点変異を有し、全身のリンパ節が未発達であることに起因する可能性がある。また、老齢マウスと *aly/aly* マウスにおける SA-T 細胞が類似した細胞であることを確認するためにケモカイン受容体である CXCR5 と CXCR4 の発現を比較した。その結果、老齢マウスと *aly/aly* マウスでは発現は同程度であったため、老齢マウスと *aly/aly* マウスにおける SA-T 細胞は類似の細胞であると考えられる(図 1)。

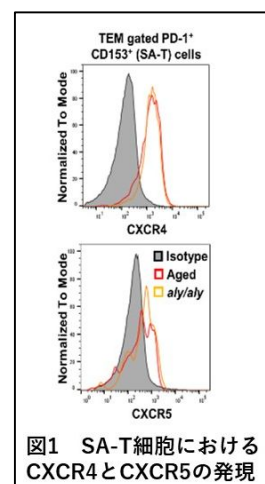


図1 SA-T細胞におけるCXCR4とCXCR5の発現

(2)老齢マウスの唾液腺上皮細胞における

以前の研究結果から、老齢マウスの唾液腺上皮細胞において老化関連マーカーである P16^{INK4a} 遺伝子発現が亢進していた。また、雌雄差によって唾液腺に集積している SA-T 細胞の割合が変化することから、*in vitro* にて老齢マウスの唾液腺上皮細胞におけるエストロゲンによる影響を検討するために、老齢マウスから単離した唾液腺上皮細胞の初代培養を試みた。若齢マウスから単離した唾液腺上皮細胞は培養可能であったが、老齢マウスから単離した唾液腺上皮細胞は培養可能な細胞数が少なかった。また、老齢マウスの唾液腺上皮細胞培養細胞では P16^{INKa} の発現が若齢マウスと同等であったことから、老齢マウスでは老化した細胞はプレートに吸着せず、培養できなかつた可能性がある。

(3)唾液腺における SA- Gal 発現

若齢の *aly/aly* マウスでは、SA- Gal の発現が導管周囲に見られたが、P16^{INK4a} の発現は PCR ではコントロールマウスと比較して上昇しなかった。SA-

Gal は酸化ストレスなどでも発現上昇するため(図 2)、*aly/aly* マウスではコントロールマウスよりも酸化ストレス等に対する感受性が高い可能性がある。また、*aly/aly* マウスでは CXCL13 の発現上昇は見られなかった。以前の研究で *aly/aly* マウスの唾液腺上皮細胞では CXCL12 発現がコントロールマウスと比較して上昇していた。そのため、*aly/aly* マウスの唾液腺に SA-T 細胞が集積する際には CXCL13 ではなく CXCL12 によって誘導されている可能性がある。

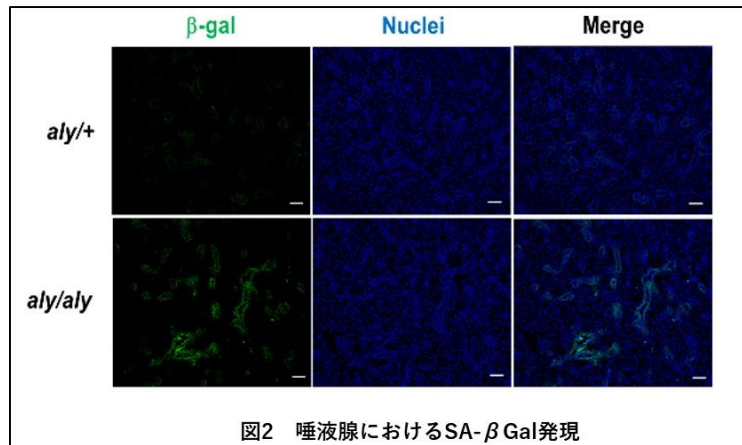


図2 唾液腺におけるSA-β Gal発現

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Trtic Natasa, Mori Mina, Matsui Shohei, Nakamura Natsuno, Fukamachi Haruka, Kurosawa Mie, Morisaki Hirobumi, Maruoka Yasubumi, Mayers Mie, Okahashi Nobuo, Kuwata Hiroataka, Itsumi Momoe	4. 巻 65
2. 論文標題 Oral commensal bacterial flora is responsible for peripheral differentiation of neutrophils in the oral mucosa in the steady state	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences	6. 最初と最後の頁 119 ~ 125
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.job.2022.11.002	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 Kikuchi Mariko, Kadena Miki, Fukamachi Haruka, Takaki Takashi, Matsui Shohei, Hoashi-Takiguchi Sumire, Morisaki Hirobumi, Trtic Natasa, Mori Mina, Kurosawa Mie, Itsumi Momoe, Funatsu Takahiro, Sakurai Atsuo, Shintani Seikou, Kato Hiroki, Fujita Takashi, Maruoka Yasubumi, Kuwata Hiroataka	4. 巻 8
2. 論文標題 Melatonin suppresses the antiviral immune response to EMCV infection through intracellular ATP deprivation caused by mitochondrial fragmentation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e11149
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heliyon.2022.e11149	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 Furukawa Masae, Matsuda Kazunari, Aoki Yu, Yamada Mitsuyoshi, Wang Jingshu, Watanabe Maki, Kurosawa Mie, Shikama Yosuke, Matsushita Kenji	4. 巻 8
2. 論文標題 Analysis of senescence in gingival tissues and gingival fibroblast cultures	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Dental Research	6. 最初と最後の頁 939 ~ 949
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cre2.581	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 Hoashi-Takiguchi Sumire, Morisaki Hirobumi, Itsumi Momoe, Kikuchi Mariko, Fukamachi Haruka, Kurosawa Mie, Yamada Michi, Suzuki Noriyuki, Kuwata Hiroataka	4. 巻 30
2. 論文標題 Novel antibody assessment method for microbial compositional alteration in the oral cavity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 101269
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2022.101269	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 Furukawa Masae, Tada Hirobumi, Wang Jingshu, Yamada Mitsuyoshi, Kurosawa Mie, Satoh Akiko, Ogiso Noboru, Shikama Yosuke, Matsushita Kenji	4. 巻 12
2. 論文標題 Molar loss induces hypothalamic and hippocampal astrogliosis in aged mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6409
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-10321-w	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 Yosuke Shikama, Mie Kurosawa, Masae Furukawa, Yasusei Kudo, Naozumi Ishimaru, Kenji Matsushita	4. 巻 19
2. 論文標題 The Priming Potential of Interferon Lambda-1 for Antiviral Defense in the Oral Mucosa	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Inflammation .	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10753-022-01624-1	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 Masae Furukawa, Kazunari Matsuda, Yu Aoki, Mitsuyoshi Yamada, Jingshu Wang, Maki Watanabe, Mie Kurosawa, Yosuke Shikama, Kenji Matsushita	4. 巻 2
2. 論文標題 Analysis of senescence in gingival tissues and gingival fibroblast cultures	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clin Exp Dent Res .	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cre2.581.	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 Kurosawa Mie, Shikama Yosuke, Furukawa Masae, Arakaki Rieko, Ishimaru Naozumi, Matsushita Kenji	4. 巻 22
2. 論文標題 Chemokines Up-Regulated in Epithelial Cells Control Senescence-Associated T Cell Accumulation in Salivary Glands of Aged and Sjogren 's Syndrome Model Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2302
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22052302	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 Furukawa Masae, Wang Jingshu, Kurosawa Mie, Ogiso Noboru, Shikama Yosuke, Kanekura Takuro, Matsushita Kenji	4. 巻 63
2. 論文標題 Effect of green propolis extracts on experimental aged gingival irritation in vivo and in vitro	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences	6. 最初と最後の頁 58 ~ 65
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.job.2020.12.003	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 Matsushita Kenji, Yamada-Furukawa Masae, Kurosawa Mie, Shikama Yosuke	4. 巻 Volume 13
2. 論文標題 Periodontal Disease and Periodontal Disease-Related Bacteria Involved in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Inflammation Research	6. 最初と最後の頁 275 ~ 283
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2147/JIR.S255309	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 Furukawa Masae, Yamada Kiyoko, Kurosawa Mie, Shikama Yosuke, Wang Jingshu, Watanabe Maki, Kanekura Takuro, Matsushita Kenji	4. 巻 98
2. 論文標題 High concentration of glucose induces filaggrin-1 expression through AP-1 in skin keratinocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Dermatological Science	6. 最初と最後の頁 137 ~ 140
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jdermsci.2020.04.002	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2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 黒澤実愛、古川匡恵、松下健二、四釜洋介
2. 発表標題 老化関連T細胞および唾液腺上皮の細胞老化が口腔乾燥症の病態形成に關与する可能性
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 黒澤実愛、古川匡恵、松下健二
2. 発表標題 加齢による口腔乾燥症の病態形成における老化関連T細胞の関与
3. 学会等名 第20回日本抗加齢医学会総会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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