

令和 6 年 6 月 2 日現在

機関番号：27102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09983

研究課題名（和文）P2Y2受容体作動薬のドラッグ・リポジショニングによる口腔機能改善効果の検証

研究課題名（英文）Drug repositioning of P2Y2 receptor agonists to improve oral function

研究代表者

向坊 太郎（Mukaibo, Taro）

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：50635117

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）：高齢者では口腔乾燥症の有病率が高いことが知られているが、加齢そのものにより唾液の量と質が変化するかは結論が得られていない。本研究では老齢マウス舌下腺Ex vivo灌流実験により、体外に摘出した舌下腺を灌流し、ムスカリンおよび アドレナリン刺激による分泌唾液を回収することで唾液腺と分泌唾液への加齢の直接的影響を調査した。調査の結果、加齢により舌下腺唾液のレオロジー性質が変化し、その原因が唾液中分泌型ムチンに結合する糖鎖修飾にあることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢者における口腔乾燥症の発症は口腔関連QoLの低下に繋がり、栄養摂取が妨げられることによりフレイルのリスクを高めると考えられる。これまで加齢による唾液腺への影響のメカニズムは不明な点が多く、また唾液の量ではなく質に着目した研究は少なかった。本研究では老齢マウス舌下腺をex vivo灌流実験により回収し、分泌タンパク（ムチン）に注目することにより糖鎖修飾（シアル酸）に変化が起きることを明らかにした。研究成果は今後高齢者における唾液中ムチンの糖鎖修飾について研究を進め、ムチン分泌をターゲットとした口腔乾燥症治療薬開発を行うための一歩であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The prevalence of xerostomia is high in older adults, but it is inconclusive whether aging alters the quantity and quality of saliva. The present study investigated the direct effects of aging on salivary glands and secreted saliva by performing ex vivo perfusion experiments in the sublingual glands of aged mice, which were removed ex vivo, and collecting muscarinic and -adrenergic stimulated secreted saliva. The investigation revealed that the rheological properties of sublingual gland saliva change with age and that this is due to glycosylation binding to secretory mucins in saliva.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：口腔乾燥症 高齢者 ムチン 唾液

### 1. 研究開始当初の背景

超高齢社会を迎えた本邦では口腔乾燥症患者の増加が見込まれる。これまで治療は対症療法が主体であり臨床応用された唾液分泌を促す薬物療法も副作用の問題から普及しておらず、新たな治療戦略が求められている。近年唾液中の水分保持の機能をもつムチンの分泌低下が口腔乾燥症患者で複数報告されており、口腔乾燥症状とムチンの分泌低下との関連が注目されている。ドライマウス（口腔乾燥症）に罹患している患者数は日本国内で約 800 万人以上と推定され、潜在的な患者数を含めると 3000 万人ともいわれる。一方日本では平均寿命が伸び続けており、2050 年には女性の平均寿命は 90 歳を超えると予想されている。したがって日本において今後年齢と相関がある口腔乾燥症患者は増加し続けることは確実である。唾液は栄養の経口摂取を維持し、健康寿命を支えるうえで非常に重要な要素であり、口腔乾燥症は摂食・嚥下機能の低下や誤嚥性肺炎の原因となるだけでなく、義歯の維持力低下、補綴処置歯の根面カリエスの増加などの補綴トラブルの原因となる。これまで口腔乾燥症の診断・治療は唾液腺からの水分分泌量が主に注目されてきた。しかし、近年唾液中に分泌されるムチンが水分の保持・安定に関与し、唾液中の構成要素としては 1% 以下のムチンが実は大きな役割を果たしていることが分かってきた。すでに眼科領域では細胞表面のムチンが水層を保持・安定化させているという概念が受け入れられ、実際にムチン分泌をターゲットとした薬剤が臨床応用されている。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は唾液腺細胞が分泌するムチンに着目し、老齢マウスを用いて加齢によるムチン分泌の変化をマウス舌下腺で調査することで、将来ムチン分泌を促進する薬剤の開発に向けて基礎データを解析、公表することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 老齢マウス舌下腺唾液の ex vivo 灌流実験

血圧、体温など多くの要素が加齢変化によって影響を受けるため、加齢による唾液腺自体の機能変化を観察することは容易ではない。本研究では ex vivo 舌下腺灌流実験を老齢マウスに適応することにより、舌下腺組織および舌下腺分泌唾液への加齢変化を調査した。全身麻酔下で顕微鏡下にてマウス舌下腺を体外に摘出し、総頸動脈をカニューレに連結する。蠕動ポンプからカニューレを通じて単離した舌下腺を灌流し、灌流液中にムスカリン性刺激薬および  $\beta$  アドレナリン刺激薬を混入することで舌下腺唾液を毛細管に採取した。

#### (2) 舌下腺唾液の LC-MS (液体クロマトグラフィー・質量分析) 解析

採取した舌下腺唾液を LC-MS 解析を行うことで舌下腺唾液の糖鎖構造を推定した。さらに若齢マウスと老齢マウスで糖鎖構造に違いがあるかを比較した。

#### (3) 舌下腺組織の調査

老齢マウスで変化があった糖鎖構造の一部に関してメカニズムを明らかにするため、舌下腺組織の qPCR とウエスタンブロットにより mRNA とタンパクの発現を若齢と老齢マウスで比較した。

### 4. 研究成果

#### (1) 老齢マウス舌下腺唾液量は変化せず、唾液のレオロジー性質（曳糸性）が低下した

Ex vivo 舌下腺灌流実験により摘出した舌下腺からの唾液分泌量は若齢と老齢マウス舌下腺でムスカリン性刺激薬および  $\beta$  アドレナリン刺激薬時の唾液分泌量と唾液分泌速度に変化はなかった (図 1)。一方で採取した唾液の曳糸性を NEVAMETER (Ishikawa iron works, Japan) で測定したところ、老齢マウスで低下することが明らかになった (図 2)。唾液の曳糸性は唾液中分泌型ムチン濃度に依存するとの報告から<sup>(1)</sup>、当初舌下腺唾液中のムチン (MUC19) 濃度に差があるのではないかと仮説を立てたが、ムチン濃度を表す GalNac (N-アセチルガラクトサミン) 濃度に差はなかった。

図 1. 舌下腺 Ex vivo 灌流実験唾液分泌速度

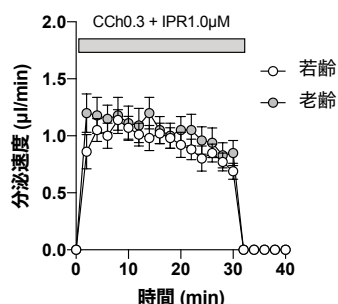
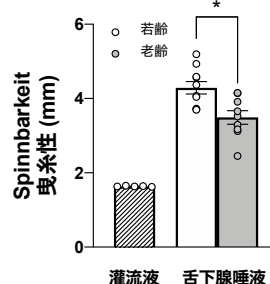


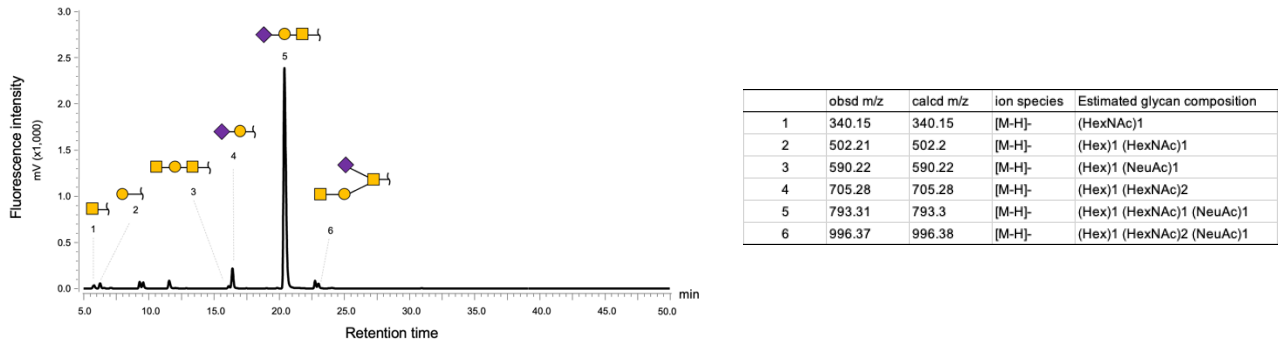
図 2. 舌下腺唾液の曳糸性の比較



### (2) 舌下腺唾液中の LC-MS 解析により舌下腺唾液の糖鎖構造が明らかになった

回収した舌下腺唾液の糖鎖構造を LC-MS 解析したところ、(Hex)1(HexNAc)1(NeuAc)1 で表される糖鎖構造が極めて高いピークを示すことがわかった (図 3). 解析から予測される糖鎖構造は複数あるものの、これまでの報告<sup>(2)</sup>からこの構造が NeuAc( $\alpha$ 2-3)Gal( $\beta$ 1-3)GalNAc で、 $\alpha$ 2-3 シアル酸結合を糖鎖構造にもつと仮説を立てた。

図 3. 回収した舌下腺唾液の LC-MS (液体クロマトグラフィー・質量分析) 解析



### (3) 老齢マウスの舌下腺組織でシアル酸転移酵素の発現が低下した

舌下腺組織におけるムチンの糖鎖構造を確認するため、 $\alpha$ 2-3 シアル酸結合に特異性をもつレクチンである *Maackia amurensis* lectin II (MAL II) で染色したところ、舌下腺が強く染色され、舌下腺から  $\alpha$ 2-3 シアル酸結合を糖鎖構造にもつムチン(MUC19)が分泌されていることが裏付けられた (図 4). 次にムチンに結合する糖鎖は細胞質中のゴルジ体内の糖鎖転位酵素により添加されると考えられていることから、 $\alpha$ 2-3 シアル酸結合に関与する転位酵素(SIAT4A)のコード遺伝子 *St3gal1* の発現を若齢と老齢マウスで比較したところ、老齢マウスで *St3gal1* の発現が低下していることが分かった. この結果はウエスタンブロットと、レクチンブロットと呼ばれる唾液中の  $\alpha$ 2-3 シアル酸結合の定量評価によっても裏付けられた。

図 4. MALII で強染色される舌下腺 (黒矢印) 図 5. 老齢マウスでの *St3gal1* 遺伝子発現の低下



### 結論

本研究ではこれまで明らかになっていなかった老化による舌下腺唾液の変化について曳糸性という唾液の質を評価軸に調査を行った. マウス舌下腺は MUC19 と呼ばれる分泌型ムチンを得意的に分泌するが、今回初めて MUC19 に結合する糖鎖が  $\alpha$ 2-3 シアル酸結合をもつ NeuAc( $\alpha$ 2-3)Gal( $\beta$ 1-3)GalNAc であることが明らかになった. さらに老化により  $\alpha$ 2-3 シアル酸結合の糖鎖転位酵素の SIAT4A の発現が遺伝子、タンパクレベルで老化により低下することで、舌下腺唾液の曳糸性が変化することが示唆された. 本研究により、高齢者の唾液の質にも着目することにより、将来の口腔乾燥症の治療に役立つことが期待される。

1. Inoue H, et al. Journal of Oral Biosciences. 2008;50(2):134-41.

2. Iida M, et al. Archives of oral biology. 2019;97:52-8.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamada M., Masaki C., Mukaibo T., Munemasa T., Nodai T., Kondo Y., Hosokawa R.	4. 巻 101
2. 論文標題 Altered Rheological Properties of Saliva with Aging in Mouse Sublingual Gland	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Dental Research	6. 最初と最後の頁 942 ~ 950
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/00220345221076071	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 1件）

1. 発表者名 向坊 太郎, 正木 千尋, 近藤 祐介, 宗政 翔, 野代 知孝, 山田 真紀雄, 細川 隆司
2. 発表標題 唾液中ムチンに焦点を当てた口腔乾燥症治療戦略
3. 学会等名 令和4年日本補綴歯科学会九州支部学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yamada M, Mukaibo T, Nodai T, Munemasa T, Kondo Y, Masaki C, and Hosokawa R.
2. 発表標題 Sexually Dimorphic Effects of Aging on Rheological Properties in Saliva
3. 学会等名 2021 IADR/AADR/CADR General Session & Exhibition (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山田真紀雄, 向坊太郎, 岩本大征, 帯金惟, 袖山美奈子, 矢野良佳, 平田祐基, 細川隆司
2. 発表標題 加齢による唾液の物性変化と分子生物学的メカニズムの調査
3. 学会等名 第51回日本口腔インプラント学会記念学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 向坊太郎, 正木千尋, 近藤祐介, 宗政翔, 野代知孝, 細川隆司
2. 発表標題 唾液の老化を知ろう
3. 学会等名 第34回日本老年歯科医学会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Taro Mukaibo, Mikio Yamada	4. 発行年 2024年
2. 出版社 Springer Nature	5. 総ページ数 7
3. 書名 Methods in Molecular Biology, Mucins	

〔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	近藤 祐介 (Yusuke Kondo)  (00611287)	九州歯科大学・歯学部・講師  (27102)	
研究分担者	宗政 翔 (Munemasa Takashi)  (40852489)	九州歯科大学・歯学部・助教  (27102)	
研究分担者	正木 千尋 (Masaki Chihiro)  (60397940)	九州歯科大学・歯学部・准教授  (27102)	

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 分 担 者	細川 隆司  (Hosokawa Ryuji)  (60211546)	九州歯科大学・歯学部・特別研修員     (27102)	

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