

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：24403

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26560065

研究課題名(和文) 男性ホルモン減少による唾液タンパク質の質的变化と生活習慣病

研究課題名(英文) The effects of androgen on the content of secretory salivary proteins

研究代表者

乾 博 (Inui, Hiroshi)

大阪府立大学・総合リハビリテーション学部・教授

研究者番号：20193568

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、3大唾液腺の発達と性ホルモン受容体の発現および唾液量や唾液タンパク質における性差とテストステロンの影響について検討を行った。8週齢のマウスにおいてアンドロゲン受容体(AR)は、顎下腺、舌下腺、耳下腺ともに高いレベルで発現していた。唾液腺の比体重重量に雌雄差は認められなかった。ピロカルピン刺激によって分泌された唾液タンパク質のうち、雌雄で量の異なるものを同定することができた。また、その一部はテストステロンによって量が制御されることを見出した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined sex-associated differences in the expression of sex hormone receptors in the salivary glands and in the abundance of secretory salivary proteins. Androgen receptor was highly expressed in the submandibular, sublingual, and parotid glands of both male and female mice. No significant differences were observed in the relative salivary glands weights of male and female mice. We have identified sex-associated bias in secretory salivary protein types. Testosterone levels in male mice were partially responsible for the sex-associated differences in the abundance of the specific salivary proteins.

研究分野：栄養生化学

キーワード：唾液 アンドロゲン 性差 テストステロン

1. 研究開始当初の背景

(1) 唾液について

唾液は、唾液腺から口腔内に分泌される分泌液である。顎下腺、舌下腺、耳下腺が3大唾液腺と呼ばれ、唾液の産生と分泌器官として機能する。成分の99%が水分であり、残りはタンパク質(ムチンなどの糖タンパク質、消化酵素)が0.4-0.5%、電解質が0.1-0.3%からなり、正常では1日に1-1.5L程度分泌される。唾液はアミラーゼによるデンプンの消化作用を持つ他、口腔粘膜の保護や洗浄、抗菌などの作用を持つことや緩衝液としてpHが急激に低下しないように働くことで、歯のう蝕予防作用を持つ。

唾液は、口腔咽頭の健康を保つための重要な働きをする。口腔が乾くという愁訴(口腔乾燥)や唾液分泌量の減少(唾液腺機能低下)は、特に高齢者で一般的な症状である。これらの症状は、嚥下障害やの口腔疾患、口臭、宿主の防御能の低下を引き起こす。このような症状が持続した場合、重大かつ長期の口腔および咽頭の疾患やQOLの低下を招く。

(2) 男性ホルモンの作用と唾液腺における役割

近年、疫学的な調査により肥満や加齢は男性ホルモンであるテストステロンを減少させること、テストステロンが減少すると、体重増加、糖・脂質代謝の悪化に起因して、糖尿病、心疾患を発症するリスクが上昇し、老化を助長して寿命を短縮させることが明らかになっている。一方で、これまでに3大唾液腺のうち、顎下腺ではアンドロゲン受容体(AR)が発現しており、去勢すると顎下腺重量が減少すること、テストステロンを投与することで重量が回復することから、顎下腺はアンドロゲンの標的器官であると考えられている。また唾液腺の組織学的構造には性差が存在しており、特に顎下腺では顆粒導管細胞の分化・発達に男性ホルモンが関与しており、去勢によって退化して線条部導管細胞になり、テストステロンの投与によって回復する。またヒトの女性の顎下腺と舌下腺では女性ホルモンであるエストロゲン受容体(ER)が発現していることも知られている。

2. 研究の目的

本研究では、3大唾液腺の発達と性ホルモン受容体の発現、および唾液タンパク質における性差とテストステロンの影響について、マウスを用いて検討した。

3. 研究の方法

(1) 動物の飼育と去勢術

7週齢のC57BL/6Jマウス(紀和実験動物)を入手して室温23±3、湿度60±10%、12時間定時照明(8:00-20:00)に設定した

飼育室にて、床敷チップを入れたプラスチックケージに入れ、餌はCE2(日本クレア)を自由摂取させて単独飼育した。8週齢時に、オスは精巣摘出手術を施す去勢群、去勢手術後にテストステロンを投与する群(テストステロン群)、擬似手術群の3群を、メスは擬似手術群に分け、深麻酔下で手術を行った。

去勢手術1週間後(9週齢)より去勢群の中からテストステロン群にエナント酸テストステロン(3.6mg/kg)を毎週皮下投与した。テストステロン処置を行わない他の群には、Sesami oilのみを皮下投与した。

解剖後、唾液腺は顎下腺、舌下腺、耳下腺の3種類に分離した後、mRNA抽出用に組織を取り液体窒素で凍結後-80で保管したものと切片解析用に10%ホルマリンに浸漬したものに分けた。

(2) 唾液の採取

去勢後、2週間おきに以下の方法で唾液の採取を行った。3時間絶食後に、ペントバルビタールナトリウム麻酔下にてピロカルピン塩酸塩を0.5mg/kg腹腔内投与した。ピロカルピン塩酸塩投与から20分間に分泌される唾液を採取した。採取されたサンプルは液体窒素で凍結後-80で保管した。唾液タンパク質は、SDS-PAGEにより分離し、CBB染色により解析を行った。

(3) 定量PCR法

Sepasol-RNA I Super G(ナカライテスク)を用いて組織からTotal RNAを抽出した。Total RNAをRNase inhibitor(タカラバイオ)存在下でDNase I(タカラバイオ)処理を行った。DNase処理を行ったTotal RNA(1μg)とoligo dT20 primer、ReverTra Ace(TOYOBO)を用いて、逆転社反応を行い、cDNAを合成した。cDNAは-20で保存した。

逆転写したcDNAをテンプレートとし、センスプライマーとアンチセンスプライマーを用いてリアルタイムPCR法による解析を行った。サーマルサイクラーはThermal Cycler Dice Real Time TP800(タカラバイオ)を使用して、SYBR Premix Ex Taq II Tli RNaseH Plus(タカラバイオ)を用いて行った。用いたプライマーは以下のとおりである。AR(sense:5'-GCAGCTTGTGCATGTGGTCA-3'、antisense:

5'-AATACCATCAGTCCCATCCAGGAA-3')、ER

(sense:5'-ATGATTGGTCTCGTCTCGCGCT-3'、antisense:

5'-AGCAGGTCATAGAGGGGCACAACG-3')、ER

(sense:5'-GAGGCCTCCATGATGATGTCCCT-3'、antisense:5'-TCTGGAGCAAAGATGAGCTTGCC-3')、

-actin (sense:

5'-TTGCTGACAGGATGCAGAAG-3'、antisense:

5'-GTACTTGCGCTCAGGAGGAG-3')PCRプログラム

は、全て1サイクル:94°C-1分/45サイクル:94°C-30秒、60°C-30秒、72°C-30秒で行った。また-Actinを内部コントロール

ールとして、定量的 PCR の試料間の補正を行った。

(4) 免疫組織化学染色法

中性ホルマリン溶液で固定した組織をパラフィン包埋し、ミクロトームを用いて 4 μm に薄切した。脱パラフィン処理後、3% H_2O を用いて内在性のペルオキシダーゼを失活させた。10 mM クエン酸バッファー (pH6.0) に浸した状態で、マイクロウェーブ (600 W) で 10 分間加熱処理し、抗原の賦活化を行った。6% スキムミルク溶液を用いてブロッキング後、抗 AR ラビットポリクロナール抗体 (N-20, Santa Cruz Biotechnology) を 3% ウシ血清アルブミン溶液に 1/100 希釈することで作製した一次抗体溶液に浸して、4 日で一晩静置した。二次抗体としてヒストファインシンプルステインマウス MAX-PO (Nichirei) を用い、DAB 染色 (Vector Laboratories) を行った。その後、ヘマトキシリン - エオジン染色を行い、オイキット溶液 (As One) とカバーガラスを用いて封入してプレパラートを作製した。

(5) 唾液腺腫瘍細胞培養法

マウス唾液腺腫瘍細胞株 SCA9 clone-15 (SCA9-15) 細胞およびヒト唾液腺腫瘍細胞株 A253 細胞は American Type Culture Collection より購入した。培養は 10% ウシ胎児血清、100 units/ml ペニシリン G ナトリウム、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ストレプトマイシン、1.0 g/L 炭酸水素ナトリウム、を含む DMEM 培地を用い、95% air、5% CO_2 、37 のインキュベーター内で行った。継代は細胞を PBS (-) で洗浄し、0.25% トリプシンと 0.02% EDTA を含む PBS (-) で処理することで細胞を剥がし、新鮮な培地に懸濁することによって行った。

(6) 統計解析

統計解析には、JMP statistical software version 8.0.1 (SAS Institute) を用いた。2 群間比較は Student の t 検定、多重比較分析は Tukey-Kramer の HSD 検定を行い、 $p < 0.05$ をもって統計学的有意とした。

4. 研究成果

(1) 唾液腺の重量の雌雄差変化

マウス雌雄間の唾液腺重量の違いを調べるために 8 週齢の C57BL/6J 雌雄マウスの顎下腺、耳下腺、舌下腺の重量を比較した。3 大唾液腺の重量は、比体重で比較すると雌雄差は認められなかった。一方で、8 週齢で去勢したマウスの 20 週齢時における顎下腺重量は、去勢により減少し、エナント酸テストステロンの投与によって回復した。

(2) 唾液腺における AR、ER、ER の発現

8 週齢の C57BL/6J 雌雄マウスの顎下腺、耳

下腺、舌下腺における AR、ER、ER の発現を定量 RT-PCR で検討したところ、AR の発現レベルはポジティブコントロールとして用いた精巢上体よりは低い、すべての唾液腺で雌雄ともに高いレベルで発現することが判明した。一方、唾液腺における ER の発現は雌の耳下腺を除き、ポジティブコントロールとして用いた子宮に比べて顕著に低かった。また、ER の発現は、雌雄マウスの 3 大唾液腺の全てでポジティブコントロールとして用いた子宮に比べて顕著に低かった。

(3) 免疫組織化学によるマウス顎下腺における AR の局在

マウス顎下腺における AR の局在を調べるために、8 週齢の C57BL/6J 雄マウスの顎下腺において抗 AR 抗体を用いて免疫組織化学を行い、顎下腺の AR 発現について検討した。その結果、腺房細胞、顆粒導管細胞に高発現し、主に核内に局在していることが判明した。

(4) 唾液量の雌雄差

唾液量の性差を解析するために雌雄マウスからの唾液採取を行った。唾液の採取は麻酔下でピロカルピン塩酸塩を投与することで副交感神経を興奮させて唾液の分泌を促進させて、20 分間唾液を採取した。体重あたりの唾液量において、顕著な雌雄差は見られなかった。

(5) 唾液タンパク質の性差

性成熟後の 8 週齢から C57BL/6J 雌雄マウスの唾液を採取しタンパク質を CBB 染色により解析を行った。その結果、発現量で雌雄差が認められるタンパク質を LC/MS-MS 分析を用いて複数同定することができた。さらに、雌雄差が認められたタンパク質の一部については、去勢、エナント酸テストステロン投与試験の結果、テストステロンによって変動することが判明した。

(6) 唾液腺腫瘍細胞株における AR の発現

唾液腺におけるアンドロゲンシグナルの影響を調べることを目的に、唾液腺細胞株における AR の発現についてウエスタンブロットを用いて検討した。その結果、SCA9-15 細胞には、低レベルで AR の発現が認められたが、A253 細胞には AR の発現レベルは検出感度以下であった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Harada N, Inui H, and Yamaji R. "Competitive and compensatory effects of androgen signaling and glucocorticoid signaling" *Receptors Clin. Investig.*, 2, e785, 2015. 査読有

〔学会発表〕(計2件)

橋本未来、原田直樹、乾博、山地亮一 “ 唾液タンパク質の性差とテストステロンの影響について ” 2015年度日本農芸化学会中部・関西支部合同大会 (中部支部第174回例会)(関西支部第491回講演会)、富山(富山県立大学)、2015年9月19~20日

塚本敬太、乾博、原田直樹、杉本圭一郎、中川一弥、高橋芳久、福里利夫、山内俊一、中野長久、山地亮一 “ 非アルコール性脂肪性肝炎モデルマウスに対するバニラ残渣抽出物の影響 ” 第53回日本栄養・食糧学会近畿支部大会、京都(京都府立大学)、2014年10月25日

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.biosci.osakafu-u.ac.jp/NC/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

乾博 (INUI Hiroshi)

大阪府立大学・総合リハビリテーション学部・教授

研究者番号: 20193568

(2) 研究分担者

原田直樹 (HARADA Naoki)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・講師

研究者番号: 00529141