

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：32710

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893297

研究課題名(和文)顎下腺機能に概日リズムを生じる機構の解明

研究課題名(英文)The circadian rhythm in salivary glands

研究代表者

内田 仁司(UCHIDA, Hitoshi)

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号：20736996

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトの安静時唾液には分泌量に昼夜差を示すことが知られているが、その調節機構は明らかとなっていない。本研究では、顎下腺の機能の日内変動が、顎下腺自体の時計機構に駆動されるのか、体内時計の中核である視交叉上核に制御されるのかを解明することを目的とした。

本研究の結果から、顎下腺に内因性の概日リズムが存在する事が明らかとなり、唾液分泌に関与する水チャネルの発現の日内変動は自律神経系を介した中枢時計(視交叉上核)の影響を優位に受けて制御されている事が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The flow rate and composition of unstimulated saliva show circadian rhythms. The circadian pacemaker is located in the suprachiasmatic nucleus (SCN) of the hypothalamus as well as circadian oscillator in extra-SCN brain regions, and peripheral tissues. The SCN synchronizes other oscillators. The aim of this study is to determine whether the salivary function is regulated by its autonomous oscillators existed in the peripheral clock in the submandibular gland (SMG) or is driven by the central clock in the SCN. We examined the expression profiles of clock genes and Aqp5 mRNA in the SMG using samples taken from in vivo and ex vivo. 24-hour variations were detected in the expression profiles of clock genes and Aqp5 mRNA in the SMG in vivo. On the other hand, Aqp5 mRNA exhibited the arrhythmic expression in cultured SMG ex vivo. Therefore, we propose that the 24-hour expression of Aqp5 in the SMG was dominantly regulated by the central clock in the SCN via the autonomic nervous system.

研究分野：時間生物学

キーワード：唾液腺 概日リズム 時計遺伝子 視交叉上核

1. 研究開始当初の背景

(1)近年、口腔乾燥症(ドライマウス)患者が増加しており、病因の特定が困難な症例が散見される。従来の研究において本症の原因の解明が試みられてきたが、未だその原因は明らかではなく、既存の病因論だけでは説明できない症例も数多く存在する。

(2)ヒトの安静時唾液には、分泌量に日内変動を示すことが知られており、活動期である昼間に増加し、休止期である夜間に減少する。また、唾液には種々の酵素や成長因子が含有されており、マウスやラットを用いた研究では、上皮成長因子と神経成長因子の濃度やアドレナリン受容体の密度、AMYLAASE 活性に日内変動を示すことが報告されている。しかしながら、この昼夜差を生み出す調節機構は明らかでない。

(3)哺乳類において、視床下部視交叉上核は全身の概日リズムを調節するペースメーカーとして機能し、生理機能や行動リズムを制御している。この概日リズムは時計遺伝子 (*Bmal1*, *Clock*, *Per*, *Cry*) で構成される転写・翻訳フィードバックループによって自律的に発生すると考えられている。また、視交叉上核以外の脳神経部位や肝臓、肺などの末梢組織も自律的な概日リズムを示すことが明らかとなっている。概日リズムは唾液腺にも存在するとの報告があるが、これが視交叉上核によって駆動されるのか、唾液腺自体の自律的な内因性リズムであるのか、または環境の周期的な変化に応じて制御を受ける外因性リズムであるのかは明らかとなっていない。このことから、唾液腺機能の日内変動を制御する機構を解明することは、ドライマウスの対処法に有用であると考えられる。

2. 研究の目的

唾液腺における時計機構を明らかにし、唾液腺機能の日内変動が中枢時計である視交叉上核に駆動されるのか、唾液腺自体の時計機能によって制御されるのかを解明することを目的とした。唾液腺の機能を概日リズムの側面から検討することで、ドライマウスの新たな対処法を確立することを目指している。

3. 研究の方法

(1)野生型 (C57BL/6J) マウス、遺伝子改変発光レポーター (*Period2::Luciferase*; *Per2::Luc* knock-in) マウス、時計遺伝子 *Cryptochrome* (*Cry*) knock-out マウス (*Cry1^{-/-}*マウス、*Cry2^{-/-}*マウス、*Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}*マウス)を用いた。

(2) CCD カメラと光電子倍增管 (photo-multiplier tube; PMT) を用いて、体内時計の中核である視交叉上核と摂食行動に關与すると考えられている弓状核および顎下腺における時計タンパク質の局在と変動の測定を行った。

(3) 時計遺伝子 (*Per2*, *Bmal1*) と時計制御遺伝子 (*Dbp*)、唾液分泌に關与する水チャネル *Aqp5* の mRNA を、24 時間で 4 時間毎にマウスの顎下腺から抽出し、real-time RT-PCR 法を用いて発現状態を検出した (in vivo)。

(4) 中枢時計 (視交叉上核) や全身の概日リズムの影響を排除するため、顎下腺の培養を行い、生体内 (in vivo) と同様に 24 時間で 4 時間毎に *Per2*, *Bmal1*, *Dbp*, *Aqp5* の mRNA の回収を行った (ex vivo)。real-time RT-PCR 法を用いて 時刻依存的な発現を検出し、in vivo の発現変動のプロファイルと比較・検討を行った。

4. 研究成果

(1) 野生型と時計遺伝子 *Cry* を欠損したマウス (*Cry1^{-/-}*マウス、*Cry2^{-/-}*マウス) の弓状核に *PER2::LUC* 活性の明瞭な概日リズムが存在し、その周期は *Cry* 依存的に変化する事を明らかにした。しかしながら、視交叉上核と比較して、弓状核では概日リズムの振幅が急速な減衰を示した。また、*Cry1^{-/-}*マウスの弓状核では、特に概日リズムの振幅の減衰が顕著であった。これまでに視交叉上核において、*Cry1* が概日振動の継続に重要であることが報告されている。このことから、弓状核においても同様に、概日リズムの継続性に *Cry1* が重要な役割を果たしていることが示唆された。

(2) 顎下腺におけるイメージングの結果、時計タンパク質 *PER2* の発現変動は導管部ではなく、腺房部に強く発現変動を認めた。このことは、唾液腺の腺房が時計機能の影響を強く受けることを示していると考えられる。また、*PER2::Luc* 概日リズムの周期は、視交叉上核や弓状核と同様に、*Cry* 依存的に変化する事が明らかとなった。

(3) 生体内 (in vivo) の顎下腺において、時計遺伝子 (*Per2*, *Bmal1*)、時計制御遺伝子 (*Dbp*) が、時刻依存的な発現変動を示すことが明らかとなった。水チャネル *Aqp5* においても、マウスの活動期である夜間に発現が最大となる日内変動を示すことが示された。このことから、マウスにおいて活動期に唾液分泌が亢進する可能性が考えられた。しかしながら、体内時計を欠損したノックアウトマウス (*Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}*マウス) では、通常の明期と暗期が 12 時間ずつの 24 時間周期の飼育環境下で *Per2*, *Bmal1*, *Dbp* および *Aqp5* の発現に変動を示さなかった。これらのことは、*Aqp5* 発現の日内変動に分子時計機構が関与することを示唆している。

(4) 生体内から摘出した培養条件下 (ex vivo) の顎下腺において、in vivo と同様に *Per2*, *Bmal1*, *Dbp* に時間依存的な発現変動を認めた。このことは、神経支配や全身の行動リズムの影響から分離した状態でも、顎下腺に時計機能が存続することを示している。一方で、*Aqp5* の発現には概日変動を認めなかったことから、培養条件下では時計機構に直接制御されないことが示唆された。

(5) 以上の結果から、唾液腺に内因性の分子時計機構が存在することが明らかとなり、水チャネル *Aqp5* 発現の日内変動は自律神経系を介した中枢時計 (視交叉上核) の影響を優位に受けて制御されることが示唆された。

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)

Uchida H, Nakamura TJ, Takasu NN, Todo T, Sakai T and Nakamura W. Cryptochrome-dependent circadian periods in the arcuate nucleus. *Neurosci Lett*. 2016 Jan 1;610:123-8. doi: 10.1016/j.neulet.2015.10.071. (査読有)

[学会発表](計 2 件)

内田仁司, 斎藤一郎, 阪井丘芳「唾液分泌の日内変動における機能分子の解析」第 15 回日本抗加齢医学会総会 (於: 福岡国際会議場: 2015 年 5 月 29 日~31 日)

内田仁司, 阪井丘芳, 斎藤一郎, 中村渉「マウス顎下腺の概日リズム」第 56 回歯科基礎医学会学術大会・総会 (於: 福岡国際会議場: 2014 年 9 月 25 日~27 日)

〔その他〕
ホームページ等

<http://ccs.tsurumi-u.ac.jp/dental/kouza/byouri/index.html>

6．研究組織

(1) 研究代表者

内田 仁司 (UCHIDA, Hitoshi)
鶴見大学・歯学部・助教
研究者番号：20736996