

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：32710

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05020

研究課題名(和文) カロリー制限研究からの知見を応用した唾液分泌障害に対する新規治療基盤の確立

研究課題名(英文) The molecular mechanism of salivary dysfunction amelioration by calorie restriction

研究代表者

齋藤 一郎 (Saito, Ichiro)

鶴見大学・歯学部・教授

研究者番号：60147634

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：マウスに35%のCR(カロリー制限食)を与えると唾液分泌量は増加し、若齢マウスを上回った。唾液腺の炎症の程度について検討を行うと、自由摂取群と比較してCRマウスでは、浸潤細胞は減少し、組織内で産生される炎症性サイトカインも低値を示し、アミノ酸代謝関連遺伝子にも変動が認められ、さらにCR群ではケトン体が経時的に上昇した。カロリー制限による様々な作用はヒストン脱アセチル化酵素のsirtuinが関与しており、ポリフェノール類のレスベラトロールがこれを活性化することが報告されていることから、レスベラトロールのNODマウスの唾液分泌亢進作用を有する事を確認したことから臨床応用の基盤となる成果が得られた。

研究成果の概要(英文)：Calorie restriction (CR) is known to decrease the risk of disease onset resulting in lifespan elongation. Xerostomia is accompanied with aging, however, the pathogenesis is unknown yet and effective treatment has not been established. We studied the effect of CR on xerostomia accompanied with aging. Method Twelve-month-old male C57BL/6 mice were divided into ad libitum-fed (AL) group and CR group. The amount of food intake in CR group was 35% less than in AL group. The saliva secretion was measured after three and six months of CR. At the end of experiment, salivary glands were extracted following histological and gene expression analysis. Results The amount of saliva secretion decreased with aging in AL group, whereas increased saliva secretion was seen from three months after CR. Remarkable lymphocyte infiltration into salivary glands in AL group mice, however, lymphocyte infiltration was not obvious in CR group mice.

研究分野：病理

キーワード：ドライマウス カロリー制限 セリン NODマウス シェーグレン症候群

1. 研究開始当初の背景

口腔は生物としての生命に必要な咀嚼や摂食・嚥下という基本的機能を担うとともに、ヒトとしての根源的欲求である会話や味覚などの高次機能にも関与する。この複雑多岐な口腔機能の持には唾液が不可欠であり、唾液の分泌不全が誘因となる高齢者の誤嚥性肺炎や低栄養の増加は社会問題でもある。口腔乾燥症は唾液分泌量が減少する多因子性の疾患で口腔乾燥感、飲水切望感、食物摂取困難だけでなく味覚異常、齲蝕、歯周病、口腔内の疼痛などを続発しQOLは著しく低下することが知られている。一方、加齢に伴い唾液分泌は減少するとされているが、心身共に健全な高齢者では顕著な乾燥症状を認めないことから、唾液分泌障害の成立には増齢的に生じる様々な老化関連疾患（病的老化）の関与が示唆されている。

近年、このような病的老化を介した疾患の成立の一つに抗酸化システムの破綻が想定されており、環境要因により生じる酸化ストレスは活性酸素種（reactive oxygen species; ROS）を発生し、細胞の構造や機能の維持に関わる蛋白質、脂質、酵素、DNAなどに障害を与えることが示されており、このような遺伝子変異を含めた生体の機能障害を招くことが病的老化の促進の病因となる。カロリー制限（caloric restriction; CR）の病態抑制効果は従来、数多く報告されており、関節リウマチやSLEなどの自己免疫疾患に伴う諸症状の改善が示されてきたが、その詳細なメカニズムは明らかではない。特にアカゲザルではCRにより糖尿病、癌、心血管病変などの老化関連疾患の発症率も低下する事が明らかになり、ヒトの研究でも様々な施設で同様の解析が行われているところである。CRの中心的な役割を担うサーチュインファミリー(Sirtuin: Sirt1-7)はNAD依存性脱アセチル化酵素でありCRにより活性化することが注目され、この酵素によりヒストンだけでなくp53, NFkB, HSF1, FOXO1,3,4, PGC-1等の蛋白を脱アセチル化し、細胞分化、寿命や炎症、インスリンシグナル伝達、グルコース代謝や脂質代謝等を制御していることが示され、特にミトコンドリアの機能や前述の抗酸化システムを増強させ生体の恒常性の維持に重要な働きを担っていることが明らかにされている。

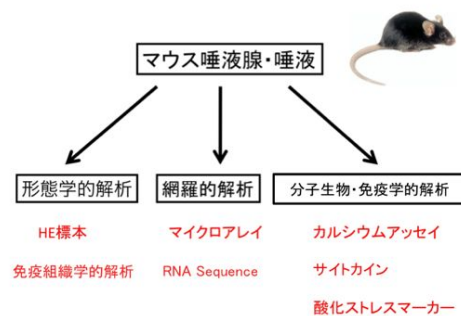
現在までに研究代表者は一貫して「唾液腺の障害と修復機序の解明」を中心に組織障害のメカニズムの研究に長年従事し、その治療法や診断法の開発に取り組んできた。

2. 研究の目的

唾液分泌障害により生じる口腔乾燥症の罹患数はシェーグレン症候群(Sjögren syndrome: SS)を含め日本では800万人から3,000万人と想定されている。本症は重篤な

歯科疾患だけでなく感染症や誤嚥性肺炎の発症を招くことなどから超高齢社会においても極めて重要な検討課題であり本症の病態解明や治療法を確立することの社会的意義は大きい。一方、様々な病態や加齢を制御することが報告されているカロリー制限は組織障害や免疫応答の制御にも有効であることが示されており最近ではその分子機構も明確になってきた。このことから、本研究ではカロリー制限の唾液分泌に与える効果の分子メカニズムを明らかにし、さらには本症の最も重篤なプロトタイプとしてSSを含めた唾液分泌障害の新規治療基盤の確立を目指す。

3. 研究の方法



CRにより誘導される遺伝子の唾液分泌における効果を唾液腺培養細胞やマウスへの投与実験により評価し、アポトーシスを誘導する遺伝子改変マウスを用い唾液分泌障害の治療効果を検討した後、臨床研究を実施し治療基盤の確立を行った。CRならびにセリンを投与した種々のマウスにおける唾液分泌量の推移や組織障害の解析ならびに発現遺伝子プロファイルを検討し、次年度以降はこれらのマウスを用いて詳細な分子生物学的ならびに免疫学的メカニズムを分析し、最終年度の臨床研究の実施に備えた。

平成27年度

障害モデルマウスにおけるカロリー制限ならびにセリンによる唾液腺の機能解析

(1) マウスにおけるCR実験

CRは12ヶ月齢のマウスを用い、食餌自由摂取群(AL)と35%CR群に分けて6ヶ月間飼育する。食餌制限3ヶ月、6ヶ月後にそれぞれの群における唾液分泌量を測定し、6ヶ月後の実験終了時にマウスから唾液腺を摘出し解析に用いた。

(2) マウス唾液分泌障害モデルの作成

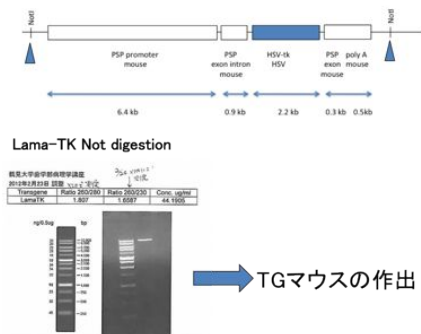
自己免疫性唾液腺炎を呈するNODマウスを実験に用いる以外に下記のマウスでも解析を行った。

アポトーシスが誘導可能な遺伝子改変マウスの作出: parotid secretory protein (PSP) プロモーター下流にGanciclovir (GSV) によ

唾液腺特異的に細胞死を誘導する HSV-TK を組み込んだコンストラクトを構築し、Lama-HSV-tk マウスに、持続的に GSV を投与することで唾液腺の障害が誘導できる実験系を確立した。

本研究課題の予備的検討として健常成獣マウス C57BL/6 にセリンを経口摂取させ経時的に唾液分泌量の推移を測定したところ、対照群と比較して唾液分泌量の亢進が認められたことから、この摂取条件を参考に NOD マウス、放射線照射マウスならびに遺伝子改変マウスでも同様の検討を行った。

トランスジェニックマウスの遺伝子構築

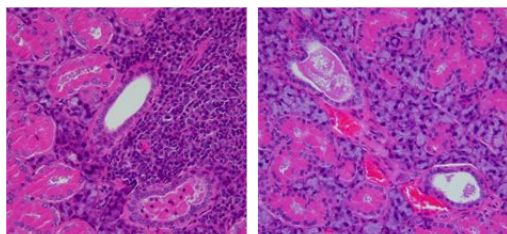


(3) 形態学的解析

ヘマトキシリン・エオジン(HE)標本作製し形態学的変化を観察すると共に TUNEL 法によるアポトーシスの検出ならびに免疫組織学的検討により唾液腺房や分泌顆粒、血管内皮を同定し CR やセリン摂取により形態学的な変化が生じているか否かを検索した。特に NOD マウスでは浸潤細胞のフォーカスコアを算出し比較した。予備的検討では写真のように CR 群ではリンパ球浸潤は軽減する傾向が認められたことから、さらに検討を進めた。

(4) 唾液腺からの単離細胞の生理学的・生化学的解析

唾液分泌能の解析はマウス耳下腺、顎下腺を急性単離し、 α_2 アドレナリン受容体活性化および、ムスカリン受容体活性化能をアミラーゼ放出量ならびに細胞内カルシウム取り込み量により invitro における CR ならびにセリンの及ぼす効果の検討を同時に施行しマウスの個体における分泌量と単離細胞での評価を行うことにより効果の精度を検証し整合性を確認する。すなわち形態学的な変化と invitro における唾液分泌とを比較することで機能の形態に与える変化を詳細に把握した。

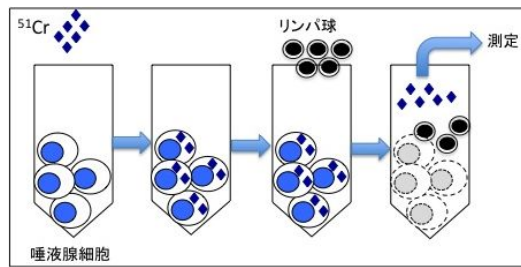


AL

CR

(5) NOD マウスにおける免疫学的解

NOD マウスの唾液腺細胞を用い CR またはセリン投与により自己抗原の発現に影響を与えるか否かを検討するために自己反応性リンパ球と共培養(クロミウム遊離試験)を行った。唾液腺単離細胞を調製し、 ^{51}Cr を細胞内に取り込ませ 96-well に NOD マウスから単離した唾液腺細胞を入れ、NOD 唾液腺局所または末梢血から得たリンパ球を共培養し細胞障害活性をガンマカウンターにて培養液中に遊離してきた ^{51}Cr を測定する手法には実績がある。



平成 28 年度

(1) 網羅的解析と特定された遺伝子の機能解析

平成 27 年度に行った種々のマウス唾液腺における網羅的な解析を行った。すなわち、DNA microarray および RNA sequence (受託解析)により遺伝子発現を比較検討し、CR の影響で変化があったセリンの生合成に関わる経路についてその詳細を検索すると共にアポトーシスの機能制御に関わる遺伝子を中心に、唾液腺組織から RNA を抽出し逆転写反応後 cDNA を調製し Real time PCR で定量的に評価した。

変化があった遺伝子を、マウス唾液腺急性単離細胞に強制発現させた後に核抽出液を調製し CR によって活性化する種々の関連抗体で免疫沈降し会合の有無、脱アセチル化活性、カルシウム取り込み能、およびアミラーゼ放出能を検討した。

遺伝子導入効率が低い場合には、ヒト唾液腺由来 HSY 細胞などに変更し、CR 状態を模倣するために低血清濃度にて培養し上記の検討を行った。

CR群と自由摂取(AL)群の唾液腺における網羅的解析の予備実験

Biological Process		
GO Term	p-value	corrected p-value
L-serine biosynthetic process	1.028E-07	1.924E-03
serine family amino acid biosynthetic process	4.278E-07	4.005E-03
L-serine metabolic process	3.445E-06	2.150E-02

平成 29 年度

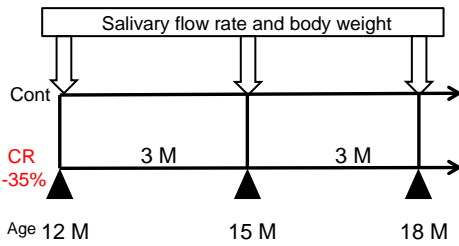
(1) 臨床研究の実施

被験者はドライマウス外来を受診する 30 名を対象とし、被験者に試験食品を 2 ヶ月間摂取させ、唾液分泌能の変化を比較検討する。唾液分泌能の評価は安静時唾液と刺激時唾液の唾液分泌量を測定しヒトにおける唾液分泌能の評価を行った。検査時に採取した唾液はマウスの解析と同様に酸化ストレスマーカーならびに炎症性サイトカインを ELISA 法により摂取前後について比較検討した。

4. 研究成果

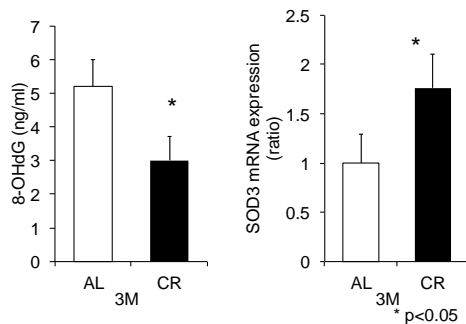
Protocol for calorie restriction (CR)

Mice: 12 months old C57BL/6, male

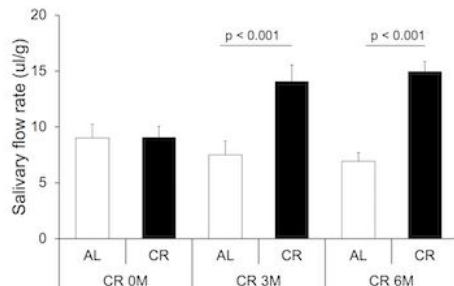


上図のように動物実験を実施した。すなわち、12M、15M、18M 毎に唾液量や体重を測定し CR マウスとコントロールマウスとの比較検討を行った。

CR decreased oxidative stress

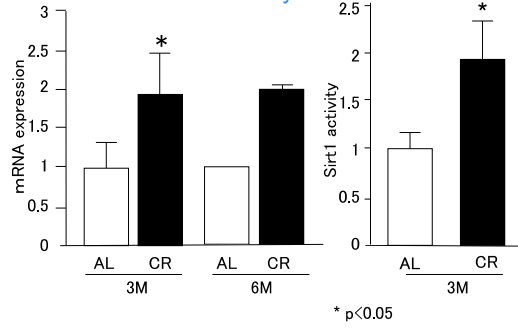


CR increased salivary flow rate



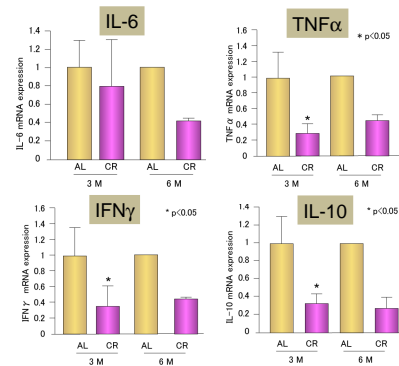
その結果、特筆すべき結果としては CR 群では左図のように唾液分泌量の増加と共に酸化ストレスの減少が認められたことから、CR は唾液腺局所に対し酸化ストレス低下させることにより唾液腺の機能を亢進させることが示唆された。

The effect of CR on Sirt1 expression and activity

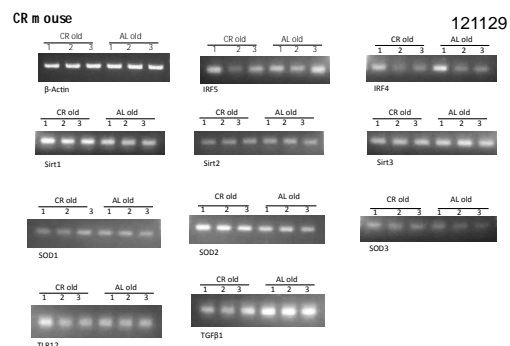


一方、この唾液腺での効果について詳細な成立機序を明らかにする目的で CR により発現が亢進するとされる長寿遺伝子の Sirt1 遺伝子の発現を確認したところ CR 群では明らかに対照群と比較して当該遺伝子の発現や Sirt1 活性の上昇がみられた事から、CR 群の唾液分泌は酸化ストレスの制御や Sirtuin 活性を介したメカニズムが関与していることが想定された。

Cytokines expression in salivary glands



さらに、これらの効果により炎症性サイトカインの発現が低下することが報告されていることから、唾液腺局所における発現低下を検出する目的で検討したところ、図のように CR 群では明らかに自由摂取群と比較してこれらの発現が抑制された結果を得ることが出来た。



このことから、長寿に関連する種々の遺伝子を網羅的に解析したところ、CR群では生体の恒常性に不可欠な遺伝子の発現が正に制御される結果を得た。以上のことからCRは唾液腺の機能を維持するだけでなく腺分泌機能を高めるために有用な手段と考えられた。本研究課題で計画した唾液腺障害遺伝子改変マウスは現在プロモーターを *mac1* に変更し作出を進めている。加えて臨床試験はCRを模倣するリスペラトロールの経口摂取での評価を行っており今後論文発表を予定している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

Sumida T., Azuma N., Moriyama M., Takahashi H., Asashima H., Honda F., Abe S., Ono Y., Harota T., Hidrata S., Tanaka Y., Shimizu T., Nakamura H., Kawakami A., Sano H., Ogawa Y., Tsubota K., Ryo K., Saito I., Tanaka A., Nakamura S., Takamura E., Tanaka M., Suzuki K., Takeuchi T., Yamakawa N., Mimori T., Ohta A., Nishiyama S., Yoshihara T., Suzuki Y., Kawano M., Tomiita M., Tsuboi H.: Clinical practice guideline for Sjogren's syndrome 2017. *Mod. Rheumatoid.* 査読有、2018 7:1-74.
DOI:10.1080/14397595.2018.1438093

Nakamura S., Okamoto M.R., Yamamoto K., Tsurumoto A., Yoshino Y., Iwabuchi H., Saito I., Maeda N., Nakagawa Y.: The *Candida* species that are important for the development of atrophic glossitis in xerostomia patients. *BMC Oral Health.* 査読有、2017. Dec 16;17(1):153.
DOI: 10.1186/s12903-017-0449-3

Saruta J., To M., Sugimoto M., Yamamoto Y., Shimizu T., Nakagawa Y., Inoue H., Saito I., Tsukinoki K.: Salivary Gland derived BDNF Overexpression in Mice Exerts an Anxiolytic Effect. *Int. J. Mol. Sci.*, 査読有、2017. 18(9),1902.
DOI: 10.3390/ijms18091902

Tsuboi H., Hagiwara S., Asashima H., Takahashi H., Hirota T., Noma H., Umehara H., Kawakami A., Nakamura H., Sano H., Tsubota K., Ozawa Y., Takamura E., Saito I., Inoue H., Nakamura S., Moriyama M., Takeuchi T., Tanaka Y., Hirata S., Mimori T., Matsumoto I., Sumida T.: Comparison of performance of the 2016 ACR-EULAR classification criteria for primary Sjogren's syndrome with other sets of criteria in

Japanese patients. *Ann. Rheum. Dis.*, 査読有、2017. Mar 22.
DOI: 10.1136/annrheumdis-2016-210758

Inoue H., Kishimoto A., Ushikoshi-Nakayama R., Hasaka A., Takahashi A., Ryo K., Muramatsu T., Ide F., Mishima K., Saito I.: Resveratrol improves salivary dysfunction in a non-obese diabetic (NOD) mouse model of Sjogren's syndrome. *J.Clin. Biochem. Notre.*, 査読有、2016. 59(2): 107-112.
DOI: 10.3164/jcbn.16-31

Tanaka N., Muro Y., Suzuki Y., Nishiyama S., Takada K., Sekiguchi M., Hashimoto N., Ohmura K., Shimoyama K., Saito I., Kawano M., Akiyama M.: Anticentromere antibody-positive primary Sjogren's syndrome: Epitope analysis of a subset of anticentromere antibody-positive patients. *Mod. Rheumatoid.*, 査読有、2016 May 10:1-7.
DOI: 10.1080/14397595.2016.1176327

Kusakabe Y., Shindo Y., Kawai T., Takahashi Y., Kobori M., Inoue H., Saito I.: Sex-Based Differences in Smgc Expression in the Submandibular Gland of C57BL/6 Mice. *Pathobiology.* 査読有、2016 83(6): 287-294.
DOI: 10.1159/000446000

Takahashi A., Inoue H., Mishima K., Ide F., Nakayama R., Hasaka A., Ryo K., Sakurai T., Hasegawa Y., Saito I.: Evaluation of the effects of quercetin on damaged salivary secretion. *PLoS One*, 査読有、2015 Jan 28;10(1)
DOI: 10.1371/journal.pone.0116008

〔学会発表〕(計 6 件)

金子三恵、梁 洪淵、菅野智子、中山亮子、玉置 洋、齋藤一郎、エクオール含有大豆イソフラボンの唾液分泌に与える効果の検討、2017年、第17回日本抗加齢医学会総会、東京国際フォーラム(東京都千代田区)

中山亮子、井上裕子、金子三恵、梁 洪淵、伊藤正孝、齋藤一郎、早期閉経モデルマウスを用いた唾液分泌障害におけるミトコンドリアの解析、2017年、第17回日本抗加齢医学会総会、東京国際フォーラム(東京都千代田区)

中山亮子、井上裕子、金子三恵、梁 洪淵、齋藤一郎、ミトコンドリアのエストロゲンを介した唾液分泌制御機構の検討、2016

年、第16回日本抗加齢医学会総会、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

齋藤一郎、阪井丘芳、唾液分泌の日内変動における機能分子の解析、2015年、第15回日本抗加齢医学会総会、福岡国際会議場（福岡県福岡市）

金子三恵、梁 洪淵、高橋 啓、小野博之、小笠原智彦、阿部道郎、井上裕子、齋藤一郎、ドライマウス患者に対する花椒オイル含有カプセル型食品の唾液分泌効果の検討、2015年、第15回日本抗加齢医学会総会、福岡国際会議場（福岡県福岡市）

金子三恵、梁 洪淵、高橋 啓、小野博之、小笠原智彦、阿部道郎、齋藤一郎、患者に対する花椒オイル含有カプセル型食品の唾液分泌効果の検討、2015年、第8回日本口腔検査学会総会・学術大会、神奈川県横浜市）

〔図書〕（計 8 件）

齋藤一郎：『臨床のみかたシリーズ』新訂版 知りたいことがすぐわかる高齢者歯科医療 - 歯科医療につながる医学知識 -、株式会社永末書店、190-191、2017.

齋藤一郎：シェーグレン症候群診療ガイドライン 2017年版、株式会社診断と治療社、1-119、2017.

齋藤一郎：超高齢社会におけるドライマウスへの対応、株式会社ヒョーロン・パブリッシャーズ、1-61、2017.

梁 洪淵、齋藤一郎：機能性食品 DATA BOOK 3 歯科領域、メディカルレビュー社、2016.

齋藤一郎：口腔内科学、株式会社永末書店、1-619、2016.

齋藤一郎：ドライシンドロームの基礎と臨床、メディカルレビュー社、27-30、2016.

齋藤一郎：第3版 EB ウィルス 自己免疫疾患（関節リウマチ、Sjögren 症候群）診断と治療社、151-157、2015.

梁 洪淵、齋藤一郎：コエンザイム Q10の基礎と応用 応用編 9 口腔疾患、丸善プラネット株式会社、121-130、2015.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 一郎 (SAITO, Ichiro)
鶴見大学・歯学部・教授

研究者番号：60147634

(2) 研究分担者

梁 洪淵 (RYO, Koufuchi)
鶴見大学・歯学部・講師
研究者番号：10298268

松本 直行 (MATSUMOTO, Naoyuki)
鶴見大学・歯学部・学内講師
研究者番号：20386080

美島 健二 (MISHIMA, Kenji)
昭和大学・歯学部・教授
研究者番号：50275343

井上 裕子 (INOUE, Hiroko)
日本薬科大学・薬学部・教授
研究者番号：50367306

中山 亮子 (NAKAYAMA, Ryoko)
鶴見大学・歯学部・助教
研究者番号：50749843