

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25463236

研究課題名(和文) 唾液ムチン分子修飾によるデンタルケアの強化と高齢者の誤嚥性肺炎の予防

研究課題名(英文) Application of Salivary Mucin Antibacterial Function for Preventing Aspiration Pneumonia among Elderly

研究代表者

竹原 祥子 (Takehara, Sachiko)

東京医科歯科大学・統合国際機構・特任助教

研究者番号：60622438

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：高齢者での死亡率が高い誤嚥性肺炎を予防するため、デンタルケア強化を目指し、抗菌性が強く発揮できる唾液ムチン分子修飾パターンを同定するための研究を行った。本研究では、細菌凝集作用および抗菌性が報告されている2種類の唾液ムチン(MUC7、MUC5B)のターンオーバーに着目し、ウェスタンブロットティングを用いてムチンの分解実態を調べた。その結果、MUC7はMUC5Bに比べて分解しやすく、MUC7のN末端が分子全体の分解の律速要因になっていることが分かり、MUC7のN末端部分の分解と抗菌作用発現との関連についての可能性が示唆された。本研究の成果が社会歯学へ大きく貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：General degradation patterns of salivary proteins and glycoproteins were examined by SDS-polyacrylamide-gel-electrophoresis. A protein band was identified as MUC7 by Western blot analysis using an antibody recognizing an N-terminal epitope. The MUC7 signal disappeared rapidly after 20-minutes of incubation. In contrast, the band of MUC7 stained for its carbohydrate components remained visible near its original position for a longer time indicating that the rapid loss of Western blot signal was due to the specific removal of the N-terminal epitope. MUC7 was highly susceptible to specific proteolysis in saliva, though major part of MUC5B was more resistant to degradation. The N-terminal region of MUC7, particularly sensitive to proteolytic degradation, has also been proposed to have distinct biological function such as antibacterial activities. Quick removal of this region may have biologically important implication.

研究分野：予防歯科

キーワード：唾液タンパク質 ムチン 糖鎖 抗菌作用 誤嚥性肺炎

1. 研究開始当初の背景

病原体にとっての最初の関門が口腔であり、口腔には自然免疫が備わっている(図1)。唾液には自然免疫の役割を果たす成分が含まれているが、加齢に伴ってその防御機能は低下し、感染症に罹患しやすくなる。高齢者にとって誤嚥性肺炎は死に直結しており、肺炎で死亡する人の数は高齢者ほど多く、90歳以上では死亡原因の第2位である。今後、高齢化がすすむ我が国において、高齢者の誤嚥性肺炎の発症予防が大変重要であると考えられる。

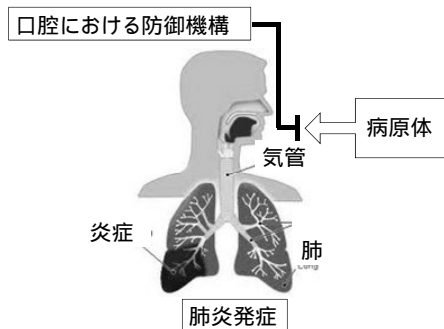


図1 肺炎発症の概念図

高齢者の誤嚥性肺炎予防のために口腔清掃が効果的であることは証明されており (Yoneyama T., 1999)、クロルヘキシジンなどが抗菌剤として広く使われている。しかしこれらの抗菌剤には味の問題や耐性菌出現などの副作用がある (Ferretti GA, 1990)。一方、唾液タンパク質由来の抗菌物質であれば副作用などの問題はない。唾液ムチン (MUC7) 分子には抗菌作用があり (Bobek LA., 2003)、分子を構成するシアル酸は細菌結合能を有する (Varki A., 2008)。当研究では唾液ムチン (MUC7) の抗菌作用が糖鎖付加などによる修飾によってどう変化するかを調べ、抗菌性を強く発揮できる唾液ムチン分子修飾パターンを調べ、デンタルケア強化への応用を目指した (図2)。

予備実験から、唾液ムチン (MUC7) の分解について以下のことがわかっている。

- ・唾液ムチン (MUC7) の抗菌性部位は 10-20 分程度の短時間で分解する
- ・シアル酸を取り除くと、抗菌性部位がより速く分解する

以上より、唾液ムチン (MUC7) の持つ抗菌性部位分解により抗菌作用は短時間で失われる、抗菌性はシアル酸分解によってさらに急速に失われるという仮説をたてた。

2. 研究の目的

(1) 高齢者にとって、誤嚥性肺炎などの気道感染は死に直結しており、助かった場合でも感染が原因で要介護状態の寝たきりにな

ることもある。したがって、その予防はきわめて重要であり、多くの施設でクロルヘキシジンなどが配合された抗菌剤を使った口腔ケアが行われているが、副作用があり長期使用は好ましくない。当研究は従来の抗菌剤に替わる抗菌性を持つ唾液ムチンに着目し、抗菌性が強く発揮できる唾液ムチン分子修飾パターンを同定し、誤嚥性肺炎予防のためのデンタルケア強化に応用する。

(2) これまでの研究に基づく仮説「唾液ムチン (MUC7) の持つ抗菌性部位分解により抗菌作用は短時間で失われる、抗菌性はシアル酸分解によってさらに急速に失われる」という仮説をたてた。」を立証するために、MUC7 の分解と抗菌作用の変化について分析を行う。具体的に以下の点を明らかにすることを目的として、本研究を進めた。

- ・唾液ムチン (MUC7) の糖鎖修飾有無によって、抗菌性がどのように変化するか。
- ・唾液ムチン (MUC7) 由来のペプチドがどのような構造の時、抗菌性が強いのか。

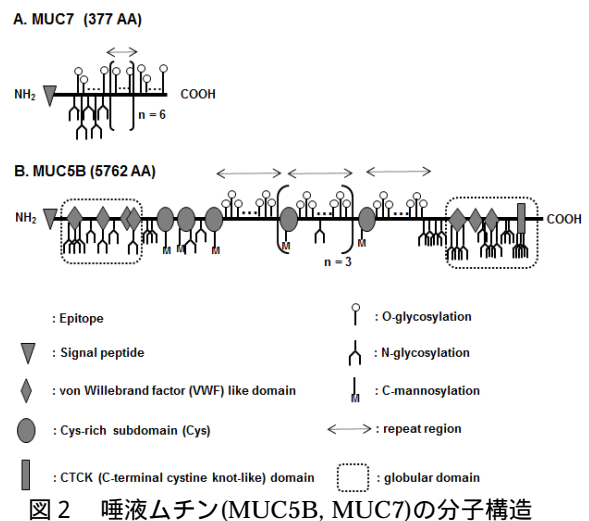


図2 唾液ムチン (MUC5B, MUC7) の分子構造

3. 研究の方法

健康な被験者から唾液を収集した。唾液に含まれるタンパク質濃度を BCA Protein Assay Kit を用いて測定した。2つのムチンのターンオーバーについて、糖鎖の分解に着目して分析を行うため、唾液 37 度でインキュベートし、その分解状況について SDS-PAGE のち、タンパク質染色、糖タンパク質染色、ウェスタンブロッティングを用いて分析した。

4. 研究成果

(1) 唾液ムチン (MUC5B, MUC7) の半減期

37度でインキュベートし、唾液タンパク質の変化を調べた結果を図3に示す。9時間後においても、タンパク質染色では濃度に大きな変化は見られなかった(図3A)。糖タンパク質染色の結果、2本の幅の広いバンドが見られた(図3B)。ウェスタンブロッティングの結果から、分子量250kDa以上の部分に見られたバンドがMUC5B、分子量150kDa以上の部分に見られたバンドがMUC7であると同定された(図3C,D)。MUC7のバンド濃度がMUC5Bに比べて早く薄くなったのは、分解の速さを示すと考えられた。

MUC7について、ウェスタンブロッティングの結果から、半減期を算出したところ 12.6 ± 1.6 分、糖タンパク質染色の結果では 290 ± 94 分であった。これは糖タンパク質の糖鎖の分解よりも、N末端に存在するエピトープの方が早く分解されることを示している。MUC7のエピトープ分解後のMUC7の分子量は、オリジナルのMUC7の分子量とあまり変わらなかった(図3B,C)。

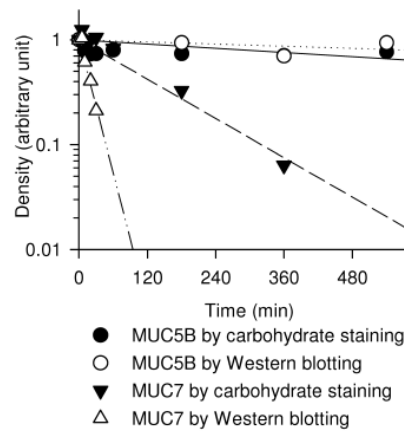
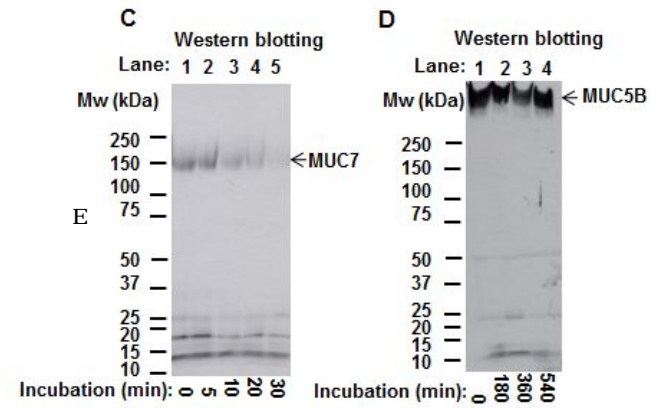
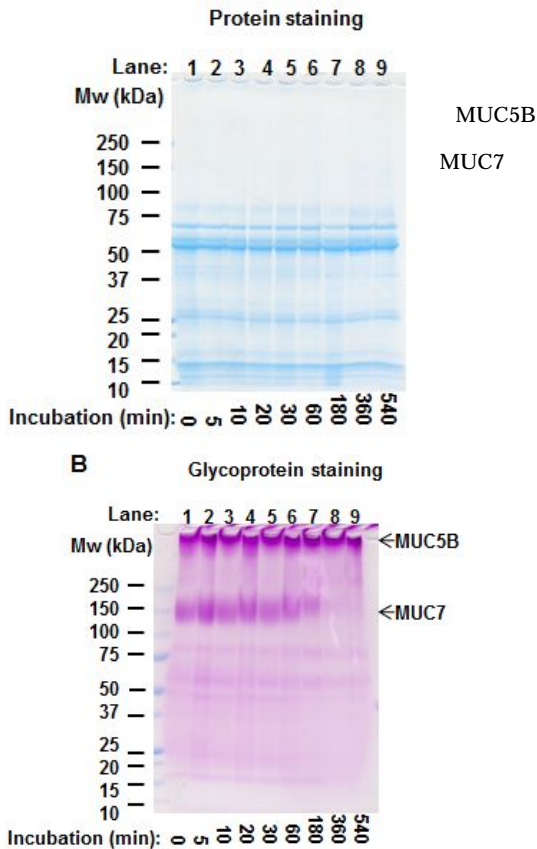


図3 唾液タンパク質分解に関する分析結果

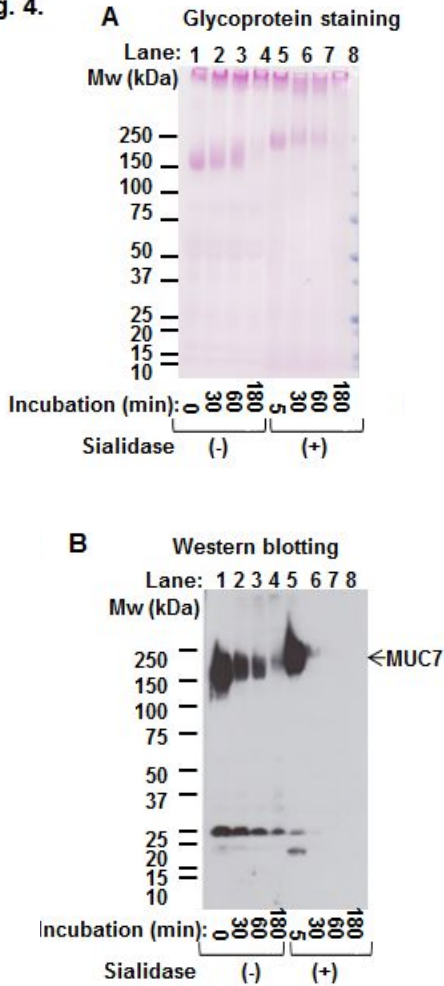
唾液を37度で9時間インキュベートした後、SDS-PAGEを行った結果

- A: タンパク質染色の結果
- B: 糖タンパク質染色の結果
- C: 抗MUC7抗体を用いたウェスタンブロッティングの結果
- D: 抗MUC5B抗体を用いたウェスタンブロッティングの結果
- E: 糖タンパク質染色およびウェスタンブロッティングの結果を濃度分析してプロットした結果。

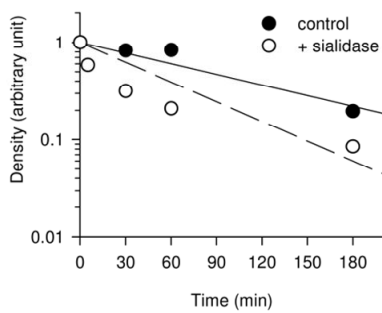
(2) MUC7に対するシアリダーゼの作用

唾液中に存在するシアリダーゼの作用を明らかにするため、唾液をシアリダーゼインヒビターで処理し、MUC7の変化を調べた。その分析結果を図4に示した。

Fig. 4.



C Glycoprotein staining



D Western blotting

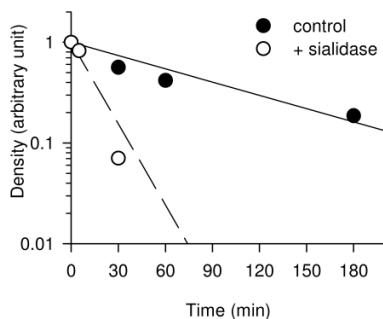


図4 シアリダーゼ処理後の唾液タンパク質

シアリダーゼを加えた唾液を 37 度で 9 時間インキュベートした後、SDS-PAGE を行った結果。

A: 糖タンパク質染色の結果

B: 抗 MUC7 抗体を用いたウェスタンブロットティングの結果

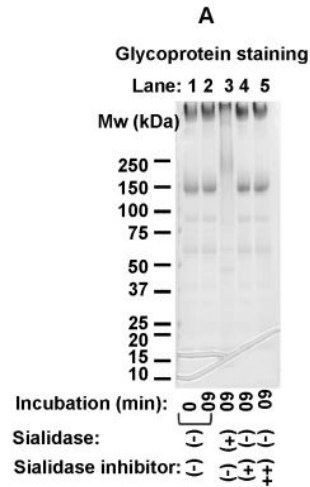
C, D: 糖タンパク質染色およびウェスタンブロットティングの結果を濃度分析してプロットした結果。

シアリダーゼ処理を行ったサンプルでは、MUC7 のバンドがウェスタンブロットティングにおいて 30 分で消失していた(図 4B)。一方、糖鎖染色の結果では、MUC7 の分子量に一致する 150kDa のバンドは、60 分のインキュベート後も認められた(図 4A)。グラフ 4C, D は MUC7 の分解にシアリダーゼ処理がどのように影響するかを糖染色とウェスタンブロットティングによって分析したものである。シアリダーゼ処理によってシアル酸を分解することで、5 分後にはバンドの移動が遅くなっていた(図 4A)。マイナスに荷電しているシアル酸がなくなることによるものだと考えられる。糖染色におけるシアリダーゼ処理後 MUC7 のバンド消失は(図 4A) ウェスタンブロットティングの結果に比べて遅い(図 4B)。これはシアル酸分解とエピトープの消失が順番に起こることを示唆している。

以上の結果より、MUC7 をシアリダーゼ処理することによって糖修飾のない N 末端の分解が亢進することが明らかになった。一方、シアリダーゼインヒビター処理によって MUC7 のエピトープ分解が阻害されていた。

(3) MUC7 に対するシアリダーゼインヒビターの作用

次に唾液をシアリダーゼインヒビターで処理した。インヒビター処理後、ウェスタンブロットティングにおける MUC7 のバンドは、60 分インキュベート後も分子量に変化が見られなかった(図 5B, C)。シアリダーゼインヒビターが MUC7 のエピトープ分解を抑制したことを示すものである。



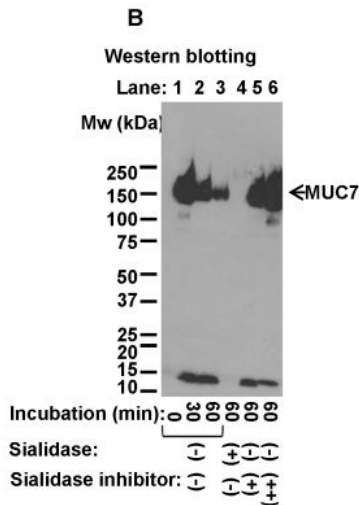


図5 シアリダーゼ、シアリダーゼインヒビターでの処理による MUC7 の分解状況
A : 糖タンパク質染色の結果
B : 抗 MUC7 抗体を用いたウェスタンブロッティングの結果

以上、健康な人から採取した唾液に含まれるムチン (MUC5B、MUC7) の半減期、シアリダーゼおよび各種プロテアーゼ阻害剤との作用を調べ、MUC7 分解の律速過程の一部を明らかにすることが出来た。

< 引用文献 >

- Yoneyama T, Yoshida M, Matsui T, Sasaki H. Oral care and pneumonia. Oral Care Working Group. Lancet. 1999 Aug 7;354(9177):515.
- Ferretti GA, Raybould TP, Brown AT, Macdonald JS, Greenwood M, Maruyama Y, Geil J, Lillich TT, Ash RC. Chlorhexidine prophylaxis for chemotherapy- and radiotherapy-induced stomatitis: a randomized double-blind trial. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1990 Mar;69(3):331-8.
- Bobek LA, Situ H. MUC7 20-Mer: investigation of antimicrobial activity, secondary structure, and possible mechanism of antifungal action. Antimicrob Agents Chemother. 2003 Feb;47(2):643-52.

Varki A. Sialic acids in human health and disease. Trends Mol Med. 2008

Aug;14(8):351-60. doi:

10.1016/j.molmed.2008.06.002.

Takehara S, Yanagishita M, Podyma-Inoue KA, Kawaguchi Y: Degradation of MUC7 and MUC5B in human saliva. PLoS ONE, 査読有、Jul 18;8 (7), 2013. DOI: org/10.1371/journal.pone.0069059.

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)

Takehara S, Yanagishita M, Podyma-Inoue KA, Kawaguchi Y: Degradation of MUC7 and MUC5B in human saliva. PLoS ONE, 査読有、Jul 18;8 (7), 2013. DOI: org/10.1371/journal.pone.0069059.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

竹原 祥子 (TAKEHARA, Sachiko)
東京医科歯科大学・
統合国際機構・
特任助教
研究者番号 : 60622438

(2)連携研究者

柳下 正樹 (YANAGISHITA, Masaki)
東京医科歯科大学・
大学院医歯学総合研究科・
教授
研究者番号 : 70132793
(平成 27 年まで連携研究者)

(3)連携研究者

井上 カタジナアンナ (INOUE, KA)
東京医科歯科大学・
大学院医歯学総合研究科・
助教
研究者番号 : 90302877