

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K12024

研究課題名(和文) 低出力レーザー(LPLI)照射が寄与する唾液分泌障害予防機序の解明

研究課題名(英文) Mechanism of low-power laser irradiation (LPLI)-induced prevention of salivary secretion disorder

研究代表者

内山 敏一 (UCHIYAMA, Toshikazu)

日本大学・松戸歯学部・講師

研究者番号：60419760

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：唾液腺を主病変とする慢性炎症性疾患は、唾液分泌障害と共に全身障害も進行する。本研究は、低出力レーザー照射(LPLI)による唾液腺n遺伝子発現の変化を網羅的にトランスクリプトーム解析し、更にパスウェイデータベースを応用し、光線治療法の作用機序を探索した。LPLIは、糖尿病ラットにおいて、インスリンレベルを変えずに高血糖値を有意に減少させた。加齢マウスや自己免疫疾患症状のマウスモデルを用いて、唾液分泌障害に関与する転写因子-miRNA発現制御機構を明らかにさせた。解析より、加齢制御に関わる転写因子とmiRNAの組合せが多数特定され、miRNAの異常発現が唾液腺の加齢に関連していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病は、歯周病や唾液分泌障害のリスクを上げ、嚥下障害や誤嚥性肺炎の発症を招くなど、さまざまな病態を形成し患者のQOLを著しく低下させる。本研究により唾液分泌障害の修復機構の詳細が明らかになれば、唾液腺組織のバリア機能改善効果の検証や治療薬の開発が可能となることに加え、精度および特異性の高い診断にも応用できることが予想されるため、社会的にきわめて意義のある研究と思われる。

研究成果の概要(英文)：LPLI has been extensively employed to modulate the secretory function of salivary glands. This study aimed to analyze the LPLI effects upon blood glucose levels, plasma insulin concentrations and the gene expression profiles and signaling pathways using DNA microarray and microRNA array in a diabetes experimental rat submandibular gland. Streptozotocin-induced diabetic rats were irradiated in the salivary glands area with a diode laser applied at 660 nm, 70 mW, 20 J/cm², 22.4 J, with a spot area of 0.028 cm² and its effects were evaluated. LPLI significantly reduced diabetic rat hyperglycemia, without changing insulin levels. In addition, we have clarified the regulation mechanism of transcription factor-miRNA expression in salivary secretion disorder using aging mouse model and mouse model of autoimmune disease. A comprehensive analysis of identified aging regulatory transcription factors and miRNAs suggested that aberrant miRNA expression is important in salivary aging.

研究分野：社会歯科学

キーワード：唾液分泌障害予防機序 低出力レーザー LPLI ドライマウス 唾液分泌障害

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ドライマウスにおける唾液分泌障害は、導管細胞上の自己抗原に対してリンパ球が反応し、その結果としての腺房細胞障害により引き起こされるが、これらの発生機序にはアポトーシスが深く関与している。近年、申請者らは、生化学方法を応用し、ストレプトゾトシン誘発糖尿病ラットの唾液腺組織におけるアポトーシス関連遺伝子の発現の変動を解析し、糖尿病による TNF、Bax、Bad、cleaved caspase-3、および phospho NF- κ B の遺伝子発現の上昇が、低出力レーザー照射(以下:LPLI/LLLT)によって減少したことを発表した。これらの糖尿病発症因子は唾液腺細胞によって大量に産生されることから、唾液腺に特異的な調節破壊因子としても注目されている。また、申請者らは、分子生物学的方法を用いて、ストレプトゾトシン誘発糖尿病ラットの唾液腺組織の解析を行い、LPLIにより、glycemicレベルが有意に抑制され、前述の糖尿病発症因子の遺伝子発現が有意に抑制され、炎症マーカーである high mobility group box1 (HMGB1)、advanced glycation end products (AGE)および receptor for AGE (RAGE)の発現の上昇も有意に抑制することを明らかにしている。これらの炎症促進、および糖尿病の発症や悪化に関与する遺伝子の抑制が、LPLIによる糖尿病の炎症・疼痛の抑制機序の一つであると考えられる。本研究では、唾液分泌障害の発症に関与する遺伝子および miRNA の発現を、LPLIを受けた唾液分泌障害モデルマウスを対象として網羅的トランスクリプトーム解析(DNA マイクロアレイ法および miRNA マイクロアレイ法)を行うことにより明らかにし、さらに、その結果をパスウェイデータベース (Ingenuity Pathway Analysis: IPA) を応用して情報伝達経路を明らかにすることで、光線治療法の作用機序の詳細と安全な光線治療法の基盤を探索することを目的とする。

2. 研究の目的

唾液分泌障害は、診断および治療が困難な病態であるとともに、QOLの著しい低下や口腔以外の障害(日和見感染、誤嚥性肺炎、上部消化管など)をきたすことが知られており、人口の25%が罹患しているとの疫学調査もある。また、2040年には日本国民の3人に1人が65歳以上の高齢者になる(現在は5人に1人)ことが予想されるなど、高齢化に伴う唾液分泌障害罹患数の増加は自明であり、病態形成の解明や治療の確立は急務とされる。申請者らは、予備的検討において、低出力レーザー照射(LPLI/LLLT)が唾液分泌を亢進する、あるいは唾液分泌障害を改善する可能性があることを見いだしている。本研究では、LPLIを介した唾液分泌機構について詳細に検討する。LPLIは、傷害や抜歯による疼痛に対する鎮痛作用、神経伝導抑制、局所血流の改善、炎症の軽減、創傷や潰瘍の治癒促進など、さまざまな生理作用を有することが示唆されているものの、唾液腺の機能に関する知見はまだ得られていない。また、唾液分泌障害は、その原因が薬剤、加齢性変化、ドライマウスなど多様であることから、治療法が確立されていないのが現状である。本研究ではLPLIが唾液腺に及ぼす影響を解析し、解析結果を臨床応用可能な知見にまで到達させることを目標としている。

3. 研究の方法

(1) DNA マイクロアレイおよび miRNA マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析
採取した唾液腺組織から RNA を mirNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて抽出し、DNA マイクロアレイおよび miRNA マイクロアレイを用い、遺伝子および miRNA の発現を網羅的に解析した。DNA マイクロアレイ解析には、Low Input Quick Amp Labeling kit (Agilent) を用いて調製した蛍光標識 cRNA と、SurePrint G3 Mouse GE マイクロアレイ (Agilent) を用いた。miRNA マイクロアレイ解析には、Agilent Complete Labeling and Hyb Kit (Agilent) を用いて調製した蛍光標識 miRNA と、SurePrint G3 Mouse miRNA マイクロアレイ (Agilent) を用いた。実験結果の解析には GeneSpring 解析ソフト (Agilent) を用いた。さらに、IPA を行い、遺伝子および miRNA の発現から予測される生物学的過程、転写経路、およびネットワークの探索を行った。

(2) リアルタイム PCR 法による mRNA および miRNA の定量逆転写酵素 VIL0 SuperScript™ (Invitrogen) を用いて RNA から合成した cDNA、特異的 TaqMan® プロンプ、および QuantStudio 7 Flex リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems) を用いて mRNA および miRNA を定量した。TaqMan® ケミストリーにより設計された miRNA 定量用のプライマーセットを用い、前駆体ではなく成熟 miRNA のみを標的とした。TaqMan Reverse Transcription Kit、TaqMan MicroRNA Assays、QuantStudio 7 Flex リアルタイム PCR システムを用いて得られた miRNA の発現量を、内在性コントロール miRNA を基準とした相対量として算出した。

(3) ウェスタンブロッティング法によるタンパク質の検討と、細胞のカルシウム、およびアミラーゼ放出能の測定

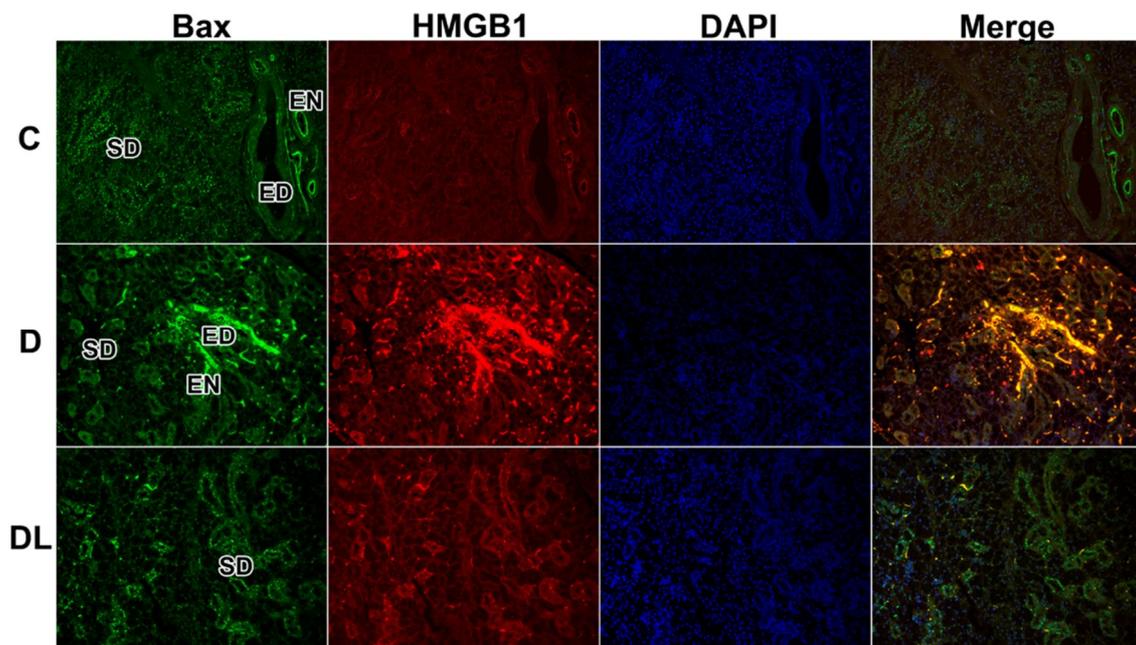
RIPA Lysis Buffer (Pierce) を用いて抽出したタンパク質を、ポリアクリルアミドゲルで分離後、PVDF 膜へ電氣的に転写し、5% BSA を用いて 1 時間ブロッキングを行った。PVDF 膜を洗浄し、5% BSA で希釈した一次抗体と 4 において一晩インキュベートした。PVDF 膜を洗浄し、5% BSA で希釈した二次抗体と室温で 1 時間インキュベートした。PVDF 膜を洗浄し、ECL-Plus Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare Japan Corporation) を用いてタンパク質を検出

し、ImageQuant Las 4000 Mini で観察した。また、唾液分泌量を算出し、細胞のカルシウムおよびアミラーゼ放出能も測定した。

さらに、3ヶ月齢の C57BL/6 マウスと 24ヶ月齢の C57BL/6 マウス（老齢 C57BL/6 マウス）の唾液腺組織からトータル RNA を分離し、唾液腺組織における遺伝子および miRNA の発現を、DNA マイクロアレイおよび miRNA アレイを用いて検討し、GeneSpring および IPA と組み合わせて解析した。Special AT-rich sequence-binding protein-1（以下：SATB1）コンディショナルノックアウト（cKO）マウスおよび老齢 C57BL/6 マウスを用いて、唾液腺の機能異常に関連する遺伝子および miRNA を検討した。シェーグレン症候群の病因を調べるためにはマウスモデルの開発が不可欠と考え、SATB1cKO マウスを用いた唾液分泌低下メカニズムを検討した。

4. 研究成果

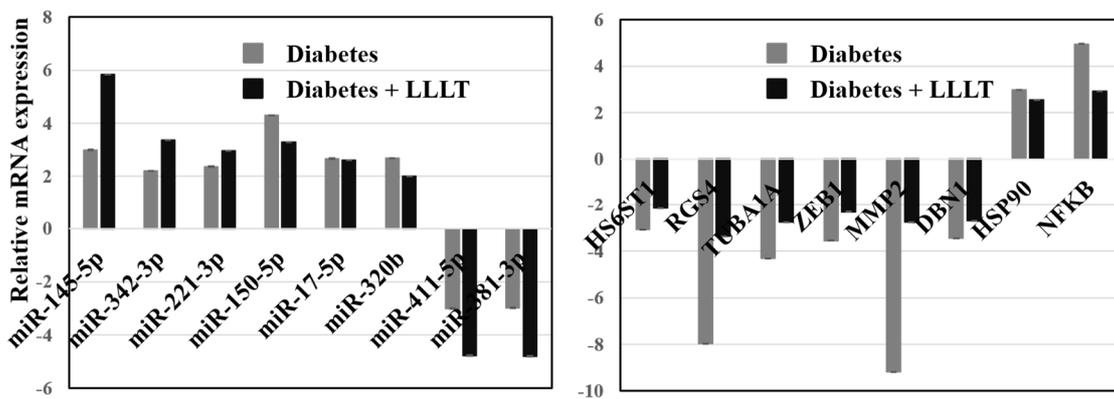
Streptozotocin 誘発糖尿病（STZ）ラットの唾液腺では、LPLI 照射群は非照射群と比較して、NF- κ B 経路の活性化に関連する HMGB1/AGE/RAGE 遺伝子発現の増加を抑制した。また、Bax、Caspase-3 活性を抑制して糖尿病誘発アポトーシスを減少させた（図 1）、C はコントロール、D は糖尿病、DL は糖尿病+LPLI を表す）。以上の結果より、LPLI 照射は糖尿病ストレスによる誘発炎症を抑制することを明らかにした。



（図 1）

遺伝子オンロジー解析により、唾液腺の老化に関わる可能性がある遺伝子、および miRNA が、cAMP 媒介シグナル、上皮接着結合シグナル、タイトジャンクションシグナル、ギャップジャンクションシグナル、カルシウムシグナル、およびサーチュインシグナルに関与していることが明らかになった。定量的 RT-PCR によりさらに解析したところ、加齢の制御に関わる転写因子が、miR-30c-1-3p、miR-34a-5p、miR-92a-3p、miR-181a-5p および miR-550a-3p の制御にも関与していることが示された。このことから、miRNA の異常発現が唾液腺加齢において重要であり、その機能は関連シグナル上の特定遺伝子の転写を通して誘導されることが考えられた。一方、SATB1cKO マウスは、胸腺での中心性免疫寛容に異常をきたし、自己免疫疾患を呈するが、これらのマウスにおいては、生後 4 週齢という若齢においても唾液腺に炎症が見られることが判明している。miRNA アレイ分析および定量的 RT-PCR から、10 種の miRNA (miR-150-5p、miR-130a-3p、miR-511-3p、miR-10a-5p、miR-6409、miR-4689、miR-483-5p、miR-135a-1-3p、miR-1934-3p、および miR-155-5p) の発現がアップレギュレートしており、一方、9 種の miRNA (miR-3909、miR-135a-5p、miR-30a-3p、let-7a-3p、miR-551b-3p、miR-133a-3p、miR-193a5p、miR-6918-5p、および miR-129-1-3p) の発現がダウンレギュレートしていることが示された。IPA により、これらの miRNA は、代謝シグナル伝達経路、AMPK シグナル伝達経路、ミトコンドリア機能不全に関わる経路、上皮間葉転換に関わる経路、およびサーチュインシグナル伝達経路の調節に潜在的に関与していることが示された。多数の組み合わせが識別された mRNA と miRNA の網羅的解析は、低出力レーザー照射 (LPLI/LLLT) による miRNA の異常発現（図 2）が唾液腺機能不全において重要であることを示唆した。そして、その機能は関連シグナル上の特定遺伝子の転写を通して誘導さ

れると考えられた。



(図 2)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 河野哲朗, 河野善治, 小林良喜, 遠藤弘康, 内山敏一, 松根健介, 鈴木久仁博, 寒河江登志朗, 岡田裕之	4. 巻 44
2. 論文標題 水酸化カルシウムによる象牙細管封鎖性の研究	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日大口腔科学	6. 最初と最後の頁 141-147
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

1. 著者名 有川量崇, 谷野 弦, 田口千恵子, 竹内麗理, 小林良喜, 内山敏一, Ujjal K.Bhawal, 那須郁夫	4. 巻 12
2. 論文標題 高齢者の口腔環境に対する中鎖脂肪酸とビタミンDを含有するオイルの効果の検討	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本口腔ケア学会雑誌	6. 最初と最後の頁 11-16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Ujjal K. Bhawal, Toshikazu Uchiyama, Fengzhu Zhang, Koh Shibusani
2. 発表標題 Low-Level Laser Therapy (LLLT): Drug free pain relief and better healing
3. 学会等名 2019 World Laser Medicine Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田口千恵子, 山田 孝, 中村 茂, 岡田優一郎, 竹内麗理, 内山敏一, 多田充裕, 有川量崇
2. 発表標題 歯科衛生士学生におけるフッ化物応用教育開始前の意識調査
3. 学会等名 第60回日本歯科医療管理学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤田 光, 大塚一聖, 岩井啓寿, 岡田珠美, 内山敏一, 平山聡司
2. 発表標題 ワンステップボンディング材の処理時間が歯質接着性におよぼす影響
3. 学会等名 日本歯科保存学会2019年度春季学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 パワール・ウジャー, 内山敏一, 有川量崇, 田口千恵子, 横田容子, 藤田(中島)光, 景山万貴子, 大峰浩隆, 平山聡司
2. 発表標題 Insights into the mechanisms of low level fluoride:current status and future expectations
3. 学会等名 オーラルヘルス学会第21回学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 有川 量崇, 谷野 弦, 田口 千恵子, 竹内 麗理, 小林 良喜, 内山 敏一, Bhawal Ujjal K., 河野 善治, 那須 郁夫
2. 発表標題 高齢者の口腔環境に対する中鎖脂肪酸とビタミンDを含有するオイルの効果の検討
3. 学会等名 第66回 日本口腔衛生学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 田口 千恵子, 小林 良喜, 河野 哲郎, 有川 量崇, 中山 竜司, 竹内 麗理, Bhawal Ujjal K., 内山 敏一, 那須 郁夫
2. 発表標題 老齢マウスにおける市販発酵食品摂取による抗菌性ペプチドの誘導について
3. 学会等名 第66回 日本口腔衛生学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 パワール・ウジャー、有川 量崇、内山 敏一、平塚 浩一、久保山 昇、渋谷 鏡
2. 発表標題 低出力レーザー照射によるSTZ誘発糖尿病ラットのAGE-RAGE系に及ぼす影響
3. 学会等名 第17回 日大口腔科学
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔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	有川 量崇 (ARIKAWA Kazumune) (50318325)	日本大学・松戸歯学部・教授 (32665)	
研究 分担者	B h a w a l U j j a l (BHAWAL Ujjal) (50433339)	日本大学・松戸歯学部・助教 (32665)	