

機関番号：32667

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592159

研究課題名（和文）唾液腺の老齢化に伴い出現する蛋白質の同定と発現機序の解明

研究課題名（英文）Analysis of expression mechanism and identification of protein in the salivary gland with aging.

研究代表者

菊池 憲一郎 (KIKUCHI KENICHIRO)

日本歯科大学・生命歯学部・准教授

研究者番号：80267260

研究成果の概要（和文）：加齢に伴う唾液分泌量の減少要因を明らかにする目的で、唾液腺組織の腺房や導管部の細胞における微細構造の変化や細胞が産生する蛋白質に注目し、免疫組織学的、微細構造学的、生化学的な手法を用いて実験を行った。その結果、加齢に伴い唾液腺組織の萎縮、アミロイド蛋白の発現、免疫抗体の一部で加齢とともに発現する蛋白質の存在が示唆された。

研究成果の概要（英文）：This study was designed to examine age-related expression mechanism and identification of protein in the sublingual and submandibular gland of male Wistar rats from 6 to 24 months. After 18 months, amyloid protein accumulates in the intralobular connective tissue surrounding the terminal portions and to the interlobular connective tissue around the blood vessels and the excretory ducts. A part of the serous and mucous cells of the sublingual and submandibular gland gradually was increased expresse of some protein with aging.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯学

キーワード：顎下腺, 舌下腺, 老化, 蛋白質, 細胞・組織, 発生・分化

1. 研究開始当初の背景

Kim S. K. and Allen E. D.(1994)は、加齢に伴いヒトを含めた動物の唾液腺において、腺房細胞数の減少は生じるが、唾液の産出量には変化がみられないと報告している。しかし、産出量に変化がみられない原因については明らかにしていない。また、宮本ら

(1998)は、スナネズミの耳下腺と顎下腺では加齢に伴い腺房細胞の細胞死が増加し、唾液分泌量の減少を誘発していると述べているが、腺房細胞の性状の経時的変化や唾液量減少の要因については述べていない。申請者は、このような背景から、加齢

とともに唾液分泌量が減少し、唾液の粘稠度が増加する要因の一つとして、ネバネバした唾液を産生する粘液細胞の動態に着眼し、ラット舌下腺の胎生後期から老齢期にかけて存在する粘液細胞の動態について検討してきた。平成14年度から平成16年度の基盤研究(C)一般に採択され、ラット舌下腺では、(1)胎生後期に漿液顆粒を生産するが、発育とともに粘液顆粒を生産ようになること、(2)老齢期の漿液性半月にみられる漿液顆粒は、発育期と比べて産生される蛋白質の性状に変化が生じること、(3)舌下腺や顎下腺の分泌細胞はアポトーシスによる細胞死が少なく、比較的ストレスに強く、腺房細胞の細胞死が直接的に唾液分泌量の減少をもたらすものではないことが明らかになり、その成果を論文に発表している。それならば、何故、唾液分泌量の減少や唾液の粘稠度が増して行くのであろうか。申請者はこの新たなる課題の解明に取り組むために、当該科学研究費補助金を申請し、腺房細胞や導管部の細胞が産生する蛋白質とそれら細胞の形態的な微細構造に注目し、(1)唾液腺の腺細胞が分泌する蛋白質の性状の違い、(2)腺房細胞や導管部の細胞の微細構造の変化、さらに、(3)生化学的な手法による加齢に伴い発現する蛋白質の同定、唾液分泌量の減少の要因の解明を目指すこととした。

2. 研究の目的

消化器に属し唾液を分泌する器官である唾液腺は、消化作用、咀嚼、嚥下の補助作用、口腔の衛生状態を保つ洗浄作用、リゾチームなどの抗菌作用などの機能を有する唾液を生産している。しかし、現代のように高齢化やストレス社会では、唾液分泌の減少をともなった疾患が増加している。そこで本研究では、唾液腺の加齢とともに発現する蛋白質を特定し、その発現機序を解明すること目的とした。

3. 研究の方法

実験動物

実験には、生後6~24ヶ月、体重650~1064gのWistar系ラット雄20匹を用いた。日頃より外表および行動等を観察し、生後

6, 12, 18, 24ヶ月の4つの時期に分けて、舌下腺および顎下腺を摘出し腺体組織の湿重量を測定した。材料採取時には、日本歯科大学生命歯学部共同利用センター生物科学施設所有の血液分析装置(ベトスキャン, Axisis社)にて血液の生化学的な検査を行ったうえで実験材料に供した。なお、実験にあたっては、同大学同学部生物科学実験委員会による、実験計画の審査と承認を経た上で、同委員会が定めた「動物の愛護と管理に関する規定」に従い、動物愛護の精神を遵守し、実験動物の健康状態と実験に伴う苦痛の軽減に最大限配慮し、適正かつ安全に実験を進めた。

実験方法

試料の採取

採取は舌下腺、顎下腺ともに左右両側とし、腺体を光顕用(一般染色、免疫染色)、電顕用、蛋白質抽出のための電気泳動用に3分割した。固定液は光顕用が10%中性緩衝ホルマリン、電顕用は2.5%グルタルアルデヒド・2%パラホルムアルデヒド混合液(0.05Mリン酸緩衝液, pH7.4)にて固定した。

(1)分泌細胞の分泌物質の性状を組織化学的に検討する:

①H-E染色

舌下腺および顎下腺の形態的な観察を行う目的で、H-E染色を施した。

②アルシアン青(A-B)染色

分泌細胞に含まれる酸性ムコ多糖を染め出すために、通法にしたがってA-B染色(pH3.5)を行った。

③Periodic Acid - Schiff反応(PAS反応)

A-B染色を行った切片の連続切片に対して、中性糖を識別するため、通法に従い染色を行った。

(2)コンゴ赤染色によるアミロイド蛋白の組織学的検討

A-B染色を行った切片の連続切片に対して、腺実質内にみられるアミロイド蛋白の局在を調べるためにコンゴ赤染色を行った。標本は偏光顕微鏡(Nikkon, N100)および共焦点レーザー顕微鏡による観察を行った。

(3)過マンガン酸カリウム酸化法を用いたアミロイド蛋白の鑑別

アミロイド蛋白は、発症の原因の違いにより沈着するアミロイド蛋白が異なることから、過マンガン酸カリウム酸化法を用いて、舌下腺および顎下腺実質内にみられたアミロイド蛋白がアミロイド light 鎖 (AL, amyloid light chain) なのか、アミロイド関連タンパク質か (AA, amyloid-associated protein) 否かの鑑別を行った。

(4) 導管および腺房細胞に発現する蛋白質の局在を検討する：

免疫組織化学的検索

漿液細胞や導管に発現する蛋白質については、抗 amylase, 抗 CSP-1 抗体, PSP 抗体, GRP 抗体, 粘液細胞や導管に発現する蛋白質については, submandibular gland protein B(SMGB), submandibular gland protein D(SMGD), α Mucin9, α subunit Sublingual gland Mucin (α SLG Mucin) 抗体, epithelial growth factor (EGF), neuro growth factor (NGF) 抗体 を用いて免疫組織化学的に検討した。

(5) 微細構造学的検索

前述で記載した抗体を用いて、免疫電顕染色を施し、経時的な変化について電顕レベルで検討する。

(6) 生化学的手法を用いた検索

種々の蛋白質を効率よく分離できる SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を行ない、加齢に伴い発現する特定の蛋白質を検索する。

4. 研究成果

(1) 実験動物の健康状態の把握

① 実験動物の外表観察と体重測定

定期的に見視と触診により外表観察および行動観察を行った。

動物の体重の平均は、生後 6 ヶ月で 650g, 生後 12 ヶ月で 770g, 生後 18 ヶ月で 836g, 生後 24 ヶ月で 784g であった。体重のピークは生後 18 ヶ月で 1064g の個体もみられたが、その後は徐々に減少に転じた。

行動観察や刺激に対する反応は、生後 20 ヶ月を経過したもので、刺激に対する反射や反応が鈍くなっていた。

② 実験動物の血液生化学的検査

材料採取時にスクリーニングとして 13 項

目 (ALB, ALP, ALT, AMY, TBIL, BUN, CA^{++} , CHOL, CRE, GLU, K^+ , TP, GLOB) について血液生化学的検査を行い、用いた実験動物の評価材料としての適否を検討した。その結果、生後 18 ヶ月以降の観察期間で顕著な減少を呈したのは ALB の 1 項目だけで、TBIL, K^+ , TP, GLOB 値には大きな変動は認められなかった。

(2) 唾液腺組織の湿重量変化

舌下腺、顎下腺の体重 100g あたりの腺体の湿重量を算出した。舌下腺では生後 18 ヶ月で 10.2mg, 生後 24 ヶ月では 5.8mg と減少していた。また、顎下腺では、生後 18 ヶ月で 50.6mg, 生後 24 ヶ月で 33.6mg となり、舌下腺同様に減少傾向を示した。

(3) 分泌細胞の分泌物質の性状を組織化学的に検討する：

① H-E 染色

舌下腺は、顎下腺とは異なり、多数の粘液細胞からなる粘液性終末部に少数の漿液細胞からなる漿液性終末部 (半月) が付着した状態で存在していた。介在部導管や線条部導管の発達が悪かった。H-E 染色の所見では粘液細胞が優勢であるために実質全体が白く抜けたように明るくみえていた。顎下腺も混合腺であるが、舌下腺とは逆に多数の漿液細胞からなる漿液性終末部の間に少数の粘液細胞からなる粘液性終末部が入り込む形で存在していた。

② アルシアン青 (A-B) 染色および Periodic Acid - Schiff 反応 (PAS 反応)

加齢に伴う分泌顆粒の性状変化を調べる目的で行ったアルシアンブルー (AB) 染色の所見では、舌下腺の粘液終末部に含まれる酸性ムコ多糖は、顎下腺と比較すると特異的な青色に染めだされた。また、PAS 反応では、顎下腺と比較して舌下腺の粘液終末部における染色性が低下していた。生後 6 ヶ月から生後 24 ヶ月観察期間を通して、H-E 染色および AB 染色による違いは認められなかった。

(4) コンゴ赤染色および過マンガン酸カリウム酸化法を用いたアミロイド蛋白の鑑別

舌下腺、顎下腺ともに生後 6 ヶ月と 12 ヶ月の個体では、アミロイド蛋白の沈着は認められなかった。しかし、生後 18 ヶ月以降になると、導管周囲および腺房細胞間、小葉間結合組織や血管壁がオレンジレッドによって染め出されていた。これらコンゴ赤染色

に陽性反応を呈した標本について偏光顕微鏡や共焦点レーザー顕微鏡による観察から、アミロイド蛋白は緑色複屈折を示した。さらに過マンガン酸カリウム酸化に抵抗性を示したことから、全身性アミロイドーシス(ALアミロイドーシス)であることが確認された。生後18ヶ月から生後24ヶ月に向うにつれてコンゴ赤の染色性は、増加しているように観察された。

(5) 導管および腺房細胞に発現する蛋白質の局在を検討する：

免疫組織化学的検索

顎下腺、舌下腺の標本に種々の抗体を用いて、老齢化に伴い出現する蛋白質の発現時期や部位について比較検討を行った。生後6ヶ月、12ヶ月、18ヶ月の舌下腺の粘液細胞はSMGD, Mucin19抗体、漿液性終末部(半月)はSMGB, PSP抗体に良好な反応を示めし、特に、Mucin19抗体は月齢が高くなるにつれて反応性の低下が認められた。また、顎下腺の漿液細胞はGRP抗体、顆粒管導管はEGF, NGF抗体、介在部導管はCSP1, SMGB, SMGD, SMGC抗体で良好な免疫活性を示し、特にSMGCは月齢が高くなるにつれて顆粒管、介在部導管で反応性が低下、一方SMGD抗体は逆に月齢が高くなるにつれて、介在部導管や漿液細胞で強い免疫活性を呈した。

この生後18ヶ月までの顎下腺の顆粒管導管と介在部導管に良好な反応を呈したSMGB抗体, SMGC抗体, SMGD抗体のうち、特に生後24ヶ月になるとSMGC抗体で、顆粒管導管と介在部導管の両者の染色性が生後18ヶ月に比べて低下し、逆にSMGD抗体は生後18ヶ月と比較して介在部導管でより強い反応性を示していた。

(6) 微細構造学的検索

前述で記載した抗体を用いて、免疫電顕染色を施し、経時的な変化について検討した結果、生後24ヶ月の舌下腺の漿液性半月の分泌顆粒でSMGD抗体の良好な反応がみられた。

(7) 生化学的手法を用いた検索

種々の蛋白質を効率よく分離できるSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)を行ない、加齢に伴い発現する特定の蛋白質を検索したところ、生後6ヶ月の舌下腺、顎下腺のともに分子量45,000, 29,000, 14,300付近で両腺共通の発現を呈し、顎下腺では分子量20,100, 舌下腺では分子量45,000から66,400の間に特異的な発現がみられ、この傾向は生後24ヶ月でも

みられました。

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0件)

[学会発表] (計0件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菊池 憲一郎 (KIKUCHI KENICHIRO)

日本歯科大学・生命歯学部・准教授

研究者番号：80267260

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

池田 利恵 (IKEDA RIE)

日本歯科大学東京短期大学・歯科衛生学科・教授

研究者番号：50168150

(4) 研究協力者

Arthur R. Hand (Professor)

University of Connecticut Health Center

Dept. of Craniofacial Sciences

佐藤住美江 (SATO SUMIE)

日本歯科大学・生命歯学部・職員