

令和 4 年 5 月 18 日現在

機関番号：37114

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18689

研究課題名(和文)ドライマウスを誘導する新規分子機序

研究課題名(英文)A novel pathophysiological mechanism of dry mouth

研究代表者

岸川 咲吏(Kishikawa, Sari)

福岡歯科大学・口腔歯学部・助教

研究者番号：50781358

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ドライマウスは唾液分泌量の減少による口腔乾燥を主症状とする疾患である。近年、肥満患者での発症増加が世界中で報告されている。しかし、肥満とドライマウスの分子生物学的関連性の報告はなく、肥満がドライマウスを誘導するメカニズムは不明なままである。そこで本研究は、高脂肪食摂取肥満マウスを用いて、肥満がドライマウスを発症させる分子メカニズムを明らかにする。研究の結果、高脂肪食を投与した肥満マウスの唾液腺では老化関連分子の発現増加が見られた。さらに老化マーカーの発現が腺房細胞で増加していた。このことから、肥満によって唾液腺細胞に老化が惹起され、唾液腺の機能低下が起きたと示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、肥満が様々な疾患のリスク要因になることが明らかになり、肥満関連性疾患の研究は飛躍的に発展している。本研究により、肥満による唾液腺の細胞老化の誘導の分子メカニズムが明らかになり、さらに加齢変化との関係性が明らかになれば、唾液腺特異的なセノリティクスの開発に繋がる。これにより、肥満による若年性ドライマウスの早期治療が可能になるとともに、加齢によるドライマウスの治療にも応用できる。健康長寿社会において、口腔機能の維持は口腔疾患の予防の上でも大変重要であり、しいては全身疾患予防にも繋がる。

研究成果の概要(英文)：Xerostomia is a disease whose main symptom is dry mouth due to decreased saliva production. In recent years, an increasing incidence of obese patients has been reported worldwide. However, there are no reports of a molecular biological link between obesity and thirst, and the mechanism by which obesity induces thirst remains unclear. In this study, we elucidated the molecular mechanism by which obesity causes dry mouth using mice fed a high-fat diet. As a result of research, gene expressions of PML, p53, and p21, which are aging-related molecules, were increased in the salivary glands of mice fed a high-fat diet. In addition, the expression of the aging marker SA- $\beta$ -gal was increased in the acinar cells of the salivary glands by immunofluorescent staining. It has been suggested that obesity caused aging of salivary gland cells and decreased salivary gland function.

研究分野：免疫学

キーワード：ドライマウス

### 1. 研究開始当初の背景

ドライマウスは口腔乾燥を主症状とする疾患である。唾液には歯の再石灰化を促す物質や、殺菌・抗菌作用を持つ物質が含まれており、口腔を潤す役割を持つ。ドライマウスになると唾液が減少するため、歯周病やう蝕などの口腔状態の悪化や舌痛、さらには摂食・味覚・発音の障害になりやすい。ドライマウスの主因はストレスとされているが、実はこの時、唾液腺自体にも解剖学的な変化が起きている (Ayuob et al, J Oral Sci. 2019)。近年、肥満患者でドライマウスが起きることが世界中で報告されている (Östberg et al, BMC Oral Health. 2012)。さらに小動物を用いた研究でも、肥満によって唾液腺に異常が起きることが確認されている。肥満マウスやラットでは、唾液中の炎症性サイトカインの増加や唾液腺重量の減少が見られ (Roa and Del Sol, Colomb Med. 2018)、唾液腺細胞の減少と萎縮も観察されている (Matczuk et al, J Diabetes Res. 2016)。加えて、肥満を表現型とする糖尿病マウスにおいても、唾液腺の酸化ストレスにより炎症性サイトカインが増加することが報告されている (Maciejczyk et al, Nutrients. 2018)。興味深いことに、肥満が誘導する唾液腺細胞の解剖学的変化は、老齢マウスのそれと酷似している (Yamakoshi et al, Aging Cell. 2015)。このことから、申請者は、肥満の唾液腺組織では加齢変化が起きるのではないかと考えた。しかし、これまでに唾液腺の解剖学的変化の原因について、老化に注目して病態生理学的に解析した研究報告はない。そこで申請者は予備実験を行ない、高脂肪食摂取により体重増加が著しいマウスの唾液腺の老化関連因子の発現量を調べた。その結果、肥満マウスの舌下腺で老化関連分子 p53 の発現が増加していることがわかった。

以上の研究結果から、本研究は、肥満が唾液腺組織において炎症や酸化的ストレスを発生させ、細胞老化を誘導することで唾液腺機能の低下が起きるのではないかと、そして肥満の解消や老化細胞の化学的除去により唾液腺の機能は回復するのではないかと、という問いのもと、肥満がドライマウスを発症させるメカニズムについて分子レベルで明らかにする。

### 2. 研究の目的

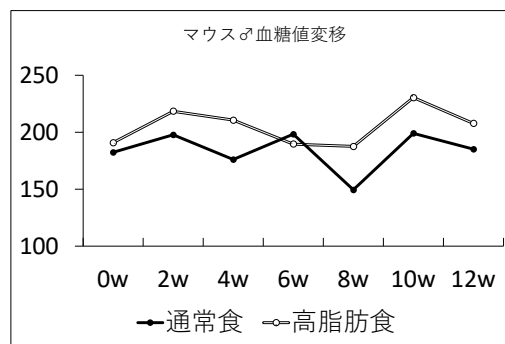
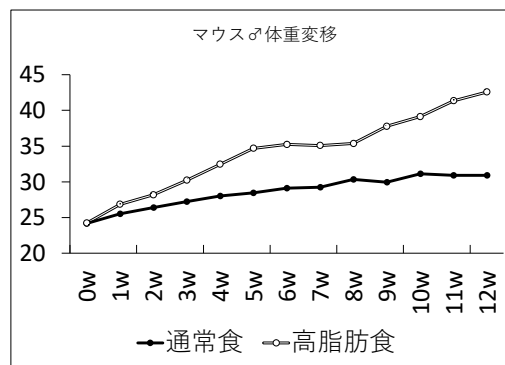
本研究の目的は、細胞老化に着目し、肥満がドライマウスを誘導する分子メカニズムを明らかにすることである。申請者は近年、ドライマウスを訴える肥満患者が増加していることに注目した。肥満マウスの唾液腺では細胞の減少や萎縮など、老齢マウスと同様の組織変化が起きていることが報告されており、肥満により細胞の老化が誘導された結果、唾液腺の機能低下につながったのではないかと推察した。

### 3. 研究の方法

高脂肪食を与えた肥満モデルマウスを用いて実験を行った。肥満モデルマウスは経時的に体重変化 (1回/週) と血糖値 (1回/2週) を計測した。高脂肪食を与えた 10 週以降で高体重と高血糖の両方を示したマウスを各実験で使用した (図 1)。

#### 3-1 老化を起こす唾液腺細胞の特定と唾液腺の器質的・機能的変化を明らかにする

・老化が誘導されている唾液腺細胞を特定するために、肥満モデルマウスの大唾液腺を用いて蛍光免疫染色を行った。サンプルである大唾液腺は顎下腺を用いた。まずマウスから採取した顎下腺を 4%PFA で 4℃、o/n で固定した。翌日 30%スクロースで置換した。サンプルを OCT コンパウンドで包埋し、凍結ブロックを作製した。作製したサンプルはクリオスタットで薄切化した。切片をブロッキング後、唾液腺の腺房細胞マーカーであるアクアポリン 5 もしくは、アミラーゼと老化マーカーである SA-β-Gal、核マーカーである DAPI を用いて三重蛍光免疫染色を行い、共焦点顕微鏡で観察した。



(図 1) マウスの体重と血糖値変移

### 3-2 唾液腺細胞が老化を起こすメカニズムを明らかにする

・老化が誘導されている組織と、細胞老化メカニズムを明らかにするために、大唾液腺である顎下腺、舌下腺を用いて各組織に発現している老化関連マーカーの発現レベルについてウェスタンブロット法を用いて解析した。老化マーカーとして PML (前骨髄球性白血病タンパク)、がん抑制遺伝子である p53、p21、DNA 損傷の指標である  $\gamma$ -H2A.X を用いた。また内在性コントロールのマーカーとして gapdh、ponceau S による total protein の検出を行った。

## 4. 研究成果

### 4-1 唾液腺の腺房細胞に老化が誘導されている

・肥満モデルマウス (以下 HFD) の顎下腺ではコントロールマウスに比べて腺房細胞マーカーであるアミラーゼ、アクアポリン5の発現が増加していた (図 2、3)。また、アミラーゼ、アクアポリン5の発現が上昇している部位で老化マーカーである SA- $\beta$ -Gal (spider- $\beta$ -gal) の発現も増加していた。唾液腺の導管部や介在部では SA- $\beta$ -Gal の発現は見られなかった。また、腺房部の外側で SA- $\beta$ -Gal の発現は見られなかったことから筋上皮細胞では細胞老化は誘導されていないことが示唆された。以上のことから唾液腺の腺房細胞 (漿液細胞もしくは粘液細胞) において老化が誘導されていると考えられた。

### 4-2 顎下腺、舌下腺における老化マーカーの発現増加

・コントロールマウスに比べて HFD マウスの舌下腺では①のマウスで PML と p53、②のマウスで p21 のみの発現増加が見られた。しかし、その他の老化マーカーについての発現に変化が見られなかった。また、顎下腺では①のマウスで PML と p53、②のマウスで PML と p21 の発現の増加が見られた (図 4)。また、舌下腺、顎下腺ともに  $\gamma$ -H2A.X の発現は検出されなかった。

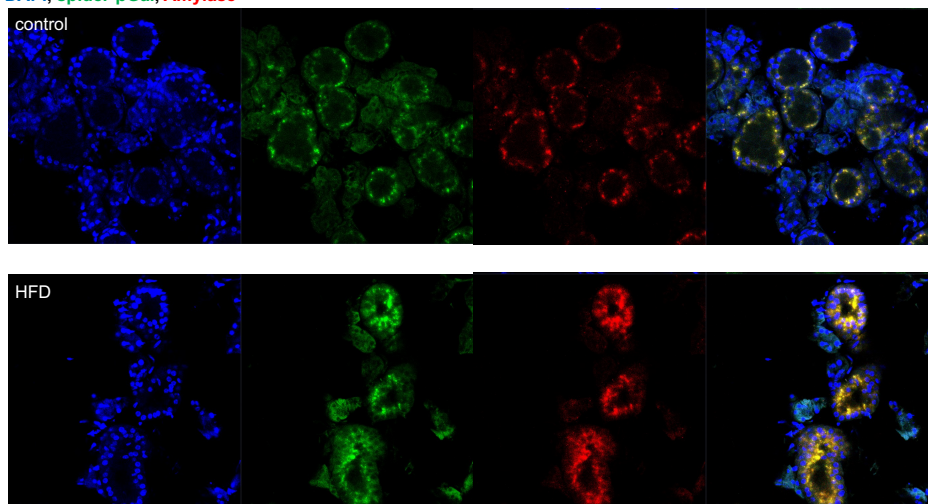
以上 2 点をまとめると、HFD マウスの唾液腺では主に顎下腺で老化が亢進していた。また顎下腺の老化メカニズムには PML-p53 経路と PML-p21 経路があることが予想された。PML-p53 経路に関しては過去の報告にもある通り、PML は p53 の下流分子であり直接的なターゲット分子である (Elisa de Stanchina et al., Mol Cell. 2004)。このことから、肥満による顎下腺の老化亢進には p53 を中心とした制御メカニズムが働いていると考えられる。一方で、PML が p21 のターゲット分子である報告はなく、新たな分子メカニズムである可能性が示唆された。

## 5. まとめ

肥満を発症するとがん抑制遺伝子の一つである p53 の発現が増加することで細胞周期がストップし、細胞老化が促進することが示唆された。肥満による唾液腺の老化は舌下腺ではなく、主に顎下腺で起きていた。また顎下腺では腺房部の腺房細胞 (漿液細胞や粘液細胞) で老化マーカーの発現増加が見られた。これらのことから肥満によって大唾液腺の一つである顎下腺に細胞老化が誘導されていることがわかった。

しかし、マウスによっては p53 以外にも p21 を介する経路が存在することが示唆された。今後は肥満モデルマウスの唾液腺の機能解析を始め、唾液腺細胞に細胞老化を誘導する原因因子やその誘導メカニズムについての解析を進めたい。

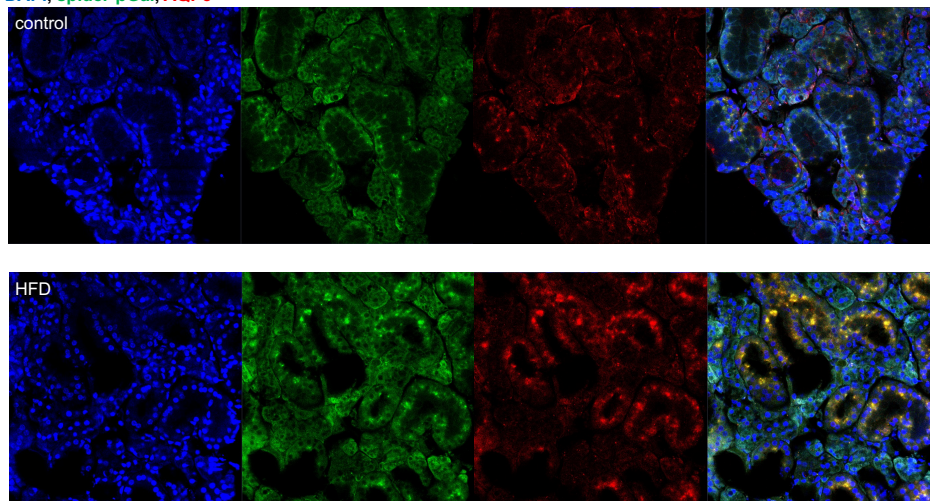
DAPI, spider- $\beta$ Gal, Amylase



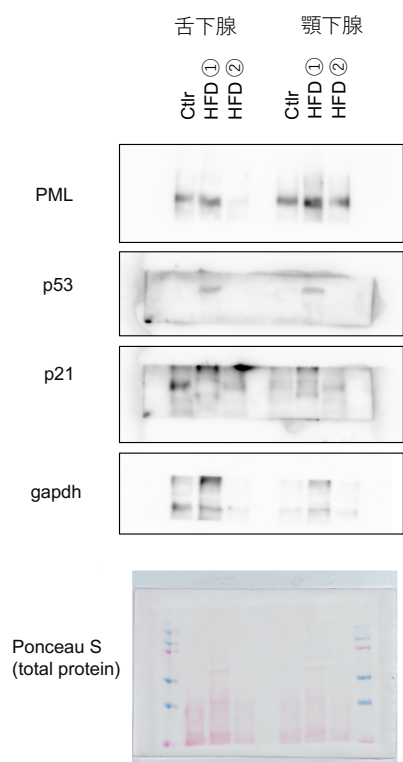
(図 2) マウス顎下腺 の蛍光免疫染色

コントロールマウス（上）、HFD マウス（下）。  
核マーカー（青）、老化マーカー（緑）、アミラーゼ（赤） x20

DAPI, spider-βGal, AQP5



（図3）マウス顎下腺の蛍光免疫染色  
コントロールマウス（上）、HFD マウス（下）。  
核マーカー（青）、老化マーカー（緑）、アクアポリン5（赤） x20



（図4）コントロールマウス (Ctrl) もしく肥満モデルマウス (HFD) から採取した舌下腺 (左側) と顎下腺 (右側) のウエスタンブロット解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Kishikawa, S., Terunuma, M
2. 発表標題 Expression of astrocytic glutamine synthetase is regulated by YAP
3. 学会等名 第63回日本神経科学大会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------