

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24792223

研究課題名(和文) 加齢による唾液腺機能低下に対するアンチエイジング療法の構築

研究課題名(英文) Construction of the anti-aging therapy for the salivary gland functional decline by the aging

研究代表者

山村 佳子 (YAMAMURA, Yoshiko)

徳島大学・大学病院・特任助教

研究者番号：00581406

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：加齢モデルマウスにデシタピンを投与した。コントロールマウスと比較してデシタピン処理マウスの唾液腺組織におけるAQP5蛋白発現増強が認められた。また、6週齢マウスと比較して27週齢デシタピン処理マウスのAQP5蛋白発現は増強していた。唾液腺における総メチル化レベルはコントロールマウスと比較して、デシタピン処理マウスは明らかに低下していた。さらに、デシタピン処理マウスのAQP5遺伝子プロモーター領域でのメチル化レベルは、コントロールマウスと比較して明らかに低下していた。よって、DNA脱メチル化剤は高齢者の唾液分泌増加に有効であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We demonstrate that the in vivo administration of decitabine to the murine aging model mice. Western blot analysis demonstrated the augmented expression of AQP5 protein in the salivary glands of decitabine-treated mice compared to those of control mice. In addition, AQP5 protein expression levels in 5-Aza-CdR-treated old mice (27 weeks old) were much higher than those in untreated and young mice (6 weeks old). Global methylation levels in the salivary glands were significantly lower in the decitabine-treated mice than in the untreated mice. Moreover, the induction of demethylation in the AQP5 promoter of decitabine-treated mice was stronger than in the control mice. Our data therefore suggest that a DNA demethylating agent may be a useful drug for restoring hyposalivation in elderly individuals.

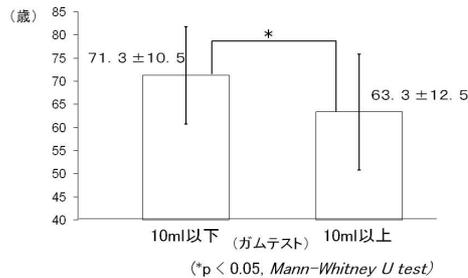
研究分野：口腔外科学

キーワード：アクアポリン5 唾液腺

1. 研究開始当初の背景

加齢に伴う唾液分泌量の低下により、「う蝕」や「歯周病の進行」、「筋・骨格系の低下」などが惹起される。そして、唾液腺は加齢により腺房構造の萎縮が認められる。

われわれはすでに臨床研究において、口腔乾燥感や口内痛を主訴に徳島大学病院歯科口腔外科を受診した125名の10分間の唾液分泌量の測定を行い、その結果、加齢に伴う唾液の分泌量の低下を明らかにした(下図)。



これまで口腔乾燥の原因として、糖尿病や発熱などの全身疾患によるもの、また薬剤服用によるもの、さらにシェーグレン症候群や唾液腺の萎縮などの唾液腺組織に関連するものが挙げられる。なかでも、唾液腺組織に起因する場合は、人工唾液の使用、ビタミン剤や唾液腺ホルモンの内服など対症療法が主に行われており、根本的な治療法は未だない。

一方、加齢に伴い生体内組織においては特定の遺伝子プロモーター領域においてDNAハイパーメチレーションが認められ (Mutat Res 219: 29

-37, 1989, Dev Genet 7: 65-73, 1986, J Biol Chem 262: 9948-9951, 1987)、そのメチル化は年齢とともに促進されることが報告されている (Nat Genet 7: 536-540, 1994)。なかでも ER 遺伝子や IGF2 遺伝子、MYOD1 遺伝子などいくつかの遺伝子のプロモーター領域においてメチル化が促進されているとの報告がある (Cancer Res 54: 2552-2555, 1994)。

このことより、加齢による唾液分泌量の低下の原因として、唾液の分泌に関与している AQP5 遺伝子のプロモーター領域でのハイパーメチレーションの可能性が示唆される。

これまで、正常腺房細胞には水分泌膜蛋白である AQP5 の存在が確認されているが、導管細胞には認められていないことが報告されている (Curr Opin Cell Biol 7: 472-483, 1995)。そこで当教室では、導管細胞に水分泌機能を付与し得るか検討を行ったところ、培養導管細胞を DNA 脱メチル化剤であるデシタピンにて処理することによ

り、AQP5 の発現誘導が確認され、発現誘導された AQP5 は水分泌機能を有していることを明らかにした (Lab Invest 85: 342-353, 2005)。

本研究においては、加齢に伴う唾液腺の機能低下と唾液腺組織での DNA ハイパーメチレーションに着目し、加齢に伴うメチル化が AQP5 遺伝子のプロモーター領域において惹起される結果、唾液腺機能としての唾液分泌低下が起こると想定するものである。すなわち、加齢に伴う唾液分泌量の低下は、唾液腺細胞における AQP5 の発現低下に起因するためであり、これに対する DNA 脱メチル化剤による AQP5 発現誘導は唾液腺分泌促進につながることを明らかにするものである。本研究はこのことから、唾液腺疾患に対するアンチエイジング (抗加齢) 療法としての新規治療法の開発を目的とするものである。

2. 研究の目的

加齢に伴う唾液腺機能の低下により、唾液分泌量の減少することが口腔乾燥症発症の一つの原因であると推察されている。本疾患に対する現在の治療法は、人工唾液の使用や症状緩和のための薬剤内服などの対症療法であり、根本的治療法は存在しない。そこで本研究においては、加齢に伴う唾液分泌量低下の原因は唾液腺細胞における水輸送膜蛋白である Aquaporin (AQP5) の発現低下に起因しているという仮説のもと、脱メチル化剤 (デシタピン) による唾液腺細胞での AQP5 発現増強を介した唾液分泌促進を目的とするものである。すなわち、アンチエイジング (抗加齢) 療法としての新規治療法の開発を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) マウスと実験手法

6 週齢および 24 週齢のマウス (雌性 C57BL/6CrSlc マウス) に対して、コントロール群 (生理食塩水投与群、n = 10) と 5-Aza-CdR 投与群 (1 mg 5-Aza-CdR / マウス kg、n = 10) に分けて検討した。

(2) 唾液分泌量の測定

コントロール群および 5-Aza-CdR 投与群マウスの唾液分泌量の測定は、塩酸ピロカルピン 5 mg/kg を腹腔内投与後 15 分間の唾液分泌総量を測定し、体重 1 g あたりの唾液分泌量として算出した。

(3) 病理組織

唾液腺組織 (顎下腺、舌下腺、耳下腺) を摘出後、ヘマトキシリン・エオ

ジンにて染色した。

(4)唾液腺組織における AQP5 のウエスタンブロット法による解析

(5)唾液腺組織における AQP5 の免疫組織化学的染色

(6)DNA メチル化シトシンの定量

5-Aza-CdR 投与群とコントロール群マウスの唾液腺組織におけるメチル化の相対的レベルは、MethylFlash™ Methylated DNA Quantification Kit (EPIGENTEK) を用いて行った。

(7)AQP5 遺伝子プロモーター領域における methylation-specific polymerase chain reaction (PCR)

5-Aza-CdR 投与群とコントロール群マウスの唾液腺組織から抽出したゲノム DNA は Sodium bisulfite 処理により修飾を行った。変換された DNA を PCR にて AQP5 プロモーター領域内 (GenBank™/EMBL Data Bank no. NM009701) の CpG 部位を含む methylated form と unmethylated form の 2 種類のプライマーを用いて増幅した。PCR 産物は 2%アガロースゲルにて電気泳動し、エチジウムブロマイドにて染色し、UV 透過光下に観察した。各プライマーの塩基配列は以下に示す。

primers : methylated form

(sense) 5'- TCGTTACGGGCGGATAAGGA -3'

(antisense) 5'- GCGACCGAAACATCTTAACCC -3'

primers : unmethylated form

(sense) 5'-TGTTTTTTGTATGGGTGGATAAGGA -3'

(antisense) 5'- TCACACAACCAAAACATCTTAACCC -3'

(8)統計的解析法

得られたデータは平均値 ± 標準偏差で表記し、Student's t 検定を用いて有意差検定を行い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

4. 研究成果

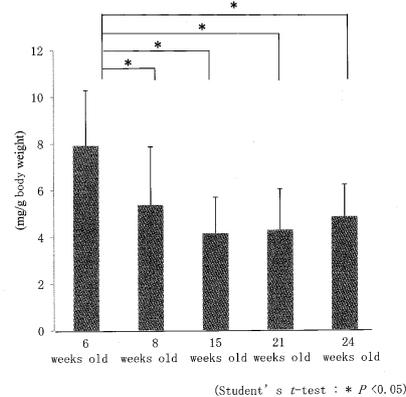
(1)病理組織像

5-Aza-CdR 投与群とコントロール群マウスの唾液腺組織(顎下腺、舌下腺、耳下腺)について、27 週齢マウスの 5-Aza-CdR 投与群とコントロール群マウスの唾液腺組織においては、単核細胞の浸潤や腺房細胞の萎縮ならびに脂肪組織や線維組織への置換などの変化は認められなかった。実験期間中および実験後において、5-Aza-CdR 投与による体重減少や寿命の短縮などの有害事象は認められなかった。

(2)コントロールマウスの加齢(生後 6 週から 24 週までの間)に伴う唾液分泌量の変化

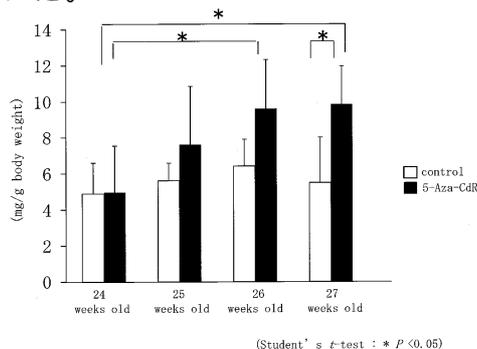
生後 6 週から 24 週までのマウスに対して塩酸ピロカルピンの腹腔内投与を行い、唾液分泌量を測定した。そ

の結果、唾液分泌量は生後 6 週マウスと比較して加齢に伴い、有意に唾液分泌量の減少を示した(下図)。また、唾液分泌総量においても 24 週まで徐々に減少を示した。したがって、唾液分泌量の減少は加齢と因果関係がみられることが示唆された。



(3)マウスの唾液分泌量に及ぼす 5-Aza-CdR の影響

マウスの加齢に伴う唾液分泌量減少に対する 5-Aza-CdR の治療効果につき検討した。その結果、5-Aza-CdR 投与群 (1 mg 5-Aza-CdR / マウス kg) マウスにおいては経時的に唾液分泌量は増加し、コントロール群と比較して有意に唾液分泌量の増加を認めた(下図)。なお、本実験の条件下においては、5-Aza-CdR 投与マウスの唾液腺組織の病理組織像は、コントロールマウスとほぼ同様の組織像を示していた。



(4) 5-Aza-CdR 処理によるマウス唾液腺組織における AQP5 蛋白の誘導

AQP5 蛋白の発現レベルを検索するために、粗細胞膜抽出蛋白についてウエスタンブロット法により解析を行った。顎下腺組織における AQP5 蛋白の発現は、3 週間の 5-Aza-CdR 投与により著しい増強が認められた。さらに、6 週マウスと比較すると 27 週マウスでは AQP5 蛋白の発現は低下しており、このことは顎下腺組織において AQP5 蛋白の発現は加齢に関連して減少することが示唆された。また、舌下腺・

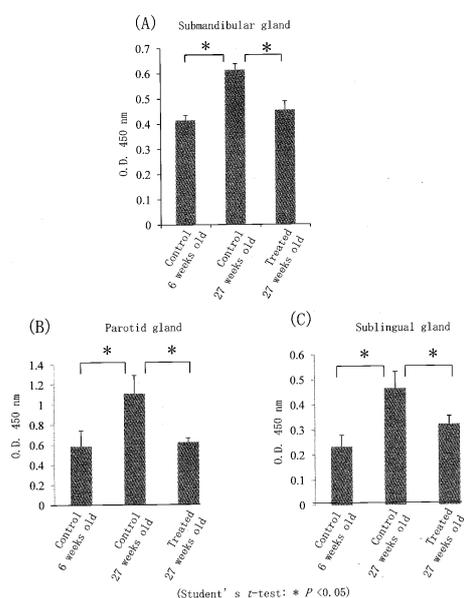
耳下腺組織においても 5-Aza-CdR 投与群の AQP5 蛋白の発現量は、コントロール群および 6 週マウスよりも増強していることが明らかとなった。

(5)5-Aza-CdR 投与マウスの唾液腺組織における AQP5 蛋白の発現増強

5-Aza-CdR 投与マウスの唾液腺組織における誘導された AQP5 の局在について検索するために、免疫組織化学的染色を行った。その結果、コントロールマウスの唾液腺細胞における AQP5 の発現は弱く認められた。一方、3 週間の 5-Aza-CdR 投与マウスにおいて AQP5 の発現は、腺房細胞の管腔側に増強が認められた。なお、AQP5 発現の多くはすべての唾液腺組織における腺房細胞の管腔側に限定して認められた。さらに、漿液性腺房細胞においてはすでに報告されているように、管腔側から放射状に分泌細管において AQP5 の発現がみられた。この AQP5 発現増強は、5-Aza-CdR 投与マウスにおいて認められた。

(6)5-Aza-CdR 投与マウスの唾液腺組織における DNA 総メチル化

5-Aza-CdR 投与マウスとコントロールマウスの唾液腺組織における DNA 総メチル化量を測定するために、マウスの唾液腺組織からゲノム DNA を抽出した後、遺伝子 DNA に含まれる 5-メチルシトシン含有量を定量した。その結果、5-Aza-CdR 投与マウスの 5-メチルシトシン含有量は、コントロールマウスと比較して有意に低値を示した。また、5-Aza-CdR 投与老齢マウスは 6 週齢マウスと同程度のメチル化レベルであった(下図)。



(7)5-Aza-CdR 投与マウスの唾液腺組

織における AQP5 遺伝子プロモーター領域 CpG 部位での低メチル化

AQP5 遺伝子内 CpG アイランドのメチル化状態を検討するため、5-Aza-CdR 投与老齢マウスとコントロールマウスの顎下腺組織を用いて、methylation-specific PCR 法を行った。その結果、5-Aza-CdR 投与マウスの唾液腺組織において非メチル化シトシンに特異的なバンドの増強が認められた。したがって、AQP5 の発現は、遺伝子プロモーター領域での低メチル化との関連が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 14 件)

(1) 山村佳子、青田桂子、桃田幸弘、松本文博、長井幸二郎、東 雅之. 徳島大学病院における慢性腎臓病患者の口腔管理について 日本口腔ケア学会雑誌 査読有 9(1): 2015, 23-27.

(2) Takano H, Momota Y, Kani K, Aota K, Yamamura Y, Yamanoi T, Azuma M.

-tocotrienol prevents 5-FU-induced reactive oxygen species production in human oral keratinocytes through the stabilization of 5-FU-induced activation of Nrf2. Int J Oncol 査読有 46(6): 2015, 1453-1460.

(3) 桃田幸弘, 可児耕一, 高野栄之, 松本文博, 茂木勝美, 青田桂子, 山村佳子, 東雅之. 一次性舌痛症における手掌部発汗の発現-皮膚水分量測定の有用性について- 日本歯科人間ドック学会誌 査読有 9: 2014, 18~23.

(4) 高野栄之, 桃田幸弘, 山村佳子, 田岡計久, 東 雅之. インプラント埋入後に生じたオトガイ神経麻痺が契機となり診断に至った下顎骨悪性リンパ腫の 1 例 日本口腔インプラント学会誌 査読有 27(2): 2014, 170~174.

(5) 山村佳子、桃田幸弘、松本文博、茂木勝美、青田桂子、高野栄之、大守真由子、河野文昭、東 雅之. 徳島大学病院内の口腔ケア依頼状況 日本口腔ケア学会雑誌 査読有 7(1): 2013, 31-35.

(6) Kani K, Momota Y, Harada M, Yamamura Y, Aota K, Yamanoi T, Takano H, Motegi K, Azuma M. -tocotrienol enhances the chemosensitivity of human oral cancer cells to docetaxel through the downregulation of the expression of NF- B-regulated anti-apoptotic gene products. Int J Oncol. 査読有 42: 2013, 75-82.

(7) Momota Y, Takano H, Kani K, Matsumoto F, Motegi K, Aota K, Yamamura Y, Omori M,

Tomioka S, Azuma M. Frequency Analysis of Heart Rate Variability: A Useful Assessment Tool of Linearly Polarized Near-Infrared Irradiation to Stellate Ganglion Area for Burning Mouth Syndrome. Pain Med. 査読有 14: 2013, 351-357.

(8) 青田桂子、高野栄之、可児耕一、山村佳子、東 雅之. リツキシマブの投与によって生じた口腔・上部消化管潰瘍の1例 日本口腔外科学会雑誌 査読有 59(7): 2013, 478-482.

(9) 青田桂子、山村佳子、大守真由子、山田佑子、可児耕一、高野栄之、茂木勝美、桃田幸弘、松本文博、東 雅之. 精神科神経科入院患者の口腔環境評価と専門的口腔ケアの有用性について 有病者歯科医療 査読有 22(2): 2013, 83-90.

(10) 青田桂子、山村佳子、可児耕一、高野栄之、茂木勝美、桃田幸弘、石丸直澄、東 雅之. Sjogren 症候群患者の唾液腺腺房構造破壊阻止 セファランチンの有効性に関する臨床病理学的研究 日本口腔科学会雑誌 査読有 62(4): 2013, 254-261.

(11) 茂木勝美、桃田幸弘、高野栄之、可児耕一、山村佳子、東 雅之. 抜歯後の止血困難をきっかけに発見された後天性血友病 A の1例 日本口腔外科学会雑誌 査読有 59(12): 2013, 786~790.

(12) Yamamura Y, Aota K, Yamanoi T, Kani K, Takano H, Momota Y, Motegi K, Azuma M. DNA demethylating agent decitabine increases AQP5 expression and restores salivary function. J Dent Res. 査読有 91(6): 2012, 612-617.

(13) Yamamura Y, Motegi K, Kani K, Takano H, Momota Y, Aota K, Azuma M. TNF-inhibits aquaporin 5 expression in human salivary gland acinar cells via suppression of histone H4 acetylation. J Cell Mol Med. 査読有 16: 2012, 1766-1775.

(14) 山村佳子、桃田幸弘、高野栄之、可児耕一、茂木勝美、松本文博、東 雅之. 真菌培養検査におけるカンジダの検出に影響する臨床的要因-口腔乾燥の関連について- 四国歯学会誌 査読有 24(2):2012, 29-34.

〔学会発表〕(計 7件)

(1) 山村佳子、茂木勝美、青田桂子、桃田幸弘、東 雅之. 唾液腺腺房細胞における MAPK 経路を介した AQP5 発現機構-SMRT と HDAC3 発現からの解析- (第 68 回日本口腔科学会総会 2014.5.8-9 東京都・新宿区)

(2) 山村佳子、茂木勝美、青田桂子、東 雅之. ヒト唾液腺腺房細胞における AQP5 発現機構-MAPK 経路の関与- (日本口腔組織培養学会 設立 50 周年記念学術大会,

2013.11.23-24 東京都・千代田区)

(3) Yamamura Y, Motegi K, Momota Y, Aota K, Takano H, Kani K, Azuma M. A Mechanism underlying the constitutive expression of AQP5 in human salivary gland acinar cells (21st international conference on oral and maxillofacial surgery 2013.10.21-24 Barcelona, Spain)

(4) 山村佳子、青田桂子、高野栄之、可児耕一、桃田幸弘、東 雅之. ヒト唾液腺腺房細胞における恒常的 AQP5 発現制御機構(第 67 回日本口腔科学会総会 2013.5.23-24 栃木県・宇都宮市)

(5) Yamamura Y, Motegi K, Aota K, Yamanoi T, Momota Y, Azuma M. Mechanism involved in the constitutive expression of AQP5 in human salivary gland acinar cells (Asean plus and Tokushima joint international conference 2012.12.7-8 Indonesia・Yogyakarta)

(6) 山村佳子、青田桂子、茂木勝美、桃田幸弘、高野栄之、可児耕一、松本文博、東 雅之. 加齢に伴う唾液腺機能低下に対する DNA 脱メチル化剤の有効性(第 57 回日本口腔外科学会総会 2012.10.19-21 神奈川県・横浜市)

(7) 山村佳子、青田桂子、茂木勝美、山ノ井朋子、東 雅之. 加齢関連メチル化遺伝子 AQP5 の機能回復と唾液分泌促進作用(第 60 回日本口腔科学会中国・四国地方部会, 2012.10.6 広島・広島市)

〔図書〕(計 1件)

山村佳子、東 雅之. 医歯薬出版 歯界展覧 歯科医師のための医学ハンドブック「口腔真菌症」2014, 224(180).

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山村 佳子 (YAMAMURA, Yoshiko)

徳島大学・病院・特任助教

研究者番号：00581406

(2) 研究分担者

なし

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし

。