

鶴見大学大学院歯学研究科博士学位論文

内容の要旨および審査の結果の要旨

氏名(本籍) 高橋 絢子(静岡県)
博士の専攻分野 博士(歯学)
学位記番号 甲第 441 号
学位授与年月日 平成 27 年 3 月 13 日
学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科専攻 鶴見大学大学院歯学研究科
(博士課程) 歯学専攻
学位論文題目 Evaluation of the effects of quercetin on damaged salivary secretion
(唾液分泌障害におけるケルセチンの効果の検討)
PLOS ONE 10(1) : e0116008. doi:10.1371/journal.pone.0116008 平成 27 年 1 月 28 日発行
論文審査委員 主査 教授 濱田 良樹
副査 教授 小林 馨 副査 教授 斎藤 一郎

内容の要旨

【研究目的】

唾液分泌量の低下によって生じる口腔乾燥症(ドライマウス)は著しい乾燥感だけでなく種々の口腔病変や誤嚥性肺炎などの発症要因となることが報告されている。

従来、唾液分泌障害の原因として頭頸部への放射線治療や自己免疫疾患の一つであるシェーグレン症候群などが報告され、その成立機序として腺組織局所の慢性炎症や酸化ストレスの関与ならびに微小血管の障害が報告されている。一方、ケルセチンはポリフェノールの一種で抗酸化作用を有するほかに、抗炎症効果、血管拡張作用を促進することが示されており、様々な疾患に対する効果が期待されているが、唾液分泌に与える影響については明らかにされていない。このことから、本研究では唾液分泌障害モデルマウスを用いケルセチンの唾液分泌に対する効果について検討し、*in vitro* でその作用機序について解析を行った。

【材料・方法】

動物

C57BL6J, 6 週齢オスは日本クレアから購入し、全ての動物実験は鶴見大学の実験動物規約に則り実施された。

ケルセチンの投与ならびに放射線照射

放射線照射による唾液分泌障害に対するケルセチンの効果を検討する目的で、ケルセチンを照射の 2 週間前より 1.25 g/kg/day, 照射後は 0.25 g/kg/day を自由摂取させ、放射線照射は 15 Gy の線量を実験開始 2 週後に行った。各群は、対照群、放射線照射群、ケルセチン摂取群、ケルセチン+照射群とし、実験開始から 10 週間、週一回キャピラリーを用いて Pilocarpine (1 mg/kg) 投与直後から 15 分後までの分泌量を測定した。

マウス唾液腺培養細胞におけるカルシウム濃度の測定

ケルセチン処理による唾液腺細胞内の Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) の変動を *in vitro* において確認する目的で、ヒト唾液腺培養細胞(HSY)に Fura-2 を添加しケルセチン (1 μ M, 10 μ M, 100 μ M) による 2 分間の前処理後、カルバコール (cch) の刺激時の蛍光を測定することで細胞内カルシウム濃度の検討を行った。

各種関連遺伝子発現量の検出

唾液分泌測定終了後にマウス顎下腺から RNA を抽出し、腺組織におけるケルセチンの抗炎症効果について、炎症性サイトカインである TNF- α ならびに IL-10 の遺伝子発現量を Real-time RT-PCR にて検出した。また、ケルセチンが唾液分泌

関連分子に作用するか否かを確認するために、唾液分泌関連因子である aquaporin 5 (AQP5) ならびに Muscarinic type 3 receptor (M3R) の遺伝子発現量を同様の方法で検出した。

一方、照射ならびにケルセチン処理を行った p53KO マウス大動脈由来の血管内皮細胞株 (MAEC) から同様の方法で RNA を抽出し、ケルセチンが MAEC における eNOS 発現に与える効果について、eNOS の遺伝子発現量を RT-PCR で得られたバンドの強度を定量解析した。

MDA の検出

ケルセチンが酸化ストレスに対し抑制的に作用するか否かを検討する目的として唾液分泌測定終了後にマウスから摘出された顎下腺のホモジネート抽出液から malondialdehyde (MDA) を検出し、吸光度計を用いて得られた吸光度から MDA の濃度を算出した。

遺伝子カスケード解析

ケルセチンによる唾液分泌促進効果のメカニズムに関わる遺伝子発現を網羅的に検出するために、特に末梢循環に対する影響を評価する目的からケルセチン処理 (50 μ M) した MAEC 細胞における遺伝子カスケード解析を行った。

統計解析

データは one-way ANOVA で解析し、2 群間の平均値の差を eNOS の発現量の検出ならびにカルシウム測定は Dunnett's 法、その他の実験データについては Tukey-Kramer 法を用いて解析した。p < 0.05 を有意差ありとした。結果は全て平均値 \pm 標準誤差 (mean \pm SE) で示した。

【結 果】

唾液分泌障害モデルの唾液量とケルセチンの効果の検討

放射線照射群においては対照群との比較では照射開始 3 週間から終了時までの期間で有意な低下を認めた。さらに照射マウスにおけるケルセチン摂取群では、摂取 3 週間ならびに 9 週間において唾液分泌量低下の抑制が有意に認められ、健常マウスにおいてもケルセチン摂取後の唾液分泌量は摂取 2 週後に有意な増加を認めた。

炎症性サイトカインの遺伝子発現の検出

照射群では TNF- α 及び IL-10 の発現量が有意に増加したが、ケルセチン摂取群では TNF- α の発現量は非摂取群と比較して明らかな低下を認め、IL-10 も同様に減弱傾向を示したことから、ケルセチンは放射線照射により生じた炎症性サイトカインの発現を抑制する効果が示された。

唾液関連遺伝子発現量の検出

健常マウスならびに照射マウスにおいてケルセチン摂取による AQP5 の発現量が有意に増加した。また、M3R は健常マウスにおいてケルセチンによる発現量の増加傾向が認められたことから、ケルセチンは唾液腺における水分分泌関連分子の発現を増強する可能性が示唆された。

カルシウム測定

100 μ M cch 処理では、ケルセチンが非処理の細胞と比較して用量依存的に有意に Ca^{2+} 濃度は増加したことから、ケルセチンは唾液腺細胞内のカルシウム取り込み能を亢進させることで唾液分泌が促進した可能性が示唆された。

eNOS 発現量の検出

照射した細胞ではケルセチン処理による eNOS 発現増加が認められたが、非照射の細胞では発現に変化がみられなかった。このことから、照射により障害される eNOS 発現の低下をケルセチンは抑制する可能性が示された。

マウス顎下腺における MDA の検出

ケルセチン非摂取群においては放射線照射による MDA の増加傾向が示されたが、ケルセチン摂取群では非摂取群と比較して有意に MDA は低下し、この結果から放射線照射によって生じる MDA はケルセチンにより抑制される可能性が考えられた。

遺伝子発現カスケード解析

検出から導き出されたいくつかのカスケードネットワークにおいて、酸化ストレスに関連する因子である FOXO1A, AKT-1, H_2O_2 が高頻度に検出され、これらの結果からケルセチンが酸化ストレスを制御している可能性が想定された。

【考 察】

唾液腺における水分分泌機構において AQP5 や M3R, $[Ca^{2+}]_i$ の関与が知られており、今回の検討でケルセチンによる AQP5 発現やカルシウム取り込みの増強が認められ、ケルセチンが唾液分泌に直接作用する効果を有することが示唆された。

また、M3R 依存性である低用量の cch 刺激ではカルシウム濃度が上昇しないことやケルセチンが M3R 発現を促進しなかったことから、ケルセチンが M3R 以外の水分分泌分子に作用し細胞内カルシウム濃度の上昇を誘導させた可能性も考えられた。また、放射線照射により誘導される唾液分泌能の低下の要因に活性酸素種や炎症反応の関与が報告されており、今回の検討では放射線照射による MDA や炎症性サイトカイン量の増加がケルセチンにより抑制されたことから、放射線誘発の酸化ストレスや炎症反応に対しケルセチンの抑制的な作用が唾液分泌障害を緩和させたと考えられた。

【まとめ】

ケルセチンの摂取は放射線照射などによる唾液分泌障害の改善だけでなく、唾液分泌を維持するための有効な手段となる可能性が示唆された。

審査の結果の要旨

ケルセチンはポリフェノールの一種で、抗酸化作用の他にも抗炎症作用や血管拡張作用を有し、様々な疾患に対する治療効果が期待されている。本研究では、放射線照射 (15 Gy) による唾液分泌障害モデルマウス (C57BL6J, 6 週齢, オス) を用い、ケルセチンの唾液分泌に対する効果について検討するとともに、*in vitro* において、その作用機序についても解析している。その結果、以下の所見が得られている。

- ①放射線照射群の唾液分泌量は、対照群に比べて有意に低下したが、ケルセチン摂取+放射線照射群では、その低下の度合いが抑制された。また、放射線照射をしていないケルセチン摂取群においても、対照群よりも唾液分泌量が増加する傾向が見られた。
- ②放射線照射群の顎下腺における TNF- α と IL-10 の発現量は有意に増加したが、ケルセチン摂取+放射線照射群での TNF- α の発現量は、放射線照射群に比べて有意に少なく、IL-10 についても減弱傾向を示した。また、対照群と放射線照射群の顎下腺における APQ5 発現量は、それぞれケルセチン摂取によって有意に増加した。
- ③ヒト唾液腺培養細胞内の Ca²⁺濃度は、カルバコールによる刺激時において、ケルセチン用量依存的に有意に増加した。
- ④放射線照射した p53KO マウス大動脈由来の血管内皮細胞 (MAEC) では、ケルセチン処理による eNOS 発現量の増加を認めたが、非照射の細胞では変化がなかった。
- ⑤放射線照射群の顎下腺において MDA レベルの増加傾向を認めたが、これに比べてケルセチン摂取+放射線照射群における MDA レベルは、有意に低かった。
- ⑥ケルセチン処理した MAEC 細胞における遺伝子カスケード解析を行ったところ、酸化ストレスに関連する FOXO1A, AKT-1, H₂O₂ が高頻度に検出された。

これらのデータは、ケルセチン摂取が放射線照射による唾液分泌障害の改善・回復に有用であることを示唆している。また、ケルセチンが唾液分泌機構に直接作用することで唾液分泌の維持に貢献していることを示している。従って本研究結果は、放射線治療後の頭頸部がん患者をはじめとする唾液分泌障害に苦しむ患者の QOL 向上に繋がるもので、きわめて臨床的価値が高いものと考えられる。

よって、本論文は博士 (歯学) の学位請求論文として十分な価値を有するものと判定した。