

令和 2 年 7 月 6 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K17219

研究課題名(和文)唾液分泌機構における新たな分子シグナリングの解明

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)

新潟大学・研究推進機構・特任助教

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)：ヒト唾液腺細胞を用いて、GABAB受容体の発現を確認した。また、高血糖状態における唾液腺の細胞死の増減を確認する目的で、細胞を高グルコース、低グルコース環境で培養した結果、高グルコース状態の継続は細胞死を誘導することが示唆された。今後はGABAB受容体と細胞死マーカーの発現関連性について検討を行う。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抑制性の神経伝達物質であるγ-アミノ酪酸(GABA)が唾液分泌に対してどのような働きをしているかについてはわかっていない。研究の結果、申請者は唾液腺にGABA B受容体が発現していることを見出した。しかし、唾液に対してどのような作用、修飾を行っているかについては今後の研究課題である。

研究成果の概要(英文)：we confirmed that GABA B receptors were expressed in human salivary gland cells. In addition, to clarify whether high glucose condition induces cell death or not, we cultured human salivary gland cells under high or low glucose condition. In the future, we will investigate the relationship between GABA B receptors and cell death markers to elucidate the mechanism of dry mouse.

研究分野：細胞生物学

キーワード：唾液腺 ドライマウス

1. 研究開始当初の背景

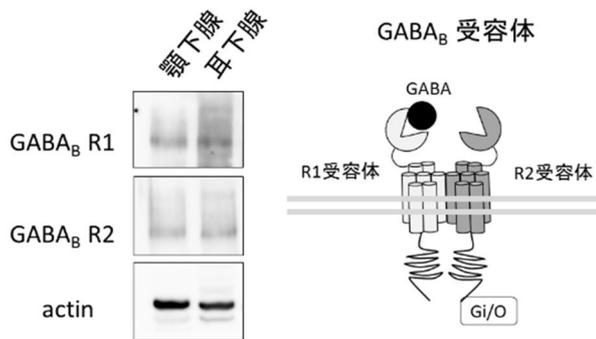
近年、咀嚼や嚥下、発語などに問題が生じるドライマウスを訴える患者は増加しており、患者の生活の質 (Quality of Life) を低下させないためにも、その対策が必要になっている。ドライマウスは唾液の分泌障害が主な原因であるが、障害が起こる原因は多様であり、現在まで有効な治療法は確立されていない。

唾液腺の腺房細胞で作られた原唾液は、導管部を通る過程で電解質の再吸収やタンパク質の分泌などの成分の修飾を受け、唾液として口腔内に分泌される。唾液の分泌は自律神経系によって調節されており、交感神経が優位に働くと、アドレナリン受容体の活性化によりタンパク質の分泌が促進して粘り気のある唾液が分泌され、逆に副交感神経が優位に働くと、ムスカリン性アセチルコリン受容体の活性化により水分分泌を促進するため、サラサラな唾液が分泌される。このように、唾液のタンパク質成分と液体成分の分泌には興奮性の神経伝達物質を介した G タンパク質共役型受容体 (GPCR) のシグナリングが深く関与していることは明らかであるが、抑制性の神経伝達物質である γ -アミノ酪酸 (GABA) を介した GPCR のシグナリングについてはわかっていない。

GABA_B 受容体は遅延型の抑制性神経伝達を担うヘテロ二量体の GPCR で(図 1)、様々な神経伝達物質の神経終末からの放出を制御する機能も併せ持つ(引用)。

またこの受容体は心臓や腎臓を含む様々な末梢器官にも発現していることが明らかとなっている(引用)。唾液腺においても、これまでにその発現は報告されていたが(引用)、唾液腺に投射する末梢神経以外の細胞にも発現しているのか、そして唾液成分の修飾や唾液の粘度

図1



の調節に直接関わっているのかは明らかではなかった。そこで申請者は、唾液腺の GABA_B 受容体の研究に着手し、ラットの顎下腺と耳下腺に GABA_B 受容体が発現していることを確認した(図 1)。さらにラットの顎下腺の免疫染色では、唾液成分の修飾や唾液の輸送路を形成する導管上皮細胞と、腺体の周囲に存在し、収縮することで唾液分泌の補助を行う筋上皮細胞に高度に発現していることがわかった。唾液腺の GABA_B 受容体が、神経終末からの神経伝達物質の分泌を調節するだけでなく、唾液腺細胞からの唾液の分泌や成分の調整を行っている可能性が出てきた。GABA_B 受容体の作動薬であるバクロフェンは、副作用として唾液の分泌亢進が挙げられている。

このため、唾液腺細胞の GABA_B 受容体の機能を解明し、GABA_B 受容体を標的として唾液分泌を促進することができれば、ドライマウスの改善に繋がるのではないかと考え、本研究を提案することにした。

2. 研究の目的

GABA_B 受容体は昆虫の唾液腺からもクローニングされており(引用)、昆虫から哺乳類まで進化的に幅広く保存されていることがわかった。このため、唾液腺の GABA_B 受容体は生理的に重要な機能を持っていることが推測されるが、これまでにその機能を解析した研究は報告されていない。

本研究では、唾液腺細胞における GABA_B 受容体の細胞内局在とその機能を明らかにし、抑制性神経伝達を担う GPCR である GABA_B 受容体の、唾液分泌における役割を明確にする。さらに、シェーグレン症候群のモデルマウスであり 1 型糖尿病を発症する NOD マウスを用いて、唾液腺細胞の GABA_B 受容体がドライマウス改善の標的となるかどうかについても合わせて検証した。

(1) 培養唾液腺細胞株 (HSY) における GABA_B 受容体の発現の有無の検討を行う。

(2) ドライマウスを発症するシェーグレン症候群モデルマウスであり 1 型糖尿病を発症する NOD マウスを模して、高血糖状態の唾液腺細胞株における細胞の状態変化について調べる。

3. 研究の方法

(1) ウエスタンブロット

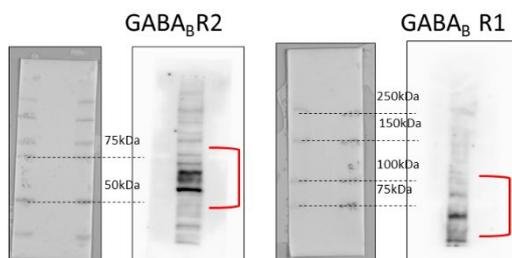
70-80%コンフルエントまで培養した HSY 細胞株を lysis buffer(0.1% SDS、50 mM NaF、1 mM

EDTA、20 mM Tris-HCl(pH 8.0)、150 mM NaCl、5 mM EDTA、1% Triton X-100、10 mM NaF、2 mM Na_3VO_4 、10 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ leupeptin、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Pepstatin A、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ antipain、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PMSF)を用いて溶解した。ソニケーション後、13500rpm、30min、4にて遠心を行った。上清を回収し適切な濃度に調節した後5×sample bufferを添加した。8%もしくは15% SDS-PAGEを用いて電気泳動を行い、ニトロセルロースメンブレンを用いて転写を行った。一次抗体に、DNA損傷のマーカーであるAnti-phospho-Histone H2A.X、細胞死(アポトーシス)のマーカーであるPML、p53、p21とGABA_B R1、GABA_B R2、また内在性コントロールとしてactinを用いて、4でo/nを行った。HRP標識二次抗体で室温1時間放置後、TBS-Tを用いて3回洗浄を行い、LAS-4000 miniを用いて検出した。

4. 研究成果

(1) 既存の培養唾液腺細胞株(HSY)におけるGABA_B受容体発現の有無について検討を行った。ウエスタンブロット法を用いてHSY細胞にGABA_B受容体(R1、R2)が発現していることを確認した。

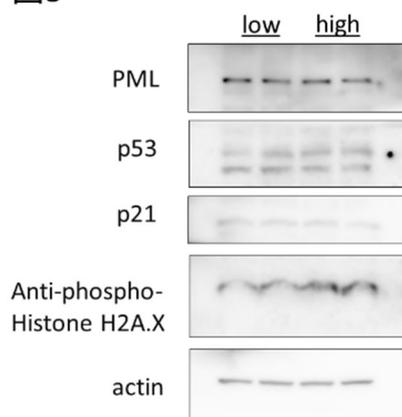
図2



(2) 同等の細胞数になるように調整後、播種したHSY細胞をlow glucose培地もしくはhigh glucose(高血糖)培地で9日間培養した。刺激後の両細胞を回収し、高血糖状態の持続が唾液腺細胞の細胞死(アポトーシス)を加速させるかどうかについてウエスタンブロット法を用いて検討を行った。その結果、アポトーシスの指標であるPML、p53、p21について発現変化は見られなかった。しかしhigh glucose培地ではDNA損傷の指標であるAnti-phospho-Histone H2A.X(引用)の発現増加が観察されたことから(図3) high glucose培地で細胞を培養し続けると、唾液腺細胞はDNA損傷を受けることが示唆された。近年、大脳皮質に発現するGABA_B受容体は加齢とともにその発現が減少することが報告されている(引用)。またNODマウスの症状である糖尿病やシェーグレン症候群では細胞の老化、細胞死やDNA損傷が増加していることが知られている。これらのことから、GABA_B受容体を発現する唾液腺細胞の細胞老化・アポトーシスの亢進が唾液腺の機能発現に寄与する可能性が示唆された。

今後はNODマウスと野生型マウスを用いてそれぞれの各唾液腺組織におけるGABA_B受容体の発現の増減とその局在を調べる。また、GABA_B受容体が唾液腺機能に与える影響を詳しく精査し、GABA_B受容体を発現する唾液腺細胞の特定を行うことで、唾液分泌シグナリングに与えるGABA_B受容体の役割について明らかにしたいと考えている。

図3



<引用文献>

Bettler B, et al. Molecular Structure and Physiological Functions of GABA(B)

Receptors. *Physiol Rev*, 2004.

M P Castelli, et al. Distribution of GABA(B) Receptor mRNAs in the Rat Brain and Peripheral Organs. *Life Sci*, 1999.

D A Schwarz, et al. Characterization of Gamma-Aminobutyric Acid Receptor GABAB(1e), a GABAB(1) Splice Variant Encoding a Truncated Receptor. *J Biol Chem*, 2000.

P J Lindsay and W R Kaufman. Potentiation of Salivary Fluid Secretion in Ixodid Ticks: A New Receptor System for Gamma-Aminobutyric Acid. *Can J Physiol Pharmacol*, 1986.

Hong KB, Park Y, Suh HJ. Sleep-promoting Effects of a GABA/5-HTP Mixture: Behavioral Changes and Neuromodulation in an Invertebrate Model. *Life Sci*, 2016.

Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, et al. DNA doublestranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem*, 1998.

Sedelnikova OA, et al. Quantitative detection of (125)IdU-induced DNA double-strand breaks with gamma-H2AX antibody. *Radiat Res*, 2002.

Joseph A McQuail, et al. GABA(B) Receptor GTP-binding Is Decreased in the Prefrontal Cortex but Not the Hippocampus of Aged Rats. *Neurobiol Aging*. 2012.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----