

平成 22 年 6 月 1 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2008～2009

課題番号：20890203

研究課題名（和文）唾液分泌能低下モデルの口腔機能解析

研究課題名（英文）A study on oral function of hyposalivation models

研究代表者

中本 哲自（NAKAMOTO TETSUJI）

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：30514989

研究成果の概要（和文）：

灌流腺組織を用いて唾液分泌を解析したところ、唾液分泌低下を引き起こす物理的因子としては低温および細胞外液を高張性にすることが明らかになった。受容体やイオン輸送担体を薬物で阻害することも分泌低下を引き起こす。しかしながら、同様の分泌低下であっても唾液中 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ および $\text{Cl}^-$ の濃度は障害を受ける部位により大きく異なることが明らかとなり、唾液腺機能障害の鑑別に唾液中イオン解析が一助となる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Fluid secretion in response to muscarinic agonists was analyzed using a mouse ex vivo submandibular perfusion technique. Lowering the temperature from the body temperature induced less salivation. Also, increasing the osmolarity in perfusion solution caused less fluid secretion. Pharmacological inhibition on channels, receptors and transporters crucial for fluid secretion also inhibited fluid secretion. Ion concentrations in secreted ex vivo saliva turned out their ion compositions were different among hyposalivation models. The results suggest that ion concentration analysis might work for identifying the target which causes hyposalivation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系補綴学

キーワード：唾液腺、口腔乾燥症、イオン、ムスカリン性レセプター、ピロカルピン、セビメリン

## 1. 研究開始当初の背景

唾液腺機能低下はシェーグレン症候群や薬剤の副作用など、高頻度に認められる疾患で、齶蝕の増加、口腔粘膜の易障害性、食塊形成の不全や嚥下障害、義歯不適合など口腔環境にさまざまな影響を及ぼす (*J. Dent.* 33, 223-233, 2005)。しかしながら、その治療法は対症療法が主であり、NIH のグループによる遺伝子導入治療や再生治療など新たな治療の可能性が模索されてはいるものの (*Periodontology* 2000, 41, 218-223, 2006)、臨床応用には隔たりがある。一方で過去 10 数年の間、さまざまな遺伝子改変マウスが作製され、唾液腺分泌に関わるチャネルやトランスポーターあるいはレセプターについて遺伝子、タンパクレベルの情報が蓄積されてきた。これまでの情報から、唾液腺分泌に主要な役割を果たすタンパクの例として、経上皮水輸送に関わるアキアポリン 5 (Aqp5)、腺房細胞での陰イオン蓄積に寄与する  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$  共輸送担体 (Nkcc1) およびタイプ 3 ムスカリン性レセプター (m3) などで、いずれも唾液分泌を 60%以上抑制していた (申請者ら未発表データ)。唾液分泌低下を招くモデルマウスのうち、Aqp5 では齶蝕についても検討され、その感受性が *Aqp5*<sup>-/-</sup> で高いことが報告された (*Caries Res.* 39, 448, 2005)。しかしながら、口腔内環境、たとえば歯周組織や軟組織については明らかにされていない。また、右図に示すように、Aqp5 が口腔内イオン環境の攪乱をきたしていたことから、これを口腔乾燥症モデルとして扱うことが妥当であるか議論の余地がある。すなわち、ある種の膜タンパクの発現を抑えることは分泌抑制だけでなく、同時にイオン環境の攪乱も誘発している。

## 2. 研究の目的

口腔乾燥症の生理学的背景を明らかにするとともにそれが口腔組織に及ぼす影響について明らかにし、口腔乾燥症の生物学的メカニズムを明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 灌流マウス顎下腺を用いた唾液腺分泌機能障害を起こす条件の検索：本研究が将来的に各種疾患モデルマウスの基本データの収集を前提としていたことから、マウス灌流顎下腺のトレーニングを行い、実験的

に汎用される副交感神経刺激薬である Carbachol と既に臨床応用されている Pilocarpine と Cevimeline, 以上 3 種の分泌刺激薬を用いて唾液分泌動態について検討した。分泌量のほかに、分泌された唾液中のイオン濃度 ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ), アミラーゼ量, タンパク量について分泌唾液ごとに検討した。

各種チャネルやトランスポーター類の阻害実験も行い分泌低下が起こる条件とそのときの唾液変化についても検討した。加えてどのような物理環境において分泌が低下したり、亢進したりするのかについても詳細に調べた。

(2) 細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  および  $\text{H}^+$  シグナリングの検討：コラゲナーゼ分散処理により得られた顎下腺細胞を用い、Fura-2 AM ( $\text{Ca}^{2+}$ ) または BCECF-AM (pH) により染色を行い蛍光顕微鏡下に Carbachol, Pilocarpine, Cevimeline 刺激に伴う細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  および  $\text{H}^+$  変化を Ratio Imaging により解析した。

## 4. 研究成果

(1) 37°C 灌流温度で Carbachol, Pilocarpine および Cevimeline による灌流顎下腺唾液分泌はそれぞれ特徴的な動態を示す。

実験的に使用される Carbachol では 0.05  $\mu\text{M}$  より唾液分泌が観察され、1  $\mu\text{M}$  程度で最大値を示したが、持続的な分泌を示す濃度は極めて範囲が狭く 0.3~0.5  $\mu\text{M}$  で定常的な分泌を観察できる。一方で臨床応用される Pilocarpine では、0.1-0.3  $\mu\text{M}$  辺りから分泌が観察され、持続的な分泌は 3-10  $\mu\text{M}$ , それ以上の濃度では刺激の初期に非常に早い分泌を認めるものの持続相の分泌が低下しやすい傾向を示した。同様に臨床応用されている Cevimeline では 1  $\mu\text{M}$  程度から分泌が観察され、30  $\mu\text{M}$  で最も安定した分泌を認めた。しかしながら、Carbachol や Pilocarpine が示す分泌動態と比較した場合、分泌刺激時の初期分泌が比較的緩やかであること、Cevimeline ではさらに高濃度にしても持続相の分泌低下はほとんど起こらない、という 2 点で大きく異なっていた。Carbachol, Pilocarpine および Cevimeline はムスカリン性刺激薬として括られるが、それらの分泌への影響については全く様相が異なることが明ら

かになった。

さらに分泌された唾液中のイオン濃度などの構成成分の解析から、Carbachol と Pilocarpine がほぼ同等の唾液分泌を起こしていることが明らかになったが、Cevimeline の唾液は唾液中の  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  濃度が低値を示す傾向を示した。

(2) 分泌低下を起こす要因として温度が重要な役割を果たす。

Carbachol, Pilocarpine および Cevimeline の持続的分泌が観察される濃度において、温度をさまざまに変化させて分泌動態を観察したところ、 $25^\circ\text{C}$  から  $37^\circ\text{C}$  にいたる温度上昇で Carbachol の分泌上昇が 2~3 倍であったのに対し、Pilocarpine では 5~6 倍、Cevimeline では 8~10 倍の上昇を示した。すなわち、臨床応用される薬剤では温度による反応性の上昇効果が高いことが明らかになり、これらの薬剤の使用法の一助となる有用な治験を得た。

さらに細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルを観察したところ、 $25^\circ\text{C}$ ,  $37^\circ\text{C}$  いずれの温度でも Carbachol, Pilocarpine および Cevimeline による  $\text{Ca}^{2+}$  上昇反応が認められたが、分泌速度に比較し、薬剤間の差が少ないことから、 $\text{Ca}^{2+}$  上昇反応の大きさは必ずしも分泌反応の大きさを反映しているわけではないことが示唆された。

(3) オスモル濃度コントロールによる分泌速度のコントロール

細胞外環境の物理的因子のコントロールとして細胞外液のオスモル濃度コントロールによる分泌への影響を灌流線組織を用い  $0.3\ \mu\text{M}$  Carbachol 刺激により調べたところ、細胞外液を低張性にコントロールすると 30% 低張性をピークとして分泌は上昇した。さらに低張性にすると分泌は減少する傾向を示した。一方で灌流液をスクロース添加により高張性にすると、オスモル濃度の上昇に伴い分泌は減少した。

分泌された唾液中のイオン濃度解析から低張性にした場合は、分泌唾液中のイオン濃度も灌流液に比例して低下していくのに対し、高張性に変化させた場合では  $\text{Na}^+$  の低下、 $\text{K}^+$  の上昇があるにも関わらず  $\text{Cl}^-$  についてはほとんど変化しないことが明らかになった。

(4) チャネルおよびトランスポーター類の分泌への影響

$\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-}2\text{Cl}^-$  共輸送担体の阻害薬である Bumetanide を用いて灌流線組織での分泌への影響を評価したところ、文献上に報告されているよりもかなり低濃度 ( $5\text{-}10\ \mu\text{M}$ ) で分泌が抑制されることが明らかとなった。その分泌された唾液中のイオン濃度は高張性にしたときの唾液とほぼ等量にも関わらず低  $\text{K}^+$  を示し、唾液中への  $\text{K}^+$  分泌にこの担体が関与している可能性が示唆された。

一方で導管細胞での  $\text{Na}^+$  再吸収に関与するとされる上皮型  $\text{Na}^+$  チャネルの阻害薬である Amiloride を用いたところ、唾液分泌量にはほとんど影響がないものの、分泌唾液中の  $\text{Na}^+$  濃度は低下していた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

中本哲自： 分泌機能を制御する  $\text{Cl}^-$  チャネル: Transmembrane Protein 16A/ Anoctamin 1, 九州歯科学会雑誌 査読なし 63: 133-137, 2009.

[学会発表] (計 12 件)

- ① 中本哲自, 近藤祐介, Jennifer Scantlin, Mark Wagner, James E. Melvin, 細川隆司: マウス顎下腺陰イオン分泌における  $\text{HCO}_3^-$  の役割 -  $\text{Nkcc1}^{-/-}$  における唾液分泌の検証 -, 第68回九州歯科学会総会, 2008/5/31, 北九州
- ② 中本哲自, Jennifer Scantlin, Mark Wagner, James E. Melvin, 細川隆司: マウス灌流顎下腺の温度依存性分泌増強効果, 第68回九州歯科学会総会, 2008/5/31, 北九州
- ③ 中本哲自, 近藤祐介, 城所愛美, 向坊太郎, 正木千尋, 細川隆司: マウス顎下腺唾液イオン解析による機能評価, 平成20年度(社)日本補綴歯科学会九州・中国・四国支部合同学術大会, 2008/8/30-31, 別府
- ④ Nakamoto, T., Hosokawa, R., Melvin J. E. :

Agonist induced Fluid Secretion from Mouse Submandibular gland is Temperature Dependent, 日中歯科医学会大会 2008, 2008/9/28-29, Xian CHINA

- ⑤ 城所愛美, 近藤祐介, 向坊太郎, 正木千尋, 中本哲自, 細川隆司: 低出力パルス超音波が唾液腺分泌に及ぼす影響, 第6回歯科物理刺激研究会, 2009/03/28, 北九州
- ⑥ Kondo, Y., Nakamoto, T., Kidokoro, M., Mukaibou, T., Masaki, C., Hosokawa, R.: Cevimeline induced salivation from perfused mouse submandibular glands, 87th General Session & Exhibition of the IADR, 2009/04/02, Miami, USA
- ⑦ Nakamoto, T., Brown, D. A., Catalan, M. A., Gonzalez-Begne, M., Romanenko, V. G., Melvin, J. E.: Purinergic P2X<sub>7</sub> receptors mediate ATP-induced saliva secretion by the mouse submandibular gland, 第11回 外分泌腺国際シンポジウム, 徳島09, 2009/7/23-25, Tokushima
- ⑧ Kondo, Y. Nakamoto, T. Kidokoro, M. Mukaibo, T. Masaki, C. Hosokawa, R.: Cevimeline and Pilocarpine induced salivation from perfused mouse submandibular gland, 第11回 外分泌腺国際シンポジウム, 徳島09, 2009/7/23-25, Tokushima
- ⑨ Kidokoro, M. Nakamoto, T. Kondo, Y. Mukaibo, T. Masaki, C. Hosokawa, R.: Fluid secretion and osmotic effect in mouse submandibular gland, 第11回 外分泌腺国際シンポジウム, 徳島09, 2009/7/23-25, Tokushima
- ⑩ Mukaibo, T. Nakamoto, T. Kondo, Y. Kidokoro, M. Masaki, C. Hosokawa, R.: The relationship between fluid secretion and temperature. 第11回 外分泌腺国際シンポジウム, 徳島09, 2009/7/23-25, Tokushima
- ⑪ Mukaibo, T. Nakamoto, T. Kondo, Y. Kidokoro, M. Masaki, C. Hosokawa, R.: The relationship between fluid secretion and temperature., 第57回 JADR 学術大会, 2nd Meeting of IADR Pan Asian Pacific Federation (PAPF), 1st

Meeting of the IADR Asia/Pacific Region (APR), 2009 /9 /22 ~ 24 ,武漢 中国

- ⑫ 城所愛美, 近藤祐介, 向坊太郎, 中本哲自, 細川隆司: 低出力パルス超音波が唾液腺分泌に及ぼす影響, 第39回 (社) 日本口腔インプラント学会・学術大会, 第29回 (社) 日本口腔インプラント学会中国・四国支部総会・学術大会併催, 2009/9/25-27, 大阪

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中本 哲自 (NAKAMOTO TETSUJI)  
九州歯科大学・歯学部・助教  
研究者番号: 30514989

### 研究協力者

近藤 祐介 (KONDO YUSUKE)  
九州歯科大学・歯学部・大学院生

城所 愛美 (KIDOKORO MANAMI)  
九州歯科大学・歯学部・大学院生

向坊 太郎 (MUKAIBOU TARO)  
九州歯科大学・歯学部・大学院生