

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 22 日現在

機関番号：32705

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592542

研究課題名（和文） 長期の交感神経刺激が及ぼす唾液分泌低下の機序解明とヒューマンセンシングへの応用

研究課題名（英文） Clarify the mechanism of reduction in the secretion of saliva on chronic sympathetic stimulation and these applications to human sensing

研究代表者

吉野 陽子 (Yoshino Yoko)

鎌倉女子大学・家政学部・講師

研究者番号：70298248

研究成果の概要（和文）：

慢性ストレスによる唾液分泌低下のメカニズムを明らかにするために、 α_1 アドレナリン受容体アゴニストのフェニレフリン（PHE）をマウスに長期投与する系を考案した。PHEマウスでは、唾液カリクレイン活性の有意な低下がみられた。また、プロテオーム解析により、顎下腺においてカリクレイン 22 (mk22) とレニン 2 (Ren2) の減少が認められたが、mRNA の発現量には差がみられなかった。一方、extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2) のリン酸化が耳下腺では上昇していたのに対して、顎下腺では有意に低下していた。これには、細胞内の Ca^{2+} 濃度上昇の低下が起因している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We generated experimental system to clarify the mechanism of reduction in the secretion of saliva on chronic stress by administration of phenylephrine (α_1 adrenergic receptor agonist) to mice. The salivary kallikrein activity in the PHE was significantly lower than that in the CTL. However analysis by proteomic suggested that amount of mk22 and Ren2 was decreased in the PHE, there was no significant difference in the expression of mRNA. On the other hand, the phosphorylation of ERK1/2 was increased in parotid gland, whereas it was decreased in submandibular gland. These results can be attributed to decrease of elevation of intracellular Ca^{2+} .

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系歯学

キーワード：ストレス、唾液分泌、カリクレイン、ERK1/2、細胞内 Ca^{2+} 濃度

1. 研究開始当初の背景

(1) ドライマウス患者は増加傾向にあり、抑うつ状態やストレスによる口腔乾燥が多くを占めているが、メカニズムについては不明

な点が多い。

(2) 食事制限下の運動負荷マウスにおいて、唾液タンパクの変化、特にカリクレイン活性が減少することが特徴であり、酸化ストレス

の関与が示唆された。これらは、慢性ストレスによるものと考えられた。

(3) 長期のフェニレフリン投与 (α_1 アドレナリン受容体アゴニスト) により、唾液カリクレイン活性の低下が生じることが動物実験において報告されている。

2. 研究の目的

(1) ドライマウスの臨床で問題となるのは、慢性ストレスによる唾液分泌機能への対処である。

(2) 本研究は、慢性ストレスにおける唾液分泌低下のメカニズムの解明を目的とした。

(3) すなわち、慢性ストレスによって交感神経が持続的に刺激を受けた結果、唾液分泌はどのように抑制されるのかを、これまでの研究を発展させて検討する。

3. 研究の方法

慢性ストレスのモデルとして α_1 アドレナリン受容体アゴニストのフェニレフリンをマウスに長期投与する系を考案し、唾液腺機能を検討した。

(1) 13 週齢の ICR 雄マウスを用い、コントロール群 (CTL) には生理食塩水を、フェニレフリン群 (PHE) には PHE (5mg/kg) を 1 日 2 回、5 日間筋注により投与した。6 日目にネブタール麻酔下で、腹腔よりピロカルピン刺激 (i.p.; 0.5mg/kg) 後、分泌唾液を口腔内よりマイクロピペットにて 20 分間採取した。採取後の重量を測定し、唾液分泌量とした。追加麻酔をした後、耳下腺と顎下腺を摘出した。

(2) 唾液成分の分析は、タンパク濃度、アミラーゼ活性、およびカリクレイン活性を測定した。

タンパク濃度は、bovine serum albumin をスタンダードとして Pierce BCA Protein Assay Kit (Pierce Biotechnology, IL, USA) を用いて測定した。

アミラーゼ活性は、Caraway 法 (Caraway, 1959) によるアミラーゼテストワコー (Wako pure Chemical Ind.; Osaka, Japan) を用いて測定した。

カリクレイン活性は、Forgaca らの方法により基質として

H-D-Val-Leu-Arg-paranitroanilide (Sigma, MO, USA) を用いた。0.4M Tris-HCl を 40 μ l 添加した後、等量の唾液を加えて 37 $^{\circ}$ C で 5 分間加温した。405nm にて吸光値を測定し、これをブランクとした。その後、2mg/ml の基質を 10 μ l ずつ添加し、5 分間ごとに 30 分間にわたり吸光値を測定した。1 分間当たりの勾配を算出した。これらの値からアプロチニン添加後の値を引き、カリクレイン活性値とした。

(3) 二次元電気泳動法

顎下腺組織は、Lysis buffer (4% (w/v) CHAPS, 8 M urea, 40mM Tris base, pH 8.5) 中でポリトロン(kinematica AG, Switzerland)を用いてホモジナイズし、細胞溶解液とした。12,000 \times g で 15 分間遠心し、上清を回収した。このサンプルのタンパク濃度を bovine serum albumin をスタンダードとして、Pierce BCA Protein Assay Kit (Pierce Biotechnology, IL, USA)を用いて測定した。

一次元目および二次元目電気泳動の全ての操作は Ettan IPGphor 3 マニュアルに従い、水中で斜光下にて行った。

一次元目電気泳動は、サンプルを Cy3 と Cy5 で標識し、10mM のリジンを加えた。Cy-dye で標識したサンプルを rehydration buffer (8M Urea, 2M Thiourea, 2% Chaps, 2.8mg/ml Dithiothreitol (DTT), 0.5% pH 3-10 pharmalyte, bromophenol blue) に混和し、IPG ストリップホルダーに注入した。pH 3-10, 7cm の Immobline DryStrip を用いて Ettan IPG phor IEF system に従って泳動した。一次元目電気泳動終了後、Immobline DryStrip は平衡化元バッファー (6M Urea, 50mM Tris (pH 8.8), 30% Glycerol, 2% SDS and 10mg/ml DTT) 中で 15 分間インキュベートした。

二次元目電気泳動は、12.5%のアクリルアミドゲルを用いて 20mA で 90 分間泳動した。Cy3 と Cy5 は、各々 532nm と 633nm レーザー、ならびに 580nm と 670nm 帯域フィルターにより 9400 Typhoon scanner (GE Health care) を用いてスキャンした。

タンパク質を分離した後、2 群間で差異のみられたスポットを検出し、プロテオーム解析 (AXIMA-Performance (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan)) により同定した。

(4) 定量 RT-PCR

顎下腺組織中の RNA は、High Pure RNA Tissue Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) を用いて抽出した。RNA の定量と定性は、吸光度計による測定とアガロース電気泳動法により行った。プライマー配列は以下の通りである。

(5'TGGAACAGTACTACGATCCG3'(forward), 5'CTGGGTTGAGCAAAGTTCAC3'(reverse))

定量 PCR は SYBR Green fluorescence を用いて Lightcycler system (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) により測定した。総容量を 20 μ l とし、キャピラリーに分注して測定した。試薬は、Fast Start SYBR Green Master (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) の混合液を 10 μ l 添加した。プライマーは終濃度が 300nM になるように添加した。組織から抽出した RNA 量 1mg は cDNA に合成した。これを希釈し、7.6 μ l ずつキャピラリーに添加した。プロトコ

ールは、95°Cで15秒、55°Cで30秒(変性)、72°Cで30秒(アニーリング)、84°Cで2秒(伸長)として測定した。

(5) ERK1/2 のリン酸化

顎下腺組織は、細胞溶解液(1M Tris-HCl, 1% chaps, protease inhibitor) 中でポリトロン(Kinematica AG, Switzerland)を用いて抽出し、12,000×gで15分間遠心後、上清を回収した。このサンプルのタンパク濃度を bovine serum albumin をスタンダードとして、Pierce BCA Protein Assay Kit (Pierce Biotechnology, IL, USA)を用いて測定した。タンパク濃度 10 µg/ml に調整したサンプルを 12.5% SDS ポリアクリルアミドゲルを用いて 50 mA で 30 分間泳動した。50 V で 70 分間 PVDF 膜 (GE Healthcare UK Ltd, England) に転写した。0.1% PBS-Tween で洗浄後、ブロッキング溶液 (Blocking agent; GE Healthcare UK Ltd, England) にて 30 分間ブロッキングし、0.1% PBS-Tween で 20 分間洗浄した。一次抗体は、p44/42 MAPK (Erk1/2) antibody (1 : 500 ; Cell Signaling Technology, Inc.)ならびに Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) XP TM Rabbit mAb (1 : 500 ; Cell Signaling Technology, Inc)を用いて 4 °C で一晩インキュベートした。メンブレインを 20 分間洗浄後、二次抗体は Alkaline Phosphatase (AP) – Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) (1 : 500; Zymed, S. San Francisco, California, USA) を用いて 30 分間室温にて振盪しながらインキュベートした。その後、20 分間洗浄後 nitro-blur tetrazolium chloride/5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (NBT/BCIP, Sigma, MO, USA) を含む基質で発色させた。タンパクの発現量は、リン酸化された p44/42 を内在化 p44/42 で除した値を算出し、リン酸化の程度を検討した。

(6) 顎下腺細胞内の Ca²⁺濃度の上昇

顎下腺は、はさみとかみそりでミンスし、0.5% BSA-BSS を 4ml 添加後に静置し、上清を吸引した。4.5ml のコラゲナーゼ Type II (Worthington, Freehold, NJ, USA) を加えて 37 °C で 10 分間振盪しながら加温した。20 回ピペッティングした後、再度加温した。再度 20 回ピペッティングした後、8 層ベール (ナイロンメッシュ) にて濾過し、4% BSA-BSS 10ml の上に重層させた。これを 100 × g で 3 分間遠心し、上清を回収した。0.5% BSA-BSS を加えて懸濁し、100 × g で 2 分間遠心後、上清を回収した。0.5% BSA-BSS を加えて懸濁後、細胞数を計測し、1×10⁶ cell/ml になるように調整した。この細胞浮遊液を fura2-AM (同仁化学) で標識した後、カルバコール刺激 (30 µM) による細胞内 Ca²⁺濃度の上昇を CAF-110 (日本分光社製) を用いて測定した。

4. 研究成果

(1) 唾液成分の変化

唾液分泌量、アミラーゼ活性は変化がみられなかった。一方、タンパク濃度は CTL 群 (1341.1±168.4 µg/ml) に比べて PHE 群では有意に上昇した

(6mg; 1749.7±294.8 µg/ml, 10mg; 1963.4±616.6 µg/ml, p<0.05) (図 1)。一方、カリクレイン活性では有意に低下した (CTL; 1.03±0.3 µM/min, PHE; 0.64±0.34 µM/min, p<0.05) (図 2)。

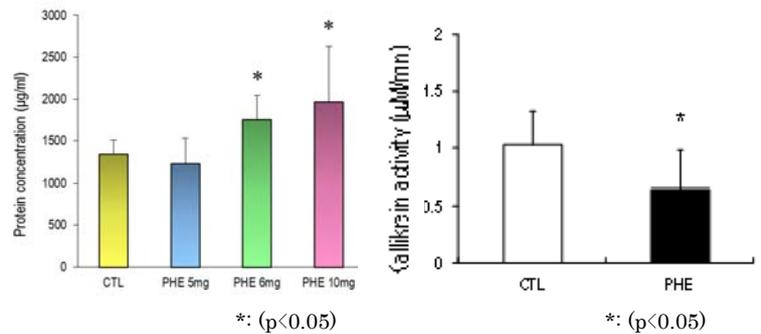


図 1. 長期 PHE 刺激による唾液タンパク濃度の上昇

図 2. 長期 PHE 刺激による唾液カリクレイン活性の低下

(2) 二次元電気泳動によるプロファイルの解析

二次元電気泳動により 2 群間で差異のみられたタンパクを調べ、プロテオーム解析により同定した。その結果、カリクレイン 22 (mk22) とレニン 2 (Ren2) が PHE マウス顎下腺で減少していた (図 3)。

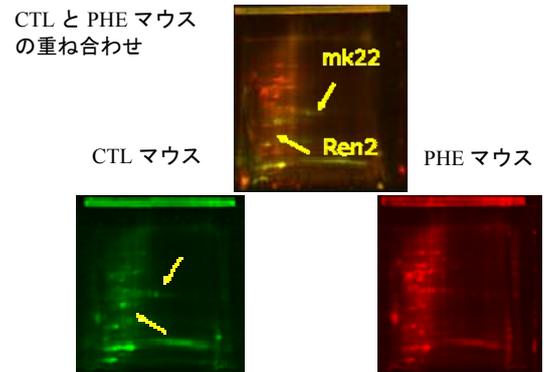


図 3. PHE と CTL マウスの顎下腺におけるタンパク発現量の差異

(3) 定量 RT-PCR による顎下腺組織中の mk22 と Ren2 の mRNA の発現量

PHE マウスの顎下腺では mk22 と Ren2 のタンパクが減少していたことから、mRNA 発現量に差がみられるかどうかについて調べた。その結果、CTL 群と PHE 群との間には有意な差が認められなかった (図 4)。

これらのことから、PHE マウス顎下腺における mk22 と Ren2 のタンパク合成能は低下し

ていないことが示唆された。

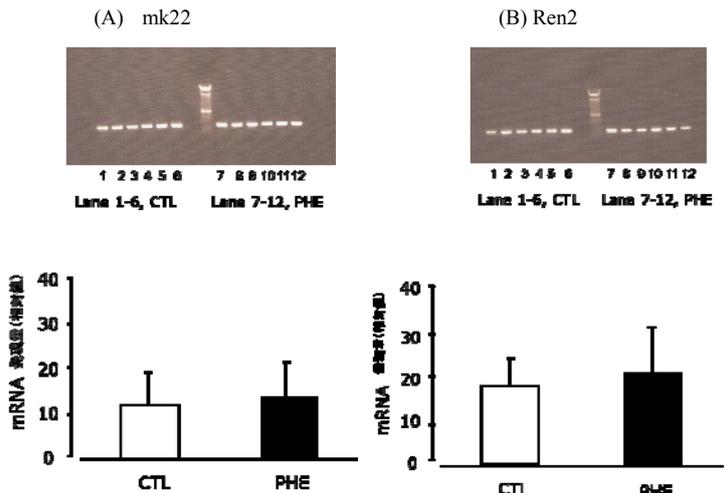


図4. 顎下腺における mk22 と Ren2 の mRNA の発現量

(4) 顎下腺における ERK1/2 のリン酸化
顎下腺における mk22 と Ren2 の mRNA 発現量に差がみられなかったことから、カリクレイン分泌の抑制が、シグナル伝達経路のどの過程で起こっているのかを調べた。

Extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2) は Mitogen-activated protein kinase ((MAPK)ファミリーに属し、細胞増殖などを媒介するリン酸化酵素である。

近年、ERK1/2 は顎下腺においてムチンなどのタンパク分泌を調節していることが分かってきた。そこで、顎下腺の ERK1/2 のリン酸化が PHE 群では低下していないかどうかについて調べた。

その結果、耳下腺では CTL 群が $0.14 \pm 0.08\%$ であるのに対して、PHE 群では $0.34 \pm 0.21\%$ であり、有意に増大していた ($p < 0.01$)。一方、顎下腺では有意に低下していた

(CTL; $0.74 \pm 0.4\%$, PHE; $0.17 \pm 0.06\%$, $p < 0.01$) (図 5)。

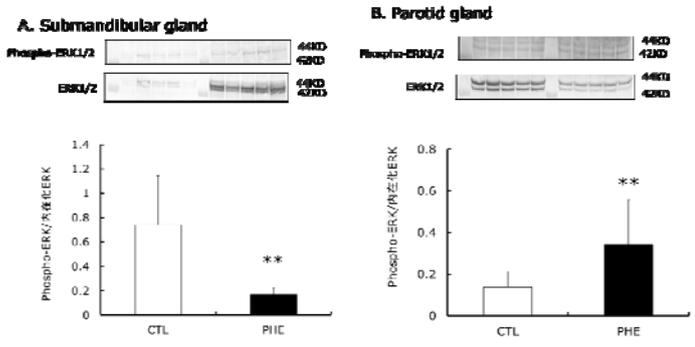


図 5. ERK1/2 リン酸化におけるタンパクの発現量

(5) 顎下腺細胞内の Ca^{2+} 濃度の上昇
顎下腺細胞内の Ca^{2+} 濃度上昇による ERK1/2 の活性化と PKC の活性化は、アミラ

ーゼなどのタンパク分泌を促進させるプロモーターであることが報告されている。

そこで、カリクレイン分泌抑制のメカニズムを知るために、長期 PHE マウスの顎下腺細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が CTL マウスに比べて低下しているか否かについて調べた。

その結果、CTL 群では Ratio (蛍光強度比) が 1.45 であるのに対して、PHE 群では 1.25 であり、有意に低下していた ($p < 0.01$)。

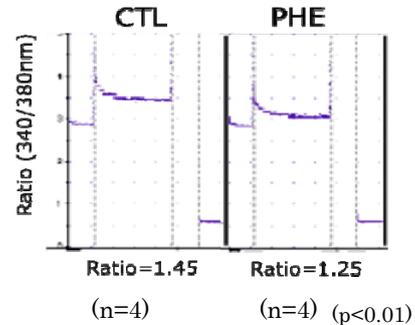


図 6. カルバコールによる顎下腺細胞内の Ca^{2+} 濃度上昇

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

① Shigeo Yamachika, Ken Yamamoto, Yoshiaki Nomura, Hiroyuki Yamada, Ichiro Saito Yoichi Nakagawa:

Clinical factors influencing the resting and stimulated salivary flow *Open Journal of Stomatology* 2012.6 (査読あり)

② 鴨井美帆、今村武浩、山本 健、岡本真理子、高橋実里、園田華子、西岡千賀子、門松伸一、山近重生、斎藤一郎、中川洋一: スルピリドの効果からみた口腔乾燥症の病態～Burning Mouth Syndrome と抑うつとの関与について～*歯薬療法* 30(3): 85-91, 2011 (査読なし)

③ Yoshino, Y., Nakagawa, Y.: Salivary 8-OHdG Induction by Physical Exercise Training Under Food Restriction. *The Open Dentistry Journal*, 5, 48-51 2011 (査読あり)

④ 中川洋一、岡本真理子、鴨井美帆、斎藤一郎: ドライマウスへの対処. *日本歯科評論* 71 (4): 137-144 2011 (査読あり)

⑤ 中川洋一: 口腔乾燥を訴える患者の診察・検査とその対応. *日本歯科医師会雑誌* 64(3):37-45 2011 (査読なし)

⑥ Nakagawa, Y.: Management of dry mouth in Sjögren's syndrome. *Japanese Dental Science Review* 47(2): 115-123 2011 (査読あり)

⑦ 中川洋一、吉野陽子、ドライマウス(1) 口が乾くのはなぜだろう? *臨床栄養* 117(2):106-7,2010 (査読なし)

⑧ 中川洋一、吉野陽子、ドライマウス(2) 検査・診断と対処法 **臨床栄養** 117(2):106-7,2010 (査読なし)

⑨ Yoshino Y, Yamane A, Suzuki M, Nakagawa Y: Availability of saliva for the assessment of alterations in the autonomic nervous system caused by physical exercise training. **Arch Oral Biol** 54(11): 977-985, 2009 (査読あり)

[著書・総説] (計4件)

① 渡邊早苗、宮崎由子、吉野陽子、(編著) これからの応用栄養学演習・実習-栄養ケアプランと食事計画・供食-、朝倉書店、東京、2012年4月1日刊行

② 五明紀春、渡邊早苗、山田哲雄、吉野陽子 (編著) : スタンダード人間栄養学・応用栄養学、朝倉書店、東京、2010年9月15日出版

③ 中川洋一 (編著) : 「ドライアイ&ドライマウス」永末書店、京都、2009年5月21日発行

④ 中川洋一 (分担執筆) : 高齢者・要介護者の口腔ケア～口腔乾燥症、舌痛症、口腔癌～、口腔保険推進ハンドブック、医歯薬出版、東京、2009年9月20日発行 (98-99頁)

[学会発表] (計5件)

① 吉野陽子、今村武浩、山近重生、井上裕子、齋藤一郎、前田伸子、中川洋一 : 長期フェニレフリン刺激によるカリクレイン分泌の抑制と顎下腺細胞内 Ca^{2+} 濃度の関与 第66回日本口腔科学学術集会 (広島) 平成24年5月

② 今村武浩、吉野陽子、山近重生、井上裕子、齋藤一郎、前田伸子、中川洋一 : コリン作動薬で誘導される唾液分泌のアドレナリン作動薬を介した抑制 第66回日本口腔科学学術集会 (広島) 平成24年5月

③ 吉野陽子、今村武浩、山近重生、前田伸子、中川洋一 : 長期フェニレフリン刺激によるタンパクとカリクレイン分泌の抑制機構 第65回日本口腔科学学術集会 (東京) 平成23年4月

④ 今村武浩、吉野陽子、山本健、山近重生、齋藤一郎、中川洋一 : ドライマウス患者における唾液分泌量とムチン濃度の比較 第55回日本口腔外科学会学術集会 (千葉) 平成22年10月

⑤ 吉野陽子、中川洋一、山近重生、今村武浩、浅田洗一 : 食餌制限下での運動負荷が及ぼすマウス唾液中の酸化ストレスマーカー8-OHdG濃度の変化 第20回日本口腔粘膜学会学術集会 (神奈川) 平成21年7月

[図書] (計 件)

[産業財産権]
○出願状況 (計 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◇件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
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

吉野 陽子 (Yoshino Yoko)
鎌倉女子大学・家政学部・講師
研究者番号 : 70298248

(2) 研究分担者

中川洋一 (Nakagawa Yoichi)
鶴見大学・歯学部・講師
研究者番号 : 90148057

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :