

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：14101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659943

研究課題名(和文) PDEの唾液タンパク質促進による誤嚥性肺炎の新しい治療方法の開発

研究課題名(英文) Development of new therapeutic method of aspiration pneumonitis on saliva protein promoting by PDE

研究代表者

村田 琢(MURATA, TAKU)

三重大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：80242965

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：誤嚥性肺炎の原因は口腔内細菌などである唾液タンパク質は口腔内細菌を減少させるなどの働きがある。その合成や分泌はcAMPにより調節され、cAMPはphosphodiesterase (PDE)で制御されている。ラット顎下腺ではほとんどがPDE3とPDE4で、腺房細胞群ではPDE3を確認したが、導管細胞では確認できなかった。両群に筋上皮細胞が存在した。PDE3Bノックアウトマウスの顎下腺には特に変化を認めなかった。顎下腺にPDE4A、PDE7B等も認めた。唾液タンパク質合成や分泌を別々のPDEが調整している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Causes of aspiration pneumonitis are oral bacteria et al. Saliva proteins reduce oral bacteria et al, and those expression and secretion are regulated by cAMP, and cAMP are controlled by phosphodiesterase (PDE). In rat submandibular gland main PDEs are PDE3 and PDE4. In isolated rat submandibular acini cells PDE3 was expressed, but not in duct cells. Myoepithelial cells were found in both cells. There were no change in submandibular gland of PDE3 knock out mouse. PDE4A and PDE7B were expressed in submandibular gland. It is suggested that each PDE regulated the expression and secretion of saliva protein.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：唾液腺 誤嚥性肺炎

1. 研究開始当初の背景

脳梗塞治療薬であるphosphodiesterase (PDE)3特異的阻害剤が脳梗塞後の誤嚥性肺炎の発症率を下げるということがいくつか報告されたが(J. Am. Geriatr. Soc. 2001, 2003など)、PDE3と誤嚥性肺炎との関係は不明であった。PDEの研究を行ってきたわれわれは唾液腺ではcAMPが唾液タンパク質合成・分泌を制御しているの、『cAMPの分解酵素で、11種類(PDE1-PDE11)により構成されているファミリーの1つであるPDE3の特異的阻害剤が、唾液腺細胞のPDE3を抑制することによりcAMP濃度が上昇し、唾液タンパク質合成・分泌を促進する。その結果、食塊形成を容易にすると共に口腔内細菌を減少させ、誤嚥性肺炎の発症率を下げる。』と仮説した。そこで、ラット顎下腺分離細胞でPDE3を検討したところ、腺房細胞でPDE3がmucinの前駆体であるapomucin発現に関係することを発見した(Arch. Oral Biol. 2006)。しかし、アクアポリン5などの発現には関係がなく、Nature Review等で報告されている『細胞内に局在しているそれぞれのPDEが特定の刺激によるcAMPシグナル伝達を細胞内局所に封じ込め (compartmentalization)、他の刺激由来のcAMPシグナルを分離している。』という理論が唾液腺にも当てはまることが考えられた。

2. 研究の目的

唾液タンパク質は食塊形成を容易にし、口腔内細菌を減少させる働きがある。そこで、本研究ではPDEシグナルにより唾液タンパク質合成・分泌を制御し、誤嚥性肺炎の新しい予防や治療方法を確立するための道を切り開くことが目的である。

3. 研究の方法

(1)PDE 活性測定

唾液腺を摘出後 PBS(-)洗浄し、PDE 測定用 buffer を加えホモジナイザーでホモジナイズした。

各 PDE に対する specific inhibitor、あるいは、activator 等を使用し、各 PDE 活性を測定した。

(2)RT-PCR による PDE 発現

唾液腺を摘出後 PBS(-)洗浄し、すぐにドライアイスで凍結した。その後、唾液腺から total RNA を抽出した。

total RNA 濃度の測定を行った。

reverse transcriptase にて total RNA より cDNA を作成した。

サーマルサイクラーを使用して PCR を行った。

電気泳動後、サイバークリーンで染色し、バンドを確認した。

(3)分離細胞作成

唾液腺を摘出後 PBS(-)洗浄し、分離細胞作成用 buffer 内で唾液腺を細切した。

コラゲナーゼ等を加え、シェイカーでシェイクした。

上記の処理した細胞を percoll 中で遠心により腺房細胞と導管細胞に分離した。

形態学的な分離の確認は、最初に、倒立型顕微鏡で腺房細胞と導管細胞を観察した。この段階で分離が確認できたので、ホルマリン固定後パラフィン封埋し、切片後、ヘマトキシリン-エオジン染色を行い観察した。

形態学的に分離が確認できたので腺房細胞マーカーのアミラーゼ活性と導管細胞マーカーのカリクレイン活性を測定し、分離を確認した。

(4)分離細胞での筋上皮細胞の確認

上記方法で分離した腺房細胞と導管細胞を筋上皮細胞のマーカーである α -SME の免疫染色で確認した。

腺房細胞と導管細胞で筋上皮細胞のマーカーである α -SMA を RT-PCR で確認した。

(5)PDE3 ノックアウトマウスでの検討

PDE3 ノックアウトマウスは海外共同研究者である米国国立衛生研究所 (National Institutes of Health (NIH)) で作成された。

そして、顕微鏡的観察と電顕的観察用の標本も NIH で作成された。

(6)リアルタイム PCR による PDE 発現

唾液腺を摘出後 PBS(-) 洗浄し、すぐにドライアイスで凍結した。その後、唾液腺から total RNA を抽出した。

total RNA 濃度の測定を行った。

reverse transcriptase にて total RNA より cDNA を作成した。

リアルタイム PCR にてそれぞれの PDE 発現を確認した。

4. 研究成果

(1)唾液腺での PDE 活性

ラット顎下腺では、ほとんどの PDE 活性が PDE3 活性と PDE4 活性であった。

しかし、舌下腺では PDE3 活性は非常に低く、顎下腺とは異なる機能が示唆された。

(2)RT-PCR による PDE3 発現

ラット顎下腺では活性の結果と同様に PDE3A と PDE3B 発現を認めた。

しかし、ラット舌下腺では、PDE3A と PDE3B 発現を共に認めなかった。このことより、ラット舌下腺では PDE3A や PDE3B 関連の機能はないと考えられた。

(3)分離細胞での PDE3 発現

ラット顎下腺腺房細胞では PDE3 活性、および、PDE3A 発現を認めたが、PDE3B 発現を認めなかった。

ラット顎下腺導管細胞では、PDE3 活性はほとんどなく、PDE3A と PDE3B 発現を認めなかった。

(4) 分離細胞での筋上皮細胞の確認

筋上皮細胞のマーカーである α -SMA の免疫染色で確認したところ、腺房細胞と導管細胞の両方に染色された細胞を認めた。

筋上皮細胞のマーカーである α -SME 発現を確認したところ、腺房細胞と導管細胞の両方で発現を認めた。このことより、筋上皮細胞は腺房細胞と導管細胞の両方に存在することが示唆された。

(5)PDE3 ノックアウトマウスでの検討

PDE3 ノックアウトマウスと野生型マウスを検討したところ唾液腺組織の形態学的変化は認めなかった。

また、唾液分泌に関係する分泌顆粒にも PDE3 ノックアウトマウスと野生型マウスで変化はなかった。

(6)リアルタイム PCR による PDE 発現

PDE ファミリーは 11 種類 (PDE1 から PDE11) よりなり、更に、それぞれに対して 1 種類から 4 種類のアイソザイム (A から D) が存在する。最近、各 PDE アイソザイムは細胞内局在を決定する A-kinase anchoring protein と結合して細胞内で局在し、機能することが報告されている。そのため、細胞全体として活性が高かった PDE 以外にも、低くても重要な役割を示す PDE アイソザイムの可能性が示唆されている。そこで各 PDE アイソザイム発現についてリアルタイム PCR で行い、発現が少ないのか、ないのかを検討した。

表 1. ラット顎下腺での PDE 発現

	発現量
PDE1A	-
PDE1B	-
PDE1C	-
PDE2A	-

PDE3A	+++
PDE3B	-
PDE4A	++
PDE4B	-
PDE4C	-
PDE4D	-
PDE7A	-
PDE7B	++
PDE8A	++
PDE8B	-
PDE10A	-
PDE11A	-

高発現(+++), 中発現(++), 発現なし(-)

PDE5A, PDE6A, PDE6B, PDE6C, および, PDE9A は cGMP 特異的であるのでアイソザイムの発現の検討は行わなかった。

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0件)

[学会発表](計1件)

関田 素子、清水 香澄、村田 琢、田川 俊郎他、Expression of phosphodiesterase3 in isolated rat submandibular cells、日中歯科医学大会、2012年4月26-28日、錦江賓館(中国・成都市)

[図書](計0件)

[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：
 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

村田 琢 (MURATA Taku)
 三重大学・医学部附属病院・講師
 研究者番号：80242965

(2)研究分担者

田川 俊郎 (TAGAWA Toshio)
 三重大学・医学(系)研究科(研究院)・
 名誉教授
 研究者番号：30046346

清水香澄 (SHIMIZU Kasumi)
 三重大学・医学部附属病院・助教
 研究者番号：20378368

(3)連携研究者

()
 研究者番号：