

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：33602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293397

研究課題名(和文)メカノバイオロジーと分子医学を基軸とした口腔乾燥症の新規治療戦略

研究課題名(英文)A new treatment strategy of xerostomia based on mechano-biology and molecular medicine

研究代表者

中本 哲自(Nakamoto, Tetsuji)

松本歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：30514989

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：唾液腺機能におけるメカノバイオロジーの検索として、低浸透圧環境下における唾液腺反応を解析した。低浸透圧環境下では唾液腺の分泌機能が亢進しており、その要因として腺房細胞の基底膜上の輸送担体の機能的活性化が起こっていることが明らかになった。一方で腺房細胞の腺腔側の陰イオンチャネルはタンニン酸を含む物質により阻害され、その結果として分泌低下が起こることが判明した。輸送担体の活性化という新たな分泌機能回復の視点が提示された。

研究成果の概要(英文)：We analyzed fluid secretion from salivary gland under hypotonic condition to investigate mechanobiology. Saliva secretion was increased under hypotonic condition due to functional upregulation of ion transporter located in basolateral membrane of acinar cells. On the other hand, anion channel in apical membrane was inhibited by tannic acid and substances containing it. As a result, fluid secretion was decreased. For the recovery of the function of fluid secretion, the activation of ion transporters might become a new tool.

研究分野：医歯薬学

キーワード：唾液腺 口腔乾燥症 イオン輸送担体 低浸透圧 タンニン酸

1. 研究開始当初の背景

ドライマウスは唾液腺の機能障害により引き起こされるが、詳細な発症機構は不明な点が多い。腺組織から体腔へと放出される液体は常に低張性でそれを制御するのは細胞膜を介した陰イオンの移動である。中でも塩素イオン (Cl^-) は主要な役割を担い (Melvin-JE, Crit Rev Oral Biol Med. 1999)、その移動は TMEM16A/Ano1 と命名された陰イオンチャネル (Yang-YD et al., Nature, 2008; Schroeder-BC et al., Cell, 2008) により腺細胞より放出される。しかしながら、一般の体細胞における細胞内 Cl^- 濃度は 5 ~ 20mM と低く、チャネルが開いても Cl^- は細胞内方へ移動し水分子は理論上腺外に放出されない。ところが、腺細胞では $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ 共輸送担体 (NKCC) 唾液腺では NKCC1 が主であるため以下 NKCC1 と原則表記 (Evans-R. et. al., J Biol Chem. 2000) の発現によりその濃度が 60mM 程度に保持され (Nakamoto-T et. al., Am. J. Physiol. 2007) チャネルが開くれば Cl^- は細胞外へと移動し、水分泌が成立する。現在、ドライマウスの臨床的対応は多くが人工唾液などの対症療法であり、シェーグレン症候群など一部疾患に対して唾液分泌の ON/OFF を司るムスカリン性レセプター ($\text{m}3\text{R}$) への薬物療法 (セビメリン、ピロカルピン) である。一方で、我が国は 2013 年総人口の 25% が 65 歳を超えたと推計される超高齢社会にある。日本老年医学会雑誌の報告によれば大学病院を受診した 75 歳以上の高齢者は平均 4.5 剤の薬剤を服用しており、入院患者ではさらに増えると指摘され、投与薬剤の中でとくに注意を喚起される薬剤の中に抗コリン作用、つまりムスカリン性レセプターを直接阻害する薬剤を多数挙げられている。臨床実験で水分子をコントロールする水チャネル (AQP) を過剰発現させる試みもされているが結果は安定せず、我々も AQP5 を AQP5 欠損マウスに発現させたが、細胞死を誘発し、機能回復には多くの課題を残すことが分かった。つまり、これまでの治療戦略では超高齢社会における口腔乾燥症には対応ができず、新機軸を樹立が必要とされていた。

2. 研究の目的

平成 17、23 年実施の歯科疾患実態調査から 65 歳以上の平均残存歯数は急激な伸びを示し、昭和 21 ~ 25 年生まれの世代が 70 歳代に到達するころには、多数残存歯数の要歯科修復患者・要歯周治療患者が激増する。そのような社会的背景では、個別の治療法を開発するよりも、口内環境を整えるほうが疫学的視点から有効性が高い。口内環境の最も重要な決定因子は“うるおい”であり、研究では分子生理学的に水分子制御機構を標的とし、外分泌機能を活性化する治療法を確立するためにマウス顎下腺灌流テクニックを駆使し、分泌機能回復に関わる標的タンパクの活性

化・不活性化機構を特定し、トランスレーショナルリサーチとして治療法を具体的に探索することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ 共輸送担体 (NKCC1)、陰イオンチャネル (TMEM16A/Ano1) およびムスカリン性アセチルコリンレセプター ($\text{m}3\text{R}$) をターゲットとして発現様式、物理的・薬理的な活性化あるいは不活性化条件の検索し臨床応用可能な分泌促進機構に関する基礎的知見を細胞・組織レベルで収集した。

4. 研究成果

(1) 等張性から低張性の環境に変化させると分泌が亢進するが、細胞内分泌シグナルには差はない。

マウス灌流顎下腺を 37 の等張性環境にてカルバコール ($\text{CCh}:0.3\mu\text{M}$) 刺激して回収した唾液サンプルと同様に 30% 低張性環境にて回収したサンプルとを比較したところ、34% の分泌上昇を認めた。しかしながら、分泌シグナルである細胞内カルシウム動態は等張性と低張性の環境間に差はなかった。回収唾液サンプル中の Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- いずれのイオン濃度も低張環境下では有意に低下していた。

(2) 低張環境下における灌流顎下腺唾液分泌量増加は灌流液中の Cl^- 濃度の影響を受ける。

細胞外液が低張になれば分泌の亢進が起こる主要因のイオンについて検索した。外液の Cl^- を 50% 低下させた状態で等張性と低張性とを比較したところ、通常溶液に認められた差は消失していた。さらに、細胞外液に NKCC1 輸送担体の阻害剤である利尿薬として利用されている Bumetanide 存在下にて唾液を回収したところ、低張性環境に認められた唾液分泌上昇が完全になくなっていた。すなわち、低張性環境における唾液分泌上昇は Cl^- の輸送機構すなわち細胞膜上の NKCC1 に依存していることが明らかとなった。

(3) NKCC1 は低張性環境下で機能的に活性化している。

低張性環境における NKCC1 の活性化を細胞内酸性化させる手法 (アンモニウムショック) にて、細胞内 pH 計測により判定したところ、低張性で NKCC1 が活性化されていることが明らかになった。また、その活性化は Bumetanide で完全に阻害されていたことから、NKCC1 が低張性環境下での活性化部位であることが証明された。機能的活性化に加えて、NKCC1 のリン酸化が低浸透圧環境下で生じているかについても検索したが、灌流

戦士組織の実験に用いた唾液腺サンプルはタンパク解析に不向きであることが予備実験で分かり、生化学的に証明できなかった。

低浸透圧環境は生体内で生じるとすればいわゆる低ナトリウム血症であり、生体から水成分が排泄できなくなるような状況と捉えられる。水成分の生体への貯留を改善するにはこのタンパクの機能を改善することにより外分泌腺からの放出促進させることが治療の一助となる可能性が示唆された。

(4) タンニン酸には唾液分泌を阻害する物質、が含まれている。

上皮を介した水分子の移動には陰イオンが主要な役割を果たしているが、腺房細胞の基底膜に存在するNKCC1が陰イオンの濃縮過程を、腺腔側の陰イオンチャンネルがそれらを担っている。この腺腔側の陰イオンチャンネルは2008年に同定されTMEM16A/Ano1と命名され、その開口確率がタンニン酸およびその関連物質により低下することが分かってきた。そこで灌流腺組織においてもこれらの物質が唾液分泌にどのような影響を及ぼすか評価した。タンニン酸の灌流液添加により用量依存性(1 μ ~100 μ M)に分泌抑制が認められた。

(5) 飲料にも唾液分泌抑制を起こす物質が含まれているものも多数存在する。

タンニン酸は緑茶や赤ワイン中にも多量に含まれていることから、われわれが日常的に摂取する嗜好飲料の中にもこれらの物質による影響が潜在的にあると予測される。そこで通常摂取する1/1000程度の濃度でマウス顎下腺の灌流液中に添加し、CCh刺激唾液への影響を観察した。調査した飲料は、緑茶、ウーロン茶、コーヒー、赤ワイン、白ワインとした。それぞれのタンニン酸濃度は、緑茶で47 μ M、ウーロン茶で34 μ M、コーヒーで33 μ M、赤ワインで56 μ M、白ワインで4.7 μ Mであった。一方で灌流顎下腺の分泌抑制は緑茶>ウーロン茶>赤ワインの順で認められた。ところが、白ワインは分泌に影響しなかった。コーヒーはタンニン酸を比較的高濃度で含むにもかかわらず、分泌抑制効果は無く、コーヒー単体での分泌効果を認めた。コーヒーに含まれる分泌促進物質の候補としてカフェインを考えたが、灌流腺組織で投与しても、唾液分泌は起こらなかった。そのため本研究では同定できなかった成分が唾液分泌を生じさせていることが考えられる。

以上の結果から各飲料中に含まれるタンニン酸は分泌阻害の一要因ではあるものの、飲料によっては、タンニン酸の影響を無くすほどの分泌作用を示すものもある。同様の現象は飲料に限ったことではなく、種々の食品でも起こりうると思われることから、今後飲料に限定せずに検索範囲を広げること

より、摂取物とそれが引き起こす唾液腺機能への影響を調査することにより、口腔内の“うるおい”を保つ食事指導などの構築が期待できる。

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 2件)

Imamura A, Nakamoto T, Mukaibo T, Munemasa T, Kondo Y, Kidokoro M, Masaki C, Hosokawa R. Effects of Beverage Ingredients on Salivary Fluid Secretion with an ex Vivo Submandibular Gland Perfusion System: Tannic Acid as a Key Component for the Inhibition of Saliva Secretion. Open Journal of Stomatology, 2015, 5, 12-18.
<http://dx.doi.org/10.4236/ojst.2015.51003> 査読有

Kidokoro M, Nakamoto T, Mukaibo T, Kondo Y, Munemasa T, Imamura A, Masaki C, Hosokawa R. Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter-mediated fluid secretion increases under hypotonic osmolarity in the mouse submandibular salivary gland. Am J Physiol Renal Physiol. 2014; 306(10):F1155-60. 査読有

[学会発表](計 2件)

Takashi Munemasa, Taro Mukaibo, Yusuke Kondo, Yuichirou Kusuda, Yuta Miyagi, Chihiro Masaki, Ryuji Hosokawa, Tetsuji Nakamoto. Salivary dysfunction in diabetic KK-Ay mouse model:第57回歯科基礎医学会学術大会9月12日、朱鷺メッセ(新潟コンベンションセンター)新潟市

中本哲自、近藤祐介、向坊太郎、城所愛美、今村敦、宗政翔、正木千尋、細川隆司、マウス顎下腺灌流法による上皮膜輸送機能解析～膜タンパクと水分分泌との関係について～：第57回歯科基礎医学会学術大会サテライトシンポジウム2015年9月11日、朱鷺メッセ(新潟コンベンションセンター)新潟市

6. 研究組織

(1)研究代表者

中本 哲自 (NAKAMOTO TETSUJI)
松本歯科大学・歯学部・教授
研究者番号：30514989

(2)研究分担者

細川 隆司 (HOSOKAWA RYUJI)
九州歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：60211546

正木 千尋 (MASAKI CHIHIRO)

九州歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：60397940

近藤 祐介 (KONDO YUSUKE)

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：006611287

向坊 太郎 (MUKAIBO TARO)

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：50635117

黒岩 昭弘 (KUROIWA AKIHIRO)

松本歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：10195571

倉澤 郁文 (KURASAWA IKUFUMI)

松本歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：60131059

土屋 総一郎 (TSUCHIYA SOUICHIRO)

松本歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：70236909

小町谷 美帆 (KOMACHIYA MIHO)

松本歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：00387432

松山 雄喜 (MATSUYAMA YUKI)

松本歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：30532783