

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：63905

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460308

研究課題名(和文) 灌流顎下腺におけるタイト結合近傍の細胞膜振動と傍細胞輸送の関係

研究課題名(英文) Relationship between paracellular transport and membranous vibration near tight junction in the perfused submandibular gland

研究代表者

村上 政隆 (MURAKAMI, Masataka)

生理学研究所・准教授

研究者番号：10104275

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：刺激持続時の唾液分泌の大部分は傍細胞分泌である。その経路、駆動力、タイト結合の開閉を明らかにする目的で本研究は行われた。経路の査定のため、種々の分子量の蛍光マーカーを用い、水分分泌速度に対する、唾液/灌流液のマーカー濃度比をプロットした。異なる大きさのマーカーでも同様の関係が得られ同じ経路を通ることが示された。また、その駆動力は主としてタイト結合の両側にかかる静水圧差であった。タイト結合の周辺の振動の精密測定のために灌流線全体の動きを蛍光ビーズを定置させこれを3次元で追尾する手法を開発した。また、ムスカリン受容体刺激により、毛細血管の増加を形態的に捉え、微小循環で駆動力の増加を評価できた。

研究成果の概要(英文)：Paracellular transport is dominant during sustained stimulation of muscarinic receptor. Using various size of fluorescent marker, the relationship between fluid secretion and marker ratio in perfusate/saliva, which revealed the paracellular route for various size of molecules is same. The driving force for paracellular fluid transport was assessed mainly hydrostatic pressure across tight junction. For measurement of vibration near the tight junction, the movement of gland by peristaltic pump was monitored three-dimensionally in reference to the position of fluorescent bead fixed inside of the vasculature. In addition, the capillary was observed in the perfused gland morphologically. The number of capillary increased by muscarinic stimulation, suggesting that the increase in the area of vascular bed, causing a pressure decrease in the feeding artery but increase in the pressure surrounding acinar region due to the increase in fluid flow across capillary endothelial cells.

研究分野：生理学

キーワード：唾液腺 タイト結合 傍細胞輸送 血管還流唾液腺 水輸送 細胞内信号 蛍光物質分泌 駆動力

1. 研究開始当初の背景

唾液腺は大量に水分を分泌し、食物の入り口である口腔を洗浄し清潔に保ち、食物の咀嚼を助け、栄養素の溶媒として、味覚を発生し、消化吸収のための重要な役割を果たす。17世紀、ニコラス ステンセンはウシ口腔にある穴からゾンデを進め、水分を分泌する臓器(唾液腺)を発見した。以来、同様の分泌線が多く発見され、その分泌機序が深く追求され、腺房細胞の管腔膜に存在する Cl⁻ チャンネル (TMEM16A) が開口し、電気化学的勾配に従って細胞内から管腔に Cl⁻ イオンが流出し、電気的中立維持のため、細胞間隙を Na⁺ イオンも管腔に入り、管腔浸透圧が上昇し、細胞内からアクアポリン 5 を通過し、経細胞的に水分が浸透的に分泌されることが研究開始当初の共通理解であった。

しかし、唾液腺腺房では等張ないしやや低張唾液が分泌されること、大量の分泌が起こること、経上皮の電気抵抗が低いことなどの理由で、細胞間隙を通過する傍細胞輸送が経細胞輸送と並行に起こると一部では提唱されていた。ことに、Garret らは分泌刺激により巨大分子が細胞間隙を通過して管腔に出現したことを見出し、また Case らは中性分子の唾液中への出現と分泌速度の関係を調べ、傍細胞経路を認識した。村上是 Hill らとともに、種々の分子量のデキストランをトリチウムで標識し、血管灌流により、ラット顎下腺に流し、分泌刺激による唾液分泌速度と、分泌されるデキストランの大きさと濃度から唾液腺傍細胞経路の分子フィルターとしての大きさを決定し、分泌刺激中に、水分子は自由にタイト結合を通過できることを明らかにした。

同時期に月田らは、上皮タイト結合を構成する claudin3 と 4 に enterotoxin(CPE) が結合し、バリア機能を阻害することを見出した。瀬川と村上是、CPE が市販の collagenase に含まれ、分離した腺房細胞では、管腔内に蛍光色素が移行し、分泌刺激による経細胞水分分泌で管腔内蛍光色素が希釈される経過を共焦点レーザー顕微鏡で観測した。この希釈経過から経細胞水分分泌の時間経過を世界で初めて計算することができた。摘出灌流線全体の水分分泌は、この経細胞分泌よりはるかに大量であった。刺激開始 30 秒以内では経細胞経路から分泌される唾液は全分泌の大部分を占めるが、その後、次第に傍細胞経路からの分泌が増加し、刺激持続期には 60% 以上になると計算された。

また橋本と村上是、血管灌流している唾液腺から素早く組織片を切り出し液体ヘリウム温度に冷やした銅ブロックに組織片を急速に圧着し、凍結切断試料を作成し、唾液腺の管腔を形作る細胞間分泌細管を電子顕微鏡観察した所、タイト結合は数本の occludin と claudin からなる並行索条であり、タイト結合直下の細胞骨格の動きにより開閉が可能であると推測された。申請者は 2008-2010

および 2011-2013 科学研究費により傍細胞の駆動力と開閉細胞内信号について研究し、1) 静水圧が主として傍細胞水輸送を駆動し、この水輸送による溶媒牽引により傍細胞気質輸送が完遂される。2) タイト結合が開くのは細胞内 Ca 濃度を増加させる刺激薬、あるいは細胞内 cAMP を増加させる刺激薬であり、また non-adrenergic, non-cholinergic の刺激薬でも開くことを明らかにしてきた。

これまでタイト結合の機能は月田らにより MDCK 培養細胞シートを用い、生化学、形態学、生理学の手法を駆使し多くの成果を上げてきた。この材料のタイト結合は、網目構造を成し、主としてバリア機能に主眼が置かれて研究されてきた。唾液腺のタイト結合は腺房細胞の頂点 (apical) を縁取り囲むと信じられてきたが、Riva は SEM を駆使して、唾液腺腺房のタイト結合は、細胞側壁を基底方向に深く長く入り込み、細胞間の微小な細管を形成する。この細胞間分泌細管 (IC: intercellular canaliculi) は盲管であり、細管の内面は管腔膜である。(細胞頂点に留まらない)。傍細胞輸送はタイト結合を超えて細胞外溶液が結合組織側より管腔側へと移送されるものであり、タイト結合の調節により通過する基質の大きさと透過性を調節すると予測される。そしてその調節には、裏打ちする細胞内骨格(アクチンなど)の動きがその候補である可能性が高い。

2. 研究の目的

申請者らは、経細胞輸送の開始と傍細胞輸送の最大になる時間には、約 30 秒の時間差があることを発見した。当初、この 30 秒間にタイト結合直下の細胞骨格の動的変化を観測することを目的に計画を立案した。1) タイト結合直下の細胞骨格の動きを推定するために、2) タイト結合周辺の細胞表面運動の変化を高速共焦点レーザー顕微鏡で観測することにあつた。しかし、共焦点レーザー顕微鏡による振動観測実験とその実験後のデータ処理がビーズの位置を 3D で特定することを含むため、多大のマンパワーを要することが予測された。そこで、先に 1) 傍輸送経路の基質移送機序が、より大きな分子にも適用できるかどうかの確認実験、2) 灌流唾液腺の小動脈・毛細血管・小静脈の唾液分泌時の形態変化観察を行い、仮説の基礎を盤石にすることとし、タイト結合の振動の観測は先延ばしすることとした。

3. 研究の方法

(1) ラット顎下腺の血管灌流。材料はあらかじめフォーレンにより痛みを除去した雄性 Wistar/ST ラットをチオペンタールで麻酔し、顎下腺を摘出、唾液排出導管、動脈、静脈にチューブを挿管し、酸素 100% ガスを飽和した人工灌流液を拍動ポンプにて動脈より定流灌流した。臓器は恒温チャンバーに設置し 37°C の条件を保った。

(2) 傍細胞輸送は、灌流液から唾液へシフトする蛍光色素量から評価した。蛍光色素には、従来使用した Lucifer Yellow および Sulfo-rhodamin B (これらの色素の分子量は約 400 Dalton)、これに、生理活性をもたないペプチド鎖に蛍光タグを付けた高分子の蛍光色素(分子量 800, 1500, 4000 dalton)を外注合成し用いた。収量は 80-90%のものを得ることができた。唾液および灌流液試料は microplate reader にて定量した。

(3) 高速共焦点レーザー顕微鏡により、1秒に z 軸方向 32 スライスのスキャンし、1秒毎の 3D 像を再構成した。さらにタイト結合周辺の細胞膜がスライス内に収まる場所を選択し、このスライスに集中して 32 倍の時間分解(30ms/s)で観測する計画であった。この手法は極めて独創的であり、組織内部で原子間力顕微鏡では観測不可能な領域もカバーできると考えられた。しかし、血管灌流臓器では拍動ポンプにより灌流液を駆動する必要があり、この拍動が 3D 画像に影響を与え、解析が不可能であった。

そこで蛍光ビーズを血管内に注入して組織内に設置し、蛍光ビーズを画像アーチファクトのマーカースとして位置を 3D で計測することで、その軌跡をもとに 3D 画像のポンプによるアーチファクトを消去することに成功した。このプロトコールは 2015 末に完成し、日本唾液腺学会で発表した。しかし、実験協力者をはじめ実験チームのマンパワーの不足により、フルスペックでの実験は不調に終わり、最終的な結果にいたらなかった。しかし、preliminary のポンプ拍動を除去しない画像で、細胞間分泌細管の位置の標準偏差の変化を経時的に求め、振動が増加することを示唆することができた。

さらに、これまでの実験で灌流圧を変化させた時、傍細胞輸送が増加することを示してきたが、この推測を唾液腺内においても確実なものにするために、唾液腺の血管の染色を行い、灌流線の小動脈、毛細血管、小静脈が分泌刺激により、どのように変化するかを観察した。

4. 研究成果

(1) 麻酔下で Wistar 雄性ラットの顎下腺を個体から遊離し、Sulforhodamine B (SRB, Sigma) を含む Krebs 液で灌流を行った。振動のマーカースとして微小緑色蛍光ビーズを実験前に動脈より注入し、静脈壁に留置され不動になることを確認した。SRB を加えない状態でビーズの動きを 3D で撮像し、実験後 Imaris(Bitplane)上で追尾し軌跡を記録した。次に SRB を灌流液に加え、定常状態でビーズが高輝度で観察されることを確認し、刺激実験を行った。

ペリスタポンプの駆動により血管内の蛍光ビーズの三次元的な振動が観察された。2波長のレーザーの混合照射により赤色の蛍光色素である SRB と緑色蛍光ビーズの同時シ

グナル検出を行なった。相対的に緑色蛍光ビーズのシグナル強度が強く SRB と容易に識別することが可能であった。

Imaris 上で蛍光ビーズの軌跡を記録し三次元座標化し、ビーズが固定されるように画像の再構成を行った。これらの操作により、ポンプの振動および刺激時の細胞収縮に起因する蛍光ビーズの比較的大きな移動によるアーチファクトの除去が可能となった。

(2) 従来の蛍光マーカースおよび新たに合成した大きい蛍光マーカースにより、400, 800, 1500, 4000 Dalton の蛍光色素の唾液内濃度と唾液分泌速度の関係をプロットすることができ、いずれの大きさの分子も溶媒牽引により、タイト結合を通過することが明らかになった。

(3) タイト結合を通過する水分の駆動力を主として静水圧とすれば、分泌刺激による血管拡張および毛細血管床の増加により分泌終末部の血流が増加し、局所の圧が増加することを想定し、観察確認しなければならない。しかし、唾液腺においてこの変化は形態的に観察されていなかった。

今回、形態的に血管床が増加することを血管内皮細胞を染色して微小循環を評価するシステムを完成させた。ムスカリンによる刺激時に細い毛細血管が増加することを観察した。

本研究計画のタイト結合近辺での振動の観察のための 3 つの重要な基本研究を実施でき、最終段階である振動の観測につなぐことができた。

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 4 件)

1. Seo E, Sazi T, Togawa M, Nagata O, Murakami M, Kojima S, Y Seo (2016) A portable infrared photoplethysmograph: Heartbeat of *Mytilus galloprovincialis* analyzed by MRI and application to *Bathymodiolus septemderum*. *Biol Open* 5(11):1752-1757. doi: 10.1242/bio.020909. (査読あり)
2. Wei F, Wei MX, Murakami M. (2015) Mechanism involved in *Danshen*-induced fluid secretion in salivary glands. *World Journal of Gastroenterology* 21: 1444-1456, DOI: 10.3748. (査読あり)
3. Seo E, Ohishi K, Maruyama T, Imaizumi-Ohashi Y, Murakami M, Seo Y (2014) Testing the constant-volume hypothesis by magnetic 1 resonance imaging of the mussel heart in the *Mytilus galloprovincialis*. *J Exp Biol* 217: 964-973, DOI:10.1242/jeb.092577 (査読あり)
4. Seo E, Ohishi K, Maruyama T, Imaizumi-Ohashi Y, Murakami M, Seo Y (2014) Magnetic resonance imaging

analysis of water flow in the mantle cavity of live *Mytilus galloprovincialis*. Journal of experimental biology. 217: 2277-2287, doi: 10.1242/jeb. 101949. (査読あり)

〔研究関係著作〕 なし

〔学会発表〕(計 22 件)

1. Murakami M, Wei F, Narita T, Hashimoto S, Shibukawa Y, Sato M (2017.3.28-30) Paracellular fluid secretion and microcirculation in the perfused submandibular gland. 第 94 回日本生理学会大会 (アクトシテイ 浜松 静岡県).
2. Derouiche S, Takayama Y, Murakami M, Tominaga M (2017.3.28-30) Functional interaction between thermosensitive TRPV4 and TMEM16A/ANO1 contributes to stimulated saliva and tear secretion. 第 94 回日本生理学会大会(アクトシテイ 浜松 静岡県).
3. Murakami M, Wei F, Narita T, Fukushima M, Hashimoto S, Shibukawa Y, Sato M (2017.2) Microcirculation & Paracellular Fluid Secretion in the perfused Submandibular gland. Gordon Research Conference on Salivary Glands and Exocrine Biology. (Hotel Galvez Galveston TX USA)
4. 橋本貞充, 成田貴則, 村上政隆 (2016.12.2) 灌流ラット顎下腺の血管系の可視化とムスカリン刺激による変化 第 61 回日本唾液腺学会 (文教学院 文京区 東京都)
5. Wei MX, Ding W, Xie L, Ping H, Wei F, Murakami M (2016.11.29-12.1) Effects of Chinese herb HQ on salivary fluid secretion by isolated and perfused rat submandibular glands. The 4th International Symposium in honor of Niels Stensen (Okazaki Conference Hall, Okazaki, Aichi, Japan)
6. Hashimoto S, Murakami M, Narita T, Sato M, Shibukawa Y (2016.12.1) Visualization of microcirculation and paracellular pathway in the perfused submandibular gland. The 4th International Symposium in honor of Niels Stensen (Okazaki Conference Hall, Okazaki, Aichi, Japan)
7. Derouiche S, Takayama Y, Murakami M, Tominaga M (2016. 11.29-12.1) Functional interaction between TRPV4 and TMEM16A/anocamin 1 contributes to stimulated saliva and tear secretion. The 4th International Symposium in honor of Niels Stensen (Okazaki Conference Hall, Okazaki, Aichi, Japan)
8. Murakami M, Wei F, Narita T, Fukushima-Matsuki M, Hashimoto S, Shibukawa Y, Sato M, Steward MC. (2016. 11.29-12.1) Microcirculation and paracellular fluid secretion in the perfused submandibular gland of the rat. The 4th International Symposium in honor of Niels Stensen (Okazaki Conference Hall, Okazaki, Aichi, Japan)
9. Murakami M (2016. 11.29-12.1) Development of salivological view through 20 years of Stensen symposia. The 4th International Symposium in honor of Niels Stensen (Okazaki Conference Hall, Okazaki, Aichi, Japan)
10. 村上政隆、魏飛、魏睦新、成田貴則、杉谷博士(2016.10.14-15)唾液分泌に及ぼす漢方薬の影響。天然薬物研究方法論アカデミー第 19 回岡崎シンポジウム(Okazaki Conference Hall, Okazaki, Aichi,
11. Derouiche S, Takayama Y, Murakami M, Tominaga M (2016.4.7-9) Functional interaction between TRPV4 and TMEM16A/ANO1 contributes to stimulated saliva and tear secretion, Calcium signaling meeting, (Hilton Hawaiian Village, Honolulu, Hawaii, USA)
12. Yamashita N, Kunii C, Tateno Y, Kuma M, Murakami M, Ishikawa T. (2016.3.22-24) Pharmacological evaluation of the role of the Ca²⁺-dependent BK and IK channels in the fluid secretion in the rat submandibular gland. The 93rd Japan Physiological Society meeting. (Sapporo Convention Center, Sapporo, Hokkaido)
13. Derouiche S, Takayama Y, Murakami M, Tominaga M (2016.3.22-24) Functional interaction between TRPV4 and angiotensin I in salivary and lacrimal glands. The 93rd Japan Physiological Society meeting. (Sapporo Convention Center, Sapporo, Hokkaido)
14. Derouiche S, Takayama Y, Murakami M, Tominaga M (2016.2.12-13) Functional interaction between TRPV4 and angiotensin I in salivary and lacrimal glands. The 8th Nagoya Global retreat. (Aichi Health Plaza, Nagoya, Aichi)
15. 成田貴則、橋本貞充、澁川義幸、佐藤正樹、村上政隆 (2015.12.5) 灌流ラット顎下腺の共焦点レーザー顕微鏡による 3D 観察：蛍光ビーズによるポンプアーチファクトの除去。第 60 回日本唾液腺学会 (文教学院大学、文京区、東京都)
16. Murakami M, Wei F, Narita T, Fukushima-Matsuki M, Hashimoto S, Shibukawa Y, Sato M. (2015.11.22-25)

Microcirculation and paracellular fluid secretion in the perfused submandibular gland. 8th FAOPS 2015, (Bankok, Thailand)

17. Derouiche S, Takayama Y, Murakami M, Tominaga M (2015.9.16-18) Functional interaction between TRPV4 and angiotensin I in salivary and lacrimal glands. International TRP meeting, (Leuven Belgium)
18. Murakami M, Wei F, Narita T, Fukushima-Matsuki M, Hashimoto S, Shibukawa Y, Sato M. (2015 .3. 21-23) Morphological approach for a paracellular fluid transport in salivary glands. 第 92 回日本生理学会大会 (神戸国際会議場展示場、神戸市、兵庫県)
19. Seo Y, Seo E, Murakami M, Ohnishi K, Maruyama T. (2015 .3. 21-23) Water flow in mantle cavity of bivalve observed by high-field MRI. 第 92 回日本生理学会大会 (神戸国際会議場展示場、神戸市、兵庫県)
20. Murakami M, Wei F, Narita T, Fukushima-Matsuki M, Hashimoto S, Shibukawa Y, Sato M. (2015.2.15-20) Microcirculation and fluid secretion by Danshen stimulation in the perfused submandibular gland. Gordon Research Conference on Salivary Glands and Exocrine Biology. (Hotel Galvez, Galveston TX, USA)
21. 村上政隆、魏飛 (2014.12.6) 灌流ラット顎下腺：漢方薬丹参による微小循環増加と唾液分泌誘発の時間経過. 第 59 回日本唾液腺学会大会 (文教学院大学、文京区、東京都)
22. Murakami M, Wei F, Narita T, Fukushima-Matsuki M, Hashimoto S, Shibukawa Y, Sato M. (2014.6.25-6.28) Morphological Search for a Paracellular Secretion Route in Salivary Glands . 92nd IADR General Session and Exhibition (iCC, Cape Town, South Africa)

〔図書〕(計 1 件)

1. 村上政隆(2016) 第 III 章 唾液腺の基礎. “唾液・唾液腺 徹底レクチャー”(日本唾液腺学会編), 総ページ 209, 金原出版, pp 73-113.

〔産業財産権〕なし

〔その他〕ホームページ等

生理学研究所ホームページ、研究部門紹介、個別研究、村上

<http://www.nips.ac.jp/research/group/post-40/>

Masataka MURAKAMI homepage

<http://www.nips.ac.jp/~masataka>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

村上 政隆 (MURAKAMI, Masataka)
生理学研究所・准教授
研究者番号：10104275

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者

杉谷 博士 (SUGIYA, Hiroshi)
日本大学・生物資源科学部・教授
研究者番号：20050144

橋本 貞充 (HASHIMOTO, Sadamitsu)
東京歯科大学・教養部・教授
研究者番号：10201708

(4)研究 協力者

成田 貴則 (NARITA, Takanori)
日本大学・生物資源科学部・講師
研究者番号：70453884

Martin C. Steward
University of Manchester,
School of Life Science, Reader

Massimo Castagnola
Catholic University of Rome,
Biochemistry, Professor

Jörgen Ekström
University of Göteborg, Pharmacology,
Professor