

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：27102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861648

研究課題名(和文)イオンチャンネルをターゲットとしたハイパーサーミアによる口腔乾燥症の新規治療戦略

研究課題名(英文)A new strategy for patients with xerostomia targeting ion channels by hyperthermia

## 研究代表者

向坊 太郎 (Taro, Mukaibo)

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：50635117

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：口腔乾燥症に対する新規治療法として、申請者は唾液腺組織に対する局所的温熱作用による唾液分泌促進について研究を行ってきた。本研究では、温度上昇に伴う細胞内カルシウム濃度上昇に着目し、細胞外カルシウム流入メカニズムと目されるTRPチャンネルの関与について明らかにすることを目的とした。研究結果から、25から37℃への温度上昇では細胞外からのカルシウム流入が細胞内カルシウム濃度の上昇に関与している可能性は低く、また組織学的検査から唾液分泌に重要なチャンネルやトランスポーターの局在の変化は認められなかった。今後温度上昇に伴う唾液分泌に関与するタンパクについてさらなる研究が必要であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to elucidate the mechanism of increased saliva secretion of salivary gland associated with temperature. Although TRP channel was studied as a SOCE (Store Operated Calcium Channel), that possibility was little according to the results of this study. Moreover, any difference was not detected in localization of channels and transporters relevant to saliva secretion between 25 and 37℃. Further study is necessary to show the mechanism of increased saliva secretion in accordance with the elevated temperature.

研究分野：歯科補綴学・生理学

キーワード：TRPチャンネル 口腔乾燥症 SOCE

## 1. 研究開始当初の背景

口腔乾燥症に対する治療法として現在、人工唾液や含嗽剤の使用などの対症療法が中心に行われており、薬物療法も比較的高率に現れる副作用（嘔気、腹痛、下痢）がとくに高齢者では問題となり、歯科領域では普及していないのが現状である。そこで口腔乾燥症患者に対し口腔外からの局所的温熱作用により唾液分泌を促進する試みを申請者は行ってきたが、温度上昇に伴う唾液分泌量増加のメカニズムについては不明であり、これらを明らかにすることにより、その効果や為害作用について検討する必要があると考えられた。

## 2. 研究の目的

申請者は口腔乾燥症への新たな治療戦略としてメカノバイオロジーの局所的な適応に注目し、これまで唾液腺に対するハイパーサーミア（温熱療法）の応用と *in vivo* レベルでの作用機序の解明を目指した研究を行い、唾液腺自体に温度依存性の唾液分泌量の増加が認められること、さらにその機序が細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の上昇にあることを発見した。

本研究ではこれらの研究成果をさらに発展させ、細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の上昇と、近年温度感受性  $Ca^{2+}$  チャンネルとして注目を集める TRP (Transient Receptor Potential) チャンネルとの関連性に焦点を当て、唾液腺におけるチャンネルの役割を明らかにすることを目的として本研究を立案した。

## 3. 研究の方法

本研究では 12 週齢 c57BL/6J マウスを用い、*Ex vivo* 顎下腺灌流実験、細胞内カルシウムイメージング、および免疫染色を行った。

### (1) マウス *Ex vivo* 顎下腺灌流実験

抱水クラロール全身麻酔下でマウス顎下腺支配動脈の分岐を結紮、切断し、顎下腺に支配動脈と導管をつけた状態で体外に摘出する。摘出後直ちに支配動脈にカニューレションを行い、*Ex vivo* 顎下腺灌流モデルを構築する。蠕動ポンプを使用して一定の灌流速度で灌流を行い、灌流液にムスカリン性刺激薬を加えることで顎下腺組織からの唾液分泌を促し、キャピラリーを用いて唾液を回収する。この一連の実験を灌流液および摘出した顎下腺を乗せる灌流ステージ上を任意の温度にコントロールすることにより温度依存性の唾液分泌量の上昇と TRP チャンネルとの関連性を明らかにする。

### (2) 細胞内カルシウムイメージング

全身麻酔下で顎下腺を体外に摘出した後、ミンシング、コラゲナーゼ処理を行う。続いて  $Ca^{2+}$  蛍光指示薬である Fura-2AM を細胞内に導入し蛍光顕微鏡(オリンパス IX71)を用いて温度上昇時の細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の上昇を検出する。TRPV4 アゴニストで、従来の TRPV4 アゴニストである 4- $\alpha$ PDD の 300 倍の特異性が近年報告されている GSK1016790 刺激時の細胞内  $Ca^{2+}$  濃度測定により TRPV4 チャンネルの温度上昇に伴う生理活性を調べる。

### (3) 免疫染色

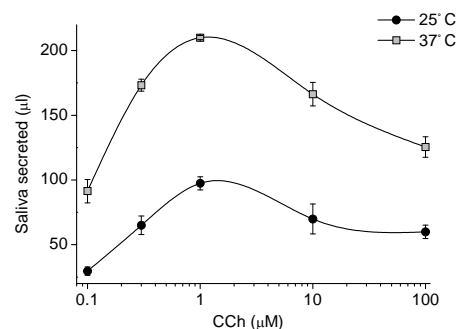
マウス *Ex vivo* 顎下腺灌流実験で 25 で灌流を行った場合と、37 で灌流を行った場合の顎下腺をそれぞれパラフィン包埋後、免疫染色を行い、唾液分泌に大きく関与するトランスポーターとチャンネルである NKCC1 と AQP5 の局在の変化について調査した。

## 4. 研究成果

### (1) マウス *Ex vivo* 顎下腺灌流実験

25 と 37 における唾液分泌量の濃度依存曲線

ムスカリン受容体に対する刺激薬の親和性に温度依存性があるかを明らかにするため、25、37 それぞれにおける刺激薬（カルバコール）濃度曲線をプロットした。温度上昇に伴う曲線の左方移動は見られず、ムスカリン受容体への親和性に温度依存性はないと解釈し、細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の変化に焦点をあて、研究を進めた。

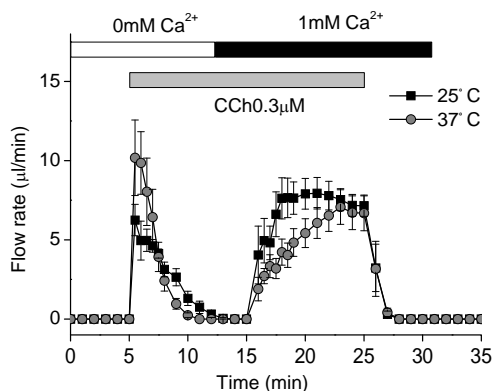


細胞外  $Ca^{2+}$  の有無による分泌量の変化

以前の研究から細胞内  $Ca^{2+}$  濃度に温度依存性があることが既に分かっていたため、次に細胞内  $Ca^{2+}$  濃度上昇について詳細に検討した。細胞内  $Ca^{2+}$  の上昇は細胞内小胞体から放出される細胞内  $Ca^{2+}$  の上昇と、小胞体内の  $Ca^{2+}$  の枯渇に続いて起きる細胞外  $Ca^{2+}$  流入(SOCE:

Store Operated  $\text{Ca}^{2+}$  Entry)に分けられる。TRPチャンネルはこのSOCEに關与すると考えられているため、灌流液から $\text{Ca}^{2+}$ を除いた状態でカルバコール刺激を行い、小胞体から $\text{Ca}^{2+}$ を枯渇させた上で再度灌流液に細胞外 $\text{Ca}^{2+}$ を戻し、SOCEによる細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 上昇と、それに伴う唾液分泌に温度による差があるかどうかを比較した。

その結果、SOCEに伴うと考えられる唾液分泌には25と37で差が見られなかった。



タプシガーギンによるSOCE依存性唾液分泌の温度感受性

SOCEによる細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 上昇に伴う唾液分泌の温度感受性を直接的に調査するため、小胞体膜上に発現し、小胞体内への $\text{Ca}^{2+}$ 再取り込みを行っているSERCA

(Sarcoplasmic Reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ ATPase)ポンプを選択的に阻害し、小胞体内のカルシウムを枯渇させる薬剤であるタプシガーギンを用いて唾液分泌を促し、25と37での唾液分泌速度、分泌量を比較した。

その結果、25と37で唾液分泌速度、分泌量に差は認められず、結果4-(1)-を裏付ける形でSOCEによる細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ の上昇とそれに伴う唾液分泌の上昇に温度感受性がないことが示され、温度上昇に伴う唾液分泌量の上昇にTRPチャンネルが關与している可能性が低いことが示された。

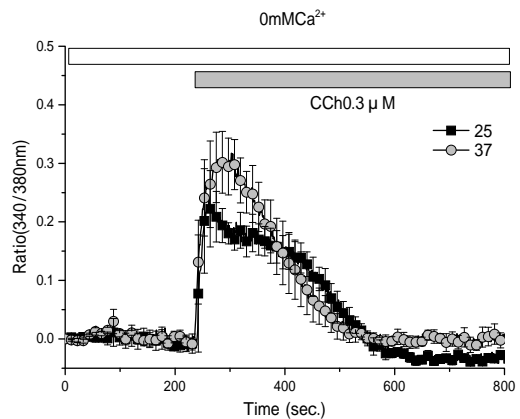
この他、唾液腺腺房細胞内に $\text{Cl}^-$ イオンを取り込み、唾液分泌に重要な働きをしているNKCC1や温度感受性 $\text{Ca}^{2+}$ チャンネルとして知られるTRPV4の作用を顎下腺Ex vivo灌流実験とそれらのチャンネル、トランスポーターの阻害薬を用いて25と37で唾液分泌量、分泌速度を調べたが、いずれも単独の關与を疑う結果は得られなかった。

## (2) 細胞内カルシウムイメージング

最後に、温度上昇に伴う細胞内カルシウムの濃度上昇が細胞外からのカルシウム流入(SOCE)ではなく、小胞体からのカルシウム放出によるものであることを直接的に示すた

め、細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 変化をカルシウムイメージング法にて測定した。

灌流液から $\text{Ca}^{2+}$ を取り除いた状態でカルバコール刺激を行うことで小胞体からの $\text{Ca}^{2+}$ 上昇を観察したところ、37刺激時が25刺激時よりもわずかに $\text{Ca}^{2+}$ 上昇が大きかったが、有意差は認められなかった。

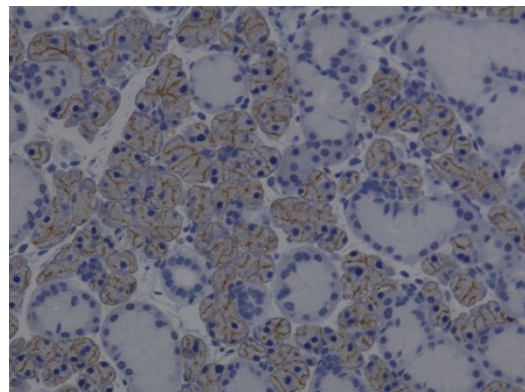


## (3) 免疫染色

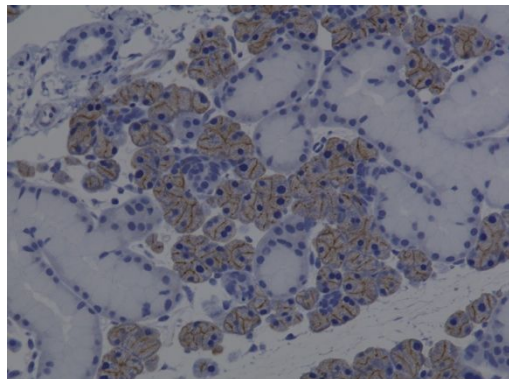
25と37におけるAQP5発現の局在

唾液分泌に重要な役割を果たすNKCC1とAQP5について25と37で灌流後固定し、それぞれ免疫染色を行い、局在の変化を調査したが、NKCC1、AQP5ともに温度による局在の変化は認めなかった。

### ● 25におけるAQP5の局在

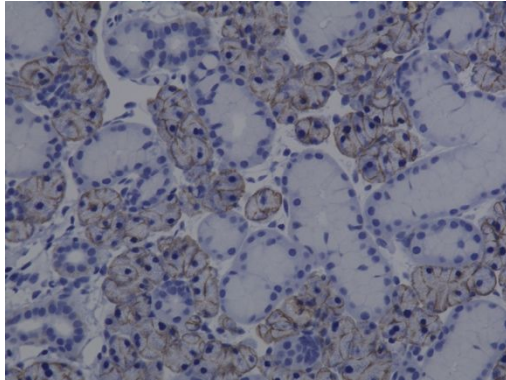


### ● 37におけるAQP5の局在

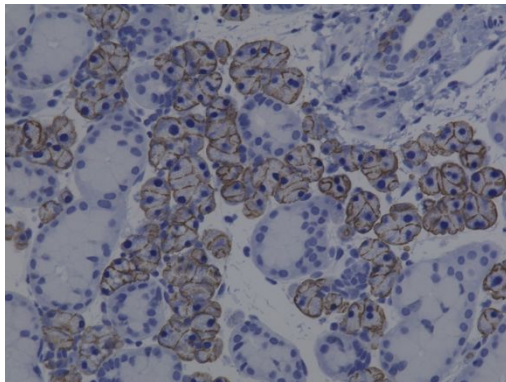


25 と 37 における NKCC1 のタンパクの局在

- 25 における NKCC1 の局在



- 37 における NKCC1 の局在



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 1 件 )

Imamura A, Nakamoto T, Mukaibo T, Munemasa T, Kondo Y, Kidokoro M, et al. 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(01):12-18. DOI: 10.4236/ojst.2015.51003

[ 学会発表 ] ( 計 0 件 )

[ 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

向坊 太郎 ( MUKAIBO TARO )

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号 : 5 0 6 3 5 1 1 7

(2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者

( )

研究者番号 :