

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08208

研究課題名(和文) 暑熱負荷による唾液腺幹細胞の増殖と分化の誘導 - 新たなドライマウス改善方法の開発

研究課題名(英文) Effects of thermal stress on salivary stem cell proliferation and differentiation-for a novel treatment of dry mouth

研究代表者

紫藤 治 (Shido, Osamu)

島根大学・医学部・教授

研究者番号：40175386

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ラットや培養細胞を用いた検討から、温熱刺激は、唾液腺の腺房細胞のアクアポリン5(AQP5、水を移動させるチャネル)の発現亢進と同組織の血管新生および血管のAQP1の発現亢進を介して、唾液分泌機能を向上させる事が知られている。今回、温熱刺激は唾液腺の幹細胞の増殖を抑制するが、その結果、唾液腺幹細胞から増殖した新生細胞の分化を促進する可能性が考えられた。さらに、ラットの自発運動により唾液腺でAQP1の発現と血管新生が促進され、唾液分泌機能が亢進することが示唆された。社会的な問題となっているヒトの口腔乾燥症に対し、その症状を改善する方法として運動を含む温熱刺激が有用である可能性がある。

研究成果の概要(英文)：It has been shown that in rats, constant exposure to moderate heat improves saliva secretion function through increased the expressions of aquaporin 1 (AQP1) and AQP5 (proteins that act as water channels) and promoting angiogenesis in the submandibular gland (SMG). In rats, constant heat exposure, however, appeared to suppress proliferation of salivary stem cells, which might then contribute to promoting the differentiation of new-borne cells in the SMG. Exercise increases body temperature and can be a potent thermal stress as heat exposure. Thus, the effect of exercise on salivary gland function (including molecular mechanism) was examined in rats. Voluntary exercise promoted pilocarpine-induced saliva secretion. The improvement of saliva secretion seemed to be induced by an increase in the expression level of AQP1 in the vessels and angiogenesis in the SMG. The findings may provide useful insights into novel and non-invasive anti-hyposalivation (dry mouth) therapy in humans.

研究分野：環境生理

キーワード：唾液腺 唾液腺幹細胞 アクアポリン 口腔乾燥症 暑熱馴化 暑熱暴露 運動トレーニング

1. 研究開始当初の背景

現在、本邦では口腔乾燥症(ドライマウス)に悩まされる人口が800万人とも1000万人とも言われ、薬剤以外での唾液分泌を促進する安全かつ簡便な治療法が求められていた。我々は、温熱生理学的知見からげっ歯類などでは繰り返し暑熱に曝露されると(いわゆる暑熱馴化)唾液分泌量が著増することをヒントに、「耳下腺周囲を加温することで唾液分泌を促す装置」(特願2010-056779)を開発し、ヒトにおいて良好な臨床的治療結果を得た。

しかし、温熱刺激の繰り返しによる唾液の分泌機能の亢進のメカニズムは十分に解明されていなかった。

2. 研究の目的

温熱刺激による唾液腺機能の亢進のメカニズムについて、我々は、短期の暑熱曝露により血管系には水のチャネルであるアクアポリン(AQP)1が、漿液腺の腺房細胞にはAQP5が誘導されることにより、水の移動が促進され、唾液腺分泌量が増加する可能性を強く示唆している(引用文献)。さらに、培養細胞を用いた検討から温度刺激そのものがAQPの誘導を促進することも示唆している(引用文献)。

しかし、温熱刺激によるAQPの誘導と唾液分泌の促進は、唾液腺が健全である場合には口腔乾燥症の治療として有効であるが、シェーグレン症候群の患者さんや放射線障害などで唾液腺が破壊・損傷されている場合には十分効果を発揮しない可能性がある。近年、げっ歯類などの唾液腺には唾液腺幹細胞が存在し、幹細胞は増殖して腺房細胞や導管細胞などに分化することが示されてきた。したがって、唾液分泌機能の回復の新たな方法として、唾液腺幹細胞を利用した唾液腺の再生が考えられる。我々の着目している温熱刺激は臨床的にシェーグレン症候群の患者さんにもある程度有効であった。そこで、本研究は実験動物の唾液腺および単離した唾液腺

幹細胞において、温熱刺激が唾液腺幹細胞の増殖と分化に及ぼす影響を検討することを目的とした。さらに、唾液腺幹細胞での結果が否定的あるいは不確実であった場合には温熱刺激と類似の刺激となりうる運動に注目し、動物の自発運動の唾液腺機能への影響とその影響のメカニズムを検討することとした

3. 研究の方法

(1) 暑熱曝露による唾液腺幹細胞の増殖と分化(In vivoでの検討)

動物はウイスター系雄性ラット(10週齢)を用いた。ラットを環境温24℃、明暗周期12:12時間、自由摂食・摂水下、プラスチックケージで飼育した。1週間飼育環境へ慣らした後、暑熱馴化群(HE)は32℃の高温環境で5日間飼育した。コントロール群(CN)は24℃の一定環境温下で5日間飼育した。暑熱曝露の深部体温への影響を確認するため、テレメトリーシステムにより深部体温(腹腔内温)を連続的に測定した。ラットの腹腔内には暑熱曝露開始の日からプロモデオキシウリジン(BrdU, Sigma)(細胞新生のマーカー)を5日連続で50mg腹腔内投与した。暑熱曝露開始から6日後にラットを麻酔し、経心的に4%パラホルムアルデヒドを灌流した後、顎下腺を摘出した。顎下腺の凍結切片を作成し、BrdUと基底膜マーカー(Na-K ATPase)の染色を行った。染色した切片は共焦点レーザー顕微鏡で観察した。また顎下腺からパラフィン切片を作成し、細胞増殖マーカーであるKi67で染色した。

(2) 暑熱曝露による培養唾液腺幹細胞の増殖と分化(In vitroでの検討)

唾液腺幹細胞の培養はPringleらの方法に従った(引用文献)。動物はウイスター系雄性ラット(10-14週齢)を用いた。ラットを麻酔した後に顎下腺を摘出し、外科用メスを用いてミンスした。顎下腺組織80mgあたり1mlのハックス緩衝液(1%牛血清アルブ

ミン含有)を加え、さらに 23 mg/mL のコラゲナーゼ II を 25 μ L、40 mg/mL ヒアルロニダーゼを 25 μ L、50 mM の塩化カルシウムを 250 μ L 加え 37°C で 20 分間振とうし、酵素処理した。ピペッティングにより組織をほぐした後に、再度 20 分間浸透した。1300 rpm で 8 分間遠心し上清を破棄した。上記を再度繰り返し、細胞を回収した。細胞をハックス緩衝液でほぐした後に 100 μ m メッシュを通し単離した。細胞を洗浄後に MSG 培地で細胞を再懸濁し、細胞数を測定後に 6well plate に播種した。細胞を 5%CO₂、37°C で培養した。培養開始から 3-5 日後に c-Kit 抗体を用いて免疫細胞学解析を行った。染色した細胞は共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

(3) 実験動物の唾液腺(個体レベル)および単離した唾液腺幹細胞において、温熱刺激が唾液腺幹細胞の増殖と分化に及ぼす影響を検討することを目的とし、その研究を継続したが、唾液腺幹細胞塊(Salisphere)の形成を安定的に得ることが困難であった。そこで、ここでは暑熱曝露と類似する刺激である運動に注目し、運動トレーニングによるラットの唾液分泌量や唾液分泌に重要な役割を果たす AQP などの機能性タンパク質の発現変化を解析した。

ウィスター系雄ラットを環境温 24±1°C で 1 週間飼育した後、自発運動トレーニングを開始した。40 日間の自発運動トレーニング後にラットを全身麻酔し、塩酸ピロカルピン(0.5 mg/kg)を腹腔内投与して唾液分泌量を測定した。また、経心脱血後にラット顎下腺を摘出し、AQP などの mRNA とタンパク質発現量を解析した。

4. 研究成果

(1) 暑熱曝露により HE の腹腔内温は明期および暗期ともに CN に比較して約 0.4°C 上昇した。顎下腺の免疫組織学解析を行った結果、HE の BrdU 陽性細胞数は CN に比べて減少する傾向が観察された。また、細胞増殖マーカー

とされる Ki67 陽性細胞数も減少する傾向が観察された。これら結果は、暑熱曝露はラット顎下腺の細胞増殖を抑制する可能性を示唆する。一般的に幹細胞などの未分化な細胞では増殖シグナルの抑制により分化が促進することから、暑熱曝露によるラット顎下腺の幹細胞増殖抑制は唾液腺幹細胞の分化を意味する可能性がある。

(2) 培養開始から約 4 日後に Salisphere の形成を確認した。そこで、幹細胞マーカーである c-Kit 抗体を用いて Salisphere を免疫細胞学的に染色したところ、多くの Salisphere が c-Kit 陽性であることが明らかとなった。しかし、多種の細胞も多く存在し、唾液腺幹細胞を安定的に分離することは困難であった。

(3) 自発運動トレーニングによりピロカルピン誘発性の唾液分泌量が有意に増加し、唾液中の Na⁺濃度やタンパク質濃度を低下した。また、運動トレーニングによりの顎下腺の血管内皮細胞に発現する AQP1 の mRNA およびタンパク質発現量が増加した。さらに、血管新生の調節に関与する血管内皮細胞増殖因子(VEGF)の発現量が顕著に上昇した。自発運動トレーニングはラットの唾液分泌機能を亢進し、その機序として顎下腺の AQP1 や VEGF の発現上昇が関与する可能性が示唆された。

さらに、血管内皮細胞のマーカーである CD31 の陽性細胞数は運動群の顎下腺で有意に増加した。また、唾液分泌刺激となるアセチルコリン受容体の M1 および M3 ムスカリン受容体の mRNA の発現量は運動群と対照群で差はなかった。これら結果は、ラットでは長期間の自発運動により唾液腺での血管新生が誘導され毛細血管での AQP1 の発現量が増加することを示唆する。運動トレーニングによる唾液腺分泌機能の向上は増加した毛細血管から AQP1 を介した水の供給能力が亢進するためと考えられた。

(4) 上記検討に加え、温熱刺激による唾液

腺幹細胞の増殖、分化の制御に関わる細胞内情報伝達系を考察するため、異なった実験系を用いて以下の結果を得た。温度感受性受容器の一つである TRPV1 のアゴニストであるカプサイシンおよび熱刺激をマウス線維芽細胞に負荷した。カプサイシンと熱刺激は両者とも MAP キナーゼを活性化し、細胞骨格の維持に關与するアクチンの重合を促進した。カプサイシンはヒートショックプロテイン (HSP) 70 のみを誘導したが、熱刺激は HSP70 と HSP90 を誘導した。また、熱刺激は TRPV1 の発現を抑制した。

< 引用文献 >

Sugimoto N, Matsuzaki K, Ishibashi H, Tanaka M, Sawaki T, Fujita Y, Kawanami T, Matsaki Y, Okazaki T, Sekine J, Koizumi S, Yachie A, Umehara H, Shido O, Upregulation of aquaporin expression in the salivary glands of heat-acclimated rats: *Sci Rep*, 3:1763, 2013

Sugimoto N, Shido O, Matsuzaki K, Ohno-Shosaku T, Hitomi Y, Tanaka M, Sawaki T, Fujita Y, Kawanami T, Masaki Y, Okazaki T, Nakamura H, Koizumi S, Yachie A, Umehara H, Cellular heat acclimation regulates cell growth, cell morphology, mitogen-activated protein kinase activation, and expression of aquaporins in mouse fibroblast cells: *Cell Physiol Biochem*, 30(2):450-457, 2012

Pringle S, Nanduri LS, van der Zwaag M, van Os R, Coppes RP. Isolation of mouse salivary gland stem cells. *J Vis Exp*. Feb 8;(48). pii: 2484, 2011

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)

Matsuzaki K, Sugimoto N, Katakura M, Sumiyoshi E, Hara T, Hashimoto M, Shido O, Daily voluntary exercise enhances pilocarpine-induced saliva secretion and aquaporin 1 expression in rat submandibular glands: *FEBS Open Bio*, 8(1): 85-93, 2017 (査読有)

Sugimoto N, Katakura M, Matsuzaki K, Nakamura H, Yachie A, Shido O. Capsaicin partially mimics heat in mouse fibroblast cells in vitro. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 390(3):281-289, 2017 (査読有)

[学会発表](計 1 件)

松崎健太郎、住吉愛理、片倉賢紀、原俊子、杉本直俊、紫藤 治。運動トレーニングによるラットの唾液腺機能変化。日本生気象学会大会、2016 年 11 月、札幌。

[図書](計 1 件)

紫藤 治、松崎健太郎、杉本直俊。温熱生理学から考える口腔乾燥症の治療方法-暑熱馴化による唾液腺でのアクアポリンの発現亢進と血管新生。島根医学、2018 (in press)

[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

紫藤 治 (SHIDO, Osamu)

島根大学・医学部・教授

研究者番号： 40175386

(2)研究分担者

片倉 賢紀 (KATAKURA, Masanori)

城西大学・薬学部・准教授

研究者番号： 40383179

松崎 健太郎 (MATSUZAKI, Kentaro)

島根大学・医学部・助教

研究者番号： 90457185

(3)連携研究者

なし

(4) 研究協力者

杉本 直俊 (SUGIMOTO, Naotoshi)

住吉 愛理 (SUMIYOSHI, Eri)