

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590278

研究課題名(和文) 暑熱馴化による唾液腺機能亢進の分子機序の解明：ドライマウス治療への応用を目指して

研究課題名(英文) Mechanism of heat acclimation-induced improvement of salivary secretion in rats

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) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：暑熱負荷による唾液腺機能亢進のメカニズムを検討した。2日間の暑熱曝露により、ラット顎下腺のアクアポリン(AQP)1と5のmRNA発現量が有意に増加した。AQP1の蛋白量は2日および5日の暑熱曝露により有意に増加した。AQP5は顎下腺の漿液腺の腺房細胞の管腔側に強発現しAQP1は血管内皮細胞に発現した。AQPの誘導にはVEGF、HIF-1の関与が示唆された。自発運動により、ラットの顎下腺組織のAQP1の蛋白発現量がやや増加した。TRPV1等の蛋白発現量は影響されなかった。ピロカルピンによる唾液分泌量は運動群でやや高かった。暑熱あるいは運動は唾液腺のAQP発現を増加させ、唾液分泌機能を改善する。

研究成果の概要(英文)：We investigated mechanism of heat exposure-induced improvement of salivary function in rats. Two-day heat exposure increased expressions of aquaporin (AQP)1 and 5 mRNA in submandibular glands of rats concomitant with the promotion of the HIF-1 $\alpha$  pathway, leading to VEGF induction. The protein level of AQP1 was raised after 2 or 5 day-heat exposure. The apical membrane distribution of AQP5 in serous acinar cells enhanced after heat acclimation, while AQP1 expression was restricted to the endothelial cells in the submandibular glands. Spontaneous exercise for 40 days tended to elevate AQP1 protein level of the rat submandibular glands, whereas it failed to affect AQP5 expression and protein levels of TRPV1, V3 or Na-K ATPase, relating to induce AQP5. Pilocarpine-induced salivary secretion was slightly elevated. These results suggest that in rats, heat exposure or exercise facilitates AQP expression in salivary glands, which may then contribute to improving saliva gland function.

研究分野：医学

科研費の分科・細目：環境生理学

キーワード：暑熱曝露 暑熱馴化 アクアポリン 唾液腺 口腔乾燥症

## 1. 研究開始当初の背景

唾液には様々な生理学的作用を有しており、ヒトにおいてその作用が失われると、口腔乾燥症(いわゆるドライマウス)となり、味覚異常、口内炎、舌痛症、摂食障害、発音障害など様々な症状が現れる。現在、本邦では口腔乾燥症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簡便な治療法が求められていた。げっ歯類では暑熱曝露や深部体温の上昇により、蒸散性熱放散反応として唾液の分泌が促進され、その体表面への塗布により(saliva spreading)熱放散が維持される。また、他の動物でも暑熱負荷時には唾液分泌の促進と浅促呼吸(panting)の組み合わせにより、蒸散性熱放散が維持される。近年、ヒトにおいても運動時などで体温が上昇するとpanting様の過呼吸が起こることが示されている。暑熱負荷や深部体温の上昇の繰り返しにより、動物には暑熱馴化(特に短期の暑熱馴化)が成立するが、この時、蒸散性および非蒸散性熱放散機能が亢進し、耐暑熱性が向上する。すなわち、暑熱馴化した動物では、暑熱曝露時の唾液の分泌量が対照動物よりも著増する。そこで、これらの知見を踏まえ、我々はヒトの口腔乾燥症の治療のため、非侵襲的で簡便な装置である「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)を開発した。しかし、温熱刺激による唾液分泌促進のメカニズムは検討されておらず、今後の口腔乾燥症治療の改善・発展および温度馴化の研究の進展のためには、その分子メカニズムが解明されること必要であった。

## 2. 研究の目的

(1) 唾液の主成分は水であり、唾液の分泌量は直接に唾液の水分量に依存する。唾液腺各部位には水チャネルであるアクアポリン(AQP)のホモログが数種類存在し、唾

液腺に分布する血管、唾液腺房細胞の基底膜側と管腔側、介在部等において水の透過性を変化させることで生理的に唾液の分泌量を調節する可能性が強く示唆されている。事実、AQP5のノックアウトマウスやAQPの一部ミュータントラットでは唾液の分泌量が激減することが報告されている。したがって、暑熱馴化による動物の唾液腺分泌亢進のメカニズムの一つとして、唾液腺組織(分布する血管を含む)におけるAQPの発現の亢進が挙げられる。そこで、ここでは暑熱馴化によって唾液腺のAQP発現が亢進するか否か、高発現するAQPのホモログの特定、およびそれらの唾液腺における局在を検討した。さらに、AQPの誘導と細胞膜への移動および細胞膜上の維持に関与する分子メカニズム(transient response potentials, TRP; hypoxia inducible factor-1, HIF-1 など)を検討した。

(2) 運動は体熱産生を増加させ深部体温を上昇させるので、体温調節機構には暑熱負荷と類似する刺激となるため、運動の繰り返しは暑熱馴化と同様な生理学的変化を誘導する(交叉適応)。さらに、先述のように運動時にはヒトにおいてもpanting様の反応が起こることが知られ、気道の乾燥の防止や選択的脳冷却の維持のために唾液の分泌亢進が必要となる。そこで、ラットの運動トレーニングにより、唾液腺のAQPの発現の増強を介して唾液分泌機能が亢進するかを検討した。

(3) これまでの検討によりAQPの誘導と移動にはHIF-1が関すること、ならびに、高温自体がAQPを誘導する可能性が示唆されている。そこで、高温での細胞培養によるAQP誘導関連因子の発現の変化を観察するため、培養細胞によりHIF-1およびAQPの膜移動に関与するheat shock protein(HSP)の発現が高温によりいかに

影響されるか検討した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 暑熱曝露による AQP および AQP 誘導関連因子の発現

動物と暑熱馴化：ウイスタ - 系雄ラットを用いた。ラットは環境温 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する。1 週間飼育環境へ慣らした後、暑熱馴化ラットは 32℃ の高温環境で飼育し、対照ラットは 24℃ の一定環境温下で飼育した。

唾液腺のサンプリング：暑熱曝露開始から 2、5、40 日後、ラットをベントバルビタールにて麻酔し、顎下腺を摘出した。なお、暑熱曝露期間 2.5 日は短期暑熱馴化、40 日で長期暑熱馴化が得られると考えられる。

AQP の解析：暑熱馴化ラットと対照ラットそれぞれにおいて、顎下腺から mRNA とタンパク質を回収し、唾液腺に発現していることが知られる AQP のタイプおよび可能性のあるタイプとして AQP1、3、4、5、6、8、9 の mRNA 発現量および蛋白量をそれぞれリアルタイム PCR 法とウエスタンブロット法で解析した。

AQP の局在：顎下腺の凍結あるいはパラフィン包埋切片を作成し、暑熱馴化により強発現した AQP のそれぞれについて免疫組織化学的に染色し、短期あるいは長期の暑熱馴化によりどのタイプの AQP が血管や腺房細胞、導管部の介在部や顆粒細胞の基底膜側あるいは管腔側のどこに局在するか解析した。

AQP 発現あるいは細胞膜への移動に関する分子の検索：と同様に、顎下腺から mRNA を回収し、TPRV1、V4、HIF-1、転写因子の GATA-6、AQP5 および AQP2 発現や細胞膜移動に関与するとされる HSP60 や HSP70 の mRNA などの発現量を解析した。

ピロカルピンおよび暑熱負荷による唾液分泌量：暑熱馴化ラットおよび対照ラットの腹腔内へのピロカルピンの投与および 36℃ の高温環境に曝露し、唾液の分泌を誘導した。唾液の分泌量を口紙法により、さらに、唾液中の Na 濃度を測定した。

#### (2) 自発運動によるラット唾液腺の AQP の誘導

ウイスタ - 系雄ラットを用いた。ラットは環境温 24℃、明暗周期 12:12 時間、自由摂食・摂水下、輪回しつきケージで飼育した。ラットを自発運動が可能な運動トレーニング群と、輪を固定して運動ができない対照群に分けた。自発運動により、深部体温が上昇することをテレメトリーシステムにより確認した。自発運動によるトレーニング効果が表れるとされる 4~8 週間の運動期間の終了後(今回は 40 日間とした)、運動トレーニング群と対照群の顎下腺の AQP mRNA 発現量を検討した。また、腹腔内へのピロカルピン投与による唾液の分泌量を測定した。

#### (3) 高温での細胞培養による AQP 誘導関連因子の発現の変化

これまでの検討により AQP の誘導には hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) が関与すること、ならびに、高温自体が AQP を誘導する可能性が示唆されている。ここでは、mouse fibroblast cell (NIH3T3) を用い、TRP、HIF-1 および HSP の発現量が高温によりいかに影響されるか検討した。細胞は 37.0℃、5% CO<sub>2</sub> 下あるいは 39.5℃、5% CO<sub>2</sub> 下で 3 時間、24 時間あるいは 5 日間培養した。

### 4. 研究成果

実験の (1) はその内容が既に国際誌に公表されているが、(2) および (3) は未発表の部分を含むため、成果はその一部を示

すにとどめた。

#### (1) 暑熱曝露による AQP および AQP 誘導関連因子の発現

2 日間の暑熱曝露により、顎下腺の AQP1 と 5 の mRNA 発現量が有意に増加した。AQP3、4、6、9 の mRNA は対照ラットおよび暑熱馴化ラットでは発現しなかった。AQP8 の mRNA は量群で発現したが、発現量に差は無かった。AQP1 と 8 の蛋白量は 2 日および 5 日の暑熱曝露により有意に増加した。暑熱曝露により AQP5 は顎下腺の漿液腺の腺房細胞の管腔側に強発現したが、粘液腺には発現しなかった。

AQP1 は血管内皮細胞に強く発現した。また、暑熱曝露により顎下腺 VEGF、HIF-1

および HSP60 と HSP70 の mRNA 発現量が有意に増加した。また、40 日間の暑熱曝露後には AQP の強発現はなかった。これらから、短期の暑熱曝露により血管には AQP1 が漿液腺の腺房細胞には AQP5 が誘導されることにより、水の移動量を増し、唾液腺分泌量が増加する可能性が強く示唆された。さらに、AQP の誘導には VEGF、HIF-1 が関与し、細胞膜表面への移動には HSP が関与すると考えられた。これら結果は、暑熱曝露（暑熱馴化）によるラットの唾液腺機能亢進の分子メカニズムを始めて明らかにした知見となった。

暑熱馴化ラットへの急性暑熱曝露により、唾液分泌量は対照ラットにくらべ、やや増加した。しかし、ピロカルピンの投与による唾液分泌は暑熱馴化によりほとんど影響されなかった。

#### (2) 自発運動によるラット唾液腺の AQP の誘導

運動トレーニングと暑熱馴化には交叉適応がある。本年度はラットの自発運動による AQP1 と AQP5 の発現の変化を検討した。ウィスタ - 系雄ラットを環境温 24 °C、明暗

周期 12:12 時間、自由摂食・摂水下、輪回しつきケージで飼育した。ラットを自発運動が可能な運動群と、運動ができない対照群に分けた。自発運動量の個体差が大きく、運動群をさらに低運動群と高運動群に分けた。40 日間の運動期間後、運動群と対照群の顎下腺の AQP のタンパク発現量を検討した。顎下腺組織の AQP1 のタンパク発現量は対照群に比べ両運動群でやや大きかった。AQP5 や AQP 誘導に関与する TRPV1、V3 や Na-K ATPase のタンパク発現量も両運動群と対象群で差は無かった。ピロカルピンによる唾液の分泌量は対照群と比べ低運動群でやや高かった。輪回しによる自発運動は AQP の誘導と唾液分泌に有効である可能性も考えられた。

#### (3) 高温での細胞培養による AQP と AQP 誘導関連因子の発現の変化

高温での細胞培養により AQP1 と 2 の mRNA および AQP4、5 の蛋白発現量が増加した。さらに、HIF-1 および HSP70、90 の蛋白発現量が増加した。HSP の発現は高温環境曝露後 3 時間では見られなかったが、24 時間後に確認された。温度刺激が直接 AQP を誘導する系を賦活化し、AQP を誘導する可能性が示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文 計 3 件]

Sugimoto N, Shido O, Matsuzaki K, Katakura M, Hitomi Y, Tanaka M, Sawaki T, Fujita Y, Kawanami T, Masaki Y, Okazaki T, Nakamura H, Koizumi S, Yachie A, Umehara H. Long-term Heat Exposure Prevents Hypoxia-Induced Apoptosis in Mouse Fibroblast Cells. Cell Biochem Biophys. 2014 Mar 20. [Epub ahead of print]

Sugimoto N, Matsuzaki K, Ishibashi H, Tanaka M, Sawaki T, Fujita Y,

Kawanami T, Masaki 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. 2013;3:1763. doi: 10.1038/srep01763.

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. 2012;30(2):450-7. doi: 10.1159/000339038

[学会発表 計 2 件]

松崎健太郎、杉本直俊、片倉賢紀、宮本まゆみ、原 俊子、紫藤 治。ラット暑熱馴化形成時の唾液分泌機能変化。第 51 回日本生気象学会、2012 年 11 月 9 日、松本。

杉本直俊、松崎健太郎、紫藤 治。短期～長期温熱刺激が細胞の耐熱性へ与える影響。第 51 回日本生気象学会、2012 年 11 月 9 日、松本。

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表

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

松崎 健太郎 (MATSUZAKI, Kentaro)  
島根大学・医学部・助教  
研究者番号 90457185

片倉 賢紀 (KATAKURA, Masanori)  
島根大学・医学部・助教

研究者番号 40383179

橋本 道男 (HASHIMOTO, Michio)  
島根大学・医学部・准教授  
研究者番号 70112133