

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 26 日現在

機関番号：32707

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24593014

研究課題名(和文)慢性ストレスによる唾液タンパク分泌異常の機序解明とそのドライマウス診療への応用

研究課題名(英文)Elucidation of mechanism in alteration of salivary protein secretion due to chronic stress and its clinical use for dry mouth patients

研究代表者

吉野 陽子 (Yoshino, Yoko)

相模女子大学・公私立大学の部局等・准教授

研究者番号：70298248

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：慢性ストレスは持続的に交感神経が刺激されている状態と考えられるため、マウスに アドレナリン受容体アゴニストのフェニレフリンを長期投与し、唾液タンパク分泌変化の機序解明を行った。このマウスでは、カリクレインとEGFの分泌低下、ならびに顎下腺上皮細胞におけるカルシウム濃度上昇の有意な低下がみられた。また、小胞体ストレス下で応答するシャペロンタンパクGRP78/Bipと翻訳抑制因子eIF2 のタンパク発現量が有意に上昇していた。さらに、分泌顆粒の染色性低下と面積の減少が観察された。これらは、eIF2 のリン酸化による唾液タンパク翻訳抑制が起きた結果として、分泌顆粒の形成不全が生じたものと推察された。

研究成果の概要(英文)：The objective of the present study was to examine the mechanism of decrease in salivary protein and kallikrein under chronic stress. Male ICR mice at 13 weeks of age were divided into two groups; Phenylephrine was intramuscularly injected with 5 mg/kg twice a day for 5 days (PHE) and physiological saline in the same time schedule (CTL). The pilocarpine-stimulated whole saliva was collected and the parotid and submandibular glands were removed. Salivary protein, EGF concentration and kallikrein activity were significantly decreased in the PHE in comparison with CTL. The CCh-induced Ca²⁺ release was significantly reduced in PHE groups compared with that in CTL groups. The expression of ER chaperone, glucose-regulated protein 78 (GRP78/Bip) and translational attenuation, phospho-eIF2 was significantly increased in the PHE groups. The area of secretory granule was significantly poorly-stained and decreased in PHE groups in comparison with CTL in hematoxylin eosin stain.

研究分野：口腔科学

キーワード：慢性ストレス 唾液タンパク カリクレイン 小胞体ストレス GRP78/Bip phospho-eIF2

1. 研究開始当初の背景

ストレスは、視床下部—交感神経系と視床下部—下垂体—副腎系を刺激する。この視床下部—交感神経系刺激は、唾液腺にも影響を及ぼす。唾液腺は全身に影響を与える生理活性物質を数多く分泌する。ストレスによって唾液分泌に変化が生じた場合、身体調節機能に異常をきたすことが懸念されるため、ストレスによる唾液分泌の変化のメカニズムを解明することは重要である。

慢性ストレスは持続的に交感神経が刺激されている状態と考えられるため、マウスに α_1 アドレナリン受容体アゴニストのフェニレフリン (PHE) を長期投与し、その持続的な交感神経受容体刺激による唾液タンパク分泌変化の機序解明を検討してきた。PHE の長期投与は唾液タンパクの機序解明の実験モデルとして有用と考えられる。

2. 研究の目的

このモデルマウスでは、唾液中の EGF とカリクレインの分泌低下が認められた。EGF は口腔粘膜や胃粘膜の治癒促進など多くの作用を持つ生理活性物質であり、生体にとって重要と考えられる。顎下腺では、Pro-EGF がカリクレインによるプロセッシングを受けて EGF となり、分泌顆粒内に貯蔵された後、唾液中に分泌される。唾液中の EGF 濃度の低下にはカリクレイン低下の関与が推察される。

また、心理的ストレスに関連する変化として、小胞体ストレス (ER stress) の関与が示唆されている。小胞体ストレスは、飢餓や食餌制限、拘束ストレスなどの慢性ストレスによっても起こり、糖尿病や神経変性疾患など多くの病気に関連しているとされている。このような、タンパク合成における翻訳の障害も 1 つの原因になると推察される。

そこで、本研究では慢性ストレスを想定して、 α_1 アドレナリン受容体アゴニストの PHE をマウスに長期投与し、このマウスにおいて観察されるカリクレインおよび EGF 分泌低下のメカニズムについて、シグナル伝達経路と小胞体ストレスの両方の関与を明らかにすることとした。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

13 週齢の ICR 雄マウスを用い、コントロール群 (CTL 群) には生理的食塩水を、PHE 投与群には PHE (5mg/kg) を 1 日 2 回 5 日間筋注した。ピロカルピン刺激による唾液を 20 分間採取し、その後顎下腺を摘出した。

(2) 組織学的検討

顎下腺組織を一部は HE 染色し、また、Pro-EGF と EGF の局在を免疫染色により検討した。

(3) ウェスタンブロッティング

ウェスタンブロッティングは、分子シャ

ペロンである Glucose-regulated protein (GRP)78/Bip と翻訳抑制因子である phospho-eIF2 α のタンパク発現量を PHE 群と CTL 群で比較した。

4. 研究成果

(1) 顎下腺組織における EGF のタンパク発現量

顎下腺組織中の EGF タンパク発現量は CTL に比べて PHE 群の方が有意に低かった (図 1)。

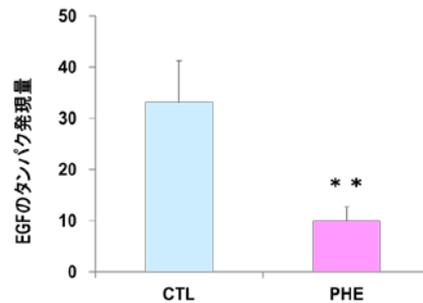


図 1. 顎下腺組織における EGF のタンパク発現量

(2) 顎下腺組織像の変化

HE 染色において、分泌顆粒の染色性と低下と面積の減少が観察され、分泌タンパクの産生減少が示唆された (図 2)。

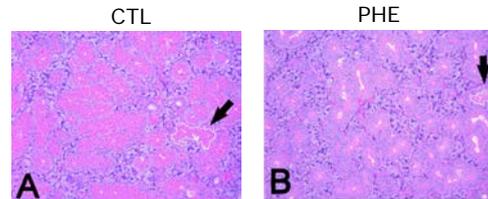


図 2. 顎下腺組織像の変化

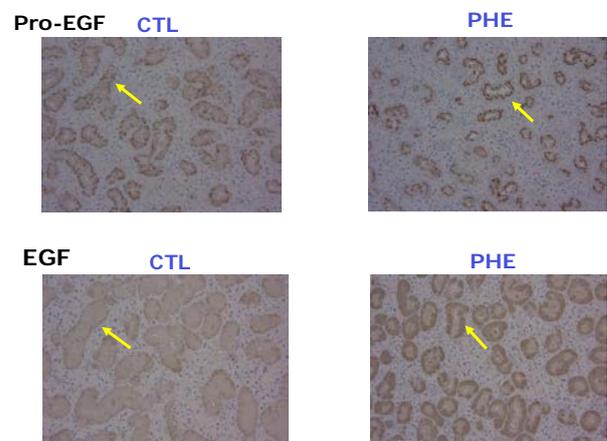


図 3. Pro-EGF と EGF の局在

また、CTL に比べて PHE マウスの方が Pro-EGF の発現が濃く、導管側より腺組織周囲に密になっていた。

さらに、CTL では、EGF 発現が細胞質に均一にみられるのに対して、PHE マウスでは腺細胞周囲に密になっていた。したがって、分泌顆粒中の EGF が少ない可能性がある。

これらのことから、PHE 長期投与ではカリクレイン低下による不完全なプロセッシングにより、未熟な EGF が顆粒性導管に貯留し、成熟した EGF 分泌が抑制された可能性が考えられた。

(3) 顎下腺における小胞体ストレス

ウェスタンブロッティングにおいて、PHE 長期投与マウスでは、分子シャペロンである Glucose-regulated proteins (GRP)78/Bip のタンパク発現量ならびに、翻訳抑制因子である eukaryotic translation initiation factor 2 α subunit (eIF-2 α) のリン酸化が有意に上昇していた (図 4, 図 5)。

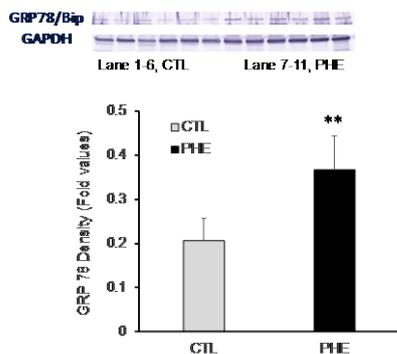


図 5. GRP78/Bip のタンパク発現

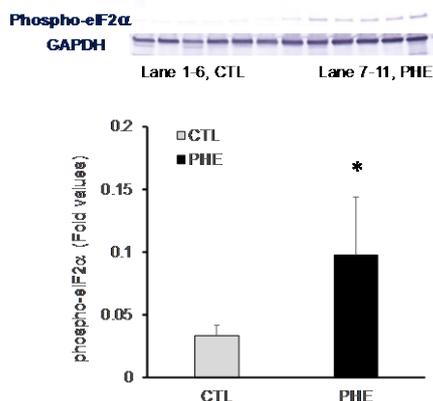


図 6. Phospho-eIF2 α のタンパク発現

また、組織学的には、GRP78/Bip タンパク発現の明らかな上昇は観察されなかったが、陽性に染色された部位の面積の増加が認められ、これがウェスタンブロッティングにおける発現量の増加に表れていたものと推察された (図 7)。

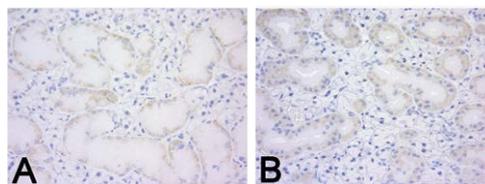


図 7. GRP78/Bip の組織学的変化

以上の結果から、慢性ストレスモデルにおける持続的な交感神経刺激は、顎下腺内のシグナル伝達や小胞体ストレスに影響を与えることにより、生体に異常をもたらす可能性が示唆された。

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 5 件)

- ① Y. Hayashi, T. Saito, T. Ohshima, Y. Nakagawa, T. Arita, A. Yashima, T. Makino, R. Konnai, K. Gomi, T. Arai, N. Maeda: Terminal RFLP analysis to determine the oral microbiota with hyposalivation. Arch Microbiol[DOI 10.1007/s00203-014-0987-x]
- ② Okamoto MR, Kamoi M, Yamachika S, Tsurumoto A, Imamura T, Yamamoto K, Kadomatsu S, Saito I, Maeda N, Nakagawa Y.: Efficacy of Fungiflora Y staining for the diagnosis of oral erythematous candidiasis. Gerodontology 30(3):220-225, 2013
- ③ Kimori H, Yamamoto K, Yamachika S, Tsurumoto A, Kamikawa Y, Sasao M, Morito M, Saito I, Ohshima T, Maeda N, Nakagawa Y.: Factors associated with the presence of atrophic tongue in patients with dry mouth. Gerodontology. 2013 May 30. doi: 10.1111/ger.12045. [Epub ahead of print]
- ④ Takahiro K Imamura, Yoko Yoshino, Shigeo Yamachika, Hisako Ishii, Nobuyuki Y Watanabe, Hiroko Inoue and Yoichi Nakagawa: Inhibition of pilocarpine-induced saliva secretion by adrenergic agonists in ICR mice. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology 39 : 1038-1043, 2012
- ⑤ Yoko Yoshino, Yoichi Nakagawa: Salivary 8-OHdG Induction by Physical Exercise Training Under Food Restriction. The Open Dentistry Journal, 5: 48-51, 2011

[学会発表] (計 6 件)

- ① 吉野陽子、今村武浩、前田伸子、齋藤一郎、中川洋一：長期のアドレナリン受容体刺激が及ぼす唾液タンパク分泌低下のメカニズム 第 35 回日本歯科薬物療法学会学術集会 (神奈川) 平成 27 年 6 月
- ② 吉野陽子、今村武浩、山近重男、高橋絢子、齋藤一郎、前田伸子、中川洋一：長期のアドレナ

リン受容体刺激が及ぼす小胞体ストレス
第 69 回日本口腔科学学会学術集会（大阪）
平成 27 年 5 月

- ③ 吉野陽子、今村武浩、山近重男、齋藤一郎、前田伸子、中川洋一：慢性ストレスによる唾液 EGF 分泌抑制のメカニズム～PKC と分泌顆粒の関与～ 第 34 回日本歯科薬物療法学会学術大会（大阪）平成 26 年 6 月
- ④ 吉野陽子、今村武浩、山近重男、高橋絢子、齋藤一郎、前田伸子、中川洋一：慢性ストレスにおける唾液上皮成長因子 EGF 分泌抑制のメカニズム 第 68 回日本口腔科学学会学術集会（東京）平成 26 年 5 月
- ⑤ 吉野陽子、今村武浩、山近重男、前田伸子、中川洋一：慢性ストレスにおける唾液分泌機能の変化—唾液中の EGF 濃度の変化— 第 33 回日本歯科薬物療法学会学術大会（東京）平成 25 年 6 月
- ⑥ 吉野陽子、今村武浩、山近重男、井上裕子、齋藤一郎、前田伸子、中川洋一：慢性ストレスにおける唾液分泌抑制における PKC-ERK1/2 の関与 第 67 回日本口腔科学学会学術集会（栃木）平成 25 年 5 月

〔図書〕（計 1 件）

- ① 吉野陽子、東條仁美他 11 名：建帛社 新版マネジメント応用栄養学 2015 年 12 月刊行予定 230 頁

〔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：
出願年月日：
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

吉野 陽子 (Yoshino Yoko)
相模女子大学・栄養科学部・准教授
研究者番号：70298248

(2) 研究分担者

中川 洋一 (Nakagawa Yoichi)
鶴見大学・歯学部・講師
研究者番号：90148057

(3) 連携研究者

()

研究者番号：