

機関番号：63905

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590225

研究課題名 (和文) 唾液分泌における傍細胞輸送の駆動力と細胞内信号による調節

研究課題名 (英文) Driving force of paracellular transport and its control by intracellular signals.

研究代表者

村上 政隆 (MURAKAMI MASATAKA)

生理学研究所・細胞器官研究系・准教授

研究者番号：10104275

研究成果の概要 (和文)：傍細胞水／溶質輸送がどのような駆動力で維持されるか、またいかなる細胞内信号で制御されるかを明らかにするため、摘出血管灌流ラット顎下腺を用い実験した。細胞内 cAMP 濃度を増加させる刺激は、タイト結合を開き、静水圧を駆動力として少量の傍細胞水輸送を起こした。一方、細胞内 Ca 濃度を増加させる刺激もタイト結合を開き、灌流圧を駆動力として傍細胞水分輸送を起こすが、未知の駆動力も働き大量の傍細胞水輸送となった。

研究成果の概要 (英文)：The isolated and vascularly perfused mandibular gland of rat was used to assess driving force of paracellular water/solute transport and its control by intracellular signals. The intracellular cAMP-increasing stimulant opens tight junction and induces small paracellular fluid secretion by increasing perfusion pressure. The intracellular Ca-increasing stimulant also opens the tight junction and induced a massive paracellular water/solute transport by perfusion pressure and additional unknown driving force.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：唾液腺、タイト結合、傍細胞輸送、血管灌流、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

(1) 唾液水分分泌研究の意義。唾液水分は、食物を消化吸収するために溶媒として働き、口腔を洗い清浄に保つ、唾液成分は口腔から体内への侵害に対しバリアとして働く。従って唾液分泌の障害は口腔内の雑菌による感染、嚥下障害、摂食障害につながり、QOLを損ない、重篤な疾病を招来する危険がある。

唾液腺をはじめ上皮膜は細胞間にタイト結合をもち、管腔側細胞膜と血管側細胞膜を隔て、上皮細胞は管腔側膜と基底側膜に異なるチャンネル／輸送体を配置し、一方向へ分泌・吸収を行うとされ、細胞を通過する輸送成分（傍細胞輸送）とその制御について多くの研究がなされてきた。しかしタイト結合を通過する輸送成分（傍細胞輸送）は、存在の傍証

がありながら、全上皮輸送に対する寄与は十分には解明されていない。

(2) 傍細胞輸送の傍証。刺激により巨大分子が細胞間隙を通過し管腔に出現したこと (Garret, *Adv Physiol Sci* 28: 109-117, 1981)、中性分子の唾液中濃度と分泌速度の関係 (Case, *J Memb Biol* 84: 239-248, 1985) から傍細胞輸送の存在の傍証は挙げられていた。

(3) 傍細胞輸送のフィルターサイズ。村上と Hill は種々の分子量のデキストランをトリチウムで標識しラット顎下腺に血管灌流し、刺激により分泌されるデキストランの大きさと濃度から傍細胞輸送の分子フィルターとしてのサイズを決定し (*J Physiol* 537: 899-906, 2001)、水分子は分泌刺激中タイト結合を自由に通過しうることを示した。

(4) 経細胞水輸送量と傍細胞水輸送量の推定。月田は上皮タイト結合を形成するクロロゲン 3 と 4 にエンテロトキシン (CPE) が結合しバリア機能を阻害することを見出した (*JCB* 147: 195-204, 1999)。腺房単離に用いるコラゲナーゼは CPE を含有し、単離した腺房では培地の蛍光色素がやすやすと管腔に入ることが理解された。瀬川と申請者はこの性質を利用し、コラゲナーゼで単離した腺房では管腔内蛍光色素が細胞から分泌された水分で希釈される経過を共焦点レーザー顕微鏡で計測し経細胞分泌の時間経過を世界で初めて計算した (*Eur J Morphol* 40: 203-207, 2002)。摘出灌流腺全体の分泌量と比較すると、刺激初期 30 秒以内は細胞内からの水分分泌が優位であるが、その後傍細胞輸送が優位になり刺激持続期には 60%以上に達すると計算した (同上)。すなわち、唾液腺水分分泌は腺房細胞管腔膜にあるアクアポリン 5 (AQP5) が大きな役割を持つとされてきた (Ma, *JBC* 274:20071-20074, 1999) が、申請者は刺激持続期には傍細胞輸送が大きく寄与すると予測した。

(5) タイト結合開閉の調節モデル。村上と Hill は AQP5 の水透過以外の機能を、基底膜にも AQP5 が発現しているラット顎下腺を用い検討した。その結果、基底側膜 AQP5 が浸透圧を感知しタイト結合の開閉を調節するモデルを実験的に裏づけた。 (*J Membr Biol* 210:203-207, 2006)

2. 研究の目的

本研究の目的は、傍細胞水輸送がどのような駆動力で維持されるのか、またどのような細胞内信号で制御されるのかを摘出血管灌流ラット唾液腺をもちい、明らかにすること

にある。そのために、以下の目標を設定した。

(1) 細胞を通過しない色素分泌と水分分泌の関係を明らかにし、色素分泌の計測により傍細胞水輸送を推定する方法を開発する。

(2) タイト結合を介した静水圧差、浸透圧差を変化させ駆動力を検討する。

(3) 細胞内信号による結合の開閉調節を検討する。

(4) タイト結合の開閉にともなう細胞内骨格と結合部の電子顕微鏡観察を行う。

3. 研究の方法

(1) 本研究では、傍細胞輸送の駆動力と細胞内信号を評価するため、実験系として摘出血管灌流ラット顎下腺を用いた。すなわち、傍細胞輸送系の構築を保った状態で水輸送を観察する為には実験系としては血管灌流臓器を用いる方法あるいは *in situ* の臓器を用いるほかはないからである。ウイスター系雄性ラット (9週令) をペントバルビタール腹腔麻酔下で顎下唾液腺を摘出、動静脈及び唾液排出導管 (以下 導管) にカニューレションを施し、37°C に保った恒温チャンバーに設置し、100%酸素ガスで飽和した灌流液 (mM: Na 145, K 4.3, Ca 1, Mg 1, glucose 5, HEPES 10, pH=7.4) で拍動ポンプを用い、動脈より定流灌流を行った。(Murakami et al, *J Physiol* 426:127-143, 1990)

(2) 導管カニューレには規格化したフッ素樹脂製 (内径0.3mm, 外径0.5mm) を用いた。唾液分泌速度は電子天秤におかれたカップに水を入れ、水面下に水で満たしたカニューレをおき、分泌された累積唾液重量を計時的に電子天秤データとして3秒毎に接続したコンピュータに送信し、エクセルシートに格納した。実験後、腺の結合組織を除去し、水分を除いた後腺湿重量を計測し、比重1と仮定して、グラム重量あたり1分当りの水分分泌速度を計算した。

(3) 細胞内を通過しない蛍光色素ルシファーイエロー (mw=520) あるいはスルフォローダミン B (mw=558) を灌流液に添加し、動脈から唾液中への色素移行を測定し傍細胞輸送を推定した。この場合、唾液は1分毎にエッペンドルフチューブに採取、電子天秤にて秤量し分泌速度を求めた。この試料に100マイクロリットルの蒸留水を添加し攪拌希釈後、マイクロ

プレートリーダー（ベックマンTX800）にて蛍光強度を測定した。測定値は、希釈系列の値から検量線を求め、希釈率を考慮して1分当りの蛍光物質の分泌速度を求めた。この方法により水分分泌と傍細胞輸送を同時に推定することが可能になった。

また、共焦点レーザー顕微鏡のステージ上に血管灌流唾液腺を設置し、高速スライス像から一秒毎の3次元像を再構成し、刺激により細胞間分泌細管内に色素が流入する経過を観察した（東京歯科大学／日本大学との共同実験）。

(4) 動脈圧及び静脈圧の測定。灌流系の動脈側、静脈側に血圧プローブ（AD Instruments, NSW, Australia）を置き、動静脈の圧差をもとめた。

4. 研究成果

(1) 静水圧による傍細胞水輸送の検討。初年度に、灌流動脈圧を計測する測定系を立ち上げ3年間継続してこの測定系をもちい、実験した。以下はムスカリン受容体を刺激し細胞内Ca濃度を上昇させることが知られているカルバコールを用いた実験結果である。

- ① 組織重量1gあたり10ml/minの流速で血管灌流を行うと、約120-160mmHgの流入圧であるが、カルバコールで刺激すると100mmHgまで低下し刺激中は一定値を保った。流速を6ml/minから25ml/minの間で変化させると、80-250mmHgの間で流入圧が線形的に変化した。流速と流入圧の線形関係から入力抵抗とゼロフローでの圧力（毛細管圧）を求めた。
- ② 種々のカルバコール濃度に対して入力抵抗は用量依存的に減少したが、ゼロフロー抵抗は一定であった。このデータを基に分泌刺激中に流速を変化させることで静水圧が変化することになる。この静水圧変化は唾液分泌速度を変化させた。一定流速の血管灌流唾液腺で初めての知見である。また流速を増加させると、唾液分泌速度も増加した。これは流速を上昇させると組織圧が上昇し傍細胞経路輸送の駆動力になったことを示唆する。
- ③ 従来よりムスカリン受容体刺激でNOが産生され血管抵抗が低下し血流を増加させる機構が提示されていた。NO合成阻害剤L-NAME=0.3mMを与えると圧は140 mmHgから180 mmHgに上昇したが、カルバコールにより 111 ± 9 mmHgに低下し、L-NAMEがない場合の 103 ± 5 mmHgに対し有意差はなく、分泌刺激中の動脈圧はNOには依存しない

ことが判明した。

- ④ カルバコール刺激下で、灌流流速を変化させ、毛細管床の静水圧を上昇させた場合、蛍光色素分泌速度が静水圧に比例して増加した。一方、高静水圧では水分分泌は比例して増加しなかったが、低圧側の測定では水分分泌速度と静水圧は比例し、高圧では水がリークする可能性が示された。

即ち、唾液水分分泌のうち大部分を占める傍細胞輸送は a) 灌流圧が駆動力になり溶媒が起動することにより起こる。b) 溶媒移動に牽引され水と溶質が移動すると結論された。

(2) 細胞内cAMP濃度を上昇させることが知られているイソプロテレノールを用いた実験結果は以下の通りである。

- ① 灌流腺を共焦点レーザー顕微鏡ステージにおき、蛍光色素ルシファーイエロー(mw=520)あるいはスルフォローダミンB(mw=558)を灌流し高速で64枚/秒のスライス像をイメージプロセッサに取り込み、1秒の時間間隔で細胞間隙と分泌細管の3次元像を再構成した結果、蛍光マーカーがイソプロテレノール刺激によりタイト結合を越えて分泌細管に入ることが明確になった。このことは細胞内cAMP濃度の上昇によりタイト結合の蛍光マーカーに対する透過性が上昇し、血管側より色素が管腔に流入したことを示している。
- ② イソプロテレノール投与時に灌流流速を変化させ、腺房周囲の静水圧を上昇させた場合の水分分泌速度を電子天秤により測定した。イソプロテレノールを添加しない場合でも、灌流圧の変化（120-220mmHg）により水分分泌の変化（0.8-7.1 μ l/g-min）が観察された。圧と水分分泌の関係は線形関係にあり、わずかな隙間を通過して水分分泌が駆動されることが観察された。無刺激で唾液が血圧に駆動されて分泌することが初めて実験的に確認された。イソプロテレノール0.2 μ M投与により動脈血圧の変化は観測されなかった。灌流圧の変化（117-209 mmHg）により水分分泌の変化（1.2-6.8 μ l/g-min）が観察された。圧と水分分泌の関係は線形関係にあり、無刺激と同様にわずかな隙間を通過して水分分泌が駆動されることが観察された。イソプロテレノール投与で蛍光マーカーが管腔に流入した結果と矛盾し、更なる検討が必要である。
- ③ 急速凍結法によるディープエッチング・フリーズフラクチャーレプリカ法により、タイト結合と腺腔側膜直下の細胞骨格の超微構造変化について検討した。タイト結合を構成する膜内粒子は、細胞膜直下に介在する短小な微細線維を介し、深部のアクチン線維束と直接結合していた。カルバコール / イソプロテレノール 混合刺激によ

り、腺腔面の平滑化と分泌顆粒の融合が起こると共に、タイト結合を構成する膜内粒子の配列が変化し基底側方向に伸長した。タイト結合の膜内粒子と細胞膜を裏打ちする短小な微細線維を介して、直下のアクチン線維との直接、結合しており、タイト結合部および腺腔側膜直下のアクチン線維束は、非刺激群に比べ刺激群ではより密となっていた。このことから、腺腔側細胞膜直下のアクチン細胞骨格の動的な構造変化にともない、タイト結合の膜貫通蛋白の局在が変化し、傍細胞輸送経路の透過性が亢進する可能性が示された。

(3) 細胞内Ca濃度を増加させる刺激薬、ピロカルピンおよびニューロキニンAを、灌流顎下腺に投与し、蛍光色素ルシファーイエローの分泌と水分分泌を検討した。

① これらの刺激薬がルシファーイエローの唾液への移行を起こすことから、傍細胞輸送が増加することが明らかになった。

② 灌流液から唾液へのルシファーイエローの移行はCa free灌流液、Caキレート剤BAPTA-AMにて阻害された。このことからニューロキニンA/ピロカルピンが誘発する傍細胞輸送はCa依存性であることが示された。

(4) 唾液腺の水分分泌を増加させる漢方薬のうち、この漢方薬のみで傍細胞経路の開閉を起す丹参(DS)について傍輸送を検討した。

① 同じ腺を用いカルバコール刺激と比較すると、DSの水分分泌速度は1 μMカルバコール刺激よりも高く、ルシファーイエロー分泌は低いことが観察された。このことは、小さい分子を通す傍細胞経路がより活性化されることを示唆している。

② 灌流顎下腺の動脈側と静脈側に酸素電極を設置し、酸素消費を測定した。酸素消費は色素分泌とほぼ並行して増減した。酸素消費と水分分泌は、Na/K ATPase阻害剤であるウアバインに感受性があることから、刺激時に傍細胞輸送系が活性化され優位になるが、経細胞イオン輸送機構にも依存している可能性が示唆された。

③ DSの水分分泌はCaなしの溶液での灌流では観察されないことから、傍細胞輸送もCa依存性で誘発されると示唆された。

(5) 本研究により得られた成果をまとめると現時点までに以下の結論が得られた。

① タイト結合は細胞内Ca濃度を増加させる刺激薬(カルバコール、ニューロキニン、ピロカルピン)、細胞内cAMP濃度を増加させる刺激薬(イソプロテレノール)で開き、さらにnon-adrenergic non-cholinergicの刺激薬(丹参)でも開く。

② タイト結合の開放により、傍細胞水輸送が

可能になり、静水圧が一部駆動力として水分輸送を起こしている。

③ 細胞内のCa濃度上昇では、静水圧増加に加えて別の水輸送駆動力が働いている。

④ タイト結合解放時にタイト結合直下の細胞骨格格子の狭小化が見られる。

⑤ 細胞内cAMP増加では水分分泌は殆ど増加しないが、蛍光色素は管腔に出現する。これはタイト結合が種々の分子に対してすべて透過性を上昇させるのではないことを示しており、更なる研究が必要である。

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 11 件)

① Tochiyama K, Satoh K, Imaizumi Y, Yokoi M, Murakami M, Seo Y. Magnetic resonance imaging of the temporomandibular joint in the rat compared with low-powered light microscopy. *Arch Oral Biol*, 査読有, in press, 2011.

② Seo Y, Takamata A, Ogino T, Morita H, Murakami M, Lateral diffusion of manganese in the rat brain determined by T1 relaxation time measured by 1H MRI. *J Physiol Sci*, 査読有, in press, 2011.

③ Seo Y, Satoh K, Watanabe K, Morita H, Takamata A, Ogino T, Murakami M, Mn-bicine: A low affinity chelate for manganese ion enhanced MRI. *Magn Reson Med*, 査読有, 65, 2011, 1005-1012.

④ Qi B, Narita T, Satoh K, Guo M-Y, Katsumata-Kato O, Murakami M, Fujita-Yoshigaki J, Sugiya H, Characteristics of neurokinin A-induced salivary fluid secretion in perfused rat submandibular gland. *Arch Oral Biol*, 査読有, 55, 2010, 737-744.

⑤ Hashimoto S, Murakami M, Morphological evidence of paracellular transport in perfused rat submandibular glands. *J Med Invest*, 査読有, 56, 2009, 395-397.

⑥ Hayashi T, Murakami M, Era S, Preliminary study of modification of serum albumin through paracellular pathway of rat submandibular gland. *J Med Invest*, 査読有, 56, 2009, 393-394.

⑦ Murakami M, Hashimoto S, Wei M, Hill AE, Morpho-Physiological approach to the paracellular route for salivary secretion by isolated perfused submandibular gland. *J Med Invest*, 査読有, 56, 2009, 322-324.

- ⑧ Qi Bing, Narita T, Sugiya H, Murakami M, Pilocarpine-induced salivary fluid secretion in the perfused submandibular gland of the rat. *J Med Invest*, 査読有, 56, 2009, 281-283.
- ⑨ Narita T, Qi B, Matsuki-Fukushima M, Murakami M, Sugiya H, Characterizaion of neurokinin A-evoked salivary secretion in the perfused rat submandibular gland. *J Med Invest*, 査読有, 56, 2009, 278-280.
- ⑩ Ekstrom J, Murakami M, Inzitari R, Khosravani N, Fanali C, Cabras T, Fujita-Yoshigaki J, Sugiya H, Messana I, Castagnola M, RP-HPLC-ESI-MS characterization of novel peptide fragments related to rat parotid secretory protein in parasympathetic induced saliva. *J Sep Sci*, 査読有, 32, 2009, 2944-2952.
- ⑪ Murakami M, Wei M, Ding W, Zhang Q, Effect of chinese herbs on salivary fluid secretion by the isolated and perfused rat submandibular gland. *World J Gastroenterol*, 査読有, 15, 2009, 3908-3915.

[学会発表] (計 代表 18 件/総数 33 件)

- ① Murakami M, Role of paracellular route for salivary secretion. 1st Conf. Interdisciplinary Res in Trad Med & Modern Med Biosci, 2010. 11. 27, 南京, 中国
- ② HASHIMOTO S, MURAKAMI M, MATSUKI-FUKUSHIMA M, NARITA T, SHIBUKAWA Y, Cytoskeletal change of paracellular pathway in perfused rat submandibular glands. 21th Int Sympo on Morphol Scis, 2010. 9. 21, Taormina, Italy.
- ③ Murakami M, Wei F, Paracellular transport of salivary gland: size, control and driving force. 21th Int Sympo on Morphol Scis, 2010. 9. 21, Taormina, Italy.
- ④ Qi B, Narita T, Murakami M, Sugiya H. Analysis of saliva fluid flow by perfusion system. 88th General Session of the IADR, 2010. 7. 17, CCI Barcelona, Spain.
- ⑤ Murakami M, Wei F, Hydrorostatic pressure contributes to the paracellular salivary secretion. 88th General Session of the IADR, 2010. 7. 16, CCI Barcelona, Spain.
- ⑥ Matsuki-Fukushima M, Murakami M, Fujita-Yoshigaki J, Katsumata-Kato O, Sugiya H Involvement of aquaporin-6 in osmoregulation of rat parotid secretory granules. 88th General Session of the IADR, 2010. 7. 15, CCI Barcelona, Spain.
- ⑦ Murakami M, Paracellular transport is important for supply of water and substrates into saliva: Morpho-Physiological approach in the isolated perfused submandibular gland.” 江蘇省高齡医学研究学会研究会特別講演, 2010. 5. 31, 徐州, 中国.
- ⑧ Shimizu H, Miyamura H, Matsushima S, Murakami M, Era S, Uchiyama Y, Kinoshita Y, New parameter for evaluating function of the parotid gland, 36th Int U Physiol Scis, 2009. 8. 1, Kyoto, Japan.
- ⑨ Murakami M, Hashimoto S, Sugiya H, Narita T, Qi B, Wei M, Hill AE, The control of paracellular transport during salivary fluid secretion by the isolated perfused submandibular gland of rat, 36th Int U Physiol Scis, 2009. 7. 31, Kyoto, Japan.
- ⑩ Hayashi T, Murakami M, Matsuyama Y, Era S, Oxidative modification of serum albumin through paracellular pathway of rat salivary gland, 36th Int U Physiol Scis, 2009. 7. 28, Kyoto, Japan.
- ⑪ Murakami M, Hashimoto S, Wei M, Hill AE, Morpho-physiological approach to the paracellular route for salivary secretion by isolated perfused submandibular gland, 11th Int Symp Exocrine Secretion, 2009. 7. 23-25, Tokushima, Japan.
- ⑫ Narita T, Qi B, Fukano M, Matsuki-Fukushima M, Murakami M, Sugiya H, Characterization of neurokinin A-evoked salivary secretion in the perfused rat submandibular gland 11th Int Symp Exocrine Secretion, 2009. 7. 23-25, Tokushima, Japan.
- ⑬ Qi B, Narita T, Sugiya H, Murakami M, Pilocarpine-induced salivary fluid secretion in the perfused submandibular gland of the rat, 11th Int Symp Exocrine Secretion, 2009. 7. 23-25, Tokushima, Japan.
- ⑭ Hayashi T, Murakami M, Era S, Study of modification of serum albumin through paracellular pathway of rat submandibular gland, 11th Int Symp Exocrine Secretion, 2009. 7. 23-25, Tokushima, Japan.
- ⑮ Hashimoto S, Murakami M, Morphological evidence of paracellular transport in perfused rat submandibular gland” ,

- 11th Int Symp Exocrine Secretion,
2009. 7. 23-25, Tokushima, Japan.
- ⑯ Murakami M, Hashimoto S, Riva A, Segawa A, Hill AE, Salivary secretion: assessment of trans- and paracellular transport by physiol-morphological techniques. 39th NIPS Int sympo Front Biol Imag, 2008. 11. 10, Okazaki, Japan.
- ⑰ Murakami M, Wei M, Ding W, Zhang Q, Promotion of salivary fluid secretion by Chinese herbs: combined approach by combination of TCM and western Physiological techniques. 2nd Huaihai state integrated traditional and western medicine's digestive symposium. 2008. 10. 13, Xuzhou, China.
- ⑱ Murakami M, Wei M, Ding W, Zhang Q, Promotion of salivary fluid secretion by Chinese herbs: possible mechanisms and therapeutic application for dry mouth. 1st Jiangsu Geriatrics of trad Chinese Med Sympo. 2008. 10. 11, Nanjing, China.

[図書] (計1件)

村上政隆 インナービジョン、東京 実験
MRS のための周辺技術：臓器灌流法と生理学モニター。成瀬昭二 編「磁気共鳴スペクトルの医学応用－基礎から臨床まで－」2011, 印刷中

[その他]

ホームページ等

<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・細胞器官研究系・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・生物資源学部・教授
研究者番号：20050114
橋本 貞充 (HASHIMOTO SADAMITSU)
東京歯科大学・歯学部・准教授
研究者番号：10201708