

機関番号：32650

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20592152

研究課題名（和文） 唾液腺の傍細胞経路による唾液分泌調節機構の解明とその活性化

研究課題名（英文） Mechanism of salivary secretion and activation of paracellular pathway.

研究代表者

橋本 貞充 (HASHIMOTO SADAMITSU)

東京歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：10201708

研究成果の概要（和文）： 唾液腺の分泌にともなうタイト結合(TJ)の構造と構成蛋白質の局在変化を検討し、腺房細胞間の傍細胞経路における選択的な透過性調節機序を明らかにする目的で研究を行なった。ラット灌流顎下腺の carbachol(CCh) と isoproterenol(IPR)刺激後の、未固定新鮮組織の急速凍結ディープエッチングレプリカの透過電顕観察において、細胞間分泌細管の TJ 部から腺腔側膜直下のアクチン細胞骨格が分泌にともなって改変され、TJ を介した水やイオン、低分子量の分子等の傍細胞輸送を増大させることが示唆された。

研究成果の概要（英文）： To elucidate the morphological change of the paracellular route for fluid secretion, the cytoskeleton of TJs were examined by TEM, using deep etching freeze-fracture (FF) replicas. Isolated submandibular glands (SMGs) were stimulated with 1  $\mu$ M of carbachol (CCh) and isoproterenol (IPR). After CCh/IPR stimulation, cytoskeletal filaments beneath the plasma membrane were arranged in a thicker layer. Contraction of the submembranous actin cytoskeleton during exocytosis elicited by CCh/IPR may cause rearrangement of TJ strands, and modulate increased paracellular permeability.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：唾液腺、唾液分泌、タイト結合、細胞骨格、傍細胞経路、isoproterenol、carbachol、凍結割断法、

## 1. 研究開始当初の背景

唾液を構成する分子の透過経路には、細胞内を様々な修飾を受けながら腺腔側膜から腺腔内へと輸送・分泌される細胞内経路(trans-cellular pathway)と、細胞間隙を通過する傍細胞経路(para-cellular pathway)とがある。近年、高齢化と共に問題となってきている、口腔乾燥症では、唾液腺腺房細胞の萎

縮消失によるものだけでなく、唾液の生成に何らかの変調を来していることが考えられ、このような分泌障害に対応するためには、唾液生成のメカニズムの詳細な理解が必要である唾液分泌に関する従来から多くの研究は分泌顆粒による唾液タンパクの分泌と、細胞膜上に存在するといわれているAquaporins(AQPs)に焦点が当たっており、

我々の研究グループにおいても、AQP5 が従来から言われているような腺房細胞の腺腔膜にのみ存在して細胞内からの水の分泌の主体をなしているというだけではなく、分泌顆粒の顆粒膜にも局在して分泌顆粒の浸透圧調節の役割を果たしていることを証明し、さらに、AQP6 も同様に腺房細胞の腺腔膜とともに分泌顆粒膜に局在し、分泌顆粒の体積の調節など開口放出に関与している可能性があることを明らかにしてきた。一方、唾液の成分のほとんどを占める大量の水やイオンは、腺腔膜のみから分泌されるものではなく、血管から組織中に移行してそれらが、腺房細胞の細胞間隙を通り、傍細胞経路を經由して、タイト結合で調節を受けて腺腔側へ移行すると考えられるが、これらの水や様々な分子の流れの詳細についてはほとんど明らかとなっていない。さらに、腺房細胞の分泌顆粒の細胞内輸送と膜融合による分泌過程においては、腺腔側と基底側とを分け、極性を持つことが必要で、細胞骨格が機能的に構築されていることが必須の条件となる。この分泌機能と細胞極性を支える重要な「key」となるのが、タイト結合 (Tight junction) とそれを裏打ちするアクチンフィラメント細胞骨格系である。

これらのタイト結合の構成蛋白については、ZO ファミリーや膜貫通蛋白質の Occludin および Claudin ファミリーがあり、分子の機能としての腺腔側膜 luminal membrane と基底側方膜 basolateral membrane を分けるフェンス機構や、隣接する細胞膜を貫通して網目状に結合させて腺腔側の外部環境と結合側側の内部環境とを分けるバリア機構について研究されてきている。しかしながら、分泌にともなうタイト結合による傍細胞経路における選択的調節機構や三次元的構造変化、タイト結合と腺房細胞の極性形成との関連、およびタイト結合構成蛋白を介した細胞内情報伝達機構の詳細については十分に解明されているとはいいがたい。このような見地から、細胞極性の決定とタイト結合形成のメカニズムを明らかにすることで、傍細胞経路を介した唾液分泌を活性化する分子機構に迫ることができると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究は、分泌刺激によりおこる分泌顆粒と腺腔側膜との膜融合にともない、腺腔側部で起こるアクチン細胞骨格の著しい改変にともなうタイト結合結合においても、きわめて短時間のうちにタイト結合構成蛋白とアクチン細胞骨格がダイナミックな構造変化を起こして傍細胞経路を介する水分泌を調節しているとの仮説を立て、唾液腺腺房細胞における唾液分泌、特に水分泌機構をタイ

ト結合とそれと連なるアクチン細胞骨格の構造変化から捉えていくことに特色がある。唾液腺を摘出して血管灌流実験系に移して、同一条件下で傍細胞経路を通過する分子を臓器レベル/細胞レベルで測定・解析することは、刺激条件を均一化するために必要不可欠であり、新鮮組織を液体ヘリウムで急速凍結固定しディープエッチングフリーズフラクチャー法で観察することにより、生きた細胞に極めて近い状態での超微細構造を解析できることは、外分泌腺における細胞内透過経路と傍細胞経路による分泌過程の理解に新たな視点を与えることになると考えた。細胞同士の接着に伴うタイト結合の形成と細胞極性の決定が、分泌機構とどのように関連するのかを検討することで、唾液腺の活性化と唾液腺再生研究の基礎となるデータが得られると考え実験を行った。

具体的には、タイト結合を介して行われていると考えられる、細胞間・細胞内経路を介した唾液蛋白質・水分泌機構を明らかにするとともに、膜の特徴を決定づけるフェンス機構と細胞極性、さらには、タイト結合蛋白を介して細胞膜直下の細胞質で起こる細胞内情報伝達機構を解明することを目的として、

(1) タイト結合とアクチン細胞骨格の構造解析：Ca 系/cAMP 系分泌刺激に伴うタイト結合と細胞膜直下のアクチン細胞骨格の超微構造変化を、新鮮組織を用いた液体ヘリウム急速凍結ディープエッチングレプリカ法により三次元的に解析する

(2) 傍細胞経路における選択的輸送調節機構の解析：ラット唾液腺を摘出し血管灌流実験系で傍細胞経路を通過する分子を臓器レベル/細胞レベルで測定するとともに、今年度に新規に導入される分光共焦点レーザー顕微鏡により、観察を行ない、トレーサー基質の分子サイズ・荷電・形の関係を検討することで傍細胞輸送調節機構の機能を解析するに焦点を絞って研究を遂行した。

## 3. 研究の方法

本研究では、唾液腺の分泌にともなう唾液腺腺房細胞におけるタイト結合の構造と、構成蛋白質の局在変化の検討を通して、タイト結合構成・関連蛋白が、これを裏打ちして細胞極性を規定するアクチンフィラメント細胞骨格系と、どのように協調し、どんなメカニズムで傍細胞経路における選択的な透過性の調節するのか、また、分泌顆粒の腺腔側膜への癒合や細胞内情報伝達機構にこれらがどのように関わっているのかを解明していきたい、多角的に評価するために、(1) タイト結合とアクチン細胞骨格の構造解析、(2) 傍細胞経路における選択的輸送調節機構の解析、にテーマに焦点を絞って研究した。

(1) タイト結合とアクチン細胞骨格の構

造解析：Ca系/cAMP系分泌刺激に伴うタイト結合と細胞膜直下のアクチン細胞骨格の超微構造変化を、高速スキャンヘッドを備えた共焦点レーザー顕微鏡および、新鮮組織の液体ヘリウム急速凍結レプリカ法により三次元的に解析する。

① 唾液腺血管灌流実験系：ネブタール麻酔下に雄ラットより顎下腺を摘出、唾液排出導管、動脈、静脈に挿管し、酸素ガスを飽和した人工灌流液を拍動ポンプで動脈より定流灌流する。臓器は恒温チャンバー内に設置し37°Cで実験する。分泌刺激は副交感刺激に交感神経刺激を重畳することとし、生理的調節範囲での刺激をCa系アゴニストとしてcarbachol (CCh)、cAMP系アゴニストとしてisoproterenol (IPR)を用い、CCh単独およびCChとIPR混合刺激を行なう。赤血球のヘモグロビンの無い環境で酸素供給を十分にするため灌流流速はin vivoでの血液流速よりも約10倍に上げ、刺激薬は数秒で腺全体に到達する様に設定する。

② 灌流顎下腺を、新規導入のZeiss社製の共焦点レーザー顕微鏡により、分光モードによる多重蛍光染色像と、超高速スキャンヘッドによる4D観察により、血管側から導入した各種トレーサーの傍細胞経路を介する腺腔側への移行を、高速フレームによってデータを取得し、タイト結合の透過調節機能を評価する。

③ 灌流実験を行い、分泌刺激に対応したタイミングで試料を採取し、岡崎国立共同研究機構・生理学研究所に設置された金属圧着急速凍結固定装置をもちいて、液体ヘリウムにより未固定新鮮組織の急速凍結固定を行い、生きたままの状態の構造を瞬間的に凍結固定し、レプリカ上で直接観察する。レプリカ上で、細胞間分泌細管のタイト結合の接着部位の膜内粒子と直下の細胞骨格を透過電子顕微鏡にて観察し、細胞間分泌細管と裏打ち構造の形態変化を検証する。

④ アクチン線維がタイト結合の構造の決定と密接な関連があると考えられることから、分離細胞によるin vitroの実験系を用いて、サイトカラシンDを用いたアクチン重合阻害実験をおこない、OccludinおよびClaudin-familyとその介在蛋白のZO-familyの細胞膜における局在の短時間の変化を、分光共焦点レーザー顕微鏡による多重染色三次元観察と、凍結超薄免疫電顕法により解析する。

(2) 傍細胞経路における選択的輸送調節機構の解析：ラット唾液腺を摘出し血管灌流実験系で傍細胞経路を通過する分子を臓器レベル/細胞レベルで測定するとともに共焦点レーザー顕微鏡観察を行ない、基質の分子サイズ・荷電・形の関係を検討することで傍細胞輸送調節機構の機能を解析。

① 共焦点レーザー顕微鏡に灌流系を設置し、種々の分子量と荷電を持つ蛍光色素が分泌刺激により分泌細管に移行する時間経過をCa系及びcAMP系アゴニストの刺激実験で観測し、傍細胞輸送経路の開閉の時間経過を明らかにする。

② 接着タンパク・裏打ちタンパクの阻害剤を用い、色素移行の変化を観察し、傍細胞輸送経路の開閉の分子機構を明らかにする。

#### 4. 研究成果

1) 分泌刺激に伴うTJと細胞骨格の超微構造変化を、新鮮組織を用いたディープエッチングレプリカ法により三次元的に解析するため、ラット顎下腺を摘出し灌流下に、carbachol (CCh) と、isoproterenol (IPR)により刺激し、液体ヘリウム下に金属圧着法により未固定新鮮組織の急速凍結固定を行い、生きたままの状態の構造を瞬間的に凍結固定し、レプリカ上で、細胞間分泌細管のタイト結合の接着部位の膜内粒子と直下の細胞骨格を透過電子顕微鏡にて観察し、CCh後にIPR刺激を加えたものでは、TJ部から腺腔側膜直下のアクチン細胞骨格が分泌にもなって改変され、TJを介した水やイオン、低分子量の分子等の傍細胞輸送を増大させることが示唆された (Hashimoto, S. & Murakami, M., et. al., J. Medical Investigation, 2009)。

2) AQPの検討では、AQP5のみならず、AQP6が同様に分泌顆粒膜に存在することを明らかにし、AQP6がタイト結合部の細胞膜と分泌顆粒膜で、水と陰イオンの輸送に密接に関与していることが示された (Sugiya H. et. al., J Cell Mol Med., :2008. Matsuki-Fukushima M., et. al., Cell and Tissue Research, :2008)。

3) 傍細胞経路における選択的輸送調節機構の解析のために、ラット灌流唾液腺を用いて傍細胞経路を通過するトレーサー分子を、分光共焦点レーザー顕微鏡観察と高速スキャンヘッド (Zeiss社製・5-Live)による高時間分解能の4D解析を行なった。1/secの3D画像のタイムシリーズ解析では、IPRによるβアドレナリン受容体への分泌刺激により、腺房細胞の容積の減少が経時的に記録できたと共に、血管灌流したLucifer YellowおよびRhodaminは、非刺激時には腺房細胞周囲の細胞間隙にとどまるが、IPR投与後には、細胞間分泌細管内へと移行する像が観察されたことから、β受容体刺激によりTJを介した傍細胞輸送経路が開くことが示唆され

た。(Hashimoto, S.& Murakami, M., XXIth ISMS, Taormina, 2010)

#### 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

Sugisawa, M., Masaoka, T., Enokiya, Y., Muramatsu, T., Hashimoto, S., Yamada, S., Shimono, M.

Expression and function of laminin and integrins on adhesion/migration of primary culture cells derived from rat oral epithelium.

J Periodont Res., 査読有, 45 (2), 2010, 284-291

Sasaki, H., Muramatsu, T., Kwon, H. J., Yamamoto, S., Hashimoto, S., Jung, H. S., Shimono, M.

Down-regulated genes in mouse dental papillae and pulp.

J Dent Res., 査読有, 89(7), 2010, 679-683

Okumura, R., Shibukawa, Y., Muramatsu, T., Hashimoto, S., Nakagawa, K., Tazaki, M., Shimono, M. Sodium-calcium exchangers in rat ameloblasts.

J Pharmacol Sci., 査読有, 112(2), 2010, 223-230

Sato, K., Muramatsu, T., Tsuchiya, Y., Masaoka, T., Enokiya, Y., Hashimoto, S., Shimono, M.

Proliferation, migration and apoptosis of periodontal ligament cells after tooth replantation.

Oral Dis., 査読有, 16(3), 2010, 263-268

Nakano Y., Somiya H., Shibui T., Uchiyama T., Takano N., Shibahara T., Hashimoto S. A case of congenital midline fistula of the upper lip.

Bull Tokyo Dent Coll., 査読有, 51(1), 2010, 31-34

Hashimoto S., Murakami M.

Morphological evidence of paracellular transport in perfused rat submandibular glands.

J. Medical Investigation, 査読有, 56, 2009, 395-397

Murakami M., Hashimoto S., Wei M., Hill A. E.

Morpho-Physiological approach to the paracellular route for salivary secretion by isolated perfused submandibular gland. J. Medical Investigation Proceeding, 査読有, 56, 2009, 322-324

Ichikawa H., Shibukawa Y., Sahara Y., Tsumura M., Qi B., Satoh K., Narita T., Hashimoto S., Momose Y., Tazaki M., Shimono M., Sugiya H.

Electrophysiological properties of AQP6 in mouse parotid acinar cells.

J. Medical Investigation Proceeding, 査読有, 56, 2009, 347-349

Sugiya H., Matsuki-Fukushima M., and Hashimoto S.

Role of aquaporins and regulation of secretory vesicle volume in cell secretion.

J Cell Mol Med, 査読有, 12(5A), 2008, 1486-1494

Matsuki-Fukushima M., Hashimoto S., Shimono M., Satoh K., Fujita-Yoshigaki J, Sugiya H.

Presence and localization of aquaporin-6 in rat parotid acinar cells.

Cell Tissue Res., 査読有, 332, 2008, 73-80

Kim Y J., Kwon H J., Shinozaki N., Hashimoto S., Shimono M., Cho S W., Jung H. S.

Comparative analysis of ABCG2-expressing and label-retaining cells in mouse submandibular gland.

Cell Tissue Res., 査読有, 334(1), 2008, 47-53

[学会発表] 計 ( 9 ) 件 うち招待講演計 ( 0 ) 件

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.

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.

Hashimoto S., Murakami M.  
Morphological evidence of paracellular transport in perfused rat submandibular glands.  
ISES, The 11th International Symposium on Exocrine Secretion, 2009. 7. 23-25, Tokushima, Japan.

Murakami M., Hashimoto S., Wei M., Hill A. E.  
Morpho-Physiological approach to the paracellular route for salivary secretion by isolated perfused submandibular gland.  
ISES, The 11th International Symposium on Exocrine Secretion, 2009. 7. 23-25, Tokushima, Japan.

Ichikawa H., Shibukawa Y., Sahara Y., Tsumura M., Qi B., Satoh K., Narita T., Hashimoto S., Momose Y., Tazaki M., Shimono M., Sugiya H.  
Electrophysiological properties of AQP6 in mouse parotid acinar cells.  
ISES, The 11th International Symposium on Exocrine Secretion, 2009. 7. 23-25, Tokushima, Japan.

市川秀樹、澁川義幸、橋本貞充、田崎雅和、下野正基  
マウス耳下腺腺房細胞での aquaporin6 の発現  
東京歯科大学学会 2009年4月 千葉

市川秀樹、澁川義幸、佐原資謹、祁 兵、佐藤啓太郎、成田貴則、橋本貞充、田崎雅和、下野正基、杉谷博士  
マウス耳下腺腺房細胞の AQP6 の電気生理学による特性  
歯科基礎医学会学術大会 2009年9月 新潟

福島美和子、橋本貞充、村上政隆、下野正基、杉谷博士  
耳下腺分離腺房細胞における jasplakinolide のアポトーシス誘導  
日本唾液腺学会学術大会 2009年12月 東京

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.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

橋本 貞充 (HASHIMOTO SADAMITSU)  
東京歯科大学・歯学部・准教授  
研究者番号：10201708

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

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

下野 正基 (SHIMONO MASAKI)  
東京歯科大学・歯学部・教授  
研究者番号：00085771

### (3) 研究協力者

杉谷 博士 (SUGIYA HIROSHI)  
日本大学・生物資源学部・教授  
研究者番号：20050114