

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20791357

研究課題名（和文） 唾液腺支配神経終末におけるニコチン受容体の生理機構の解明

研究課題名（英文） Physiological mechanisms of nicotinic receptors in nerve terminals terminated the salivary glands

研究代表者

小野 堅太郎（ONO KENTARO）

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：40316154

研究成果の概要（和文）：喫煙による唾液分泌促進が報告されているものの、その仕組みについてほとんどわかっていない。そこで喫煙成分の1つであるニコチンのラット耳下腺細胞における細胞内カルシウム変動について調べた。ニコチン投与により唾液腺細胞の細胞内カルシウム濃度は上昇し、この反応は薬剤による神経遮断処置により消失した。よって、唾液腺支配神経終末に存在するニコチン受容体が喫煙による唾液分泌促進に関わっている可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Although cigarette smoking induces salivary secretion, it is unclear the induction mechanism. In the present study, we investigated effects of nicotine on rat parotid gland cells using intracellular  $Ca^{2+}$  imaging. Nicotine increased intracellular  $Ca^{2+}$  concentration in salivary cells, and the response was blocked by drug-induced nerve synaptic blockage. Therefore, it is possible that nicotinic receptors in nerve terminals terminated the salivary gland mediate salivary secretion.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：ニコチン、唾液腺、細胞内カルシウム、神経

## 1. 研究開始当初の背景

近年、高齢者において口腔乾燥感を訴える患者が増えてきていると言われている。口腔乾燥感は唾液分泌減少により主に引き起こされ、唾液の持つ様々な口腔保護作用（pH緩衝能や抗炎症作用）が失われるためう触や歯周病といった代表的歯科疾患の引き金と

なる。数年前より我々は、口腔乾燥症の治療薬として期待されているムスカリン受容体アゴニストのピロカルピンはラットへの腹腔内投与により耳下腺唾液分泌を促進するが、高濃度では中枢の脳弓下器官にも作用してしまい「喉の渇き」の指標となる飲水行動が促進する事を報告した(Sato et al., 2006)。

このようなムスカリン受容体を標的とした催唾剤は唾液分泌促進効果に加えて口渇感誘発という副作用が発生するため使用に注意を要する事がわかった。

ニコチン受容体は、もう一つのアセチルコリン受容体である。ニコチンは喫煙により容易に血中に取り込まれるが、この喫煙により耳下腺からの唾液分泌は促進する(Pangborn & Sharon, 1971)。同じような現象がウサギへのニコチン血管内投与によっても観察されている(Inoki et al., 1971)。ラット舌下腺腺房に対する  $Ca^{2+}$  イメージング実験にて、ニコチン投与は神経終末を刺激してアセチルコリンを放出するという報告がある(Zhang et al., 1996)。しかしながら、唾液の主な液成分に関与する耳下腺や顎下腺における実験は行われておらず、ニコチンによる唾液分泌促進反応に唾液腺神経終末のニコチン受容体が関与するか否かはよく分かっていない。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、ラット唾液腺細胞におけるニコチンの作用について明らかにすることである。まず、唾液腺腺房にニコチンを投与し、唾液分泌に直接関わる細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の上昇が引き起こされるか否かについて調べ、その反応が腺房自身であるのか、それとも支配神経終末であるかについて明らかにする。また、*in vivo* 実験にて、ラットへニコチンを末梢投与し、過去のヒトやウサギの研究と同様に唾液分泌が促進するか否かを調べる。また、ムスカリン受容体を標的にした催唾剤で得られた「口渇感誘発」がニコチンによっても起こるのかどうかについて調べる。

## 3. 研究の方法

唾液腺を支配する神経終末への影響が強く示唆されるため、実験手法としては酵素処理単離唾液腺腺房に対する  $Ca^{2+}$  イメージング法を主に採用した。この手法は、研究代表者にとって初めての経験であるため、十分な事前実験を踏まえてから、詳しいニコチン反応についての研究を行った。

### (1) $Ca^{2+}$ イメージング法

ラットを深麻酔後、耳下腺ならびに顎下腺を摘出し、コラゲナーゼ処理により単離を行った。単離後、 $Ca^{2+}$  濃度蛍光指示薬 fura-2 を細胞内に導入し、専用の顕微鏡にて細胞内の  $Ca^{2+}$  濃度を測定した。

### (2) *in vivo* 実験

#### ① 麻酔管理下のラットに対し、薬物

を静脈内投与し、口腔内に分泌された唾液を綿球で回収した。その重量より唾液分泌量を換算した。

#### ② あらかじめ麻酔下にてラット側脳室にカニューレを装着し、後日、薬物を中枢へ投与した。投与後の飲水瓶の重量を測ることで「喉の渇き」について評価した。

## 4. 研究成果

まず、コラゲナーゼ処理により単離された唾液腺腺房ならびに導管が、過去の多くの論文で報告されているような神経伝達物質に対する  $Ca^{2+}$  応答性を有しているのかどうかについて検討した結果、腺房と導管で神経伝達物質の種類により異なる反応を有することが明らかとなった。この結果に関しては既に *Auton Neurosci* に発表した(雑誌論文①参照)。この研究により、ムスカリン受容体やノルアドレナリン受容体に対する拮抗薬をどの程度の濃度を使用することで効果的にかつ特異的に作用させられるかを知ることができた。

次に、得られた唾液腺腺房標本に神経終末が付着しているかどうかを調べるために、高濃度の細胞外  $K^+$  刺激(High K)を行った。この刺激により細胞は脱分極するために、もし神経であればシナプス放出が引き起こされる。多くの唾液腺腺房において、High K による一過性の細胞内  $Ca^{2+}$  濃度上昇を示した。この High K 誘発  $Ca^{2+}$  応答は細胞外の  $Ca^{2+}$  の除去や電位依存性  $Ca^{2+}$  チャネル阻害薬により完全に抑制された。一方、High K により反応を示さない腺房の多くは腺房構造を失った単一の細胞で多くみられた。ちなみにこの単一腺房細胞は通常は薬物応答性を示していた。これらの結果は、腺房構造を保った標本には神経終末が付着している可能性を強く支持する。さらに High K 誘発  $Ca^{2+}$  応答は、ムスカリン受容体やノルアドレナリン受容体のアンタゴニストにより部分的に抑制され、共投与によりほぼ完全に抑制された。これは High K 刺激による神経終末からの神経伝達物質がアセチルコリンとノルアドレナリンであることを示唆する。すなわち、得られた唾液腺腺房標本に副交感神経ならびに交感神経両方の神経終末が存在していることを示す。

これらの結果を踏まえ、ニコチンを投与したところ、High K 誘発  $Ca^{2+}$  応答に似た一過性の細胞内  $Ca^{2+}$  上昇を濃度依存性に示した。このニコチン誘発  $Ca^{2+}$  応答は High K に応答する腺房でしか観察されず、ニコチン受容体拮抗薬ならびに電位依存性  $Ca^{2+}$  チャネル阻害薬により完全に抑制された。これらの結果より、ニコチンは唾液

腺腺房自身というよりは付着する神経終末に作用していると考えられる。別のニコチン受容体アゴニストであるシチジンを投与したところ、ニコチンよりも大きな細胞内  $Ca^{2+}$  上昇を濃度依存性に示した。これは関与する受容体に  $\beta 4$  サブユニットが関与していることを示している。ここまでの結果については The 11<sup>th</sup> International symposium on exocrine secretion にて発表を行った(雑誌論文④ならびに学会発表④を参照)。その後、様々な受容体サブタイプもしくはサブユニット特異的なアンタゴニストの作用を検討している。

しかしながら、このニコチン誘発  $Ca^{2+}$  応答は、同実験条件における催唾剤による  $Ca^{2+}$  応答と比べて小さく、また反応時間は非常に短かった(学会発表③⑥⑨を参照)。そこでラットにおいて本当にニコチンが催唾作用を示すのか疑問を持ち、*in vivo* 実験を行った。その結果、ある濃度のニコチンにより、催唾剤に比べ分泌される唾液は少ないものの有意な唾液分泌の促進をみとめた(未発表)。

さらに、口渇中枢におけるニコチン受容体の存在を確認したため(雑誌論文⑩参照)、ムスカリン受容体を標的にした催唾剤と同じく(雑誌論文⑫参照)、「口渇感誘発」がニコチンによっても起こるのかどうかについて調べた。しかしながら、中枢に投与されたニコチンは催唾剤ピロカルピンに比べて極わずかにしか口渇感を引き起こさなかった。この結果に関しては既に Neuroreport に発表した(雑誌論文⑪参照)。このニコチンとムスカリン受容体アゴニストとの中枢における口渇感誘発の違いに関しては、口渇中枢内の応答する細胞群の違いが考えられた(雑誌論文⑧参照)。

これらの結果をまとめると、唾液腺支配神経の終末には  $\beta 4$  サブユニットを含むニコチン受容体が発現しており、おそらく生理学的には副交感神経興奮によるアセチルコリン放出後のポジティブフィードバックに関与していると考えられる。喫煙や末梢ニコチン投与による唾液分泌促進効果にはこのメカニズムが関与している可能性がある。ただし、その作用は現在催唾剤として使用されているピロカルピンやセビメリンと比べ小さいかったこととよく知られているニコチン依存性の影響から、ニコチンが催唾剤本体として寄与する可能性は低いと考えられる。ただし、ヨーロッパではニコチン依存性の治療薬として使用されている別のニコチン受容体アゴニストのシチジンは、ニコチンよりも大きな  $Ca^{2+}$  上昇を示したため、こちらのほうに催唾剤としての可能性を感じている。

## 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 15 件)

- ① Inagaki T, Ono K, Masuda W, Iida T, Hosokawa R, Inenaga K. Differences in the  $Ca^{2+}$  response resulting from neurotransmitter stimulations of rat parotid acini and ducts. *Auton Neurosci.* in press. (査読有)
- ② Inenaga K, Yamada N, Yuji R, Kawai M, Uneyama H, Ono K, Suzuki E, Torii K. Proteome analysis for rat saliva. *The Journal of Medical Investigation.* 2009 56:224-227. (査読無)
- ③ Ono K, Inagaki T, Iida T, Hosokawa R, Inenaga K. Effects of pilocarpine and cevimeline on  $Ca^{2+}$  mobilization in rat parotid acini and ducts. *The Journal of Medical Investigation.* 2009 56:375. (査読無)
- ④ Iida T, Ono K, Inagaki T, Hosokawa R, Inenaga K.  $Ca^{2+}$  mobilization by nicotine through synaptic activation in rat parotid acini. *The Journal of Medical Investigation.* 2009 56:376. (査読無)
- ⑤ Inenaga K, Inagaki T, Hosokawa R, Ono K. Parotid salivary secretion induced by stimulation of periodontal regions with toothbrush in humans. *The Journal of Medical Investigation.* 2009 56:277. (査読無)
- ⑥ 稲永清敏, 稲垣智浩, 小野堅太郎, 関根有紀, 河合美佐子, 畝山寿之, 鳥居邦夫. 味刺激による後味の強さと唾液分泌相関. 2009 16:363-364. (査読無)
- ⑦ Ono K, Tanaka T, Inoue H, Ansai T, Sato-Wakasugi N, Muraoka K, Yokota M, Takehara N, Morimoto Y, Inenaga K. Small salivary gland size in patients with xerostomia of unknown etiology. *Arch Oral Biol.* 2009 54:369-373. (査読有)
- ⑧ Ono K, Miyahara N, Inenaga K. Cell subpopulations of nicotine-sensitive subfornical organ neurons in rat. *Neurosci Lett.* 2008 442:74-76. (査読有)
- ⑨ Tanaka T, Ono K, Ansai T, Yoshioka I, Habu M, Tomoyose T, Yamashita Y, Nishida I, Oda M, Kuroiwa H, Wakasugi-Sato N, Okabe S, Kito S, Takahashi T, Tominaga K, Inenaga K, Morimoto Y. Dynamic magnetic resonance

sialography for patients with xerostomia. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2008 106:115-123. (査読有)

- ⑩ Ono K, Toyono T, Inenaga K. Nicotinic receptor subtypes in rat subfornical organ neurons and glial cells. Neuroscience. 2008 154:994-1001. (査読有)
- ⑪ Ono K, Hirase M, Kai A, Inenaga K. Effect of central nicotinic activation on drinking behavior. Neuroreport. 2008 19:845-849. (査読有)
- ⑫ Inenaga K, Wakasugi-Sato N, Ono K, Hirase M, Honda E. Intraperitoneal injection of pilocarpine activates neurons in the circumventricular organs and hypothalamus in rats. Brain Res. 2008 1200:51-57. (査読有)
- ⑬ Inoue H, Ono K, Masuda W, Inagaki T, Yokota M, Inenaga K. Rheological properties of human saliva and salivary mucins. J Oral Biosci. 2008 50:134-141. (査読有)

[学会発表] (計 21 件)

- ① 稲永清敏, 山田尚之, 湯地玲子, 小野堅太郎, 河合美佐子, 畝山寿之, 鈴木榮一郎. 唾液プロテオーム解析. 第 51 回歯科基礎医学会. 2009 年 9 月 10 日, 新潟.
- ② 稲永清敏, 稲垣智浩, 小野堅太郎. ブラッシングによる耳下腺唾液分泌促進. 第 51 回歯科基礎医学会. 2009 年 9 月 10 日, 新潟.
- ③ Ono K, Inagaki T, Iida T, Hosokawa R, Inenaga K. Effects of pilocarpine and cevimeline on  $Ca^{2+}$  mobilization in rat parotid acini and ducts. The 11<sup>th</sup> International symposium on exocrine secretion. 2009 July 25, Tokushima, Japan.
- ④ Iida T, Ono K, Inagaki T, Iida T, Hosokawa R, Inenaga K.  $Ca^{2+}$  mobilization by nicotine through synaptic activation in rat parotid acini. The 11<sup>th</sup> International symposium on exocrine secretion. 2009 July 25, Tokushima, Japan.
- ⑤ Inenaga K, Inagaki T, Ono K. Parotid salivary secretion induced by stimulation of periodontal regions with toothbrush in humans. The 11<sup>th</sup> International symposium on exocrine secretion. 2009 July 24, Tokushima, Japan.
- ⑥ 小野堅太郎, 稲垣智浩, 細川隆司, 稲永清敏. ラット耳下腺細胞における催唾剤

による細胞内カルシウム濃度上昇. 第 69 回九州歯科学会. 2009 年 5 月 30 日, 福岡.

- ⑦ Inenaga K, Ono K, Miyahara N. Mechanism of drinking behavior by central activation of nicotinic receptor in rat. The 8<sup>th</sup> Korea-Japan joint symposium on Physiology. 2009 Jan 16, Pusan, Korea.
- ⑧ Ono K, Toyono T, Inenaga K. Nicotinic receptors in rat subfornical organ neurons and glial cells. Annual Meeting Society for Neuroscience, 2008 Nov 18, Washington D.C., USA.
- ⑨ 稲垣智浩, 小野堅太郎, 細川隆司, 稲永清敏. ラット耳下腺細胞に対するピロカルピンおよびセビメリンの作用. 第 50 回歯科基礎医学会. 2008 年 9 月 23 日, 東京.
- ⑩ 小野堅太郎, 稲永清敏. 原因不明口腔乾燥症患者の唾液腺体積. 第 50 回歯科基礎医学会. 2008 年 9 月 23 日, 東京.
- ⑪ 小野堅太郎, 平瀬正輝, 稲垣智弘, 宮原宣高, 稲永清敏. 脳弓下器官におけるニコチン受容体と口腔機能. 第 50 回歯科基礎医学会. 2008 年 9 月 23 日, 東京.
- ⑫ Inagaki T, Ono K, Hosokawa R, Inenaga K. Different sensitivities to cholinergic and adrenergic stimulations in rat parotid. Annual Meeting of International Association for Dental Research, 2008 Jul 10, Toronto, Canada.
- ⑬ 稲垣智浩, 小野堅太郎, 増田渉, 細川隆司, 稲永清敏. ラット耳下腺細胞のコリン性・アドレナリン性刺激による多様な反応. 第 68 回九州歯科学会. 2008 年 5 月 31 日, 福岡.

[図書] (計 1 件)

- ① 安細敏弘, 柿木保明 編著、医歯薬出版、今日からはじめる! 口腔乾燥症の臨床 この主訴にこのアプローチ、2008、p. 6.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小野 堅太郎 (ONO KENTARO)

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号: 40316154