

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 8 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592585

研究課題名(和文)炎症時に涙腺組織内で上昇するプロテアーゼは涙液分泌を促進するか？

研究課題名(英文) Effects of protease-activated receptors (PARs) on intracellular calcium dynamics of acinar cells in rat lacrimal glands.

研究代表者

木村 桂 (KIMURA, Katsura)

岩手医科大学・医学部・講師

研究者番号：10364358

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)：プロテアーゼ活性化型受容体(PARs)はGタンパク共役型受容体の一種である。涙腺でのPARsの機能をCa<sup>2+</sup>イメージング法にて検討した。RT-PCRでPAR2のみの発現を認めた。PAR2刺激によって細胞内Ca<sup>2+</sup>の上昇を認め、この上昇は細胞外Ca<sup>2+</sup>除去によっても消失せず、PLC抑制薬やIP3受容体抑制薬でも阻害されなかった。Ca<sup>2+</sup>流入機構では、低濃度Gd<sup>3+</sup>等の投与で完全抑制されず、NO donorの投与で流入の増強を認めた。以上から、PAR2は細胞内ストアを刺激して[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>の上昇を引き起こすが、これはIP3非依存性の反応と考えられ、Ca<sup>2+</sup>流入機構としてNCCEが優位に働いている。

研究成果の概要(英文)：Protease-activated receptors (PARs) are G-protein-coupled receptors, activated by proteolytic cleavage. Here, lacrimal gland acinar cell responses to PAR activation were examined, with respect to intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) dynamics. Only PAR2 mRNA was detected in these acinar cells. A PAR2-activating peptide (PAR2-AP) induced an increase in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in these cells. The removal of extracellular Ca<sup>2+</sup> and the use of Ca<sup>2+</sup> channel blockers did not inhibit PAR2-AP-induced [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> increases. The NO donor mimicked the effects of PAR2 in activating non-capacitative calcium entry (NCCE). However, both calyculin A and a low concentration of Gd<sup>3+</sup> did not completely block the PAR2-AP-induced increase in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. These findings indicated that PAR2 activation resulted primarily in Ca<sup>2+</sup> mobilization from intracellular Ca<sup>2+</sup> stores and that PAR2-mediated [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> changes were mainly independent of IP3. We suggest that PAR2-AP differentially regulates both NCCE and CCE, predominantly NCCE.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：涙腺 プロテアーゼ活性化型受容体 細胞内カルシウムイオン 共焦点レーザー顕微鏡 RT-PCR

1. 研究開始当初の背景

プロテアーゼ活性化型受容体

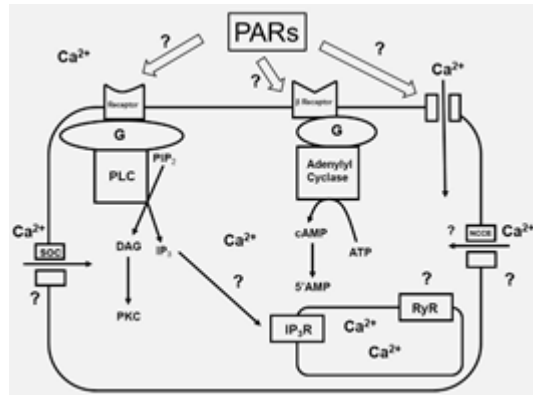
(PARs; Protease activated receptors) は、特定のプロテアーゼによって特異的に活性化される三量体 G タンパクと共役した7回膜貫通型の受容体で、リガンドが受容体自身に存在している奇異な受容体である。活性化機構には2つの方法がある。1つはプロテアーゼがN末側のペプチド鎖を特定部位で切断し、露出した受容体活性化配列が tethered ligand となって PARs を活性化する方法。もう一つは合成ペプチドによって活性化される方法である。受容体が活性化されると、イノシトール 3 リン酸 (IP<sub>3</sub>) 産生を介して細胞内カルシウムイオン濃度 ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) が上昇したり、一酸化窒素(NO)の産生が NO synthetase (NOS) の活性化によって引き起こされると言われている。当初、PARs は血小板で研究されてきたが、血管内皮細胞や血管平滑筋、末梢知覚神経、あるいは肥満細胞など多くの細胞にも存在する事がわかり、炎症機転にも PARs が関与すると考えられるようになってきた。ヒトゲノムのおよそ2%がプロテアーゼをコードすると言われていることから、PARs の役割の大きさがうかがい知れる。このため、PARs は創薬の一つのターゲットとなっている。

共同研究者らは以前に PARs を用いた細動脈平滑筋の研究で、脳の比較的細い細動脈 (直径 50 μm 以下) では、PAR-1 刺激に応じて平滑筋の [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> の上昇が引き起こされたが、PAR-2 刺激では NOS および cGMP 非依存的に平滑筋 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> の全体的な低下が起こることを報告している。PARs のうち PAR-2 は消化器系臓器においても多様な役割を演じていると言われており、唾液腺の腺房組織にも存在し、その活性化により唾液分泌が誘起されると報告されている。現在進行中の研究では、合成ペプチドである SLIGRL-NH<sub>2</sub> (PAR-2AP) 投与により、耳下腺腺房細胞の [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇を認めており、これは細胞外の Ca<sup>2+</sup> 除去によっても消失せず、Gd<sup>3+</sup> 投与によっても同様であった。また、NO の donor の投与でこの流入は増強した。これらのことから、PAR-2 は細胞内ストアを刺激して [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> の上昇を引き起こし、続く Ca<sup>2+</sup> 濃度の上昇は、non-capacitative calcium entry (NCCE) によるものと示唆されている。

眼科領域においては、角膜上皮に存在する PARs についての研究はなされているものの涙腺での報告は、涙液分泌に関係する in vivo 実験で、細胞内の反応、特に [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> の変動を見ているものではない。また、これまでの研究の多くが細胞内の反応、特に [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> の変動を見ているものではなく、さらに [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> の上昇の後にどのように外分泌機転が誘発されるかについての研究はほとんどないと言ってよい。また、涙腺は Sjögren 症候群のような涙液分泌低下を来たす疾患において重要であり、その炎症機転機構を解明することはきわめて臨床的意義が大きいことも挙げられる。

上記に記載した結果をふまえると、細胞内情報伝達系において、PARs は G タンパクに結合して

いるとすればどのタイプに結合しているのか、[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> の上昇後に引き起こされる Ca<sup>2+</sup> 流入がどのタイプのチャネルによるのかなど、その作用機序について鳥瞰的に整理された図を描くに至っていない (?マーク)。



2. 研究の目的

本研究の目的は、炎症機転を考える上で、**外分泌腺とくに涙腺という機能単位の中で、PARs 刺激を通じて [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> の変動と涙液分泌機構を経時的に観察し、解析することである。**先に述べたように [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇後の外分泌機構についてはほとんどわかっていない。また、涙腺において PARs の果たす役割も同様である。[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇後すぐに外分泌が起こると考えている研究者が多いが、共同研究者らの肥満細胞を使った報告では、[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇に分泌は直結しないことを国際学会で報告している。**本研究の予備実験では、細動脈と涙腺に対する PARs、特に PAR-2 の反応は全く異なると言った結果を得ている。**当該研究期間では、まず PAR-2 刺激による正常涙腺細胞内での変化を観察し、その実験結果をもとに涙腺疾患の病態解明に生かしたい。

3. 研究の方法

1) 細胞の [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 変動やフリーラジカルの産生をイメージングできる腺細胞および腺房標本を、涙腺から作製する。

2) 涙腺での Ca<sup>2+</sup> シグナリングにおける PARs、特にその中でも PAR-2 の役割を決定する。腺細胞に PAR-2 の合成アゴニスト (PAR-2AP) である SLIGRL-NH<sub>2</sub> を投与して細胞がどのような [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 変動を示すか、イメージング法を用いて検討する。

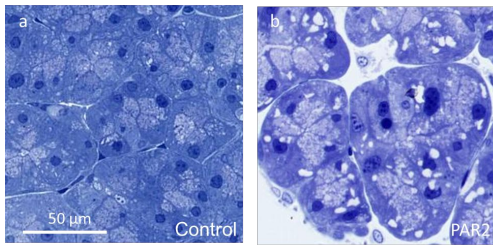
3) さらに、細胞内 Ca<sup>2+</sup> シグナリングに関連する試薬、およびプロテインキナーゼのアゴニストあるいはアンタゴニストを用いて PAR-2 への効果を評価する。

4) さらに PAR-2 の反応機構がどのように分泌に影響を及ぼすか生化学的にも検討する。

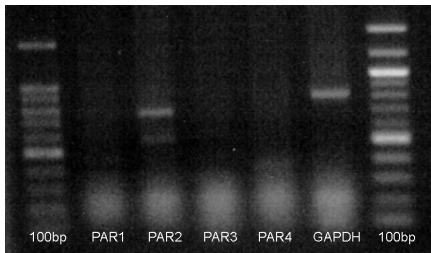
5) イメージングに用いた生組織標本を化学固定し、電子顕微鏡で耳下腺細胞の微細構造の変化を検討する。

#### 4. 研究成果

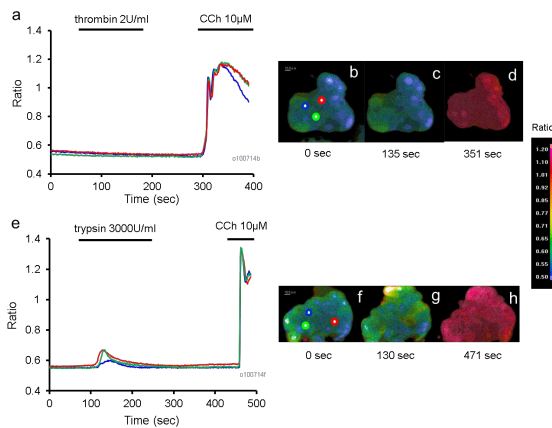
光学顕微鏡では拡大した腺腔と開口放出像が確認された。



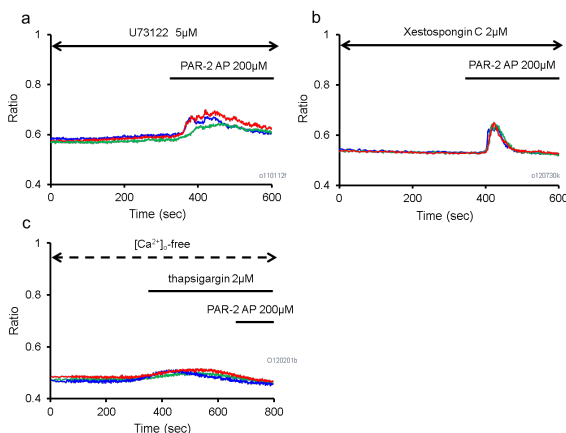
RT-PCR では PAR-2 受容体のみ発現が認められた。



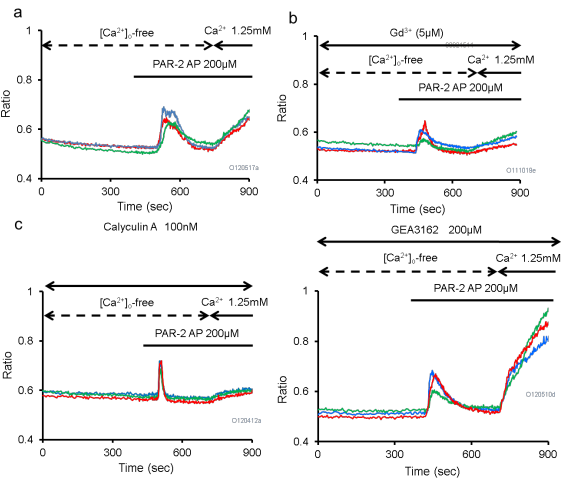
これを示唆するように PAR-1,3,4 のアゴニストのトリピンでは反応を認めないのに対し、トリプシンや PAR-2 アゴニストの投与によって  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇を認めた。



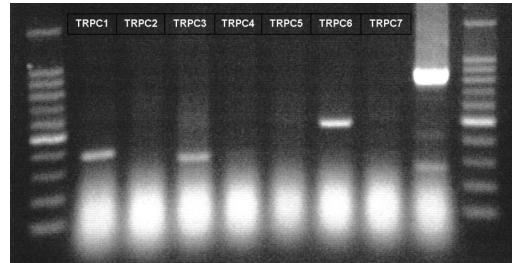
$[Ca^{2+}]_i$  の上昇は、細胞外の  $Ca^{2+}$  除去によっても消失せず、 $Gd^{3+}$  投与によっても抑制されなかった。また、PLC 抑制薬の U73122 や IP3 受容体阻害剤の Xestospongine C でもこの反応は阻害されなかった。



細胞外からの  $Ca^{2+}$  流入機構について検討したところ、低濃度  $Gd^{3+}$  や calyculin A の投与で完全抑制されず、NO の donor の投与で  $Ca^{2+}$  流入の増強を認めた。



TRPC 受容体についても検討したところ、TRPC1,3,6 の発現が確認された。



考察: 以上の結果から、PAR-2 は細胞内ストアを刺激して  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇を引き起こすが、これは IP3 非依存性の反応と考えられる。また、細胞外からの  $Ca^{2+}$  流入は、CCE と NCCE が協調している可能性が示唆されるが、結果から NCCE の方が優位に働いている可能性があり、TRPC6 受容体が強く発現していることからこのことが示唆される。

#### 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 6 件)

1) Yan J, Akutsu H, Satoh Y: The morphological and functional observation of the gap junction proteins in the oviduct epithelia in young and adult hamsters. *Okajimas Folia Anat Jpn* 2011;88(2): 57-64.

2) Miura H, Saino T, Sato, M, Satoh Y: The role of protease activated receptors in the intracellular calcium dynamics of neurons and satellite cells in the rat superior cervical ganglia. *Bioimages* 2011;19: 17-27.

3)佐藤洋一:右の腸 左の腸の発生学的・解剖学的差異. 胃と腸 2012;47:1920-1926

4)Kamada Y, Saino T, Oikawa M, Kurosaka D, Satoh Y: P2Y purinoceptors induce intracellular calcium dynamics of acinar cells in rat lacrimal glands. Histochem Cell Biol 2012;137:97-106.

5)Oikawa M, Saino T, Kimura K, Kamada Y, Tamagawa Y, Kurosaka D, Satoh Y: Effects of protease-activated receptors (PARs) on intracellular calcium dynamics of acinar cells in rat lacrimal glands. Histochem Cell Biol 2013;140:463-476.

6)Sawai T, Uzuki M, Miura Y, Kamataki A, Matsumura T, Saito K, Kurose A, Osamura YR, Yoshimi N, Kanno H, Moriya T, Ishida Y, Satoh Y, Nakao M, Ogawa E, Matsuo S, Kasai H, Kumagai K, Motoda T, Hopson N. World's first telepathology experiments employing WINDS ultra-high-speed internet satellite, nicknamed "KIZUNA". J Pathol Inform. 2013;4:24.

(学会発表) (計 31 件)

1)鳥羽良陽, 木村桂, 及川誠, 村井憲一, 黒坂大次郎:トリーク眼内レンズの術後眼内回旋量の検討. 第26回JSCRS学会総会;2011年6月, 福岡.

2)木村桂, 工藤利子, 江川勲, 石川陽平, 横山大輔, 黒坂大次郎:角膜移植抜糸前後の角膜前後屈折値の検討. 第11回東北屈折矯正研究会;2011年9月, 盛岡.

3)鎌田有紀, 齋野朝幸, 黒坂大次郎, 佐藤洋一:ATP受容体刺激による涙腺腺房細胞の細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度上昇はP2Y受容体が主である. 日本解剖学会 第57回東北・北海道連合支部学術集会;2011年9月, 盛岡.

4)玉川靖則, 齋野朝幸, 松浦誠, 佐藤洋一:利尿剤であるspironolactoneのラット精巣細動脈における細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>)上昇機構の検討. 日本解剖学会 第57回東北・北海道連合支部学術集会;2011年9月, 盛岡.

5)木村桂, 藤原貴光, 黒坂大次郎:改造プラチナ1シリーズハンドピースによるZCB00挿入法の検討. 第27回JSCRS学会総会;2012年6月, 東京.

6)木村桂, 村井憲一, 黒坂大次郎:角膜表面反射による術前マーキング法を用いたトリークIOLの術後成績. 第12回東北屈折矯正研究会;2012年9月, 仙台.

7)齋野朝幸, 玉川靖則, 佐藤洋一:ラット精巣細動脈におけるスピロラクトン誘発性Ca<sup>2+</sup>上昇メカニズムの研究. 第37回日本微小循環学会総

会;2012年3月, 盛岡.

8)齋野朝幸, 柁一毅, 松浦誠, 佐藤洋一:細動脈における血管平滑筋の多様性:リアルタイム共焦点レーザー顕微鏡による解析 第37回日本微小循環学会総会, 招待講演;2012年3月, 盛岡.

9)齋野朝幸, ワトソン アイリーン, 佐藤洋一:ラット耳下腺における細胞内カルシウム動態を指標としたプロテアーゼ活性化型受容体2の機能解析. 第117回日本解剖学会総会全国学術集会;2012年3月, 甲府.

10)佐藤洋一:バイオイメージングの実際. 第28回医学生物学電子顕微鏡技術学会講演会;2012年5月, 盛岡.

11)齋野朝幸, 玉川靖則, 松浦誠, 佐藤洋一:利尿剤であるspironolactoneの受容体はどこに存在するか:ラット精巣細動脈における細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>)上昇機構での検討. 第21回日本バイオイメージング学会学術集会;2012年8月, 京都.

12)三浦仁, 佐藤洋一, 齋野朝幸:ラット上頸神経節におけるプロテアーゼ活性化型受容体の刺激による細胞内カルシウム濃度変動の解析. 第21回日本バイオイメージング学会学術集会;2012年8月, 京都.

13)及川誠, 齋野朝幸, 黒坂大次郎, 佐藤洋一:涙腺腺房細胞におけるプロテアーゼ活性化型受容体の発現とその機能解析. 日本解剖学会 第58回東北・北海道連合支部学術集会;2012年9月, 山形.

14)佐藤洋一:血管平滑筋のカルシウム動態イメージング. 第58回東北・北海道連合支部学術集会. 特別講演;2012年9月, 山形.

15)佐藤洋一:各種臓器由来の血管平滑筋の細胞内カルシウム動態. 日本顕微鏡学会第56回シンポジウム;2012年11月, 札幌.

16)Satoh Y, Saino T, Akutsu-Yamauchi H: New era of dynamic morphology by the realtime confocal microscopy: with special reference to Ca<sup>2+</sup> dynamics in living tissues. The 41st International Congress of Histochemistry and Cytochemistry, Aug, 2012, Kyoto.

17)Satoh Y-I, Saino T, Miura H: Effect of PARs on [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> dynamics of sympathetic ganglia of rats. The 52nd American Society for Cell Biology Annual Meeting, Dec, 2012, San Francisco.

18)Saino T, Eileen L. Watson, Satoh Y: Protease-activated receptor 2 performs the protein secretion through the phosphorylation of

CAMK II in rat parotid gland acinar cells. The 41st International Congress of Histochemistry and Cytochemistry, Aug, 2012, Kyoto.

19)Oikawa M, Saino T, Kimura K, Kamada Y, Kurosaka D, Satoh Y: Effects of protease-activated receptors (PARs) on intracellular calcium dynamics of acinar cells in rat lacrimal glands. The 52nd American Society for Cell Biology Annual Meeting, Dec, 2012, San Francisco.

20)Saino T, Eileen L. Watson, Satoh Y : Protease-activated receptor 2 performs the protein secretion through the phosphorylation of CAMK II in rat parotid gland acinar cells. The 52nd American Society for Cell Biology Annual Meeting, Dec, 2012, San Francisco.

21)Tamagawa Y, Saino T, Matsuura M, Satoh Y: The mechanism study of spironolactone-induced Ca<sup>2+</sup> increase in rat testicular arteriole smooth muscle cells The 52nd American Society for Cell Biology Annual Meeting, Dec, 2012, San Francisco.

22)小野寺毅、今泉利雄、木村桂、工藤利子、高橋和博、高橋俊明、渡邊敏明: BUT 短縮型ドライアイに対する2%レバミピド点眼液の効果。角膜カンファランス 2013; 2013年2月、和歌山。

23)及川誠、齋野朝幸、木村桂、黒坂大次郎、佐藤洋一: 涙腺腺房細胞におけるプロテアーゼ活性化型受容体の発現とその機能解析。第118回日本解剖学会総会・全国学術集会; 2013年3月、高松。

24)玉川靖則、齋野朝幸、松浦誠、佐藤洋一: 利尿剤である spironolactone の受容体はどこに存在するか: ラット精巣細動脈における細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度 ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>)上昇機構での検討。第118回日本解剖学会総会・全国学術集会; 2013年3月、高松。

25)Saino T, Eileen L. Watson, Satoh Y : Protease-activated receptor 2 affects protein secretion through a multifunctional Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase (CAMK II) pathway in rat parotid gland acinar cells. FAOBMB Mini-Symposium –Molecular Bases for Medical and Pharmaceutical Sciences–, Apr, 2013, Morioka.

26)Satoh Y, Saino T, Masu K, Matsuura M, Misaki T, Tamakawa Y, Sasaki K: Functional heterogeneity of blood vessels: with special reference to Ca<sup>2+</sup> dynamics of smooth muscles. International Symposium Anatomical Science for advance in health and clinical therapy 2013, Aug, 2013, Sendai.

27)Saino T, Oikawa M, Kimura K, Kamada Y, Tamagawa Y, Kurosaka D, Satoh Y: Effects of protease-activated receptors (PARs) on intracellular calcium dynamics of acinar cells in rat lacrimal glands. International Symposium Anatomical Science for advance in health and clinical therapy 2013, Aug, 2013, Sendai.

28)木村桂、工藤利子、黒坂大次郎: 前部層状角膜移植後にトーリック IOL を挿入した一例。第13回東北屈折矯正研究会; 2013年9月、山形。

29)佐々木香奈、平川正人、齋野朝幸、佐藤洋一: 血管平滑筋の細胞内カルシウム動態に及ぼす神経伝達物質の効果-細動脈と細静脈の比較-。第59回日本解剖学会東北・北海道連合支部学術集会; 2013年9月、札幌。

30)Higashio H, Satoh Y: The GTPase Rab37 participates in the control of mast cell degranulation. 第36回日本分子生物学会年会; 2013年12月、神戸。

31)及川誠、木村桂、工藤利子、橋爪公平、黒坂大次郎: トウワタ茎汁により夫婦ほぼ同時に両眼発症した一過性角膜内皮機能不全の一例。角膜カンファランス 2014; 2014年1月、沖縄。

(図書)(計1件)

佐藤洋一、齋野朝幸、阿久津仁美: カルシウムイメージング技術の基礎。日本組織細胞化学会編 組織細胞化学 2011 p175-185. (2011)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

木村桂 (KIMURA KATSURA)  
岩手医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 10364358

### (2)研究分担者

齋野朝幸 (SAINO TOMOYUKI)  
岩手医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 40305991

佐藤洋一 (SATO YOH-ICHI)  
岩手医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 40118253

### (3)連携研究者

黒坂大次郎 (KUROSAKA DAIJIRO)  
岩手医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 20215099