

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463068

研究課題名(和文)水チャネル, アクアポリン5をターゲットとした放射線性口腔乾燥症治療の可能性の検討

研究課題名(英文) Studies on the molecular mechanism of hyposalivation after irradiation, focusing on aquaporin-5, for clinical applications

研究代表者

須佐 岳人 (SUSA, Taketo)

群馬大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：10622558

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：頭頸部への放射線照射後の唾液分泌低下と、唾液腺腺房細胞の水チャネルであるアクアポリン5との関係を、ラットとマウスで検討した。15グレイの1回照射により、1か月後には唾液分泌量は低下し、2か月後も低下したままであった。耳下腺組織を観察すると、腺房細胞のなかには異常な大型の核を持つ細胞が認められたものの、アクアポリン5については、発現量も細胞内分布も大きな変化は認められなかった。また、照射前にピロカルピンを投与しても唾液分泌低下を劇的に抑えることはできなかった。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the relationships between the hyposalivation after irradiation to head and neck region and the expression and subcellular distribution of water channel aquaporin-5 that plays an important role in water secretion in the salivary gland acinar cells using rats and mice. Single dose irradiation of 15 gray to these animals caused apparent reduction of saliva in 1 month and the reduction continued until 2 months. No apparent change in either the expression or subcellular distribution of aquaporin-5 was found in the parotid glands, although there were some abnormal cells having larger nuclei. Pretreatment with pilocarpine did not show apparent protective effect against hyposalivation in our current study.

研究分野：口腔外科学

キーワード：放射線照射 唾液腺 アクアポリン

1. 研究開始当初の背景

臨床医学の現場では、頭頸部腫瘍の治療にエックス線照射を用いることが多い。その際に、病巣は存在しないが、同時に照射されてしまう唾液腺は大きな影響を受ける。すなわち、唾液分泌量が低下し、口腔乾燥症に陥る。唾液は食事の摂取・嚥下に重要であるのみならず、口腔内の抗菌作用を有するほか、口腔内を湿潤な状態に保ち、円滑な発話を可能にするなどの重要なはたらきをもつ。したがって、口腔乾燥症は生活の質を低下させる重大な障害であり、その予防と治療は重要な課題である。照射動物を用いた、唾液腺機能低下機序の解明と、機能保持、機能回復に向けた研究は盛んにおこなわれているが、未だ不明な点が多い。唾液腺の腺房細胞には、細胞膜に水チャネルであるアクアポリン5が存在することを我々は明らかにしてきた。照射による唾液分泌低下の機序のひとつとして、アクアポリン5の減少や、細胞内分布の乱れが示唆されてきた。しかし過去の文献をみるとその解析結果と解釈には疑問な点もあり、再検討が必要であると感じた。

2. 研究の目的

我々は、唾液腺の水チャネルについて、多くの研究をおこなってきた。本研究では、その手法を用いて、照射によるアクアポリン5の変化を正確に解析することとした。また、臨床現場では、唾液腺刺激薬であるピロカルピンを照射前に投与しておくことで、唾液分泌低下を抑制できる場合があるので、モデル動物で、その機序を含めて検討することとした。すなわち、照射後の唾液腺に起こる変化をアクアポリン5を中心に解析し、口腔乾燥症の治療や予防に向けた基礎データを得ることを目的として本研究をおこなった。

3. 研究の方法

(1) アクアポリン5の調節機構の検討

まず、唾液腺のアクアポリン5について、その調節機構について、さらに知見を深めることとした。唾液の分泌は、おもに水成分の分泌とタンパク質成分の分泌に分けられ、別の制御を受ける。そこで、ラットに、1) 水成分の分泌を促す作用のあるピロカルピン、2) タンパク質成分の分泌を促す作用のあるイソプロテレノールを7日間繰り返し投与し唾液腺を採取した。アクアポリン5の変化を、アクアポリン5抗体を用いた免疫染色やウェスタンブロットで解析した。また、唾液分泌を抑制する目的でラットを絶食にし、唾液腺を採取して、同様にアクアポリン5を解析した。また、唾液分泌時に、水の移動の原動力となる塩化物イオンの移動に重要な細胞膜輸送体である Na/K/2Cl cotransporter (NKCC1)と、チャネル TMEM16A についても解析を加えた。

(2) エックス線照射による唾液腺の変化の

検討

まず、オスのラットに動物用エックス線照射装置で15グレイを照射した。照射後2時間、2週間、4週間後に唾液腺を採取し、ヘマトキシリン・エオジン染色による組織学的解析とアクアポリン5、NKCC1、TMEM16Aの免疫染色をおこなった。

引き続き、唾液分泌量測定法を確立し、マウスを用いた検討をおこなった。マウスは以下の3群に分けた。

1) コントロール群：照射なし

2) 15グレイ照射群

3) ピロカルピン投与1時間後に15グレイ照射群

いずれの群も、1か月後と2か月後に唾液分泌量を測定した。唾液分泌量は、ピロカルピン刺激による、一定時間の唾液分泌量を測定した。唾液腺を採取し、組織学的解析と免疫染色をおこなった。オスとメスについて検討した。

4. 研究成果

(1) アクアポリン5の調節機構 - ピロカルピン、イソプロテレノールの影響

ピロカルピンは、唾液の水成分の分泌を刺激すること、また、照射による唾液分泌機能低下を抑制する効果が示唆されていることから、ピロカルピンの連続投与でアクアポリン5の発現量が増加することを予想した。しかし、解析した結果、予想に反してアクアポリン5は減少気味であった。一方で、腺房細胞の分泌顆粒放出により、唾液のタンパク質成分の分泌を促すイソプロテレノールの連続投与で、アクアポリン5の発現量が大きく上昇することが、免疫染色とウェスタンブロットの解析で判明した。イソプロテレノールの作用は分泌顆粒を放出させることなので、逆に顆粒放出を抑制するためにラットを絶食にし、唾液腺のアクアポリン5を解析した。その結果、とくに耳下腺でアクアポリン5の発現が大きく減少することが判明した。つまり、顆粒の放出が促進された状態が続くとアクアポリン5の発現が上昇し、顆粒の放出が抑制された状態が続くと発現が低下することが考えられた。以上の結果、アクアポリン5は唾液分泌状態に伴って発現量が変化するものの、水成分の分泌との関連は低いことが示唆された。アクアポリン5は水透過性のチャネルであるが、水の移動の原動力はイオンの動きである。腺房では塩化物イオンが腺房細胞から分泌されることでナトリウムイオンも移動し、水が移動する。そこで塩化物イオンの分泌に関係するNKCC1とTMEM16Aについても検討することとした。絶食による影響を調べたところ、アクアポリン5以外のNKCC1とTMEM16Aについては発現量に大きな変化がないことが判明した。

(2) エックス線照射による唾液腺の変化

まず、照射の条件の検討も含めて、ラットに15グレイを1回照射して、照射後2時間、2週間、4週間で唾液腺を採取し解析した。ヘマトキシリン・エオジン染色では、いずれの時点でも大きな変化が認められなかった。免疫染色をおこなったところ、照射後2時間の時点では、アクアポリン5、NKCC1、TMEM16Aのいずれもタンパク質量や細胞内分布に大きな変化は認められなかった。しかし、これらの動物については、唾液分泌量の測定をしていなかったため、照射しても唾液分泌低下がおこっていなかった可能性が残された。そこで、ピロカルピン刺激による唾液分泌量測定法を確立し、マウスを用いて照射実験を繰り返した。過去の報告では、メスを対象とした研究が多く、性差の影響も検討する必要があると判断し、オスとメスで検討した。その結果、照射後1か月でオス、メスともに明らかに唾液分泌量が減少した。またその程度はメスの方が大きいようであった。1か月の時点で耳下腺の組織像を観察すると、組織形態はほぼ保たれているものの、腺房細胞には大型化した核をもつ細胞がみられるなど、細胞レベルでは損傷を受けていると思われた。また、アクアポリン5を免疫染色してみると、コントロールと比較して、発現量も細胞内分布も大きな変化はみられないようであった。また、ピロカルピンを投与してから15グレイを照射したマウスも解析した。唾液分泌量は、ピロカルピン投与なしで照射した動物ほどは低下していないようであったが、個体差もありはっきりしていない。唾液腺組織像やアクアポリン5の発現量、局在については、ピロカルピン投与なしで照射した動物とほぼ同様の变化であった。

以上の結果、本研究では、まず、1)アクアポリン5の調節機構の一部を新たに解明することができた。水分分泌を促進するピロカルピンには、アクアポリン5の発現を上昇させる作用はないことがわかった。また、2)エックス線照射動物を用いた検討では、アクアポリン5は唾液分泌に重要といわれながら、照射による唾液分泌低下を説明できるほどの変化を示さないことがわかってきた。解析は途中となってしまったが、NKCC1やTMEM16Aを含めて検討を進める必要がある。

5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計3件)

Matsuzaki T, Yaguchi T, Shimizu K, Kita A, Ishibashi K, Takata K. The distribution and function of aquaporins in the kidney: resolved and unresolved questions. *Anat Sci Int*, in press, DOI: 10.1007/s12565-016-0325-2. 査読有

Ikedo M, Matsuzaki T. Regulation of aquaporins by vasopressin in the kidney.

Vitam Horm 98: 307-337, 2015, DOI: 10.1016/bs.vh.2014.12.008. 査読有

Susa T, Sawai N, Aoki T, Iizuka-Kogo A, Kogo H, Negishi A, Yokoo S, Takata K, Matsuzaki T. Effects of repeated administration of pilocarpine and isoproterenol on aquaporin-5 expression in rat salivary glands. *Acta Histochem Cytochem* 46: 187-197, 2013 DOI: org/10.1267/ahc.13037. 査読有

〔学会発表〕(計9件)

谷口明慧、黒川潤、本間実、向後寛、向後晶子、横尾聡、松崎利行。唾液腺腺房細胞で唾液分泌に必要とされるAQP5、NKCC1、およびTMEM16Aの絶食による発現量変化の検討。第121回日本解剖学会総会・全国学術集会、ビッグパレットふくしま、福島県郡山市、2016年3月29日。

五味暁憲、清水崇寛、横尾聡。口腔がん治療時の口腔不快症状と漢方-患者のQOL維持・向上を目指した漢方薬の適応-。第66回日本東洋医学会学術集会、富山国際会議場、富山県富山市、2015年6月14日。

Matsuzaki T, Takata K. Tissue distribution of water channel proteins (aquaporins and relatives). The second world congress on water channel proteins (aquaporins and relatives). The "Babes-Bolyai" University, Cluj-Napoca, Romania, 7 May, 2015

松崎利行、矢口知征、清水絹恵。ラット、マウスの腎臓近位尿細管におけるアクアポリンの分布局在の再検討。第55回日本組織細胞化学学会総会・学術集会、松本市中央公民館、長野県松本市、2014年9月28日。

松崎利行。腎臓における水チャネル。第61回北関東医学会総会、群馬大学、群馬県前橋市、2014年9月26日。

松崎利行、澤井信彦、小澤一史。アクアポリンの発現と機能的意義-下垂体の幹・前駆細胞ニッチにおける発現も含め-。日本下垂体研究会第29回学術集会、八王子セミナーハウス、東京都八王子市、2014年8月9日。

須佐岳人、澤井信彦、向後晶子、青木武生、向後寛、横尾聡、高田邦昭、松崎利行。ピロカルピンまたはイソプロテレノール投与による唾液腺アクアポリン5発現量の変化。第119回日本解剖学会総会・全国学術集会、自治医科大学キャンパス、栃木県下野市、2014年3月27日。

須佐岳人、根岸明秀、横尾聡。細胞膜水子

ヤネル - アクアポリン 5 のラット唾液腺における発現調節に関する検討。第 58 回日本口腔外科学会総会・学術大会、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡、福岡県福岡市、2013 年 10 月 11 日。

須佐岳人、澤井信彦、向後晶子、青木武生、向後寛、横尾聡、高田邦昭、松崎利行。ラット唾液腺における細胞膜水チャネル - アクアポリン 5 の発現調節に関する検討。第 54 回日本組織細胞化学会総会・学術集会、航空会館、東京都港区、2013 年 9 月 28 日。

6 . 研究組織

(1)研究代表者

須佐 岳人 (SUSA, Taketo)

群馬大学・医学系研究科・研究員

研究者番号：10622558

(2)研究分担者

横尾 聡 (YOKOO, Satoshi)

群馬大学・医学系研究科・教授

研究者番号：00322206

松崎 利行 (MATSUZAKI, Toshiyuki)

群馬大学・医学系研究科・教授

研究者番号：30334113

(3)研究協力者

谷口 明慧 (TANIGUCHI, Akie)