

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 19 日現在

機関番号：14101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670855

研究課題名(和文) PDEの唾液タンパク質合成・分泌促進による新型インフルエンザの新治療方法開発

研究課題名(英文) Development of new therapeutic method of novel influenza by the promotion of salivary protein synthesis and secretion by PDE

研究代表者

村田 琢 (MURATA, TAKU)

三重大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：80242965

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：鳥インフルエンザウイルスは変異により爆発感染(パンデミック)する可能性がある。それゆえにphosphodiesterase (PDE) と抗ウイルス作用のある唾液タンパク質との関係を研究した。

舌下腺はアドレナリン作動性神経の作用がないためPDE活性はほとんどないと考えていた。しかし、他の唾液腺と同様のPDE活性を示し、舌下腺特有のPDEの作用がある可能性が示唆された。顎下腺腺房細胞ではPDE3阻害剤でアミラーゼやアクアポリンの発現が増加した。ノックアウトマウスと野生型での更なる詳細な検討では変化を認めなかった。

研究成果の概要(英文)：There is possibility of the explosion infection (pandemic) by the mutation of avian influenza virus. Therefore, we studied relationship between phosphodiesterase (PDE) and antiviral salivary proteins. As the sublingual gland does not have action of the adrenergic nerve, we had thought that there was little PDE activity in the sublingual gland. However, the PDE activity in the sublingual gland was like other salivary glands. And it was suggested that there was the specific PDE action in the sublingual gland. In submandibular acini cells, PDE3 inhibitor stimulated the expressions of amylase and aquaporin. We did not find the difference knockout and wild mouse in the further detailed studies.

研究分野：医歯薬学

キーワード：唾液腺 cAMP phosphodiesterase

## 1. 研究開始当初の背景

鳥インフルエンザウイルスがヒトインフルエンザウイルスと混じり合い、人の間で感染する能力を持つウイルスが生まれる可能性が報告され、将来、爆発的感染（パンデミック）を引き起こす可能性が高まっている。しかも、抗ウイルス薬やワクチンを十分量確保することは困難で、また、耐性などの問題も指摘され、新しい予防や治療方法開発が急務である。

唾液腺には大唾液腺（耳下腺、顎下腺、舌下腺）と小唾液腺があり、唾液のほとんどは大唾液腺から分泌されている。唾液には水、電解質、タンパク質などの種々の成分が含まれていて、唾液タンパク質には抗ウイルス作用のある唾液タンパク質が含まれる。唾液タンパク質合成・分泌などは細胞内のセカンドメッセンジャーである cAMP により制御されている。そして、細胞内の cAMP 濃度はアデニル酸シクラーゼによる合成と phosphodiesterase (PDE) の分解により調節されていることが知られている。PDE は 11 種類 (PDE1 - PDE11) あるが、Nature Review 等で報告されているように『細胞内に局在しているそれぞれの PDE が特定の刺激による cAMP シグナル伝達を細胞内局所に封じ込め (compartmentalization)、他の刺激由来の cAMP シグナルを分離している。』ため、各 PDE が異なる唾液タンパク質を制御している可能性がある。

## 2. 研究の目的

PDE により抗ウイルス作用のある唾液タンパク質合成・分泌を促進し、新型インフルエンザウイルスの新しい予防や治療方法を確立することが可能であると考えられる。しかし、唾液腺での PDE と唾液タンパク質との関

係はわれわれの報告以外にはほとんどなく、詳細は全く不明である。そこで本研究では最初にげっ歯類唾液腺での PDE について検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) PDE 活性測定

唾液腺を摘出後 PBS(-) で洗浄し、PDE 測定用 buffer を加えホモジナイザーでホモジナイズした。

PDE 活性は cAMP のアイソトープを使用して測定した。

### (2) RT-PCR による PDE 発現

唾液腺を摘出後 PBS(-) で洗浄し、すぐにドライアイスで凍結した。その後、唾液腺から total RNA を抽出した。

total RNA 濃度の測定を行った。

reverse transcriptase にて total RNA より cDNA を作成した。

サーマルサイクラーを使用して PCR を行った。

電気泳動後、サイバーグリーンで染色し、バンドを確認した。

### (3) 分離細胞作成

唾液腺を摘出後 PBS(-) で洗浄し、分離細胞作成用 buffer 内で唾液腺を細切した。

コラゲナーゼ等を加え、シェイカーでシェイクした。

上記の処理した細胞を percoll 中で遠心により腺房細胞と導管細胞に分離した。

形態学的な分離の確認は、最初に、倒立型顕微鏡で腺房細胞と導管細胞を観察した。この段階で分離が確認できたので、ホルマリン固定後パラフィン封埋し、切片後、ヘマトキシリン-エオジン染色を行い観察した。

形態学的に分離が確認できたので腺房細胞マーカーのアミラーゼ活性と導管細胞マ

ーカーのカリクレイン活性を測定し、分離を確認した。

#### (4) リアルタイム PCR による発現

唾液腺を摘出後 PBS(-)洗淨し、すぐにドライアイスで凍結した。その後、唾液腺から total RNA を抽出した。

total RNA 濃度の測定を行った。

reverse transcriptase にて total RNA より cDNA を作成した。

リアルタイム PCR にてそれぞれの発現を確認した。

#### (5) PDE3 ノックアウトマウスでの検討

PDE3 ノックアウトマウスは海外共同研究者である米国国立衛生研究所 (National Institutes of Health (NIH)) で作成された。

そして、顕微鏡的観察と電顕的観察用の標本なども NIH で作成された。

### 4. 研究成果

#### (1) ラット舌下腺での PDE 活性

舌下腺はアドレナリン作動性神経の作用がほとんどないため、全体の PDE 活性はほとんどないと考えていた。しかし、顎下腺や耳下腺とほぼ同様の PDE 活性を示したため、舌下腺特有の PDE の作用がある可能性が示唆された。

#### (2) 唾液腺での PDE 発現

舌下腺で PDE 活性が他の唾液腺と同程度あったため、各唾液腺での PDE 発現を検討したところ、それぞれの唾液腺で PDE 発現が異なっていた。

(3) 顎下腺分離腺房細胞での PDE3 阻害剤の効果

顎下腺分離腺房細胞に PDE3 阻害剤を作用させたところアミラーゼやアクアポリンの発現が増加した。

#### (4) PDE ノックアウトマウスでの検討

ノックアウトマウスと野生型マウスでの形態学的変化を分泌顆粒のサイズなどを含め更に詳細に検討したが、特に大きな変化を認めなかった。

### 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 1 件)

(1) Ahmad F, Murata T, Shimizu K, Degerman E, Maurice D, Manganiello V., Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases: important signaling modulators and therapeutic targets, Oral Diseases, 査読有, 21, 2015, 25-50, DOI: 10.1111/odi.12275

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

村田 琢 (MURATA, Taku)

三重大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：80242965

### (2)研究分担者

清水 香澄 (SHIMIZU, kasumi)

三重大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20378368

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：