

論文審査の結果の要旨

氏名：櫻井 甫

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：The role of calcium response in regulation and maintenance of secretory function in salivary glands
(唾液腺の分泌機能の調節と維持におけるカルシウム応答の役割)

審査委員：(主査) 教授 平塚 浩一

(副査) 教授 清水 武彦

教授 吉垣 純子

唾液は口腔内衛生を維持する上で重要な役割を果たしており、その分泌低下は様々な口腔機能障害の原因となる。現在、口腔乾燥症患者は全国で800万人にのぼると言われており、今後の超高齢社会において、さらに増加していくことが予想される。唾液分泌量を減少させる要因として、加齢や服薬など様々な原因が考えられるが、健常者でも個人差が大きく、生活習慣や遺伝的な要因によっても差が出ていると考えられる。

唾液腺腺房細胞では、副交感神経刺激によってムスカリン受容体が活性化し、イノシトール三リン酸が合成される。イノシトール三リン酸受容体は小胞体膜上に存在する Ca^{2+} チャネルであり、イノシトール三リン酸が結合すると小胞体内に貯蔵されている Ca^{2+} を細胞質に放出するため、細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇する。 Ca^{2+} は腺腔膜に存在するカルシウム依存性 Cl^{-} チャネルに結合し、 Cl^{-} が細胞内から腺腔へ放出される。腺腔の Cl^{-} の電気化学ポテンシャルによって、血漿の Na^{+} がタイト結合を経由して腺腔に輸送される。その結果、腺腔内の浸透圧が上昇して、血漿の水を腺腔に引き込んで、原唾液が生成される。したがって、腺房細胞における細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が水分分泌に重要な役割を果たしており、水分分泌量を決定していると考えられている。

ムスカリン受容体刺激によって起こる細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇には、刺激直後に急速に起こる Ca^{2+} 濃度上昇 (peak phase) とそれに続く持続相 (sustained phase) の二相からなる。細胞内 Ca^{2+} プールからの Ca^{2+} 放出が急速な細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を引き起こすが、 Ca^{2+} 放出によってやがて細胞内プール内の Ca^{2+} 濃度の低下が起こる。小胞体に存在する STIM タンパク質が細胞内 Ca^{2+} プールの枯渇を感知して、細胞膜に存在する Ca^{2+} チャネルである Orai を活性化する。その結果、細胞外の Ca^{2+} が細胞内に流入して持続相を形成する。Orai を介する Ca^{2+} 流入は、容量依存性 Ca^{2+} 流入 (Store-Operated Ca^{2+} Entry: SOCE) と呼ばれる。本研究では、唾液腺機能における Ca^{2+} 応答の役割を解析した。細胞内 Ca^{2+} 濃度測定は、蛍光指示薬である Fura-2-AM を細胞内にロードし、蛍光光度計による測定を行った。Fura-2 は 510nm の励起光によって 340nm と 380nm の蛍光を出す。 Ca^{2+} 結合状態では 340nm の蛍光が増加し、380nm の蛍光が減少する。340nm と 380nm の蛍光の比 (F340/F380) を測定し、細胞内 Ca^{2+} 濃度の指標とした。

まず、唾液分泌能が異なることが報告されている 2 系統のマウスにおけるカルシウム応答の比較を行った。マウスでは系統によって齶蝕感受性が異なるが、齶蝕感受性の低い C3H/HeSlc (C3H) マウスでは唾液分泌能が高いが、齶蝕感受性の高い B57BL/6CrSlc (B6) では C3H と比べて唾液分泌能が低いことが報告されている。顎下腺から細胞を単離し、ムスカリン受容体アゴニストであるカルバコール (CCh) 刺激による Fura-2 の蛍光変化を測定した。1 μM の CCh によって F340/F380 は上昇し、そのピークの高さは 2 系統ともほとんど差が見られなかった。しかし、ピーク後の持続相では、有意差はみられなかったものの、C3H の方が高い傾向がみられた。さらに、続いて 10 μM CCh を添加すると、ともにさらに F340/F380 が上昇したが、そのピーク高さは C3H が有意に高かった。このことから、持続相以降に起こるカルシウム濃度上昇に差があると考えられた。しかし、リアルタイム RT-PCR によって STIM1, STIM2, および Orai1 の mRNA 発

現量を調べたところ、2系統間に差はみられなかった。高濃度の CCh による刺激時の Ca^{2+} 動態に差がみられたことから、細胞内 Ca^{2+} プールの容量の比較を行った。細胞外 Ca^{2+} を除去した培地で、細胞内 Ca^{2+} ポンプに対する阻害剤であるタプシガルギンによる細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化をみた。タプシガルギンは小胞体に存在する Ca^{2+} ポンプを阻害するため、細胞質にリークした Ca^{2+} が小胞体内に戻れず細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇する。タプシガルギン存在下での細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇は C3H が B6 よりも有意に高かった。従って、細胞内 Ca^{2+} の容量は C3H の方が高く、そのために CCh 応答性の Ca^{2+} 濃度上昇が高かった可能性がある。

次に、ラット耳下腺腺房細胞の初代培養細胞における分泌関連機能について解析を行った。ラット耳下腺から腺房細胞を単離して培養すると、単離過程において組織障害が起こり、Src-p38 MAP キナーゼを介した脱分化シグナルを誘導する。Src の活性化には活性酸素種が関わっていることを我々はすでに報告している。そこで、活性酸素スカベンジャーの一つである MCI-186 が唾液腺細胞の機能低下を抑制するかを解析した。MCI-186 はエダラボンとも呼ばれ、脳梗塞急性期に脳機能保護に用いられる薬剤である。MCI-186 存在下で耳下腺腺房細胞を単離し、CCh によるカルシウム応答を測定したところ、非存在下と比較してカルシウム応答のピークおよび持続相が高く、水分泌能が高いことが期待された。

これらの結果から、唾液腺機能において重要な水の分泌量は、カルシウム応答の大きさの違いに依存すると予測される。唾液分泌能を維持するためにはカルシウム応答を維持することが必要であり、細胞ストレスに対して活性酸素スカベンジャーである MCI-186 が機能低下を予防することが期待される。本研究で得られた知見は、唾液分泌能を維持するメカニズムを明らかにし口腔乾燥症の予防法の開発に貢献すると考えられる。

よって本論文は、博士（歯学）の学位を授与されるに値するものと認められる。

以 上

平成31年2月21日