

2. 公募研究

研究課題名： *In vivo* 機能解析法を用いた口腔感覚刺激による唾液腺再生機序の解明と新規ドライマウス治療薬の検索

研究代表者：根津顕弘（北海道医療大学 歯学部 口腔生物学系 薬理学分野）

研究分担者：細矢明宏（北海道医療大学 歯学部 口腔構造・機能発育学系 組織学分野）

【研究の背景と目的】

唾液腺の片側の障害により、反対側の代償性肥大が起こることが知られている。これまで我々は、生きた動物の唾液腺における Ca^{2+} 応答と血流のイメージングと共に、唾液分泌を同時に測定できる *in vivo* 機能解析法を開発した。この研究により、片側顎下腺障害は反対側の腺肥大だけでなく、アセチルコリン (ACh) 感受性増大による Ca^{2+} 応答と唾液分泌が増強されることを発見した。この唾液腺の ACh 感受性の増大は、ムスカリン受容体作動薬であるピロカルピンでも起こることから、「口の乾きによる粘膜刺激」が副交感神経系を介して、唾液腺の機能亢進を起こす可能性が示されている。また我々は、「嚙む刺激」と唾液腺機能の関係を調べた結果、14 日間の液状餌で飼育したラットの耳下腺が正常の半分以下に萎縮し、その後の 3 日間の固形餌飼育によって萎縮した唾液腺が正常近くまで回復すること、この再生腺では分泌機能が正常レベルに回復することを見出した。この結果は、「嚙む刺激」により萎縮腺からの腺再生とその機能回復が起こることを示している。

本研究は、口腔感覚刺激による唾液腺の自己再生と機能亢進のしくみを解明し、それを応用したドライマウスの新規治療薬の検索を目的とする。この生体に備わる唾液腺の維持や自己再生のしくみを解明し、薬物による唾液腺の再生を目指す。

【実験方法】

1) 液状餌による耳下腺萎縮と固形餌や薬物による再生誘導

対照群として、7 週齢の Wistar 系雄性ラットを 17 日間固形餌（固形餌群）あるいは液状餌（液状餌群）で飼育したものをを用いた。液状餌で 14 日間飼育後、固形餌で 3 日間飼育し、唾液腺の再生（液状/固形餌群）を促した。

2) 食餌性状変更による唾液分泌機能の解析

上記条件で飼育したラットを麻酔後、薬物投与用カテーテルを大腿静脈に挿入した。唾液分泌刺激はシリンジポンプを用いた ACh の静脈内持続投与により行った。ACh による持続的な唾液分泌は、予め重量を測定しておいた綿球をラット口腔内に挿入する綿球法により測定した。

3) 薬理学的手法による唾液腺再生に関わるシグナルの解析

液状餌 14 日間飼育した後、固形餌で 3 日間飼育中に 1 日 1 回薬物投与を行った。対照群として 17 日間固形餌（固形餌群）、17 日間液状餌（液状餌群）、および 14 日間液状餌の後 3

日間の固形餌（液状/固形餌群）で飼育したものをを用いた。また液状餌で 17 日間飼育の最後の 1 日あるいは 3 日間に 1 日 1 回薬物を皮下投与し、耳下腺再生が起こるか否か検討した。これらの条件で飼育したラットを安楽死後、耳下腺、顎下腺および舌下腺を摘出し重量を測定した。

4) 耳下腺萎縮と固形餌で誘導される唾液腺再生に関与する遺伝子の網羅的解析

上記方法で飼育したラットから摘出した耳下腺および顎下腺から RNA 抽出キットを用いて total RNA を抽出した。サンプルの遺伝子発現量を、次世代シーケンサーを用いたバルク RNA-Seq により解析する（Rhelixa 社）。固形餌群、液状餌群、および液状/固形餌群で比較し、発現量に変化する遺伝子を網羅的かつ定量的に解析した。

【結果と考察】

1) 食事性状変化による耳下腺萎縮とその後の回復の誘導

液状餌群のラットの耳下腺重量は、固形餌群の 33%まで低下した。また液状/固形餌群では固形餌群の 85%まで回復した。液状餌飼育による唾液腺萎縮は、耳下腺で顕著にみられ、顎下腺では大きな萎縮は認められなかった。アセチルコリンの静脈内持続投与（60 nmol/min）による唾液分泌量を各群で比較すると、液状餌群では固形餌群の 55%まで分泌機能が低下し、液状/固形餌群では固形餌群と同等の分泌が観察された。以上の結果から、わずか 3 日の咀嚼刺激で萎縮した耳下腺の重量に加え、唾液分泌機能が回復することが明らかになった。

2) 唾液腺再生に関わるシグナルの解析

咀嚼刺激による耳下腺回復における自律神経系が関与を調べるため、腺重量変化に対する受容体遮断薬や作動薬の効果を検討した。液状餌で 14 日飼育後の 3 日固形餌摂食時にアトロピンあるいはプロプラノロールを皮下投与すると、プロプラノロールによって萎縮耳下腺の重量の回復は完全に抑制されたが、アトロピンでは有意な抑制は認められなかった。また液状餌 17 日の最後の 3 日間にピロカルピン、イソプレナリンあるいはニコチンを皮下投与すると、腺重量はそれぞれ 78、121 および 78%まで回復した。これらの結果から、この耳下腺の再生には交感神経系伝達物質による β アドレナリン受容体の活性化が関与する可能性が示された。

3) 耳下腺萎縮と固形餌で誘導される唾液腺再生に関与する遺伝子の網羅的解析

各群の耳下腺組織の遺伝子発現変動を網羅的に解析したところ、液状餌飼育後に 1 日だけ固形餌で飼育した群と液状餌群で変動する遺伝子数が最も多く、2 倍以上有意に上昇した 477 遺伝子と 2 倍以上有意に低下した 124 遺伝子が認められた。発現上昇する遺伝子群には、細胞増殖や分化（24 個）、血管や神経新生（11 個）、唾液分泌関連分子（9 個）あるいは免疫系を制御する多数の遺伝子（295 個）が認められた。

【今後の展望】

今後は、本研究で得られた液状餌飼育で萎縮した耳下腺を再生させるしくみを薬物で誘導できるか否かを検討する。長期間の液状餌飼育で萎縮した耳下腺を液状餌のまま腺重量や機能を回復させる可能性のある薬物を選択肢し、耳下腺再生を起こす薬物を同定する。さらに再生が誘導される薬物を用いて薬物投与で起こる副作用なども調べる予定である。この実験で得られる結果は、唾液腺の腺体と機能再生を促すという全く新しい治療薬の開発への大きなヒントとなることが期待される。

また、食餌性状変更によって多くの遺伝子変動が認められた。耳下腺再生におけるこれらの遺伝子の機能の解析をすすめるとともに、変動遺伝子をマーカーとして利用し耳下腺の維持や萎縮からの再生に関わる細胞内シグナル伝達機構についても薬理学および組織学的手法により解析する予定である。

研究協力者：高橋 茂（北海道大学大学院 歯学研究院 口腔機能解剖学教室）

MST Tahmina Akter（北海道医療大学 歯学部 口腔生物学系 薬理学分野）

加藤志織（北海道医療大学 歯学部 第4学年）

藤田尚正（北海道医療大学 歯学部 生体機能・病態学系 歯科麻酔科学分野）

照光 真（北海道医療大学 歯学部 生体機能・病態学系 歯科麻酔科学分野）