

論文内容の要旨

P2Y purinoceptors mediate ATP-induced changes in intracellular calcium and
amylase release in acinar cells of mouse parotid glands

—P2Y 受容体はマウス耳下腺腺房細胞での ATP 誘発性細胞内カルシウム上昇と
アミラーゼ分泌に関与している—

(Biomedical Research 第 37 巻、第 1 号、平成 28 年 2 月掲載予定)

もりぐち かすみ
守口 霞

I. 研究目的

唾液腺は、分泌顆粒を蓄えた腺房細胞と、唾液の輸送路を形成する導管細胞から構成される。腺房細胞からの分泌顆粒はアミラーゼなどのタンパク質を含み、開口分泌によって腺腔内に放出される。分泌は自律神経系で調節されているが、加えて ATP 等の神経伝達物質の作用を解明することはシェーグレン症候群等を考える上でも極めて臨床的意義が大きい。そこで ICR マウスでの ATP 受容体の種類とその反応機構について検討することを目的とした。

II. 研究方法

マウス (ICR ♀ 12-18W) を CO₂ 吸入にて屠殺後耳下腺を摘出した。標本を HEPES バッファー中で純化コラゲナーゼ 100U/ml を用い 37°C、60 分消化した。その際、15 分毎に O₂ を注入し、開始 30 分から 10 分おきにピペッティングで組織の粉碎を行った。消化後、フィルターにかけ細胞を回収し、Ca²⁺ 感受性色素 (Indo-1/AM ; 5 μM) を含むバッファーで 37°C、1 時間振盪して色素を細胞に導入した。標本をカバーガラスに固着させリアルタイム共焦点レーザー顕微鏡 (Nikon RCM/Ab) を用い [Ca²⁺]_i の画像解析を行った。併せて、Indo-1/AM 付加前の検体から mRNA を採取し、RT-PCR を行った。

III. 研究成績

(1) Ca²⁺ イメージング

ATP は [Ca²⁺]_i を上昇させた。同じ外分泌腺である涙腺と異なり、反応は腺終末部の管腔側から始まった。この上昇に神経系の関与はなかった。細胞内外の Ca²⁺ の関与を検討したところ、細胞内ストアからの Ca²⁺ 放出が優位に働いていることを確認した。受容体の検討では、この反応に P1 受容体は関与せず、P2 受容体が働いており、刺激薬実験から G タンパク共役型の P2Y 受容体が主であることが確認された。

(2) アミラーゼ分泌

ATP の反応は濃度依存的であり、ATP によってアミラーゼ分泌が起こることを確認した。また、この分泌はカルシウム依存性であった。

(3) P2 受容体の発現

耳下腺に P2X_{2,4,7} と P2Y_{1,2,10,12,14} のプリン受容体の発現が確認された。このうち特に P2X₄ と P2Y_{1,10,12,14} の発現が強く認められた。

IV. 考察及び結論

1. 耳下腺には P2 プリン受容体が存在することが確認された。P2X と P2Y の双方が存在すると考え

- られるが、イメージングの結果から、P2Y が優位に働いている可能性が高い。
2. RT-PCR の結果から、P2X_{4,7} と P2Y_{1,10,12,14} 受容体が強く発現していることが確認された。
 3. ATP によってアミラーゼ分泌が起こることが確認され、これは細胞内 Ca²⁺ 濃度上昇依存的であることが確認された。
 4. 耳下腺分泌に関する ATP 受容体について、今までの報告では P2X、特に P2X₇ 主体と考えられているが、我々の結果から P2Y 特に P2Y_{1,12} 受容体が優位に働いて [Ca²⁺]_i を上昇させている可能性が高い。

論文審査の結果の要旨

論文審査担当者

主査 教授 加藤 裕久 (薬理学講座 病態制御学分野)
副査 准教授 久慈 昭慶 (口腔保健育成学講座 小児歯科学・障害者歯科学分野)
副査 教授 齋野 朝幸 (解剖学講座 細胞生物学分野)

唾液腺からの分泌は自律神経系で調節されているが、加えて ATP 等の神経伝達物質の作用を解明することはシェーグレン症候群等を考える上でも極めて臨床的意義が大きい。本論文は、正常 ICR マウス涙腺腺房細胞に存在する ATP 受容体の種類とアミラーゼ分泌機構についての研究である。今まで耳下腺での P2 プリン受容体の種類は詳細には検討されていなかったが、本研究によって P2X と P2Y の双方が存在すると考えられ、イメージングの結果から、P2Y が優位に働いている可能性が高いことが示された。また、今まで検討されていない P2 受容体の種類も詳細に同定されている。耳下腺からの唾液分泌にプリン受容体が関与することも明らかにし、その分泌の一つがカルシウム依存性である事も明らかにした。ATP 受容体のうち唾液分泌に関するものは、今までの報告では P2X₇ 主体と考えられているが、本研究によって P2Y、特に P2Y_{1,12} 受容体が優位に働いて細胞内 Ca²⁺ 濃度を上昇させ、アミラーゼ分泌を誘導している可能性が高いことが明らかになった。学位に値する。

試験・試問結果の要旨

本文の要旨についての質問に加え、細胞内カルシウムの動員機構、およびプリン受容体に関する諮問を行い、適切な解答を得た。学位に値する学識を有しているものと認めた。

参考論文

1. 簡易呼吸陽圧発生装置が自発呼吸に及ぼす影響
—呼吸力学パラメータによる分析—
(久慈 昭慶 他 8 名と共著)
- 岩手医科大学歯学雑誌 平成 27 年 1 月
第 39 巻 第 3 号
98 項—105 項