

論文内容の要旨

$\alpha 1$ -Adrenoceptors relate Ca^{2+} modulation and protein secretions in rat lacrimal gland

($\alpha 1$ アドレナリン受容体はラットの涙腺において Ca^{2+} 調節と蛋白分泌に関与する)

(池田千花, 東尾浩典, 中野真人, 大久保雅俊, 佐藤洋一, 黒坂大次郎, 齋野朝幸)

(Biomedical Research 36 巻, 6 号 平成 27 年 12 月掲載)

I. 研究目的

自律神経の刺激により涙腺から涙液が分泌される。涙液中にはリソソーム, ラクトフェリン, 分泌型ムチンなどのタンパクが含まれており眼表面の抗菌作用や涙液の蒸発を防いでいる。ムチンは主に結膜から分泌され, ヒトでは涙腺の導管からも分泌されているとの報告がある。交感神経から放出されるノルアドレナリン (NA) 刺激によるタンパクの分泌作用は弱く, 血流を増やすことで間接的に分泌を促すと考えられていたが, 近年 $\alpha 1$ アドレナリン受容体刺激が直接タンパクの分泌を促進すると言ったものや, ATP を介して間接的に分泌を促すという報告があった。しかし, これまでの報告では涙腺腺房細胞からの直接的なムチン分泌の詳細な経路については明らかにされていない。腺房細胞からのムチンを含むタンパクの分泌機構を明らかにすることは, ドライアイやシェーグレン症候群の病態解明や治療において重要である。本研究は, 特に涙腺をストレスで緊張する交感神経刺激類似の NA を用いて涙腺腺房細胞の細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) の変動を解析し, 涙腺細胞内のタンパク分泌機構を明らかにすることを目的とした。

II. 研究対象ならび方法

Wistar ラット (7-12 週, 150-290g) を CO_2 吸入にて屠殺し, 涙腺を摘出後純化コラゲナーゼで消化し, 腺房単位に分離した。腺房細胞に Ca^{2+} 感受性蛍光色素 (Indo-1/AM) を導入し, NA や NA アゴニスト等の刺激による $[Ca^{2+}]_i$ をリアルタイム共焦点レーザー顕微鏡 (Nikon RCM/Ab) を用いて観察した。受容体については PT-PCR 法を用い, 腺房細胞に発現している α , β アドレナリン受容体およびムチンを確認した。ムチンを含むタンパク分泌については, 同じ分泌顆粒に含まれると考えられるペルオキシダーゼを指標とし, 腺房細胞を 60-80 分間刺激した後, ELISA 法を用いてペルオキシダーゼ活性を測定することで代用し検証した。

III. 研究結果

PT-PCR では涙腺腺房細胞に $\alpha 2C$, $\beta 1$, $\beta 3$ を除くほぼ全ての NA 受容体を認めた。NA は涙腺腺房細胞で二相性の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を引き起こした。細胞外 Ca^{2+} 除去および Ca^{2+} チャネルブロッカーはどちらもこの上昇を部分的に阻害し, 二相目の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇のみ抑制した。PLC 阻害薬の U73122 および G 蛋白アゴニストの Suramin の使用により, ほぼ完全に NA 誘発性 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を抑制した。受容体について検討すると, $\alpha 1$ アゴニストである phenylephrine 刺激で強い $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を認めたが, $\alpha 2$ アゴニストである clonidine および β アゴニストである isoproterenol では有意な $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を認めなかった。カルシ

ウム上昇に関係すると考えられる PKC のアンタゴニストである GF109203X は、NA 誘発性 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇に影響を及ぼさなかった。タンパク分泌を検討すると、NA 刺激によって濃度依存的にペルオキシダーゼ分泌の上昇を認めた。phenylephrine 刺激ではペルオキシダーゼ上昇を認めたが、isoproterenol 刺激では変化を認めなかった。カルシウムイオノファである A23187 刺激によってもペルオキシダーゼの著名な上昇を認めたことから、ペルオキシダーゼ分泌はカルシウム依存性である事が示唆された。ムチンの発現を RT-PCR で確認した結果、腺房細胞に MUC1, 4, 5A, 5B, 16 の発現を認めた。

IV. 結 語

今回の検討により NA 受容体のうち特に $\alpha 1$ 受容体は涙液分泌において重要な役割を果たしている可能性が示された。副交感神経刺激を代用するコリン刺激は IP_3 依存性に $[Ca^{2+}]_i$ 増加を誘発するが、交感神経刺激の代用の NA 刺激は $[Ca^{2+}]_i$ 非依存性であるとされている。以前の我々の報告で、モルモット涙腺では NA はカテコラミン受容体を介した $[Ca^{2+}]_i$ の増加によって開口放出が促されるが、分泌に重要な役割を果たす筋上皮細胞の収縮はコリン刺激によってのみ起こると報告している。本研究により、交感神経の $\alpha 1$ 受容体活性化による IP_3 依存性の $[Ca^{2+}]_i$ 増加は副交感神経機構と同様なメカニズムで $[Ca^{2+}]_i$ の増加が引き起こされることから、これらの両経路が活性化されることにより、協調して涙腺からの涙液分泌が増加するのではないかと推測された。

ムチン分泌は間接的にペルオキシダーゼ活性で測定したが、今回 phenylephrine 刺激によって腺房細胞からペルオキシダーゼ分泌が誘発され、この刺激は Ca^{2+} 依存性であることが示された。また、RT-PCR によっても分泌型ムチン発現が確認できたことから、涙腺腺房細胞から分泌型のムチンが少なからず分泌されている可能性が示唆された。

論文審査結果の要旨

論文審査担当者

主査 教授 鈴木 健二 (麻醉学講座)

副査 教授 黒坂大次郎 (眼科学講座)

副査 教授 前沢 千早 (腫瘍生物学研究部門)

本研究は涙腺からの涙液分泌機構を神経生理学的に明らかにしようとした基礎的研究である。従来涙分泌への神経学的関与は副交感神経系が主とされ、交感神経系の関与は少ないものとされてきたが、最近交感神経系が腺房細胞からの蛋白質分泌等重要な役割を果たしている事が示唆されている。また、涙腺腺房細胞内カルシウム濃度上昇が涙分泌のtriggerとなることが明らかにされている。これらの点に着目し、ラット涙腺の腺房細胞を用いて交感神経刺激による細胞内カルシウム濃度の変化を観察し、蛋白質を含む涙分泌機構を明らかにすることを試みた。今回は涙液分泌に α_1 アドレナリン受容体が重要な役割を果たしており、副交感神経刺激時と同様に α_1 受容体活性化によっても細胞内カルシウム増加が起こされていることを明らかにした。さらに涙液中蛋白の一つであるムチン分泌を反映するペルオキシダーゼも α_1 受容体刺激によって誘発され、この分泌もカルシウム依存性であることを明らかにした。

シェーグレン症候群をはじめとする涙分泌機能低下状態の病態解明および治療法の開発に新知見を与える優れた研究であり、学位に値する。

試験・試問の結果の要旨

涙分泌の機序および機能低下による緒症状、合併症とその予防法や治療法について試問し適切な解答を得た。学位に値する学識と指導能力を備えていることを認めた。

参考論文

- 1) 眼内レンズ挿入の極小切開強角膜創への影響 (鳴海新平, 他6名と共著)
眼科手術, 27巻, 4号 (2014): p614-618.
- 2) Polymer I/A チップとmetal I/A チップの灌流量と吸引量の比較 (黒沢千花, 他3名と共著)
臨床眼科, 68巻, 10号 (2014): p1421-1426.