

## 論文内容の要旨

論文題目 テオフィリン投与ラットの唾液腺の変化

氏名 梶川悟

ホスホジエステラーゼ (PDE) は、アデニレートシクラーゼによって産生されるサイクリック AMP (cAMP) を分解する酵素で、PDE 阻害薬は細胞内の cAMP シグナルを増強させる作用を有することから、喘息の治療に用いられている。PDE 阻害薬の毒性として、血管炎および唾液腺肥大が知られているが、後者についてはこれまで詳細な研究がほとんどされていない。そこで、本研究では、代表的な PDE 阻害薬であるテオフィリン (1,3-dimethylxanthine) を用いて、唾液腺に対する影響を病理組織学および分子生物学的に明らかにした。

### (1) テオフィリン投与後の唾液腺の経時変化

7 週齢のオス F344 ラットにテオフィリンを 50 mg/kg の用量で単回および反復 4 日間 (1 日 2 回) 腹腔内投与した後、臨床症状、耳下腺と顎下腺の臓器重量および病理組織学的変化を経時的に検査した。

単回投与では、投与後 4 時間まで流涎がみられた。それに一致して、耳下腺および顎下腺の重量が一過性に減少し、病理組織学的には腺房の細胞内分泌顆粒が減少した。投与後 24 時間の耳下腺および顎下腺の重量は対照群に比べてわずかに増加した。反復投与でも、単回投与と同様に、毎投与後 4 時間まで流涎がみられた。最終投与の投与直前の耳下腺および顎下腺の重量は対照群の約 1.3 倍に増加した。重量は、投与後 4 時間まで減少し、8 時間には投与直前値に戻った。細胞内分泌顆粒の変動は、唾液腺の重量の変化とよく一致していた。

以上の結果から、テオフィリンによる唾液腺の肥大は、テオフィリンを投与するたびに腺房の分泌顆粒の放出と再充填のサイクルを繰り返すことにより、唾液分泌機能が亢進した結果と考えられた。また、耳下腺および顎下腺ともに投与後 4 時間の腺房上皮細胞では、タンパク合成の亢進を示唆する核の淡明・大型化、核小体の明瞭化、および基底膜側の好塩基性領域の拡大がみられた。

## (2) 筋上皮細胞，導管および水分分泌タンパクの唾液分泌への関与

唾液の分泌には，腺房のみならず，筋上皮細胞，導管および細胞膜の水透過チャンネル(アクアポリン，AQP)が関与していることが知られている．そこで，7週齢のオス F344 ラットにテオフィリンを 50 mg/kg の用量で反復 4 日間(1 日 2 回)腹腔内投与し，最終投与後に経時的に耳下腺と顎下腺を採取し， $\alpha$ -Smooth Muscle Actin(筋上皮細胞のマーカー)および AQP5(唾液腺に特異的な AQP)に関する免疫組織化学的検査，共焦点レーザー顕微鏡および電子顕微鏡検査をおこなった．

筋上皮細胞が最も多く分布していたのは，耳下腺および顎下腺ともに介在部導管の周囲であった．耳下腺の腺房周囲にはほとんど分布していなかった．顎下腺の腺房周囲には分布はしていたが，数は少なかった．テオフィリン投与により，耳下腺および顎下腺の腺房は分泌顆粒を放出して小型化したが，筋上皮細胞の組織学的変化はあきらかではなかった．対照群の AQP5 シグナルは，耳下腺では腺房の内腔で，顎下腺では腺房内腔に加えて介在部導管の内腔で，それぞれ強かった．テオフィリンを投与しても，耳下腺および顎下腺の腺房のシグナルに変化はみられなかったが，顎下腺の介在部導管では，テオフィリン投与により AQP5 のシグナルが増強することが共焦点レーザー顕微鏡検査により明らかになった．顎下腺の介在部導管上皮細胞では，テオフィリン投与後 1 時間に空胞が多くみられ，この空胞は電子顕微鏡観察で細胞間の開大であることが確かめられた．この変化は耳下腺ではみられなかった．

以上の結果から，テオフィリンを投与すると，耳下腺および顎下腺ともに分泌顆粒が放出されて腺房が小型化するが，腺房周囲には筋上皮細胞は少なく，筋上皮細胞が腺房を収縮させていることを示す組織学的変化もみられなかった．このことから，分泌における筋上皮細胞の寄与はそれほど大きくないと考えられた．顎下腺の介在部導管では，AQP5 シグナルがもともと強いこと，および，テオフィリン投与後に同部のシグナルが増強して空胞化(細胞間の開大)がみられることから，唾液の水分分泌に関しては，耳下腺よりも顎下腺，また，顎下腺の中でも特に介在部導管が重要な役割を果たしている可能性が考えられた．

## (3) テオフィリンによる唾液分泌シグナル

唾液分泌の生理的なメカニズムに関しては，特に アドレナリン受容体を介する経路がよく知られている．アドレナリン受容体が刺激されると，細胞膜の G タンパクによりアデニレートシクラーゼが活性化され，cAMP が合成されてシグナルが伝達される．このシグナルにより唾液が分泌される．従って，PDE 阻害薬による唾液分泌亢進にも cAMP シグナルが関与している可能性が考えられた．そこで，ラット唾液腺の組織内 cAMP 濃度および PDE 酵素活性がテオフィリン投与により変化するかどうか調べた．すなわち，7 週齢のオス F344 ラットに

テオフィリンを 50 mg/kg の用量で単回腹腔内投与して、経時的に耳下腺と顎下腺を採取した。組織内 cAMP 濃度については Enzyme Immunoassay 法により測定し、PDE 酵素活性については酵素組織化学的手法により調べた。加えて、テオフィリン投与による唾液分泌に アドレナリン受容体が関与しているか否かを調べるため、プロプラノロール（アドレナリン受容体拮抗薬）とテオフィリンを併用投与し、投与後 4 時間の耳下腺および顎下腺の重量を測定した。

耳下腺および顎下腺の cAMP 濃度は、テオフィリン投与により増加した。耳下腺の PDE 酵素活性には、テオフィリン投与により明らかな変化は認められなかったものの、顎下腺では PDE 酵素活性の低下がみられた。プロプラノロールとテオフィリンの併用投与により、テオフィリン単独投与に比べ、耳下腺および顎下腺の重量の減少を部分的に抑制した。

以上の結果から、テオフィリンによるラットの唾液腺の変化には、PDE 活性の抑制に伴う cAMP シグナルが関連していることが示された。また、アドレナリン受容体遮断がテオフィリンによる唾液腺重量の低下を軽減したことから、受容体を介した経路も部分的に関与していると考えられた。

#### （４）唾液腺の遺伝子発現

cAMP は遺伝子の転写因子のひとつであること、および、テオフィリン投与後の腺房細胞ではタンパク合成の亢進を示唆する組織所見がみられたことから、テオフィリンにより遺伝子発現が増加している可能性が考えられた。そこで、cAMP によって転写が制御されていることが知られている唾液腺の主要な遺伝子のうち、分泌タンパクの中から消化酵素のアミラーゼ（AMY1）および口腔内の殺菌作用を有する Cystatin S（CysS）、PDE サブファミリーの中から唾液腺に多く発現している PDE3A と PDE4D、さらに、水分泌チャネルのアクアポリン 5（AQP5）について、これらの遺伝子の発現量の変化を調べた。すなわち、7 週齢のオス F344 ラットにテオフィリンを 50 mg/kg の用量で単回および反復 4 日間（1 日 2 回）腹腔内投与した。経時的に耳下腺と顎下腺を採取し、Real-time RT-PCR 法を用いて遺伝子発現量の変化を調べた。アミラーゼに関しては免疫組織化学的検査もおこなった。

耳下腺および顎下腺の主要な分泌タンパクは、それぞれ AMY1 および CysS であった。単回投与では、分泌タンパク遺伝子の発現量の一過性の増加がみられた。反復投与では、CysS の発現量の著しい増加がみられた。AMY1 遺伝子の発現量の変化は明らかでなかったが、免疫組織化学的検査ではテオフィリン投与により耳下腺腺房のアミラーゼの枯渇と再充満がみられた。テオフィリンによる唾液腺肥大は、cAMP シグナルに関連すると考えられる分泌タンパクの合成亢進によることが示された。PDE3A 遺伝子の発現量は耳下腺で、PDE4D は顎下腺で、それぞれ発現が多かった。単回投与では、PDE3A 遺伝子の発現量は一過性に増加した。反復投

与では、顎下腺では発現量の持続的増加がみられ、テオフィリン投与により更に発現量が増加した。一方、PDE4D の遺伝子発現量には変化はみられなかった。PDE3A 遺伝子の発現量の増加は、過剰な cAMP に対するフィードバックと考えられ、また、同じ PDE でもサブファミリーごとに遺伝子発現のメカニズムが異なることも示唆された。AQP5 遺伝子の発現量は耳下腺および顎下腺でほぼ等しく、テオフィリン投与による変化も明らかではなかった。顎下腺の介在部導管では、免疫組織化学的検査ではテオフィリン投与により AQP5 シグナルの発現増強がみられたにもかかわらず、遺伝子の発現量に変化がないことから、テオフィリン投与により、細胞内のリザーバーから AQP5 が細胞膜へ移動していることを示唆しているものと考えられた。

上述した本研究の結果、以下のことが明らかとなった。テオフィリンをラットに投与すると、唾液腺の PDE 活性が阻害されて cAMP シグナルが増強される（ アドレナリン受容体を介した経路も一部関与している）。このシグナルにより腺房から分泌顆粒が放出され、分泌タンパク遺伝子の発現増加などによりタンパク合成が亢進し、再び分泌顆粒が腺房細胞の細胞質に蓄えられる。このとき、投与前よりもわずかに多めに蓄えられる、という一連のサイクルの存在が示された。また、テオフィリンを反復投与すると、この一連のサイクルが繰り返されることにより、一部の遺伝子の発現量が持続的に増加して腺房内に分泌顆粒が過剰に蓄積し、腺房が肥大することが示された。このように、テオフィリンによる唾液腺の肥大は、唾液分泌の機能亢進を示す変化と考えられた。また、耳下腺と顎下腺との比較に関しては、耳下腺はアミラーゼなどの消化酵素タンパクの分泌をおこない、顎下腺は口腔内の殺菌に関連したタンパクとともに唾液の水分泌をおこなうという機能分担が示された。さらに、顎下腺の介在部導管が唾液分泌に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。