

イヌ顎下腺細胞からのカルシウムイオン動員によるムチン分泌

山 木 博 司

Mucin release from submandibular gland cells induced by calcium ion.

Hiroshi Yamaki

(平成6年1月20日受付)

緒 言

糖蛋白である高分子ムチンは、唾液腺、消化管粘膜、気管支粘膜等から分泌され、潤滑、緩衝、粘膜保護、微生物凝集作用等により、非免疫的局所防衛に重要な役割を演じている^{1,2)}。特に、口腔は、呼吸器系とともに、消化器系の入り口でもあり、絶えず微生物等の異物の侵入や各種外来刺激に曝されている。そのため、口腔内における局所防衛は、口腔のみならず全身の健康維持にとって必須である。更に、義歯装着者においては、粘膜保護に加え、義歯の維持による口腔機能回復にも関与している²⁾。

顎下腺は、混合腺であり、ムチン分泌細胞を有し、コリン作動性及びアドレナリン作動性神経の二重支配を受けている。ムチン分泌に関しては、主に β アド

レナリン受容体刺激により引き起こされ、 α アドレナリン受容体及びムスカリン様アセチルコリン受容体(ムスカリン受容体)の関与は少ないと言われている^{3,4)}。ラット顎下腺 β 受容体の刺激は、細胞内セカンドメッセンジャーのcAMP産生を促進し、恐らくcAMP-dependent protein kinaseにより、分泌に関与する蛋白質のリン酸化を介し、ムチン分泌を引き起こすものと考えられている^{5,6)}。一方、イヌにおいて、鼓索神経の電気刺激やbethanecholの静脈内投与は、顎下腺からのムチン分泌を促進する⁷⁾。又、Komabayashiらは、イヌ顎下腺スライスを用い、糖蛋白の成分であるシアル酸の遊離が、pilocarpine刺激により引き起こされることを示した⁸⁾。これらのことは、ムスカリン受容体刺激によっても、ムチン分泌が引き起こされることを示唆している。

カルシウムイオン(Ca^{2+})は、種々の細胞における刺激—分泌連関において中心的役割を果たしていることは周知である⁹⁾。Flemingらは、 α_1 アドレナリン受容体、ムスカリン受容体及びペプチド受容体作用薬といった Ca^{2+} 動員に関与する薬物によっても、 β アドレナリン受容体刺激に比較し少量ではあるが、顎下腺細胞からのムチン分泌を促進することを報告した¹⁰⁾。これらの薬物によるムチン分泌時に、ホスファチジルイノシトール(PI)代謝が促進することから、ムチン分泌反応に受容体と共役したPI加水分解を介する機序が関与する可能性が示唆された。又、 β アドレナリン受容体刺激によるムチン分泌が、細胞外液の Ca^{2+} を除去することにより部分的に抑制されること、及び Ca^{2+} キレーターであるBAPTAの添加によっても阻害されることから、 β アドレナリン受容体を介するムチン分泌においても Ca^{2+} の関与が示唆されている¹¹⁾。更に、Millsらにより β アドレナリン受容体作動性薬も顎下腺細胞の細胞内 Ca^{2+} プールから若干の

広島大学歯学部歯科補綴学第一講座(主任:赤川安正教授)本論文の要旨は、第33回歯科基礎医学会総会(平成3年10月,鹿児島),第81回日本薬理学会近畿部会(平成4年6月,名古屋),第34回歯科基礎医学会総会(平成4年10月,岡山),第66回日本薬理学会年会(平成5年3月,横浜),第26回広島大学歯学会総会(平成5年6月)において発表した。

主な略語: ACh, acetylcholine; NAD, noradrenaline; Isop, isoproterenol; Thaps, thapsigargin; 8-br-cAMP, 8-bromoadenosine 3':5'-cyclic monophosphate; Ins(1,4,5) P_3 , inositol 1,4,5-trisphosphate; Ins(1,3,4,5) P_4 , inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate; PLC, phospholipase C; PKC, protein kinase C; DG, diacylglycerol; [Ca^{2+}], 細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度; LY-83583, 6-anilino-5,8-quinolinedione; SK&F 96365, 1- β -[3-(4-methoxyphenyl)propoxy]-4-methoxyphenethyl-1H-imidazole hydrochloride; U-73122, 1-[6-[(17 β -3-methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17-yl)amino]hexyl]-1H-pyrrole-2,5-dione; U-73343, 1-[6-[(17 β -3-methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17-yl)amino]hexyl]-1H-pyrrolidione-2,5-dione.

Ca²⁺ 遊離を引き起こすことが示された¹²⁾。これらの知見は、ムチン分泌反応においても、細胞内 Ca²⁺ 濃度の上昇が何らかの役割を担っている可能性を示唆する。しかし、細胞内 Ca²⁺ 濃度の上昇を引き起こす Ca²⁺ イオノファー単独では、ムチン分泌が認められないこと⁵⁾ 等から、Ca²⁺ のムチン分泌における役割については否定的な見解もあり、顎下腺細胞からのムチン分泌機序に関しては依然不明な点が多い。

これまで報告されている知見の多くは、ラット顎下腺細胞を用いて得られたものである。著者は、ラットに比較し粘液細胞の豊富なイヌ顎下腺細胞を用い、ムチン分泌に関連する細胞内情報伝達系について検索した。

材料ならびに方法

1. 実験動物

実験動物には雑種成犬 (体重 6~16 Kg) 及び Wistar 系雄性ラット (体重 200~250 g) を用いた。

2. 細胞調製

イヌを pentobarbital (30 mg/Kg i.v. 又は 50 mg/Kg i.p.) による深麻酔下に放血致死後、顎下腺を摘出した。顎下腺細胞の単離は、McPherson らの方法に準拠した¹³⁾。すなわち、摘出顎下腺 (8~15 g) を McIlwain tissue chopper により細片とし、Ca²⁺、Mg²⁺-free modified Hanks solution (NaCl 149 mM, KCl 5.4 mM, Na₂HPO₄ 0.3 mM, KH₂PO₄ 0.4 mM, glucose 5.5 mM, Hepes 5 mM, pH 7.4) で洗浄し、酵素液中で 37°C, 60~90分間、100% O₂ 通気下にて激しく振とう (振動数190回/分) した。酵素液は、collagenase (Worthington type2, 100 U/ml), hyaluronidase (Sigma, 1000 U/ml), soybean trypsin inhibitor (S1, Worthington 0.01%) 及び deoxyribonuclease (DNase) (Boehringer, 20 U/ml) を含有した Ca²⁺、Mg²⁺-free modified Hanks solution とした。恒温振とう終了後、細胞はナイロンメッシュによりろ過し、遠心 (20×g, 10分間) 分離した。単離細胞は、100% O₂ で飽和した normal incubation medium (NaCl 136 mM, KCl 4.7 mM, MgCl₂ 1.1 mM, Na₂HPO₄ 1.0 mM, CaCl₂ 1.3 mM, Hepes 10 mM, glucose 5.5 mM, MEM amino acid (Gibco) 2%, bovine serum albumin (BSA) 2%, soybean trypsin inhibitor 0.01%, pH 7.4) に懸濁し、遠心 (20×g, 5分間) により 3 回洗浄し、実験に供した。

3. ムチン分泌

単離細胞は、D-[1-¹⁴C] glucosamine (18.5 kBq/ml, 2.18 GBq/nmol, Amersham) 及び DNase (20 U/ml) を

含む normal incubation medium 中で 37°C, 3 時間、100% O₂ 通気下にてインキュベーションした。Normal incubation medium で 3 回洗浄した後、細胞浮遊液とし、0.8 ml ずつプラスチックチューブに分注し、各実験条件下でインキュベーションを行った。インキュベーション終了後、各標本を遠心 (3000 rpm, 1 分間, 4°C) し、上清を採取した。ムチン分泌量の測定は、McPherson らの方法に従った¹³⁾。すなわち、採取した上清に、トリクロロ酢酸 (最終濃度10%) 及びリンタングステン酸 (最終濃度0.5%) を加え、生じた沈澱中の放射活性をムチン分泌量とし、液体シンチレーションカウンターにより測定した。遠心分離しない標本全放射活性を同様にして求めムチン総量とし、ムチン分泌量はムチン総量に対する割合 (% of total) で示した。

4. [Ca²⁺]_i の測定

BSA 0.5% 含有 normal incubation medium により単離細胞を 2 回洗浄後、細胞浮遊液とした。細胞浮遊液は、1 μM fura 2/AM を、30°C, 30分間のインキュベーションにより負荷後、細胞浮遊液の 2 倍量の normal incubation medium (BSA 0.5%) を加え、更に 30分間インキュベーションを行った。次に、BSA 0.2% 含有 normal incubation medium により 2 回洗浄後、細胞浮遊液は 3~8 × 10⁶ cells/ml に調製し、氷上に保存した。キュベット内に細胞浮遊液 0.5 ml と normal incubation medium 0.5 ml を加え、32°C, 5 分間攪拌した後、蛍光分光光度計 (F-2000, 日立社製) により励起波長 340 及び 380 nm, 蛍光波長 510 nm における二波長の蛍光を測定し、[Ca²⁺]_i は以下の式により算出した。

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d \left[\frac{(R - R_{\min})}{(R_{\max} - R)} \right] \cdot \left[\frac{F_{\min}(\lambda 380)}{F_{\max}(\lambda 380)} \right]$$

$$R = \frac{F(\lambda 340) - Z(\lambda 340)}{F(\lambda 380) - Z(\lambda 380)}$$

R : 340 nm における蛍光 (F(λ 340)) と 380 nm における蛍光 (F(λ 380)) の比

K_d : Ca²⁺ と fura 2 の解離定数 (224 nM)

R_{max}: digitonin 添加により fura 2 を Ca²⁺ と十分結合させたときの R

R_{min}: EGTA により Ca²⁺ を完全にキレートした後の Ca²⁺ 非結合時の R

Z : サンプルのみの自己蛍光

5. Digitonin 膜透過性細胞からの Ca²⁺ 遊離

Normal incubation medium (BSA 0.5%) により単離細胞を 2 回洗浄後、37°C, 30分間インキュベーション

を行った。次に、2 mM EGTA 含有 intracellular buffer (KCl 110 mM, NaCl 10 mM, MgCl₂ 2 mM, KH₂PO₄ 5 mM, HEPES 20 mM, pH 7.2) により 2 回洗浄後、50 μM digitonin と共に 37°C, 5 分間インキュベーションを行い、膜透過性処置を施した。膜透過性細胞は、intracellular buffer により 2 回洗浄後、ATP generation system (MgATP 2 mM, creatinine phosphokinase 20 unit/ml, phosphocreatinine 20 mM) 含有 intracellular buffer にて 3 ~ 8 × 10⁷ cells/ml に調製し、氷上保存した。

測定は、キュベット内に、細胞浮遊液 0.5 ml と ATP generation system 含有 intracellular buffer 0.5 ml を加え、32°C, 5 分間攪拌後、蛍光分光光度計 (HITACHI 850, 日立社製) を用いて行なった。Ca²⁺ 遊離は、励起波長 340 nm 及び蛍光波長 510 nm における吸光度の変化より求めた。

6. 細胞内 Ins(1, 4, 5)P₃ 量の測定

顎下腺細胞浮遊液 0.8 ml に、氷冷 20% 過塩素酸 0.16 ml を加え反応を停止し、氷上に 20 分間放置した。次に、遠心 (2000 × g, 15 分間, 4°C) により上清 0.4 ml を採取し、10 mM EDTA (pH 7.0) 0.1 ml を含むチューブに移した。各サンプルは、Freon (1, 1, 2-trichlorotrifluoroethane) 及び tri-n-octylamine の 1:1 (v/v) 混合液 0.3 ml 添加後、攪拌により中和した。遠心 (2000 rpm, 1 分間) により三相に分離し、最上相を採取し試料とした。試料調製後、Ins (1, 4, 5) P₃ 測定用キット (Amersham) を用い、ラジオイムノアッセイにより測定した。

7. 細胞内 Ins(1, 3, 4, 5)P₄ の測定

Ins (1, 3, 4, 5) P₄ binding protein の調製は、Challissらの方法に従った¹⁴⁾。すなわち、10~15頭のラットより小脳を摘出し、20容量の 1 mM DTT 含有氷冷 20 mM NaHCO₃ 溶液の中で Polytron (2 × 15 s, 5 目盛) を用いホモジネートした後、遠心操作 (5000 × g, 10 分間, 4°C) により上清を採取した。上清は、更に超遠心 (38,000 × g, 20 分間, 4°C) した。生じた沈渣は、タンパク濃度が 5~7 mg/ml になるよう homogenization buffer により調製し、-20°C で保存して用いた。

試料は、Ins (1, 4, 5) P₃ 測定用と同様な手順により調製した。Assay buffer (CH₃COONa 25 mM, KH₂PO₄ 25 mM, EDTA 2 mM, pH 5.0), [³H] Ins (1, 3, 4, 5) P₄ (specific activity 777.0 GBq/mmol, NEN) 及び Ins (1, 3, 4, 5) P₄ binding protein (250 μg) を用いラジオイムノアッセイにより Ins(1, 3, 4, 5)P₄ 量を測定した。

8. Digitonin 膜透過性細胞からのムチン分泌

単離細胞に、3 と同様の手順により [¹⁴C] glucosamine を取り込ませた後、glutamate buffer (potassium glutamate 138.7 mM, pipes 20 mM, NaATP 5 mM, magnesium acetate 7 mM, glucose 5 mM, EGTA 0.5 mM, pH 7.25) により 3 回洗浄し細胞浮遊液とした。次に、50 μM digitonin を添加し、37°C, 5 分間のインキュベーション後、1 回洗浄しプラスチックチューブに 0.8 ml ずつ分注して実験に供した。Buffer 中の遊離 Ca²⁺ 濃度は、Ca²⁺ 電極を用い測定し、設定濃度になるよう添加した。

9. 統計学的処理

有意差の検定は、Student's t-test により行った。

10. 使用薬物

そのほかの主な使用薬物は次の通りである。Acetylcholine chloride (第一製薬), atropine sulfate (Merck), L-noradrenaline (半井化学), isoproterenol, L-phenylephrine, thapsigargin, ionomycin, econazole, miconazole, 8-bromoadenosine 3':5'-cyclic monophosphate sodium salt, neomycin sulfate, ryanodine, cinnarizine, phorbol 12-myristate 13-acetate (Sigma), Ins (1, 4, 5) P₃, Ins (1, 3, 4, 5) P₄, digitonin (和光純薬), heparin, caffeine (片山化学), LY-83583 (Calbiochem-Behring Corp.), GTP-γ-S, GDP-β-S, staurosporine (Boehringer Mannheim), cyclic ADP-ribose (Amersham), TMB-8 (Aldrich Chemical Company), SK&F 96365 (SmithKline Beecham より供与), U-73122, U-73343 (Upjohn Company より供与), pirenzepine (Boehringer Ingelheim より供与)。

結 果

1. イヌ顎下腺細胞からの各種刺激薬によるムチン分泌

イヌ顎下腺細胞において、ACh は濃度依存的にムチン分泌を促進した。NAd, Isop 及び 8-br-cAMP によってもムチン分泌は生じたが、ACh に比較し軽度であった (図 1)。ACh によるムチン分泌は持続的であり (図 2A), atropine 及び pirenzepine により濃度依存的に抑制された (図 2B)。

ラット顎下腺細胞からのムチン分泌反応は、イヌの場合と異なり、ACh に比較し NAd 及び Isop において顕著であった (図 3)。

2. ムチン分泌の Ca²⁺ 依存性

イヌ顎下腺細胞では、Ca²⁺ イオノファーである

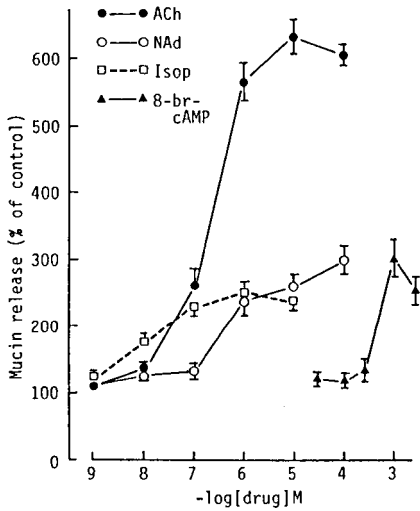


図1 Acetylcholine (ACh), noradrenarine (NAd), isoproterenol (Isop) 及び 8-br-cAMP によるイヌ顎下腺細胞からのムチン分泌
ムチン分泌量は、各薬物添加後、20分間インキュベーションした時の分泌量を、自然分泌量を100%とした時の割合で表した。各値は3~4例の平均値 ± S.E.M. を示す。

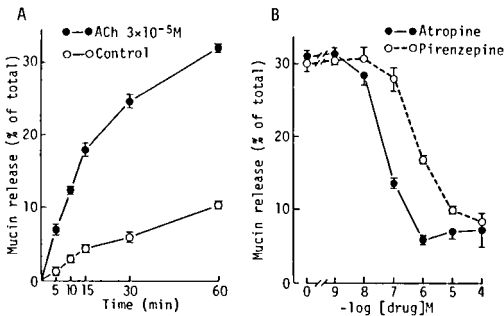


図2 ACh によるイヌ顎下腺細胞からのムチン分泌の経時変化 (A) 及びムスカリン受容体阻害薬の効果 (B)
ムチン分泌量は、ACh 添加後、(A) では横軸に示した各時間、(B) では20分間、インキュベーションした時の分泌量で表した。Atropine 及び pirenzepine は、ACh (10⁻⁵M) 添加3分前に処置した。各値は3~4例の平均値 ± S.E.M. を示す。

Iono により濃度依存的にムチン分泌促進を認めた (図4)。更に、細胞内 Ca²⁺ プールの Ca²⁺ ポンプを特異的に阻害し、細胞内 Ca²⁺ 濃度を上昇させる作用を有する Thaps 2μM によってもムチン分泌を認めた。ラットの場合では、Iono によるムチン分泌促進は、ほとんど認められなかった (図4)。

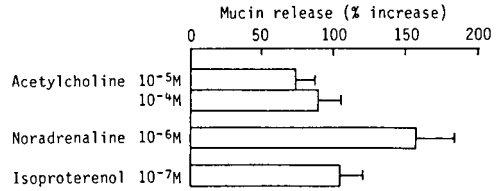


図3 Acetylcholine, noradrenaline 及び isoproterenol によるラット顎下腺細胞からのムチン分泌
ムチン分泌量は、各薬物添加後、15分間インキュベーションした時の分泌量を、自然分泌量に対する増加割合で表した。各値は4例の平均値 ± S.E.M. を示す。

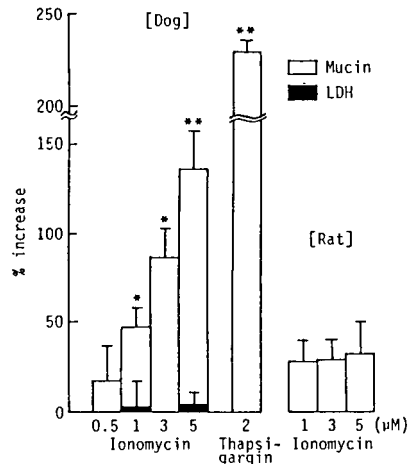


図4 イヌ及びラット顎下腺細胞における ionomycin 及び thapsigargin によるムチン分泌
LDH: lactate dehydrogenase
ムチン分泌量は、ionomycin 及び thapsigargin 添加後、15分間インキュベーションした時の分泌量を、自然分泌量に対する増加割合で表した。各値は3~4例の平均値 ± S.E.M. を示す。*P<0.05, **P<0.01

イヌ顎下腺細胞における各種薬物によるムチン分泌の細胞外 Ca²⁺ 依存性について検討した。ACh によるムチン分泌量は、細胞外液の Ca²⁺ を除去することにより著しく減少した (図5)。Isop 及び 8-br-cAMP によるムチン分泌は、細胞外液 Ca²⁺ 非存在下においても、細胞外液 Ca²⁺ 存在下とほぼ同程度であったが、NAd 及び phenylephrine では減少した (表1)。

3. イヌ顎下腺細胞内の [Ca²⁺]_i 動態

ACh は、二相性の [Ca²⁺]_i 上昇、すなわち、刺激直後の一過性上昇 (ピーク) とそれに続く持続性上昇 (プラトー相) を引き起こした (図6)。ピーク及びプラトー相共に ACh 濃度に依存して上昇した。Atro-

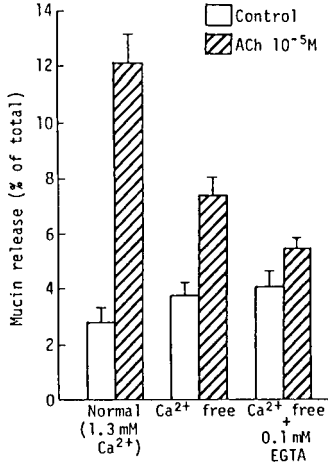


図5 AChによるイヌ顎下腺細胞からのムチン分泌に対する細胞外Ca²⁺の影響
ムチン分泌量は、ACh添加後、20分間インキュベーションした時の分泌量で表した。各値は3例の平均値±S.E.M.を示す。
Ca²⁺ free: CaCl₂を含まない(0 mM) medium

表1 イヌ顎下腺細胞からの各薬物によるムチン分泌のCa²⁺依存性

薬物	濃度 (M)	Mucin release (% of control)
8-br-cAMP	10 ⁻³	96.0±5.0
Isoproterenol	10 ⁻⁷	80.0±6.3
	10 ⁻⁶	72.7±6.6
	10 ⁻⁵	78.2±5.5
Noradrenaline	10 ⁻⁶	53.5±4.4*
	10 ⁻⁵	46.2±3.6**
	10 ⁻⁴	36.4±5.5**
Phenylephrine	10 ⁻⁵	35.8±4.3**
	10 ⁻⁴	43.6±3.3**

ムチン分泌量は、細胞外液Ca²⁺非存在下(0 mM)における各薬物による分泌量を、Ca²⁺存在下(1.3 mM)の分泌量に対する割合で示す。
*P<0.05, **P<0.01

pineの添加は、[Ca²⁺]_iを速やかに抑制した。細胞外液Ca²⁺非存在下では、ACh刺激直後のピークは同様に認められたが、プラトー相は認められなかった。NAdは、[Ca²⁺]_iを若干上昇させたが、Isop及び8-br-cAMPは影響を及ぼさなかった。Iono及びThapsは、緩慢で持続的に[Ca²⁺]_iを上昇させた(図7)。

PLC阻害薬neomycin及びU-73122とその構造類似体U-73343のAChによる[Ca²⁺]_i動態への影響について検討した(図8)。Neomycin前処置により、

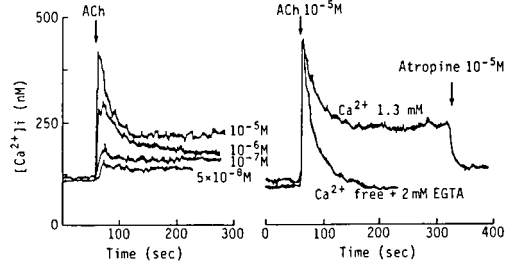


図6 イヌ顎下腺細胞におけるAChによる細胞内遊離Ca²⁺濃度([Ca²⁺]_i)上昇作用
左は、細胞外液にCaCl₂を含む(1.3 mM)場合のACh添加前後の[Ca²⁺]_iの経時変化を絶対濃度で表した。右は、細胞外液にCaCl₂を含む(1.3 mM)場合及び含まない(0 mM)の場合の[Ca²⁺]_iの経時変化を絶対濃度で表した。

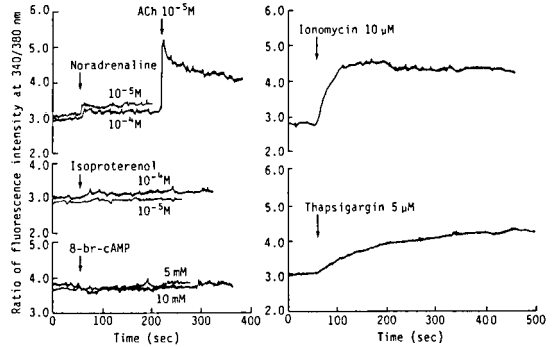


図7 イヌ顎下腺細胞における各薬物による[Ca²⁺]_i上昇作用
各薬物添加前後の[Ca²⁺]_iを、励起波長340及び380 nmにおける蛍光強度の相対比で表した。

AChによるピークは抑制された。U-73122は、ACh 10⁻⁵Mによる[Ca²⁺]_i上昇を若干抑制したに過ぎなかったが、より低濃度のACh 10⁻⁷Mによる上昇を抑制した(図8A)。U-73343は、ACh 10⁻⁵Mによる[Ca²⁺]_i上昇を抑制した。U-73122及びU-73343は、ACh 10⁻⁵Mによるムチン分泌を有意に抑制した(図8B)。

4. AChによる細胞内Ins(1,4,5)P₃及びIns(1,3,4,5)P₄量上昇の経時変化

ACh刺激後の細胞内Ins(1,4,5)P₃量は、5秒をピークとした急激で一過性の上昇後、速やかに静止レベルまで減少した(図9)。Ins(1,3,4,5)P₄量は、Ins(1,4,5)P₃に比べ遅れて上昇し始め、15秒後をピーク

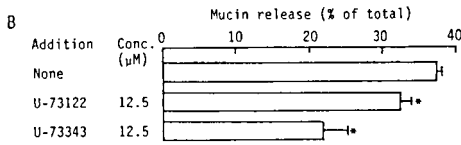
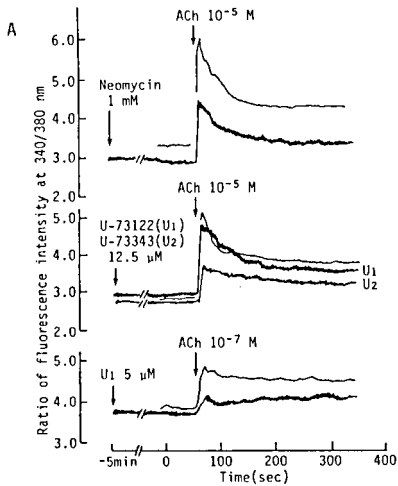


図8 AChによる $[Ca^{2+}]_i$ 上昇(A)及びムチン分泌(B)に対するPLC阻害薬の効果 (A)では、各阻害薬は、ACh添加6分前に処置を行った。(B)では、U-73122及びU-73343は、ACh($10^{-5}M$)添加10分前に処置した。ムチン分泌量は、ACh添加後20分間インキュベーションした時の分泌量で表した。各値は3~4例の平均値 \pm S.E.M.を示す。* $P < 0.05$

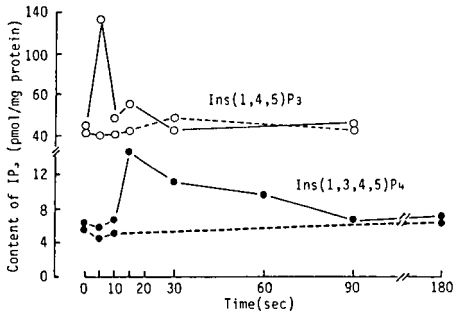


図9 AChによる細胞内 $Ins(1,4,5)P_3$ 及び $Ins(1,3,4,5)P_4$ 量の経時的変化 ACh($10^{-5}M$)添加後の各時間における細胞内 $Ins(1,4,5)P_3$ (○)及び $Ins(1,3,4,5)P_4$ (●)蓄積量を $pmol/mg$ proteinで表した。実線(—)はACh添加後の、破線(.....)はACh未添加時の各細胞内イノシトール量を示す。

とする持続的な上昇を示し、90秒後に静止レベルとなった(図9)。

5. Digitonin 膜透過性細胞からの Ca^{2+} 遊離

Digitonin $50 \mu M$ により処置した細胞において、 $Ins(1,4,5)P_3$ は、 $0.1 \mu M$ から濃度依存的に一過性の Ca^{2+} 遊離を引き起こした(図10)。 Ca^{2+} 濃度が静止レベルに戻った後、再び $Ins(1,4,5)P_3$ を作用させた場合も、 Ca^{2+} 遊離は遊離量が若干減少するが認められた。 $Ins(1,3,4,5)P_4$ では、 Ca^{2+} 遊離を認めなかった。又、 $Ins(1,4,5)P_3$ による Ca^{2+} 遊離にも影響を与えなかった(図10)。

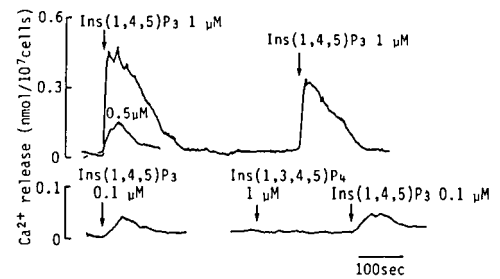


図10 Digitonin 膜透過性細胞からの $Ins(1,4,5)P_3$ 及び $Ins(1,3,4,5)P_4$ による Ca^{2+} 遊離作用 Digitonin $50 \mu M$ を5分間作用させ、膜透過性処置を行った。矢印において、各薬物(最終濃度で示す)を添加した時の、 Ca^{2+} 遊離量を絶対濃度で表した。

Ryanodineは、持続的な $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を引き起こした(図11)。Caffeineは、 Ca^{2+} 遊離作用を示さず、 $Ins(1,4,5)P_3$ 及びryanodineによる Ca^{2+} 遊離にも影響を与えなかった(図11)。

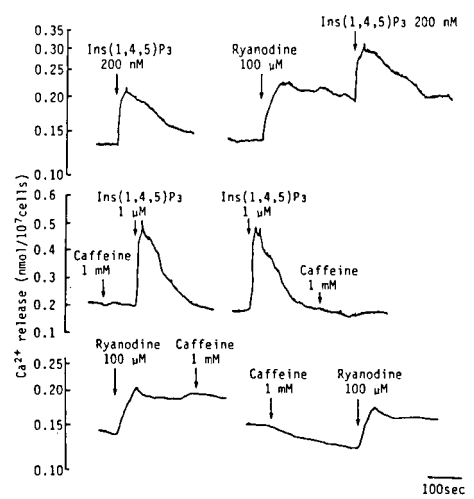


図11 Digitonin 膜透過性細胞からの ryanodine, caffeine 及び $Ins(1,4,5)P_3$ による Ca^{2+} 遊離作用

Digitonin 処置細胞において, cyclic ADP-ribose (cADPR) は, 急速で一過性の Ca^{2+} 遊離を引き起こした (図 12A)。cADPR による Ca^{2+} 遊離は, Ins (1, 4, 5) P_3 と同様の濃度範囲で認めたが, Ins (1, 4, 5) P_3 に比べ若干その作用は弱かった (図 12B)。 IP_3 受容体拮抗薬 heparin は, Ins (1, 4, 5) P_3 による Ca^{2+} 遊離をほぼ完全に抑制する濃度でも, cADPR による Ca^{2+} 遊離には影響を与えなかった (図 13A)。ほぼ最

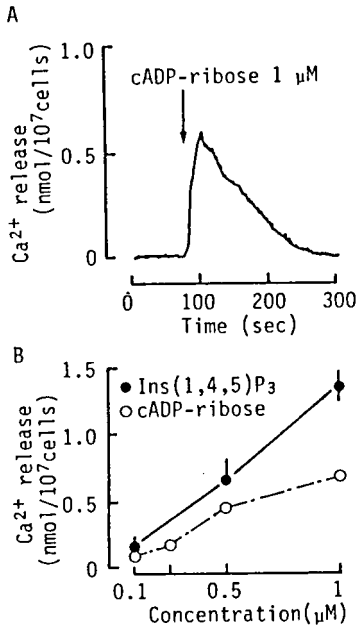


図12 Digitonin 膜透過性細胞からの cADP-ribose による Ca^{2+} 遊離作用 (A) 及び濃度反応曲線 (B)

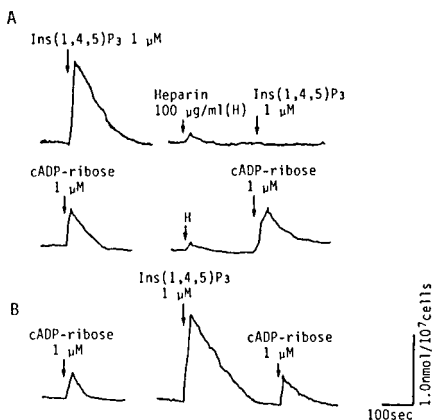


図13 cADP-ribose 及び Ins (1, 4, 5) P_3 による digitonin 膜透過性細胞からの Ca^{2+} 遊離に対する heparin の影響 (A) 及び相互作用 (B)

大反応を示す濃度の Ins (1, 4, 5) P_3 添加後も, cADPR による Ca^{2+} 遊離は影響を受けず (図 13B), cADPR 前処置も Ins (1, 4, 5) P_3 の作用に影響を与えなかった (図示せず)。Ryanodine は, 持続的な Ca^{2+} 遊離を引き起こしたが, この時 cADPR を作用させても, 対照と同様に Ca^{2+} 遊離を引き起こした (図 14)。

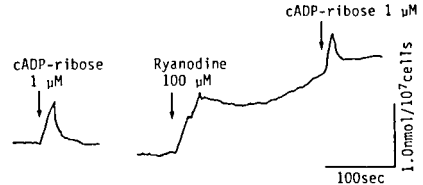


図14 cADP-ribose 及び ryanodine による digitonin 膜透過性細胞からの Ca^{2+} 遊離に対する相互作用

6. ムチン分泌への PKC の関与

PKC 活性化物質である phorbol 12-myristate 13-acetate (TPA) は, 濃度依存的にムチン分泌を引き起こした (図 15A)。TPA 及び PKC 阻害薬である staurosporine は, 単独で Ca^{2+} 動態に影響を与えず, 又, ACh による $[Ca^{2+}]_i$ 動態にも影響を与えなかった (図 15B)。

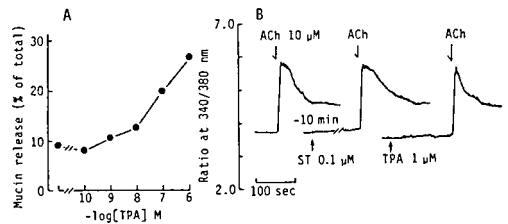


図15 TPA によるイヌ顎下腺細胞からのムチン分泌の濃度反応曲線 (A) 及び TPA, staurosporine (ST) の Ca^{2+} 動態への効果 (B) ムチン分泌量は, TPA 添加後, 30分間インキュベーションした時の分泌量で表した。

7. 細胞内 Ca^{2+} プールからの Ca^{2+} 遊離阻害薬の Ca^{2+} 動態への影響

TMB-8 100 μM 前処置は, ACh 10⁻⁵M による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇のピークを抑制した。プラトー相で作用させると, プラトー相は速やかに静止レベルまで減少した (図 16)。Cinnarizine 10 μM 前処置は, ACh 10⁻⁷M による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇のピーク及びプラトー相をともに抑制した (図 16)。

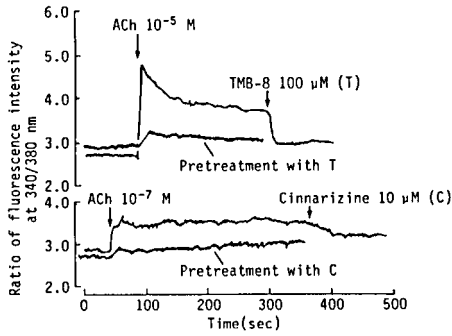


図16 ACh による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇に対する TMB-8 及び cinnarizine の効果
TMB-8 及び cinnarizine は、ACh 添加10分前に処置した。

8. 細胞内への Ca^{2+} 流入

Ca^{2+} free の外液中に細胞を置いた後、 $CaCl_2$ (最終濃度 1.3 mM) を添加すると $[Ca^{2+}]_i$ は上昇した (図 17)。この Ca^{2+} 添加による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は、細胞外液 Ca^{2+} の細胞内への流入を反映するものと考えられる。このような条件下で ACh を添加すると、 $[Ca^{2+}]_i$ は一過性上昇の後、静止レベルに回復するが、この後に $CaCl_2$ を添加すると、更に大きな $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を

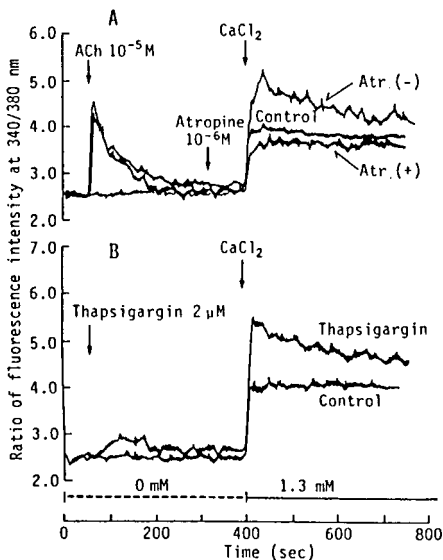


図17 ACh (A) 及び thapsigargin (B) によるイヌ顎下腺細胞内への Ca^{2+} 流入
細胞外 Ca^{2+} 非存在下 (Ca^{2+} 0 mM) に細胞を静置した後、 $CaCl_2$ (最終濃度 1.3 mM) を添加した時の細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度上昇を、図7と同様、励起波長 340 及び 380 nm における蛍光強度の相対比で表した。

認めた (図 17A)。ACh 添加後、 $CaCl_2$ 添加前に atropine を処置すると、 Ca^{2+} 添加による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は、ACh 非刺激時の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇と同程度にまで抑制された (図 17A)。Thaps 添加により、 $[Ca^{2+}]_i$ は軽度で緩慢な上昇の後、静止レベルに回復した。引き続き $CaCl_2$ を添加すると、ACh と同様著明な $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を認めた (図 17B)。

受容体を介する Ca^{2+} 流入を特異的に阻害する薬物は、特定されていないので、その可能性のある薬物について検討を行った。SK&F 96365 40 μ M 前処置後、ACh 10^{-5} M を添加すると、ACh による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は影響を受けなかったが、 Ca^{2+} 添加による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は、ACh 非刺激時と同等にまで抑制された (図 18A)。SK&F 96365 処置時期を ACh 添加の前後の2通りについて検討した。ACh 添加前後いずれの処置

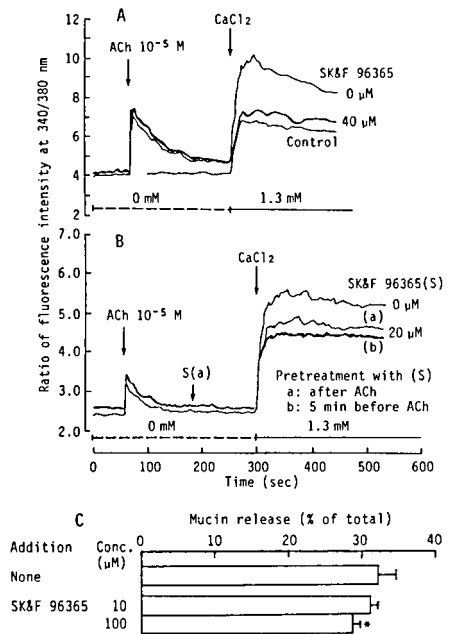


図18 A: ACh による Ca^{2+} 流入に対する SK&F 96365 40 μ M 前処置の効果
B: ACh による Ca^{2+} 流入に対する SK&F 96365 20 μ M の処置時期の影響
C: ACh によるムチン分泌に対する SK&F 96365 の効果

(A) では、SK&F 96365 は、ACh 添加5分前に処置した。(B) では、SF&F 96365 処置は、ACh 添加の5分前及び3分後の2通り行った。(C) では、SK&F 96365 は、ACh (10^{-5} M) 添加5分前に処置した。ムチン分泌量は、ACh 添加後、20分間インキュベーションした時の分泌量で表した。各値は3~4例の平均値 \pm S.E.M. を示す。* $P < 0.05$

においても、Ca²⁺ 添加による [Ca²⁺]_i 上昇を抑制したが、ACh 添加前に処置した場合、若干強い抑制を認めた (図18B)。SK&F 96365 100 μM は、ACh 10⁻⁵M によるムチン分泌を有意に抑制した (図18C)。Thaps 添加後の Ca²⁺ 添加による [Ca²⁺]_i 上昇も、SK&F 96365 処置により抑制された。SK&F 96365 処置時期の違いによる抑制効果は、Thaps 添加の前後いずれの処置とも同程度であった (図19)。

Econazole は、ACh 或いは Thaps 添加後の Ca²⁺ 添加による [Ca²⁺]_i 上昇を若干抑制した (図20)。Econazole の構造類似体である miconazole も Thaps による Ca²⁺ 流入を若干抑制した (図示せず)。

LY-83583 前処置は、ACh による [Ca²⁺]_i の一過性上昇には影響を与えず、その後の Ca²⁺ 添加による [Ca²⁺]_i 上昇のみを抑制した (図21)。

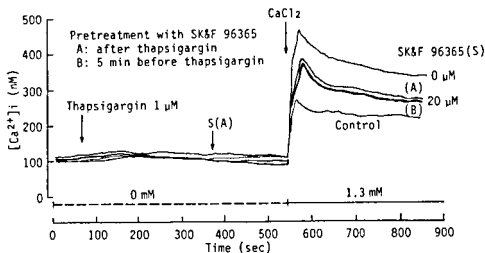


図19 Thapsigargin による Ca²⁺ 流入に対する SK&F 96365 の効果
SK&F 96365 は、thapsigargin 添加 (A) 5 分後、(B) 5 分前に処置した。細胞内遊離 Ca²⁺ 濃度は、図 6 と同様、絶対濃度で表した。

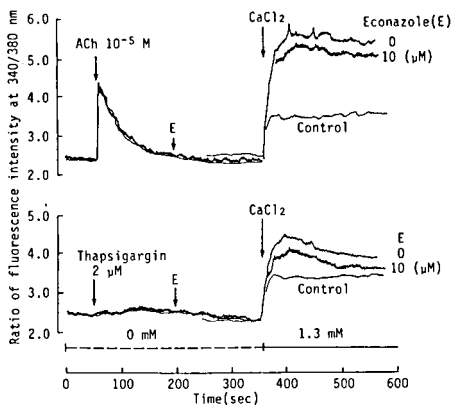


図20 ACh 及び thapsigargin による Ca²⁺ 流入に対する econazole の効果
Econazole は、ACh 添加 2 分後及び thapsigargin 添加後 2.5 分後に処置した。

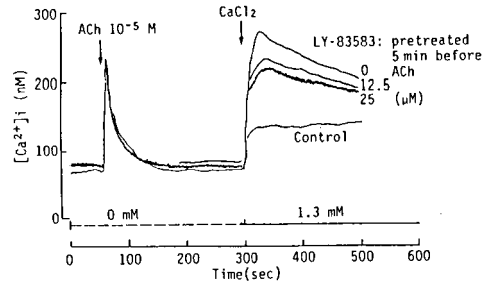


図21 ACh 及び thapsigargin による Ca²⁺ 流入に対する LY-83583 の効果
LY-83583 は、ACh 添加の 5 分前に処置した。

9. Digitonin 膜透過性細胞からのムチン分泌

Ca²⁺ 1 μM 存在下におけるムチン分泌は、20分までは自然分泌量と同程度であったが、40分後では僅かながら分泌を認めた (図22)。GTP-γ-S は、時間及び濃度依存的にムチン分泌を促進した (図22, 23)。Ca²⁺ と GTP-γ-S の併用は、分泌を若干促進した (図23)。

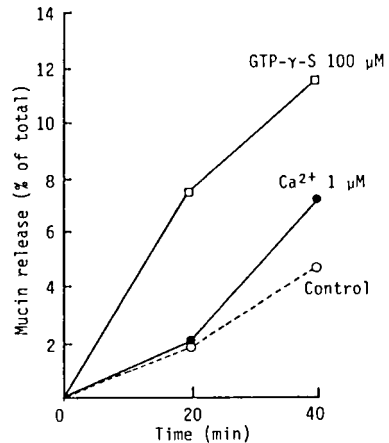


図22 Ca²⁺ 及び GTP-γ-S の digitonin 膜透過性細胞からのムチン分泌の経時的変化
ムチン分泌量は、digitonin 膜透過性細胞を、GTP-γ-S 100 μM (□)、Ca²⁺ 1 μM (●) 存在下及び非存在下 (○) で、各時間インキュベーションした時の分泌量で表した。

考 察

顎下腺からの高分子ムチン分泌については、主に β アドレナリン受容体-cAMP 系により引き起こされ、α アドレナリン受容体及びムスカリン受容体の関与は僅かであるとされてきた³⁻⁶⁾。しかし、これまでの研究の多くは、ラットを用いたものである。本研究

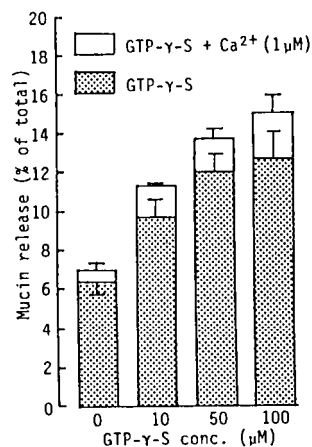


図23 GTP- γ -S による digitonin 膜透過性細胞からのムチン分泌の濃度反応曲線及び Ca^{2+} との併用効果

ムチン分泌量は、GTP- γ -S 及び Ca^{2+} 添加後、40分間インキュベーションした時の分泌量で表した。各値は3～4例の平均値 \pm S.E.M. を示す。

では、顎下腺細胞からのムチン分泌機序に関して、ラットに比較し粘液細胞の豊富なイヌ顎下腺細胞を用いて検索した。イヌ顎下腺細胞からのムチン分泌においては、アドレナリン受容体刺激に加え、ムスカリン受容体刺激によってもムチン分泌が促進されること、この分泌反応は、ラット顎下腺細胞とは異なり、ムスカリン受容体を介する系が主体であることが明らかとなった。ムスカリン受容体は、現在、遺伝子学的に5種類 ($m_1 \sim m_5$)、薬理的に4種類 ($M_1 \sim M_4$) のサブタイプに分類されているが¹⁵⁾、耳下腺及び顎下腺細胞では M_3 受容体の存在が報告されている^{16,17)}。本研究では、 M_1 受容体遮断薬 pirenzepine による分泌抑制には、非特異的遮断薬 atropine に比し、高濃度必要であったことから、ACh によるムチン分泌は、 M_2 或いは M_3 受容体を介するものと思われるが、このことは、より特異的アゴニストを用いた実験や受容体結合実験による解析等が必要である。

耳下腺及び唾液腺外分泌細胞におけるイオン—溶液分泌には、 Ca^{2+} が中心的役割を演じているが⁹⁾、開口分泌反応は、主に cAMP をセカンドメッセンジャーとしている。顎下腺細胞からのムチン分泌においても、 Ca^{2+} の関与は少ないとの報告が多く³⁻⁶⁾、 Ca^{2+} の関与について肯定的な報告は僅かである^{8,10,11)}。ムスカリン受容体刺激は、多くの場合、 Ca^{2+} を介して様々な細胞機能を発現することが知られている。ラット顎下腺細胞からのムチン分泌は、これまでの報告の通り、 Ca^{2+} イオノフォアである Iono によりほとん

ど促進されなかった。しかし、イヌ顎下腺細胞では、Iono により濃度依存的にムチン分泌が促進された。Thaps は、細胞内 Ca^{2+} プールの Ca^{2+} ポンプを特異的に阻害し、プール内への Ca^{2+} 再取り込みを抑制する作用を有することが報告されている¹⁸⁾。したがって、Thaps を作用させることにより $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇やプール内 Ca^{2+} の涸渇もたらされる。実際、イヌ顎下腺細胞においても、Thaps はゆっくりとした、持続的な $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇を引き起こした。この Thaps によっても、著明なムチン分泌を認めた。又、ACh によるイヌ顎下腺細胞からのムチン分泌は、細胞外液の Ca^{2+} を除去することにより著しく減少した。Komabayashi らは、イヌ顎下腺スライスからの pilocarpine によるシアル酸遊離が、細胞外液の Ca^{2+} 除去により減少したと報告している。これらの知見より、イヌ顎下腺細胞におけるムチン分泌反応には、 Ca^{2+} 依存性機序が関与することが示唆される。一方、Isop 及び 8-br-cAMP によるムチン分泌が、細胞外液の Ca^{2+} 除去によつては、僅かしか影響されなかったことから、 β アドレナリン受容体を介する分泌反応には、 Ca^{2+} の関与が少ないことが伺える。しかし、NAd による分泌は、 Ca^{2+} 除去により有意に減少した。 α アドレナリン受容体刺激は、 Ca^{2+} 動員を介して様々な細胞反応を引き起こすことが知られている。したがって、NAd の Ca^{2+} 依存性の部分は、 α アドレナリン受容体を介する作用と考えられる。このことは、 α アドレナリン受容体作動薬 phenylephrine による分泌が、同様に Ca^{2+} 依存性であったことや、後述するように、NAd により $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が僅かながら上昇することからも支持される。

ACh は、二相性の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇、すなわち、刺激直後の一過性の大きな上昇（ピーク）とそれに続く持続した上昇（プラトー相）を引き起こした。細胞外液の Ca^{2+} 除去により、ピークは影響されないが、プラトー相は消失したことから、ピークは細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位からの Ca^{2+} 遊離、プラトー相は細胞外から細胞内への Ca^{2+} 流入とみられる¹⁹⁾。アドレナリン作動性薬については、Mills らは、Isop がラット顎下腺細胞の細胞内 Ca^{2+} プールから Ca^{2+} 遊離を引き起こすことを報告した¹²⁾。しかし、本研究では、 β アドレナリン受容体作動性薬による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇を認めなかった。

ムスカリン受容体をはじめ多くの受容体は、GTP 結合蛋白質を介して PLC と共役し、PI 加水分解を促進して、Ins (1,4,5) P_3 及び DG の2つのメッセンジャーを産生する。前者は、細胞内 Ca^{2+} プールから Ca^{2+} 遊離を引き起こし Ca^{2+} を介して、後者は PKC

を活性化し蛋白質のリン酸化を介して、多くの細胞機能発現に関与することが知られている^{20,21)}。Flemingらは、ムチン分泌反応においても、受容体と共役したPI代謝回転を介する機序の存在を示唆している¹⁰⁾。本研究において、PLC阻害薬 neomycin 及び U-73122 とその構造類似体 U-73343 は、いずれも、ムスカリン受容体を介するムチン分泌及び $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を共に抑制した。したがって、ムスカリン受容体を介するムチン分泌反応経路に、PLC 活性化の関与が示唆された。顎下腺細胞における細胞内 $InsP_3$ 量の経時的変化については、Fleming らによるラットを用いた報告がある。彼らは、 $InsP_3$ 量がムスカリン受容体刺激後、5分間持続した上昇を示したと報告した¹⁰⁾。本研究における細胞内 $InsP_3$ 量の測定では、ACh 刺激5秒後にピークを示す一過性上昇を認めた。これらの差異は、本研究で用いた方法が、より正確に $Ins(1,4,5)P_3$ 量を反映しているのに対し、Fleming らの用いた方法では、 $Ins(1,3,4)P_3$ 及び $Ins(1,3,4,5)P_4$ の混在が避けられなかったためであると思われる。一方、 $Ins(1,3,4,5)P_4$ は、 $Ins(1,4,5)P_3$ より遅れて上昇することを認めた。これらのことから、ムスカリン受容体刺激による PLC 活性化が示された。PLC には、少なくとも5種類のサブタイプが存在することが知られている²²⁾。白血球において、U-73122 は特異的に PLC を阻害し、U-73343 よりその作用は強いとされているが²³⁾、イヌ顎下腺細胞においては、U-73122 に比較し U-73343 より強い抑制を認めた。U-73122 及び U-73343 の抑制効果が、ヒト白血球の場合と異なるのは、PLC のサブタイプが異なるためかもしれない。また、 G_i を抑制する百日咳毒素によっては、ACh によるムチン分泌は影響されなかった (未発表)。したがって、 G_i 以外の分子種の GTP 結合蛋白質を介するものと思われる。

$Ins(1,4,5)P_3$ は、多くの細胞において、細胞内 Ca^{2+} プールから Ca^{2+} 遊離を引き起こす。又、 $Ins(1,3,4,5)P_4$ は、 $Ins(1,4,5)P_3$ の代謝産物で、細胞内 Ca^{2+} 遊離或いは細胞外 Ca^{2+} の細胞内への流入に関与する可能性が示唆されている²⁰⁾。本研究においても、digitonin により膜透過性処置を施した細胞において、 $Ins(1,4,5)P_3$ は濃度依存的に一過性の Ca^{2+} 遊離を引き起こした。しかし、 $Ins(1,3,4,5)P_4$ は、 Ca^{2+} 遊離に対し作用を示さなかった。このことから、イヌ顎下腺細胞における $Ins(1,4,5)P_3$ 感受性 Ca^{2+} プールの存在が明らかとなり、ムスカリン受容体刺激直後の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇のピークは、刺激直後に産生された $Ins(1,4,5)P_3$ による $Ins(1,4,5)P_3$ 感受性 Ca^{2+} プールからの Ca^{2+} 遊離 (ICR) によるものと考えられ

る。細胞内の一部において生じた Ca^{2+} 濃度の上昇が、 Ca^{2+} 波として細胞内部全体に拡がり、例えば、受精卵の卵割や外分泌細胞における溶液分泌等に関係していることが報告されている^{20,24)}。この Ca^{2+} 波は、 Ca^{2+} の拡散により生じているのではなく、隣接する Ca^{2+} プールからの Ca^{2+} 遊離が、時間及び空間的に連続して生じるためと考えられ、いくつかの細胞において ICR がその主体であると報告されている^{20,25)}。

ICR とは別に、骨格筋及び心筋細胞においては、 Ca^{2+} 誘発性 Ca^{2+} 遊離 (CICR) 機構の存在が示されており、この CICR も、 Ca^{2+} 波や Ca^{2+} 振動の発生機序と思われる^{20,26)}。最近、副腎髄質クロマフィン細胞や平滑筋細胞等においても CICR が存在する可能性が示唆されている。CICR に影響を与える薬物として、caffeine 及び ryanodine が知られている。Ryanodine は、ryanodine 感受性 Ca^{2+} プールの Ca^{2+} チャンネルを構成する ryanodine 受容体を開口状態に固定し、 Ca^{2+} 遊離を引き起こす。Caffeine は、ryanodine 受容体の Ca^{2+} に対する感受性を高めることにより、静止レベル付近の Ca^{2+} 濃度でも Ca^{2+} 遊離を引き起こさせる作用を有している。本研究では、ryanodine により持続的な Ca^{2+} 遊離を認めた。しかし、caffeine は Ca^{2+} 遊離を引き起こさなかった。このように、ryanodine 感受性 Ca^{2+} プールの存在が示唆されたが、この Ca^{2+} プールは、caffeine には非感受性であった。

cADPR は、nicotinamide adenine dinucleotide (NAD^+) の代謝産物で、ウニ卵において内因性の CICR 活性化物質として新しく発見された Ca^{2+} 遊離物質であり、ウニの卵割に重要な役割を果たすと考えられている²⁷⁾。cADPR を合成する ADP-ribosyl cyclase は、ウニ卵以外に、ウサギ肝臓、脳、心臓、脾臓、腎臓等においても見出されている²⁷⁾。しかし、これらの組織において、cADPR がどのような刺激に対応して合成され、いかなる生理的役割を果たしているかは不明である。本研究では、cADPR が果して唾液腺においても Ca^{2+} 遊離作用を有するか否かについて検討した結果、digitonin により膜透過性処置を施した細胞において、濃度依存的に一過性の Ca^{2+} 遊離を引き起こすことを認めた。cADPR はウニ卵において、現在知られている最も強力な Ca^{2+} 遊離物質とされている²⁷⁾。イヌ顎下腺細胞においては、 $Ins(1,4,5)P_3$ に比べ作用は弱かったが、これは顎下腺においては、内因性活性が低いか、或いは代謝が速いため等と考えられるが、いずれかは明らかではない。cADPR による Ca^{2+} 遊離は、 $Ins(1,4,5)P_3$ 受容体拮抗薬 heparin 前処置に

よっては影響を受けなかった。したがって、cADPR は Ins(1, 4, 5)P₃ 受容体に作用するものではない。又、ryanodine の前処置も cADPR の作用に影響しなかった。このことから、cADPR が、膵臓 β 細胞で示されたように、ryanodine 感受性 Ca²⁺ プールから Ca²⁺ 遊離を引き起こすという報告²⁸⁾とは異なり、顎下腺細胞においては、Ins(1, 4, 5)P₃ 感受性及び ryanodine 感受性 Ca²⁺ プールとは別の Ca²⁺ プールに作用しているか、或いは Ins(1, 4, 5)P₃ 受容体及び ryanodine 受容体以外の部位に作用し、Ca²⁺ 遊離を引き起こしている可能性も示唆された。唾液腺においても、cADPR により Ca²⁺ 遊離が認められたことは、外分泌腺においても CICR が存在することの裏付けとなるかもしれない。又、cADPR が、唾液腺においてどのような受容体と関連した情報伝達経路を成しているかは、その生理的役割を明らかにする上でも解明が待たれる。

DG は PKC を活性化し、ラット顎下腺細胞においても、ムチン分泌への PKC の関与が示唆されている^{29,30)}。本研究においても、PKC 活性化物質 TPA は、濃度依存的にムチン分泌を引き起こした。しかし、TPA 及び PKC 阻害薬 sturosporine は、Ca²⁺ 動態に影響を与えなかったことから、PKC 活性化によるムチン分泌反応は、Ca²⁺ を介さない機序によることが示唆された。

非興奮性細胞においては電位依存性 Ca²⁺ チャンネルは欠如しており、そのため、受容体刺激後の細胞外液からの細胞内への Ca²⁺ 流入は、主に受容体作動性 Ca²⁺ チャンネルを介して生じると考えられている。受容体作動性 Ca²⁺ チャンネルを介する Ca²⁺ 流入機構に関しては、耳下腺細胞、膵臓外分泌細胞、好中球、T cell、肝細胞等²⁰⁾において研究されているが詳細は不明である。Putney らは、Ins(1, 4, 5)P₃ 感受性 Ca²⁺ プールの涸渇が Ca²⁺ 流入を活性化するという容量性 Ca²⁺ 流入機構を提唱している³¹⁾。本研究において、ACh は細胞内への Ca²⁺ 流入を著明に促進し、この流入は、Ins(1, 4, 5)P₃ 感受性 Ca²⁺ プールからの Ca²⁺ 遊離を阻害するとされている TMB-8 及び cinnarizine により抑制された。このことから、Putney らにより報告されているように、細胞内への Ca²⁺ 流入と細胞内 Ins(1, 4, 5)P₃ 感受性 Ca²⁺ プールからの Ca²⁺ 遊離との間に密接な関係が存在することが示唆される^{31,32)}。Thaps は、受容体を介することなく直接細胞内 Ca²⁺ プールに作用してプール内 Ca²⁺ を涸渇させる。イヌ顎下腺細胞においても、Thaps を作用させると Ca²⁺ 流入が引き起こされることより、プール内の Ca²⁺ 遊離或いは涸渇が誘因となる Ca²⁺ 流入

の機構が存在するものと思われる³³⁾。しかし、どのようにして細胞内 Ca²⁺ プールの涸渇情報が、細胞膜 Ca²⁺ 透過性チャンネルに伝達されるかについては、いくつかのモデルが示されてきているが明らかではない。Irvine らは、細胞膜上に Ca²⁺ 透過性チャンネルである Ins(1, 3, 4, 5)P₄ 受容体が存在し、細胞内 Ca²⁺ プール上の Ins(1, 4, 5)P₃ 受容体とカップルしているモデルを提唱した³⁴⁾。Ins(1, 3, 4, 5)P₄ の関与に関しては、ウニ卵³⁵⁾、T リンパ球³⁶⁾ 及び内皮細胞³⁷⁾ 等で報告されている。本研究において、細胞内 Ins(1, 3, 4, 5)P₄ 量は、ACh 刺激後持続して上昇することを示したが、Ca²⁺ 流入への関与については今後の検討課題である。

最近、涸渇した細胞内 Ca²⁺ プールから拡散性で低分子量の陰イオン性リン酸化合物が遊離され、Ca²⁺ 流入を刺激することが示された³⁸⁾。又、Ca²⁺ 流入因子がホスファターゼにより不活化することが示された³⁹⁾。しかし、その物質は未だ同定されていない。他に、チトクローム P-450^{40,41)}、guanylate cyclase⁴²⁾ 或いは tyrosine kinase⁴³⁾ の関与が示唆されている。本研究においては、チトクローム P-450 阻害薬 econazole 及び miconazole により、ACh 及び Thaps による Ca²⁺ 流入は若干抑制された。Guanylate cyclase 阻害薬 LY-83583 は、ACh による Ca²⁺ 流入を抑制した。これらのことから、チトクローム P-450 及び guanylate cyclase の関与の可能性が示唆されたが、いずれも阻害効果が小さいことから、顎下腺細胞における受容体作動性 Ca²⁺ 流入機構の主経路ではないと思われる。Merritt らは、細胞内 Ca²⁺ プールの Ca²⁺ 遊離に比較し、細胞膜での Ca²⁺ 流入を特異的に抑制する薬物として SK&F 96365 を報告した⁴⁴⁾。顎下腺においても、この SK&F 96365 は、ACh 及び Thaps によるプールからの Ca²⁺ 遊離には影響を与えない濃度で Ca²⁺ 流入を抑制した。又、SK&F 96365 は、ACh によるムチン分泌も有意に抑制した。しかし、その抑制効果が、Ca²⁺ 流入に対する抑制効果より小さかったのは、Ca²⁺ 流入が完全には抑制されないためか、或いは Ca²⁺ 依存性機序と並行して PKC 活性化を介する機序によりムチン分泌が生じるためと考えられる。

骨髄細胞、肥満細胞等における開口分泌においては、細胞質に存在する低分子量 GTP 結合蛋白質 (G_E) が関与していることが示唆されている⁴⁵⁾。肥満細胞における開口分泌においては、GTP が必須であり、Ca²⁺ は補助的な役割であると報告されている^{45,46)}。本研究においても、digitonin 膜透過性細胞において、GTP-γ-S により著明なムチン分泌を認めた。Ca²⁺ は単独で僅かな分泌しか引き起こさなかった

が、GTP- γ -S によるムチン分泌を若干増強した。この GTP- γ -S の作用は、本実験の成績のみでは、細胞膜三量体 GTP 結合蛋白質に対する作用か、細胞質の G_E に作用した結果であるか否かは不明である。いずれにしても、GTP 結合蛋白質がムチン分泌に重要な関わりを有していることが窺える。 Ca^{2+} イオンファームが、無傷細胞で有意なムチン分泌を引き起こしたにも関わらず、膜透過性とした細胞で、 Ca^{2+} によって直接引き起こされるムチン分泌が弱かったのは、digitonin による膜透過性処置により、分泌に必要な Ca^{2+} 感受性因子等の成分が失われたためか、或いは Ca^{2+} が分泌開始に作用するのではなく、GTP による分泌の補助的な働きを行い、分泌の持続に重要な役割を有しているため等が思料される。

以上より、イヌ顎下腺細胞からのムチン分泌は、 β アドレナリン受容体-cAMP 系に加え、ムスカリン受容体と共役する細胞内外からの Ca^{2+} 動員系が重要な役割を担っていることが明らかとなった。更に、PKC 活性化を介するムチン分泌経路及び GTP 結合蛋白質が関与する可能性も示唆された (図24)。

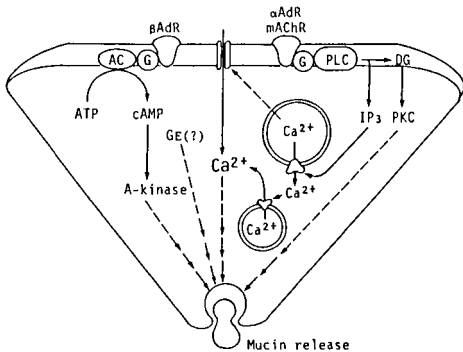


図24 イヌ顎下腺細胞におけるムチン分泌機序
 β AdR: β アドレナリン受容体, α AdR: α アドレナリン受容体, mAChR: ムスカリン受容体, G: 三量体 GTP 結合蛋白質, PLC: phospholipase C, DG: diacylglycerol, IP₃: inositol 1,4,5-trisphosphate, PKC: protein kinase C, AC: adenylate cyclase, A-kinase: cAMP-dependent protein kinase, G_E: 低分子量 GTP 結合蛋白質

総 括

イヌ顎下腺細胞を用い、ムチン分泌機序に関わる細胞内情報伝達経路について検討し、以下の結果を得た。

1. 高分子ムチン分泌は、Isop, NAd, phenylephrine 及び ACh 刺激によって促進され、ACh による分泌が最も著明であった。Iono 及び Thaps によ

てもムチン分泌が生じた。

2. α アドレナリン受容体及びムスカリン受容体を介するムチン分泌は、細胞外 Ca^{2+} の除去により著明に減少した。

3. ACh により、 $[Ca^{2+}]_i$ は二相性の上昇を、細胞内 Ins (1,4,5) P₃ 量は一過性上昇を、Ins (1,3,4,5) P₄ 量は持続性上昇を示した。

4. Ins (1,4,5) P₃ は、digitonin 膜透過性細胞において、一過性の Ca^{2+} 遊離を引き起こした。

5. TPA によりムチン分泌を認めた。TPA 及び staurosporine は、 Ca^{2+} 動態には影響を与えなかった。

6. Ryanodine は、持続性 Ca^{2+} 遊離を引き起こしたが、caffeine は Ca^{2+} 遊離を引き起こさなかった。

7. cADPR は、digitonin 膜透過性細胞から Ca^{2+} 遊離を引き起こした。cADPR による Ca^{2+} 遊離は、heparin 及び ryanodine により抑制されなかった。

8. ACh は、細胞外液から細胞内への Ca^{2+} 流入を促進した。この Ca^{2+} 流入は、SK&F 96365, econazole, miconazole 及び LY-83583 により抑制された。

9. Digitonin 膜透過性細胞において、GTP- γ -S はムチン分泌を引き起こした。 Ca^{2+} は、単独で弱い分泌しか示さなかったが、GTP- γ -S による分泌を若干増強した。

以上、イヌ顎下腺細胞からのムチン分泌反応に関与する受容体と細胞内情報伝達経路について、ムスカリン受容体とそれに共役する Ca^{2+} 動員系の重要性を明らかにした。この Ca^{2+} 動員は、PI 代謝回転促進による細胞内 Ca^{2+} プールからの Ca^{2+} 遊離と、それが誘発する Ca^{2+} 流入によることを示唆した。更に、PKC 活性化を介する機序及び GTP 結合蛋白質の関与の可能性も示唆し、イヌ顎下腺細胞におけるムチン分泌に関わる細胞内情報伝達経路の一端を明らかにした。

謝 辞

稿を終えるに臨み、終始御懇篤なる御指導ならびに御校閲を賜りました本学歯科補綴学第一講座赤川安正教授ならびに終始御懇篤なる御指導を賜りました前本学歯科補綴学第一講座教授津留宏道名誉教授に衷心より感謝の意を表します。また、本研究の遂行及びまともに際し、御懇篤なる御指導ならびに御校閲を賜りました本学歯科薬理学講座土肥敏博教授、御懇篤なる御指導を賜りました前本学歯科薬理学講座教授辻本明名誉教授ならびに御校閲を賜りました本学口腔生理学講座菅野義信教授に深甚なる謝意を表します。さらに、

本研究に対し、御助言、御協力をいただきました本学歯科薬理学講座森田克也講師に感謝の意を表します。多大な御支援をいただきました橋本正毅講師ならびに佐藤裕二講師をはじめとする歯科補綴学第一講座教室員各位ならびに北山滋雄講師をはじめとする歯科薬理学講座関係者各位に感謝致します。Pirenzepine を御供与いただいた Boehringer Ingelheim, SK&F 96365 を御供与いただいた SmithKline Beechem, U-73122 及び U-73343 を御供与いただいた Upjohn Company に感謝致します。

文 献

- 1) Levine, M.J., Reddy, M.S., Tabak, L.A., Loomis, R.E., Bergey, E.J., Jones, P.C., Cohen, R.E., Stinson, M.W. and Al-Hashimi, I.: Structural aspects of salivary glycoproteins. *J. Dent. Res.* **66**, 436-441, 1987.
- 2) Edgar, W.M.: Saliva: its secretion, composition and functions. *Br. Dent. J.* **172**, 305-312, 1992.
- 3) Bogart, B.I. and Picarelli, J.: Agonist-induced secretions and potassium release from rat submandibular gland slices. *Am. J. Physiol.* **235**, C256-C268, 1978.
- 4) Quissell, D.O. and Barzen, K.A.: Secretory response of dispersed rat submandibular cells. II. Mucin secretion. *Am. J. Physiol.* **238**, C99-C106, 1980.
- 5) Quissell, D.O., Barzen, K.A. and Lafferty, J.L.: Role of calcium and cAMP in the regulation of rat submandibular mucin secretion. *Am. J. Physiol.* **241**, C76-C85, 1981.
- 6) Quissell, D.O., Deisher, L.M. and Barzen, K.A.: Subcellular distribution and activation of rat submandibular cAMP-dependent protein kinase following β -adrenergic receptor stimulation. *Biochim. Biophys. Acta* **969**, 28-32, 1988.
- 7) Kinjo, K., Nishikawa, T. and Tsujimoto, A.: Role of the autonomic nervous system in regulating salivary mucin secretion by the canine submandibular gland in vivo. *Arch. Oral Biol.* **28**, 97-98, 1983.
- 8) Komabayashi, T., Nakano, K., Nakamura, T. and Tsuboi, M.: Stimulation of amylase and sialic acid releases from dog submandibular gland slices by pilocarpine or high K^+ medium: a possible role of calmodulin for their releases. *Jpn. J. Physiol.* **33**, 921-930, 1983.
- 9) Petersen, O.H.: Stimulus-secretion coupling: cytoplasmic calcium signals and the control of ion channels in exocrine acinar cells. *J. Physiol.* **448**, 1-51, 1992.
- 10) Fleming, N., Bilan, P.T., Sliwinski-Lis, E. and Carvalho, V.: Muscarinic, α_1 -adrenergic and peptidergic agonists stimulate phosphoinositide hydrolysis and regulate mucin secretion in rat submandibular gland cells. *Pflügers Arch.* **409**, 416-421, 1987.
- 11) Dohi, T., Yamaki, H., Morita, K., Kitayama, S., Tsuru, H. and Tsujimoto, A.: Calcium dependency of adrenergic and muscarinic cholinergic stimulation of mucin release from dog submandibular gland cells. *Arch. Oral Biol.* **36**, 443-449, 1991.
- 12) Mills, C.L., Hallett, M.B., McPherson, M.A. and Dormer, R.L.: β -Adrenergic mobilization of Ca^{2+} from an intracellular store in rat submandibular acini. *Biochem. J.* **293**, 691-695, 1993.
- 13) McPherson, M.A. and Dormer, R.L.: Mucin release and calcium fluxes in isolated rat submandibular acini. *Biochem. J.* **224**, 473-481, 1984.
- 14) Challiss, R.A.J. and Nahorski, S.R.: Neurotransmitter and depolarization-stimulated accumulation of inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate mass in rat cerebral cortex slices. *J. Neurochem.* **54**, 2138-2141, 1990.
- 15) Hall, J.M., Caulfield, M.P., Watson, S.P. and Guard, S.: Receptor subtypes or species homologues: relevance to drug discovery. *Trends Pharmacol. Sci.* **14**, 376-383, 1993.
- 16) Dai, Y., Ambudkar, I.S., Horn, V.J., Yeh, C., Kousvelari, E.E., Wall, S.J., Li, M., Yasuda, R.P., Wolfe, B.B. and Baum, B.J.: Evidence that M_3 muscarinic receptors in rat parotid gland couple to two second messenger systems. *Am. J. Physiol.* **261**, C1063-C1073, 1991.
- 17) Laniyonu, A., Sliwinski-Lis, E. and Fleming, N.: Muscarinic M_3 receptors are coupled to two signal transduction pathways in rat submandibular cells. *Eur. J. Pharmacol.* **188**, 171-174, 1990.
- 18) Thastrup, O., Cullen, P.J., Dorbak, B.K., Hanley, M.R. and Dawson, A.P.: Thapsigargin, a tumor promoter, discharge intracellular Ca^{2+} stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 2466-2470, 1990.
- 19) Brinck, R.W. and Hurley, T.W.: Regulation of cytosolic Ca^{2+} in resting and stimulated rat submandibular salivary gland acini. *Arch. Oral Biol.* **34**, 917-922, 1989.
- 20) Berridge, M.J.: Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* **361**, 315-325, 1993.
- 21) Nishizuka, Y.: The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature* **334**, 661-665, 1988.
- 22) 土肥敏博, 森田克也: 刺激-分泌連関における情報伝達とリン脂質代謝. *ブレインサイエンス* **3**, 147-153, 1992.
- 23) Bleasdale, J.E., Thakur, N.R., Gremban, R.S., Bundy, G.L., Fitzpatrick, F.A., Smith, R.J. and

- Bunting, S.: Selective inhibition of receptor-coupled phospholipase C-dependent processes in human platelets and polymorphonuclear neutrophils. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 255, 756-768, 1990.
- 24) Nauntofte, B.: Regulation of electrolyte and fluid secretion in salivary acinar cells. *Am. J. Physiol.* 263, G823-G837, 1992.
 - 25) Delisle, S. and Welsh, M.J.: Inositol trisphosphate is required for the propagation of calcium waves in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* 267, 7963-7966, 1992.
 - 26) McPherson, P.S. and Campbell, K.P.: The ryanodine receptor / Ca^{2+} release channel. *J. Biol. Chem.* 268, 13765-13768, 1993.
 - 27) Galione, A.: Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release and its modulation by cyclic ADP-ribose. *Trends Pharmacol. Sci.* 13, 304-306, 1992.
 - 28) Takasawa, S., Nata, K., Yonekura, H. and Okamoto, H.: Cyclic ADP-ribose in insulin secretion from pancreatic β cells. *Science* 259, 370-373, 1993.
 - 29) Fleming, N., Bilan, P.T. and Sliwinski-Lis, E.: Effects of phorbol ester and diacylglycerols on secretion of mucin and arginine esterase by rat submandibular gland cells. *Pflügers Arch.* 406, 6-11, 1986.
 - 30) Quissell, D.O., Barzen, K.A. and Deisher, L.M.: Evidence against a direct role for protein kinase C in rat submandibular salivary mucin secretion. *Arch. Oral Biol.* 34, 695-699, 1989.
 - 31) Putney, J.W., Jr.: A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium* 7, 1-12, 1986.
 - 32) Takemura, H., Hughes, A.R., Thastrup, O. and Putney, J.W., Jr.: Activation of calcium entry by the tumor promoter thapsigargin in parotid acinar cells: evidence that an intracellular calcium pool, and not an inositol phosphate, regulate calcium fluxes at the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 264, 12266-12271, 1989.
 - 33) Hoth, M. and Penner, R.: Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature* 355, 353-356, 1992.
 - 34) Irvine, R.F.: 'Quantal' Ca^{2+} release and the control of Ca^{2+} entry by inositol phosphates - a possible mechanism. *FEBS Lett.* 263, 5-9, 1990.
 - 35) Irvine, R.F. and Moor, R.M.: Microinjection of inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate activates sea urchin eggs by a mechanism dependent on external Ca^{2+} . *Biochem. J.* 240, 917-920, 1986.
 - 36) Guse, A.H., Roth, E. and Emmrich, F.: *D-myoinositol* 1,3,4,5-tetrakisphosphate releases Ca^{2+} from crude microsomes and enriched vesicular plasma membranes, but not from intracellular stores of permeabilized T-lymphocytes and monocytes. *Biochem. J.* 288, 489-495, 1992.
 - 37) Lückhoff, A. and Clapham, D.E.: Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate activates an endothelial Ca^{2+} -permeable channel. *Nature* 355, 356-358, 1992.
 - 38) Randriamampita, C. and Tsien, R.Y.: Emptying of intracellular Ca^{2+} stores releases a novel small messenger that stimulates Ca^{2+} influx. *Nature* 364, 809-814, 1993.
 - 39) Parekh, A.B., Terlau, H. and Stühmer, W.: Depletion of $InsP_3$ stores activates a Ca^{2+} and K^+ current by means of a phosphatase and a diffusible messenger. *Nature* 364, 814-818, 1993.
 - 40) Alvarez, J., Montero, M. and Garcia-Sancho, J.: Cytochrome P-450 may link intracellular Ca^{2+} stores with plasma membrane Ca^{2+} influx. *Biochem. J.* 274, 193-197, 1991.
 - 41) Sargeant, P., Clarkson, W.D., Sage, S.O. and Heemskerk, J.W.M.: Calcium influx evoked by Ca^{2+} store depletion in human platelets is more susceptible to cytochrome P-450 inhibitors than receptor-mediated calcium entry. *Cell Calcium* 13, 553-564, 1992.
 - 42) Bahnson, T.D., Pandol, S.J. and Dionne, V.E.: Cyclic GMP modulates depletion-activated Ca^{2+} entry in pancreatic acinar cells. *J. Biol. Chem.* 268, 10808-10812, 1993.
 - 43) Lee, K., Toscas, K. and Villereal, M.L.: Inhibition of bradykinin- and thapsigargin-induced Ca^{2+} entry by tyrosine kinase inhibitors. *J. Biol. Chem.* 268, 9945-9948, 1993.
 - 44) Merritt, J.E., Armstrong, W.P., Benham, C.D., Hallam, T.J., Jacob, R., Jaxa-Chamiec, A., Leigh, B.K., McCarthy, S.A., Moores, K.E. and Rink, T.J.: SK&F 96365, a novel inhibitor of receptor-mediated calcium entry. *Biochem. J.* 271, 515-522, 1990.
 - 45) Gomperts, B.D.: G_E : a GTP-binding protein mediating exocytosis. *Ann. Rev. Physiol.* 52, 591-606, 1990.
 - 46) Lillie, T.H.W. and Gomperts, B.D.: Guanine nucleotide is essential and Ca^{2+} is modulator in the exocytotic reaction of permeabilized rat mast cells. *Biochem. J.* 288, 181-187, 1992.