

## 【第121回生涯教育講座】

温熱生理学から考える口腔乾燥症の治療方法  
— 暑熱馴化による唾液腺でのアクアポリンの  
発現亢進と血管新生し どう おさむ まつ ざき けん たろう  
紫 藤 治<sup>1)</sup> 松 崎 健太郎<sup>1)</sup>  
すぎ もと なお とし  
杉 本 直 俊<sup>2)</sup>

キーワード：唾液腺，暑熱暴露，暑熱馴化，口腔乾燥症，アクアポリン

## はじめに

唾液は様々な生理学的作用を有しており，ヒトにおいてその作用が失われると，口腔乾燥症（ドライマウス）となり，味覚異常，口内炎，舌痛症，摂食障害，発音障害など様々な症状が現れる。現在，本邦では口腔乾燥症に悩まされる人口が800万人とも1000万人とも言われ，薬剤以外での唾液分泌を促進する簡便な治療法が求められている。

ラットやマウスなどのげっ歯類では暑熱暴露や深部体温の上昇により，蒸散性熱放散反応として唾液の分泌が促進され，その体表面への塗布（唾液塗布 saliva spreading）により熱の放散が維持される。また，他の哺乳類でも暑熱負荷時には唾液分泌の促進と浅促呼吸（パンティング panting）の組み合わせにより，蒸散性熱放散が維持される<sup>1,2)</sup>。暑熱負荷や深部体温の上昇の繰り返しにより，動物には暑熱馴化が成立するが，この時，

蒸散性および非蒸散性熱放散機能が亢進し，耐暑熱性が向上する。すなわち，唾液塗布やパンティングを行う動物においては，暑熱馴化により暑熱暴露時の唾液の分泌量が対照動物よりも著増する。ヒトは明確にパンティングをする動物ではないが，近年，ヒトにおいても運動時などで体温が上昇するとパンティング様の過呼吸が起こることが示されている<sup>3)</sup>。そこで，我々は口腔乾燥症に苦しむヒトにおける唾液分泌機能の亢進・維持のために，繰り返し温熱刺激を与えることが有効である可能性を考えてみた。

動物では暑熱馴化により唾液腺の肥大が起こり，これは暑熱馴化動物の唾液分泌機能の亢進のメカニズムの一つとされる。しかし，分子レベルを含め唾液分泌亢進の詳細なメカニズムは未だ十分に理解されていない。唾液の分泌は自律神経系により調節されているので，暑熱馴化による唾液分泌量の亢進は自律神経系の機能の変化（興奮性や温度への感受性の亢進など）による可能性がある。しかし，唾液の99%以上は水であることから，唾液の分泌量は唾液腺組織での水の移動能に直接影響されると考えられる。脂質二重膜からなる疎水

Osamu SHIDO et al.

1) 島根大学医学部環境生理学講座

2) 金沢大学医薬保健研究域医学系，島根大学医学部特別協力研究員  
連絡先：〒693-8501 出雲市塩冶町89-1

島根大学医学部環境生理学講座

性の細胞膜を介した水の輸送には膜内在型の水のチャネルであるアクアポリン (aquaporin, AQP) が重要な役割を果たす。事実、AQP の発現している上皮細胞では発現していない上皮に比べ水の輸送量が10~100倍になる<sup>4)</sup>。また、AQP のアイソフォームの一つである AQP5 (次項参照) の欠損マウスでは唾液分泌不全がおこり<sup>5)</sup>、AQP5 の発現異常を来すシェーグレン症候群の患者さんでも唾液の分泌低下が起こる。そこで、我々はげっ歯類の暑熱馴化による唾液分泌機能の亢進のメカニズムの一つとして、AQP の発現亢進を考えた。本稿ではまだ検討は少ないもののラットの暑熱馴化による唾液腺での AQP の発現の変化とそのメカニズムを紹介し、さらに、温熱生理学的立場から口腔乾燥症の改善方法としてヒトへの応用を提案したい。

### 唾液腺での AQP の局在

現在のところ、哺乳類には12~15の AQP のアイソフォームがあり、いくつかのサブグループに分類されている。AQP0, AQP1, AQP2, AQP4,

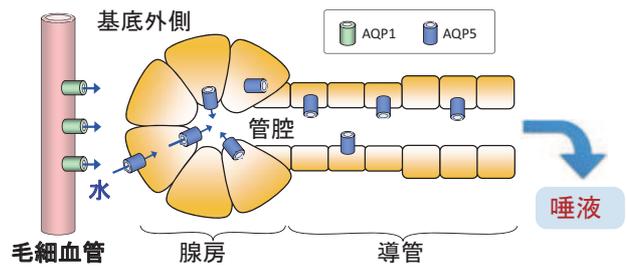


図1 ラットの唾液腺におけるアクアポリン1 (AQP1) とアクアポリン5 (AQP5) の局在。

AQP5 および AQP6 は水の輸送のみに関与し、AQP3, AQP7, AQP9 および AQP10 は水以外にもグリセロールや尿素の輸送に関与し、AQP8 は水と尿素を輸送する。さらに、superaquaporin と呼ばれる細胞内に存在する AQP11 と AQP12 が知られる<sup>6)</sup>。

ラットの顎下腺では AQP1 は血管系、特に毛細血管に多く発現し、腺房細胞や導管細胞には発現していないと報告されており、AQP5 は腺房細胞を中心に発現することが知られる (図1)<sup>7)</sup>。ラット顎下腺を用いた我々の検討では AQP1 は毛細血管の内皮細胞に発現することが確認された (図2 参照)<sup>8)</sup>。AQP5 は腺房の漿液細胞の頂上部

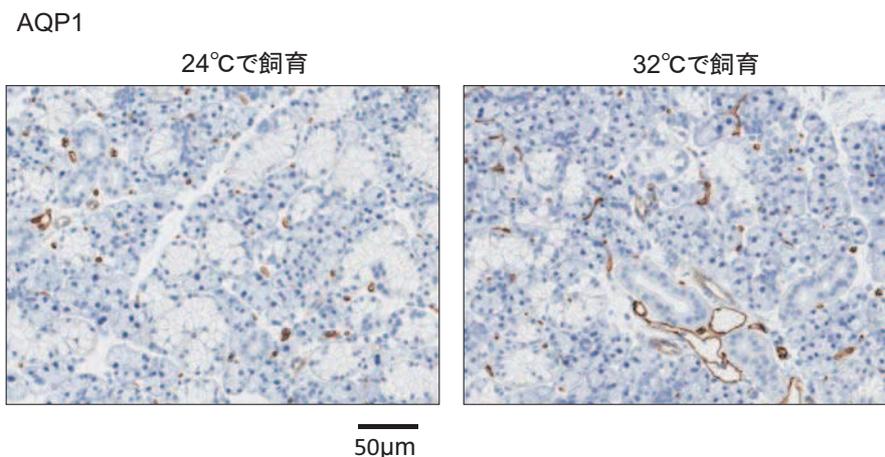


図2 ラットの顎下腺におけるアクアポリン1 (AQP1) 陽性細胞の分布

AQP1陽性細胞は茶色で、細胞核は青で染色されている。AQP1陽性細胞は血管内皮細胞に発現している。また、ラットを32°Cで5日間飼育すると、AQP1陽性細胞数が増加した。

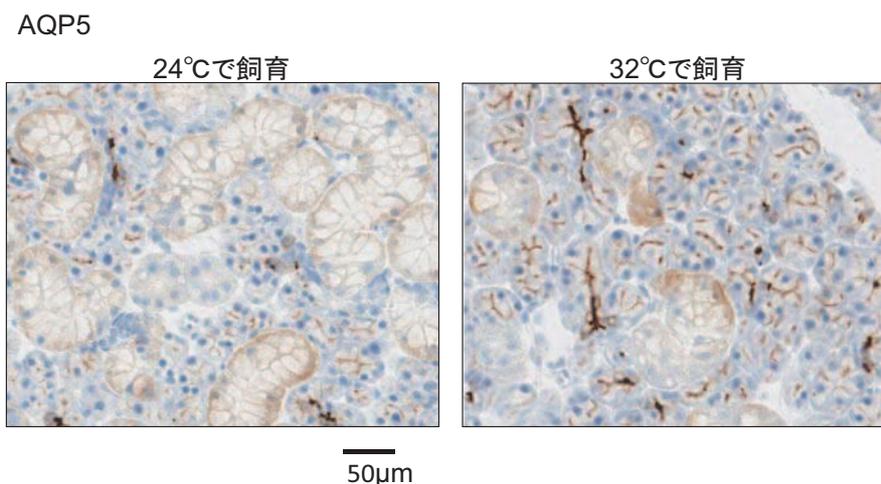


図3 ラットの顎下腺におけるアクアポリン5 (AQP5) 陽性細胞の分布

AQP5 陽性細胞は茶色で染色されており、細胞核は青で染色されている。AQP5 は腺房の漿液細胞の頂上部細胞膜側 (管腔面) に発現している。また、ラットを32°Cで5日間飼育すると、AQP5 陽性細胞数が増加した。

細胞膜側 (apical membrane, 管腔面) に多く発現しており、粘液細胞の基底外側での発現も観察された (図3 参照)<sup>8)</sup>。ラットの顎下腺における RT-PCR を用いた AQP1~9 の mRNA の発現の検討では、AQP1, AQP5, AQP8 の mRNA の発現は確認されたが、その他の AQP の mRNA は測定限界量以下であった<sup>8)</sup>。残念ながら当時は AQP8 に特異的な抗体が無く、AQP8 が唾液腺組織のどこに発現しているかは確認されていない。

#### 暑熱馴化による唾液腺でのアクアポリンの誘導とメカニズム<sup>8,9)</sup>

ウエスタンブロット法と免疫組織化学的手法を用いて、温熱刺激によるラット唾液腺の AQP1 と AQP5 のタンパク質発現量と誘導された局在を解析した。5週齢の若年雄ラット (Wistar 系) を、環境温24°C (対象群) あるいは32°C (暑熱馴化群) で5日間飼育した後、それぞれ顎下腺を採取し解析した。

暑熱暴露群の AQP1 の発現量は対照群のおよ

そ2倍となった。AQP1 は毛細血管にのみ発現しており、暑熱暴露群では AQP1 が発現している細胞数が増加した (図2)。さらに、血管内皮細胞のマーカーである CD31 の抗体で顎下腺組織を染色すると、暑熱暴露群では CD31 の陽性細胞数が対象群の1.6倍程度に増加した。これらから、暑熱暴露はラットの顎下腺の毛細血管新生を促進すると考えられ、また、AQP1 の発現も促進する可能性が示唆される。

暑熱暴露群では対照群に比べ AQP5 の発現量は2.5倍に増加した。AQP5 は前述のように腺房の漿液細胞の管腔面や粘液細胞の基底外側に発現しているが、暑熱暴露により漿液細胞の管腔面でのみ発現が増強されていた (図3)。また、RT-PCR を用いた検討では、暑熱暴露により AQP8 の mRNA の発現が増強することは無く、その他の AQP (AQP2, AQP3, AQP4, AQP6, AQP7, AQP9) の mRNA を新たに発現させることもなかった。これら結果は、暑熱暴露はラット唾液腺の腺房において漿液細胞の管腔面でのみ

AQP5 発現を強く促進することを示唆している。

以上から、暑熱馴化による唾液分泌の亢進のメカニズムの一つとして、毛細血管の新生と AQP1 発現の増加による毛細血管からの水移動能の改善と、唾液腺の腺房漿液細胞での AQP5 発現の増加による腺房細胞から管腔への水移動能の向上が考えられる (図1 参照)。

暑熱馴化による唾液腺の毛細血管新生と AQP 誘導の分子メカニズムは十分には検討されていない。血管新生には VEGF (vascular endothelial growth factor) を含む HIF-1 (hypoxic inducible factor-1) pathway が重要であることが知られている。ラットでは5日間の暑熱暴露により、顎下腺の HIF-1 $\alpha$  および VEGF の mRNA の発現が増加し、さらに VEGF のタンパク質自体も増加していることが確認されている。暑熱馴化による唾液腺での血管新生には HIF-1 の活性化とそれによる VEGF の誘導が少なくとも一部は関与すると考えられる。細胞膜上への AQP の発現は新たな AQP の合成や内在 AQP の膜への移動などが考えられる。それに関与する系は様々で、例

えば HIF-1 pathway や HSP (heat shock protein) が挙げられる (図4 参照)。事実、暑熱馴化したラットの顎下腺では HIF-1 $\alpha$  の mRNA, HSP70 と HSP60 のタンパク質量が増加するとの報告がある。また、繊維芽細胞系の培養細胞を用いた検討において、細胞を39.5°Cの高温状態で5日間培養すると、AQP1 の mRNA レベルと AQP5 のタンパク質量が増加すると共に、AQP 誘導に関連する HSP90 と HSP70 や HSF1 (heat shock transcription factor1) のタンパク質量の増加や p38 系の活性化などが起こることが報告されている。暑熱刺激による AQP の誘導については上記の実験結果や腎臓での AQP の誘導機序から、幾つかのモデルが考えられるが (図4)、今後のより詳細な検討が待たれる。

#### 運動トレーニングによる唾液腺機能の変化<sup>10)</sup>

運動は熱産生を著増させ体温を上昇させるので、その繰り返し (運動トレーニング) により体温調節系には暑熱馴化と類似した機能的変化が起こることが知られる (交叉適応)。そこで運動トレ

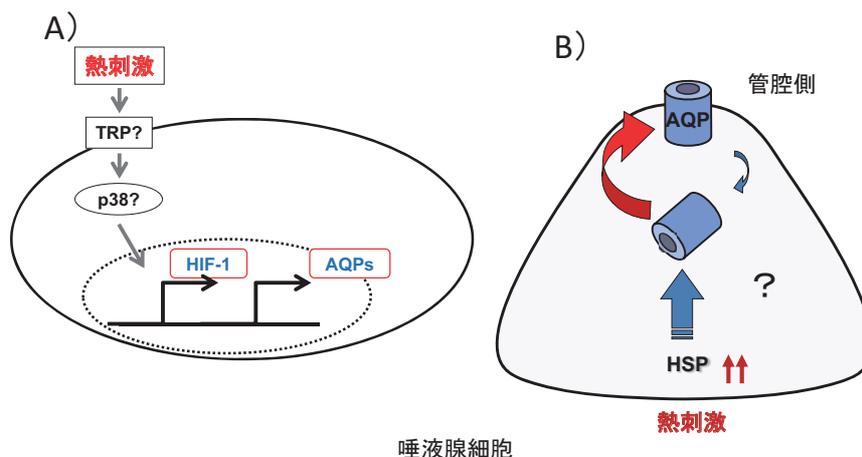


図4 アクアポリン (AQP) 誘導のメカニズムの考察

TRP, transient receptor potential; p38, phosphor-specific p38 MAPK; HIF-1, hypoxic inducible factor-1; HSP, heat shock protein.

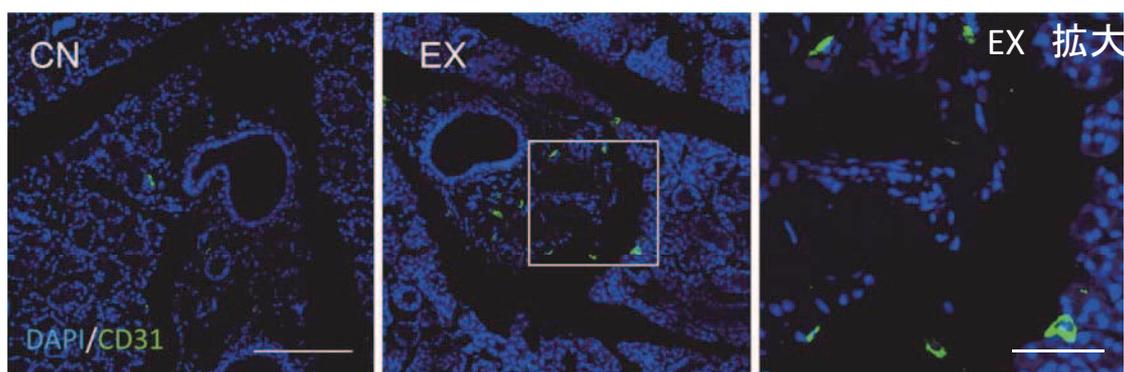


図5 ラットの顎下腺における CD31 の発現

CD31 は緑で染色されており，細胞核は DAPI（青）で染色されている。CN，対照群（左）；EX，運動群（中央）。スケールバーは100  $\mu$  m。右は運動群のボックスの拡大図で，スケールバーは25  $\mu$  m。運動トレーニングにより CD31 陽性の毛細血管数が増加した。

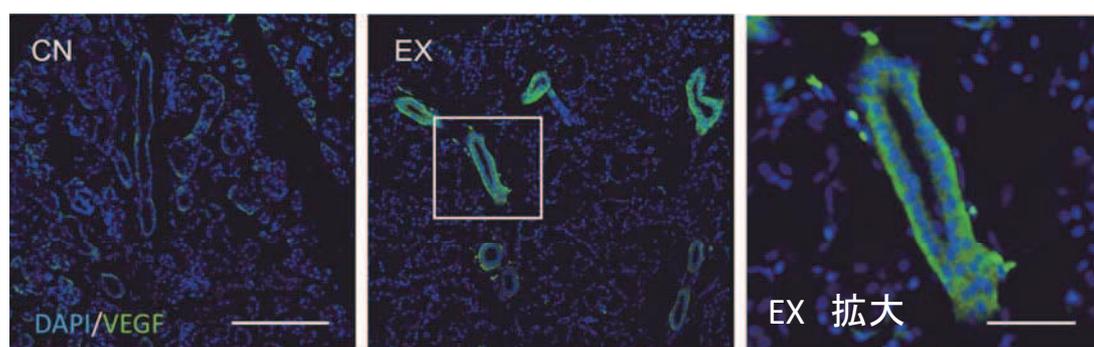


図6 ラットの顎下腺における VEGF の発現

VEGF は緑で染色されており，細胞核は DAPI（青）で染色されている。CN，対照群（左）；EX，運動群（中央）。スケールバーは100  $\mu$  m。右は運動群のボックスの拡大図で，スケールバーは25  $\mu$  m。運動トレーニングにより腺房の漿液細胞，導管細胞，毛細血管での VEGF 発現が増加した。

ニングした動物では暑熱馴化した動物と同様な唾液腺機能の変化が起こることが期待される。ラット（Wistar 系雄）を40日間ランニングホイール付きのケージで飼育し，自発運動をさせて運動トレーニング群（運動群）とし，対照ラットは自発運動ができない条件（対照群）で飼育した。運動群では対照群に比べ，ピロカルピン（M3 ムスカリン受容体のアゴニスト）の投与による唾液分泌が有意に促進された。この時，顎下腺の AQP1

の mRNA およびタンパク質の発現量は対照群に比べ運動群で有意に増加していた。さらに，運動群の顎下腺では対照群に比べ CD31 の陽性細胞数が多く（図5），VEGF の mRNA およびタンパク質の発現量が高かった（図6）。AQP5 の mRNA およびタンパク質の発現量は自発運動により変化しなかった。また，ピロカルピンを受容する M1 および M3 ムスカリン受容体の mRNA の発現量は両群で差はなかった。これら結果は，

ラットでは長期間の自発運動により、唾液腺で血管新生と毛細血管の水透過性を亢進させる AQP1 の発現増加が起き、この結果唾液分泌能が向上する可能性を示唆する。また、暑熱馴化動物と異なり、自発運動は腺房における AQP5 の発現に影響しなかった。これは、ランニングホイールでの自発運動は暑熱暴露と比べて温熱刺激としての強度が弱く、ラットの唾液塗布行動をほとんど誘導しないことによると推察される。

### ヒトへの応用

ヒトはイヌなどと異なり暑熱負荷時に強力にパンティングを行う動物ではない。しかし、生理的意味は少ないが高体温時にパンティング様の過換気が起こることが知られている<sup>3)</sup>。湿度低下を伴う高温環境への暴露時や運動時に換気が増加した状態では、口腔内や気道の乾燥を防ぐために唾液の分泌を促進する応答が合理的となる。従って、動物実験のように暑熱馴化後や、運動トレーニングにより唾液腺の分泌機能が亢進する可能性も期待される。残念ながら現時点ではヒトにおける全身性の温熱刺激による唾液腺機能の変化についての検討はないが、以下のように唾液腺の局所加温に関する例が報告されている。

健常人を対象として、使い捨てカイロを両側の耳下腺上の皮膚に置き、一日1時間以上連続7日間、同部分を加温した。加温期間の前後でサクソテストを実施して唾液分泌量を測定したところ、加温前の唾液分泌量に対し、終了後では唾液分泌

量が17%以上有意に増加した<sup>11)</sup>。さらに、シェーグレン症候群の患者さんに同様の処置をしたところ、口腔内の乾燥による夜間の睡眠障害が改善した例があるようである (personal communication)。これら結果は、ヒトでは唾液腺局所の繰り返し加温により、唾液腺機能が亢進する可能性を示唆している。ここから、「耳下腺周囲を加温することで唾液分泌を促す装置」も開発されている。

### おわりに

現代社会において大きな問題となっている口腔乾燥症に対し、非侵襲的かつ簡便な治療方法の開発を目指すことは極めて有意義と思われる。動物を用いた *in vitro* の検討や細胞レベルでの *in vivo* の検討から、温熱刺激の繰り返しは、唾液腺の水チャネルの発現の亢進と同組織の血管新生を介して、唾液の分泌機能を向上させる可能性が示唆されている。ヒトを対象とした検討は十分ではないが、機能的な原因による口腔乾燥症から組織障害を含むシェーグレン症候群などに伴う口腔乾燥症にいたるまで、その症状を改善する方法として簡便な温熱刺激が有用かもしれない。神経幹/前駆細胞は温熱刺激により増殖し神経細胞へ分化し、機能を有するようになることが知られるようになった<sup>12,13)</sup>。唾液腺にも唾液腺幹細胞が存在し、様々な組織に分化することが知られる。温熱刺激はそれらの分化を促進し、唾液腺組織の修復に役立つかもしれない。今後の検討が待たれる。

## 文 献

- 1) Robertshaw D, Mechanisms for the control of respiratory evaporative heat loss in panting animals: *J Appl Physiol*, 101: 664-668, 2006
- 2) Sugimoto N, Shido O, Furuyama F, Sakurada S, Nishino H, Thermoregulatory responses to acute heat loads in the FOK rat: *Int J Biometeorol*, 43: 119-123, 1999
- 3) Tsuji B, Hayashi K, Kondo N, Nishiyasu T, Characteristics of hyperthermia-induced hyperventilation in humans: *Temperature (Austin)*, 3(1): 146-160, 2016
- 4) Agre P, King LS, Yasui M, Guggino WB, Ottersen OP, Fujiyoshi Y, Engel A, Nielsen S, Aquaporin water channels-from atomic structure to clinical medicine: *J Physiol* 541: 3-16, 2002
- 5) Ma T, Song Y, Gillespie A, Carlson EJ, Epstein CJ, Verkman AS, Defective secretion of saliva in transgenic mice lacking aquaporin-5 water channels: *J Biol Chem*, 274: 20071-20074, 1999
- 6) Ishibashi K, New members of mammalian aquaporins: AQP10-AQP12: *Handb Exp Pharmacol* 190: 251-262, 2009
- 7) Akamatsu T, Parvin MN, Murdiastuti K, Kosugi-Tanaka C, Yao C, Miki O, Kanamori N, Hosoi K, Expression and localization of aquaporins, members of the water channel family, during development of the rat submandibular gland: *Pflügers Arch* 446: 641-651, 2003
- 8) Sugimoto N, Shido O, Matsuzaki K, Ohno-Shosaku T, Hitomi Y, Tanaka M, Sawaki T, Fujita Y, Kawanami T, Masaki Y, Okazaki T, Nakamura H, Koizumi S, Yachie A, Umehara H, Cellular heat acclimation regulates cell growth, cell morphology, mitogen-activated protein kinase activation, and expression of aquaporins in mouse fibroblast cells: *Cell Physiol Biochem*, 30(2): 450-457, 2012
- 9) Sugimoto N, Matsuzaki K, Ishibashi H, Tanaka M, Sawaki T, Fujita Y, Kawanami T, Masaki Y, Okazaki T, Sekine J, Koizumi S, Yachie A, Umehara H, Shido O, Upregulation of aquaporin expression in the salivary glands of heat-acclimated rats: *Sci Rep*, 3: 1763, 2013
- 10) Matsuzaki K, Sugimoto N, Katakura M, Sumiyoshi E, Hara T, Hashimoto M, Shido O, Daily voluntary exercise enhances pilocarpine-induced saliva secretion and aquaporin 1 expression in rat submandibular glands: *FEBS Open Bio*, 8(1): 85-93, 2017
- 11) 杉本直俊, 藤田義正, 正木康史, 梅原久範, シェーグレン症候群口腔乾燥症における温熱治療の有効性: 第55回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2011
- 12) Shido O, Matsuzaki K, Involvement of neurogenesis in the hypothalamic area in establishing long-term heat acclimation in rats: *Temperature (Austin)*. 2(3): 362-367, 2015
- 13) Hossain ME, Matsuzaki K, Katakura M, Sugimoto N, Mamun AA, Islam R, Hashimoto M, Shido O, Direct exposure to mild heat promotes proliferation and neuronal differentiation of neural stem/progenitor cells in vitro: *PLoS One*, 12(12): e0190356, 2017