

機関番号：30110

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592180

研究課題名 (和文) 唾液腺導管の電解質輸送とタンパク質分泌のイメージング解析と制御機構の解明

研究課題名 (英文) Imaging analysis of the electrolyte transport and protein secretions in salivary ducts to reveal their regulatory mechanisms

研究代表者

谷村 明彦 (TANIMURA AKIHIKO)

北海道医療大学・歯学部・准教授

研究者番号：70217149

研究成果の概要 (和文)：多光子レーザー顕微鏡を用いた解析によって、ラット唾液腺導管細胞において自発的  $\text{Ca}^{2+}$  オシレーションが起こることが明らかになった。この自発的  $\text{Ca}^{2+}$  オシレーションには、プリン受容体が関与することが薬理的解析で示めされた。また、 $\text{Ca}^{2+}$  応答と同調して、細胞容積増大が起こることがわかった。この  $\text{Ca}^{2+}$  オシレーションは、導管細胞からの自発的 ATP 放出によって起こり、電解質再吸収の調節に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：Using multiphoton microscopy, the present study established that rat salivary ductal cells exhibit spontaneous oscillations in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ). Pharmacological examinations indicate that purinergic receptors play major roles in these spontaneous  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations. It was also found that spontaneous elevations of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  were well correlated with spontaneous cell swelling of ductal cells. These results indicate the possibility that the  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations are induced by the spontaneous ATP release in salivary ductal cells in the resting state and regulate electrolyte reabsorption.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2300000	690000	2990000
2009 年度	900000	270000	1170000
2010 年度	500000	150000	650000
年度			
年度			
総計	3700000	1110000	4810000

研究分野：

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：歯科薬理学

1. 研究開始当初の背景

(1) 唾液腺の導管部は、腺房部から分泌され

た源唾液の輸送経路であると同時に、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{Cl}^-$  の再吸収や  $\text{K}^+$ 、 $\text{HCO}_3^-$  の分泌の機能を持つ事

が知られている。また、それらに加えて、成長因子などの生理活性分泌を分泌や唾液腺の再生に唾液腺導管が関与する可能性が示唆されている。さらに、唾液腺導管部が形態的に異なる細胞で構成されることが組織学的研究によって明らかにされている。これらの結果から、唾液腺導管が異なる機能を持った細胞から構成される可能性が示唆される。しかし、唾液腺導管細胞の機能を調節するしくみや多様性はほとんどわかっていなかった。

(2) 多光子レーザー顕微鏡を用いて、種々の受容体刺激による唾液腺導管細胞の  $\text{Ca}^{2+}$  応答を解析した我々の結果から、導管細胞の中に特定のアゴニストに対して高い感受性を示す細胞が存在することが明らかになった。これらの高感受性細胞は、生理的な分泌刺激において重要な役割を担っていると考えられる。

(3)  $\text{IP}_3$  を測定できる FRET 型分子センサー (LIBRA) を世界で最初に開発し、培養細胞の細胞内  $\text{IP}_3$  濃度を定量的に測定する独自の技術を確立していた。さらに、この蛍光センサーの改良に成功していた。

## 2. 研究の目的

(1) 多光子レーザー顕微鏡は、組織に対するダメージが低く、生理的な反応の解析に適している。その特徴を利用して、多光子レーザー顕微鏡による  $\text{Ca}^{2+}$  イメージング解析によって、唾液腺導管細胞の  $\text{Ca}^{2+}$  応答の調節機構とそれらの生理的役割を明らかにする。

(2)  $\text{Ca}^{2+}$  応答の調節には、細胞内ストアからの  $\text{Ca}^{2+}$  放出とチャネルからの  $\text{Ca}^{2+}$  流入が関係し、それらによって  $\text{Ca}^{2+}$  ウェーブやオシレー

ションなどの時・空間的に調節された  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルが発生する。本研究では、唾液腺導管細胞における  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルの調節機構を明らかにする。

(3) 唾液腺導管細胞は、電解質輸送やタンパク質分泌等の機能を持っている。これらの反応をイメージングで可視化し、導管細胞の生理的機能の調節における時・空間的  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルの役割を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) ラット耳下腺導管の  $\text{Ca}^{2+}$  応答と機能解析

① コラゲナーゼおよびヒアルロニダーゼ処理によって単離したラット耳下腺導管を実験に用いた。

② 単離した導管に  $\text{Ca}^{2+}$  蛍光色素 fura-2 を取り込ませ、実験チャンバーに固定し、 $37^\circ\text{C}$  での反応を多光子レーザー顕微鏡で反応を解析した。また、一部の実験では fura-2 蛍光と同時に微分干渉像を取得し、 $\text{Ca}^{2+}$  応答と形態変化の同時解析を行った。

③ 耳下腺導管に fura-2 を取り込ませた後、細胞膜蛍光プローブ FM-1-43 で細胞膜を染色し、 $\text{Ca}^{2+}$  応答と形態変化の関係を多光子レーザー顕微鏡で解析した。

④ 耳下腺導管の分泌顆粒をキナクリンで染色し、多光子レーザー顕微鏡を使った解析でそれらの分布と動態を明らかにした。

(2) 唾液腺導管細胞 (HSY-EA1 細胞) の  $\text{Ca}^{2+}$  オシレーションと  $\text{IP}_3$  動態の解析

プラスミドベクターを用いて、HSY-EA1 細胞に  $\text{IP}_3$  センサー LIBRAvIIS を発現させた。この細胞に fura-2 を取り込ませ、EM-CCD カメラを使った FRET イメージングシステムを用いて、アゴニスト刺激による LIBRAvIIS 蛍光と fura-2 蛍光の同時測定によって、 $\text{Ca}^{2+}$  応答と  $\text{IP}_3$  動

態の解析を行った。

#### 4. 研究成果

(1) ラット耳下腺導管細胞の自発的  $\text{Ca}^{2+}$  オシレーションとその発生機構

① Fura-2 を取り込ませたラット耳下腺導管細胞を  $37^{\circ}\text{C}$  で環流し、多光子レーザー顕微鏡で観察すると、極少数の導管で自発的  $\text{Ca}^{2+}$  オシレーションが観察された。この自発的  $\text{Ca}^{2+}$  オシレーションは、よりマイルドな酵素処理を行うことによって、多くの導管で見られるようになった。自発的  $\text{Ca}^{2+}$  オシレーションは、平均 10 分間に 2 回程度の比較的大きな  $\text{Ca}^{2+}$  上昇として認められた。この頻度は細胞によって大きく異なった。

② 自発的  $\text{Ca}^{2+}$  オシレーションは、プリン受容体の遮断薬である PPADS やスラミンによって抑制された。一方、ムスカリン受容体遮断薬（カルバコール）や  $\alpha$  アドレナリン受容体遮断薬（フェントラミン）は、自発的  $\text{Ca}^{2+}$  オシレーションを抑制しなかった。これらのことから、自発的  $\text{Ca}^{2+}$  オシレーションの発生にはプリン受容体が関与することが示唆された。また、この自発的  $\text{Ca}^{2+}$  オシレーションは、細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  の除去によって抑制されたが、完全には消失しなかった。この結果は、自発的  $\text{Ca}^{2+}$  オシレーションが主に細胞内ストアからの  $\text{Ca}^{2+}$  放出によって起こることが示唆された。

③ ラット耳下腺導管には、P2Y2 および P2X7 の 2 種類のプリン受容体が発現することが示されている。P2X7 はチャネル型受容体であり、しかもその活性化には 1mM 程度の高濃度の ATP が必要である。一方、P2Y2 は G タンパク質共役型で、ホスホリパーゼ C の活性化を介して  $\text{IP}_3$  依存性の  $\text{Ca}^{2+}$  放出を起こすことが明らかにされている。これらのことから、ラット耳下腺導管の自発的  $\text{Ca}^{2+}$  オシレーションは P2Y2 受容体を介する反応と考えられた。

このことを確認するため、ラット耳下腺導

管の  $\text{Ca}^{2+}$  応答に対する ATP (1 $\mu\text{M}$ ) あるいは UTP (1 $\mu\text{M}$ ) 刺激の影響を解析した。その結果、これらの刺激によって  $\text{Ca}^{2+}$  オシレーションの頻度が増加することが確認された。これらの結果から、ラット耳下腺導管の自発的  $\text{Ca}^{2+}$  オシレーションは、P2Y2 受容体を介する反応であることが明らかになった。

④ ATP を含む分泌顆粒を染色する色素キナクリンで、ラットの導管を染色すると、導管内の多くの分泌顆粒の染色が確認された。これらの結果から、導管細胞内の ATP を含む分泌顆粒の放出によって自発的  $\text{Ca}^{2+}$  オシレーションが起こるのではないかと考えられた。

(2) ラット耳下腺導管細胞の自発的  $\text{Ca}^{2+}$  オシレーションと細胞形態の変化

① ラット耳下腺導管の自発的  $\text{Ca}^{2+}$  オシレーションの生理的役割を明らかにするために、 $\text{Ca}^{2+}$  応答と微分干渉像を使った細胞形態の同時解析を行った。ラット耳下腺導管の微分干渉像の変化を解析すると、自発的な細胞形態の変化が観察された。この微分干渉像の差分イメージと fura-2 蛍光イメージの変化を使って  $\text{Ca}^{2+}$  応答と形態変化を解析すると、両者が一致することが明らかになった。

カルバコールなどのムスカリン受容体アゴニスト刺激は、唾液腺腺房細胞や導管の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を持続的に上昇させ、それに伴って細胞容積の減少を起こすことが知られている。従って、自発的  $\text{Ca}^{2+}$  オシレーションによる細胞形態の変化も、細胞容積の減少を反映したものであると考えられた。

② 自発的  $\text{Ca}^{2+}$  オシレーションに伴う導管細胞の形態変化が細胞容積の減少なのかを確かめるために、導管の細胞膜を FM-1-43 で染色し、多光子レーザー顕微鏡を使って解析した。その結果、予想に反して細胞容積の増大が観察された。この反応が本当に  $\text{Ca}^{2+}$  応答に伴う

反応か否かを確認するために、fura-2 を取り込ませた導管を FM-1-43 で染色し、自発的  $\text{Ca}^{2+}$  オシレーションと細胞形態の同時解析を行った。その結果、自発的  $\text{Ca}^{2+}$  オシレーションが細胞容積増大を起こすことが明らかになった (図 1)。

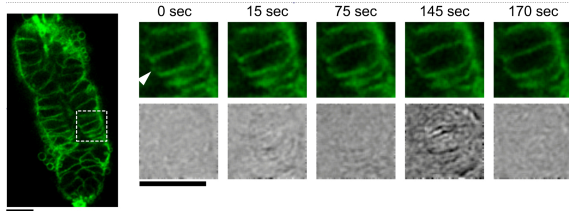


図 1 ラット耳下腺導管細胞の細胞容積増大

この反応が、自発的  $\text{Ca}^{2+}$  オシレーションだけで起こる反応なのか、それともアゴニスト刺激による  $\text{Ca}^{2+}$  応答でも起こるのかを明らかにするために、ATP によるプリン受容体刺激およびカルバコールによるムスカリン受容体刺激による  $\text{Ca}^{2+}$  応答と細胞形態の変化を解析した。ATP 刺激は自発的  $\text{Ca}^{2+}$  オシレーションの頻度を増大させ、その  $\text{Ca}^{2+}$  オシレーションと同調した細胞容積の増大を起こした。同様の反応はカルバコール刺激でも観察された。また、高濃度のカルバコール刺激は、一部の導管細胞に  $\text{Ca}^{2+}$  オシレーションを起こすと同時に、導管全体で持続的な細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇を起こした。この場合は、持続的な細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇に伴って、導管の管腔拡大が起こった。また、その場合でも  $\text{Ca}^{2+}$  オシレーションに伴って一過性の細胞容積増大が観察された。

さらにイオノマイシンを使って、持続的で大きな細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を起こすと、導管全体で同調した細胞容積増大が起こり、それに伴って導管の伸長が起こった。これらの結果は、比較的小さく持続的な細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇は、導管の管腔拡大を起こし、大きな細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇が細胞容積増大を起こすことがわかった。この細胞容積増大は導管細胞におけ

る電解質吸収によるものと考えられた。一方、それまでの研究では、管腔拡大は細胞容積減少によるものであることが示唆されていた。しかし、本研究で細胞膜の動きを直接的に観察した結果、管腔拡大が必ずしも細胞容積減少によるものではないと考えられた。一般的に導管細胞では、電解質の再吸収が起こると考えられてきた。しかし、導管の中には電解質を分泌する部分があることが示唆されている。この管腔拡大も、電解質分泌によるものである可能性があるが、詳細についてはより詳しい解析が必要である。

③唾液腺導管の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の変化によって起こる細胞形態の変化が、導管細胞における電解質輸送と関係があると考え、イオンチャンネルの阻害剤やイオノフォアの影響を検討した。 $\text{Ca}^{2+}$  依存性  $\text{Cl}^-$  チャンネル阻害薬、cAMP 依存性  $\text{Cl}^-$  チャンネル阻害薬、 $\text{Na}^+$  チャンネル阻害薬が、イオノマイシンによる導管細胞の形態変化を阻害した。また、 $\text{K}^+$  イオノフォアでもイオノマイシンによる導管細胞の形態変化を阻害した。これらの結果から、細胞容積増大は導管細胞における  $\text{Cl}^-$  と  $\text{Na}^+$  の吸収によって起こる可能性が示唆された。また、この反応に  $\text{K}^+$  イオンの濃度勾配が関与すると考えられた。

### (3) 唾液腺導管細胞の $\text{Ca}^{2+}$ オシレーションの発生機構

耳下腺導管細胞の  $\text{Ca}^{2+}$  オシレーションの発生機構を明らかにするために、ヒト耳下腺導管に由来する HSY-EA1 細胞を用いた実験を行った。 $\text{Ca}^{2+}$  シグナルの発生には、細胞外から細胞質に  $\text{Ca}^{2+}$  を流入させる様々な  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルに加えて、細胞内ストアから  $\text{Ca}^{2+}$  を放出するチャンネルであるイノシトール 1, 4, 5-三リン酸 ( $\text{IP}_3$ ) 受容体が関与する。特に非興奮性細胞における  $\text{Ca}^{2+}$  応答では、 $\text{IP}_3$  受容体を介す

る  $\text{Ca}^{2+}$  放出が重要な役割を担っている。我々は、以前から  $\text{IP}_3$  をリアルタイムで計測できる蛍光プローブ LIBRA を開発し、その改良を行ってきた。本研究では、その改良型  $\text{IP}_3$  プローブ LIBRAvIIS を発現させた HSY-EA1 細胞に fura-2 を取り込ませて  $[\text{IP}_3]_i$  と  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  の変化を同時に解析した。

HSY-EA1 細胞をムスカリン受容体やプリン受容体アゴニストで刺激すると、 $\text{Ca}^{2+}$  オシレーションが発生し、それに伴って明らかな  $\text{IP}_3$  振動が観察された (図 2)。この時の  $\text{IP}_3$  スパイクの大きさは 50-150nM 程度で、スパイク頻度が小さい時ほど明確な  $\text{IP}_3$  振動が観察された。この  $\text{IP}_3$  振動は  $\text{Ca}^{2+}$  オシレーションの結果であって、 $\text{Ca}^{2+}$  オシレーションの発生に必須では無いと考えられるが、なんらかの補助的な役割があると推測される。

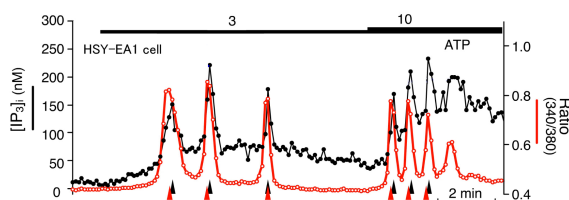


図 2 耳下腺導管細胞の  $\text{Ca}^{2+}$  オシレーションと  $\text{IP}_3$  動態

上記の研究手法を使って、ラット唾液腺導管の  $\text{Ca}^{2+}$  オシレーションの発生機構の解析するために、蛍光タンパク質発現ウイルスベクターを作成した。このベクターを顎下腺開口部から逆行性に注入し、蛍光タンパク質を発現させることに成功した。しかし、この方法では唾液腺腺房細胞への発現が多く、導管細胞の解析には適さないことがわかった。また従来の細胞膜局在型  $\text{IP}_3$  分子センサーを細胞質型に変更し、それを精製して唾液腺細胞への導入を試みた。しかし、これまでに試みた導入法では細胞に対するダメージが大きすぎて測定ができなかった。今後、唾液腺導管細胞の  $\text{Ca}^{2+}$  オシレーションと  $\text{IP}_3$  動態の解明のために、より高感度な  $\text{IP}_3$  センサーと唾液腺導

管を標的にした遺伝子導入法の確立が必要である。

#### 5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕 (計 19 件)

- ① [Tanimura A](#), [Shitara A](#), and [Tojyo Y](#). Diversity and spactio-temporal proterties of calcium responses in salivary ducts. *J Oral Biosci* 53: 48-56, 2011. 査読有り
- ② [Tanimura A](#). The development of FRET-based  $\text{IP}_3$  biosensors and their use for monitoring  $\text{IP}_3$  dynamics during  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations and  $\text{Ca}^{2+}$  waves in non-excitabile cells. *J Oral Biosci* 53: 109-121, 2011. 査読有り
- ③ [Morita T](#), [Tanimura A](#), [Shitara A](#), [Suzuki Y](#), [Nezu A](#), [Takuma T](#), and [Tojyo Y](#). Expression of functional Stim1-mK01 in rat submandibular acinar cells by retrograde ductal injection of adenoviral vector. *Arch Oral Biol* 56:1356-1365, 2011. 査読有り
- ④ [Nezu A](#), [Tanimura A](#), [Morita T](#), and [Tojyo Y](#). Visualization of  $\text{Ins}(1, 4, 5)\text{P}_3$  dynamics in living cells: two distinct pathways for  $\text{Ins}(1, 4, 5)\text{P}_3$  generation following mechanical stimulation of HSY-EA1 cells. *J Cell Sci* 123: 2292-2298, 2010. 査読有り
- ⑤ [Morita T](#), [Tanimura A](#), [Baba B](#), [Kurosaki T](#), and [Tojyo Y](#). A Stim1-dependent, noncapacitative  $\text{Ca}^{2+}$ - entry pathway is activated by B-cell- receptor stimulation and depletion of  $\text{Ca}^{2+}$ . *J Cell Sci* 122: 1220-1228, 2009. 査読有り
- ⑥ [Okayama M](#), [Arakawa T](#), [Tanimura A](#), [Mizoguchi I](#), [Tajima Y](#), and [Takuma T](#). Role of VAMP8/endobrevin in Constitutive Exocytotic Pathway in HeLa Cells. *Cell Struct Funct* 34: 115-125, 2009. 査読有り

⑦ Tanimura A. Mechanism of calcium waves and oscillations in non-excitabile cells. International Journal of Oral-Medical Science 8: 1-11, 2009. 査読有り

⑧ Tanimura A, Morita T, Nezu A, Shitara A, Hashimoto N, and Tojyo Y. Use of fluorescence resonance energy transfer-based biosensors for the quantitative analysis of inositol 1,4,5-trisphosphate dynamics in calcium oscillations. J Biol Chem 284: 8910-8917, 2009. 査読有り

⑨ Shitara A, Tanimura A, Sato A, and Tojyo Y. Spontaneous oscillations in intracellular  $Ca^{2+}$  concentration via purinergic receptors elicit transient cell swelling in rat parotid ducts. Am J Physiol 297: G1198-G1205, 2009. 査読有り

[学会発表] (計 29 件)

① Tanimura A. Roles of purinergic receptors on the spontaneous and agonist-induced  $Ca^{2+}$  responses in rat salivary ducts, The 8th Gordon Research Conference on Salivary Glands and Exocrine Biology, 2011年2月、ガルベストーン(TX, USA)

② 谷村明彦. 蛍光イメージングによる細胞内カルシウム情報伝達系の研究. 第52回歯科基礎医学会総会 ライオン学術賞受賞講演、2010年9月、東京都(船堀)

③ 森田貴雄、谷村明彦、設楽彰子、鈴木裕子、根津顕弘、田隈泰信、東城庸介、唾液腺への非侵襲的アデノウイルス注入によるStim1の*in vivo*発現と機能解析、第61回日本薬理学会北部会、2010年9月、札幌市

④ 谷村明彦、森田貴雄. 容量性および非容量性カルシウム流入機構におけるSTIM1の機能. 第87回日本生理学会、シンポジウム: ストア作動性カルシウム流入機構とその生理的役割2010年5月、盛岡市

⑤ 谷村明彦、唾液腺導管細胞のカルシウム応答とその多様性、51回歯科基礎医学会学術大会サテライトシンポジウム: 唾液腺研究最前線一口腔乾燥の分子機構と臨床応用、2009年9月、新潟

⑥ 根津顕弘、谷村明彦、森田貴雄、東城庸介、細胞質発現型IP<sub>3</sub>バイオセンサーの精製とそれを用いた耳下腺腺房細胞のIP<sub>3</sub>濃度測定への応用、第51回歯科基礎医学会学術大会、2009年9月、新潟市

⑦ Tanimura A, Morita T, Nezu A, Tojyo Y. Monitoring of IP<sub>3</sub> dynamics during  $Ca^{2+}$  oscillations in HSY human parotid cell line with FRET-based IP<sub>3</sub> biosensors. The 11<sup>th</sup> international Symposium on Exocrine Secretion, 2009年7月、徳島市

⑧ 設楽彰子、谷村明彦、森田貴雄、根津顕弘、東城庸介、ラット耳下腺導管細胞における自発的 $Ca^{2+}$ 反応の発生機構、第50回歯科基礎医学会学術大会、2008年9月、東京都(品川)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

谷村 明彦 (TANIMURA AKIHIKO)  
北海道医療大学・歯学部・准教授  
研究者番号: 70217149

### (2) 研究分担者

森田 貴雄 (MORITA TAKAO)  
北海道医療大学・歯学部・講師  
研究者番号: 20326549

根津 顕弘 (NEZU AKIHIRO)  
北海道医療大学・歯学部・講師  
研究者番号: 00305913

東城 庸介 (TOJYO YOSUKE)  
北海道医療大学・歯学部・教授  
研究者番号: 90111731