

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月13日現在

機関番号：30110  
 研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22592075  
 研究課題名（和文）In vivo 遺伝子発現系を用いた唾液腺腺房細胞における  
 分泌の分子機構の解明  
 研究課題名（英文）Analyses of molecular mechanisms of salivary secretion in salivary  
 acinar cells using gene expression in vivo  
 研究代表者  
 森田 貴雄（MORITA TAKAO）  
 北海道医療大学・歯学部・講師  
 研究者番号：20326549

研究成果の概要（和文）：顎下腺開口部からアデノウイルスを導入し、ラット顎下腺組織に in vivo で Stim1-mK01 を発現させた。Stim1-mK01 は主に腺房細胞に発現しており、機能的であることが示された。Stim1-mK01 の過剰発現によりカルシウム応答は増強され、発現顎下腺からの唾液分泌はコントロールに比べて増加傾向を示した。同様の方法でカルシウムバイオセンサーの G-GECO を顎下腺組織に発現させ、唾液腺の in vivo カルシウムイメージングに初めて成功した。

研究成果の概要（英文）：Stim1-mK01 was expressed in rat submandibular glands by retrograde ductal injection of an adenoviral vector. Stim1-mK01 proteins were expressed predominantly in acinar cells following infection with an adenoviral vector. Confocal microscopy and  $Ca^{2+}$  imaging analysis indicated that the Stim1-mK01 expressed in submandibular acinar cells is functional. The overexpression of Stim1-mK01 enhanced the agonist-induced  $Ca^{2+}$  release from intracellular  $Ca^{2+}$  stores and the  $Ca^{2+}$  entry through store-operated  $Ca^{2+}$  entry. It is possible that the overexpression of Stim1 increased salivary fluid secretion compared to the control. In addition, we succeeded in monitoring the agonist-induced  $Ca^{2+}$  dynamics in SMG in live animals using the  $Ca^{2+}$  indicator, G-GECO.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：唾液腺、シグナル伝達、唾液分泌、アデノウイルス、遺伝子導入、GFP、カルシウム、薬理学

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 唾液腺腺房細胞からの水・電解質分泌は、主に細胞内  $Ca^{2+}$  によって調節されている。耳下腺腺房細胞では、ムスカリン受容体の刺激により、イノシトール三リン酸受容体

( $IP_3R$ ) を介した細胞内ストアからの  $Ca^{2+}$  放出がおこり、これが水・電解質分泌の引き金となる。さらに細胞外から  $Ca^{2+}$  が流入することにより、持続的な分泌が起こると考えられている。 $Ca^{2+}$  は  $K^+$  チャネルや  $Cl^-$  チャネル、

Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup>トランスポーターなどを活性化することによって腺腔内へイオンを分泌し、これを駆動力として水の動きを調節すると考えられており、この水の動きに水チャネルであるアクアポリン 5(AQP-5)が関与することが示唆されている(Ma et al., J. Biol. Chem., 274, 20071-74, 1999)。

(2) 最近、細胞内 Ca<sup>2+</sup>ストアの Ca<sup>2+</sup>センサーである Stim1、細胞膜 Ca<sup>2+</sup>チャネルの Orail や TRPC などが唾液腺細胞の Ca<sup>2+</sup>流入に関与することが示唆されている(Liu et al., Proc Natl Acad Sci USA, 104, 2007; Cheng et al., J Biol Chem, 283, 2008)。また我々は培養細胞を使って、Stim1 が新しい Ca<sup>2+</sup>流入機構に関与することを発見した(Morita et al., J Cell Sci, 122, 2009)。このような持続的な細胞内 Ca<sup>2+</sup>の上昇により、Cl<sup>-</sup>チャネルや Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup>共輸送体(NKCC1)などが活性化し、これらの働きによりイオン分泌が亢進することによりアクアポリン(AQP)などを介する水分分泌が促進すると考えられている。

(3) 以前より唾液腺腺房細胞を培養してこれに外来遺伝子を発現させる試みは行われていたが、12時間程度でその極性や分泌機能が失われてしまうため、外来遺伝子発現による機能解析が困難であった。一方、アデノウイルスを唾液腺開口部から逆行性に注入し、唾液腺細胞に AQP など外来タンパク質を発現させる試みが行われてきた。また、センダイウイルスの膜エンベロープを使って Cl<sup>-</sup>チャネルの siRNA を唾液腺に導入するノックダウン実験が報告されている(Ishibashi et al., Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 294, 2008)。これら従来の方法では唾液腺の導管細胞にしか遺伝子や siRNA を導入することができなかった。しかし我々は、アデノウイルスベクターを使った遺伝子導入により、唾液腺の腺房細胞に効率よく蛍光標識タンパク質を発現させることに初めて成功し、腺房細胞からの唾液分泌における分子の機能を解析することが可能となった。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究は、アデノウイルスを唾液腺開口部から逆行性に注入し、in vivo で Ca<sup>2+</sup>動態および水・イオン分泌に関係する分子を唾液腺腺房細胞に発現させ、その唾液腺から調整した細胞を用いて、それらの分子の細胞内動態と Ca<sup>2+</sup>動態への影響をリアルタイムに解析する。またこれらの分子の siRNA を使った遺伝子ノックダウン法を用い、Ca<sup>2+</sup>動態を解析することにより、その分子の役割を明らかにする。

(2) また、これらを導入した動物における

唾液分泌量や唾液の組成を解析し、これらの分子の分泌における機能を明らかにする。さらに、これらを導入した動物を用いて in vivo で唾液腺における Ca<sup>2+</sup>動態およびシグナル分子の動態と唾液分泌の同時解析を行う。これらにより、唾液腺腺房細胞からの唾液分泌における分子メカニズムを明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 蛍光タンパク質標識したシグナル分子の作製およびその局在・機能解析

① 蛍光タンパク質 (mK01 及び Venus) 標識シグナル分子発現プラスミドベクターの作製

ヒト Stim1 および Orail cDNA は Origene 社から購入した。mK01 およびヒト Stim1 タンパクをコードする cDNA を PCR により増幅し、これらをつなげて Stim1-mK01 融合タンパク質を発現するプラスミドベクターを作製した。ヒト Orail と Venus cDNA をつなげて Venus-Orail を発現するプラスミドベクターを作製した。

② Stim1-mK01 と Venus-Orail の共発現による局在・機能解析

Lipofectamine2000 (Invitrogen)を用いて、Stim1-mK01 および Venus-Orail プラスミドを COS-7 細胞に導入し、これらの融合タンパク質を発現させた。

ARGUS-HiSCA Ca<sup>2+</sup>イメージング装置(浜松ホトニクス)を用いて、Stim1-mK01 および Venus-Orail 発現細胞の Ca<sup>2+</sup>応答を解析した。局在解析は、多光子レーザー顕微鏡(Radiance 2100MP, Zeiss)を用いて行った。

(2) 蛍光タンパク質標識シグナル分子を発現するアデノウイルスの作製

Stim1-mK01, Venus-Orail および、Ca<sup>2+</sup>バイオセンサーの G-GECO 発現プラスミドから融合タンパク質をコードする cDNA 部分を切り出し、アデノウイルスベクターに組み込んだ。アデノウイルスベクター作製には、Invitrogen 社の ViraPower アデノウイルス発現キットを用いた。アデノウイルスベクターを増殖専用細胞(HEK293A)に導入し、培養上清を回収することによりアデノウイルス粒子を調製した。(G-GECO プラスミドは大阪大学の永井健治教授より供与された。)

(3) 蛍光タンパク質標識分子の in vivo における発現とその局在解析

① in vivo の唾液腺へのアデノウイルスベクター遺伝子導入

Wistar 系雄性ラット(10-16 週齢)をソムノペンチル(45 mg/kg)あるいはケタミン(50 mg/kg)+キシラジン(6.7 mg/kg)で麻酔し、実体顕微鏡下でラットの顎下腺開口部にチュ

ープを挿入した (図 1)。そのチューブにシリンジを装着し、調製したアデノウイルス粒子を含んだ上清 25-100  $\mu$ l を逆行性に注入した。



図 1  
顎下腺開口部  
へのチューブ  
の挿入

## ② 蛍光標識分子の局在解析

注入 1-7 日後にラットから顎下腺を摘出し、蛍光実体顕微鏡 (KEYENCE) を用いて顎下腺組織全体での蛍光を観察した。さらに、酵素処理により顎下腺腺房及び導管細胞を調製し、多光子レーザー顕微鏡を用いて蛍光標識タンパク質の発現と細胞内局在のリアルタイム解析を行った。また、摘出顎下腺を 4% パラホルムアルデヒドで固定した後切片を作製し、多光子レーザー顕微鏡で蛍光タンパク質の局在を観察した。

## ③ Stim1-mK01 の単離顎下腺細胞における $Ca^{2+}$ イメージング

アデノウイルス注入顎下腺から酵素処理により単離顎下腺腺房細胞を調製し、ARGUS-HiSCA  $Ca^{2+}$  イメージング装置を用いて、種々の刺激による  $Ca^{2+}$  応答を解析した。

## (4) 唾液分泌測定

上記の方法により麻酔したラットを、実体顕微鏡下で、チューブを顎下腺開口部に挿入した。ピロカルピン (1 mg/kg) を腹腔内投与し、分泌された唾液を 5-10 分ごとにマイクロチューブに回収し、その重量を測定することにより唾液分泌量を計算した (図 2)。

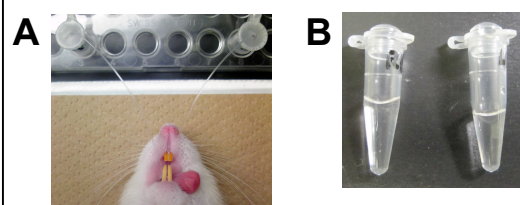


図 2 顎下腺開口部へのチューブの挿入 (A) とアゴニスト投与により分泌された唾液 (B)

## (5) *in vivo* $Ca^{2+}$ イメージング

*in vivo*  $Ca^{2+}$  イメージングは、Multizoom AZ100 正立顕微鏡 (ニコン) と AQUA-COSMOS/ASHURA システム (浜松ホトニクス) を用いて行われた。G-GECO アデノウイルスを注入したラットをウレタンで麻酔後、開胸して顎下腺を露出させた。アセチルコリンの腹腔内投与による G-GECO の蛍光変化を cooled 3CCD カメラで検出した (図 3)。

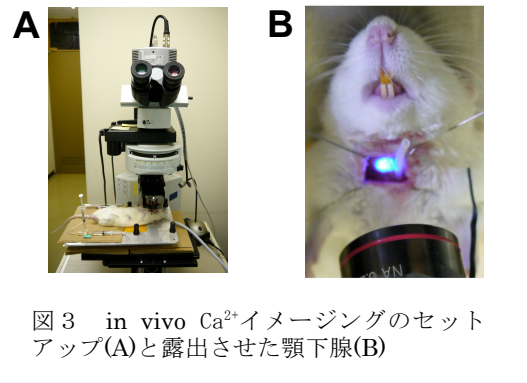


図 3 *in vivo*  $Ca^{2+}$  イメージングのセットアップ (A) と露出させた顎下腺 (B)

## 4. 研究成果

(1) 蛍光タンパク質標識分子の *in vivo* における発現とその局在・機能解析

### ① 顎下腺組織における Stim1-mK01 の局在解析

ラット顎下腺開口部にチューブを挿入し、Stim1-mK01 融合タンパク質を発現するウイルス粒子を逆行性に注入した。ウイルス注入 2 日後に顎下腺を摘出し、実体顕微鏡で観察したところ、Stim1-mK01 の蛍光は顎下腺全体に見られたが、舌下腺には蛍光は見られなかったことから、顎下腺での発現が特異的であることが示された (図 4 A)。組織切片を調製して共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、Stim1-mK01 は顎下腺腺房細胞の約 20% に発現が見られ、導管細胞では 1-2% に発現していた。このことから、本法を使って顎下腺腺房細胞に効率的に外来タンパク質を発現できることが示された (図 4 B)。

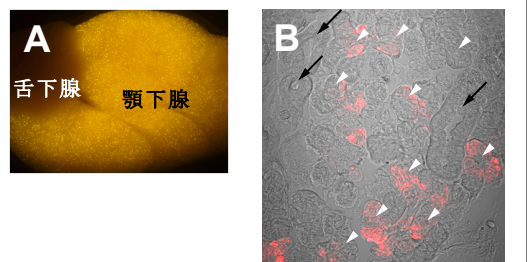


図 4 (A) Stim1-mK01 を発現させたラット顎下腺の蛍光像。(B) 顎下腺組織切片における透過像と Stim1-mK01 蛍光像の重ね合わせ。白矢頭：腺房、黒矢印：導管。

### ② アデノウイルスにより唾液腺細胞に発現した Stim1-mK01 の機能解析

酵素処理により分離顎下腺腺房細胞を調製し、Stim1-mK01 の機能を解析した。タプシジンなどの小胞体  $Ca^{2+}$  ポンプ阻害剤で誘導された  $Ca^{2+}$  ストアの枯渇により、Stim1-mK01 が内在性 Stim1 分子と同様に細胞膜近傍へ移動することが示された (図 5 A)。

さらにストア枯渇により誘導される容量性  $Ca^{2+}$  流入を調べると、Stim1-mK01 発現細胞

ではこの  $\text{Ca}^{2+}$  流入がコントロールの mK01 発現細胞に比べて増大していた (図 5 B)。これらの結果から、アデノウイルスによって導入、発現した Stim1-mK01 は生体内の唾液腺細胞で機能的であることが示された (Morita et al., Arch. Oral Biol., 56, 2011)。

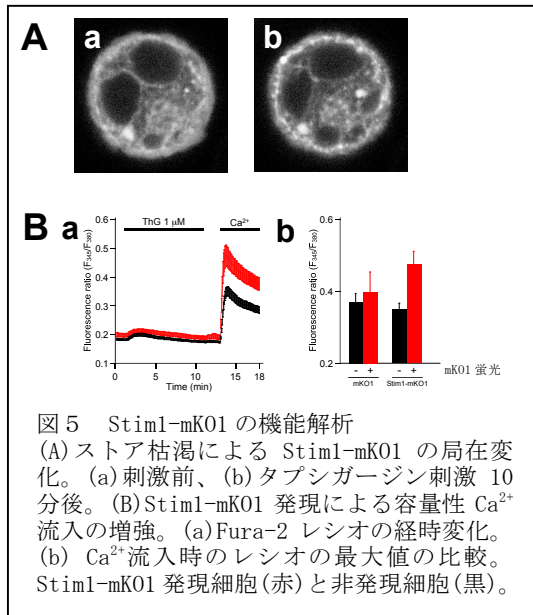


図 5 Stim1-mK01 の機能解析  
(A) ストア枯渇による Stim1-mK01 の局在変化。(a) 刺激前、(b) タブシガージン刺激 10 分後。(B) Stim1-mK01 発現による容量性  $\text{Ca}^{2+}$  流入の増強。(a) Fura-2 レシオの経時変化。(b)  $\text{Ca}^{2+}$  流入時のレシオの最大値の比較。Stim1-mK01 発現細胞 (赤) と非発現細胞 (黒)。

### ③ Stim1-mK01 発現細胞におけるアゴニスト刺激による $\text{Ca}^{2+}$ 応答の増強

Stim1-mK01 発現細胞では、ムスカリン受容体アゴニスト (カルバコール、CCh) 刺激によるストアからの  $\text{Ca}^{2+}$  流出量および  $\text{Ca}^{2+}$  流入量がコントロールに比べて増大していた。この放出量増大の割合は、低濃度の CCh 刺激ほど大きかった (図 6)。

また、Stim1-mK01 発現細胞と mK01 発現細胞では、イオノマイシンによる放出量に差は見られなかった。さらに Stim1-mK01 発現による  $\text{IP}_3$  受容体の  $\text{IP}_3$  に対する感受性の増大は認められなかった。これらのことから、この放出量の増大は受容体刺激に特異的な増強と考えられた。

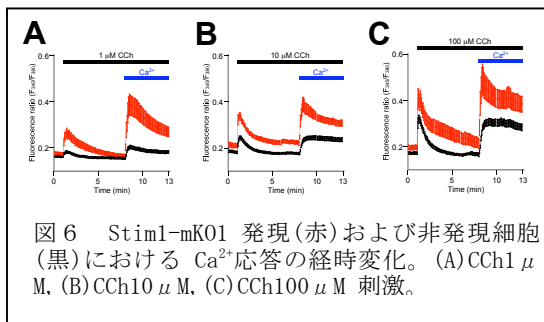


図 6 Stim1-mK01 発現 (赤) および非発現細胞 (黒) における  $\text{Ca}^{2+}$  応答の経時変化。(A) CCh 1  $\mu\text{M}$ 、(B) CCh 10  $\mu\text{M}$ 、(C) CCh 100  $\mu\text{M}$  刺激。

### (2) 唾液分泌解析

受容体刺激による  $\text{Ca}^{2+}$  応答が増強したことから、Stim1 発現により唾液分泌量が増加する可能性が考えられた。そこで、Stim1-mK01 をラット顎下腺の片側に発現させ、ムスカリ

ン受容体アゴニスト (ピロカルピン) 投与による唾液分泌を調べた。ウイルス 100  $\mu\text{l}$  注入群では、非注入群と比べて分泌量の低下が観察された。そこで、注入量を 25  $\mu\text{l}$  に減らし、非注入群と比較すると、唾液分泌量の増大傾向が観察された (図 7)。しかし、この分泌量の増加は発現量や個体差など条件によって大きな差があり、さらなる条件検討が必要であると考えられる。

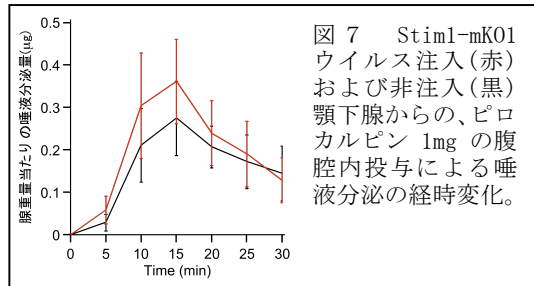


図 7 Stim1-mK01 ウイルス注入 (赤) および非注入 (黒) 顎下腺からの、ピロカルピン 1mg の腹腔内投与による唾液分泌の経時変化。

(3) Stim1-mK01 と Venus-Orai1 の共局在分子間相互作用の解析のモデルとして、Stim1-mK01 と Venus-Orai1 を培養細胞 (COS-7) に発現させ、刺激によるこれらの分子動態をリアルタイムで観察した。これらの分子はストアの枯渇により凝集し、共局在を示した。

Venus-Orai1 を発現するアデノウイルスを作製し、Stim1-mK01 発現ウイルスと共に導入したところ、これらを共発現する顎下腺腺房細胞が観察された。このことから、複数の外来タンパク質を同時に発現させ、FRET による分子の相互作用の解析に応用できることが示された。

### (4) 顎下腺組織における in vivo $\text{Ca}^{2+}$ イメージング

同様の手法で、ラット顎下腺組織に  $\text{Ca}^{2+}$  バイオセンサー (G-GECO) を発現させ、in vivo で顎下腺における  $\text{Ca}^{2+}$  応答を観察した。アセチルコリンの腹腔内投与により、顎下腺組織の  $\text{Ca}^{2+}$  上昇が観察されたことから、世界で初めて in vivo における唾液腺の  $\text{Ca}^{2+}$  動態の解析に成功した (図 8)。また、 $\text{Ca}^{2+}$  応答と唾液分泌の同時測定にも成功した。今後は、 $\text{Ca}^{2+}$  応答と唾液分泌とのより詳細な解析、ならびに共焦点顕微鏡を用いた細胞内での詳細な  $\text{Ca}^{2+}$  動態の解析を行う予定である。

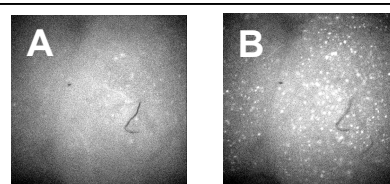


図 8 (A) 刺激前、(B) アセチルコリン腹腔内投与 10 分後の顎下腺における G-GECO の蛍光変化。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

① Tojyo Y, Morita T, Nezu A, Tanimura A.  
Staurosporine maintains the activation of store-operated  $Ca^{2+}$  entry even after the refilling of  $Ca^{2+}$  stores.  
Cell Calcium; in press (2013) 査読有  
doi:pii:S0143-4160(13)00048-1. 10.1016/j.ceca.2013.03.002.

② Morita T, Tanimura A, Shitara A,  
Suzuki Y, Nezu A, Takuma T, Tojyo Y.  
Expression of functional Stim1-mK01 in rat submandibular acinar cells by retrograde ductal injection of an adenoviral vector.  
Arch. Oral Biol.; 56 : 1356-1365 (2011)  
査読有  
doi:10.1016/j.archoralbio.2011.06.001

③ Tanimura A, Shitara A, Tojyo Y  
Diversity and spatio-temporal properties of calcium responses in salivary ducts.  
J Oral Biosci; 53 : 48-56(2011) 査読無

④ Tanimura A  
The development of FRET-based IP<sub>3</sub> biosensors and their use for monitoring IP<sub>3</sub> dynamics during  $Ca^{2+}$  oscillations and  $Ca^{2+}$  waves in non-excitabile cells.  
J Oral Biosci; 53 : 109-121(2011) 査読無

[学会発表] (計14件)

① 根津顕弘, 森田貴雄, 東城庸介, 谷村明彦  
唾液腺の  $Ca^{2+}$  応答と唾液分泌に対するピロカルピンの作用  
第86回日本薬理学会年会  
2013年3月21日~23日、福岡

② 根津顕弘, 森田貴雄, 東城庸介, 谷村明彦  
唾液腺の  $Ca^{2+}$  応答と唾液分泌に対するムスカリン受容体部分作動薬としてのピロカルピンの作用  
第57回日本唾液腺学会  
2012年12月1日、東京

③ 森田貴雄, 根津顕弘, 東城庸介, 谷村明彦  
ラット顎下腺腺房細胞への Stim1-mK01 発現による  $Ca^{2+}$  ストアおよび  $Ca^{2+}$  放出量の増大  
第54回歯科基礎医学会  
2012年9月14日~16日、郡山

④ 根津顕弘, 森田貴雄, 東城庸介, 谷村明彦  
唾液腺の  $Ca^{2+}$  応答と唾液分泌に対するムスカリン受容体パーシャルアゴニストとしてのピロカルピンの作用  
第54回歯科基礎医学会  
2012年9月14日~16日、郡山

⑤ 森田貴雄, 根津顕弘, 東城庸介, 谷村明彦  
アデノウイルスの導入により in vivo で発現させた Stim1 による  $Ca^{2+}$  応答と唾液分泌の増強  
第85回日本薬理学会年会  
2012年3月14日~16日、京都

⑥ 根津顕弘, 森田貴雄, 東城庸介, 谷村明彦  
細胞質発現型 IP<sub>3</sub> バイオセンサーの唾液腺腺房細胞への導入と IP<sub>3</sub> 動態の測定  
第85回日本薬理学会年会  
2012年3月14日~16日、京都

⑦ 森田貴雄, 根津顕弘, 東城庸介, 谷村明彦  
唾液腺腺房細胞への Stim1-mK01 の発現による  $Ca^{2+}$  応答および唾液分泌の増強  
第53回歯科基礎医学会学術大会  
2011年9月30日~10月2日、岐阜

⑧ 根津顕弘, 森田貴雄, 東城庸介, 谷村明彦  
IP<sub>3</sub> バイオセンサーのラット唾液腺腺房細胞への導入と IP<sub>3</sub> 動態の観察  
第53回歯科基礎医学会学術大会  
2011年9月30日~10月2日、岐阜

⑨ 森田貴雄, 根津顕弘, 東城庸介, 谷村明彦  
In vivo 遺伝子導入法による唾液腺への Stim1 の発現と  $Ca^{2+}$  応答および唾液分泌への影響  
第62回日本薬理学会北部会  
2011年9月30日、仙台

⑩ 東城庸介, 森田貴雄, 根津顕弘, 谷村明彦  
ラット顎下腺へのアデノウイルスの in vivo 注入による Stim-1-mK01 の発現  
第31回日本歯科薬物療法学会  
2011年6月24日~26日、千葉

⑪ 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> バイオセンサーの分離精製と耳下腺腺房細胞への導入  
第84回日本薬理学会年会  
2011年3月22日~24日、横浜

⑫ 森田貴雄, 東城庸介, 谷村明彦  
Expression of functional Stim1 in rat submandibular acinar cells by retrograde ductal injection of adenovirus.  
Gordon Research Conferences Salivary Glands & Exocrine Biology,

2011年2月5日～10日、Garveston, USA

⑬森田貴雄、谷村明彦、設楽彰子、根津顕弘、  
田隈泰信、東城庸介、  
唾液腺腺房細胞に発現させた Stim1-mKO1 に  
よる  $Ca^{2+}$  応答の増強  
第 52 回歯科基礎医学会学術大会  
2010年9月20日～22日、東京

⑭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10日、札幌

[産業財産権]

○取得状況 (計 1 件)

名称：細胞内IP3測定用分子センサー  
発明者：谷村明彦、東城庸介、根津顕弘、  
森田貴雄  
権利者：独立行政法人科学技術振興機構  
種類：特許第 4803976 号  
番号：P4803976  
取得年月日：平成23年10月26日  
国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.hoku-iryo-u.ac.jp/~d-yakuri/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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

### (2) 研究分担者

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

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

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：