

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592745

研究課題名(和文)唾液腺カルシウム応答の in vivo イメージングと唾液分泌の同時測定

研究課題名(英文)Real-time monitoring of Ca<sup>2+</sup> responses in rat submandibular glands and salivary secretions in living animals.

研究代表者

根津 顕弘 (NEZU, Akihiro)

北海道医療大学・歯学部・講師

研究者番号：00305913

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、生きた動物において、唾液腺のCa<sup>2+</sup>応答はどのように変化し、唾液分泌に関わるのかを明らかにすることを目的とした。

ラットの顎下腺に蛍光Ca<sup>2+</sup>センサーを導入し、唾液分泌刺激薬を投与すると腺全体に細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度上昇が観察され、Ca<sup>2+</sup>応答の時間・空間的变化は薬物ごとに異なることが明らかになった。薬物によるCa<sup>2+</sup>応答と唾液分泌を同時測定すると、低濃度ではCa<sup>2+</sup>応答より遅れて分泌が起こり、Ca<sup>2+</sup>応答と分泌に時間差があることが明らかになった。またCa<sup>2+</sup>流入を増強させる分子の強制発現は、受容体刺激によるCa<sup>2+</sup>応答を増強させることから、分泌機能改善に有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To investigate the relationships between Ca<sup>2+</sup> responses and salivary secretion in living animals, we measured Ca<sup>2+</sup> responses in the rat submandibular gland (SMG) and salivary secretion from the SMG in real-time. First, we measured sialogogue-induced Ca<sup>2+</sup> responses and salivary secretions. Administration of various agonist induced increase in intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) throughout the Ca<sup>2+</sup> sensor-expressed SMG. In addition, acetylcholine frequently shows Ca<sup>2+</sup> oscillations in whole gland. We found that there is the difference among the agonist-induced spatio-temporal changes in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in living animals. When salivary secretions were measured with Ca<sup>2+</sup> responses using the micro pressure sensor, secretions occurred with a delay from the increase in the [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. The expression of Stim1, which is essential for the activation of Ca<sup>2+</sup> entry, increased agonist-induced Ca<sup>2+</sup> responses in SMG cells, therefore it may be a suitable gene therapy strategy for dry mouth in the future.

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 カルシウム応答 唾液分泌 in vivo イメージング

## 1. 研究開始当初の背景

唾液腺は、腺房細胞と唾液の輸送路となる導管細胞から構成される。腺房細胞では、イオンチャネルや共輸送体の働きにより電解質と水が分泌される。この電解質と水分は、主にムスカリン受容体を介したイノシトール三リン酸 ( $IP_3$ ) 依存性の  $Ca^{2+}$  応答によって調節される。

これまでに、唾液腺細胞の  $Ca^{2+}$  応答は、受容体刺激により腺腔側から上昇した  $[Ca^{2+}]_i$  が基底膜へと伝播する  $Ca^{2+}$  ウェーブや、腺腔側で  $[Ca^{2+}]_i$  が規則正しく上昇と下降を繰り返す  $Ca^{2+}$  オシレーションといった特徴的な  $Ca^{2+}$  応答を起こすことや、導管に自発的な  $Ca^{2+}$  オシレーションを起こす細胞が存在することが明らかにされてきた。

また、腺房細胞では  $IP_3$  産生を介した  $[Ca^{2+}]_i$  上昇が cAMP 系の作用により増強されることや、腺房と導管細胞では、アゴニストに対する感受性が大きく異なり、導管細胞に、腺房細胞にはない cAMP 産生系を介した  $Ca^{2+}$  放出経路が存在することが明らかになっている。

これらの  $Ca^{2+}$  応答の時間・空間的变化や細胞内情報伝達機構は生体内の唾液腺で起こるのか？また、唾液腺の  $Ca^{2+}$  応答は唾液分泌にどのような影響を与えるのか？これらを実際に調べた研究は現在行われていない。さらに、アゴニストによる  $[Ca^{2+}]_i$  上昇の大きさと唾液分泌量が必ずしも一致しない場合がある。この矛盾がどのような機序により起こるのか調べるには、単離細胞の実験では限界があった。

近年、イメージング技術の進歩により、生きた動物の組織内の  $Ca^{2+}$  応答の可視化が可能となり、脳内の神経細胞における  $Ca^{2+}$  応答の *in vivo* イメージングが行われるようになった。この技術を唾液腺組織へ応用により生きた動物で唾液腺の  $Ca^{2+}$  応答の解析が可能になるのではないかと考え、本研究を立案した。

## 2. 研究の目的

本研究は、生きた動物において、唾液腺の  $Ca^{2+}$  応答はどのように変化し、唾液分泌に関わっているのかを明らかにすることを目的とし、以下の実験を行った。

(1) ラット顎下腺開口部から逆行性に  $Ca^{2+}$  蛍光センサーを導入し、アゴニストの投与による顎下腺の細胞内  $Ca^{2+}$  濃度 ( $[Ca^{2+}]_i$ ) 変化の *in vivo* イメージングを行う。顎下腺開口部にカニューレを挿入し、アゴニストによる唾液分泌量変化を  $Ca^{2+}$  イメージングと同時に測定する。

(2)  $Ca^{2+}$  応答に関与するタンパク質を過剰発現あるいはノックダウンさせ、それが  $Ca^{2+}$  応答と唾液分泌に与える影響を解析する。

## 3. 研究の方法

### (1) ラット顎下腺における $Ca^{2+}$ 応答の *in vivo* イメージング

麻酔したラットの顎下腺開口部にカニューレを挿入し、 $Ca^{2+}$  蛍光指示薬の fura-2/AM あるいは超高感度  $Ca^{2+}$  蛍光バイオセンサー (YC-Nano50) 発現アデノウイルスベクターを逆行性に注入した。顎下腺の  $Ca^{2+}$  応答は、正立顕微鏡に取り付けた高感度 3CCD カメラ付きイメージングシステム (AQUACOSMOS) を用いて fura-2 あるいは YC-Nano50 の蛍光強度変化を測定した。測定はマクロズームレンズ (x1) を使い、顎下腺全体の  $Ca^{2+}$  応答を可視化した。薬物は、腹腔内投与あるいは大腿静脈に挿入したカニューレより持続的に注入した。

分泌刺激薬による顎下腺  $Ca^{2+}$  応答の *in vivo* イメージング: ムスカリン受容体やアドレナリン受容体などのアゴニストを腹腔内あるいは静脈内に投与し、その  $Ca^{2+}$  応答をイメージングした。

各種拮抗薬、阻害薬の顎下腺  $Ca^{2+}$  応答に対する影響: 受容体拮抗薬、神経節遮断薬および酵素阻害薬を前処理した後、薬物による顎下腺の  $Ca^{2+}$  の応答をイメージングした。

### (2) ラット顎下腺における唾液分泌のリアルタイムモニタ

麻酔したラットの顎下腺開口部に挿入したカニューレに測定用の微小圧力センサーを設置し、変化する圧力を測定した。この手法により、 $Ca^{2+}$  応答で用いた分泌刺激薬や、その作用に対する受容体拮抗薬や阻害薬の影響を検討した。

### (3) 顎下腺の $Ca^{2+}$ 応答あるいは唾液分泌に関与するタンパク質の同定とその機能解析

$Ca^{2+}$  応答に関与するタンパク質 (受容体、細胞内センサー分子、チャネル、酵素など) を強制発現するアデノウイルスベクターを作製し、顎下腺に導入する。標的タンパク質の強制発現が唾液腺細胞の  $Ca^{2+}$  応答にどのような影響を与えるのかを、単離細胞を用いて検討した。

蛍光タンパク質発現ウイルスベクターの作成と標的遺伝子の顎下腺細胞への導入: GFP などの蛍光タンパク質標識分子の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。

標的タンパク質の強制発現した単離細胞の  $Ca^{2+}$  応答の解析：倒立顕微鏡に取り付けた高感度 CCD カメラ付きイメージングシステム (ARUGS HiSCA) を用いて fura-2 の蛍光強度変化を測定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) ラット顎下腺における $Ca^{2+}$ 応答の *in vivo* イメージング

ラット顎下腺に有機系  $Ca^{2+}$  センサー、fura-2 を導入し、アセチルコリン (ACh) による  $Ca^{2+}$  応答の測定に成功した。しかし fura-2 は細胞外への漏出や細胞内小器官への再分布を起こし、長時間の実験には使用できなかった。

そこで、蛍光タンパク質を利用した YC-Nano50 ( $Ca^{2+}$  に対する親和性:  $K_d=50$  nM) を用いて実験を行った。YC-Nano50 発現ベクターを顎下腺に逆行性に注入すると顎下腺で蛍光が観察され、舌下腺には蛍光は観察されなかった。YC-Nano50 は主に腺房細胞に発現していた。YC-Nano50 を顎下腺に導入したラットの腹腔内にベタネコール (Bet) を投与すると大きな YC-Nano50 の蛍光比 (Ratio) 上昇が観察され、この反応は 30 分以上持続した (図 1)。

また唾液腺細胞に小さな  $Ca^{2+}$  応答を起こすピロカルピン (Pilo) の投与でも小さな  $[Ca^{2+}]_i$  を検出できた。YC-Nano50 を用いることで、低濃度の  $[Ca^{2+}]_i$  変化の検出と長時間測定が可能となった。

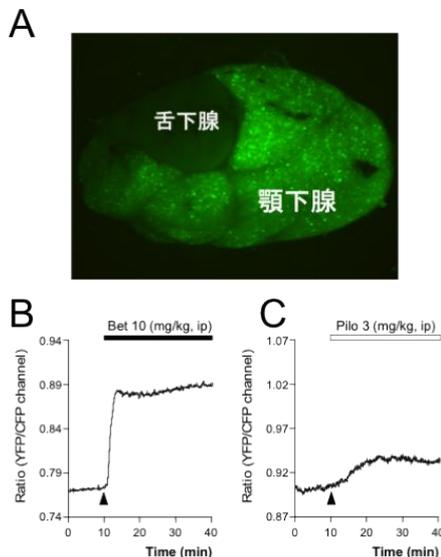


図 1) 蛍光  $Ca^{2+}$  センサー (YC-Nano50) を用いた顎下腺  $Ca^{2+}$  応答の測定。

A: 顎下腺細胞に発現した YC-Nano50。B および C: YC-Nano50 を用いた顎下腺の  $Ratio([Ca^{2+}]_i)$  変化。Bet (10 mg/kg) と Pilo (3 mg/kg) を腹腔内に投与した。

この方法を用いて、薬物の静脈内投与による顎下腺の  $Ca^{2+}$  応答のイメージングを行った。ACh を静脈内に投与すると顎下腺全体に大きな  $[Ca^{2+}]_i$  上昇が観察された。ACh では顎下腺で同期した  $Ca^{2+}$  オシレーションがしばしば観察された (図 2)。この  $Ca^{2+}$  応答は投与速度に依存して上昇し、投与を止めると速やかに安静時レベルまで低下した。またアドレナリン (AD)、サブスタンス P (SP) およびイソプレナリン (ISO) を静脈内に投与すると ISO を除いた全ての薬物で腺全体に  $Ca^{2+}$  応答が観察された。AD や SP では  $Ca^{2+}$  オシレーションは観察されず、これらの結果は、顎下腺の  $Ca^{2+}$  応答の時間・空間的变化が薬物によって異なることを示す初めての成果である。

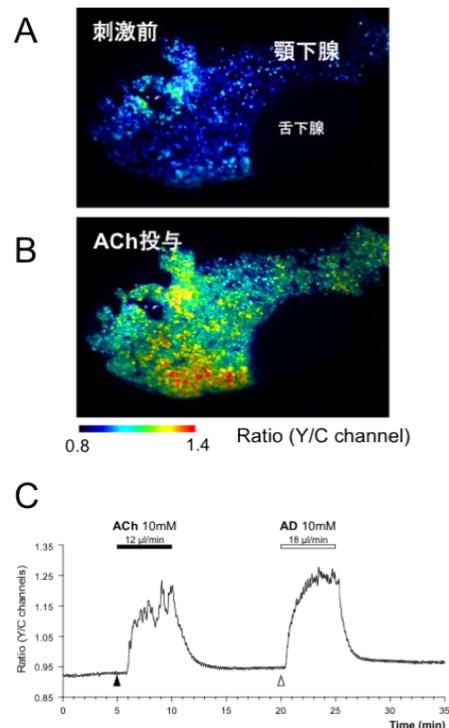


図 2) 蛍光  $Ca^{2+}$  センサー YC-Nano50 を用いた顎下腺  $Ca^{2+}$  応答の *in vivo* イメージング。

A および B: ラットの顎下腺に YC-Nano50 を発現させ、この動物に ACh (10 mM) を  $12 \mu\text{l}/\text{分}$  の速度で持続注入した時の  $Ca^{2+}$  応答。(A) 刺激前、(B) ACh 投与後の Ratio 画像を示す。C: YC-Nano50 の発現した顎下腺における ACh と AD による  $Ca^{2+}$  応答の時間変化。ACh (10 mM,  $12 \mu\text{l}/\text{分}$ ) と AD (10 mM,  $18 \mu\text{l}/\text{分}$ ) の速度で静脈内に持続投与した。

## (2) ラット顎下腺における唾液分泌のリアルタイムモニタ

ACh による  $Ca^{2+}$  応答と唾液分泌との関係を明らかにするため、顎下腺の  $Ca^{2+}$  応答と唾液分泌の同時測定を行った。

FISO 微小圧力センサーは、カニューレ内の流速を圧力として感知し、最低感度が 50 nl/秒の微量な変化を捉えることが可能で、これを応用して顎下腺からの分泌量変化を開口部に挿入したカニューレ内で測定した。

ACh の静脈内投与により、投与速度に依存して唾液分泌速度は増大し、最大の  $[Ca^{2+}]_i$  上昇を起こす濃度で約 600 nl/秒の分泌速度に達した。興味深いことに、低濃度刺激のとき  $Ca^{2+}$  応答に続いて分泌が起こり、これらの反応に時間差があることが明らかになった (図 3)。この時間差は薬物投与速度の増大とともに消失した。

また ACh の  $Ca^{2+}$  応答と唾液分泌は抗コリン薬のアトロピンで抑制され、神経節遮断薬のヘキサメトニウムでは抑制されなかった。

これらの結果は、顎下腺において ACh による  $Ca^{2+}$  応答と唾液分泌には、神経節の興奮は大きくないこと、また  $Ca^{2+}$  応答と分泌には、その後のイオン濃度変動が関わっている可能性が示唆された。これは  $Ca^{2+}$  応答と分泌同時に測定することで初めて得られた知見である。

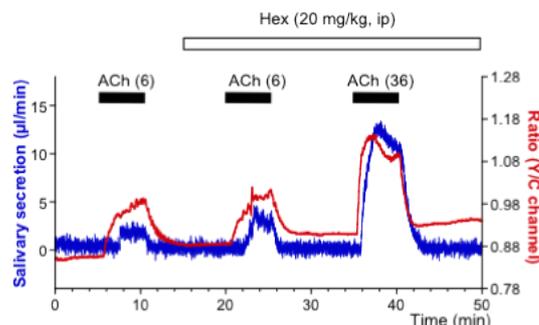


図 3) 顎下腺  $Ca^{2+}$  応答 と唾液分泌の同時測定変化。ACh (10 mM, 投与速度 6 および 36  $\mu$ l/分) 刺激による  $Ca^{2+}$  応答 (赤線) と唾液分泌速度変化 (青線)。ヘキサメトニウム (20 mg/kg) は腹腔内に投与した。

## (3) 顎下腺の $Ca^{2+}$ 応答あるいは唾液分泌に関与するタンパク質の機能解析

$Ca^{2+}$  流入に関与する Stim1 を顎下腺腺房細胞に強制発現させたときの、受容体刺激による  $Ca^{2+}$  応答に対する影響を調べた。

Stim1 発現ベクターを顎下腺に逆行性に注入し、この分子を強制発現させた。この顎下腺を酵素処理し単離腺房細胞を調製し、その

$Ca^{2+}$  応答をイメージングで解析した。Stim1 の強制発現した細胞をカルバコール (CCh) で刺激すると、細胞内ストアからの  $Ca^{2+}$  放出は、Stim1 の発現していない細胞と比べ有意に高く、さらに  $Ca^{2+}$  流入は約 1.7 倍高かった (図 4)。この結果は Stim1 分子の強制発現により、受容体刺激を介した  $Ca^{2+}$  応答が増強されたことを示し、この分子を強制発現させることで腺房細胞からの分泌を増大することが出来ることを示唆している。このような分子の発現量を調節することで口腔乾燥症状の改善の新しい治療法へ利用が期待された。

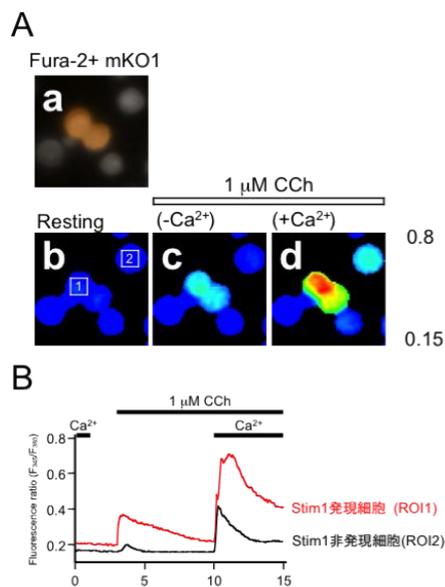


図 4) Stim1 を強制発現させた細胞と非発現細胞における受容体刺激を介した  $Ca^{2+}$  応答の比較

A: Stim1 発現ベクターを注入した顎下腺から酵素処理により単離した細胞に fura-2 を取り込ませ CCh 刺激したときの  $Ca^{2+}$  応答のイメージング。(a) Stim1 発現細胞 (赤) を示す。

B: CCh による Stim1 発現細胞 (赤)、非発現細胞 (黒) の  $Ca^{2+}$  応答の経時変化。

## (4) まとめ

本研究では、 $Ca^{2+}$  応答と唾液分泌との関係を解析するため生きた動物の唾液腺、顎下腺における  $[Ca^{2+}]_i$  変化と分泌の同時測定法を確立し、検討を行った。

その結果、顎下腺の  $Ca^{2+}$  応答は分泌刺激薬によって異なった時間・空間的变化を起こすことを初めて明らかにした。ACh による  $Ca^{2+}$  応答と分泌の同時測定により、低濃度刺激では、 $Ca^{2+}$  応答に遅れて分泌が起こることが明らかとなった。さらに ACh では、 $Ca^{2+}$  応

答と分泌に神経節の興奮の関与は少ない可能性が示唆された。Ca<sup>2+</sup>応答を増強させる分子は、強制発現させることで細胞レベルでのCa<sup>2+</sup>応答を有意に増強した。

YC-Nano50 を用いた顎下腺 Ca<sup>2+</sup>応答の生体イメージングは、分泌とCa<sup>2+</sup>応答との関係を知る極めて有効なツールであり、今後、この手法を用いた方法で臓器レベルから細胞レベルへ移行することで、唾液分泌機構に関して、これまでの結果を生体での応答として確かめるだけでなく、今まで予想できなかった新たな発見につながることを期待される。

また、Ca<sup>2+</sup>応答に関与する分子の強制発現やノックダウン手法は、口腔乾燥症状の改善に有効な新しい治療法として期待される。さらに本研究で確立した生体イメージング法は、治療に用いられる分子のスクリーニングに使用できるものと考え、さらに検討を加える予定である。

## 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5件)

Morita T, Nezu A, Tojyo Y, Tanimura A. Increase in muscarinic stimulation-induced Ca<sup>2+</sup> response by adenovirus-mediated Stim1-mK01 gene transfer to rat submandibular acinar cells in vivo. *Biochemical and Biophysical research Communications*, (査読有) 439, 2013, 433-437

Tanimura A, Mochizuki T, Morita T, Nezu A, Tojyo Y, Arisawa M, Shuto S. A fluorescence-based method for evaluating inositol 1,4,5-trisphosphate receptor ligands: determination of subtype selectivity and partial agonist effects. *Journal of Biotechnology*, (査読有) 167, 2013, 248-254

谷村明彦、根津顕弘、森田貴雄、生体内の分子を観るバイオイメージング技術 経口タンパク質を使ったライブイメージング法、*日本薬理学会誌(実験技術)*、141、2013、262-267

Tojyo Y, Morita T, Nezu A, Tanimura A. Staurosporine maintains the activation of store-operated Ca<sup>2+</sup> entry even after the refilling of Ca<sup>2+</sup> stores. *Cell Calcium*, (査読有) 53, 2013, 349-356

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. *Archives of Oral Biology*, (査読有) 56(11), 2011, 1356-1365

[学会発表](計20件)

根津顕弘、森田貴雄、東城庸介、永井健治、谷村明彦、Intravital イメージングを用いた顎下腺のCa<sup>2+</sup>応答と唾液分泌のリアルタイムモニタリング、第87回日本薬理学会年会 2014年3月19日~21日、仙台市

東城庸介、森田貴雄、根津顕弘、谷村明彦 スタウロスポリンはCa<sup>2+</sup>ストアの再充填後もストア作動性Ca<sup>2+</sup>流入を持続させる。第87回日本薬理学会年会、2014年3月19日~21日、仙台市

根津顕弘、森田貴雄、東城庸介、永井健治、谷村明彦、Intravital イメージングを用いた顎下腺のCa<sup>2+</sup>応答と唾液分泌の同時解析 第58回日本唾液腺学会、2013年12月14日、文京区、東京

根津顕弘、森田貴雄、谷村明彦、唾液分泌シグナル応答のintravital イメージングと分泌制御機構の解析、第55回歯科基礎医学会学術大会、学術シンポジウム、2013年9月20日~9月22日、岡山市

谷村明彦、根津顕弘、森田貴雄、ウイルスベクターを使った唾液腺へ遺伝子導入とイメージング解析への応用、第55回歯科基礎医学会学術大会、サテライトシンポジウム、2013年9月20日~9月22日、岡山市

根津顕弘、森田貴雄、東城庸介、永井健治、谷村明彦、*In vivo* 実験系を用いたピロカルピンによる唾液腺細胞のCa<sup>2+</sup>応答と唾液分泌機構の解析、第64回日本薬理学会北部会 2013年9月13日、旭川市

谷村明彦、根津顕弘、森田貴雄、東城庸介、ラット顎下腺細胞のCa<sup>2+</sup>応答と唾液分泌に対するピロカルピンの部分作動薬作用 第33回日本歯科薬物療法学会、2013年6月15日~16日、文京区、東京

根津顕弘、森田貴雄、東城庸介、谷村明彦、唾液腺のCa<sup>2+</sup>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、福岡市

根津顕弘、森田貴雄、東城庸介、谷村明彦、口腔乾燥症状改善薬ピロカルピンによる唾液腺のCa<sup>2+</sup>応答と唾液分泌、第31回北海道医療大学歯学会、2013年3月9日、札幌市

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、文京区、東京

谷村明彦、大浦泰、村田佳織、森田貴雄、根津顕弘、周東智、新規蛍光アデノフォスチン誘導体の  $IP_3$  センサー LIBRA への作用と  $IP_3$  測定法への応用、第 63 回日本薬理学会北部会、2012 年 9 月 14 日、新潟市

村田佳織、森田貴雄、根津顕弘、齊藤正人、谷村明彦、 $IP_3$  受容体蛍光リガンドを用いた新しい蛍光センサーの開発;  $IP_3$  受容体蛍光リガンドとリガンド結合ドメインの結合による蛍光変化、第 54 回歯科基礎医学会学術大会・総会、2012 年 09 月 14 日～16 日、郡山市

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 回歯科基礎医学会学術大会・総会、2012 年 09 月 14 日～16 日、郡山市

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 回歯科基礎医学会学術大会・総会、2012 年 9 月 14 日～16 日、郡山市

根津顕弘、森田貴雄、東城庸介、谷村明彦、細胞質発現型  $IP_3$  バイオセンサーの唾液腺腺房細胞への導入と  $IP_3$  動態の測定、第 85 回日本薬理学会年会、2012 年 3 月 14 日、京都市

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、京都市

根津顕弘、森田貴雄、東城庸介、谷村明彦、 $IP_3$  バイオセンサーのラット唾液腺腺房細胞への導入と  $IP_3$  動態の観察、第 53 回歯科基礎医学会学術大会・総会、2011 年 10 月 1 日、岐阜市

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・総会、2011 年 10 月 1 日、岐阜市

東城庸介、森田貴雄、根津顕弘、谷村明彦、スタウロスポリンによるストア作動性  $Ca^{2+}$  流入の持続効果、第 62 回日本薬理学会北部会、2011 年 9 月 30 日、仙台市

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、仙台市

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

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

### (2) 研究分担者

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

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