

令和 2 年 11 月 30 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11484

研究課題名(和文) 唾液腺Ca²⁺応答の低侵襲的長期間イメージング技術の確立と機能・再生研究研究課題名(英文) Development of low invasive long-term imaging technique for studying salivary gland Ca²⁺ response and functional regeneration

研究代表者

谷村 明彦 (Tanimura, Akihiko)

北海道医療大学・歯学部・教授

研究者番号：70217149

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、唾液腺細胞にCa²⁺センサー遺伝子を発現させたラットを使ったin vivo Ca²⁺イメージング解析技術を低侵襲的で長期間の解析ができる実験系に発展させることを目的とする。発現ベクターとしてアデノ随伴ウイルス・ベクター(AAV)およびレンチウイルス・ベクター(LV)を使って、YC-Nano50, G-GECO, GCaMPなどのCa²⁺センサー遺伝子を唾液腺に導入し、1ヶ月以上の長期発現に成功した。また低侵襲的イメージング用の光ファイバー・システムを用い、GCaMPを発現させたラット唾液腺におけるCa²⁺ waveのin vivo Ca²⁺イメージング観察に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

In vivo Ca²⁺イメージング技術に、微小圧力センサーを使ったリアルタイム唾液分泌測定法や、レーザースペックル血流計を使った血流イメージング法を組み合わせる事によって、アセチルコリン刺激による唾液分泌における唾液腺腺房細胞のCa²⁺応答と血流の関係を解析することが可能になった。光ファイバー・システムを導入することによって、神経刺激や感覚刺激などの生理的な刺激による唾液分泌とCa²⁺応答の解析が可能になると期待される。また長期期間のストレスや薬物投与による唾液分泌障害や、唾液腺の再生や機能回復に伴うCa²⁺応答の変化の解析には、長期間のCa²⁺イメージング観察が有用になると期待される。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is the development of low invasive and long term methods for in vivo Ca²⁺ imaging studies using genetically encoded Ca²⁺ indicators (GECI) in rat salivary glands. We used adeno associated virus and lentivirus for the long term expressions of GECI, such as YC-Nano50, G-GECO, GCaMP, and succeeded in expression of these molecules more than one month. We also used fiber imaging systems for low invasive imaging, and succeeded in the observation of Ca²⁺ wave in GCaMP-expressing salivary acinar cells in in vivo Ca²⁺ imaging.

研究分野：薬理学

キーワード：唾液腺 in vivo 蛍光 カルシウム 遺伝子 ウイルス

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

唾液腺の水・電解質分泌は細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇によるイオンチャネルの活性化がトリガーとなることから、腺房細胞の Ca^{2+} シグナルが精力的に調べられてきた。特に我々は、蛍光色素を使ったライブイメージング解析によって、腺房細胞の腺腔側で起こる Ca^{2+} オシレーションや腺腔側から全体へ広がる Ca^{2+} ウェーブと言った反応を明らかにしてきた。

これまで我々が行ってきた細胞レベルのライブイメージングを個体レベルの解析に発展させるために、顎下腺開口部からのアデノウイルスベクター注入によって、生きたラットの顎下腺腺房細胞に遺伝子を発現させる方法を確立した。さらに、この遺伝子導入法を用いて、ラット顎下腺腺房細胞に Ca^{2+} センサー（YC-Nano 50）遺伝子を発現させ、生きたラットにおいて、唾液腺 Ca^{2+} シグナルを可視化する『in vivo Ca^{2+} イメージング』を初めて成功させた。

この in vivo Ca^{2+} イメージングと微小圧力センサーを使って唾液腺分泌のリアルタイム計測、及びレーザースペックル血流計を使ったイメージング解析によって、唾液分泌過程における唾液腺の Ca^{2+} 応答と血流の直接的解析が可能になった。

これらの技術を使った研究において、唾液腺組織全体で同調した Ca^{2+} オシレーションと言う従来技術では予想し得なかった現象が捉えられている。このオシレーションの発生にはアンジオテンシン II 受容体やトロンボキサン A2 受容体を介する血管収縮が関与することが示唆されており、個体レベルの唾液分泌の調節における自律神経系以外の生理活性物質の重要性が明らかになりつつあった。

2. 研究の目的

In vivo Ca^{2+} イメージング解析は、唾液腺の生理機能の解析のみならず、唾液腺の病態や機能再生の研究を大きく進展させる結果をもたらすことが期待される。それを実現するために、低侵襲的で長期間の in vivo Ca^{2+} 解析ができる実験系の確立を本研究の第1の目的である。アデノウイルスによる一過性の遺伝子発現を使った現在の方法で解析ができるのは約5日間である。1ヶ月以上の長い時間経過で進行する病態や再生の過程の解析には、持続的な遺伝子発現が必要である。本研究では、長期間の遺伝子発現を実現するために、アデノ随伴ウイルスやレンチウイルスを使ったイメージング法を確立する。さらに皮膚の透明化やファイバー型のイメージングシステムを使った低侵襲的イメージング法の確立を目的とする。

本研究の第2の目的は、上記の方法をつかって唾液腺の機能亢進の実現に必要な基礎データを蓄積することである。我々が発見した唾液腺の腺房レベルで同調する Ca^{2+} オシレーションを指標にして、唾液腺の代償性肥大やムスカリン受容体作動薬を利用して唾液腺機能を高めることができる可能性を見出している。本研究では、これらの知見を唾液腺の機能再生に発展させるための基盤を構築する。

3. 研究の方法

1) Ca^{2+} シグナルのイメージング解析： Ca^{2+} センサー（YC-Nano50、G-GECO、R-GECO）遺伝子をアデノ随伴ウイルス・ベクター（AAV）およびレンチウイルス・ベクター（LVV）に挿入し、 Ca^{2+} センサー発現ウイルスを作製した。同様にして、G-GECO、R-GECO、GCaMP を発現するウイルスベクターを作成した。これらのウイルスを使って、唾液腺由来培養細胞株（HSY-EA1 細胞株）に Ca^{2+} センサーを発現させ、その作用を比較した。さらにこれらのウイルスベクターの唾液腺の導管からの注入あるいは注射による直接投与によって、ラット顎下腺あるいはラット耳下腺に Ca^{2+} センサー遺伝子を発現させ実験に用いた。

2) 血流のイメージング解析：レーザースペックル血流計は、血管を流れる赤血球の動きから血流のイメージング解析する技術である。この技術を使って、 Ca^{2+} と血流に加えて、微小圧力計をつかった唾液分泌の同時解析を行った。

3) 自家蛍光イメージングによる形態解析：自家蛍光は細胞に多く含まれるフラビンなどの色素に由来する蛍光であり、通常蛍光イメージングではノイズとして、蛍光タンパク質のイメージングの質を低下させる要因となる。しかし、無染色で組織を可視化出来ると言う利点を生かすことによって、様々な組織の可視化が可能になる。本研究では、共焦点レーザー顕微鏡を使った自家蛍光のイメージングによるノンラベル・イメージング法を確立した。

4) 組織透明化法は、切片を作らずに組織の3次元構造解析ができる技術として注目されている。この組織透では、組織をホルマリン等で固定する必要があるため、ライブイメージングへの利用は行われてこなかった。我々は、加熱や超音波処理を使って、通常は1日以上を要する透明化の

時間を5分程度に短縮する「超高速透明化法」を開発した。さらにこの方法を使って、皮膚を透明化することに成功した。これによって、生きた動物の皮膚の透明化による低侵襲性イメージングの技術的基盤が確立した。

5) 唾液腺機能亢進のしくみを明らかにするために、導管結紮をした反対側の顎下腺や、ピロカルピンを投与下ラットから摘出した唾液腺から mRNA を抽出し、合成した cDNA を使って次世代シーケンサーを使った網羅的遺伝子発現解析を行った。さらにその結果に基づいて RT-PCR や定量 PCR によって、唾液腺機能亢進に関与する遺伝子を同定した。またこれらの組織を使って、細胞増殖マーカーである PCNA の免疫染色による解析を行った。

4. 研究成果

本研究の目的は、アデノウイルスを使った遺伝子導入による *in vivo* Ca²⁺ イメージングを発展させて唾液腺の Ca²⁺ 応答を長期間観察できる低侵襲的な *in vivo* 解析法を確立することである。口腔乾燥症の進行、薬物治療による唾液腺機能の回復、代償性肥大などによる唾液腺の機能亢進など1ヶ月以上の長い時間経過で進行する病態や再生の過程の解析には、持続的な遺伝子発現が必要である。また唾液腺由来の細胞に遺伝子を導入した機能的な細胞株は、再生研究などの有用なツールとなる。さらに侵襲性が低い *in vivo* イメージング技術によって、意識レベルが保たれた状態を必要とする味覚などの口腔感覚による生理的な唾液分泌の調節機構の解析が可能になる。本研究は、このような研究に必要な技術的基盤の確立を行った。

1) ウイルスベクターを使った長期イメージング法の開発

長期間イメージングを実現するために、Ca²⁺センサー (YC-Nano50) 遺伝子をアデノ随伴ウイルス・ベクター (AAV) およびレンチウイルス・ベクター (LVV) に挿入して Ca²⁺センサー発現ウイルス (AAV5-YC-Nano50 と AAVDJ-YC-Nano50) を作製した。同様にして、G-GECO, R-GECO, GCaMP を発現するウイルスベクターを作成した。AAV5-YC-Nano50 と AAVDJ-YC-Nano50 を HSY 細胞に感染させて発現効率を比較すると、AAV5 と比較して AAVDJ の方が2倍から7倍の高い発現を示した。また、その発現量は3日で最大になり、5日目から減少した。AAVDJ-YCnano50 をこれらの細胞に感染させ多細胞から恒常発現細胞を作製したところ、低濃度の ATP 刺激でカルシウム・オシレーション反応が起こることが確認された。同様にして LVV に YC-Nano50, G-GECO, R-GECO などの Ca²⁺センサー遺伝子を挿入したウイルスベクターを作製した。LVV による YC-Nano50 の発現は、3日頃に最大となりそのまま高い蛍光強度が維持され、は1ヶ月以上経代しても維持された。

AAVDJ-YC-Nano50 および LVV に YC-Nano50 を使って、ラット顎下腺への YC-Nano50 の発現を試みた。LVV に YC-Nano50 を逆行性に注入した顎下腺において蛍光タンパク質の発現が観察された。その蛍光は遺伝子導入後3ヶ月を経過したラットでも認められ、アセチルコリン刺激による蛍光比の変化も確認された。これらのことから、LVV-YC-Nano50 を使って Ca²⁺センサー遺伝子を持続的に発現させる事ができることが明らかになった。

ウイルスベクターを使った遺伝子導入によって、Ca²⁺センサーなどを長期発現する唾液腺細胞株を作成することが可能である。しかし、ガン化していない正常細胞の場合は、長期間の培養によって分裂能が消失することが知られている。それを回避して、蛍光タンパク質を安定発現する唾液腺細胞を作成するために、ヒトテロメラーゼ (hTER) 遺伝子を用いて細胞を不死化する方法を確立した。この技術を使用することによって、唾液腺由来の幹細胞等を用いた再生研究が可能になると期待される。

2) 低侵襲的 *in vivo* イメージングシステムを使ったイメージング解析

分離した唾液腺腺房細胞では、腺腔側から基底側に広がる Ca²⁺ ウェーブが起こることが知られている。またアデノウイルスベクターを使ったラットの顎下腺腺房細胞の *in vivo* Ca²⁺ イメージングでは、唾液腺の組織レベルで同調する Ca²⁺ オシレーションが発生することに加えて、Ca²⁺ オシレーションが波の様に広がる Ca²⁺ ウェーブが起こることが明らかになった。このような唾液腺細胞の Ca²⁺ 動態を *in vivo* で解析すること、および味覚刺激、舌や口腔内の機械的刺激等による唾液腺の Ca²⁺ 応答を解析するために、3種類の光ファイバーを使ったイメージング装置を比較して光ファイバーを使った低侵襲的 *in vivo* イメージングシステムの確立を試みた。

その中で、Cellvisio と doric を使った実験では、GCaMP を発現させたラット唾液腺において ACh による蛍光強度の変化を解析した。特に Cellvisio を使った実験では、*in vivo* Ca²⁺ イメージングで初めて Ca²⁺ ウェーブの観察に成功した。一方、これらの装置では FRET 解析ができないため、高感度 Ca²⁺

センサー (YC-Nano50) を使うことができなかった。そこで蛍光顕微鏡とファイバースコープを組み合わせた装置を試作した。この装置では、唾液腺に発現させたYC-Nano50蛍光の検出が可能であったが、ノイズレベルを下げて信頼性を高める必要性が明らかになった。YC-Nano50を使ったファイバー・イメージングには、より太い光ファイバーを使用が必要と考えられた。

3) 超高速透明化法を使った生体ウインドウ技術の開発

我々はLUCIDと言う透明化試薬を使った骨の透明化法を開発した。さらにLUCID中の組織を100°C、5分間の熱処理あるいは5分間の超音波処理で透明化できることを明らかにした。さらにCUBICを使用することによって肝臓や腎臓などの色素を含む組織や、血液を含む組織をより効果的に透明化することに成功した。さらにこの方法を使って皮膚の一部を透明化し、皮下の組織を可視化出来るSkin Windowを形成する技術を開発した。

4) 自家蛍光を使ったラベルフリー・イメージング

共焦点レーザー顕微鏡あるいは2光子レーザー顕微鏡の強い励起光で得られる自家蛍光イメージの積算によって、無染色の組織を細胞レベルで明瞭に可視化する技術を開発した。この方法を使って、蛍光タンパク質を発現させることなくイメージング解析が可能になった。特に、この方法では励起光がヘモグロビンで吸収されるため、黒くぬけた管として血管を可視化することが可能である。唾液腺開口部からのアデノウイルスの逆行的注入では、約20%の腺房細胞に蛍光タンパク質を発現させることができるが、導管やそれ以外の結合組織への遺伝子導入効率が低いため組織構造の解析には適していない。自家蛍光を使ったラベルフリー・イメージングは、この問題を解決する手段として有用である

5) 顎下腺の導管結紮・再解放による唾液腺の再生に伴う機能変化の解析

唾液腺の再生に関する研究は、分泌機能を失った唾液腺の機能回復において重要な研究と位置付けられる。片側の顎下腺導管を結紮すると、結紮側の唾液腺が萎縮すると同時に、反対側の唾液腺が代償的に肥大することが知られている。また結紮した導管を再解放すると、萎縮した唾液腺が再肥大して機能を回復する。この唾液腺導管の結紮・再解放実験は、実際に何らかの理由で機能不全に陥った唾液腺の理量に有用な知見が得られる可能性がある。この過程で再生する唾液腺腺房細胞の起源として導管細胞や筋上皮細胞が考えられているが、未だに明らかにされていない。

我々は顎下腺の導管結紮によって反対側唾液腺の機能亢進が起こる事を明らかにした。興味深い事に、*in vivo* Ca²⁺イメージングを使った解析から、この機能亢進は反対側唾液腺の肥大ではなく、アセチルコリンに対する感受性の増大であることが明らかになった。また、この機能更新ではアセチルコリンによるCa²⁺オシレーションが、持続的Ca²⁺上昇に変化するというCa²⁺応答の質的变化を伴っていることが明らかになっている。将来的に、この機能亢進のメカニズムが解明され、人為的なコントロールが可能になれば、口腔乾燥症の治療法に直結する技術に発展する可能性がある。我々は、次世代シーケンサーを使った網羅的遺伝子解析と定量PCR解析によって、この過程で変化する遺伝子を同定した。

その結果、代償性機能亢進ではamylase, Gadd45g, Irf7遺伝子の発現が増加し、AQP5, EGF, Dbp遺伝子の発現が低下することが明らかになった。このことは、相対的に腺房細胞が増加して導管細胞が減少したことを示唆する。この結果はPCNAの免疫組織化学的解析で、腺房における増殖能の亢進を示す結果とも一致する。

一方、ピロカルピン処理では、アセチル-CoAに関与するHmgcs2や血管運動に関与するAngptl4の有意な増加が確認されている。代償性機能亢進とは異なり、腺房細胞の増殖活性の増加は認められなかったことから、代償性機能亢進とは異なるしくみで唾液腺の機能亢進が起こっていることがわかった。

低侵襲的*in vivo*イメージング・システムは、これらの治療法開発における評価系として有用である。現在の実験では、静脈からの持続的に注入したアセチルコリンによる反応を観察しているが、今後は、本研究で開発した光ファイバー・システムを使って、神経刺激や味覚等の口腔感覚刺激を用いたより生理的な唾液分泌の解析を試みる。また、LVVとhTERを使って、唾液腺由来の細胞株を確立し、唾液腺再生研究へ応用することが可能になった。

5. 主な発表論文等

原著論文 (計 11 件)

1. Ishikawa S, Kobayashi M, Hashimoto N, Mikami H, Tanimura A, Narumi K, Furugen A, Kusumi I, Iseki K, Association between N-desmethylclozapine and clozapine-induced sialorrhea: Involvement of increased nocturnal salivary secretion via muscarinic receptors by N-desmethylclozapine. *J Pharmacol Exp Therap* 2020, in press. JPET-AR-2020-000164; DOI: <https://doi.org/10.1124/jpet.120.000164>
2. 新規組織透明化技術による歯および歯周組織の立体構造解析., 石田成美, 関 有里, 根津頭弘, 谷村明彦, 北海道医療大学歯学会雑誌, 38 (2): 95-102, 2019. (ISSN:1880-5892)
3. 村田佳織, 石田成美, 齊藤正人, 谷村明彦, 歯原性上皮細胞におけるマイグレーションの制御因子の同定-成長因子とケモカインの相互作用-, 北海道医療大学歯学会雑誌 38:1-8, 2019.
4. Takahashi A, Morita T, Murata K, Minowa E, Jahan A, Saito M, Tanimura T. Effects of full-length human amelogenin on the differentiation of dental epithelial cells and osteoblastic cells. *Arch Oral Biol* 107, 104479, 2019.
5. Ivanova, H, Wagner LE, 2nd, Tanimura A, Vandermarliere E, Luyten T, Welkenhuyzen K, Alzayady KJ, Wang L, Hamada K, Mikoshiba K et al: Bcl-2 and IP3 compete for the ligand-binding domain of IP3Rs modulating Ca²⁺ signaling output. *Cellular and Molecular Life Sciences*, (2019).
6. Nezu A, Morita T, Nagai T, Tanimura A. Simultaneous monitoring of Ca²⁺ responses and salivary secretion in live animals reveals a threshold intracellular Ca²⁺ concentration for salivation. *Exp Physiol* 104: 61-69, 2019.
7. Sneyd J, Han JM, Wang L, Chen J, Yang X, Tanimura A, Sanderson MJ, Kirk V, Yule DI. On the dynamical structure of calcium oscillations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114: 1456-1461, 2017.
8. Han JM, Tanimura A, Kirk V, Sneyd J. A mathematical model of calcium dynamics in HSY cells. *PLoS Comput Biol* 13: e1005275, 2017.
9. 根津頭弘, 森田貴雄, 谷村明彦. 細胞質型イノシトール三リン酸 (IP₃) バイオセンサー “cLIBRAvIIS” を用いた唾液腺腺房細胞の IP₃ 測定法の開発. 北海道医療大学歯学会雑誌 35: 13-22, 2016.
10. Oura T, Murata K, Morita T, Nezu A, Arisawa M, Shuto S, Tanimura A. Highly Sensitive Measurement of Inositol 1, 4, 5-Trisphosphate by Using a New Fluorescent Ligand and Ligand Binding Domain Combination. *Chembiochem* 17: 1509-1512, 2016.
11. Murata K, Takahashi A, Morita T, Nezu A, Fukumoto S, Saitoh M, Tanimura A. Effect of 1, 25-dihydroxyvitamin D3 on spontaneous calcium responses in rat dental epithelial SF2 cells revealed by long-term imaging. *Biomed Res* 37: 329-334, 2016.

総説

1. Tanimura, A: InVivo imaging study for the regulation of salivary gland functions. *Impact*, 2018:38-40, 2018
2. 谷村明彦, 根津頭弘, 森田貴雄, 村田佳織. IP₃ シグナル解析法の進歩と細胞内シグナル研究への応用. 日薬理誌 (*Folia Pharmacol. Jpn.*) 152 : 1-7, 2018

著書

Tanimura A and Shuto S. Competitive fluorescent ligand assay for inositol 1, 4, 5-trisphosphate. *Methods in Molecular Biology* 2091:137-144, 2020. <https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0167-9> その他 7 件

[学会発表]

根津頭弘, 高橋 茂, 森田貴雄, 谷村明彦. Intravital imaging と遺伝子解析による唾液腺における代償性機能亢進の分子機構の解明. 第 62 回歯科基礎医学会学位術大会 2020

シンポジウム・招待講演

1. 谷村明彦, 根津顕弘. 蛍光イメージングによる Ca^{2+} シグナル解析とその応用—細胞レベルから個体レベル— (アップデートシンポジウム: 細胞内 Ca^{2+} による細胞機能の調節: パッチクランプ法から光学イメージング法によるアプローチまで). 第 62 回歯科基礎医学会学術大会 2020 年 9 月 (鹿児島県、鹿児島市)
2. 谷村明彦, 根津顕弘, 森田貴雄. In vivo 機能解析と遺伝子情報に基づく唾液腺機能亢進機構の研究と口腔乾燥症治療への提案. 第 61 回歯科基礎医学会学術大会, 2019 年 9 月 (東京都, 文京区) その他 11 件

〔図書〕

1. Tanimura A and Shuto S. Competitive fluorescent ligand assay for inositol 1,4,5-trisphosphate. *Methods in Molecular Biology* 2091:137-144, 2020. <https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0167-9>

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称: FRET 法における被検物質蛍光センサーの固定用無機系繊維シート

発明者: 谷村明彦, 小島理恵, 佐々木皓平, 川部雅章

権利者: 谷村明彦, 小島理恵, 佐々木皓平, 川部雅章

種類: 特許, 番号: 特願 2018-179893

出願年: 2018、国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 根津 顕弘

ローマ字氏名: NEZU, Akihiro

所属研究機関名: 北海道医療大学

部局名: 歯学部

職名: 准教授

研究者番号 (8 桁): 00305913

研究分担者氏名: 森田 貴雄

ローマ字氏名: MORITA, Takao

所属研究機関名: 日本歯科大学

部局名: 新潟生命歯学部

職名: 准教授

研究者番号 (8 桁): 20326549

研究分担者氏名: 石井 久淑

ローマ字氏名: ISHII, Hisayoshi

所属研究機関名: 北海道医療大学

部局名: 歯学部

職名: 教授

研究者番号 (8 桁): 00275489

研究分担者氏名: 赤松 徹也

ローマ字氏名: AKAMATSU, Tetuya

所属研究機関名: 徳島大学

部局名: 大学院社会産業理工学研究部

職名: 准教授

研究者番号 (8 桁): 80294700

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 村田 佳織

ローマ字氏名: MURATA, Kaori

研究協力者氏名: 蓑輪 絵里香

ローマ字氏名: MINOWA, Erika

研究協力者氏名: 郷 賢治

ローマ字氏名: GOH, Kenji

研究協力者氏名: 石田 成美

ローマ字氏名: ISHIDA, Narumi

研究協力者氏名: ジャハン アズメリー

ローマ字氏名: JAHAN, Azmerree