

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462821

研究課題名(和文) In vivoマイクロイメージングによる唾液腺細胞のCa<sup>2+</sup>応答と分泌機構の解明研究課題名(英文) Analysis of Ca<sup>2+</sup> response and mechanism of salivary secretion in salivary gland cells using in vivo micro imaging

研究代表者

根津 顕弘 (Nezu, Akihiro)

北海道医療大学・歯学部・准教授

研究者番号：00305913

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、「生体内の唾液腺において腺房細胞内のCa<sup>2+</sup>はどのように変動し、唾液分泌に関わっているか？」を明らかにすることを目的とした。顎下腺全体(マクロ)および腺房細胞(ミクロ)の生体Ca<sup>2+</sup>イメージングを用いて、唾液分泌におけるCa<sup>2+</sup>応答と血流動態を同時に解析した。唾液分泌刺激薬により顎下腺全体で同期したCa<sup>2+</sup>オシレーションが観察され、このCa<sup>2+</sup>応答は高倍率レンズを用いた観察により腺房細胞でも観察された。またCa<sup>2+</sup>オシレーションに、血管収縮による血流変化が重要な役割を果たすことが明らかとなり、唾液分泌と腺房細胞のCa<sup>2+</sup>濃度の時間・空間的变化との関係に新たな知見を得ることが出来た。

研究成果の概要(英文)：We examined sialogogue-induced changes in Ca<sup>2+</sup> response and blood flow (BF) during salivary secretion in rat submandibular gland (SMG) using an intravital Ca<sup>2+</sup> imaging system, a fiber-optic pressure sensor and a laser speckle imaging flowmeter. Using the macro and micro Ca<sup>2+</sup> imaging in rat SMG, we found that infusion with acetylcholine (ACh) induced tissue-wide synchronization of Ca<sup>2+</sup> oscillations in vivo. Simultaneous monitoring of Ca<sup>2+</sup> responses and BF in SMG demonstrated that the ACh-induced changes in BF were also synchronized with Ca<sup>2+</sup> oscillations. We revealed that the vasoconstriction via angiotensin II and thromboxane A2 receptors play important role for a generation of the ACh-induced Ca<sup>2+</sup> oscillations in SMG in vivo. Real-time monitoring of Ca<sup>2+</sup> and salivary secretion showed a clear time lag between the onset of intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) and that of salivary secretion. Based on this result, we estimated required [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> for salivary secretion in vivo.

研究分野：歯科薬理学

キーワード：唾液腺 Ca<sup>2+</sup>応答 唾液分泌 Ca<sup>2+</sup>イメージング 血流動態

## 1. 研究開始当初の背景

唾液腺の水・電解質分泌に、腺房細胞の  $Ca^{2+}$  応答が重要な役割を果たしている。これまでに我々は、*in vitro* 実験系を用いた単離唾液腺細胞のイメージング解析により、唾液腺細胞が  $Ca^{2+}$  ウェーブや  $Ca^{2+}$  オシレーションといった特徴的な  $Ca^{2+}$  動態を起こすことを明らかにしてきた。また アドレナリン受容体を介する  $Ca^{2+}$  シグナルの増強作用を報告し、唾液分泌には様々な受容体の相互作用も関わっている可能性が考えられている。

*In vitro* 実験系で観察される  $Ca^{2+}$  ウェーブや  $Ca^{2+}$  オシレーションが唾液腺で起こるのか、またこのような時間・空間的な  $Ca^{2+}$  応答が分泌にどのような役割を果たすのかといった疑問は *in vitro* 実験系で解析することは不可能であり、その解析には生きた動物の唾液腺における  $Ca^{2+}$  応答と唾液分泌を同時に測定する必要があった。

近年、イメージング装置と蛍光バイオセンサーの進歩により、標的臓器の応答を可視化する *in vivo* イメージングが注目されている。我々は、遺伝子発現ウイルスベクターを用いた方法により、遺伝子導入が困難であった唾液腺腺房細胞へ蛍光  $Ca^{2+}$  センサーを非侵襲的に発現させ、生きた動物の唾液腺全体の  $Ca^{2+}$  応答を可視化する *in vivo* “マクロ” イメージング法を確立した (発表論文<sup>5</sup>)。超高感度  $Ca^{2+}$  センサー (YC-Nano50;  $K_d=50$  nM) を用いた  $Ca^{2+}$  イメージングと高感度微小圧力センサー (50 nl/秒) による唾液分泌の同時測定により、アセチルコリン (ACh) 投与による顎下腺小葉単位の  $Ca^{2+}$  オシレーションと唾液分泌が起こることを明らかにした。

*In vivo* イメージング法の確立により、「生体内の唾液腺において腺房細胞の細胞内  $Ca^{2+}$  濃度 ( $[Ca^{2+}]_i$ ) はどのように変動し、唾液分泌に関わっているのか？」という疑問に対しアプローチできるようになった。この手法を唾液腺全体の “マクロ” イメージングから細胞レベルでの  $Ca^{2+}$  応答を解析する “ミクロ” イメージング解析へと発展させることにより実現可能になると考え、本研究を立案した。

## 2. 研究の目的

本研究は、「生体内の唾液腺において腺房細胞内の  $[Ca^{2+}]_i$  はどのように変動し、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、生きたラットの顎下腺の  $Ca^{2+}$  応答を腺全体 (マクロ) および腺房細胞 (ミクロ) によるイメージングを行い、様々な唾液分泌刺激による  $Ca^{2+}$  応答の可視化を行う。さらに、唾液分泌と顎下腺血流の同時測定による唾液分泌における  $Ca^{2+}$  応答と血流動態の関係について検討する。

## 3. 研究の方法

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

蛍光  $Ca^{2+}$  センサーの顎下腺への導入：麻酔したラットに蛍光センサー (YC-Nano、G-GECO、および GCaMP 等) 遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクターを唾液腺開口部より逆行性に注入し、約 36 時間後に実験に用いた。

顎下腺全体の  $Ca^{2+}$  応答の測定：蛍光センサーを導入したラットを麻酔し、頸部から顎下腺を露出させ、正立顕微鏡のステージ上に固定し、顎下腺に発現した蛍光センサーの蛍光比変化を測定した。マクロズームレンズを装着した蛍光顕微鏡を用いて、分泌刺激によって変化する顎下腺全体の蛍光強度変化を高感度 3CCD カメラ付きイメージングシステム (により測定した。唾液分泌刺激薬は大腿静脈に挿入したカテーテルより持続的に注入し、阻害薬等は腹腔内投与により行った。

顎下腺内の腺房細胞の  $Ca^{2+}$  応答の測定：高倍率レンズ (5~20 倍) を装着した正立型の共焦点レーザー顕微鏡、多光子レーザー顕微鏡およびマクロズームレンズを装着した蛍光顕微鏡を用いて  $Ca^{2+}$  センサーの蛍光変化をモニターした。

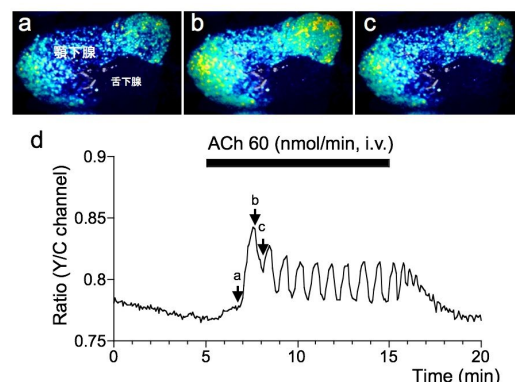
顎下腺の血流イメージング：顎下腺の血流変化は二次元レーザースペックル血流計を用いて測定した。

唾液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。

## 4. 研究成果

### (1) ラット顎下腺におけるムスカリン受容体刺激を介した $Ca^{2+}$ 応答と唾液分泌

ACh 投与による蛍光  $Ca^{2+}$  センサー (YC-Nano50) の発現した顎下腺全体 (1 倍) の  $Ca^{2+}$  応答を可視化した。ACh 濃度に依存して顎下腺全体で  $[Ca^{2+}]_i$  上昇が観察され、比較的低濃度 (60~120 nmol/min) の ACh 投与により周期的な  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇と下降を繰り返す  $Ca^{2+}$  オシレーションが惹起された (図 1)。



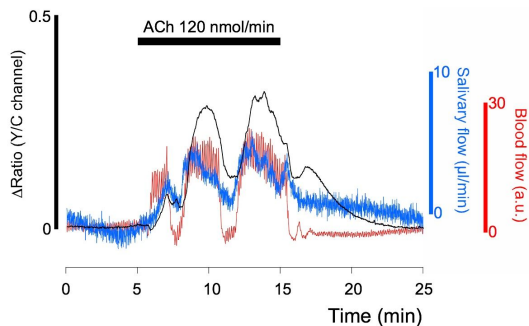
(図 1) マクロイメージングを用いた ACh による顎下腺全体の  $Ca^{2+}$  応答の解析 (a-b) 図 1d 内の矢印での YC-Nano50 の蛍光比

(Ratio)画像。(d)顎下腺全体のCa<sup>2+</sup>応答。ACh投与により顎下腺全体で同期するCa<sup>2+</sup>オシレーションが観察された。

### (2) AChによる顎下腺全体で同期するCa<sup>2+</sup>オシレーションとその発生機構

AChによるCa<sup>2+</sup>オシレーションの発生機構を明らかにするため神経節遮断薬および受容体遮断薬を用いて検討した。これらの薬物の前投与はCa<sup>2+</sup>オシレーションの発生に影響しなかったことから、自律神経節を介した交感神経系の関与はないことが明らかとなった。

唾液分泌に影響する因子として唾液腺血流動態が考えられる。そこでCa<sup>2+</sup>応答、唾液分泌および腺血流の同時測定を行った。Ca<sup>2+</sup>オシレーション発生時に唾液分泌と腺血流量の上昇と下降が観察された(図2)。これは実際の唾液分泌にCa<sup>2+</sup>応答と血流動態が密接な関係にあることを示す直接的な証拠である。



(図2) ラット顎下腺におけるCa<sup>2+</sup>応答と血流動態の同時測定

ACh投与によるCa<sup>2+</sup>応答(黒色)、唾液分泌(青色)および血流動態(赤色)、顎下腺でのCa<sup>2+</sup>オシレーションと同様に、唾液分泌と腺血流変化が観察された。

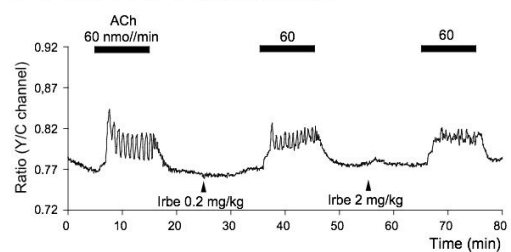
またCa<sup>2+</sup>応答と血流オシレーションはCa<sup>2+</sup>拮抗薬で完全に抑制された。この結果からCa<sup>2+</sup>オシレーションに血管収縮を介した腺血流変化が大きく影響することが示唆された。

血流オシレーションに関わる血管収縮物質を調べるため、血流イメージングにより拮抗薬をスクリーニングしたところ、アンジオテンシンII(AT<sub>1</sub>)とトロンボキサンA<sub>2</sub>(TXA<sub>2</sub>)受容体拮抗薬によって血流オシレーションが抑制された。これらの拮抗薬を用いてCa<sup>2+</sup>オシレーションに対する影響を調べたところ、顎下腺におけるCa<sup>2+</sup>オシレーションにはAT<sub>1</sub>およびTXA<sub>2</sub>受容体を介した血管収縮による血流量変化が重要な役割を果たすことが明らかとなった(図3)。

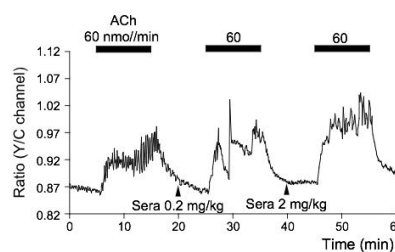
### (3) Ca<sup>2+</sup>応答と唾液分泌の同時測定による唾液分泌の[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>の閾値の算定

Ca<sup>2+</sup>応答と唾液分泌の同時測定により、唾液分泌は常にCa<sup>2+</sup>応答に遅れて起こる。Ca<sup>2+</sup>応答と分泌の時間差はACh濃度とともに短縮し、最大の分泌を起こすACh濃度で約20秒の時間差が認められた(図4)。この時間差は腺房細胞の水分分泌に関与する様々な分子が活性化される[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>に達するまでの時間であると考え、分泌開始時の[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>を算出したところ、生体内で唾液分泌が起こる[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>はおよそ60 nMであると推定された。これらの結果は、超高感度かつ蛍光比変化による高い定量性を持つYC-Nano50を使った生体内Ca<sup>2+</sup>イメージングと唾液分泌の同時測定により初めて得られた知見である。

A) アンジオテンシンII受容体拮抗薬前投与

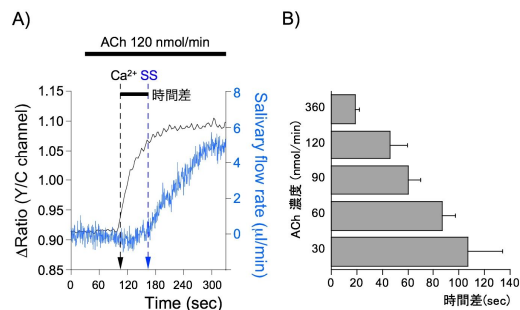


B) トロンボキサンA<sub>2</sub>拮抗薬前投与



(図3) AChによるCa<sup>2+</sup>オシレーションに対する各種拮抗薬の効果

(a)イルベサルタン(Irbe)および(b)セラトロダスト(Sera)投与によるAChによる[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>変化パターンの時間変化。これらの薬物の前投与によって、AChによるCa<sup>2+</sup>オシレーションの抑制が認められた。



(図4) AChによるCa<sup>2+</sup>応答と唾液分泌の同時測定による時間関係の解析

A)Ca<sup>2+</sup>応答と唾液分泌の時間の測定。Ca<sup>2+</sup>応答および唾液分泌(SS)の時間差の測定。B)Ca<sup>2+</sup>応答と唾液分泌開始時間の時間差。唾液分泌

は常に  $Ca^{2+}$  応答よりも遅れて観察された。

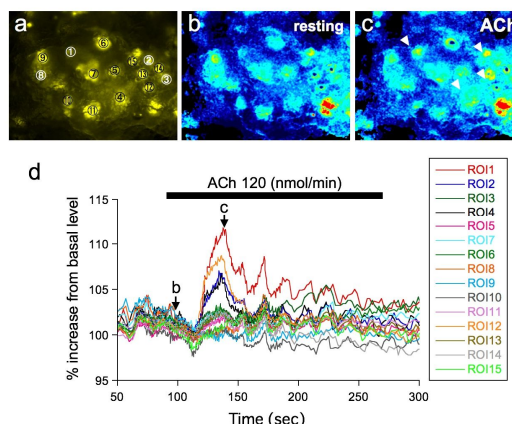
#### (4) ミクロイメージングによる顎下腺腺房細胞の $Ca^{2+}$ 応答の時間・空間的解析

単離細胞で見られる細胞内  $Ca^{2+}$  ウェーブや  $Ca^{2+}$  オシレーションが実際の唾液腺の腺房細胞で、どのような  $Ca^{2+}$  応答の時間・空間的变化が起こすのかを調べるため高倍率レンズを用いた共焦点レーザー顕微鏡と二光子励起顕微鏡とこれらの測定系に適した蛍光  $Ca^{2+}$  センサー (G-GECO および GCaMP) によるミクロイメージングを試みた。高倍率測定では体動(呼吸や心拍)による観察部位のブレが測定の問題となるため、顎下腺をカバーガラスで挟んで挙上する手法により測定を試みた。本固定法により体動の影響は大きく減少し、蛍光  $Ca^{2+}$  センサーを発現した腺房細胞の観察に成功した。そこで ACh 刺激による  $Ca^{2+}$  応答を測定したところ、 $Ca^{2+}$  応答の観察に YC-Nano50 を使用したときよりも高濃度の ACh が必要であった。これは G-GECO や GCaMP が  $Ca^{2+}$  に対する親和性が YC-Nano50 よりも低いため、 $Ca^{2+}$  応答の検出により高い  $[Ca^{2+}]_i$  が必要となることに起因すると考えられた。高濃度 ACh により腺房細胞は強いシュリンケージを起こし、顎下腺全体の大きな形態変化が起こったため、高倍率観察での正確な  $Ca^{2+}$  応答の観察が困難であった。

この結果から、ミクロイメージングを行うために以下の2点について改良が必要となった。1) 体動と組織形態変化を出来るだけ避ける顎下腺固定法の確立、2) 高感度蛍光  $Ca^{2+}$  センサーの使用することである。

そこで組織固定法を再検討し、組織用接着剤で腺組織をカバーガラスに固着後に挙上する方式に変更した。さらに、より小さな  $[Ca^{2+}]_i$  を測定するため YC-Nano50 を用いたマルチズーム蛍光顕微鏡により解析した。本測定系は8倍までズーム可能な5倍レンズ用いることで最大40倍までの観察ができる。これらの改良により低濃度の ACh 刺激による  $Ca^{2+}$  応答の可視化が可能となり、さらに細胞レベルでの  $Ca^{2+}$  オシレーションを観察することに成功した(図5)。また最大の唾液分泌を起こす ACh によって細胞内  $Ca^{2+}$  ウェーブ様の反応も観察できた。

また多光子励起顕微鏡において低濃度の ACh による  $Ca^{2+}$  応答の観察するため、より  $Ca^{2+}$  に対して高感度な GCaMP シリーズ (GCaMP6s) 発現ウイルスベクターを作成した。



(図5) ミクロイメージングによるラット顎下腺腺房細胞における  $Ca^{2+}$  応答

(a) 高倍率観察 (15 倍) による YC-Nano50 発現顎下腺腺房細胞の蛍光像。(b) および (c) アセチルコリン投与前および投与後の蛍光比画像。(d) ACh 刺激による顎下腺腺房細胞の  $Ca^{2+}$  応答の経時変化。図 4a に示す 15 個の測定部位の反応。矢頭は反応が見られた細胞を示す。

#### (まとめ)

本研究では、我々の開発した *in vivo* イメージング技術を用いて、生きた動物における顎下腺の  $Ca^{2+}$  応答と唾液分泌との関係を明らかにすることを目的とし、顎下腺全体 (マクロ) および腺房細胞 (ミクロ) での  $Ca^{2+}$  応答の時間・空間的变化の可視化を試み、唾液分泌と血流動態の同時測定により解析した。その結果、ACh により顎下腺全体で同期する  $Ca^{2+}$  オシレーションとその発生機構を明らかにし、さらに細胞レベルでも同期した  $Ca^{2+}$  応答が起こることを初めて示した。また  $Ca^{2+}$  応答と唾液分泌の同時測定により、唾液分泌に必要な  $[Ca^{2+}]_i$  を算出した。以上の結果は、生体イメージングによる我々の実験システムによって初めて示された知見である。

組織深部の観察には多光子励起顕微鏡が最も適しており、顎下腺の深い部位での  $Ca^{2+}$  応答を高い解像度で可視化が可能である。我々は唾液腺に適した組織接着による顎下腺固定法が確立し、高倍率測定において測定時のブレとまた腺房細胞のシュリンケージによる影響を抑制することに成功した。本固定法と GCaMP6s を用いて二光子励起顕微鏡による観察を行うことで、生体内における唾液分泌と  $Ca^{2+}$  応答との関係に新たな知見が得られることが期待される。

#### 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 6 件)

1) 根津顕弘、森田貴雄、谷村明彦: 細胞質型イノシトール三リン酸 ( $IP_3$ ) バイオセンサー “cLIBRAV11S” を用いた唾液腺腺房細胞の

IP<sub>3</sub>測定法の開発. 北海道医療大学歯学会雑誌、(査読有)、35(2)、2016、13-22.

<http://id.nii.ac.jp/1145/00064432/>

2) 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*, (査読有), 17(16), 2016, 1509-1512.

DOI:10.1002/cbic.201600096

3) Murata K, Takahashi A, Morita M., Nezu A., Fukumoto S, Saito M, Tanimura A: Effect of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on spontaneous calcium responses in rat dental epithelial SF2 cells revealed by long-term imaging. *Biomedical Research (Tokyo, Japan)*, (査読有), 37(6), 2016, 329-334. DOI: 10.2220/biomedres.37.329

4) Nezu A., Morita T., Tanimura A. In vitro and in vivo imaging of intracellular Ca<sup>2+</sup> responses in salivary gland cells. *Journal of Oral Bioscience*, (査読無), 57, 2015, 69-75. DOI:10.1016/j.job.2015.02.003

5) Nezu A., Morita T., Tojyo Y, Nagai T., Tanimura A. Partial agonistic effects of pilocarpine on Ca<sup>2+</sup> responses and salivary secretion in the submandibular glands of live animals. *Experimental Physiology*, (査読有), 100(6), 2015, 640-651. DOI: 10.1113/EP085110

6) Tojyo Y., Morita T., Nezu A., Tanimura A., Key components of store-operated Ca<sup>2+</sup> entry in non-excitable cells. *J Pharmacol Sci.*, (査読無), 125(4), 2014, 340-346. DOI: 10.1254/jphs.14R06CP

[学会発表](計 28 件)

1) 根津顕弘, 森田貴雄, 谷村明彦, 生きた動物の顎下腺における唾液分泌に対する細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の閾値, 第90回日本薬理学会, 2017年3月15日~17日, 長崎県長崎市

2) 森田貴雄, 根津顕弘, 谷村明彦, ピロカルピンによる唾液分泌の機能亢進と遺伝子発現増加, 第90回日本薬理学会, 2017年3月15日~17日, 長崎県長崎市

3) 根津顕弘, 森田貴雄, 永井健治, 谷村明彦, 顎下腺のCa<sup>2+</sup>応答と唾液分泌の同時測定による分泌におけるCa<sup>2+</sup>濃度の閾値の算定, 第61回日本唾液腺学会学術集会, 2016年12月3日, 東京都文京区

4) 森田貴雄, 根津顕弘, 谷村明彦, ピロカルピン前投与による顎下腺および脳組織での遺伝子発現の増加, 第61回日本唾液腺学会学術集会, 2016年12月3日, 東京都文京区

5) Nezu A., Morita T., Tanimura A.,

Simultaneous monitoring of Ca<sup>2+</sup> response and salivary secretion reveals the threshold level of intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration for salivary secretion in rat submandibular gland. 4<sup>th</sup> Stensen symposium, 2016/11/30-12/2, Aichi, Okazaki

6) Morita T., Nezu A., Tanimura A., Enhancement of salivary secretions and gene expressions in the submandibular gland and the brain by preadministration of pilocarpine. 4<sup>th</sup> Stensen symposium, 2016/11/30-12/2, Aichi, Okazaki

7) Tanimura A., Nezu A., Morita T., Roles of muscarinic receptors on the functions of salivary glands. 4<sup>th</sup> Stensen symposium, 2016/11/30-12/2, Aichi, Okazaki

8) 根津顕弘, 森田貴雄, 永井健治, 石井久淑, 谷村明彦, アセチルコリン刺激で惹起される顎下腺全体で同期するCa<sup>2+</sup>オシレーションとその発生機構, 第67回日本薬理学会北部会, 2016年9月30日, 北海道, 札幌市

9) 谷村明彦, 大浦泰, 村田佳織, 森田貴雄, 根津顕弘, 周東智, 新規IP<sub>3</sub>測定法-競合的蛍光リガント結合アッセイ法-, 第67回日本薬理学会北部会, 2016年9月30日, 北海道, 札幌市

10) 森田貴雄, 根津顕弘, 谷村明彦, ピロカルピンの前投与による唾液腺および脳組織における遺伝子発現変化, 第67回日本薬理学会北部会, 2016年9月30日, 北海道, 札幌市

11) 根津顕弘, 森田貴雄, 石井久淑, 谷村明彦, アセチルコリンによる顎下腺のCa<sup>2+</sup>オシレーションにおける腺血流動態の影響, 第58回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2016年8月24日~26日, 北海道, 札幌市

12) 森田貴雄, 根津顕弘, 谷村明彦, ピロカルピンの前投与による唾液分泌亢進と遺伝子発現変化, 第58回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2016年8月24日~26日, 北海道, 札幌市

13) 谷村明彦, 根津顕弘, 森田貴雄, In vivo イメージングを使った細胞内シグナルと生体機能の同時解析: 唾液腺腺房細胞のCa<sup>2+</sup>応答と唾液分泌, 第58回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2016年8月24日~26日, 北海道, 札幌市

14) 根津顕弘, 森田貴雄, 石井久淑, 永井健治, 谷村明彦, アセチルコリンによって惹起される顎下腺全体で同期するCa<sup>2+</sup>オシレーションとその発生機構, 第89回日本薬理学会, 2016年3月9日~11日, 神奈川県横浜市

15) 根津顕弘, 森田貴雄, 永井健治, 谷村明彦, アセチルコリン刺激による顎下腺全体で同期したCa<sup>2+</sup>オシレーションとその発生機構, 第60回日本唾液腺学会, 2015年12月5日, 東京都文京区

16) 森田貴雄、関 有里、石田成美、根津顕弘、谷村明彦、ピロカルピンの前投与による唾液分泌量増加のメカニズムの解明、第60回日本唾液腺学会、2015年12月5日、東京都文京区

17) 根津顕弘、森田貴雄、谷村明彦、アセチルコリン刺激によって惹起される顎下腺全体で同期する  $Ca^{2+}$  オシレーションの発生機構、第57回歯科基礎医学会学術大会・総会、2015年9月11日～13日、新潟県新潟市

18) 森田貴雄、根津顕弘、谷村明彦、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを用いた  $Ca^{2+}$  バイオセンサー恒常発現細胞における培養時の  $Ca^{2+}$  応答と細胞の動きの同時解析、第57回歯科基礎医学会学術大会・総会、2015年9月11日～13日、新潟県新潟市

19) Nezu A., Morita T., Nagai T., Tanimura A., Real-time imaging of  $Ca^{2+}$  dynamics in rat submandibular gland during salivary secretion in live animals, Gordon Research Conference, Calcium signaling. 2015/6/7-6/12, Boston, USA

20) Tanimura A., Nezu A., Morita T., Shuto S., A novel method for  $IP_3$  measurement with fluorescent adenophostin A derivatives, Gordon Research Conference, Calcium signaling. 2015/6/7-6/12, Boston, USA

21) 根津顕弘、森田貴雄、東城庸介、永井健治、谷村明彦、生きた動物の唾液腺におけるアセチルコリンによる組織全体で同期する  $Ca^{2+}$  振動、第88回日本薬理学会年会、2015年3月18日～20日、愛知県名古屋市

22) 根津顕弘、森田貴雄、東城庸介、永井健治、谷村明彦、生きた動物における薬物および神経刺激による顎下腺の  $Ca^{2+}$  応答、唾液分泌および血流量の同時測定、第59回日本唾液腺学会学術集会、2014年12月6日、東京都文京区

23) 森田貴雄、根津顕弘、東城庸介、谷村明彦、アデノウイルスの in vivo 遺伝子導入法を用いたラット顎下腺腺房細胞への Stim1-mK01 発現による  $Ca^{2+}$  応答の増大および唾液分泌への影響、第59回日本唾液腺学会学術集会、2014年12月6日、東京都文京区

24) 根津顕弘、森田貴雄、東城庸介、谷村明彦、唾液分泌刺激薬による顎下腺の  $Ca^{2+}$  応答の intravital イメージングと唾液分泌の同時測定、第56回歯科基礎医学会学術大会・総会、2014年9月25日～27日、福岡県福岡市

25) 谷村明彦、村田佳織、齊藤正人、根津顕弘、森田貴雄、競合的蛍光リガンド結合アッセイ法を活用した新規  $IP_3$  分子センサーの開発、第56回歯科基礎医学会学術大会・総会、2014年9月25日～27日、福岡県福岡市

26) 森田貴雄、根津顕弘、東城庸介、谷村明彦、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを用い

た  $Ca^{2+}$  バイオセンサーの長期発現と唾液腺細胞の長時間  $Ca^{2+}$  イメージング、第56回歯科基礎医学会学術大会・総会、2014年9月25日～27日、福岡県福岡市

27) 根津顕弘、森田貴雄、東城庸介、谷村明彦、生きた動物における顎下腺  $Ca^{2+}$  応答のリアルタイムイメージングと唾液分泌の同時測定、第56回歯科基礎医学会学術大会・総会、第28回唾液腺談話会(サテライトシンポジウム)、2014年9月25日、福岡県福岡市

28) 谷村明彦、根津顕弘、森田貴雄、東城庸介、佐藤寿哉、石井久淑、Intravital  $Ca^{2+}$  イメージングによる唾液分泌制御機構の解析、平成26年度生理学研究会「唾液腺形態形成研究会～機能解析から器官再生へ、2014年8月4日～5日、愛知県岡崎市

## 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・准教授  
研究者番号: 00305913

### (2) 研究分担者

石井 久淑 (ISHII Hisayoshi)  
北海道医療大学・歯学部・教授  
研究者番号: 00275489

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