

[最近のトピックス]

アデノウイルスを用いた外来タンパク質の唾液腺へのin vivo発現とその機能解析

森田 貴雄

北海道医療大学歯学部 口腔生物学系 薬理学分野

Takao Morita

Department of Pharmacology, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido

ウイルスを唾液腺開口部から逆行性に注入し、生きた動物の唾液腺組織に外来遺伝子を発現させる手法は、NIDCRのBaumらにより1990年代から行われている (Baum et al., 2002)。現在この方法により、障害を受けた唾液腺組織に対する遺伝子治療の臨床応用が試みられている。遺伝子導入によく用いられているアデノウイルスは、高い効率で外来遺伝子を発現させることができる反面、特に腺房細胞に重篤な炎症とそれに伴う腺房細胞の減少を招くという問題があった。今回我々は彼らの方法を使い、炎症を起こさずに顎下腺腺房細胞に機能的分子を発現させることに成功したので紹介する (Morita et al., 2011)。

mKO1 蛍光タンパク質を融合させたStim1 (Stim1-mKO1) を発現するアデノウイルスを作製し、これをラットの顎下腺開口部から逆行性に注入した。我々の方法では、ウイルス注入量を1/10量に減らすと共にチューブの遠位端を塞ぎ、注入ウイルスがすぐに漏出しないように工夫した。Stim1-mKO1を発現させた顎下腺を観察すると、その蛍光は顎下腺組織全体に見られ、舌下腺には発現が見られなかった (図1A)。さらにこの組織切片において、アデノウイルス導入による炎症の兆候は認められず、Stim1-mKO1の発現は主に腺房細胞で見られた (図1B)。また、ウイルスの発現が標的組織にのみ限定されたことから、将来的な遺伝子治療への応用も可能になる。

次に腺房細胞を単離し、Stim1-mKO1の局在と機能を解析した。Stim1はCa²⁺ストアの枯渇により細胞膜近傍に移行し、容量性Ca²⁺流入を引き起こすことが知られている (Putney, 2007)。小胞体Ca²⁺ポンプ阻害剤のThapsigargin (ThG) でCa²⁺ストアを枯渇させると、Stim1-mKO1の細胞膜近傍への移行が観察された。またStim1-mKO1発現細胞では、ThGおよびムスカリン受容体アゴニストのカルバコール (CCh) 刺激により誘導される容量性Ca²⁺流入は、発現していない細胞に比べて増大していた (図2)。これらの結果から、本方法は機能的タンパク質を唾液腺腺房細胞に発現させ、腺房細胞からの唾液分泌の分子メカニズムを研究する上で有用な方法であると考えられる。

参考文献

Baum BJ, Wellner RB, & Zheng C. Gene transfer to salivary glands. *Int Rev Cytol* 213: 93-146, 2002.

Morita T, Tanimura A, Shitara A, Suzuki Y, Nezu A, Takuma T & Tojyo Y. Expression of functional Stim1-mKO1 in rat submandibular acinar cells by retrograde ductal injection of an adenoviral vector. *Arch Oral Biol* (in press), 2011.

Putney JW, Jr. New molecular players in capacitative Ca²⁺ entry. *J Cell Sci* 120: 1959-1965, 2007.

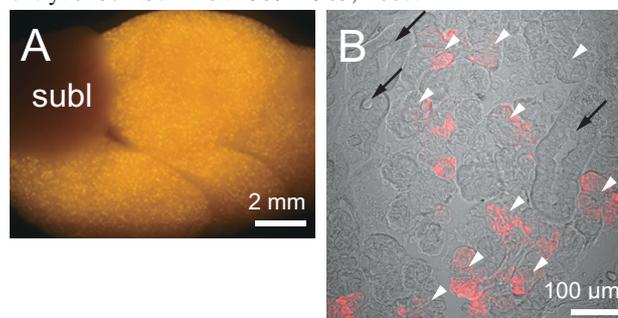


図1 顎下腺組織におけるStim1-mKO1の発現

A: Stim1-mKO1を発現させた顎下腺

Stim1-mKO1は顎下腺全体に発現し、舌下腺 (subl) には発現しなかった。

B: Stim1-mKO1を発現させた顎下腺の組織切片

Stim1-mKO1は主に腺房 (白矢頭) で発現し、導管 (黒矢印) にはほとんど発現しなかった。

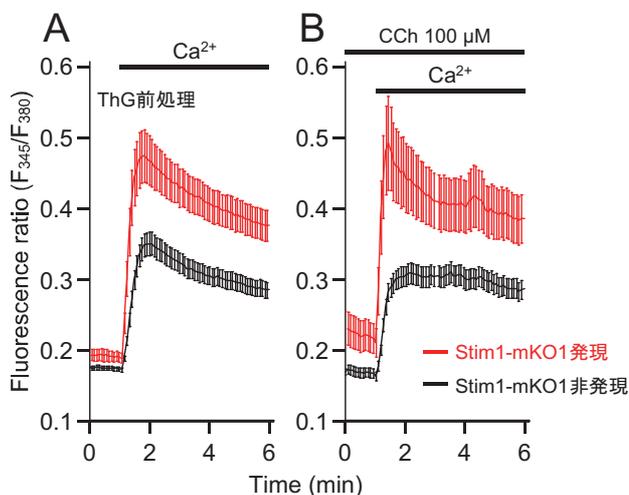


図2 Stim1-mKO1発現細胞における容量性Ca²⁺流入の増強
ThG (A) およびCCh (B) 刺激により引き起こされた容量性Ca²⁺流入はStim1-mKO1発現細胞で増強していた。
赤; Stim1-mKO1発現細胞, 黒; 非発現細胞