

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K08504

研究課題名(和文)皮膚感覚装置におけるニューロン-グリア相互作用の細胞内Na⁺濃度画像解析研究課題名(英文)Na⁺ image analysis of neuron-glia interactions in cutaneous sensory devices

研究代表者

岩永 ひろみ (Takahashi-Iwanaga, Hiromi)

北海道大学・医学研究院・准教授

研究者番号：30193759

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)：ラット頬ひげ毛包槍型感覚終末は、入力線維を包む髄鞘形成シュワン細胞と無髄軸索終末の薄板状被覆をなす終末シュワン細胞の二種グリア細胞を伴う。一次感覚ニューロンが放出するという神経伝達物質グルタミン酸に対するこれらの細胞の応答を調べる目的で、槍型終末分離標本に蛍光性プローブFura-2またはSBFIを負荷し、刺激剤を与えたときの細胞内Ca²⁺濃度とNa⁺濃度変化を画像解析した。髄鞘形成シュワン細胞は、ときに1 mMグルタミン酸の刺激に対しCa²⁺応答し、Na⁺画像解析では同刺激に一致して緩やかな細胞内Na⁺イオン濃度上昇を示した。一方、終末シュワン細胞のグルタミン酸刺激に対する応答は検出されなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

中枢・末梢神経系正常機能の発現と維持に欠かせないニューロン-グリア相互作用の解析に、細胞内Na⁺濃度画像化法が有効であることを初めて皮膚感覚装置の分離標本の実験で示し、さらに精細なデータを得るために解決すべき問題点を具体的に示した。これによって、皮膚感覚装置の機能形態とその病的変化の理解に新しい視点を提供し得る研究技法の開発に貢献できた。また、Na⁺画像取得条件錬成のため行ったCa²⁺画像解析によって、皮膚感覚装置の異なる種類のグリア細胞が、神経終末から放出されるという伝達物質ATPに対し、それぞれ独自の受容体亜型を介し応答していることを明らかにし、新しい末梢神経系創薬の鍵を提供できた。

研究成果の概要(英文)：The lanceolate sensory endings that innervate rat vibrissal follicles accompany two glial cell types: the myelinating Schwann cells that enshroud the afferent fibers, and the terminal Schwann cells that form lamellar coverings on the unmyelinated axon endings. In order to examine responses of the mechanoreceptor glia to the neurotransmitter, glutamate, which is reportedly released from the primary sensory neurons, isolated preparations of lanceolate endings were loaded with the fluorescent probe, Fura-2 or SBFI, and subjected to image analysis of intracellular Ca²⁺ or Na⁺ dynamics during a bath application of the stimulant. The myelinating Schwann cells occasionally responded to application of 1 mM glutamate with a Ca²⁺ transient, and displayed a mild elevation in intracellular Na⁺ concentration during a corresponding stimulation. No responses were detectable from the terminal Schwann cells.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞組織化学 カルシウム画像 ナトリウム画像 グルタミン酸 アデノシン5'三リン酸

1. 研究開始当初の背景

マイスナー小体などの皮膚感覚装置は、終末シュワン細胞とよばれる 特異な形態のグリアを含む。このグリア細胞は、丸い細胞体からのばした 2 枚の薄板突起で一次感覚ニューロンの軸索終末を両脇から挟み、皮膚感覚装置に共通の三つ組み構造をつくる(図1)。軸索終末が興奮すると自己分泌的に ATP やグルタミン酸が放出されるといわれ(文献)、これを被うシュワン薄板は 脳アストロサイトのシナプス周囲突起に相当する構造とみなすことができる。

アストロサイトのシナプス周囲突起は、細胞膜の Na^+ 共輸送体を介して神経伝達物質を能動的に回収し、また、自身の伝達物質受容体の活性化に基づく細胞効果を発揮して、正常な神経伝達に欠かせない役割を果たす(文献)。近年の研究によれば、受容体を介したアストロサイトの Ca^{2+} 応答(一過性細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇)は、細胞膜上の電位依存性 Na^+ チャネルの働きで増強されるという(文献)。終末シュワン細胞を含む末梢グリア細胞も、こうしたチャネルや輸送体を発現するといわれるが、それら分子の機能活性や随伴ニューロン軸索との相互作用に果たす役割は未知である。

Na^+ 感受性蛍光色素を顕微鏡技術に応用した研究によれば、培養系や新鮮脳組織切片のアストロサイトは、外部から投与したグルタミン酸などを Na^+ との共輸送によって盛んに取り込み、このとき、細胞体で Na^+ 濃度の一過性上昇、いわば Na^+ 応答が検出されるという(文献)。私たちはこれまでに、ラット頬ひげ動き受容器 槍型神経終末の分離膜片標本で Ca^{2+} 画像解析を行い、終末シュワン細胞の各薄板突起が細胞外 ATP 刺激や軽い接触刺激に対し 独自に Ca^{2+} 応答する機能単位であることを報告した(文献)。この分離標本への Na^+ 画像化法の応用は、皮膚感覚装置でのニューロン - グリア相互作用の解析に最適な研究材料を提供すると期待される。

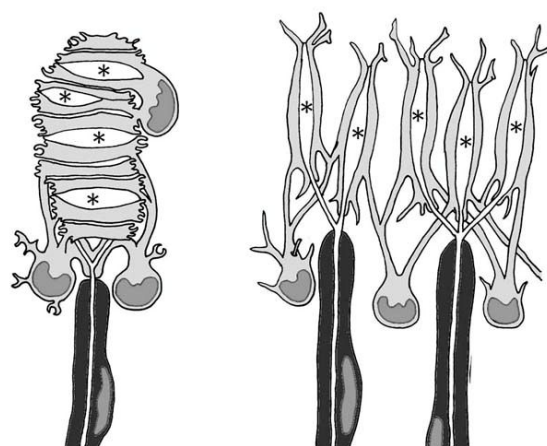


図1. マイスナー小体(左)と毛包の槍型感覚終末(右) 軸索終末(*)の両面を終末シュワン細胞(灰色)の薄板が被う。黒は髄鞘形成シュワン細胞。

2. 研究の目的

皮膚感覚装置軸索終末から興奮依存的に自己分泌される伝達物質 ATP、グルタミン酸の刺激に応じた終末シュワン細胞の活動を Ca^{2+} 応答あるいは Na^+ 応答として検出し、応答責任分子を薬理生理学的に同定することによって、末梢神経系での軸索-シュワン細胞相互作用の実態を明らかにする目的で、ラット頬ひげの動き受容器 槍型終末の分離標本を用いて以下のことを行った。

(1) 終末シュワン細胞に Ca^{2+} 応答を惹き起こすのに十分な用量の刺激剤を与え、それに伴う同細胞の電位依存性 Na^+ チャネル活性化の検出を試みた。

(2) 終末シュワン細胞にグルタミン酸をさまざまな濃度で与えたときの細胞内 Na^+ 濃度変動を画像化し、同物質の Na^+ 共輸送体を介した細胞内取り込みの可能性を検討した。

3. 研究の方法

生後 6 - 7 週令の野生型 Wistar ラットまたはグリア細胞が緑色蛍光を発する Wistar-Kyoto 系 S100 β -EGFP トランスジェニックラットをエーテル麻酔下に断頭屠殺し、頬ひげ毛根を周囲組織とともに切り出して培養液に移し、実体顕微鏡下の解剖とコラゲナーゼ消化を組み合わせた

やり方(文献)で槍型終末を含む膜片組織を生きたまま分離した(図2)。これを用いて、以下の実験(1) (4)を行った。

(1) ATP 受容体またはグルタミン酸受容体を介した細胞応答

槍型終末分離標本に蛍光性 Ca^{2+} 指示薬 Fura-2 の AM 体 $20 \mu\text{M}$ を 37°C で 50 分負荷したのちに観察チャンパー底に貼付けて倒立式蛍光顕微鏡のステージに載せ、生理的塩液で灌流しながら励起光波長 $340 \text{ nm}/380 \text{ nm}$ で得られる 505 nm 蛍光比画像(半定量的 Ca^{2+} 画像)をタイムラプス記録。標本灌流液に ATP $20\text{--}100 \mu\text{M}$ またはグルタミン酸 $20 \mu\text{M}\text{--}1 \text{ mM}$ を 3 分間加えて刺激したときの細胞応答を調べた。明確な Ca 応答が得られた場合、応答責任受容体亜型を特異的作動薬または遮断薬を用いた実験で同定した。

(2) Ca 応答に伴う電位依存性 Na^+ チャンネル活性化

分離標本に蛍光性 Na^+ 指示薬 SBFI の AM 体 $20 \mu\text{M}$ を 37°C で 70 分負荷して観察チャンパー底に貼付け、標本を生理的塩液で灌流しながら上記実験(1)と同じ光学系で蛍光比画像(励起光波長 $340 \text{ nm}/380 \text{ nm}$; 半定量的 Na^+ 画像)をタイムラプス記録。多くの終末シュワン細胞が Ca 応答を示す条件で刺激剤を与えたときの細胞内 Na^+ 濃度変動を解析した。

(3) Na^+ 共輸送体を介したグルタミン酸取り込み

上記実験(2)と同様にして SBFI を負荷した分離標本の蛍光比画像をタイムラプス記録しながら、標本灌流液にグルタミン酸を 1 mM の濃度で加える刺激を 3 分間与えた。

(4) 終末シュワン細胞 Na 応答の高速 2 光子励起顕微鏡解析

SBFI を負荷し観察チャンパー底に張り付けた分離標本を高速 2 光子励起顕微鏡のステージに載せ、パルスレーザー(出力波長 830 nm)で Na^+ 濃度依存的蛍光強度画像をタイムラプス記録しながら、上記実験(2),(3)で終末シュワン細胞の Na 応答が一定の頻度で検出されることが判明した刺激条件を与えた。

グリア細胞の同定は、野生型ではホルマリン固定後のグリア特異蛋白 S100 β 免疫染色、トランスジェニックラットでは生細胞の発する EGFP 蛍光に基づいて行った。

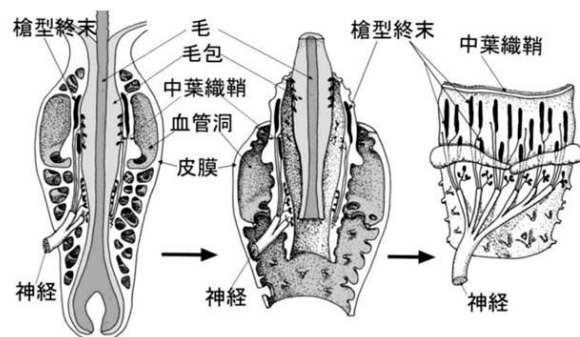


図2. ラット頬ひげ槍型感覚終末分離標本の作製過程

4. 研究成果

(1) ATP 受容体またはグルタミン酸受容体を介した細胞応答

画像記録領域内グリア細胞に刺激剤の投与と関連した一過性 Ca^{2+} 濃度上昇が見られたものを反応陽性とした場合の陽性率は、ATP $20 \mu\text{M}$ で 76% ($n=17$), ATP $100 \mu\text{M}$ で 85% ($n=13$)であった(n は独立実験回数)。次に、このプリン作動性応答の責任受容体を調べるため、S100 β -EGFP トランスジェニックラットの槍型終末分離標本で生きたグリア細胞を同定し Ca^{2+} 画像記録を行った。感覚終末のグリア薄板をつくる終末シュワン細胞に $\text{P}2\text{Y}_2$ 作動薬 UTP の刺激を与えたところ、ATP を投与した場合とほぼ同様の強さの Ca 応答が惹き起こされ、UTP に対する応答は特異的 $\text{P}2\text{Y}_2$ 遮断剤 AR-C 118925XX で完全に抑制された。これに対し、感覚終末につづく太い有髄線維をつくる髄鞘形成シュワン細胞は、 $\text{P}2\text{Y}_1$ 作動薬 ADP に ATP と同様の応答性を示し、この細胞応答は特異的 $\text{P}2\text{Y}_1$ 遮断剤 MRS 2179 で完全に抑制された。槍型終末周辺にみられる星形シュワン様細胞(グリアマーカー S100 β 陽性自由細胞)は終末シュワン細胞と同じく、専ら $\text{P}2\text{Y}_2$ 受容体を機能的に発現していた。

一方、グルタミン酸刺激を与えた実験では、刺激剤濃度 $20 \mu\text{M}$ ($n=5$)と $100 \mu\text{M}$ ($n=10$)で画像

記録領域に細胞応答は検出されず，1 mM で刺激した 5 例中 2 例で槍型終末基部の髄鞘形成シュワン細胞が Ca 応答し，この細胞は ATP 刺激にも応答した（図 3）。終末シュワン細胞はグルタミン酸刺激に不応であった。グルタミン酸刺激に対する細胞応答は検出頻度が少なく，責任受容体を同定するのに十分な回数の薬理学的実験を行うことができなかった。

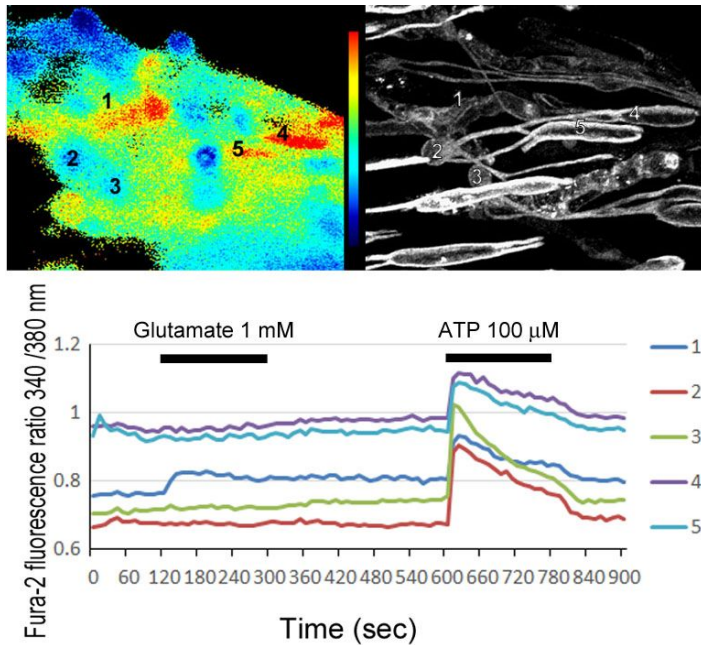


図 3. 槍型終末分離標本の Fura-2 蛍光比画像（左上）と対応する領域の S100β 免疫染色像（右上）。有髄線維に随伴する細胞 1，終末シュワン細胞の細胞体 2，3 とその薄板突起 4，5 に相当する領域の細胞内 Ca²⁺ 濃度経時変化を下のグラフの対応する番号の曲線で示す。バーは，表記物質の標本灌流液を介した投与。

(2) Ca 応答に伴う電位依存性 Na⁺チャネル活性化

分離標本に蛍光性 Na⁺指示薬 SBFI を負荷して観察チャンパーにセットし，終末シュワン細胞の Ca 応答を惹き起こす P2Y₂ 作動薬 UTP 100 μM を標本灌流液に加える実験を行ったが，刺激に関連した細胞内 Na⁺濃度変動を検出することはできなかった（n=8）。

(3) Na⁺共輸送体を介したグルタミン酸の取り込み

SBFI を負荷した分離標本の Na⁺依存的蛍光比画像をタイムラプス記録しながら標本灌流液にグルタミン酸 1 mM を加えたところ，7 例中 1 例で槍型終末基部の髄鞘形成シュワン細胞の各周辺部細胞質 Na⁺濃度上昇を示唆する緩やかな蛍光比増強がみられた（図 4）。

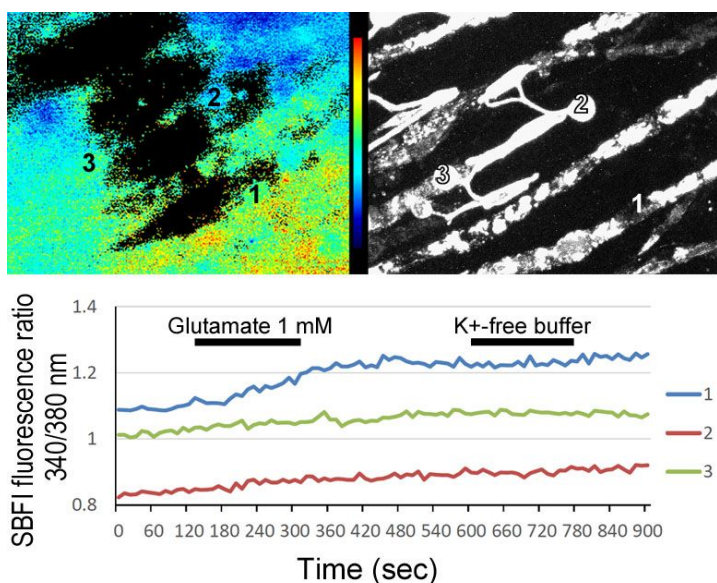


図 4. 槍型終末分離標本の SBFI 蛍光比画像（左上）と対応する領域の S100β 免疫染色像（右上）。有髄線維に随伴する細胞 1 と終末シュワン細胞の細胞体 2，3 に相当する領域の細胞内 Na⁺濃度の経時変化を下のグラフの対応する番号の曲線で示す。バーは，表記の物質の標本灌流液を介した投与。

(4) シュワン細胞 Na 応答の高速 2 光子励起顕微鏡解析

槍型終末分離標本に，Na⁺依存的蛍光強度画像のタイムラプス記録を行いながらグルタミン酸 1 mM の灌流刺激を与えた。終末シュワン細胞の薄板突起と受容体軸索が光学切片上で明瞭

に区別されたものの、パルスレーザー照射による自然退色の影響が強く、刺激に応じた変化を見分けるには至らなかった(図5)。

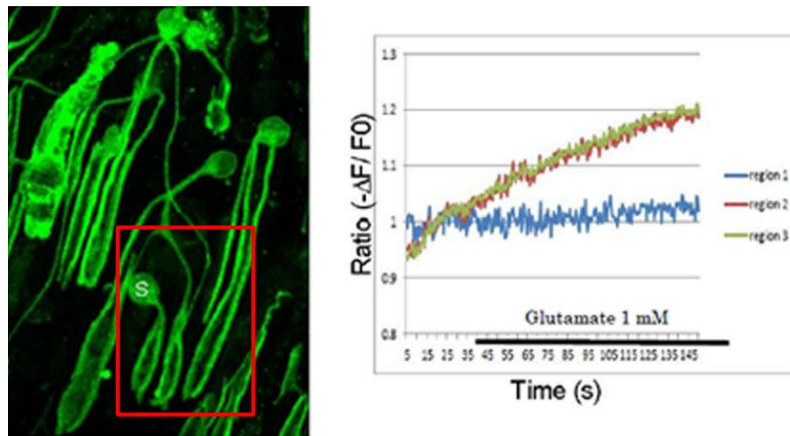
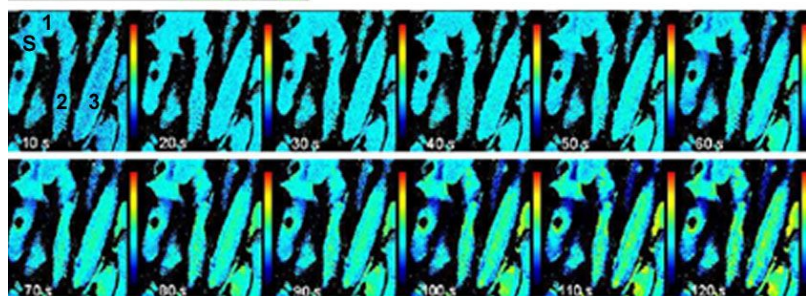


図5. 高速2光子励起顕微鏡による槍型終末分離標本のNa⁺画像記録



画像記録後のS100β免疫染色像を左上に。図下半部に、赤枠領域のSBFI蛍光減弱度(-ΔF/F₀)疑似色表示画像を10秒毎に並べた。1コマ目のS100β陰性細胞1、S100β陽性槍型終末グリア鞘2、3の細胞内Na⁺濃度経時変化を右上のグラフに示す。

(5) 結果のまとめと考察

ラット頬ひげ動き受容器分離標本に蛍光プローブ Fura-2 を用いた Ca 画像化法を応用し、受容器をつくる終末シュワン細胞と受容器周辺の星形シュワン様細胞がグルタミン酸刺激に不応であり、細胞外 ATP に受容体 P2Y₂ を介し Ca 応答することを明らかにした。一方、受容器基部の髄鞘形成シュワン細胞は P2Y₁ を発現する点で上記 2 種グリア細胞と区別され、一部の細胞は比較的高濃度の 1 mM グルタミン酸に Ca 応答した。Na⁺感受性蛍光プローブ SBFI を同じ光学系に応用した画像解析で、一例ではあるが、髄鞘形成シュワン細胞内の緩やかな Na⁺濃度上昇が 1 mM グルタミン酸刺激に一致して検出された。しかし、その意義の検討には、細胞により高濃度のプローブを負荷する方法の工夫や、量子効率の高い蛍光プローブの開発が必要である。

<引用文献>

Honma S et al.: Vesicular glutamate transporter immunoreactivity in the periodontal ligament of the rat incisor. *Anat Rec*, 295, 160—166 (2012)

Gundersen V et al.: Neuroglial transmission. *Physiol Rev*, 95, 695—726 (2015)

Pappalardo LW et al.: Sodium channels in astroglia and microglia. *Glia*, 64, 1628—1645 (2016)

Chatton JY et al.: GABA uptake into astrocyte is not associated with significant metabolic cost: implications for brain imaging of inhibitory transmission. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100: 12456—12461 (2003)

Takahashi-Iwanaga H & Iwanaga T.: Accumulated caveolae constitute subcellular compartments for glial calcium signaling in lanceolate sensory endings innervating rat vibrissae. *J Comp Neurol*, 520: 2053—2066 (2012)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kimura S, Nakamura Y, Kobayashi N, Shiroguchi K, Kawakami E, Mutoh M, Takahashi-Iwanaga H, Yamada T, Hisamoto M, Nakamura M, Udagawa N, Sato S, Kaisho T, Iwanaga T, Hase K.	4. 巻 11
2. 論文標題 Osteoprotegerin-dependent Mcell self-regulation balances gut infection and immunity.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nat Commun	6. 最初と最後の頁 234
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-019-13883-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Iwanaga T, Nio-Kobayashi J, Takahashi-Iwanaga H.	4. 巻 40
2. 論文標題 Bush-like integrin filament networks associated with hyaloid vasculature in murine neonate eyes.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biomed Res	6. 最初と最後の頁 79-85
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2220/biomedres.40.79	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Itabashi T, Arima Y, Kamimura D, Higuchi K, Bando Y, Takahashi-Iwanaga H, Murakami M, Watanabe M, Iwanaga T, Nio-Kobayashi J.	4. 巻 118
2. 論文標題 Cell- and stage-specific localization of galectin-3, a β -galactoside-binding lectin, in a mouse model of experimental autoimmune encephalomyelitis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neurochem Int	6. 最初と最後の頁 176--184
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuint.2018.06.007.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kishimoto A, Kimura S, Nio-Kobayashi J, Takahashi-Iwanaga H, Park AM, Iwanaga T.	4. 巻 172
2. 論文標題 Histochemical characteristics of regressing vessels in the hyaloid vascular system of neonatal mice: Novel implication for vascular atrophy.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Exp Eye Res	6. 最初と最後の頁 1--9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.exer.2018.03.024.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kishimoto A, Kimura S, Nio-Kobayashi J, Takahashi-Iwanaga H, Park AM, Iwanaga T	4. 巻 172
2. 論文標題 Histochemical characteristics of regressing vessels in the hyaloid vascular system of neonatal mice: Novel implication for vascular atrophy.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Exp Eye Res	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.exer.2018.03.024.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 岩永ひろみ
2. 発表標題 ラット槍型感覚終末星形シュワン様細胞でのプリン作動性信号を介した細胞外シグナル調節キナーゼ (ERK)の活性化
3. 学会等名 日本解剖学会第65回東北・北海道連合支部学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩永ひろみ
2. 発表標題 ラット洞毛槍型感覚終末星形シュワン様細胞でのプリン作動性信号を介した細胞外シグナル調節キナーゼ (ERK)活性化とその機構
3. 学会等名 第125回日本解剖学会全国学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岩永ひろみ, 堤元佐, 大友康平, 岩永敏彦, 根本知己
2. 発表標題 ラット頬ひげ動き受容器周辺の星形シュワン様細胞におけるCa信号の生成と伝播 高速2光子励起顕微鏡による解析
3. 学会等名 第124回 日本解剖学会全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩永ひろみ, 岩永敏彦
2. 発表標題 ラット頬ひげ動き受容器周辺のグリア細胞種間に見られる機能的ATP受容体亜型の棲み分け
3. 学会等名 第123回日本解剖学会全国学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takahashi-Iwanaga H
2. 発表標題 Purinoreceptor P2Y2 mediates activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK) in stellate Schwann-like cells associated with lanceolate sensory endings innervating rat vibrissae.
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会 / 第98回日本生理学会大会 合同大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------