

平成21年 5月 7日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007-2008
 課題番号：19590184
 研究課題名（和文） 感覚装置グリア網におけるATP誘発性信号の伝播特性と機能連関
 研究課題名（英文） ATP-evoked signals in glial nets associated with sensory devices: Their properties in propagation and coupling to functions.
 研究代表者
 岩永 ひろみ (TAKAHASHI-IWANAGA HIROMI)
 北海道大学・大学院医学研究科・准教授
 研究者番号：30193759

研究成果の概要:皮膚感覚装置グリア細胞は分岐する突起で連絡し合い、軸索終末間に広がる網をなす。このグリアの細胞外ATP刺激に対するCa応答について、伝播の時空特徴と制御因子を明らかにするため、ラット髭の動き受容器、槍型終末分離標本の生理実験と信号関連分子の組織化学を行なった。各軸索終末に伴行するグリア突起は、局所ATP刺激に対し独自のCa信号を生成し得る機能単位であり、信号の突起内局在化への細胞外ATP分解酵素の貢献が示された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：細胞生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：感覚神経終末，終末シュワン細胞，カルシウム画像，アデノシン5'三リン酸

1. 研究開始当初の背景

アデノシン三リン酸(ATP)は、ニューロン間の伝達物質として、また、グリアや上皮細胞など非興奮性細胞間の信号物質として、広く生体機能の調節に関わる。グリア細胞では、細胞膜のATP受容体が刺激をうけると細胞内Ca²⁺濃度が一過性に上昇し、これが二次信号として、神経活性物質の分泌、細胞外液のイオン濃度調節などのグリア活動を引き起こす結果、周囲のニューロンにさまざまな調節効果をもたらす。最近のCa²⁺感受性蛍光試薬を用いた画像化技術は、このATP受容体活性化に基づくグリア信号が細胞間を波として伝播することを明らかにし、それによって営まれるグリア細胞の協調的活動が、離れた

ニューロン間を機能的に連結する可能性を提示した。しかし、今日までの報告の多くは培養系の実験に基づいており、実際の神経組織で、信号物質ATPがとりもつグリア・ニューロン間の相互作用が、どのような空間的規模と時間経過をもって行われるかは、まだ、十分に明らかでない。

マイスナー触覚小体など皮膚感覚装置のグリアである、終末シュワン細胞は、分岐する突起でつながり合い、異なるニューロンの軸索終末間を連絡する網をなす。私たちは、これまでに、ラット頬ひげの動き受容器槍型神経終末を酵素で生きたまま分離する方法を考案し、Ca²⁺画像化技術を応用して、この末梢性グリアが、ATP受容体分子亜型P2Y₂

を発現していること、機械刺激に応じて ATP を傍分泌し、細胞間に広がる Ca^{2+} 波を生じることを明らかにした。一方、ATP は、神経終末から自己分泌的に放出される、感覚調節物質として知られる。したがって、この生理活性物質の惹き起こすグリア信号の生成・伝播過程を詳細にすることは、皮膚知覚のしくみを明らかにし、中枢、末梢神経系のグリアの機能を理解する上で、重要な問題となる。

2. 研究の目的

感覚神経終末のグリア網を伝播する ATP 誘発性 Ca^{2+} 信号の時間・空間的特性を明らかにし、その機能的意義を考察することをめざし、具体的に以下の点を目的とする研究を行った。

(1) 感覚神経終末をグリア網とともに生きたまま分離し、グリア細胞の局所にガラス細針で軽く触れるやり方で機械刺激を与えたときの細胞応答を Ca^{2+} 画像として記録・解析し、グリア網における刺激誘発性 ATP 放出部位とその効果が及ぶ空間的範囲を特定する。

(2) ATP 作動性信号やそれによって賦活される細胞内 Ca^{2+} 信号系のさまざまな段階に影響を及ぼす薬剤の存在下に (1) と同様の実験を行ない、グリア信号生成・伝播の調節機構を考察する。

(3) 感覚終末のグリア網を構成するシュワン細胞の形態成熟に伴う、ATP 受容体と ATP 分解酵素の発現変化を上記生理実験に加え、免疫組織化学と酵素組織化学で追跡する。

3. 研究の方法

(1) ラット頬ひげの動き受容器 槍型神経終末を観察材料とし、実体顕微鏡下の微小解剖と恒温振盪器内でのコラゲナーゼ消化を組み合わせた方法によって、頬ひげ毛包頸部を囲む槍型終末を、周囲結合組織とともに膜片標本として生きたまま分離し (図 1)、これを用いて、以下の実験①-③を行なった。

①分離標本に蛍光性 Ca^{2+} 指示薬 fluo-4 を負荷したのち、培養液を満たした観察チャンバー底に貼り付け、倒立式レーザー共焦点顕微鏡のステージに載せ、マイクロマニ

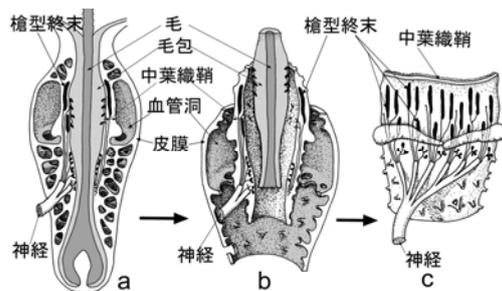


図 1. 槍型感覚終末分離標本の作成過程を示す模式図

ピュレーターに取り付けたガラス細針の先端で一個の終末シュワン細胞のさまざまな部位に軽く触れて刺激を与え、刺激点周囲のグリア網の細胞内 Ca^{2+} 濃度変化をコマ落とし画像として記録した。

②標本培養液中に信号物質 ATP の分解酵素 apyrase、または、組織に内在する細胞外 ATP 分解酵素の阻害剤 β γ -methylene ATP を加えて上記①と同様の実験を行ない、機械刺激誘発性 ATP 分泌に対する周囲細胞 Ca^{2+} 応答の空間的広がりや時間経過の変化を解析した。

③生後 30 日令の若いラットの槍型終末分離標本で、ニューロン軸索に随伴しない、未熟なシュワン細胞における ATP 受容体分子亜型の発現を生理・薬理的に検討した。

(2) 毛包槍型神経終末のほか、切歯乳頭ルフィニ終末、指腹皮膚マイスナー様小体など、皮膚・粘膜に分布する種々の感覚装置について、以下の組織学的検索①、②を行ない、ATP 誘発性信号が広く感覚調節に関与する可能性について検討した。

①Karnovsky 固定標本の凍結切片を作成し、Braun らの方法(2003)に従って ATP 分解酵素の酵素組織化学を行い、感覚終末における同酵素の局在を調べた。

②未固定凍結切片を作成し、常法に従った *in situ* hybridization 法を行い、感覚終末グリア細胞における細胞外 ATP 分解酵素分子亜型の遺伝子発現を調べた。

4. 研究成果

(1) 槍型終末分離標本刺激実験の結果

①正常培養液中の分離槍型終末の一つにガラス針を軽く触れると、 Ca^{2+} 信号が、探針接触点から 30 μ m 以内の槍型終末を包むグリアの薄板突起間に広がった (図 2)。信号は、各薄板突起固有の生成焦点に始まり、その薄板内に限って伝播した。薄板突起の応答潜時は、探針接触点からの距離が離れるほど、長くなった。

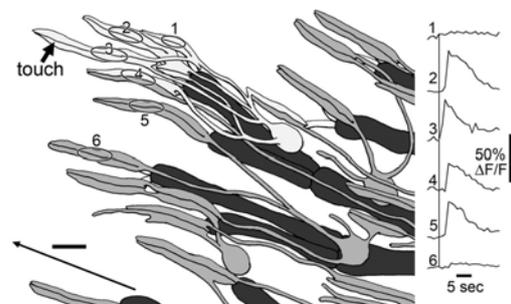


図 2. 分離槍型終末シュワン鞘の機械刺激に対する Ca^{2+} 応答。S100 蛋白免疫染色標本のトレース。短矢印が探針接触点。長矢印は毛軸。スケール 10 μ m。

②標本培養液に ATP 分解酵素 apyrase を加えて同様の機械刺激実験を行なったところ、グリア薄板間の Ca^{2+} 信号伝播範囲が有意に縮小した (表 1)。また、細胞外 ATP 分解酵素阻害剤 $\beta\gamma$ -methylene ATP の存在下では、薄板間信号伝播範囲が有意に拡大し、各グリア薄板の生成焦点に始まる Ca^{2+} 濃度上昇は、ときに、その突起が由来するシュワン細胞体にまで広がった。

表 1. 各種培養液中のグリア薄板間信号伝播半径

	mean \pm SD (μ m)
normal control	23.2 \pm 5.3
suramin 100 μ M	10.2* \pm 5.5
apyrase 20 U/mL	9.3* \pm 5.1
$\beta\gamma$ -methyleneATP 300 μ M	45.3* \pm 5.7

各群 20 回の独立した実験の計測値に基づく。*印は、危険率 5% で、正常対照に比較し統計的有意差を検出。

③生後 30 日令ラットの槍型終末分離標本を、灌流液を介し ATP 受容体亜型 $P2Y_1$ 作動薬 2methylthio-ATP および $P2Y_2$ 作動薬 UTP で刺激したところ、軸索に随伴しない未熟多極型シュワン細胞、槍型軸索終末に薄板突起を伴わせる終末シュワン細胞ともに、後者の刺激剤だけに応答を示した。これに対し、分離標本に混入する毛細血管の内皮細胞は、前者のプリン作動薬に応答した (図 3)。

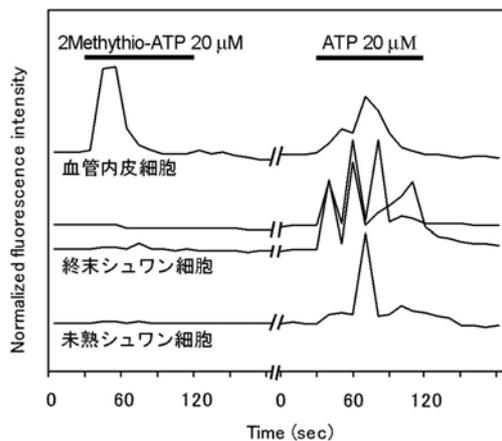


図 3. 終末シュワン細胞も未熟型シュワン細胞も $P2Y_1$ 作動薬 2-メチルチオ-ATP に応答する。

(2) 種々の感覚終末の組織学的検索

①固定組織切片の ATP 分解酵素組織化学では、ラット歯根膜ルフィニ知覚終末、頬ひげ毛包槍型終末の他、サル指腹皮膚マイスナー小体のグリア細胞表面に ATPase 活性が検出され、陽性反応は、とくに、軸索終末を

包むグリア薄板で強かった。

②マウスの組織切片で ^{35}S 標識 DNA プローブを用いたオートラジオグラフィによる *in situ* hybridization を行ない、細胞外 ATPase 分子亜型 ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 および 2 の遺伝子発現を調べた。どちらの酵素亜型も、陽性反応を示す銀粒子の集積が、切歯乳頭ルフィニ終末と指腹皮膚マイスナー小体に中等度にみられた。

(3) 結果のまとめと考察

今日までの培養系での実験によれば、グリア細胞を含む多くの細胞種が、機械刺激誘発性 ATP 放出とそれに続く周囲細胞の ATP 受容体活性化に基づき、細胞間を伝播する Ca^{2+} 波を示す。本研究の分離槍型終末機械刺激実験で、探査針接触点周辺にみられたグリア薄板間 Ca^{2+} 信号伝播も、同様の機構により、刺激局所から遊離する ATP に対し、各薄板突起が自身のプリン受容体 $P2Y_2$ を介して応答する結果生じると考えられる。というのも、この細胞応答は、抗プリン作動薬 apyrase 感受性で、応答潜時は ATP 放出源からの距離に依存したからである。

槍型終末グリア細胞の各薄板突起は、局所 ATP 刺激に対し、一定の信号生成焦点に始まり、その薄板内に限局する Ca^{2+} 応答を生成することによって、それぞれ、伴行する軸索終末に独自の調節効果を及ぼし得る機能単位と見なされよう。この細胞内小区域に局在する Ca^{2+} 信号系に、区域固有の信号生成焦点の存在は重要な役割を果たすと考えられ、その形態・分子背景の解明が、今後の研究課題である。また、本研究は、感覚終末グリア細胞の産生する細胞外 ATP 分解酵素が、細胞内区域に限局する信号の伝播調節に貢献することを明らかにした。

若いラットの分離槍型終末を用いた生理実験は、槍型軸索終末を薄板突起で包む、成熟グリア細胞と同様に、軸索の被覆に関与しない未熟グリア細胞が、機能的プリン受容体を発現していることを示した。これは、細胞外 ATP を介した細胞間相互作用が、皮膚感覚装置グリア細胞の形態形成、機能維持に深く関わることを示唆する。

今までの培養細胞での報告と今回の分離組織標本での観察を総合すると、生体内の頬ひげ毛包周囲槍型終末で行なわれる、ATP を介したグリア-ニューロン相互作用について、次のような可能性が予測される。まず、頬ひげが外力によって曲げられると、ニューロン軸索から興奮依存的に、また、グリア細胞自身や毛包上皮細胞などの非興奮性細胞から機械刺激誘発性に、ATP が遊離する (図 4 a)。これらの ATP 放出源が協調して働き、さらに、信号物質が拡散する結果、グリア薄

板の Ca^{2+} 信号活性化は、毛の動きによる毛包組織の変形が大きい領域で受容体軸索の興奮と同時に起こるのに加えて (図 4b)、刺激入力域周辺の休止状態の槍型軸索をも巻き込む (図 4c)。ラットは頬ひげを規則的に動かして外界の事物をくり返しなぞり、その性状を認識することが知られる。この行動で、前者のグリア信号は、軸索周囲イオン環境の調節を促して、刺激の中心領域の機械受容器がくり返し興奮するのを助け、後者のグリア信号は、グリア性伝達物質の放出を惹き起こし、刺激周辺領域の受容体の興奮性調節に貢献する (図 4d)。これらの可能性の検証には、今後、より器官に近い標本での生理実験が必要であろう。

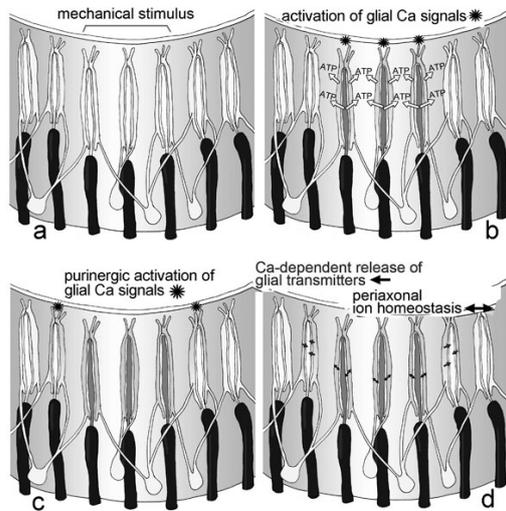


図 4. 毛の動きによって惹き起こされる槍型終末グリア鞘の Ca 信号と、その予想される役割を模式的に示す。

5. 主な発表論文等 (研究代表者に下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① Takebe K, Nio-Kobayashi J, Takahashi-Iwanaga H, Yajima T, Iwanaga T: Cellular expression of a monocarboxylate transporter (MCT1) in the mammary gland and sebaceous gland of mice. *Histochem Cell Biol*, 131: 401-409, 2009. 査読有
- ② Nio-Kobayashi J, Takahashi-Iwanaga H, Iwanaga T: Immunohistochemical localization of six galectin subtypes in the mouse digestive tract. *J Histochem Cytochem*, 57: 41-50, 2009. 査読有
- ③ Takebe K, Nio-Kobayashi J, Takahashi-Iwanaga H, Iwanaga T: Histochemical demonstration of monocarboxylate transporter in the perineurium of mice with special reference to GLUT1. *Biomed Res*, 29: 297-306, 2008. 査読有

- ④ Takahashi-Iwanaga H, Nio-Kobayashi J, Habara Y, Furuya K: A dual system of intercellular calcium signaling in glial nets associated with lanceolate sensory endings in rat vibrissae. *J Comp Neurol*, 510: 68-78, 2008. 査読有
- ⑤ Yanase H, Takebe K, Nio-Kobayashi J, Takahashi-Iwanaga H, Iwanaga T: Cellular expression of a sodium-dependent monocarboxylate transporter (Slc5a8) and the MCT family in the mouse kidney. *Histochem Cell Biol*, 130: 957-966, 2008. 査読有
- ⑥ Ishikawa H, Naito T, Iwanaga T, Takahashi-Iwanaga H, Suematsu M, Hibi T, Nanno M: Curriculum vitae of intestinal intraepithelial T cells: their developmental and behavioral characteristics. *Immunol Rev*, 215: 154-165, 2007. 査読有
- ⑦ Hisatsune C, Yasumatsu K, Takahashi-Iwanaga H, Ogawa N, Kuroda Y, Yoshida R, Ninomiya Y, Mikoshiba K: Abnormal taste perception in mice lacking the type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *J Biol Chem*, 282: 37225-37231, 2007. 査読有

[学会発表] (計 3 件)

- ① 岩永ひろみ, 岩永敏彦. サル膵臓導管系在部における水チャネルアクアポリン1の発現. 第114回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2009年3月29日, 岡山.
- ② 岩永ひろみ. ラット頬ひげの槍型知覚終末におけるATPを介したグリア信号系. 第113回日本解剖学会 全国学術集会シンポジウム「皮膚・口腔領域における感覚研究の進展」, 2008年3月29日, 由布.
- ③ 岩永ひろみ: 皮膚・結合組織の知覚終末グリア細胞におけるecto-ATPaseの局在とその役割について. 生理学研究所研究会「生体システム間境界領域におけるATP・アデノシン情報伝達の役割」, 2007年9月7日, 岡崎.

[その他]

ホームページ

<http://www.med.hokudai.ac.jp/~anat-3w/kenkyu.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩永 ひろみ (TAKAHASHI-IWANAGA HIROMI)
北海道大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号: 30193759

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし