

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20570157

研究課題名（和文） 顕微光学法による神経-免疫シナプス構築の分子機構とその機能解析

研究課題名（英文） Functional analysis of neuro-immune synapse structure by molecular imaging.

研究代表者

古野 忠秀 (FURUNO TADAHIDE)

愛知学院大学・薬学部・准教授

研究者番号：80254308

研究成果の概要（和文）：

これまで生体内の独立したシステムであると考えられてきた神経系と免疫系の間には密接な相互作用が存在し、両者の接着を介した相互作用が生体機能を巧妙に調節していると考えられ始めている。本研究では、神経細胞と免疫細胞の効率的な相互作用を担う接着構造に着目し、それに関わる接着分子の機能解析を行った。その結果、接着分子 CADM1 が神経細胞とマスト細胞（アレルギーに関わる免疫細胞）の接着および相互作用に重要な役割を果たしていることを見出した。

研究成果の概要（英文）：

There has been an exponential increase in data illustrating that the nervous and immune systems are not disparate entities. The nerve-mast cell relationship has served as a prototypic association and has provided substantial evidence for bidirectional communication between nerves and immune cells. Mast cells are closely apposed to nerves in a variety of tissues including skin, intestine, and dura mater. Some mast cells actually form membrane-membrane contact with nerve cells. However, the molecules that sustain this association have not been identified. We here found that an adhesion molecule named cell adhesion molecule 1 (CADM1) on mast cells predominantly mediated the attachment to neurites and promoted their functional communication. In addition, among splicing variants of CADM1, the shortest isoform CADM1d showed a unique feature for the contact strength and communication efficiency in nerves and mast cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：生物物理学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：神経細胞、マスト細胞、接着分子、情報伝達、アレルギー、画像解析

1. 研究開始当初の背景

神経系と免疫系は生体内の独立したシステムであると考えられてきた。しかし、神経科学と免疫学の急速な進展により、神経系と免疫系の間には密接な相互作用が存在し、両者の相互作用が生体機能を巧妙に調節していることが明らかになってきた。神経支配は胸腺や脾臓などのリンパ組織や気道や小腸などの粘膜組織に及び、そのような組織では神経線維と免疫細胞が接着している様子が観察されていた。リンパ組織ではマクロファージやリンパ球が、また、粘膜組織ではマスト細胞が神経終末と数十ナノメートルの間隙を介してシナプス様の構造で接着していることが明らかになっていた。これらのことから、両細胞は「神経-免疫シナプス」を介して高度な生命秩序を維持しており、ストレスなどによる両者の相互作用の変調が炎症性疾患や自己免疫疾患の原因になると考えられてきた。例えば、消化器系組織における両細胞の相互作用の変調が炎症性腸疾患の原因になること、また、皮膚組織では皮膚炎の悪性化、慢性化、難治化につながるだけでなく痛みや痒みのような感覚受容にも悪影響を及ぼすことなどが分かりつつあった。また、中枢においても両細胞の相互作用の異常が血液脳関門の透過性を上昇させ、多発性硬化症などのさらに重篤な疾病を引き起こす引き金になることが報告されていた。したがって、両者の相互作用の分子細胞レベルでの解明は、生命科学における重要で緊急性の高い研究課題になっていた。しかし、神経細胞と免疫細胞がどのように互いを認識して接着するのか、また、両細胞がどのように情報交換しているのかについては、分子細胞レベルでほとんど明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

上述の点を踏まえて、本研究ではまず神経-免疫シナプスを構成する接着分子及び受容体を同定し、それらの細胞膜における動的な局在変化を追究して、シナプス構築過程の分子機作を明らかにすることを目的とした。次に、神経-免疫シナプスを介した活性化シグナルが細胞内にどのような分子機構で伝達されていくのかを明らかにするとともに、シナプスを介した両細胞の接着により、それぞれの細胞にどのような性質（特に細胞応答性）の変化が引き起こされているのかを追究し、その分子機構を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

(1)細胞

上頸神経節細胞 (superior cervical ganglia; SCG) および後根神経節細胞 (dorsal root ganglia; DRG) は、生後4日以内の Balb/c 新

生児マウスから単離して、マトリゲルコートしたガラスボトムディッシュに播種し、50 ng/ml 神経成長因子 (nerve growth factor; NGF) を含んだ F-12 培地で培養した。骨髓由来マスト細胞 (bone marrow-derived mast cell; BMMC) は 8~10 週齢の Balb/c マウスから単離した骨髓細胞を 10 ng/ml インターロイキン-3 (IL-3) および 2 ng/ml 幹細胞因子 (stem cell factor; SCF) を含んだ DMEM 培地で3週間以上培養して、マスト細胞に分化させることによって得た。神経芽細胞腫 Neuro2a と細胞膜α細胞株 αTC6 細胞は DMEM 培地で、マスト細胞株 IC-2 細胞は αMEM 培地で培養した。

(2)接着率の測定

あらかじめ神経細胞を培養してあるディッシュに 1×10^4 個のマスト細胞を加えて3時間培養した後、接着しなかった細胞を取り除いた。そして、顕微鏡を用いて神経細胞とマスト細胞の細胞数を数え、神経細胞1個あたりに接着しているマスト細胞の数を接着率として算出した。

(3)免疫染色

共存培養した細胞をパラホルムアルデヒドで固定し、Triton X-100 で可溶化した。抗体を加えて PBS で洗った後、蛍光標識二次抗体を加えて同様に PBS で洗った。試料は共焦点レーザー顕微鏡 (LSM-510META) を用いて観察した。

(4)カルシウムイメージング

共存培養した細胞をカルシウムイオン特異的蛍光試薬 Fluo 3-AM または Fluo 8 NW で標識し、HEPES 緩衝液で洗った。測定は HEPES 緩衝液中で、共焦点レーザー顕微鏡を用いて行った。

(5)接着効率の測定

共存培養ディッシュの中の神経細胞とマスト細胞が接着している部分の近傍にフェムト秒レーザーを照射した。マスト再オブが神経突起からはがれない場合には、徐々に照射位置を近づけていき、最終的にはがれた時のレーザー照射位置までの距離をヒストグラムとしてまとめた。

4. 研究成果

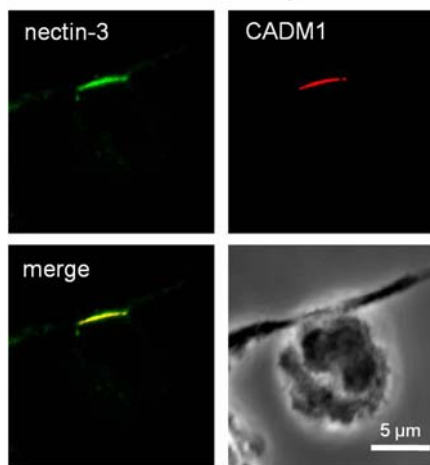
(1)神経細胞とマスト細胞の相互作用における CADM1 の役割

我々は、SCG と BMMC には接着分子 CADM1 が発現しており、両細胞を共存培養すると、CADM1 のホモフィリックな結合によって両細胞が接着することを明らかにし、その結果を原論文として公表していた。その研究の過程で、感覚神経節細胞である DRG は SCG に比べて、CADM1 の発現量が顕著に少ないことを見出ししていた。しかし、興味深いことに、DRG と BMMC を共存培養すると、DRG の神経突起に BMMC が接着する様子が観察され、両者の接着部位には BMMC

が発現している CADM1 が集積していることが分かった。そこで、CADM1 を発現していないマスト細胞株 IC-2 細胞を用いて DRG への接着効率を測定した。その結果、IC-2 細胞の接着率 ($0.11 \pm 0.02/\text{DRG}$) は BMMC の接着率 ($0.34 \pm 0.03/\text{DRG}$) に比べて有意に低かったが、IC-2 細胞に CADM1 を発現させると接着率 ($0.36 \pm 0.04/\text{DRG}$) が BMMC と同じレベルまで増加することが分かった。さらに、神経刺激に伴うマスト細胞のカルシウム応答率を測定したところ、IC-2 細胞の応答率は低かったが ($17.5 \pm 2.0\%$)、この細胞に CADM1 を発現させると、応答率はやはり BMMC と同じレベルまで回復した ($42.0 \pm 4.0\%$ と $33.5 \pm 2.0\%$)。このことから、マスト細胞に発現している CADM1 は DRG に発現している他の接着分子とヘテロフィリックに結合していると考えられた。

そこで、CADM1 と結合することが報告されている接着分子 nectin-3、Necl-1、Necl-5、CRTAM の DRG における発現を RT-PCR にて調べたところ、これらの中では nectin-3 のみを発現していることが分かった。実際に、nectin-3 の細胞外ドメインを認識する中和抗体の存在下では、BMMC および CADM1 を発現させた IC-2 細胞の DRG への接着効率が有意に抑制された ($0.16 \pm 0.02/\text{DRG}$)。また、神経刺激に伴うこれらマスト細胞のカルシウム応答率も顕著に抑制された ($25.5 \pm 1.5\%$)。これらの抑制は、非特異的抗体存在下では全く起こらなかった。さらに、CADM1 と nectin-3 が両細胞の接着部位に共局在していることも明らかになった (図1)。これらの結果から、DRG とマスト細胞の接着にはマスト細胞に発現している CADM1 と DRG に発現している nectin-3 のヘテロフィリックな結合が大きな役割を果たしていると考えられた。

図1 神経-マスト細胞の接着部位における CADM1 と nectin-3 の共局在



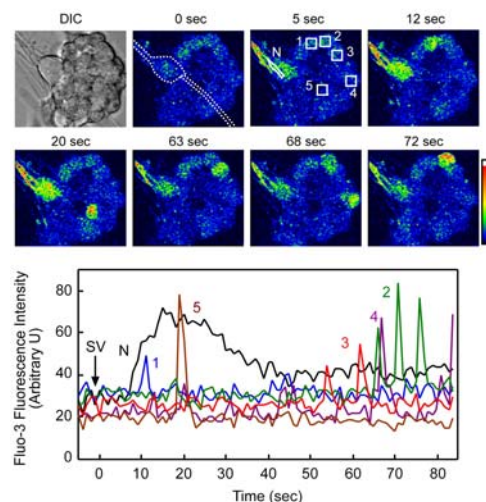
(2) 細胞間相互作用における CADM1 の寄与
これまでの結果から、神経細胞とマスト細胞

の接着および相互作用には CADM1 が深く関与していることが明らかになった。ところで、CADM1 は神経やマスト細胞だけでなく他の細胞に発現していることも知られている。例えば、膵臓α細胞にも CADM1 の発現が見られる。そこで、膵臓α細胞株 αTC6 細胞を SCG と共存培養することにより、両細胞の相互作用を追究した。αTC6 細胞はコロニーを作って増殖し、CADM1 はその接着部位に局在していた。一方、SCG と αTC6 細胞を共存培養すると、SCG の神経突起に αTC6 細胞が接着する様子が観察され、両細胞の接着部位には CADM1 が集積していることが分かった。両細胞の接着は CADM1 の細胞外領域を認識する中和抗体によって抑制された。このことから、SCG と αTC6 細胞の接着に CADM1 が関与していることが明らかになった。

次に、SCG 刺激に伴う αTC6 細胞のカルシウム動態を観察した。神経突起と接着している αTC6 細胞では、神経突起のカルシウムイオン濃度の上昇後に、パルス的なカルシウムイオン濃度上昇が観察された。一方、突起と接着していない αTC6 細胞ではカルシウムイオン濃度上昇が起こらなかった。また、αTC6 細胞がコロニーを形成している場合には、神経突起と接着している細胞から波状にカルシウムシグナルが伝播していく様子も観察された (図2)。SCG 刺激に伴う αTC6 細胞のカルシウム応答率は RNA 干渉によって CADM1 の発現を減少させると有意に抑制された ($34.7 \pm 6.4\%$ から $6.9 \pm 2.0\%$)。このことから、神経細胞と膵臓α細胞の細胞間相互作用に CADM1 が重要な役割を果たしていると考えられた。

実際に、膵島細胞がんにおいて、膵島に CADM1 の発現が見られない患者は、CADM1 の発現が見られる患者に比べて、膵臓機能が低下している割合が有意に高いことが明らかになっている (12/14 (CADM1⁻) と 1/7 (CADM1⁺))。

図2 神経刺激に伴う αTC6 細胞のカルシウム応答

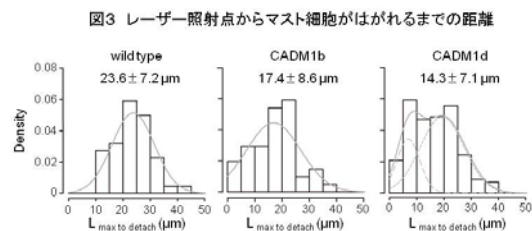


(3) 神経細胞とマスト細胞の接着力と相互作用の相関～CADM1 スプライシングバリエーションの機能～

最近、マウス神経細胞に発現する CADM1 には少なくとも 4 種類のスプライシングバリエーション (isoform a, b, c, and d) が存在することが明らかになった。Isoform a, b, c の 3 種は胎児期から発現が見られるが、最も短い isoform d (CADM1d) は胎児期には発現が見られず、生後 14 日以降に発現が見られる。一方、マスト細胞に発現している CADM1 は isoform c (CADM1c) であることが分かっている。そこで、これらスプライシングバリエーションが神経細胞とマスト細胞の相互作用に及ぼす影響を追究した。

神経系細胞としては Neuro2a 細胞を用いた。Neuro2a 細胞は内在性に CADM1c を発現している。CADM1 のスプライシングバリエーションの機能解析をするため、Neuro2a 細胞に CADM1b または CADM1d を発現させた細胞株をそれぞれ樹立し、CADM1c を発現しているマスト細胞と共存培養した。

まず、Neuro2a 細胞とマスト細胞の接着力を測定した。接着力の測定には、フェムト秒レーザーパルスを用いた。フェムト秒レーザーパルスを集光させると、多光子吸収による衝撃波とキャビテーションバブルが生じ、熱発生を極限まで抑えた「マイクロ津波」が発生する。これを利用して、パルス照射によって接着していた細胞がはがれた時に、集光点と接着部位との距離から働いた細胞がはがれるのに要した力を算出した。その結果、CADM1d を発現させた Neuro2a 細胞とマスト細胞の接着力が最も大きいことが分かった (図 3)。

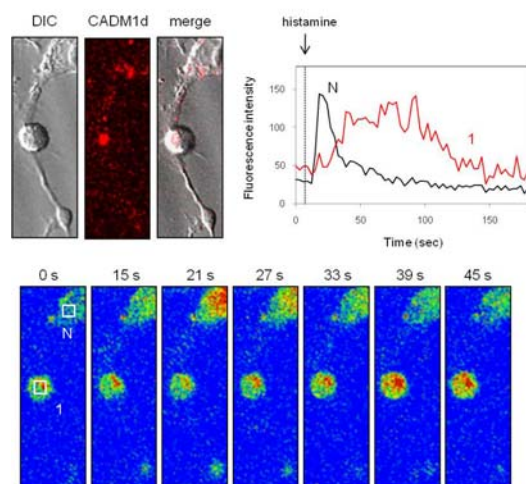


次に、Neuro2a 細胞の活性化に伴うマスト細胞のカルシウム応答率を測定した。その結果、予想通り、CADM1d を発現させた Neuro2a 細胞が最も効率よくマスト細胞のカルシウム応答を誘導することが分かった (66.4% (CADM1d) と 40.2% (wild type)、40.4% (CADM1b))。また、マスト細胞の細胞内分泌顆粒の動態をキナクリンを用いて観察することにより、カルシウム応答した細胞では脱顆粒が起こっていることも分かった。このことから、CADM1 のスプライシングバリエーションのうち、マウスで生後 14 日以降に発現が

見られる CADM1d が神経細胞とマスト細胞の最も強い接着を生み出し、最も効率よくシグナルを伝達することができると考えられた。

このことをさらに明らかにするために、赤色蛍光蛋白質 (red fluorescent protein; RFP) を融合した CADM1d を Neuro2a 細胞に発現させ、マスト細胞との接着部位に CADM1d の集積が見られる場合と見られない場合 (内在性の CADM1c が接着に関わっている場合) とに分けて、マスト細胞のカルシウム応答率を計測した (図 4)。その結果、やはり、接着部位に RFP が見られるマスト細胞の方がカルシウム応答率が有意に高かった (62.7% (RFP あり) と 38.3% (RFP なし))。

図4 接着部位にCADM1dが集積したマスト細胞のカルシウム応答



これらの結果から、発生が進むと神経での発現が見られるようになる CADM1d が、マスト細胞との効率の良い相互作用に深く関わっていることが明らかになった。

(4) 神経-マスト細胞の相互作用に関わる他の接着分子

これまで CADM1 に焦点を当てて、神経-マスト細胞相互作用の研究を行ってきたが、CADM1 が発現していない細胞においても接着は見られた。そこで、両細胞の接着に関する他の分子を同定することを試みた。

N-カドヘリンは神経細胞のシナプス形成と維持に重要な役割を果たしているが、我々は以前にマスト細胞にも N-カドヘリンが発現していることを見出し、原論文として報告している。そこで、DRG と BMSC の接着における N-カドヘリンの寄与を調べた。その結果、N-カドヘリンの細胞外領域を認識する中和抗体の存在下では、両細胞の接着効率が抗体の濃度依存的に減少することが分かった。現在、神経-マスト細胞の相互作用における N-カドヘリンの機能を解析中である。

(5) まとめ

本研究では、神経細胞とマスト細胞の in

in vitro 共存培養系を用いて、両細胞の細胞間シグナル伝達に関わる接着分子（特に CADM1）の機能解析を中心に研究を展開してきた。得られた研究成果は非常に新規性の高いものであり、その結果の一部は原論文や学会発表を通じて公表し、当該分野に高いインパクトを与えたと考えている。当初設定した目的としては、接着による細胞の性質変化の解析という難しい課題へのアプローチが残されている。これまで得られた結果を基盤に、in vivo への展開も併せて視野に入れながら、この分野の研究の進展に寄与していきたい。

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 10 件）

- ① Hagiya, M., Furuno, T., Hosokawa, Y., Iino, T., Ito, T., Inoue, T., Nakanishi, M., Murakami, Y., Ito, A.: Enhanced nerve-mast cell interaction by a neuronal short isoform of cell adhesion molecule-1, CADM1. *J. Immunol.*, in press. 査読有
- ② Inoh, Y., Furuno, T., Hirashima, N., Kitamoto, D., Nakanishi, M.: The ratio of unsaturated fatty acids in biosurfactants affects the efficiency of gene transfection. *Int. J. Pharm.*, **398**, 225-230. (2010) 査読有
- ③ Miyazu, S., Furuno, T., Nakanishi, M.: Phosphorylation states of STAT3 and ERKs in mouse embryonic stem cells. *Cell Biol. Int.*, **34**, 485-492. (2010) 査読有
- ④ Hoshino, Y., Hirashima, N., Nakanishi, M., Furuno, T.: Inhibition of degranulation and cytokine production in bone marrow-derived mast cells by hydrolyzed rice bran. *Inflamm. Res.*, **59**, 615-625. (2010) 査読有
- ⑤ Nakanishi, M., Inoh, Y., Kitamoto, D., Furuno, T.: Nano vectors with a biosurfactant for gene transfection and drug delivery. *J. Drug Deliv. Sci. Tech.*, **19**, 165-169. (2009) 査読有
- ⑥ Inoh, Y., Furuno, T., Hirashima, N., Nakanishi, M.: Non-viral vectors with a biosurfactant MEL-A promote gene transfection into solid tumors in mouse abdominal cavity. *Biol. Pharm. Bull.*, **32**, 126-128. (2009) 査読有
- ⑦ Sugimoto, Y., Furuno, T., Nakanishi, M.: Effect of NeuroD2 expression on neuronal differentiation in mouse embryonic stem cells. *Cell Biol. Int.*, **33**, 174-179. (2009) 査読有
- ⑧ Kumagai, K., Ozaki, Y., Nakanishi, T., Inomata, M., Furuno, T., Nakanishi, M., Ogasawara, M. S.: Role of μ -calpain in

human decidua for recurrent miscarriage. *Am. J. Reprod. Immunol.*, **59**, 339-346. (2008) 査読有

- ⑨ Koma, Y., Furuno, T., Hagiya, M., Hamaguchi, K., Nakanishi, M., Masuda, M., Hirota, S., Yokozaki, H., Ito, A.: Cell adhesion molecule 1 is a novel pancreatic-islet cell adhesion molecule that mediates nerve-islet cell interactions. *Gastroenterology*, **134**, 1544-1554. (2008) 査読有
- ⑩ Nakanishi, M., Furuno, T.: Molecular basis of neuroimmune interaction in an in vitro coculture approach. *Cell. Mol. Immunol.*, **5**, 249-259. (2008) 査読有

〔学会発表〕（計 27 件）

- ① 古野忠秀、柴田麻希、嵩田有希、伊納義和、中西 守: 神経刺激に伴うマスト細胞の脱顆粒に及ぼすプロポリスの影響。日本薬学会第 131 年会。2011 年 3 月 31 日（静岡）；31P-0529
- ② Iino, T., Hosokawa, Y., Hagiya, M., Furuno, T., Ito, A., Masuhara, H.: Femtosecond laser estimation of intercellular adhesion strength between neurite and mast cell. 生物物理学会第 48 回年会。2010 年 9 月 22 日（仙台）；3P211
- ③ Furuno, T., Ito, A., Hosokawa, Y., Nakanishi, M.: Relationship between calcium response and adhesion strength in nerve-mast cell interaction. 生物物理学会第 48 回年会。2010 年 9 月 21 日（仙台）；2P226
- ④ Hosokawa, Y., Iino, T., Hiraoka, A., Hagiya, M., Furuno, T., Ito, A., Masuhara, H.: Single cell manipulation and stimulation by femtosecond laser-induced impulsive force. 生物物理学会第 48 回年会。2010 年 9 月 20 日（仙台）；1C1520
- ⑤ Furuno, T., Ito, A., Hirashima, N., Nakanishi, M.: Involvement of cell adhesion molecule 1 (CADM1) in nerve-mast cell communication. 14th International Congress of Immunology. 2010 年 8 月 23 日（Kobe）；PP-020-19
- ⑥ 古野忠秀、関村美穂、岡本恵佑、伊藤彰彦、平嶋尚英、中西 守: 後根神経節細胞とマスト細胞の相互作用における接着分子 CADM1 の役割。日本薬学会第 130 年会。2010 年 3 月 30 日（岡山）；30P-pm037
- ⑦ 柴田麻希、古野忠秀、中西 守: 感覚神経とマスト細胞の相互作用における N-cadherin の関与。日本薬学会第 130 年会。2010 年 3 月 29 日（岡山）；29P-am388
- ⑧ 竹川まり恵、古野忠秀、中西 守: マスト細胞のミトコンドリア内カルシウムイオン動態とその役割。日本薬学会第 130 年会。2010 年 3 月 29 日（岡山）；29P-am398

- ⑨ Furuno, T., Ito, A., Hirashima, N., Nakanishi, M.: The role of cell adhesion molecule 1 (CADM1) in nerve-mast cell communication. Biophysical Society 54th Annual Meeting. 2010年2月21日 (San Francisco); 506-Pos
- ⑩ 古野忠秀、岡本恵佑、関村美穂、伊藤彰彦、平嶋尚英、中西 守: 神経-免疫相互作用における接着分子CADM1 の機能解析. 第47回日本生物物理学会年会. 2009年10月30日 (徳島); 1P-151
- ⑪ 竹川まり恵、古野忠秀、中西 守: マスト細胞のミトコンドリア内カルシウムイオン動態とその役割. 第55回日本薬学会東海支部大会. 2009年7月11日 (名古屋); E-11.
- ⑫ 古野忠秀、伊藤彰彦、中西 守: 共存培養系を用いた神経線維と膵臓 α 細胞の相互作用の解析. 日本薬学会第129年会. 2009年3月27日 (横浜); 27Q-am176.
- ⑬ 関村美穂、古野忠秀、伊藤彰彦、岡本恵佑、平嶋尚英、中西 守: 後根神経節細胞とマスト細胞の相互作用における接着分子CADM1 の役割. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会. 2008年12月11日 (神戸); 3P-0437
- ⑭ 星野有香、古野忠秀、伊納義和、朱 霞、加藤久宜、平嶋尚英、中西 守: マスト細胞の活性化に及ぼすHRB (hydrolyzed rice bran)の影響. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会. 2008年12月10日 (神戸); 2P-0374
- ⑮ 古野忠秀、伊藤彰彦、平嶋尚英、中西 守: 膵臓 α 細胞と神経細胞は接着分子CADM1 を介して相互作用する. 第46回日本生物物理学会年会. 2008年12月3日 (福岡); 1P-197
- ⑯ 古野忠秀、伊藤彰彦、中西 守: 神経と膵臓 α 細胞の相互作用における接着分子CADM1 の機能解析. 第30回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム. 2008年8月6日 (札幌); MP-15

[図書] (計 3件)

- ① Furuno, T., Nakanishi, M.: Analysis of neuro-immune interactions by an in vitro co-culture approach. In "Neuropeptide: Methods and Protocol" (Ed. Walker, J) in "Methods in Molecular Biology" series, Springer, in press.
- ② Nakanishi, M., Furuno, T.: A rational approach to inducing neuronal differentiation in embryonic stem cells. In "Embryonic stem cells", Intech, in press.
- ③ 中西 守、古野忠秀: 薬品分析科学の最前線 (日本薬学会物理系薬学部会・分析化学担当教員会議編) pp172-173. じほう (2009)

[産業財産権]
○出願状況 (計 0件)

○取得状況 (計 0件)

[その他]
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古野 忠秀 (FURUNO TADAHIDE)
愛知学院大学・薬学部・准教授
研究者番号: 80254308

(2) 研究分担者

中西 守 (NAKANISHI MAMORU)
愛知学院大学・薬学部・教授
研究者番号: 90090472
伊納 義和 (INOH YOSHIKAZU)
愛知学院大学・薬学部・講師
研究者番号: 90434547

(3) 連携研究者

なし