

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590195

研究課題名(和文) 生組織標本における環状アデノシンリン酸のイメージング技法の開発と
応用研究課題名(英文) Development and application of cAMP imaging in living cell/tissue
specimens

研究代表者

佐藤 洋一 (SATO YOICHI)

岩手医科大学・医学部・教授

研究者番号：40118253

研究成果の概要(和文)

これまで適当なプローブが無かったためlive cell imagingが充分になされてこなかったcAMPに着目して、工藤佳久氏が新規開発したcAMP感受性蛍光試薬(溶液中のcAMP測定に使うのが主目的の試薬)を、生きた細胞内でもイメージングに使用できないかどうかを検討するのが本研究の目的であった。試薬の蛍光特性に合致したフィルターを作製し、単離細胞標本と組織標本でcAMPイメージングをおこなった。マスト細胞では細胞内Ca²⁺が上昇する刺激(Compound 48/80, ATP)で明瞭な蛍光変化を認めたものの、培養細胞(Hela細胞)、腺房細胞、あるいは血管平滑筋細胞でははっきりとした変化をみとめなかった。今回は、AKMLysとAKMOrnの2種類のプローブを用意したが、AKMOrnはレーザー照射による減光が著しかったことから、細胞負荷後に十分な蛍光量を発するAKMLysを用いて実験を進めた。実験の結果、1)ヒスタミン刺激によるcAMPの上昇が確認されているポジティブコントロールの細胞では変化が認められないこと、2)マスト細胞の顆粒基質は多種の色素と結合して蛍光を発することがある、および3)マスト細胞で蛍光特性が変化した箇所を高精度で観察すると顆粒状に見えること、などから、マスト細胞で得られた所見は、cAMPの上昇を引き起こしたのものというよりは顆粒基質に蛍光色素が結合したためにおきた人工産物的な現象と推察される。cAMPイメージングそのものは成功したとはいえないが、このぷろジェクトを遂行するにあたって行われた高速レーザー顕微鏡のブラッシュアップにより、副次的にCa²⁺イメージングの研究は成果を上げた。

研究成果の概要(英文)

We aimed to visualize intracellular cAMP dynamics in living cells/tissues; there were few knowledge on the dynamics, although cAMP has been considered as an important intracellular second messenger. Compared to Ca²⁺ imaging, there was no suitable fluorescent probes for cAMP imaging. In the project, we tried in vivo imaging of cAMP using ratiometric fluorescent probes which are developed for in vitro measurement of cAMP (AKMys and AKMOrn) by Dr. Kudo. These probes are excited by UV laser and sequential fluorescent images were acquired and computed by a laser scanning microscope (Nikon RCM-8000). In the present study, cells loaded AKMLys showed sufficient fluorescent intensity for the measurement. Photobleach of AKMOrn was considerable. Mast cells from rat peritoneal cavity stimulated by Compound 48/80 or ATP showed distinct changes of fluorescent intensity, and computed ratiometric images might represent cAMP changes in the cell. However histamine or cholinergic agonists had no effect on cultured Hela cells, isolated blood vessels, and acinar cells of exocrine glands. 1) Any positive control specimens did not show cAMP changes, 2) mast cell granule matrices can bind various dyes, and 3) high resolution imaging revealed that the exocytosed granules show evident changes of fluorescence. Therefore, at this time, we regret to conclude that the change of fluorescent intensity observed in stimulated mast cells are a kind of artifact. However, in the project, we performed brush-up of the microscopy (Nikon RCM), and consequently many fruitful results on Ca²⁺ imaging have been obtained.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

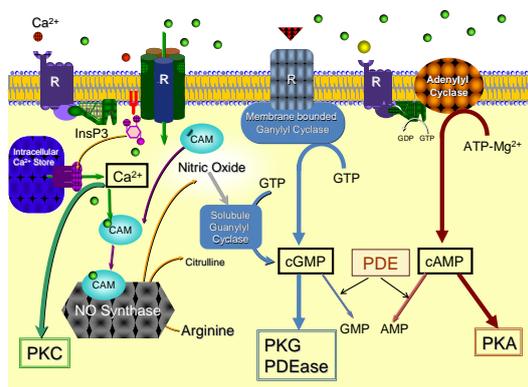
研究分野：解剖学

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：(1) 細胞・組織 (2) シグナル伝達 (3) 生理活性
 (4) cAMP (5) イメージング

1. 研究開始当初の背景

細胞内の情報伝達系でセカンドメッセンジャーとして働く物質の探索は、Earl Sutherland と Theodore Rall に始まる。彼らは肝細胞のアドレナリンに対する反応を調べて、この細胞で働くセカンドメッセンジャーは環状アデノシンリン酸 (cAMP) であることを突き止めた。細胞内に微量に含まれる cAMP は Ca^{2+} とともに細胞内情報伝達系の要として、phosphokinase A (PKA) と phosphokinase C (PKC) を介して数々の細胞機能に関与することがわかってきた。[図緑： Ca^{2+} 系，茶：cAMP系]



cAMP と Ca^{2+} は一酸化窒素などによって引き起こされる cGMP 依存性の情報伝達系[上図青]を介して関連していることがわかっているが、直接どのような相互関係にあるかはまだよくわかっていないことが多い。それは空間的・時間的変動（すなわち、組織内のどの細胞が、細胞のどこから、いつどのように増減するか）の比較が、各種の細胞でなされていないせいだと思われる。

生細胞、できれば生組織内の細胞を用いた

live cell imaging をおこなうことで、空間的・時間的変動は解析できる。 Ca^{2+} に関しては、カルシウムキレート剤である BAPTA を改良した Fura-2 が開発されて以来、多くの知見が積み重ねられてきた。しかしながらその殆どが培養細胞・単離細胞標本で得られたもので、組織内の細胞本来の形態を保った標本で得られたものではなく、細胞内局在を云々されることもあまりなかった。一方 cAMP に関しては、文献的に報告されているプローブがあるとはいえ、手軽に細胞に導入できるものではなかったため、cAMP の live cell imaging は全く普及してこなかった。

2. 研究の目的

メインテーマは、「生きた組織における cAMP 依存性の細胞内情報伝達系の可視化」である。

これまでニーズはあったものの、適当なプローブが無かったため live cell imaging がなされてこなかった cAMP に着目して、工藤佳久氏（東京薬科大学名誉教授）が新規開発中の cAMP 感受性蛍光プローブの評価を細胞レベルでおこなうことができるかどうか検証するのが第一の目的である。同氏は、蛍光プローブの開発目標を Fura-2 と同様に、1) 細胞外添加で細胞内に移行し、2) 絶対濃度指標が可能な ratiometry ができるもの、においていくつかの試薬を開発した。この蛍光プローブ群は改良中であり、各種の細胞で cAMP 依存性細胞内情報伝達系の機能評価に使うことができるかどうか、検討する必要がある。

刺激に対する生体反応の多様性を解析することは、基礎生命医学の研究において重要なことである。にもかかわらず細胞内情報伝達系に関する仕事の多くは、普遍的な事象

のみを追求め、多様性の解析を避けてきたように思われる。本研究計画の第二の目的は多様な細胞から構成される組織を生きのままの状態に保ち、形態と機能の変化を画像としてとらえることにより、1) どのような伝達物質に対してどの種類の細胞が反応するか？2) 細胞内の cAMP 依存性のシグナル伝播はいつどこからどのように始まり、終息するか？3) 特定細胞の反応は他の細胞へ伝播するか？4) 細胞内と細胞間の cAMP 依存性のシグナル伝達の機構に関して、細胞の種類によりどのような差があるか？を明らかにすることを目的としている。単離・培養細胞の Ca²⁺ 依存性の変化は live cell imaging でかなり調べられてきたものの、組織内の細胞における動きに関してはまだまだ不明な点が多い。我々は動的形態学的視点から、組織内の多様な細胞の Ca²⁺ イメージング法に挑戦してきたが、同様の観点から、本実験計画では cAMP 依存性の細胞内情報伝達系の多様性を調べる。

研究に用いるのは単離・培養細胞(Hela 細胞とマスト細胞)および組織標本としては、細動脈標本と各種腺組織で、これらも既に Ca²⁺ イメージングに成功したものである。

上記の実験目的を達成するために用いるものが、高速でデジタル画像を取得・演算処理できるリアルタイム共焦点レーザー顕微鏡である。cAMP 感受性蛍光指示薬によるリアルタイムのイメージングがどの程度可能か、この顕微鏡の応用の可能性を探るのも副次的な研究目的となっている。

3. 研究の方法

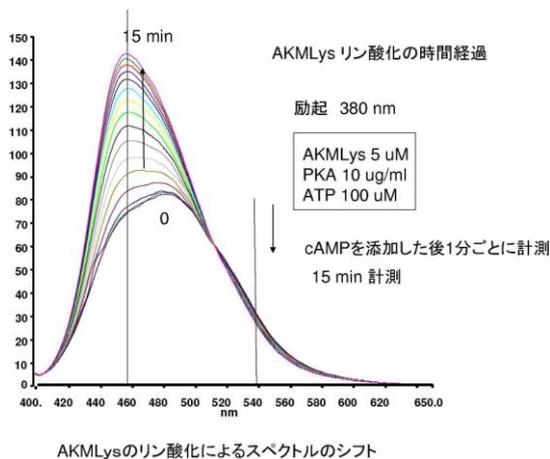
試薬

cAMP イメージング試薬: 工藤博士より提供を受けた AKMLys および AKMOrn の脂溶性誘導物質を使用した。試薬は DMSO に溶かし(最終濃度 5mM), 20 μ l に小分けして Stock solution とし、ディープフリーザーにて保存した。使用時は解凍し最終濃度 10 μ M で細胞・組織へ負荷した。

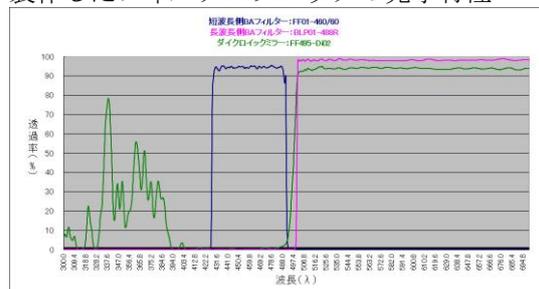
顕微鏡

AKMLys および AKMOrn の蛍光特性(Ext 380 nm, Em 460 / Em 530; 図参照 原図は工藤博士)にあわせたフィルターブロックを制作し、それを装着して実験した。(フィルターそのものは Semrock 社の規格品で、ニコン社製顕微鏡に合わせてフィルターブロックをニコン社へ発注した。)用いた顕微鏡は紫外線励起のできる高速共焦点レーザー走査型顕微鏡(Nikon RCM-8000 改良型)である。もともとは Indo-1 の Ca²⁺ Ratio -imaging 用の顕微鏡であったが、その UV レーザー(Ar Laser; 351

nm)と UV 透過性に優れた水浸対物レンズ(C Apo, NA 1.14, \times 40)は、AKMLys, AKMOrn にも適用できる。



製作したフィルターブロックの光学特性



なお Nikon RCM 改良型は、そのままでも AKMLyn や AKMOrn のイメージングが可能であるが、適当なフィルターセットを装着しても、コントロール PC が旧式化しているため、データ管理がやりにくい。そこで UCSD 技術員の箱崎氏(本機種の開発担当者)の協力を得て、プログラムとインターフェイスの改良を企図した。

標本

細胞: Hela 細胞、ラット腹腔内マスト細胞
組織: 細動脈(精巣)、涙腺腺房、膵臓腺房
標本採取法は、これまでの Ca²⁺ imaging 方に準ずる。

試薬負荷と刺激ならびにイメージング

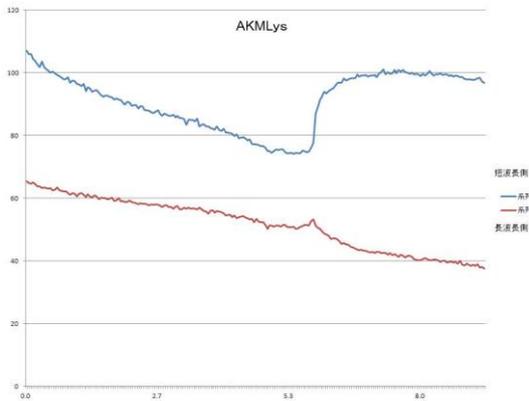
上記組織・細胞に AKMLys あるいは AKMOrn を 2~20 μ M の溶液で 37°C 30~90 分、負荷する。次いで標本周囲を HEPES 緩衝リンゲル液で灌流し、cAMP と Ca²⁺ の変動がおきるとされている刺激物質や細胞内情報伝達系修飾物質(adrenaline, histamine, serotonin, VIP, CCh, PARs)を灌流液に加える。Nikon RCM-8000 改良型で得られた画像データは RCM の画像解析プログラムでデータ処理するとともに、Image J とプラグイン(UCSD 箱崎氏

提供) を使って TIFF 画像とし、動画作成をおこなった。

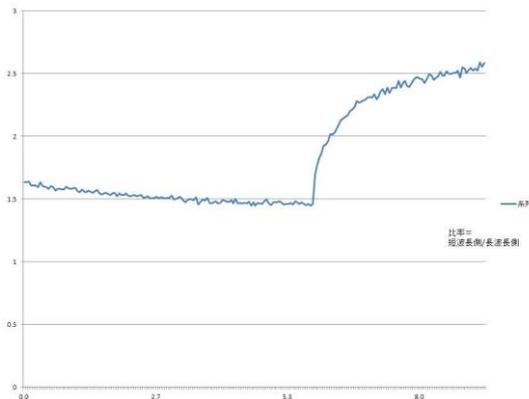
4. 研究成果

マスト細胞

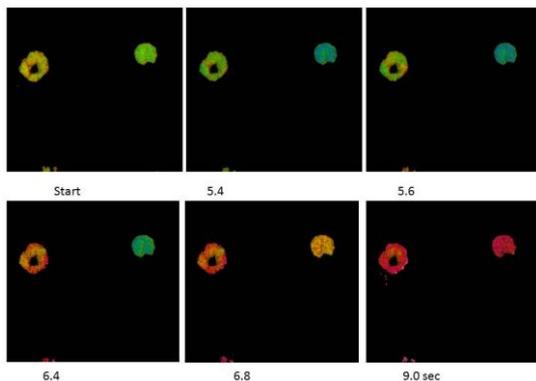
G タンパク質を刺激する Compound 48/80 (ca. 10^{-5} M) でマスト細胞は Ca^{2+} 上昇を引き起こし、次いで顆粒放出を生じる。AKMLyn を負荷したマスト細胞これで刺激したところ、長波長側と短波長側の蛍光強度が変化した。



この蛍光強度比を取ると下図のようになる。蛍光強度比の上昇は in vitro では cAMP 濃度の上昇を意味する。



次いで、各ピクセルの蛍光強度比を、比が高いところは暖色、比が低い場合を寒色の擬似カラーで表示する。



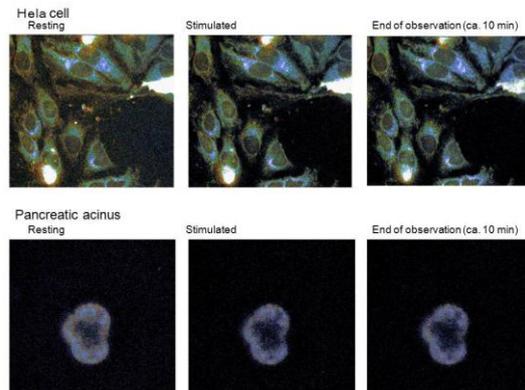
マスト細胞の分泌果粒の基質は非特異的に種々の色素と結合する性質がある。従って、開口放出に伴い、残存した AKMLys が基質に沈着して蛍光特性が変化し、それを観察している可能性がある。高精細で画像解析すると変化した領域が顆粒状になっていることから、その疑いが残る。本来であれば、サイトゾルの変化であり、顆粒以外のところが変化するはずである (Indo-1 のイメージングではそうなる)。そこで、 Ca^{2+} がおきるもの顆粒放出はおきない ATP で刺激したところ (10^{-4} M)、同様の変化がつかまえられた。このことから、観察された蛍光強度の変動は cAMP 濃度変化を反映したものであり、マスト細胞で Ca^{2+} と cAMP のクロストークが把握できたものと見なすことも可能であった。しかしながら、ATP では細胞膜の断裂にともなう色素の流入も否定できないことから、これは将来の検討課題となっている。

培養細胞

HeLa 細胞等を Histamine (10^{-5} ~ 10^{-3} M) で刺激したが変化はつかまえられなかった。

腺組織等

Histamine, Adrenaline, CCh など種々の濃度で刺激したが、反応は見られなかった。



結論

- フィルターブロックの改良によりイメージングに必要な蛍光強度は、得られた。
- マスト細胞では目途通りのイメージングに成功したが、他の細胞では変化がつかまえられなかった。
- 現時点ではマスト細胞の反応は一種の人工産物である可能性が否定できない。
- レーザー顕微鏡のインターフェイス改良、あるいはプラグイン開発により、cAMP 以外のイメージングに資するところは大きかった。

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 8 件)

- 1) Ogasawara R, Yoshida Y, Tohyama K, Satoh Y, Suwabe A: Isolated rat alveolar type II cells protrude intracellular lamellar bodies by forming bubble-like structures during surfactant secretion. *Cell Tissue Res* 335/2, 397-405 (2008)
- 2) Misaki T, Satoh Y, Saino T, Kuroda T, Masu K, Russa D, Ogawa K: Immunohistochemical localization of protease-activated receptors in cerebral and testicular arterioles of rats: dependence on arteriole size and organ-specificity. *Arch Histol Cytol* 71/3, 179-184 (2008)
- 3) Saino T, Misaki T, Matsuura M, Shikanai T, Satoh Y: Dipyridamole inhibits intracellular calcium transients in isolated rat arteriole smooth muscle cells. *Arch Histol Cytol* 71: 235-247 (2008)
- 4) Russa AD, Ishikita N, Masu K, Akutsu H, Saino T, Satoh Y: Microtubule remodeling mediates the inhibition of store-operated calcium entry during mitosis in COS-7 cells. *Arch Histol Cytol* 71:249-263 (2008)
- 5) Tamagawa Y, Saino T, Matsuura M, Satoh Y: The effects of diuretics on intracellular Ca²⁺ dynamics of arteriole smooth muscles as revealed by laser confocal microscopy. *Acta Histochem Cytochem.* 42(4):121-128 (2009)
- 6) Wakabayashi T, Kimura Y, Ohba Y, Adachi R, Satoh Y, Shingai R: In vivo calcium imaging of OFF-responding ASK chemosensory neurons in *C. elegans*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1790(8):765-769 (2009)
- 7) Russa AD, Maesawa C, Satoh Y: Spontaneous [Ca²⁺]_i oscillations in G1/S phase-synchronized cells. *J Electron Microsc* (Tokyo). 58(5):321-329. (2009)

- 8) Zou K, Maeda T, Watanabe A, Liu J, Liu S, Oba R, Satoh Y, Komano H, Michikawa M: Abeta42-to-Abeta40- and angiotensin-converting activities in different domains of angiotensin-converting enzyme. *J Biol Chem.* 13;284(46):31914-20 (2009). Epub Sep 22(2009).

[学会発表] (国際学会に限定 計 13 件)

- 1) Saino T, Watson EL, Satoh Y: Protease-activated receptor 2 induces Ca²⁺ entry via non capacitative calcium entry in rat parotid glands. The 48th American Society for Cell Biology Annual Meeting 2008, Dec, San Francisco
- 2) Ishikita N, Masu K, Russa AD, Kuroda T, Akutsu H, Saino T, Satoh Y: Aberrant intracellular calcium dynamics of neurohypophysis of thalidomide-induced autistic rats. The 48th American Society for Cell Biology Annual Meeting 2008, Dec, San Francisco
- 3) Masu K, Saino T, Kuroda T, Matsuura M, Russa AD, Ishikita N, Satoh Y: Ca²⁺ imaging revealed regional differences of 5-HT receptors in cerebral and testicular arterioles of rats: dependence on arteries size and organ specificity. The 48th American Society for Cell Biology Annual Meeting 2008, Dec, San Francisco
- 4) Russa AD, Saino T, Akutsu-Yamauchi H, Satoh Y: Microtubule remodeling mediates the inhibition of store-operated calcium entry (SOCE) during mitosis in COS-7 cells. The 48th American Society for Cell Biology Annual Meeting 2008, Dec, San Francisco
- 5) Matsuura M, Kuroda T, Saino T, Satoh Y: ATP-induced intracellular calcium dynamics in prostatic smooth muscles of golden hamsters. The 48th American Society for Cell Biology Annual Meeting 2008, Dec, San Francisco
- 6) Tamagawa Y, Matsuura M, Saino T, Satoh Y: Comparison of effects with respect to diuretics on intracellular calcium dynamics in rat testicular arteriole

smooth muscle cells. The 48th American Society for Cell Biology Annual Meeting 2008, Dec, San Francisco

- 7) Kuroda T, Kashiwa K, Kobayashi S, Satoh Y: Intracellular calcium dynamics of fibroblasts continuously exposed to high concentration of ATP. The 49th American Society for Cell Biology Annual Meeting 2009, Dec, San Diego
- 8) Matsuura M, Kuroda T, Tamagawa Y, Saino T, Satoh Y, Sadzuka Y: Age-associated change in the reactivity of Noradrenalin -induced intracellular calcium dynamics in prostatic smooth muscles. The 49th American Society for Cell Biology Annual Meeting 2009, Dec, San Diego
- 9) Kamada Y, Saino T, Kurosaka D, Satoh Y: Effect of ATP on intracellular calcium dynamics in rat lacrimal gland. The 50th American Society for Cell Biology Annual Meeting, 2010, Dec, Philadelphia, USA
- 10) Satoh Y, Russa D: Microtubule Remodeling Resulting in Inhibition of Store-Operated Calcium Entry during Mitosis. The 3rd International Symposium on Bioimaging, 2010, Jan, Okazaki
- 11) Satoh Y, Saino T, Akutsu-Yamauchi H, Hamano Y: New era of morphology - Developed by the fluorescent markers and the confocal microscopy. XXI International Symposium on Morphological Sciences, 2010, September, Taormina, Italy
- 12) Russa D, Kuroda T, Satoh Y: Spontaneous $[Ca^{2+}]_i$ oscillations in G1/S phase synchronized cells. The 50th American Society for Cell Biology Annual Meeting, 2010, Dec, Philadelphia, USA
- 13) Saino T, Watson EL, Satoh Y: Functional analysis of protease-activated receptor 2 on intracellular calcium ion dynamics in rat parotid gland acinar cells. The 50th American Society for Cell Biology Annual Meeting, 2010, Dec, Philadelphia, USA

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 洋一 (SATO YOICHI)
岩手医科大学・医学部・教授
研究者番号：40118253

(2) 研究分担者

齋野 朝幸 (SAINO TOMOYUKI)
岩手医科大学・医学部・准教授
研究者番号：40305991

阿久津 仁美 (AKUTSU HITOMI)
岩手医科大学・医学部・助教
研究者番号：30398482

(3) 連携研究者

なし