

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月10日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590206

研究課題名（和文） 皮膚感覚装置グリア細胞におけるATP誘発性信号局在化の形態・分子基盤

課題名（英文） Morphological and molecular backgrounds for localization of ATP-induced signals in glial cells associated with cutaneous sensory devices.

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（和文）：皮膚感覚装置グリア細胞は複数の薄板突起で異なる軸索終末を被い、各突起が神経伝達物質ATPの刺激に対し自身のCa²⁺信号を生成する。本研究は、このグリア信号系と細胞膜の微小区域カベオラとの関連をラットの頬ひげ動き受容器 槍型終末分離標本の免疫組織化学とCa²⁺画像解析で検討し、ATP受容体P2Y₂とその共役分子G_{q/11}のカベオラ依存的なグリア薄板への局在が信号の細胞内区域化に欠かせないことを示した。

研究成果の概要（英文）：Glial cells in cutaneous sensory devices extend multiple lamellar processes that cover different axon terminals and generate their own Ca²⁺ signals in response to stimulation with the neurotransmitter ATP. We examined links between this glial signaling and the plasma membrane microdomains caveolae by immunohistochemistry and Ca²⁺ image analysis in isolated lanceolate sensory endings—motion detectors of rat vibrissae. Our data have shown that caveola-dependent localization of the ATP receptor P2Y₂ and its coupling partner G_{q/11} to the glial lamellae is essential for the subcellular compartmentalization of the signals.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
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，カベオラ，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

ニューロンとグリアは、アデノシン三リン酸(ATP)を信号物質として相互に分泌・受容し、それに基づいて調節効果を及ぼし合うことが知られる。私たちはこれまでに、ラット頬ひげの動き受容器 槍型神経終末の分離標本

を用いた生理実験で、皮膚感覚装置の特異なグリアである終末シュワン細胞が細胞外ATP刺激に対しG蛋白共役型受容体P2Y₂を介して一過性細胞内Ca²⁺濃度上昇反応を示すことを見出し、この細胞が皮膚知覚の調節に関与する可能性を指摘した。

槍型終末の他、マイスナー触覚小体など多くの皮膚機械刺激受容器は、膨らんだ軸索終末の両面を2枚のシュワン薄板が被う「三つ組み」を共通の構造単位として含む(図1)。終末シュワン細胞は分岐する突起をもち、それぞれの枝が異なる軸索終末上の薄板に終わる。分離槍型終末を用いた私たちの実験で、シュワン細胞の各薄板突起は、局所ATP刺激に対し突起固有の信号生成焦点に始まり突起内に限局するCa²⁺応答を示し、自身の信号に基づいて伴行軸索終末を個別に補佐・調節できる機能単位とみなされた。

細胞表面の小陥凹カベオラは、カベオラ蛋白 caveolin-1 とコレステロールに富む足場に種々のG蛋白共役型受容体とその下流の細胞内信号系分子を集積させた膜の微小領域として機能することが知られる。終末シュワン細胞が多数のカベオラをもつことが以前から透過電顕で報告され、そこに足場蛋白 caveolin-1 の局在が免疫組織化学的に証明されている。しかし、ATP誘発性信号のシュワン薄板への区域化にカベオラがどのような役割を果たすのかは、明らかでない。

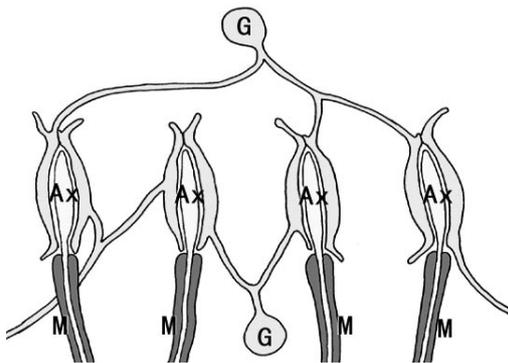


図1. 槍型神経終末の模式図。軸索終末(Ax)をグリア細胞(G)の薄板突起が被う。M, 有髄線維。

2. 研究の目的

皮膚感覚装置内で軸索終末に随伴する終末シュワン細胞の各薄板突起が、局所に遊離する信号物質ATPを独自に検出し突起に限局したCa²⁺信号を生成する構造的基盤を特にカベオラの役割に注目して解析するため、以下のことを行った。

(1) 終末シュワン細胞のカベオラ分布をcaveolin-1の免疫組織化学と通常の透過電顕観察で明らかにする。

(2) シュワン薄板の信号生成に関わる細胞内Ca²⁺貯蔵所である滑面小胞体の微細構造、それとカベオラとの立体相互関係を透過電顕・走査電顕で詳細にする。

(3) 感覚装置の分離標本を膜コレステロール除去剤methyl-β-cyclodextrinで処理して終末シュワン細胞のカベオラを破壊したときのCa²⁺信号関連分子の細胞内局在変化を免疫組織化学で検索する。

(4) 分離標本の実験で生理的用量の細胞外ATP刺激に対する終末シュワン細胞の応答を高速共焦点顕微鏡のCa²⁺画像として記録し、methyl-β-cyclodextrin処理によるカベオラ破壊が細胞応答に与える影響を解析する。

3. 研究の方法

若い成熟雄ラットの頬ひげ毛包周囲槍型神経終末を観察材料とした。通常の顕微鏡観察では、動物をペントバルビタール(40 mg/kg体重)の腹腔注射で麻酔して経心灌流固定した。光顕免疫組織化学には4%パラホルムアルデヒド、透過電顕には2.5%グルタルアルデヒド、走査電顕には0.1%グルタルアルデヒドを固定液として用いた。分離組織標本の実験では、ラットを頸椎脱臼と心臓からの瀉血によって屠殺し、直ちに頬ひげ毛包を含む皮膚組織を取り出して材料とした。

(1) caveolin-1の光顕免疫組織化学

パラホルムアルデヒド固定組織から凍結切片を作成し、caveolin-1に対するマウスモノクロナル抗体とシュワン細胞特異蛋白S100に対するウサギポリクロナル抗体を用いた免疫二重染色を蛍光抗体法間接法で行ない、共焦点顕微鏡で観察した。

(2) 透過電顕

固定された頬ひげ毛包上半部を周囲組織とともに切り出して1% OsO₄で後固定し、常法に従ってEpon-812に包埋し超薄切片を作成して酢酸ウラニル-クエン酸鉛染色を施して観察標本とした。

(3) 走査電顕

頬ひげ毛包上半部を周囲組織とともに1% OsO₄で後固定し、Tanaka & Mitsushima(1984)の方法に従い組織を液体窒素中で凍結切断し、0.1% OsO₄で5日間処理して細胞質蛋白を除去し、タンニン酸-オスミウム導電染色、臨界点乾燥を行ない、プラズマオスミウム被着して検鏡した。

(4) 分離組織標本の実験

未固定組織を培養液に移し、実体顕微鏡下の微小解剖と恒温震盪器内のコラゲナーゼ消化を組み合わせて、槍型終末を含む膜片標本を頬ひげ毛包から分離し(図2)、以下の実験①、②を室温で行なった。

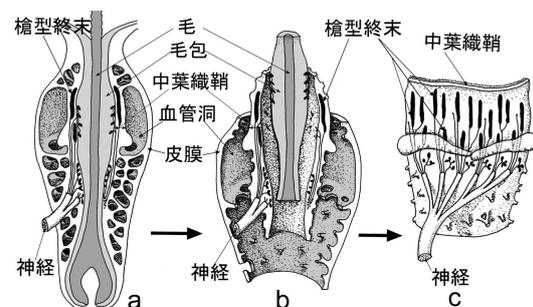


図2. 頬ひげ槍型終末分離標本の作成過程

①標本を実験群と対照群に分け、それぞれ 2% methyl- β -cyclodextrin を含む培養液と含まない正常培養液に 40 分間置いた後、免疫組織化学または透過電顕で観察した。免疫組織化学では caveolin-1, P2Y₂ または G_{q/11} の局在を S100 の免疫染色と組み合わせて調べた。②分離標本に Ca²⁺指示薬 fluo-4 を負荷して観察チャンパー底に貼り付け、倒立型高速共焦点顕微鏡のステージに置き、チャンパー灌流液に ATP 10 μ M を加えたときの細胞応答を fluo-4 蛍光画像として記録した。同じ標本で 2 回の刺激実験を 50 分の休止時間をはさんで行ない、休止中 40 分の 2% methyl- β -cyclodextrin 処理、続いて 10 分の培養液洗浄を行った場合と 50 分間正常培養液中に置いた場合の画像記録を比較解析した。

4. 研究成果

(1) caveolin-1 免疫染色と透過・走査電顕
 槍型終末のシュワン細胞は、丸い細胞体の一端から結合索と呼ばれる長い紐状突起をのびし、その先が 2—5 つに分かれて軸索終末を被う薄板状の終足をなす (図 1)。カベオラ蛋白 caveolin-1 の免疫染色では、シュワン細胞の細胞体ゴルジ野と薄板突起が強く標識され、細胞体表面と結合索は染まらなかった (図 3)。この結果と一致して、透過電顕でみたカベオラ小器官は特にシュワン薄板に高密度に分布していた。

シュワン薄板の膜成分を OsO₄ 処理で露出し走査電顕観察したところ、薄板突起の細胞質全体に網状の細管からなる典型的な滑面小胞体が広がっているのが見出された。滑面小胞体細管の内腔は時折細胞表面近くで大きさ約 400 nm の槽状に拡張し、各槽は 3—6 個のカベオラ底の細胞膜と接触していた。

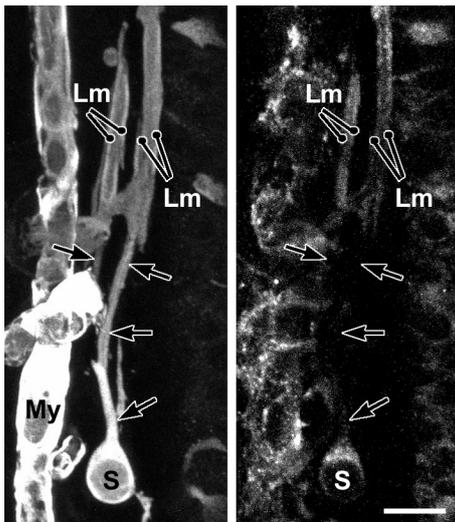


図 3. 頬ヒゲ毛包の縦断 S100 蛋白(左)と caveolin-1(右)の蛍光免疫二重染色。終末シュワン細胞の caveolin-1 免疫活性は、細胞体(S)のゴルジ野と薄板(Lm)に限局する。矢印, 結合索。My, 有髄線維。

(2) 槍型終末分離標本を用いた実験結果

①正常培養液で維持した後にホルマリン固定した終末シュワン細胞では、caveolin-1, P2Y₂, G_{q/11} いずれの免疫組織化学反応も薄板限局性に強く検出された。一方, methyl- β -cyclodextrin でカベオラを除去して固定したグリア細胞では、上記 3 種蛋白の免疫染色は弱まり、細胞全体に均一に検出された。これらの観察結果は、P2Y₂ と G_{q/11} がカベオラ依存的に薄板突起に集積することを示す。

②チャンパー灌流液に ATP 10 μ M を加えて終末シュワン細胞を刺激したところ、まず、薄板で細胞内 Ca²⁺濃度上昇が起こり、3—10 秒後に細胞体の Ca 応答が続いた (図 4)。この Ca²⁺濃度変動は、各薄板の先端または中間部の特異な焦点に始まり、波として突起全体に速やかに広がったのち結合索を介して細胞体に伝播した。正常培養液中で 50 分休止後標本を再刺激すると細胞応答は再現され、シュワン薄板内の信号生成焦点の位置にも細胞各部位の応答順序にも変化はみられなかった。これに対し、methyl- β -cyclodextrin で 40 分処理してカベオラを除去した後 ATP で再刺激した場合は、シュワン薄板の応答潜在時間が細胞体のそれに比較して有意に遅延し、ときに、細胞体の Ca²⁺濃度上昇が薄板応答に先行する例も観察された (図 4)。カベオラ除去後の薄板内 Ca²⁺波は、除去前と同じ生成焦点から発せられたが、しばしば、自発的な減衰や新たな焦点に由来する波との衝突によって、伝播途中に消滅した。

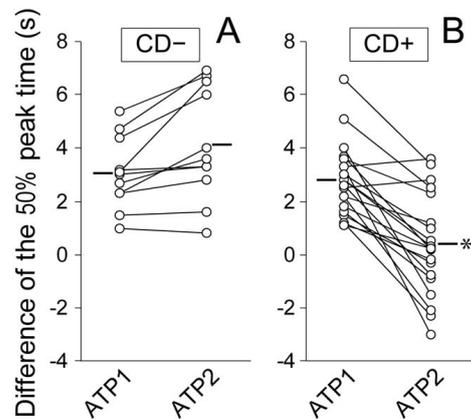


図 4. 終末シュワン細胞の薄板突起と細胞体の 10 μ M ATP 刺激に対する応答潜在時間の差 +側は前者の応答が早いことを示す。2 回の刺激実験(ATP1, ATP2)を正常培養液中(A)または 2% methyl- β -cyclodextrin 中(B)での休止をはさんで行った。

(3) 結果のまとめと考察

本研究は、皮膚感覚装置の軸索受容体を被うシュワン薄板が、局所的かつ特異的に密なカベオラ群とそれに随伴する滑面小胞体 Ca²⁺貯蔵所のネットワークを備えること、カベオラ依存的な信号系分子の薄板への集積が、薄

板の信号生成焦点からの速やかな Ca^{2+} 信号生成とその薄板全体への一貫した伝播に欠かせないことを示した。これは、グリアの Ca^{2+} 信号系において、細胞局所に集積するカベオラが機能的に独立した細胞内小区域を構成することを示す、最初の報告である。

ラット頬ひげ槍型終末は他の機械刺激受容器と同様、単一の感覚神経から分岐した複数の軸索終末からなる。各軸索終末が二枚のシュワン薄板を伴って三つ組みをなしており、独立した刺激 - 興奮変換部位として機能するものと一般に推測されている。電気生理学的研究によれば、ラット頬ひげの一次求心線維は、ひげがなぞる対象物の性状に特異的な発火パターンを示すという。そうした一連の発火は、単一の求心線維を共有する複数の変換部位の非同期的活動に由来すると予測できる。カベオラ依存的にシュワン薄板に限局する ATP 誘発性 Ca^{2+} 信号は変換部位の個別のグリア性調節を可能にし、刺激の暗号化に貢献するかもしれない。こうした推測の検証には、より器官に近いタイプの標本での実験が必要であろう。

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 9 件)

- ① 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. 査読有
- ② Sato-Miyaoka M, Hisatsune C, Ebisui E, Ogawa N, Takahashi-Iwanaga H, Mikoshiba K: Regulation of hair shedding by the type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *J Invest Dermatol*, 印刷中. 査読有
- ③ 岩永ひろみ: 知覚終末グリア細胞のプリン作動性信号系. *顕微鏡*, 46: 217-221, 2011. 査読有
- ④ Takebe K, Takahashi-Iwanaga H, Iwanaga T: Intensified expressions of a monocarboxylate transporter in consistently renewing tissues of the mouse. *Biomed Res*, 32: 293-301, 2011. 査読有
- ⑤ Iwanaga T, Hozumi Y, Takahashi-Iwanaga H: Immunohistochemical demonstration of dopamine receptor D2R in the primary cilia of the mouse pituitary gland. *Biomed Res*, 32: 225-235, 2011. 査読有
- ⑥ Iwanaga T, Miki T, Takahashi-Iwanaga H: Restricted expression of somatostatin receptor 3 to primary cilia in the pancreatic islets and adenohypophysis of mice.

Biomed Res, 32: 73-81, 2011. 査読有

- ⑦ Kuchiiwa T, Nio-Koayashi J, Takahashi-Iwanaga H, Yajima T, Iwanaga T: Cellular expression of monocarboxylate transporters in the female reproductive organ of mice: implications for the genital lactate shuttle. *Histochem Cell Biol*, 135: 351-360, 2011. 査読有
- ⑧ Inagaki A, Yamaguchi S, Takahashi-Iwanaga H, Iwanaga T, Ishikawa T: Functional characterization of a ClC-2-like Cl⁻ conductance in surface epithelial cells of rat rectal colon. *J Membr Biol*, 235: 27-41, 2011. 査読有
- ⑨ Nagai A, Takebe K, Nio-Kobayashi J, Takahashi-Iwanaga H, Iwanaga T: Cellular expression of the monocarboxylate transporter (MCT) family in the placenta of mice. *Placenta*, 31: 126-133, 2010. 査読有

[学会発表] (計 5 件)

- ① Takahashi-Iwanaga H: Purinergic signaling in glial cells associated with cutaneous mechano- receptors. 第 116 回解剖学会総会・全国学術総会, 2011 年 3 月 28 日, *J. Physiol. Sci.* 誌上開催 (関東・東北大震災のため).
- ② Takahashi-Iwanaga H: Accumulated caveolae constitute subcellular compartments of calcium signaling in the lamellar Schwann cells associated with cutaneous mechanoreceptors. The 21st International Symposium on Morphological Sciences, 2010 年 9 月 19 日, Tormina, Italy.
- ③ 岩永ひろみ: 槍型知覚終末におけるグリア性カルシウム信号の細胞内区域化機構, とくにカベオラの役割について. 第 115 回解剖学会総会・全国学術集会, 2010 年 3 月 30 日, 盛岡, 岩手県民会館.
- ④ Takahashi-Iwanaga H: Purinergic signaling in terminal Schwann cells associated with lanceolate sensory endings. The 9th European Meeting on Glial Cells, 2009 年 9 月 9 日, Paris, France..
- ⑤ Takahashi-Iwanaga H: Clustered caveolae support initiation and propagation of local purinergic signals in glial processes accompanying lanceolate sensory endings. International Symposium on Purinergic Signaling in New Strategy of Drug Discovery, 2009 年 7 月 24 日, 福岡, ホテル・ザ・ルイガンズ.

[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 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：