

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590292

研究課題名(和文) TRPチャネル発現グリア細胞が担う中枢性呼吸調節機構の解明

研究課題名(英文) The elucidation of central chemosensitive respiratory regulation by TRP channels expressed in glial cell.

研究代表者

平田 豊 (Hirata, Yutaka)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：10441247

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：脳幹・延髄が担う中枢性呼吸調節機構は、血液ガスとpHの恒常性の維持に重要である。我々はTRPチャネルファミリーが延髄グリア細胞の高炭酸ガスに対するCa応答に関与していることを報告している。中枢性化学受容分子としてのTRPのサブタイプを同定するために、延髄グリア細胞におけるTRP発現パターン解析からTRP-Xが高発現であった。TRP-X遺伝子欠損マウスの高炭酸ガスに対する呼吸応答をwhole body plethysmography法により計測した。8%CO₂負荷に対する換気応答作用は、TRP-X遺伝子欠損マウスでは減弱した。従ってTRP-Xが中枢性呼吸調節機構に関与していること示唆された。

研究成果の概要(英文)：The central chemosensitive respiratory regulation in medulla of brainstem is important in the maintenance of blood gas and pH homeostasis. We reported that transient receptor potential (TRP) channel family was involved in hypercapnic Ca responses in medullary glial cells. To identify the subtype of the TRP channels as central chemosensing molecules, we detected the expression pattern of TRP channel family in medullary glial cells. TRP-X subtype channel is highest expression in medullary glial cells. In comparison with wild-type mice, the effects of ventilation response to 8%CO₂ on TRP-X knockout mice at attenuated. These results suggest that the TRP-X channel is involved in the central chemosensitive respiratory regulation.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・環境生理学(含体力医学・栄養生理学)

キーワード：TRP 中枢性呼吸調節 グリア細胞 二酸化炭素 延髄

1. 研究開始当初の背景

中枢性呼吸調節機構において内因性に応答する中枢化学受容細胞は長い間謎であった。最近、脳幹・延髄表層のグリア細胞はCO₂負荷に対してCa²⁺応答した後、ATPを遊離し、中枢性呼吸神経活動を増加させることが示された (Gourine, et al. Science 2010)。しかし、ATP遊離性グリア細胞には、内因性中枢化学受容細胞のみならず、ATP伝播による二次応答性グリア細胞が含まれ、その化学受容体の分子実体も依然、未解明である。我々は、TRP (transient receptor potential) channelが脳幹グリア細胞に発現し、化学受容機能を持つことを報告している (Hirata & Oku Cell Calcium 2010)。

2. 研究の目的

脳グリア細胞におけるTRPの生理的役割は不明な点が多く、中枢性呼吸調節機構におけるその解明は、呼吸不全をきたす様々な疾患の病態生理を理解する上で重要な意義をもつ。本研究の目的は、PCO₂/pHセンサーとして機能するTRPのサブタイプ同定と中枢性呼吸調節機構におけるグリア・神経回路網のTRPを中心とした分子基盤を解明することである。

3. 研究の方法

(1) 延髄由来ニューロン・グリア共培養系
妊娠マウス15日目の胎仔から延髄を摘出し、パパイン酵素処理し、神経系細胞を単離する。単離した細胞をポリエチレンイミンでコートされたガラスディッシュにて分散培養する。CO₂インキュベーターにて約10日培養し、各実験に用いる。一部のディッシュは培養3日目から、冷培養液にて培地交換を行い、グリア細胞の高密度培養を行う。各ディッシュの一部は免疫染色によって、ニューロン・グリア細胞の確認を行う。

(2) 細胞内Ca²⁺応答のイメージング

マウス延髄から単離した組織スライスまたはニューロン・グリア共培養系細胞にCa感受性蛍光指示薬であるFluo-4 AM、x-Rhod-1 AMで染色し、特殊高速高感度光計測システム (BrainVision社製 MiCAM Ultima) または共焦点レーザー顕微鏡・Axiovert/LSM510 META (Zeiss社)を用いて、薬剤刺激またはCO₂/pH感受性細胞の細胞内Ca²⁺応答をイメージングし、動画像として記録・解析する。BV_analyzer (BrainVision社)にて解析する。

(3) FACSariaによるグリア細胞の選別回収

ドイツMax-Planck研究所Dr. Kirchhoffから供与されている、グリア細胞選択的に緑色蛍光タンパク質 (eGFP) が発現する遺伝子改変マウス (GFAP-eGFP-Tg マウス: 8-13週齢) から、全脳、小脳、延髄を摘出し、パ

イン酵素処理により各種細胞を単離する。細胞の選別精度を高めるため、単離した細胞に赤色蛍光核染色色素・Nuclear-ID™ Redを導入し、生細胞の核を特異的に染色する。赤色蛍光染色される細胞群のうち、eGFP陽性細胞をグリア細胞としてFACS Ariaによって選別回収する。

(4) Real time PCR 解析

選別回収した細胞群と延髄、全脳組織からtotal RNAをFastPure RNA Kitを用いて抽出する。抽出したtotal RNAからPrimeScript® 1st strand cDNA Synthesis KitによってcDNAを合成し、Real time PCR解析に用いる。Real time PCRによるTRPチャンネルの網羅的な解析は、SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus)の試薬を用い、Applied Biosystems社のSDS 7900HT Fast Real Time PCR Systemにて行う。TRPチャンネルのサブタイプ、V1~V6、C1~C7、M1~M8、A1、Pkd1、Pkd2、Pkd211t、Pkd212、及び内在性コントロールとしてGapdh、Actb、Rps18、グリア細胞マーカーとしてGfap、S100B、eGFP、神経細胞マーカーとしてMtap2のプライマーをIDT社のIDT real time PCR toolソフトウェアによりintronを含む領域2箇所2セット以上設計する。脳全体のTRPチャンネル発現を基準として、延髄グリア細胞におけるTRPチャンネル発現パターンを網羅的に解析する。

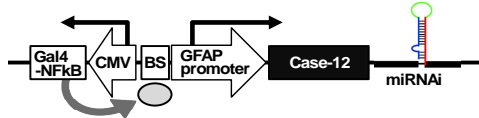
(5) whole body plethysmography 法による換気応答の計測

TRPチャンネルが中枢性呼吸調節を担っているかを検討するため、それらのTRPノックアウトマウスに対する、50%O₂及び21%O₂における、高CO₂負荷による換気応答の変化をwhole body plethysmography法にて野生型と比較する。すなわち、各種マウス (オス: 8-13週齢) をポンプとマスフローメーターmodel8300 (KOFLOC社)にて厳密に一定流量 (100mL/min) で吸引している小型チャンバー内にて自由行動できる環境に置く。0%CO₂、3%CO₂及び8%CO₂負荷時において、換気応答の変動によるチャンバー内の圧変化と呼吸頻度を微差圧トランスデューサー、増幅器及びPower Lab (ADInstruments社)によって経時的に計測する。野生型マウスの高CO₂負荷による換気応答 (一回換気量と呼吸頻度) の変化量とTRPノックアウトマウスの場合を統計処理して評価する。各マウス体温をwhole body plethysmography計測の前後に測定し、体温変化と体重で換気応答を補正する。

(6) グリア細胞特異的Ca感受性緑色蛍光色素発現及び、TRPチャンネル発現抑制遺伝子組換えマウスの作製

グリア細胞特異的プロモーター (GFAP) の活性を増幅するために、米国Bristol大学Dr. Kasparovらのグループ (BMC Biotechnol. 2008) によって開発された双方向性転写増

幅法である Gal4-NFκB を利用し、組織特異的なプロモーターの活性をその特異性を低下させることなく増幅できるシステムを用いる。下図のように Gal4-NFκB、CMV プロモーター、BS (Gal4 結合領域)、GFAP プロモーター、Case-12 (Ca 感受性緑色蛍光タンパク質)、microRNAi カセット、TK_pA の順に pTYF プラスミド・ベクターに挿入する。

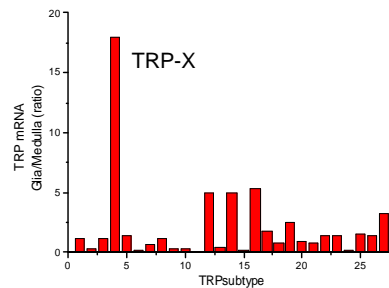


作製したプラスミドを、マウス延髄由来の神経系培養細胞に電気穿孔法 (275V、0.7 msec を 1 パルス及び、20V、50 msec を 10 パルス) で、エレクトロポレーター CUY21Pro-Vitro (ネッパジーン社) にて遺伝子導入する。導入した神経系培養細胞に ATP または、CO₂ 負荷によって Ca 応答することを 3-(2) の Ca イメージングにて確認する。Ca 応答が確認できたプラスミドを制限酵素 (DraIII) 処理し、pTYF ベクターのバックボーンをアガロース電気泳動にて分離・除去する。このプラスミド断片を精製し、C57BL/6N 系統のマウス由来前核期胚に顕微注射し、状態の良好な 250 個以上の胚を仮親マウス (Slc: ICR) に移植する。得られた産仔について、尾組織を採取し、genotyping 判定を行う。この遺伝子組換えマウスを野生型と交配させ、genotyping 判定で選別繁殖し、ヘテロ同土を交配させ、ホモの組換えマウスを作製する。ホモ遺伝子組換えマウスの新生仔の延髄から、組織スライスまたは神経系細胞を単離し、グリア・神経回路網で、TRP サブタイプ発現を抑制したグリア細胞選択的に、Case-12 による Ca 応答イメージング計測解析に用いる。また whole body plethysmography 法による換気応答の計測に用いる。

4. 研究成果

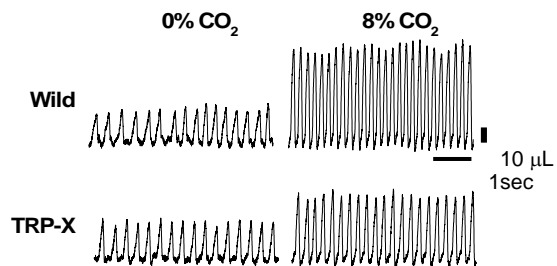
(1) 脳幹・延髄グリア細胞に発現する TRP チャネルの網羅的解析

GFAP-eGFP-Tg マウス由来の脳幹・延髄から eGFP の緑色蛍光を指標に ACSAria を用いてグリア細胞を選別回収した。Real time PCR 解析により、延髄組織における TRP チャネル発現に対し、延髄から選別単離したグリア細胞群の TRP チャネル発現パターンを解析した。その結果、下図に示すように TRP チャネルの 4~5 サブタイプが延髄のグリア細胞で高発現であった。そのうち最も高発現である TRP-X (未発表のため X サブタイプとした)。

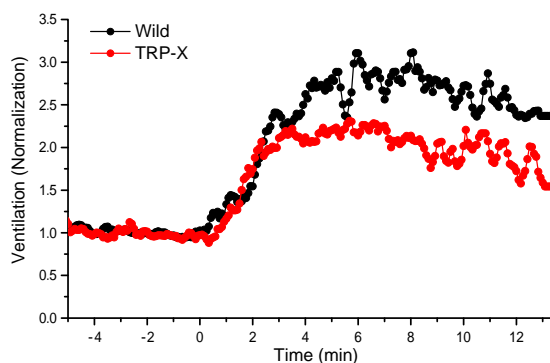


(2) 高 CO₂ 負荷による換気応答

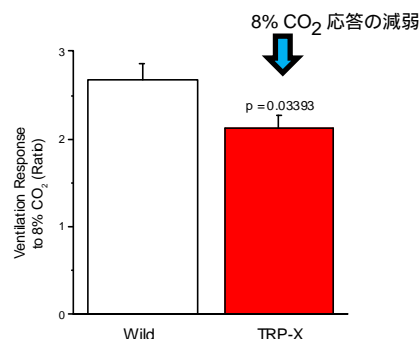
延髄グリア細胞に高発現している TRP-X チャネルの遺伝子欠損マウスにおける高 CO₂ 負荷に対する換気応答の変化を計測し、野生型マウスと比較した。下図のように、野生型マウス (wild) の換気応答において、8% CO₂ 負荷により、一回換気量と呼吸頻度の増加が見られるが、TRP-X 遺伝子欠損マウスでは、8% CO₂ 負荷において、換気応答の減弱が観察された。



さらに、8% CO₂ 負荷に対する経時的な換気応答変化を観察した (下図)。



8% CO₂ 負荷後の換気応答の変動を野生型と比較すると、野生型では、2.7 倍に増加しているが、TRP-X 遺伝子欠損マウスでは 2.1 倍で、高 CO₂ 負荷に対して減弱した (下図)。



換気応答の減弱が観察されたが、値にバラツキがあるので、さらに個体数を増やして実験をする必要があり、現在解析中である。

(3) グリア細胞特異的Ca感受性緑色蛍光色素発現及び、TRPチャンネル発現抑制遺伝子組換えマウスの作製

TRP-Xチャンネル以外のサブタイプで欠損マウスを入手できないものやグリア細胞に発現しているTRPチャンネルの発現抑制をするために、組換え遺伝子マウスの作製をした。この遺伝子組換えマウスは、TRPチャンネルの発現抑制されているグリア細胞のCa応答を計測するために、Ca応答性緑色蛍光タンパク質を同時にグリア細胞に発現させている。それらの遺伝子を導入した約250個の胚から得られた新生仔(58匹)について、尾組織を採取し、genotyping判定を行った。その結果、12系統の新生仔に遺伝子組換えが確認できた。更にC57BL/6N系統のマウスと交配させ、繁殖が可能な系統は9系統であった。genotyping判定で選別繁殖し、ヘテロ同士を交配させ、ホモの遺伝子組換えマウスの3系統を確立した。現在、それらの新生仔の延髄から、組織スライスまたは神経系細胞を単離し、Case-12によるCa応答イメージング解析の検討中である。

TRP遺伝子欠損マウスの利用が提供先の事情により保留となり、その期間はTRPチャンネル発現抑制遺伝子組換えマウスの作製を優先して行った。現在、提供が再開されたことから、whole body plethysmography法による換気応答の計測を継続中である。同時並行でCase-12によるCa応答イメージング解析も進め、TRP-Xチャンネル以外のサブタイプ以外についても検討している。以上の研究を継続し、得られた成果を論文する予定である。

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 0件)

〔学会発表〕(計 2件)

平田 豊、越久 仁敬

TRPチャンネルが関与する、ラット延髄由来グリア細胞における高CO₂負荷に対する細胞外pH非依存的なCa応答
第85回日本薬理学会年会 2012.3.14 京都

平田豊、越久仁敬

TRP channels are involved in mediating hypercapnic Ca²⁺ responses in rat glia-rich medullary cultures independent of extracellular pH.

第34回日本分子生物学会年会 2011.12.13 横浜

〔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

http://www.hyo-med.ac.jp/research_facilities/reserch/physiology1.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平田 豊(Hirata, Yutaka)
兵庫医科大学・医学部・講師
研究者番号：10441247

(2) 研究分担者

越久 仁敬 (Oku, Yoshitaka)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号：20252512

久保 秀司 (Kubo, Shuji)
兵庫医科大学・医学部・准教授
研究者番号：10441320

(3) 連携研究者 なし
()

研究者番号：