

平成 21 年 6 月 18 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007 ～ 2008

課題番号：19790182

研究課題名（和文） 中枢化学受容器機構の解明

研究課題名（英文） The elucidation of mechanisms for central chemoreceptor

研究代表者 平田 豊 (Hirata Yutaka)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：10441247

研究成果の概要：

中枢性化学受容機構解明のため、ラット延髄由来神経系初代培養細胞において、多波長同時観察ユニットを組み合わせた特殊高速高感度光計測システムを用い、細胞外 pH 変化、高 CO₂ 負荷による細胞内 Ca 応答及び pH 応答のイメージング化に成功した。この解析結果から、細胞内 Ca 応答は細胞外 pH 変化ではなく、高 CO₂ 負荷による細胞内 H⁺ 濃度上昇に起因している仮説が示唆された。穿孔パッチクランプ法によっても高 CO₂ 負荷による脱分極が観察されたが、Na 電流は検出されないことから、グリア細胞が CO₂ 感受性を持っている可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	3,100,000	0	3,100,000
2008 年度	400,000	120,000	520,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	120,000	3,620,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・環境生理(含体力医学・栄養生理学)

キーワード：環境生理

1. 研究開始当初の背景

呼吸中枢は、PCO₂ レベルを検出することによって、驚くべき精密さで生体の PCO₂/pH 環境を一定値に保っている。PCO₂ に対する換気応答の 2/3 は中枢化学受容器が担っている (Smith et al. J Appl Physiol 100: 13, 2006)。多くの中枢化学受容細胞 (CRC; central chemoreceptor cell) 候補が脳幹内で見つかっているが、どの細胞が真の CRC で

あるのか、CRC において何が PCO₂/pH を検知している分子実体であるかは未だ解明されていない。これらの分子レベルでの中枢化学受容機構の解明は、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。

2. 研究の目的

生理的な PCO₂ レベルで内因性に化学感受性

を有する細胞の特定と、化学感受性分子の同定を行い、その分子実体が vivo 系で化学受容器として機能していることを確認することが最終目標である。

(1) 延髄の由来のニューロン・グリア共培養系で、CO₂/pH 感受性細胞内 Ca 応答測定を行い、組織特異的プロモーターによる蛍光性タンパク質の発現によって、CO₂/pH 感受性細胞がニューロンかグリア細胞か、あるいは NK1R-positive 細胞なのかを特定する。

(2) その CO₂/pH 感受性細胞培養系を用い、薬理学的手法と電気生理学的手法によって、化学感受性分子の候補を選定する。

(3) さらに、個体レベルで、化学感受性分子を標的とした RNAi 誘導型アデノウイルスを用い、その分子発現を抑制した時に、換気応答が減弱するか否かを whole body plethysmography 法にて検討し、真の CO₂/pH 感受性分子・細胞として機能しているかどうかを評価する。

3. 研究の方法

(1) 延髄由来ニューロン・グリア共培養

系：妊娠ラット 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 Ca 応答および pH 変化のイメージング**：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 または pH 感受性蛍光色素である SNARF-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) を用いて、CO₂/pH 感受性細胞の細胞内 Ca 応答・pH 変化をイメージングし、動画像として記録・解析する。SNARF-1 の蛍光は Dual-View image splitter にて分器することにより 2 波長を同時計測する。その蛍光変化比を高 K⁺/nigericin 法により作成した検量線から、BV_analyzer (BrainVision 社) にてイメージング化する。

(3) **穿孔パッチクランプ**：gramicidin が含まれるパッチクランプ用電極内液を用い、保持電位 -60mV にて穿孔パッチをクランプする。-150mV から 80mV の範囲で 10mV ごとに電位を変化させて、膜電流を計測し、I-V カーブを作成する。また、定電流及び定電圧にて 12%CO₂ 負荷など刺激による膜電位、電流変化

をそれぞれ計測する。

(4) **whole body plethysmography**：マウスの新生仔 (P4 から P10) をポンプとフローメーターにて一定流量で吸引している小型チャンバーに入れる。呼吸によるチャンバー内の圧変化と呼吸頻度を増幅器、微差圧トランスデューサー及び Power Lab (計測装置) にて計測する。一回換気量は検量線により算出する。

4. 研究成果

(1) 図 1 に示すように、ラット延髄由来初代培養細胞において、ニューロン・グリア細胞共培養系及びグリア細胞高密度培養の確立に成功した。赤色に染色されている細胞がニューロンで、緑色はグリア細胞である。青色は細胞核を染色している。図 1a はニューロン・グリア細胞共培養。図 1b はニューロンがほとんど検出されないグリア細胞高密度培養である。

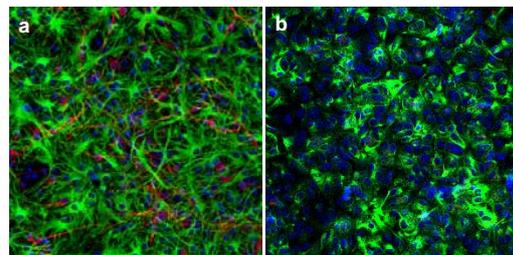
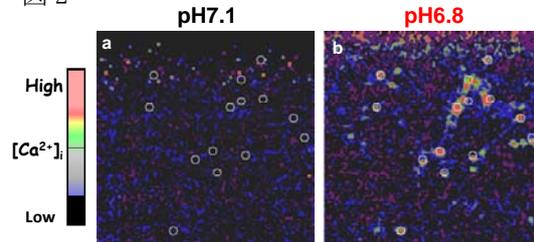


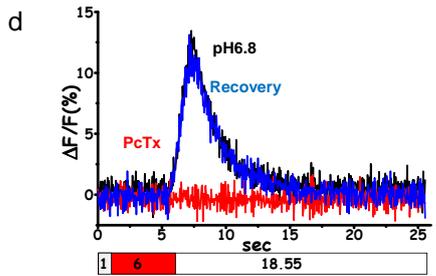
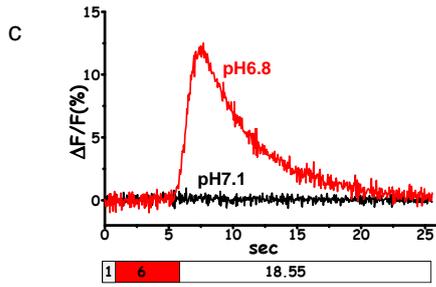
図1 神経細胞(MAP-2; red)、グリア細胞(GFAP; green)、細胞核(DAPI; blue)

(2) ラット延髄由来初代培養細胞を用いて、細胞外 pH 変化や CO₂ 負荷に対する細胞内 Ca 応答のイメージング解析を行った。pH7.4 から pH6.8 への細胞外の酸性負荷による Ca 応答はタランチュラ毒由来の特異的阻害剤・psalmotoxin (PcTx) によって完全に抑制されたことから、acid-sensing ion channel 1a (ASIC1a) を介したものであった(図 2)。

図 2

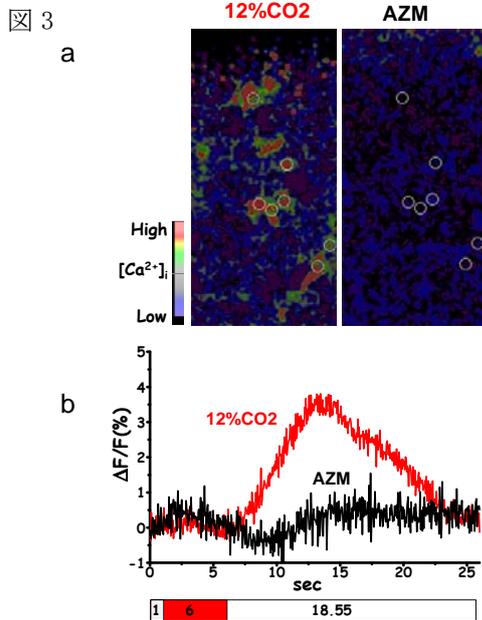


a と b では細胞外 pH7.4 から 7.1 または 6.8 に変化させたときの Ca 応答のイメージングの図である。各細胞を白丸で囲み、その蛍光強度の経時的变化を trace として、図 2 の c, d にて示している。



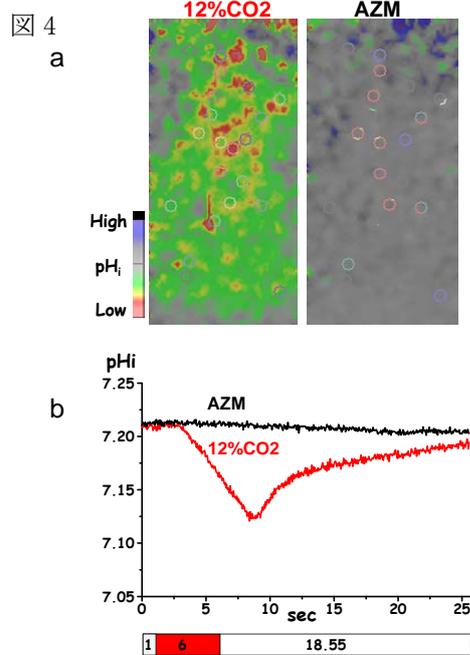
dではpH6.8に対するCa応答に対してPcTx前処理による阻害効果及び阻害剤洗浄後の回復を示している。

一方で、pH7.1への細胞外の酸性負荷では細胞内Ca応答は引き起こされないにも関わらず、12%CO₂負荷によって細胞内Ca応答が引き起こされた。様々なスクリーニングの結果、このCa応答は炭酸脱水素酵素阻害剤(AZM)によって抑制された(図2a 2c、図3)。



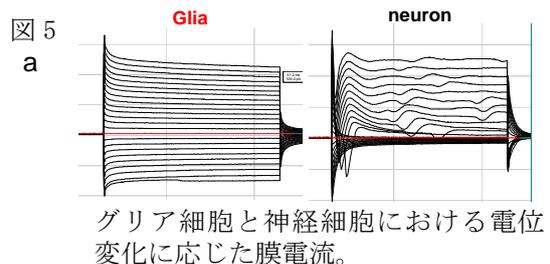
aのCaイメージングでは12%CO₂負荷による細胞内Ca応答とそれに対する炭酸脱水素酵素阻害剤(AZM)の効果を示している。その経時変化をbに示している。

そこで、内因性CO₂感受性細胞のCa応答が、細胞内H⁺濃度上昇に起因しているかどうかを判断するため、細胞内pH値変化の計測を試みた。1波長励起による2波長蛍光が計測可能な多波長同時観察ユニットシステムを組み合わせた特殊高速高感度光計測システム(BrainVision社製MiCAM Ultima)を用いて、細胞内pH値の変動のイメージング化に成功し、12%CO₂負荷による細胞内pH値の低下が観察された(図4)。

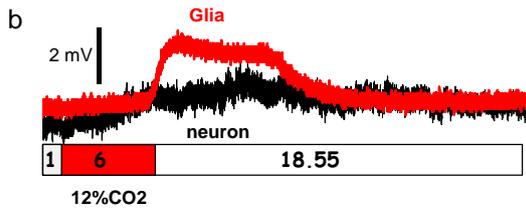


aのpH_iイメージングでは、12%CO₂負荷による細胞内pH応答とそれに対するAZMの効果を示している。その経時変化をbに示している。

従って、CO₂感受性は細胞外pH変化ではなく、CO₂負荷による細胞内pH低下によってCa応答が引き起こされる仮説が示唆された。さらに、グラミシジン-穿孔パッチクランプ法によって、膜電位変化を計測したところ、12%CO₂負荷による膜の脱分極が観察された(図5b)。しかし、それらの応答細胞ではNa電流は検出されないことから(図5a)、グリア細胞がCO₂感受性を持っている可能性が示唆された。



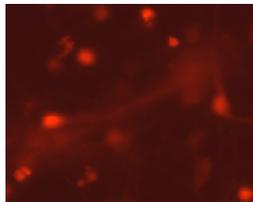
グリア細胞と神経細胞における電位変化に応じた膜電流。



グリア細胞と神経細胞における 12%CO2 負荷に対する膜電位変化。

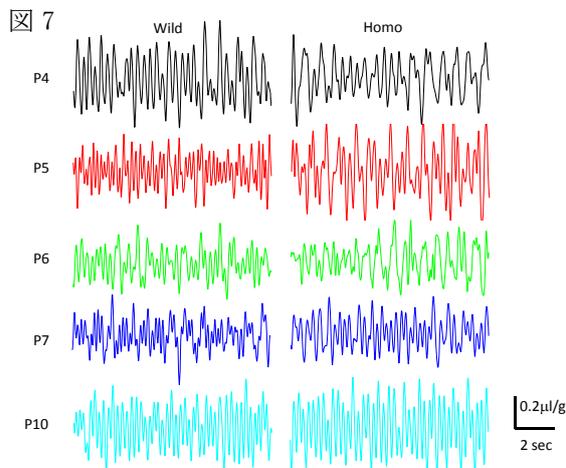
(3) Substance P の受容体である neurokinin1 receptor (NK1R) のプロモーター特異的誘導による赤色蛍光性タンパク質・RFP の発現をアデノウイルスによって、ラット延髄由来初代培養細胞に行った。アデノウイルスではほとんど発現しなかったが、レンチウイルスでは RFP の発現が成功した(図 6)。

図 6 ラット延髄由来初代培養細胞における NK1R 発現細胞を RFP によって検出

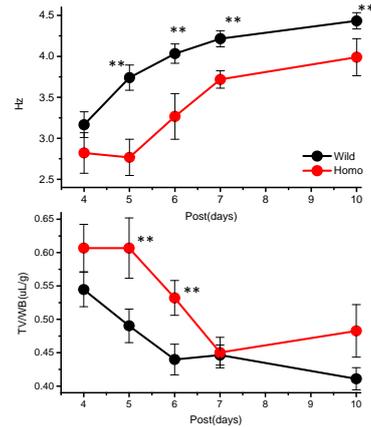


今後、このレンチウイルスを CO2 応答性細胞に用いる。

(4) 個体レベルで、CO2 感受性分子がどのように機能しているかを評価するために whole body plethysmography 法を確立した。新生仔マウスにおいては生後 4 日から換気応答の評価が可能であり、glutamate transporter (GLT1) 遺伝子欠損マウスでは有意に呼吸頻度は減少し、一回換気量の増加が観察されたことから、CRC の生体での呼吸応答を評価できる実験システムが整った(図 7)。



Whole body plethysmography による Wild と GLT1KO マウスの代表的な呼吸の trace。



Wild と GLT1 KO マウスで、呼吸頻度と換気量に有意な差が見られた。

現在、これらの成果を論文投稿する準備中である。

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)

[学会発表] (計 1 件)

Yutaka Hirata & Yoshitaka Oku

Primary-cultured medullary cells, possibly glial cells, respond to hypercapnia and/or hypocapnia independently of extracellular pH in rats. 第 6 回ヨーロッパ神経科学会 4: 194. 5, 2008 (2008 年 7 月 15 日、スイス、ジュネーブ)

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・助教
研究者番号：10441247

(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：