

機関番号：63905

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790216

研究課題名（和文） 神経・グリアにおける細胞容積感受性イオンチャネル活性化機構の研究

研究課題名（英文） Research on the activation mechanism of volume-sensitive ion channels in neurons and glia

研究代表者

秋田 天平（AKITA TENPEI）

生理学研究所・細胞器官研究系・特任助教

研究者番号：00522202

研究成果の概要（和文）：本研究では細胞の大きさ・形や運命の制御に関わるタンパク分子の中で非常に影響力の強いものの1つである細胞容積感受性外向整流性アニオンチャネル（VSOR）について、その脳神経系の細胞上での活性化機構と役割について検討を行い、研究期間中特に脳内の主要なグリア細胞であるアストログリアでの VSOR 活性化機構に関し、脳内の軽微な局所的傷害に対しても確実にその活性化を導くための基盤メカニズムを発見することができた。

研究成果の概要（英文）：We investigated the activation mechanism of one of the most influential regulators of cell volume, shape and fate, the volume-sensitive outwardly rectifying (VSOR) anion channel in the central nervous system. Within this research period, we have found especially a fundamental mechanism of VSOR channel activation in the major glial cells, astrocytes, which would operate even in response to a minute damage happening in surrounding tissues with high fidelity and certainty.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：細胞容積調節・イオンチャネル・アストログリア・ブラジキニン・カルシウムイオン・カルシウムナノドメイン・活性酸素種・細胞間情報伝達

1. 研究開始当初の背景

細胞容積は外界の大きな浸透圧変化や炎症・虚血・細胞死等の病的状況のみならず、細胞の増殖・分化・伸展・移動等の基本的生理機能の発現時にも変化するため、その容積調節機構の一つとして細胞容積感受性イオンチャネルがあらゆる種類の細胞に備わっている。細胞容積調節は細胞内外の正味の溶質と水の出入りを調節することにより達成されるが、中でも細胞容積感受性外向整流性アニオンチャネル（VSOR）は陰イオン（アニオン）の出入りを調節する最も強力なものである。通常 VSOR は容積の増大に伴って活性化され、陰イ

オンを細胞外に放出することを通じて容積を元に戻す方向に働くが、その活性化機序は未だ解明されていない。一方、容積変化に対する VSOR 活性化の閾値や活性化によって生じる電流の変化率を増減しうる各種細胞内シグナリング分子が知られており、中には活性酸素種（ROS）のように測定上全く容積変化を伴うことなく VSOR を活性化し、結果として細胞容積の縮小を誘導するものもある。神経・グリアにおける容積調節機構について、これまで様々な検討がなされているが、その中で VSOR の役割について明確に言及しているものは、研究代表者の所属研究室からの近年の

数報を除き、まだあまり報告が無かった。

2. 研究の目的

本研究はマウス大脳皮質由来の神経・グリアの培養系を用いて、様々な条件下で活性化される VSOR 電流とそれに伴う細胞容積変化及び細胞内 Ca^{2+} ・ROS 等のシグナリング分子の濃度変動・空間分布との相関関係を丁寧に解析し、VSOR 活性化のタイミング・キネティクスとその必要条件を可能な限り正確に把握することにより、脳神経系での VSOR 生理機能の理解を一層深め、さらに容積調節機構の破綻した状態と考えられる炎症・虚血性疾患等における神経・グリアの病態変化にはどのような条件で移行しうるのかについてまで検討を進めるのが目的であった。

3. 研究の方法

(1) マウス大脳皮質由来神経・アストログリア細胞培養系の構築

神経細胞は胎生 14 - 16 日齢、アストログリア細胞は哺乳 2 - 3 日齢のマウス大脳皮質より取得し、分散培養して実験に用いた。必要に応じて神経・アストログリアの共培養系も用いた。

(2) 電気生理学的測定

ホールセルパッチクランプ法により細胞膜電位固定下で VSOR 活性化による細胞膜電流の変化を測定した。

(3) 細胞内 Ca^{2+} ・ROS イメージング

Ca^{2+} 及び ROS 蛍光指示薬を細胞内に負荷し、冷却 CCD カメラを通じてそれらのイメージングを行った。

(4) グルタミン酸放出量の計測

VSOR 活性化刺激に伴いアストログリアから細胞外に放出されたグルタミン酸量を蛍光アッセイ法により計測した。

(5) 細胞容積測定

コールター型細胞粒度分布計測装置及び細胞内に負荷した蛍光色素の濃度変化のイメージングにより細胞容積変化を測定した。

(6) 定量 RT-PCR・免疫細胞化学染色及び siRNA を用いた遺伝子ノックダウン

VSOR 活性化に関わる Ca^{2+} チャネルやプロテインキナーゼを定量 RT-PCR・免疫細胞化学染色により同定し、それらに対する siRNA を用いてそれぞれの遺伝子ノックダウンの効果を調べた。

4. 研究成果

(1) ブラジキニンにより誘起されるアストログリア VSOR 活性化機構とその細胞間情報伝達への寄与の発見

強力な炎症化学伝達物質の 1 つであるブラジキニンの作用により、脳内の主要なグリア細胞であるアストログリアから興奮性伝達物質のグルタミン酸が放出され、それが隣接する神経細胞に様々な影響を及ぼすことが知られている。しかし、そのグルタミン酸放出のメカニズムについては様々な議論がなされており、統一的な見解が得られていなかった。一方、以前研究代表者の所属研究室に在籍していた Liu Hong-Tao 博士により、VSOR がグルタミン酸を有意に透過すること、またブラジキニンによりアストログリア上の VSOR が活性化されることを示唆する手掛かりが得られており、このことは VSOR を介するグルタミン酸放出とそれを通じた神経への情報伝達という新たなメカニズムの可能性を示唆していたため、研究代表者は本研究費申請後直ちにその検証を開始することとした。

その結果、まず神経・アストログリアの共培養系において、ブラジキニン投与後にアストログリアから放出されたグルタミン酸を介する隣接神経細胞への情報伝達（神経細胞上の NMDA 型グルタミン酸受容体活性化を介する神経細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇）が、VSOR 活性化阻害剤存在下では確かに抑制されることが判明した（図 1）。

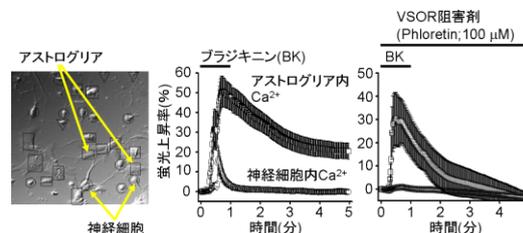


図 1 VSOR を介するアストログリア-神経細胞間 Ca^{2+} シグナリング。アストログリアよりやや遅れて発生する神経細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は VSOR 阻害により消失する。（論文②より改変。）

実際アストログリアから放出されたグルタミン酸量を蛍光アッセイ法により測定したところ、VSOR 阻害剤存在下では放出量の減少が確認され、一方開口放出阻害剤のテタヌス毒素は有意な減少をもたらさなかった。また、個々のアストログリア細胞について細胞膜電流測定を行ったところ、ブラジキニン投与により典型的な VSOR 活性化電流の発生が認められた。しかし、この VSOR 活性化は細胞容積の増大を伴っていなかったため、細胞内 ROS 生成の関与について調べたところ、ROS 除去剤或いは細胞内 ROS 生成酵素の一つである NADPH oxidase (NOX) に対する阻害剤投与により、ブラジキニン投与後の VSOR 活性化電流の発生及びグルタミン酸放出、そして隣接神経へ

の情報伝達の全てが抑制されることが判明した。以上のことから、ブラジキニンの作用によりアストログリア上の VSOR が細胞内 ROS 生成を介して細胞容積増加を伴わずに活性化され、その VSOR を通じて放出されたグルタミン酸が隣接する神経への情報伝達を担っているという、これまでに知られていなかった新たなメカニズムが明らかとなった(図2)。痛みや腫れ・血圧低下など非常に強い作用を持つことで知られるブラジキニンは、いわゆる典型的な細菌感染等による炎症時のみならず、単純な組織灌流障害を含む様々な種類の傷害時に、脳内いたるところの組織間隙・血管内で容易に産生される物質であり、今回発見されたメカニズムは、脳内の多くの病態に付随するアストログリアからのグルタミン酸過剰放出による神経毒性を和らげるための治療の手がかりを与えるものと考えられる。(これらの成果は下記論文②として発表した。)

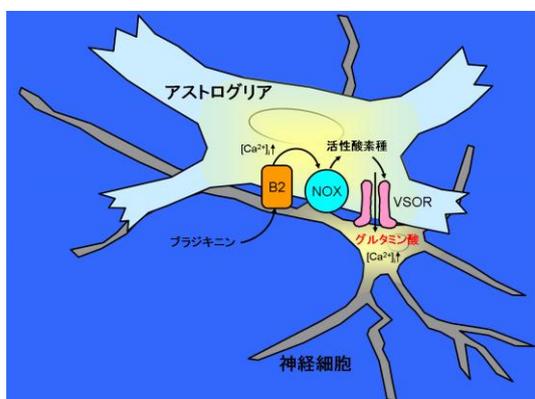


図2 ブラジキニンにより誘起されるアストログリア VSOR 活性化機構の模式図

(2) 「Ca²⁺ナノドメイン」を介するブラジキニン誘起性アストログリア VSOR 活性化機構の発見

上記のブラジキニンによるアストログリア VSOR 活性化機構において、ブラジキニン作用直後にアストログリア内で明瞭な Ca²⁺濃度上昇が ROS 生成に先行して誘起されることが分かっていたが、当初の検討で細胞膜透過型の Ca²⁺キレート剤である BAPTA-AM を細胞外から投与し、観測される Ca²⁺濃度上昇を大きく抑制しても VSOR 活性化はあまり抑制を受けず、一見 Ca²⁺濃度上昇は無関係であるように思われた。しかし、細胞内 Ca²⁺の作用部位が Ca²⁺の通り道である Ca²⁺透過型イオンチャネルの極めて近傍、数十ナノメートル以内(1ナノメートルは100万分の1ミリ)に存在する場合、その Ca²⁺作用を阻害するためには非常に高濃度の Ca²⁺キレート剤を細胞内に負荷する必要があることが知られており、細胞膜透過型のキレート剤では十分高濃度のキレート剤が細胞内に取り込まれていない可能性も考え

られた。そのような通常の光学顕微鏡の空間分解能よりも狭い、Ca²⁺チャネルから至近距離の領域は「Ca²⁺ナノドメイン」と呼ばれ、実測不能ながら非常に高い Ca²⁺濃度上昇が起こっていることが知られており、例えば神経終末部位での伝達物質放出や心筋の興奮収縮連関においては、1細胞上の局所で非常に素早い正確な機能発現が達成される上で、Ca²⁺ナノドメイン内での制御機構が重要な役割を果たしていることが知られている。一方、VSOR 活性化機構に関し、その活性化様式(細胞容積増加を伴う或いは伴わない場合)や細胞種の違いを問わず、これまで Ca²⁺ナノドメインを介する制御機構は全く知られていなかったが、1細胞上の局所的な容積調節或いは形態変化を誘導する上で、そのような制御機構は非常に有効な機序であることが想像されたため、Ca²⁺の関与についてより詳細に検討することとした。

ブラジキニンにより誘起されるアストログリア内 Ca²⁺濃度上昇は、作用直後の大きな振幅を形成する細胞内 Ca²⁺ストアからの Ca²⁺放出による成分と、その後の小さな振幅を継続させる、ストア作動性ないし受容体作動性と呼ばれる細胞膜 Ca²⁺チャネルを介する、細胞外からの Ca²⁺流入による成分の2つからなることがまず確認された。そこで、それぞれの成分を細胞内 Ca²⁺ストアの枯渇及び細胞外 Ca²⁺除去により段階的に取り除いたところ、ブラジキニンにより誘起される VSOR 活性化電流も 1/2、1/4 と段階的に抑制され、さらに細胞内外に Ca²⁺キレート剤を追加して微量な残留 Ca²⁺をも徹底的に取り除くことにより VSOR 活性化電流はほぼ消失した。関与する細胞膜 Ca²⁺チャネルの種類を定量 RT-PCR・免疫細胞化学染色及び siRNA を用いた遺伝子ノックダウンの手法を用いて探索したところ、Orail1・TRPC1・TRPC3 の3種類が Ca²⁺濃度上昇に寄与していることが判明したが、VSOR 活性化については特に TRPC1 を通る Ca²⁺流入がより強く関与していることも判明した。また、VSOR 活性化の時間経過は Ca²⁺濃度上昇の時間経過よりもずっとゆっくりで且つ長く継続するため、Ca²⁺濃度上昇と VSOR 活性化を介する酵素系の関与を考え探索したところ、Ca²⁺依存型プロテインキナーゼ C (α及びβ型)に対する選択的阻害剤或いはそれらの遺伝子ノックダウンにより、Ca²⁺濃度上昇が維持されたまま ROS 生成及び VSOR 活性化が抑制されることが判明した。以上のことから、ブラジキニンにより誘起されるアストログリアの VSOR 活性化は、やはり細胞内 Ca²⁺濃度上昇に強く依存しており、様々な Ca²⁺依存型酵素系の介在を通じて誘起されていることが明らかとなった。

これらのことから、当初の検討で用いた細胞膜透過型の Ca²⁺キレート剤では VSOR 活性化

に関わる Ca^{2+} 作用を阻害するには不十分であったことが強く示唆されたため、高濃度の Ca^{2+} キレート剤を細胞膜電流計測で用いるガラスピペット電極を通じて直接細胞内に注入した効果について調べたところ、有意に VSOR 活性化を抑制するには 10 mM以上の高濃度 BAPTA を注入する必要があることが判明した。理論的な検討から、このことは VSOR 活性化に関わる Ca^{2+} 作用が、 Ca^{2+} 放出及び流入を担う Ca^{2+} チャネル分子の開口部近傍、およそ 20 ナノメートル以内の Ca^{2+} ナノドメインで起こっていることを示唆した (図3、これらの成果は論文①として近日中に発表される予定である。)

個々の Ca^{2+} チャネル毎に形成されるナノドメインを介して活性化が制御されるということは、例えばごく僅かな化学伝達物質の作用により細胞内でその作用部位近傍でのみ限局的に、たとえ観測し難い程度の Ca^{2+} 濃度上昇しか発生しなかった場合でも、その上昇に関わった Ca^{2+} チャネルの周囲では確実に制御機構が働くことを意味する。従って、 Ca^{2+} ナノドメインを介する VSOR 活性化制御機構は、1細胞上の例えば微細突起毎に独立して局所的な容積調節或いは形態変化を誘導するための基盤を与えるものと考えられる。細胞容積調節に関わる分子についてこのような制御機構の存在が明らかになったのは、全く世界で初めてのことである。また、特に VSOR の場合、容積調節と同時に局所的な細胞間情報伝達にもこの機構が寄与しうることが、今回の我々の研究結果から示唆された。従って、今後は実際に細胞の一部にのみ化学伝達物質が作用した場合に誘起される細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇と、その部分の容積調節・形態変化及び細胞間情報伝達による周囲細胞への影響との相関の詳細を明らかにすることが是非とも必要である。また、ブラジキニンのような炎症物質のみならず、例えばアストログリア自身により放出される ATP やグルタミン酸等の情報伝達物質によってもアストログリア内に Ca^{2+} 濃度上昇が誘起されることがよく知られている。従って、そのような情報伝達物質についても同様な VSOR 活性化機構が働くか否かを調べることは、自己放出された情報伝達物質によりどのように細胞の形態変化等が制御されるのかといった、いわば細胞生命の基本原理解明にもつながる重要な課題であると考えられる。

なお、本研究費申請時には検討を予定していた神経細胞上の VSOR 活性化機構について、今回の2年の研究期間では十分に研究を進めることができなかつた。しかし、上記アストログリアからの情報伝達を介する相互作用を考慮しながら是非今後検討を進めていきたい。

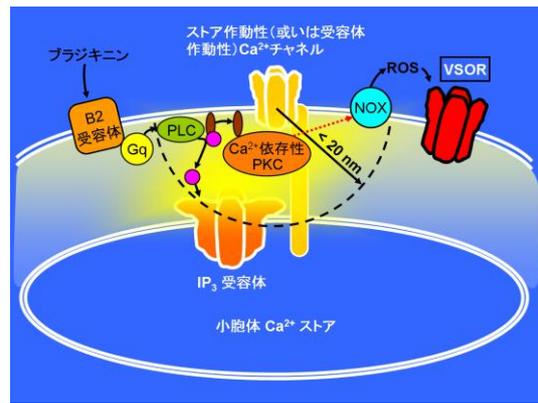


図3 「 Ca^{2+} ナノドメイン」を介するブラジキニン誘起性アストログリア VSOR 活性化機構の模式図

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3件)

- ① Akita T & Okada Y (2011) “Regulation of bradykinin-induced activation of volume-sensitive outwardly rectifying anion channels by Ca^{2+} nanodomains in mouse astrocytes.” *The Journal of Physiology* In press [査読有]
- ② Liu HT, Akita T, Shimizu T, Sabirov RZ & Okada Y (2009) “Bradykinin-induced astrocyte-neuron signalling: glutamate release is mediated by ROS-activated volume-sensitive outwardly rectifying anion channels.” *The Journal of Physiology* 587(10):2197-2209 [査読有]

[学会発表] (計4件)

- ① 秋田天平 (発表代表者)、“Regulation of bradykinin-induced activation of volume-sensitive outwardly rectifying (VSOR) anion channels via “ Ca^{2+} nanodomains” in mouse cortical astrocytes.” 第87回日本生理学会大会、2010年5月21日、盛岡市民文化ホール・マリオス (岩手県)
- ② 秋田天平 (発表代表者)、「 Ca^{2+} ナノドメイン」を介するブラジキニン誘起性アストログリア細胞容積センサー外向整流性アニオンチャネル (VSOR) 活性化機構、第56回中部日本生理学会、2009年12月4日、石川県立音楽堂 (石川県)
- ③ 秋田天平 (発表代表者)、“Regulation of bradykinin-induced activation of volume-sensitive outwardly rectifying (VSOR) anion channels via “ Ca^{2+} nanodomains” in mouse cortical astrocytes.” 第40回生理学研究所国際シンポジ

- ウムPAT-CVR2009、2009年8月3日－6日、
岡崎コンファレンスセンター（愛知県）
- ④ 秋田天平（発表代表者）、“Bradykinin-induced glutamate release via volume-sensitive outwardly rectifying (VSOR) anion channels in mouse cortical astrocytes.” 第36回国際生理学会、2009年7月31日、国立京都国際会館（京都府）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nips.ac.jp/contents/release/entry/2009/02/vsor.html>（論文②に関して）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

秋田 天平 (AKITA TENPEI)

生理学研究所・細胞器官研究系・特任助教
研究者番号：00522202