

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450440

研究課題名(和文) 脊髄アストロサイトのグリア伝達物質放出機構と細胞保護における役割の解明

研究課題名(英文) Gliotransmitter release and its protective effects in spinal astrocytes

研究代表者

乙黒 兼一 (Otsuguro, Ken-ichi)

北海道大学・獣医学研究科・准教授

研究者番号：40344494

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：神経保護作用を示すことが知られているアデノシンや硫化水素のアストロサイトにおける産生・放出機構と作用を培養脊髄アストロサイトを用いて検討した。低Ca²⁺刺激ではアストロサイトからATPが放出され、これが細胞外で代謝されることでアデノシン濃度が増加することが示された。また硫化水素産生酵素CBSのアストロサイトでの発現は、ニューロンによって調節・維持されていることが示唆される。アデノシンや硫化水素は受容体やイオンチャンネルを介して細胞機能に影響を与えることが示された。虚血病態で起こる低Ca²⁺やニューロン死によるアデノシンや硫化水素の動態変化が、病態の形成・進展に関わっている可能性が示唆される。

研究成果の概要(英文)：Production and release mechanisms of adenosine and hydrogen sulfide (H₂S), which are known to be neuroprotective agents, were examined in the cultured spinal astrocytes. Under the low Ca²⁺ conditions, ATP released by astrocytes was extracellularly degraded to adenosine, resulting in the increase in extracellular adenosine level. The astrocytic CBS (H₂S synthase) expression was suggested to be controlled/maintained by the neurons. Adenosine and H₂S affect cellular functions via the activation of receptors and ion channels. Under the ischemic conditions, it is suggested that the change in adenosine and H₂S production and releases by the low Ca²⁺ and/or neuronal death is involved in disease onset and progression.

研究分野：獣医薬理学

キーワード：アストロサイト アデノシン 硫化水素 脊髄 グリア伝達物質

1. 研究開始当初の背景

脊髄は感覚や運動機能を統合・調節する中枢神経組織である。最近、アストロサイトが ATP やアデノシンなどのプリン化合物やグルタミン酸などの伝達物質を放出し、シナプス伝達や脳循環などの生理的機能を調節していることが報告されている。また、アストロサイトが放出するグリア伝達物質には細胞保護作用を持つものがあり、組織損傷の治療や保護の役割を果たしている可能性がある。アデノシンや硫化水素は神経保護作用を示すことが報告されているが、中枢神経組織でのその主要な産生・放出源はアストロサイトである。そのため、これらのグリア伝達物質が病態下の細胞保護機構に重要な役割を果たしていると考えられるが、脊髄を含めた中枢神経組織におけるアデノシンや硫化水素の産生・放出機序は今だ解明されていない。

2. 研究の目的

本研究課題は、神経保護効果を持つグリア伝達物質の脊髄アストロサイトにおける放出機構を明らかにすることを目的とする。グリア伝達物質の中にはアデノシンのように細胞保護作用を示すものがあるが、その産生・放出機序や脊髄傷害の保護・治療過程における役割は不明である。アストロサイトは組織環境の変化や刺激で形態が変化し、反応性アストロサイトとなることで様々な分子の発現パターンが変化する。そのため、アストロサイトの機能と反応性への変化を詳細に検討し、病態下でのグリア伝達物質放出機構を明らかにし、グリア伝達物質を介した細胞保護機構の解明と脊髄機能障害の新規治療法開発の基盤となる知見を得る。

3. 研究の方法

(1) 酵素処理により新生ラット脊髄細胞を分離した。培養フラスコの振盪によりアストロサイトを選別した後、DMEM/Ham's F12 medium で培養したものを脊髄アストロサイト培養系として使用した。また胎児ラット脊髄から脊髄細胞を分離後、Neurobasal medium で培養した。アストロサイトの増殖を抑制するために、cytosine arabinoside を培養 2 日または 7 日後に添加し、それぞれを脊髄ニューロン培養系または脊髄細胞混合培養系として使用した。また脊髄ニューロン/アストロサイト共培養系は、脊髄アストロサイト培養系に胎児ラット脊髄より分離した脊髄細胞を播種することで作製した。

(2) 脊髄アストロサイトからのプリン化合物放出量は、アデノシン、ADP 及び AMP はエテノ化した後に HPLC 法で、ATP はルシフェリン/ルシフェラーゼ法で測定した。また、脊髄アストロサイトの硫化水素産生量はメ

チレンブルー法で測定した。硫化水素産生酵素 CBS (cystathionin β -synthase) の発現はウエスタンブロット法と免疫組織染色法で測定した。

(3) 脊髄アストロサイトの ecto-NTPDase、Cx43 及び Panx 発現と、RIN-14B 細胞の TRPA1 及び K_{ATP} チャネル発現は RT-PCR 法で検出した。

(4) ラット摘出脊髄標本を作製し、人工脳脊髄液で灌流した。腰髄後根を電気刺激し、対応する前根から反射電位として単シナプス反射電位 (MSR) と遅発性前根電位 (sVRP) を記録した。

(5) RIN-14B 細胞の細胞内 Ca^{2+} 濃度を、 Ca^{2+} 蛍光指示薬 fura-2 を用いてイメージング法で測定した。

4. 研究成果

(1) 低 Ca^{2+} による脊髄アストロサイトからのプリン化合物放出

脊髄アストロサイトを低 Ca^{2+} 溶液 (0-0.1 mM) に曝露すると細胞外プリン化合物量が増加したが、低酸素に曝露しても、細胞外アデノシンや他のプリン化合物量は変化しなかった。

Ecto-NTPDase1, 2 及び 3 を阻害する POM-1 は低 Ca^{2+} によるアデノシン増加を抑制し、ATP 増加を増強した。一方、ecto-NTPDase1 及び 3 を阻害する ARL67156 は低 Ca^{2+} によるプリン化合物増加に影響を与えなかった。脊髄アストロサイトには ENTase1 及び 2 が発現していた。

低 Ca^{2+} による各プリン化合物放出の時間経過を検討したところ、ATP は低 Ca^{2+} 処置直後に一過性に増加し、処置 1 時間後にはほぼコントロール近くのレベルまで減少していた。ADP 及び AMP は ATP より遅れて増加し、低 Ca^{2+} 処置 2 時間後にかけて徐々に減少した。一方、アデノシンは低 Ca^{2+} 処置 1 時間後に増加がピークに達し、処置 2 時間後まで増加が維持された (図 1)。

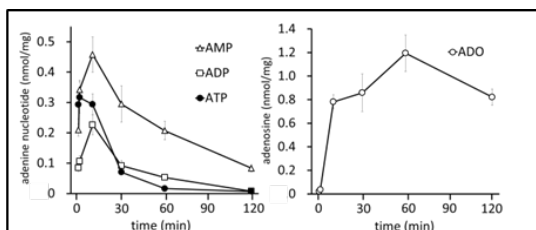


図1 低 Ca^{2+} による脊髄アストロサイトからのプリン化合物放出の時間経過

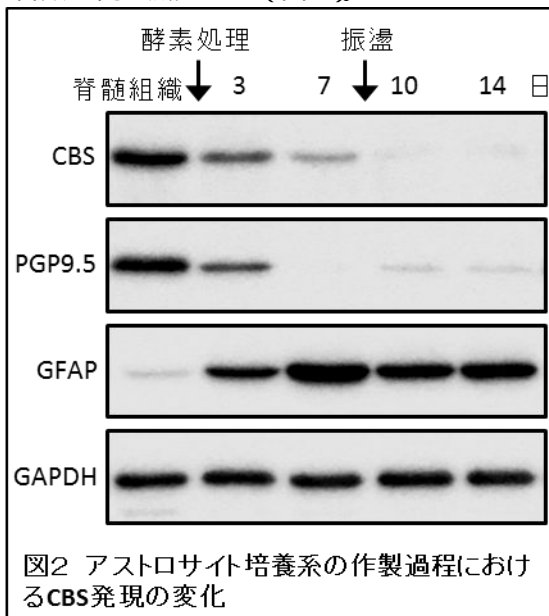
低 Ca^{2+} によるプリン化合物放出反応は、コネキシンヘミチャネル阻害薬 Gap27 及びパネキシンヘミチャネル阻害薬 Panx1 で抑制された。また、脊髄アストロサイトで Cx43 と Panx1 の発現が検出された。

低 Ca^{2+} 刺激によって脊髄アストロサイトからギャップジャンクションヘミチャネルを介して ATP が放出され、この ATP が細胞外で ecto-NTPDase によって代謝されることでアデノシン量が増加することが示された。ATP 放出経路となるギャップジャンクションヘミチャネルとして Cx43 と Panx1 が、また ATP の代謝には ecto-NTPDase2 が関与していることが示唆された。低 Ca^{2+} は虚血病態で引き起こされるため、低 Ca^{2+} によって増加したアストロサイト由来のアデノシンが神経保護に関与している可能性がある。

(2) 脊髄アストロサイトの硫化水素産生とニューロンの影響

新生ラットの脊髄組織では、硫化水素産生酵素 CBS はアストロサイトに局在して発現していた。一方、脊髄組織から分離培養したアストロサイトでは CBS 発現量が顕著に減少し、硫化水素産生量もごくわずかだった。

アストロサイト培養系の作製過程で、アストロサイトマーカーの GFAP 発現量は培養日数に従って増加した。一方、ニューロンマーカーの PGP9.5 と CBS の発現量は、培養日数に従い減少した(図2)。



脊髄細胞混合系では、高い CBS 発現を硫化水素産生が認められた。培養アストロサイトに脊髄細胞を播種したアストロサイト/ニューロン共培養系では、PGP9.5 の発現上昇に伴い CBS 発現が増加した。この時、CBS はニューロンではなくアストロサイトに発現していた(図3)。

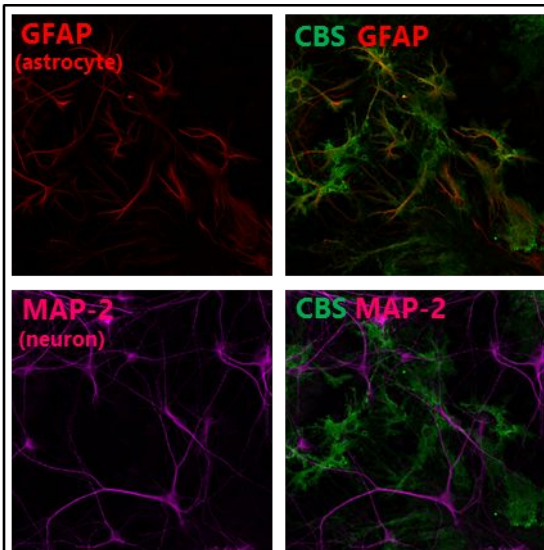


図3 ニューロン/アストロサイト混合培養系におけるCBS発現

脊髄組織では、硫化水素産生酵素 CBS はアストロサイトに発現していることが示された。アストロサイトの CBS 発現は、ニューロンによって維持されていると考えられる。脊髄での硫化水素産生は、ニューロンとアストロサイトの相互作用によって調節されていることが示唆される。

(3) 脊髄神経活動に対するアデノシンの効果

摘出脊髄標本の反射電位はアデノシン A_1 受容体作動薬 CHA 及びアデノシンキナーゼ阻害薬 ABT-702 で抑制された。両抑制効果は、アデノシン A_1 受容体拮抗薬 8CPT で回復した。

ABT-702 による反射電位抑制効果は、アデノシンデアミナーゼ阻害薬 EHNA で増強され、平衡ヌクレオシドトランスポーター阻害薬 NBTI/dipyridamole で抑制された。

ABT-702 は摘出脊髄標本からアデノシンを放出した。この放出反応は、EHNA で増強され、NBTI/dipyridamole で抑制された。

アデノシンキナーゼの阻害によって増加した細胞内アデノシンが、平衡ヌクレオシドトランスポーターを介して細胞外に放出されること、放出されたアデノシンが A_1 受容体を介して脊髄神経活動を抑制することが示された。アデノシンキナーゼとデアミナーゼが同時に阻害されると、アデノシン増加が増強され、結果的にアデノシン放出量が増加すると考えられる。虚血などの病態下では、アデノシンキナーゼ活性が抑制されることが報告されており、アデノシンキナーゼ活性の低下によって放出されたアデノシンが病態形成に関与している可能性がある。

(4)RIN-14B 細胞に対する硫化水素の効果

RIN-14B 細胞に硫化水素を適用すると、自発的 Ca^{2+} オシレーションの抑制と細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加の、抑制性と興奮性の反応が観察された。硫化水素の濃度に依存して、興奮性効果を占める細胞の割合が増加した。

K_{ATP} チャネル阻害薬存在下では、硫化水素による抑制性作用は消失した。RIN-14B 細胞は K_{ATP} チャネルサブユニット Kir6.2 と SUR1 を発現していた。

硫化水素による興奮性作用の Ca^{2+} 増加は、TRPA1 阻害薬で抑制された。RIN-14B 細胞は TRPA1 を発現していた。

硫化水素は、 K_{ATP} チャネルと TRPA1 を介して、細胞内 Ca^{2+} 動員に対して抑制と興奮の両方向性の効果を示すことが明らかになった。TRPA1 や K_{ATP} チャネルはニューロンやアストロサイトにも発現しており、アストロサイトで産生された硫化水素が、これらの細胞の機能調節を行っている可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

Delgermurun D, Yamaguchi S, Ichii O, Kon Y, Ito S, Otsuguro K. Hydrogen sulfide activates TRPA1 and releases 5-HT from epithelioid cells of the chicken thoracic aorta. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* (2016) 187, 43-49. 査読有

Delgermurun D, Ito S, Ohta T, Yamaguchi S, Otsuguro K. Endogenous 5-HT outflow from chicken aorta by 5-HT uptake inhibitors and amphetamine derivatives. *J. Vet. Med. Sci.* (2016) 78, 71-76. 査読有
DOI: 10.1292/jvms.15-0146

Ujike A, Otsuguro K, Miyamoto R, Yamaguchi S, Ito S. Bidirectional effects of hydrogen sulfide via ATP-sensitive K^{+} channels and transient receptor potential A1 channels in RIN14B cells. *Eur. J. Pharmacol.* (2015) 764, 463-470. 査読有
DOI: 10.1016/j.ejphar.2015.07.029

Kobayashi T, Otsuguro K, Yamaguchi S, Ito S. Contribution of $\alpha 2\text{A}$ -adrenoceptor subtype to effect of dexmedetomidine and xylazine on spinal synaptic transmission of mice. *Eur. J. Pharmacol.* (2015) 761, 321-329. 査読有

DOI: 10.1016/j.ejphar.2015.06.020

Otsuguro K, Tomonari Y, Otsuka S, Yamaguchi S, Kon Y, Ito S. An adenosine kinase inhibitor, ABT-702, inhibits spinal nociceptive transmission by adenosine release via equilibrative nucleoside transporters in rat. *Neuropharmacology* (2015) 97, 160-170. 査読有
DOI: 10.1016/j.neuropharm.2015.05.035

Eguchi R, Akao S, Otsuguro K, Yamaguchi S, Ito S. Different mechanisms of extracellular adenosine accumulation by reduction of the external Ca^{2+} concentration and inhibition of adenosine metabolism in spinal astrocytes. *J. Pharmacol. Sci.* (2015) 128, 47-53. 査読有

Miyamoto R, Otsuguro K, Yamaguchi S, Ito S. Neuronal regulation of hydrogen sulfide-producing enzyme cystathionine β -synthase expression in rat spinal cord astrocytes. *Neurosci. Res.* (2015) 97, 52-59. 査読有

[学会発表] (計 27 件)

Ayako Ujike, Soichiro Yamaguchi, Shigeo Ito, Ken-ichi Otsuguro “ H_2S -induced Ca^{2+} signals are increased by IL-1 β in RIN-14B cells” The 4th Sapporo Summer Seminar for One Health (SaSSOH) 2016年9月20 - 21日 北海道大学 (北海道札幌市)

Dugar Delgermurun, Soichiro Yamaguchi, Osamu Ichii, Yasuhiro Kon, Shigeo Ito, Ken-ichi Otsuguro “ H_2S releases 5-HT from chicken thoracic chemoreceptor cells via the activation of TRPA1” The 4th Sapporo Summer Seminar for One Health (SaSSOH) 2016年9月20 - 21日 北海道大学 (北海道札幌市)

Ryota Eguchi, Soichiro Yamaguchi, Ken-ichi Otsuguro “Multiple ischemic like stimuli increase extracellular adenosine in rat spinal astrocytes” The 4th Sapporo Summer Seminar for One Health (SaSSOH) 2016年9月20 - 21日 北海道大学 (北海道札幌市)

Ayako Ujike, Soichiro Yamaguchi, Shigeo Ito, Ken-ichi Otsuguro “IL-1 β enhances H_2S -induced Ca^{2+} responses and 5-HT release in RIN14B cells” 第59回日本神経化学大会 2016年9月8 - 10日 福岡

国際会議場（福岡県福岡市）

Ryota Eguchi, Soichiro Yamaguchi, Ken-ichi Otsuguro “Ischemic stimuli induce extracellular accumulation of adenosine in rat spinal cord” 第 59 回日本神経化学大会 2016 年 9 月 8 - 10 日 福岡国際会議場（福岡県福岡市）

Delgermurun Dugar, 山口聡一郎, 市居修, 昆泰寛, 伊藤茂男, 乙黒兼一 “Effect of H₂S on 5-HT release from glomus cells in the chicken thoracic aorta” 第 159 回日本獣医学会学術集会 2016 年 9 月 6 - 8 日 日本大学（神奈川県藤沢市）

Dugar Delgermurun, Soichiro Yamaguchi, Osamu Ichii, Yasuhiro Kon, Shigeo Ito, Ken-ichi Otsuguro “H₂S releases 5-HT via activation of TRPA1 in chemoreceptor cells of chicken thoracic aorta” 第 30 回北海道薬物作用談話会 2016 年 7 月 31 日 北海道大学（北海道札幌市）

Delgermurun Dugar, 山口聡一郎, 太田利男, 伊藤茂男, 乙黒兼一 “Effects of 5-HT uptake inhibitors and amphetamine derivatives on 5-HT outflow from chicken aortic body” 第 89 回日本薬理学会年会 2016 年 3 月 9 - 11 日 パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

氏家絢子, 山口聡一郎, 伊藤茂男, 乙黒兼一 “Effect of pro-inflammatory cytokine on H₂S-induced Ca²⁺ responses in RIN14B cells” 第 89 回日本薬理学会年会 2016 年 3 月 9 - 11 日 パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

江口遼太, 山口聡一郎, 乙黒兼一 “Extracellular accumulation of adenosine by ischemic stimulations in rat spinal astrocytes” 2016 年 3 月 9 - 11 日 パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

宮本亮, 乙黒兼一, 山口聡一郎, 伊藤茂男 「ラット脊髄における硫化水素産生酵素 CBS の発現はニューロンにより維持される」 第 88 回日本生化学会大会 2015 年 12 月 1 日 - 4 日 神戸ポートアイランド（兵庫県神戸市）

Ryota Eguchi, Sanae Masumoto, Soichiro Yamaguchi, Shigeo Ito, Ken-ichi Otsuguro “Ca²⁺ reduction accumulates extracellular adenosine in spinal cord” The 3rd Sapporo Summer Seminar for One Health (SaSSOH) 2015 年 9 月 16 - 17 日 北海道大学（北海道札幌市）

Ayako Ujike, Soichiro Yamaguchi, Shigeo Ito, Ken-ichi Otsuguro “Isolation of 5-HT-containing cells using fluorescence activated cell sorter” The 3rd Sapporo Summer Seminar for One Health (SaSSOH) 2015 年 9 月 16 - 17 日 北海道大学（北海道札幌市）

Takeshi Kobayashi, Soichiro Yamaguchi, Yoshihiro Ikenaka, Shigeo Ito, Ken-ichi Otsuguro “Estimate the cause of the species difference of the effectiveness of xylazine by docking simulation” The 3rd Sapporo Summer Seminar for One Health (SaSSOH) 2015 年 9 月 16 - 17 日 北海道大学（北海道札幌市）

Delgermurun Dugar, 山口聡一郎, 太田利男, 乙黒兼一, 伊藤茂男 “5-HT outflow from chicken aorta by 5-HT uptake inhibitors and amphetamine derivatives” 第 158 回日本獣医学会学術集会 2015 年 9 月 7 - 9 日 北里大学（青森県十和田市）

宮本亮, 乙黒兼一, 山口聡一郎, 伊藤茂男 「ニューロンによるラット脊髄アストロサイトの硫化水素産生酵素の発現調節」 第 158 回日本獣医学会学術集会 2015 年 9 月 7 - 9 日 北里大学（青森県十和田市）

江口遼太, 赤尾早苗, 乙黒兼一, 山口聡一郎, 伊藤茂男 “Gap junction hemichannels contribute to extracellular accumulation of adenosine by external Ca²⁺ reduction in rat spinal astrocytes” 第 88 回日本薬理学会年会 2015 年 3 月 18 - 20 日 名古屋国際会議場（愛知県名古屋市）

宮本亮, 乙黒兼一, 山口聡一郎, 伊藤茂男 “Hydrogen sulfide production is controlled by neuronal signals in rat spinal cord astrocytes” 第 88 回日本薬理学会年会 2015 年 3 月 18 - 20 日 名古屋国際会議場（愛知県名古屋市）

Takeshi Kobayashi, Ken-ichi Otsuguro, Soichiro Yamaguchi, Shigeo Ito “Effects of dexmedetomidine and xylazine on spinal nociceptive pathways” The 2nd Sapporo Summer Seminar for One Health (SaSSOH) 2014 年 9 月 24 - 25 日 北海道大学（北海道札幌市）

Delgermurun Dugar, Soichiro Yamaguchi, Ken-ichi Otsuguro, Shigeo Ito “Effects of H₂S on 5-HT release from glomus cells in the chick aortic body” The 2nd Sapporo Summer Seminar for

One Health (SaSSOH) 2014年9月24
- 25日 北海道大学(北海道札幌市)

⑳江口遼太, 増本早苗, 乙黒兼一, 山口聡一郎, 伊藤茂男「脊髄アストロサイトのCa²⁺除去下で見られる細胞外アデノシン増加におけるギャップジャンクションヘミチャネルの関与」第157回日本獣医学会学術集 2014年9月9 - 12日 北海道大学(北海道札幌市)

㉑江口遼太, 増本早苗, 乙黒兼一, 山口聡一郎, 伊藤茂男「細胞外Ca²⁺除去下における脊髄アストロサイトでの細胞外アデノシン増加へのギャップジャンクションヘミチャネルの関与」第28回北海道薬物作用談話 2014年7月19日 北海道大学(北海道札幌市)

㉒ Ryo Miyamoto, Ken-ichi Otsuguro, Soichiro Yamaguchi, Shigeo Ito “Cysteine aminotransferase and mercaptopyruvate sulfurtransferase contribute to H₂S production in the peripheral nervous system” 17th World Congress of Basic & Clinical Pharmacology 2014年7月13 - 18 Cape Town International Convention Centre (Cape Town) South Africa

㉓ Takeshi Kobayashi, Ken-ichi Otsuguro, Soichiro Yamaguchi, Shigeo Ito “Differential contribution of α_{2A} adrenoceptors to the effect of dexmedetomidine and xylazine on spinal synaptic transmission” 17th World Congress of Basic & Clinical Pharmacology 2014年7月13 - 18日 Cape Town International Convention Centre (Cape Town) South Africa

㉔ Ayako Ujike, Ken-ichi Otsuguro, Ryo Miyamoto, Soichiro Yamaguchi, Shigeo Ito “Hydrogen sulfide bidirectionally modulates Ca²⁺ signals in RIN14B cells” 17th World Congress of Basic & Clinical Pharmacology 2014年7月13 - 18日 Cape Town International Convention Centre (Cape Town) South Africa

㉕ Ryo Miyamoto, Ken-ichi Otsuguro, Soichiro Yamaguchi, Shigeo Ito. “H₂S production in peripheral neurons is mediated by cysteine aminotransferase and mercaptopyruvate sulfurtransferase” 3rd International Conference on H₂S Biology and Medicine 2014年6月4 - 6日 京都大学(京都府京都市)

㉖ Ayako Ujike, Ken-ichi Otsuguro, Ryo Miyamoto, Soichiro Yamaguchi, Shigeo Ito “The bidirectional effect of hydrogen sulfide on Ca²⁺ signals via opening KATP and TRPA1 channels in RIN14B cells” 3rd International Conference on H₂S Biology and Medicine 2014年6月4 - 6日 京都大学(京都府京都市)

〔その他〕

ホームページ等

北海道大学大学院獣医学研究院薬理学教室
ホームページ

<http://www.vetmed.hokudai.ac.jp/organization/pharmacol/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

乙黒 兼一 (OTSUGURO, Ken-ichi)

北海道大学・大学院獣医学研究科・准教授
研究者番号：40344494

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

山口 聡一郎 (YAMAGUCHI, Soichiro)

北海道大学・大学院獣医学研究科・助教
研究者番号：50596864