様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 23 年　6 月 10 日現在

機関番号：　34519
研究種目：　若手研究（B）
研究期間：　2009～2010
課題番号：　21790231
研究課題名（和文）　化学性呼吸調節機構の分子基盤の解明

研究課題名（英文）　The elucidation of molecular basis on mechanisms for chemosensitive respiratory regulation

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（和文）：
延髄に存在する中枢化学受容器細胞(CRC)は、血液ガスと pH の恒常性の維持に重要である。内因性 CRC を同定するために、高 CO_2 液の短時間負荷(秒単位)に対する、細胞内 Ca、細胞内 pH 及び膜電位の応答をラット延髄由来初代培養細胞にて計測した。グリア細胞高密度培養系では、細胞内の酸性化が Ca 応答に先行し、細胞外酸性化に非依存的に引き起こされた。この Ca 応答は TRP チャネル阻害剤によって減弱された。また、高 CO_2 負荷 Ca 応答細胞群の一部は、TRP 活性化剤によっても Ca 応答を示した。従って、TRP チャネルは、中枢化学受容機能分子の有力候補と示唆された。

研究成果の概要（英文）：
The medulla contains central chemosensitive cells (CRC) important for the maintenance of blood gas and pH homeostasis. To identify the intrinsic CRC, we measured responses of intracellular Ca^{2+} and H^+, and membrane potential of rat primary-cultured medullary cells to a brief exposure (sec level) to hypercapnic acidosis. In glia-rich cultures, intracellular acidification preceded the hypercapnic acidosis-induced Ca^{2+} response independent of extracellular pH. TRP channel blockers attenuated the hypercapnic acidosis-induced Ca^{2+} response. Subpopulations of cells that exhibited the hypercapnic acidosis-induced Ca^{2+} response also responded to the application of TRP agonist. These results suggest that the TRP channel is a potent candidate of central chemosensing molecules.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2009　年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010　年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総　計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学
科研費の分科・細目：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：TRP、中枢化学受容器 、グリア細胞、カルシウム応答、二酸化炭素、水素イオン濃度、延髄、培養細胞

１．研究開始当初の背景

化学性呼吸調節は、生体内の P_{CO2} / pH 環境の恒常性を極めて厳密に維持している。P_{CO2}/pH 変化に対する換気応答の 2/3 は中枢化学受容器細胞 (CRC; central chemoreceptor cell)による調節機構が担っている。　高 CO_2 ガス負荷によって活動を増加させるニューロンは延髄の複数部位で報告されている（Gourine, et al. *Nature* 2005, Guynenet, et al. *J Physiol.* 2008, Nattie, *J Appl Physiol.* 2008)。しかし、これらのニューロンは、後シナプス性あるいは傍分泌に応答する二次応答ニューロンの可能性もある。

即ち､内因性に応答する CRC の探索には、新しい視点からのアプローチが必要である。また、生理的緩衝液での高 CO_2 ガス負荷は pH 低下 (酸性化)も伴い、CRC がどちらを検出しているかは不明であり、その化学受容器の分子実体が何であるかは不明なままである。

２．研究の目的

本研究の目的は､生理的な P_{CO2} レベルで内因性に化学感受性を有する細胞の特定と、化学受容器機能分子群の同定を行い、化学性呼吸調節機構の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。CO_2 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 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、CO_2/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 にて分光することにより 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、カレントクランプ法及びボルテージクランプ法にて 12% CO_2 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）RT-PCR：

グリア細胞高密度培養系から total RNA を FastPure RNA Kit を用いて抽出した。このtotal RNA (5μg)から PrimeScript RT reagent kit によって cDNA を合成し、PCR に用いた。　PCR は Ex Taq HS kit を用い、反応条件は 98° C(10 sec)、55° C(30 sec)、72° C (35 sec)を 35 サイクルにて行った。用いた primer は以下の通りである。
rat TRPV1(5’-accgtcaacaagattgcaca-3’と 5’-tggttccctaagcagaccac-3’)、
TRPM8(5’-ctgtggcctcgtatcgtttagg-3’と 5’-gccggaatacaatacccgctat-3’)、
TRPA1 (5’-aatgcagtcgatggcaatcag-3’と 5’-ccctgcctacaagcataatgga-3’)、
GFAP (5’-gccgctcctatgcctcctccga-3’と 5’-agaggaaggttgagtcgctgga-3’)、
beta-actin (5’-cccagatcatgtttgagacc-3’と 5’-aggattccatacccaggaag-3’)であり、その推定 PCR 産物サイズは、順に 519、331、364、547 及び 456 bp である。

４．研究成果

（１）CO_2 に対する延髄由来初代培養細胞の Ca 応答

特殊高速高感度光計測システム（BrainVision 社製 MiCAM Ultima）と灌流開閉装置の電磁弁制御を同期化することで、秒単位の短時間の高 CO_2・酸性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。灌流装置の溶液チューブをステンレス製にすることより､CO_2 拡散を防ぎ､培養細胞に再現性のある高 CO_2 溶液の負荷を可能にした。

この光学計測・灌流同期システムにより、ラット延髄由来初代培養細胞が、高 CO_2 負荷(12%CO_2)溶液に対して一過性の Ca 応答することを明らかにした｡高 CO_2 負荷溶液は pH7.1 であることから、HEPES 緩衝液により細胞外液 pH7.4 から pH7.1 へ酸性負荷させたところ、Ca 応答は観察されなかったが、pH6.8 への酸性負荷に対して、一過性の強い Ca 応答を引き起こした。

一方で、高 CO_2 負荷溶液の炭酸水素イオン濃度を下げた場合、正常の 5%CO_2 で、pH7.1 を示す溶液となる。この isocapnic acidosis

溶液では一過性の細胞内 Ca 応答を引き起こさないことから、高 CO_2 負荷溶液に対する一過性 Ca 応答は、細胞外液の酸性化に起因するものではなく、CO_2 が未知の分子に直接作用するか、細胞膜を通過した CO_2 による細胞内の pH 低下(酸性化)が Ca 応答を引き起こすことが示唆された。

興味深いことに、ニューロン・グリア細胞共培養系だけでなく、グリア細胞高密度培養系においても、高 CO_2 負荷に対して一過性の細胞内 Ca 応答が見出された。更に、ニューロン・グリア細胞共培養系では Na チャネル阻害剤・TTX の存在下においても、一過性の Ca 応答が観察されたことから、内因性の中枢化学受容器細胞の存在が示唆された。

（２）CO_2 に対するグリア細胞の膜電位変化

CO_2 に対する内因性 Ca 応答細胞の電気生理学的性質を解析するために、Ca イメージングとパッチクランプ法を組み合わせて解析した。図 1a に示すように、高 CO_2 負荷によって Ca 応答した細胞を Ca イメージングの画像内で特定し、グラミシジン-穿孔パッチクランプ法を行った。

図１a

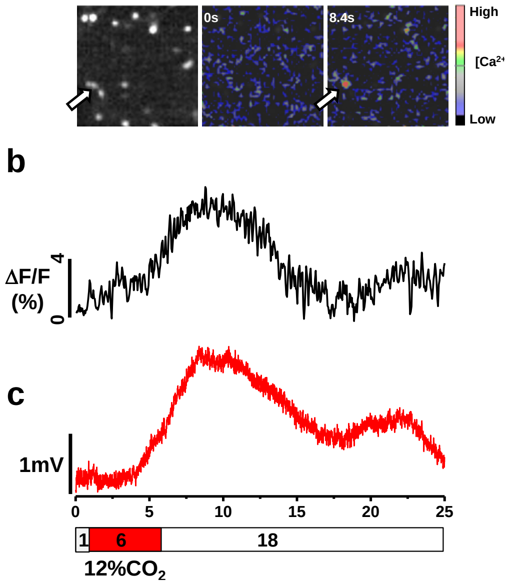


図 1b のトレースは CO_2 負荷(6 sec)に対する Ca 応答であり、１c は膜電位変化の一過性の上昇、即ち脱分極を示している。この細胞に一定の電圧変化をかけ、I-V カーブを作成したところ、ニューロンで観察される Na 電流が検出されなかった。従って、この内因性 Ca 応答細胞がグリア細胞であると示唆された。

（３） CO_2 に対するグリア細胞内 pH の変化

２波長蛍光分光器と特殊高速高感度光計測を組み合わせたシステムにより、細胞内 pH イメージング解析及び各細胞内 pH 値の計測が可能である。このシステムにより、グリア細胞高密度培養系において、細胞膜を通過した CO_2 による細胞内の pH 変化を観察した。

図２

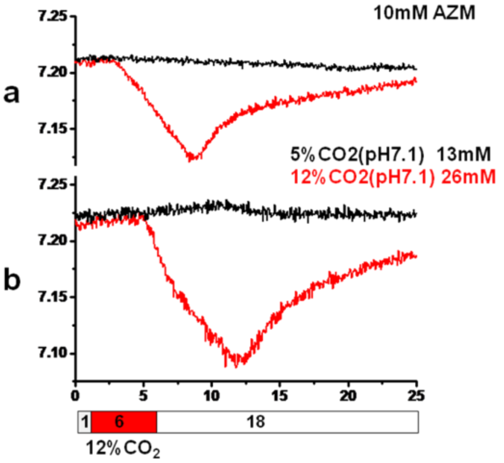


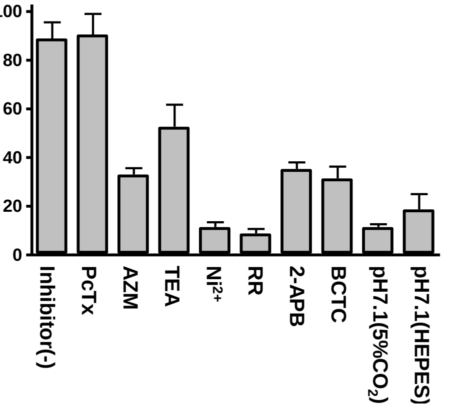
図２a の赤色トレースは、高 CO_2 負荷によって細胞内 pH の一過性の低下(酸性化)を示している。同じ細胞外液 pH である isocapnic acidosis 溶液では、細胞内 pH 低下は起こらなかった(図２b の黒色トレース)。更に、図２a の黒色トレースが示すように、炭酸脱水酵素阻害剤(AZM)は、高 CO_2 負荷による細胞内酸性化を阻害し、Ca 応答も阻害した(図３)。これらのグリア細胞内 pH 及び Ca 応答の結果から、細胞膜を通過した CO_2 の増加が、炭酸脱水酵素によって H+を増加させ、Ca 応答が引き起こすと推察される。

（４）TRP チャネルによる Ca 応答

TRP(transient receptor potential)は、温度、痛み、酸・アルカリや刺激化学物質などの様々な細胞内外の環境変化を感知できるセンサー機能を持つ、陽イオン透過性イオンチャネルである。このような機能的多様性は、生体内の幅広い組織に発現し、少なくとも 29 種類のサブタイプから構成されるスーパーファミリーによって裏付けられている。

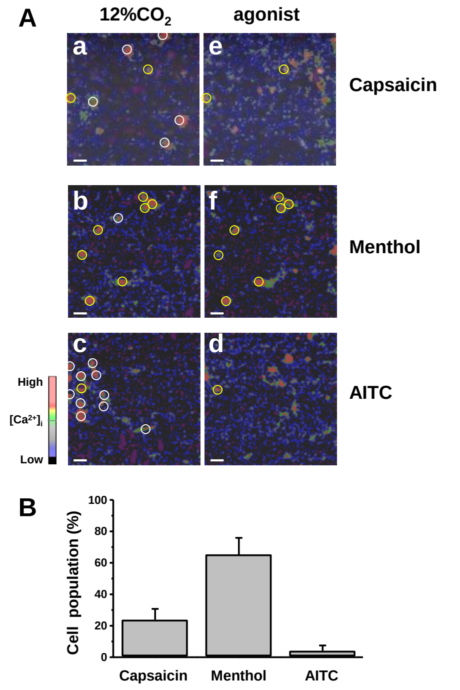
そこで、高 CO_2 負荷における一過性の細胞内 Ca 応答に対する TRP サブタイプ非特異的阻害剤(Ni^{2+}、ruthenium red、2-APB)の効果を検討したところ、強力に Ca 応答を抑制した。 更に、TRPV1・TRPM8 の特異的阻害剤(BCTC)によっても抑制された(図３)。

図３



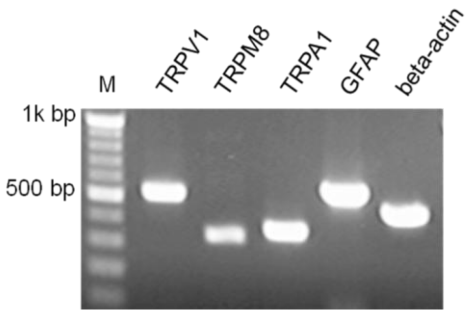
一方で、高 CO_2 負荷 Ca 応答細胞群における TRP 刺激剤誘発性 Ca 応答細胞の割合を比較したところ、Ca 応答の重複割合は、メンソールによって活性化される TRPM8 が 65%と最も高く、カプサイシンによって活性化される TRPV1 は 23%であった(図４)。

図４



これは、延髄由来のグリア細胞に TRPM8、TRPV1 発現を示す RT-PCR の結果と一致した(図５)。この時、同時にグリア細胞特異的なタンパク質である GFAP の検出を確認している。

図５

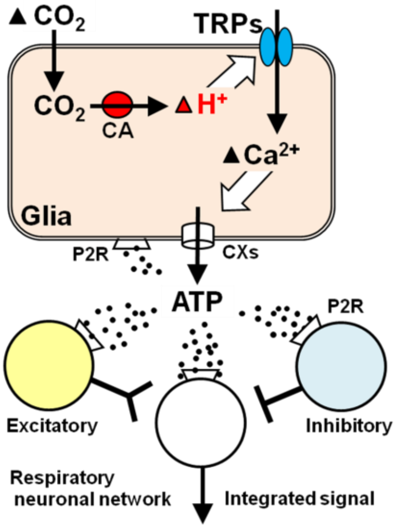


（５）TRP チャネルの化学受容性機能

TRPM8 は、細胞内 H^+ 変動を感知することが知られている (Andersson, et al. *J Neurosci.* 2004) ので、化学受容機能分子の最有力候補である。しかし、TRP サブタイプ非特異的阻害剤が強力に作用したこと、脳幹グリア細胞において発現する TRP サブタイプの生理機能については、ほとんど不明であることから、現時点では他のサブタイプの関与を排除できない。

以上の結果から、高 CO_2 負荷に対する内因性 Ca 応答では、細胞膜を通過した CO_2 の増加は、炭酸脱水酵素(CA)により、細胞内 H+増加を促進し、細胞内が酸性化される。この細胞内酸性化によって TRP チャネルが活性化され、一過性の Ca 応答が引き起こすという仮説が提案される(図６)。

図６



グリア細胞の一過性 Ca 応答は、細胞内 ATP 顆粒の分泌・遊離を引き起こすと考えられる。即ち、CO_2 変化を TRP チャネルによって感受したグリア細胞は、細胞間伝達物質として ATP を遊離し、興奮性及び抑制性呼吸ニューロン活動に影響し、その統合された呼吸シグナルが呼吸調節を行うと示唆され、TRP は、この化学性呼吸調節機構において、内因性に化学感受機能を担っていると推察される。

これらの研究成果を論文にまとめ、Cell Calcium (2010;48:124-12)に発表することができた。

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１件）

① <u>Hirata Y,</u> Oku Y. TRP channels are involved in mediating hypercapnic Ca^{2+} responses in rat glia-rich medullary cultures independently of extracellular pH. Cell Calcium 2010;48:124-12. (査読有)

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：