

学位論文題名

Cellular mechanisms of calcium signaling and
gliotransmitter release of astrocytes

(アストロサイトにおけるカルシウムシグナル機構と伝達物質放出機構)

学位論文内容の要旨

脳神経系はニューロンとグリア細胞から構成されている。グリア細胞の役割は、これまでニューロンの物理的・化学的支持であると考えられていた。しかし最近になって、グリア細胞の一つであるアストロサイトが、カルシウムを介した細胞間情報伝達を起こすことが報告された。また、細胞内カルシウム濃度依存的にアストロサイトは伝達物質を放出し、ニューロンの活動やシナプス伝達を直接調節している可能性が示唆され始めており、近年ではアストロサイトがニューロンに対して能動的に影響を与えると考えられるようになってきた。

そこで本研究では、アストロサイトにおけるカルシウムシグナル機構と伝達物質の放出機構の両者を解明することを目的とした。

アストロサイトはカルシウムを介して細胞間情報伝達を行う。機械刺激はその情報伝達を引き起こすが、刺激を受けた細胞自身での細胞内カルシウム濃度上昇機構についてはわかっていなかった。第1章では、機械刺激によるアストロサイトの細胞内カルシウム濃度上昇機構について、カルシウムイメージング法を用いて薬理学的に解析した。単独で存在しているアストロサイトに機械刺激を与えると、細胞外カルシウムの有無に関わらず細胞内カルシウム濃度は上昇した。次に、細胞外カルシウムが存在する状態で、ホスホリパーゼC (PLC) 阻害剤存在下でアストロサイトに機械刺激を与えたところ、カルシウム応答はコントロールに比べて有意に小さかった。これらのことから、機械刺激を受けた細胞における細胞内カルシウム濃度上昇は主に細胞内カルシウムストアからの動員によるものであることが示された。さらに、細胞外カルシウムが存在しない状態で、PLC阻害剤もしくはATP受容体アンタゴニスト存在下で細胞に機械刺激を与えたところ、細胞内カルシウム濃度上昇は完全に抑制された。以上の結果から、一つの系として、ATPによる自己分泌系が働き、イノシトール3リン酸(IP_3)を介した小胞体からのカルシウム動員があることがわかった。またもう一つの系として、細胞外カルシウムの流入によっても細胞内カルシウム濃度が上昇することが示された。これは機械刺激感受性イオンチャネルを介していると考えられる。

機械刺激による細胞内カルシウム濃度上昇は大きな細胞膜変形が引き金となる。そこで、機械刺激の際に重要な意味を持つ細胞膜の物理量として、「硬さ・軟らかさ」を表す弾性率について解析を行う必要がある。第2章および第3章では、アストロサイト細胞膜の形態と細胞膜弾性率の決定要因とを原子間力顕微鏡 (AFM) を用いて解析した。AFMは探針と試料間に働く原子間力を検出して、試料の微細な表面形状を観察する走査型顕微鏡である。この顕微鏡は形状測定のみならず、細胞膜の物理量を測定することにも利用することができる。まず、アストロサイトの細胞膜の形態を観察したところ、細胞膜上には筋状構造が

観察され、それはアクチンを反映したものであることがわかった。次に、アストロサイトの弾性率を測定したところ、核の上の細胞膜は細胞質上のそれより軟らかく、アクチンを反映した筋状構造を示す細胞膜は特に硬いことが示された。さらには、アクチン重合阻害剤投与による細胞膜の弾性率変化を測定したところ、投与後は細胞全体で細胞膜が軟らかくなった。以上の結果から、細胞膜の弾性を決めている第一要因がアクチンであることが示され、細胞膜を変形させる機械刺激は、アクチンのたわみを引き起こして細胞内カルシウム濃度を上昇させることが示唆された。

アストロサイトは近傍の細胞間でカルシウムを介した情報伝達、すなわち、カルシウムウェーブを起こす。隣接した細胞間ではギャップ結合を形成することから、カルシウムウェーブの伝播はATPによる旁分泌の系だけでなく、ギャップ結合を介したIP₃またはカルシウム自身の拡散によるものであると考えられた。第4章では、アストロサイトの動的構造変化をAFMで観察した後、アクチンと、ギャップ結合を構成するタンパク質であるコネキシン43の局在を免疫細胞化学法によって調べた。その結果、アクチンとコネキシン43は共存していることが明らかになった。このことから、コネキシン43はアクチンと何らかの相互作用をもって、細胞の接着に関与していることが示唆された。さらに以上の結果から、機械刺激によってアクチンがたわむことによってヘミチャネル（ギャップ結合の片方）が開口し、それによってATPが細胞外へと放出される可能性も考えられている。

第1章から第4章では、機械刺激による細胞内カルシウム濃度上昇機構とATPを介した細胞間情報伝達機構について明らかにした。また最近になって、アストロサイトは伝達物質であるグルタミン酸も放出できることが示されている。第5章では、アストロサイトがシナプス伝達を調節できる可能性を示すために、アストロサイトによる伝達物質放出機構について、特に分化した細胞と未分化の細胞との間で比較・検討した。まず、アストロサイトからのグルタミン酸放出について検討した。高速液体クロマトグラフィー（HPLC）および酵素反応を利用したイメージング法による解析から、分化した細胞はATP刺激によってグルタミン酸を放出することがわかった。次に、エキソサイトーシス機構の存在を確認するために、刺激依存的な蛍光色素（FM1-43）の取り込みと放出を検討したところ、分化細胞は未分化細胞よりも活発に取り込みと放出を行っていることが明らかになった。さらに、エキソサイトーシスに関与するSNAREタンパク質の一つであるシナプトブレヴィンの細胞内分布を免疫細胞化学法によって解析した結果、未分化細胞ではその発現はほとんど確認できなかったが、分化細胞では点状に発現していた。また、シナプトブレヴィンと別のSNAREタンパク質であるシンタキシンの発現について、ウェスタンブロッティング法により検討したところ、分化細胞でその発現が促進されることが示された。以上の結果から、アストロサイトはグルタミン酸を放出することができると示され、その放出機構はSNAREタンパク質を介したエキソサイトーシスの可能性が高いことが示唆された。さらに、それは分化にともなって起こり得ることも明らかとなった。

以上の研究結果は、アストロサイトは今まで考えられていたようなニューロンや神経系全体に対する受動的役割を果たすだけでなく、積極的にシナプス伝達に関与していることを示すものである。したがって本研究は、ニューロンのみに焦点が当てられてきた神経伝達機構研究の歴史を大きく変え、神経情報機構の新しい構築原理の解明に大きな貢献を果たすものである。

学位論文審査の要旨

主 査	助 授	伊 藤 悦 朗
副 査	教 授	浦 野 明 央
副 査	教 授	小 池 達 郎
副 査	教 授	高 畑 雅 一

学 位 論 文 題 名

Cellular mechanisms of calcium signaling and gliotransmitter release of astrocytes

(アストロサイトにおけるカルシウムシグナル機構と伝達物質放出機構)

脳神経系はニューロンとグリア細胞から構成されている。グリア細胞の役割は、これまでニューロンの物理的・化学的支持であると考えられていた。しかし最近になって、グリア細胞の一つであるアストロサイトが、カルシウムを介した細胞間情報伝達を起こすことが報告された。また、細胞内カルシウム濃度依存的にアストロサイトは伝達物質を放出し、ニューロンの活動やシナプス伝達を直接調節している可能性が示唆され始めており、近年ではアストロサイトがニューロンに対して能動的に影響を与えると考えられるようになってきた。

そこで本研究では、アストロサイトにおけるカルシウムシグナル機構と伝達物質の放出機構の両者を解明することを目的とした。

第1章では、機械刺激によるアストロサイトの細胞内カルシウム濃度上昇機構について、カルシウムイメージング法を用いて薬理的に解析した。単独で存在しているアストロサイトに機械刺激を与えると、細胞外カルシウムの有無に関わらず細胞内カルシウム濃度は上昇した。細胞外カルシウムが存在しない状態で、ホスホリパーゼC阻害剤もしくはATP受容体アンタゴニスト存在下で細胞に機械刺激を与えたところ、細胞内カルシウム濃度上昇は完全に抑制された。以上の結果から、一つの系として、ATPによる自己分泌系が働き、イノシトール3リン酸を介した小胞体からのカルシウム動員があることがわかった。またもう一つの系として、細胞外カルシウムの流入によっても細胞内カルシウム濃度が上昇することが示された。

第2章および第3章では、アストロサイト細胞膜の形態と細胞膜弾性率の決定要因とを原子間力顕微鏡 (AFM) を用いて解析した。アストロサイトの細胞膜の形態を観察したところ、細胞膜上には筋

状構造が観察され、それはアクチンを反映したものであった。次に、アストロサイトの弾性率を測定したところ、核の上の細胞膜は細胞質上のそれより軟らかく、アクチンを反映した筋状構造を示す細胞膜は特に硬いことが示された。以上の結果から、細胞膜の弾性を決めている第一要因がアクチンであることが示され、細胞膜を変形させる機械刺激は、アクチンのたわみを引き起こして細胞内カルシウム濃度を上昇させることが示唆された。

第4章では、アストロサイトの動的構造変化を AFM で観察した後、アクチンと、ギャップ結合を構成するタンパク質であるコネキシン 43 の局在を免疫細胞化学法によって調べた。その結果、アクチンとコネキシン 43 は共存していることが明らかになった。このことから、コネキシン 43 はアクチンと何らかの相互作用をもって、細胞の接着に関与していることが示唆された。さらに以上の結果から、機械刺激によってアクチンがたわむことによってヘミチャネル（ギャップ結合の片方）が開口し、それによって ATP が細胞外へと放出される可能性も考えられている。

第5章では、アストロサイトがシナプス伝達を調節できる可能性を示すために、アストロサイトによる伝達物質放出機構について、特に分化した細胞と未分化の細胞との間で比較・検討した。まず、高速液体クロマトグラフィーと酵素反応を用いたイメージング法を用いてアストロサイトからのグルタミン酸放出について検討した。その結果、ATP 刺激によって分化した細胞からグルタミン酸放出が起きていることが確認された。次に、エキソサイトーシス機構の存在を確認するために、刺激依存的な蛍光色素（FM1-43）の取り込みと放出を検討したところ、分化した細胞は未分化細胞よりも活発に取り込みと放出を行っていることが明らかになった。さらに、エキソサイトーシスに関与する SNARE タンパク質の一つであるシナプトブレブリンの細胞内分布を免疫細胞化学法によって解析した結果、未分化細胞ではその発現はほとんど確認できなかったが、分化細胞では点状に発現していた。また、シナプトブレブリンと別の SNARE タンパク質であるシンタキシンの発現についてウエスタンブロッティング法により検討したところ、分化細胞でその発現が促進されることが示された。以上の結果から、アストロサイトはグルタミン酸を放出することができることが示され、その放出機構は SNARE タンパク質を介したエキソサイトーシスの可能性が高いことが示唆された。さらに、それは分化にともなって起こり得ることも明らかとなった。

これを要するに、以上の一連の結果は、アストロサイトは今まで考えられていたようなニューロンや神経系全体に対する受動的役割を果たすだけでなく、積極的にシナプス伝達に関与していることを示すものである。したがって本研究は、ニューロンのみに焦点が当てられてきた神経伝達機構研究の歴史を大きく変え、神経情報機構の新しい構築原理の解明に大きな貢献を果たすものである。

よって著者は、北海道大学博士(理学)の学位を授与される資格あるものと認める。