

# 論 文 要 旨

グリオトランスミッターによるアストロサイトの  
Ca<sup>2+</sup>応答とそれに対する神経栄養因子の修飾作用

令和3年度  
北海道医療大学大学院歯学研究科

郷 賢治

## 【緒言】

中枢神経の信号処理に関する細胞として、神経細胞を取り囲むグリア細胞の機能が注目されている。グリア細胞は神経系の栄養補給などの補助的な役割を担っていると考えられてきたが、ここ数年に渡り脳における信号処理に積極的に関与している可能性が指摘されてきている。グリア細胞の一つであるアストロサイトはグリオトランスミッターと呼ばれ様々な生理活性物質を放出し、シナプス伝達、脳血流等の幅広い生理機能に関与することが知られている。またアストロサイトの機能変化は、病態にも関与すると考えられている。

一般にグリオトランスミッターは、アストロサイトの表面に存在する G タンパク質共役型受容体を介し細胞内ストアから  $\text{Ca}^{2+}$  放出と細胞外からの  $\text{Ca}^{2+}$  流入によって細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を上昇させる。グリオトランスミッターの一つである ATP は、周囲のアストロサイトを活性化するのに加えて、隣接する神経細胞や血管に作用しシナプス伝達や血流調整に関与する可能性が指摘されている。

他のアストロサイトの  $\text{Ca}^{2+}$  動態に作用する生理活性物質としては、Bradykinin や神経栄養因子が知られている。Bradykinin は、炎症や脳虚血時に産生され、B2 受容体の活性化を介してアストロサイトの細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  を上昇させる。また脳由来神経栄養因子 (BDNF ; brain-derived neurotrophic factor) は、シナプス接合部から放出されるタンパク質で神経やアストロサイトの高親和性神経成長因子受容体 (TrkB 受容体) に結合し、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を上昇させることが報告されているがその詳細は明らかではない。

そこで本研究では、アストロサイトの機能に対する  $\text{Ca}^{2+}$  応答の関係を解明するために BDNF とアストロサイトの  $\text{Ca}^{2+}$  動態の関連性をラットグリア細胞由来の細胞株 (C6 細胞) とグリア初代細胞を用いて検索し、その作用機序を明らかにすることを目的とする

## 【対象と方法】

実験に用いた C6 細胞は、10 %牛胎児血清を含む RPMI-1640 で培養した。C6 細胞は測定用チャンバーに播種し、 $\text{CO}_2$  インキュベーターで 2-5 日間培養した。アストロサイト初代培養細胞は、細切した 11 週齢雄 Wister ラットの脳皮質をトリプシンで 10 分間処理し、フィブロネクチンをコートしたディッシュ上で 10 %牛胎児血清を含む Minimum Essential Medium Eagle で 3 時間培養した。その後ディッシュ底面に接着した細胞をピペッティングによって分離し、ポリエチレンイミンでコートした測定用チャ

ンバーに播種し，CO<sub>2</sub>インキュベーターで 14-19 日間培養した．この方法で調整され成体ラットアストロサイトは放射状に突起を伸ばしており，免疫染色によってアストロサイトマーカーである GFAP 陽性反応が確認された．

C6 細胞あるいは初代培養アストロサイトの Ca<sup>2+</sup>応答の解析は，Ca<sup>2+</sup>測定の前 2 日前にアデノウイルスを用いて Ca<sup>2+</sup>を可視化するために Genetical Encoded Calcium Indicator (GECI) をコードする GCaMP6s 遺伝子を導入し，発現させた GCaMP6a の蛍光を倒立型顕微鏡 TE-2000 (Nikon) を用いたイメージングシステム AQUACOSMOS (Hamamatsu) で測定した．この測定では 480 nm の励起光の照射によって発生する 530nm の蛍光を EM-CCD カメラにて取得し，その蛍光像から蛍光強度比を画像化して[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 動態のイメージング解析を行った．Caged ATP および膜透過性 caged IP<sub>3</sub> を用いた実験では，ピンホールを使って局所的 (直径約 5 μm) な細胞体あるいは細胞突起近傍への 380nm の光照射によって ATP あるいは IP<sub>3</sub> を局所的に発生させた．

#### 【結果および考察】

C6 細胞に ATP，グルタミン酸，アセチルコリン，ヒスタミン，Bradykinin を作用させて Ca<sup>2+</sup>応答を起こす物質を検討した結果，C6 細胞が ATP に反応することを明らかにした．C6 細胞に 10 μM 以上の ATP を作用させると，細胞質全体で一過性の[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇と，それに続いて持続相が観察された．一方，細胞外液 Ca<sup>2+</sup>の非存在下での ATP 刺激では，一過性の[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇のみが観察されたことから．この反応は細胞内ストアからの Ca<sup>2+</sup>放出であることを明らかにした．この[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇は，P2Y 受容体阻害薬である Suramin によって抑制された．一方，成体ラットアストロサイトは，ATP と Bradykinin 刺激によって Ca<sup>2+</sup>応答を惹起した．ATP 刺激では突起部から細胞体に向う Ca<sup>2+</sup>波が観察された．また Bradykinin 刺激でも，細胞体から突起に向う Ca<sup>2+</sup>波が観察された．この ATP の反応は C6 細胞と同様に Suramin によって抑制されたことから，C6 細胞と成体ラットアストロサイトの ATP 刺激は P2Y 受容体を介して[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇を惹起することが示された．

C6 細胞に低濃度 (1~3 μM) の ATP を作用させると，細胞の突起部において[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇が数分間隔で起こる局所的 Ca<sup>2+</sup>オシレーションが観察された．Caged ATP を用いて細胞体および細胞突起近傍への局所的な ATP 刺激を行うと，光照射部位に関わりなく突起部で局所的 Ca<sup>2+</sup>オシレーションが観察された．一方，膜透過性 Caged IP<sub>3</sub> では突起部の Ca<sup>2+</sup>応答は観察できなかった．この結果から突起部は ATP に対する感受性が高

いことが明らかになった。また C6 細胞の突起部における  $\text{Ca}^{2+}$  オシレーションは、ミトコンドリアの膜電位を低下させる FCCP で抑制され、mPTP を活性化する CAtr によって増加した。また、成体ラットアストロサイトでも突起における同様の反応が観察されたことから、突起部での  $\text{Ca}^{2+}$  応答におけるミトコンドリアの関与が示されなかった。

成体ラットアストロサイトには BDNF 受容体として TrkB-T1 が発現しており、BDNF の直接刺激では  $\text{Ca}^{2+}$  応答を起こさないことが示された。しかし、BDNF 刺激によって ATP や Bradykinin に対する反応性が高まることが示されたことから、BDNF 未刺激の成体ラットアストロサイトを Bradykinin 刺激ですると、0.3 nM で 7.8 %、1 nM で 27 % の細胞が  $\text{Ca}^{2+}$  応答を惹起した。一方、BDNF で 1 時間刺激した細胞では 0.3 nM で 76 %、1 nM で 94% の細胞が反応を示した。同様に BDNF 未刺激のアストロサイトの ATP 刺激では、0.3  $\mu\text{M}$  で 3.9 %、3  $\mu\text{M}$  で 43 % の細胞が  $\text{Ca}^{2+}$  応答を起こしたが、BDNF 刺激した細胞では 0.3  $\mu\text{M}$  で 43 %、3  $\mu\text{M}$  で 89 % の細胞が反応した。Bradykinin 刺激による  $\text{Ca}^{2+}$  応答に対する増強作用は、12 時間の BDNF 刺激によってさらに増大した。

#### 【結論】

C6 細胞およびアストロサイトの突起は、細胞体と比較して ATP に対する感受性が高いことが示されなかった。この ATP の反応は、突起を介するアストロサイト同士の情報伝達やシナプス伝達、及び血流調整に関与するとことが示唆された。この突起の反応にはミトコンドリアが関与することから、アストロサイトの情報伝達が酸化的ストレスに関与する病態と関連している可能性が考えられた。

また本研究では、ATP や Bradykinin に対するアストロサイトの感受性が、BDNF によって大きく増強することが示された。これは神経栄養因子によるアストロサイトの新しい機能修飾機構である可能性が示唆された。