2P205

マスト細胞から神経細胞への活性化機構の研究

○鈴木 亮、古野 忠秀、中西 守 (名市大院・薬学系)

【目的】皮膚組織をはじめ生体内では多くのマスト細胞が神経細胞と接着し相互作用している。我々はこれまで神経細胞とマスト細胞の共存培養システムから、神経細胞からマスト細胞へのシグナル伝達にはサブスタンスPが関与していることを明らかにした。一方、マスト細胞から神経細胞へのシグナル伝達を追究することは、マスト細胞が外来異物に対するセンサーとして生体の環境変化を中枢に伝達する生体防御反応を理解する上で重要である。しかし、その活性化機構については未だ明らかになっていない。そこで本研究では、マスト細胞から神経細胞への活性化因子の追究を試みた。【実験方法】神経細胞には上頸神経節初代培養細胞、マスト細胞にはRBL-2H3細胞株を用いた。両者を共存培養し、細胞内カルシウムイオン動態を指標に相互作用を追究した。【結果と考察】神経細胞とマスト細胞を共存培養すると、伸長した神経突起がマスト細胞に接着した。そこで、マスト細胞を抗原で特異的に刺激すると、マスト細胞のカルシウムイオン濃度上昇後、マスト細胞に接着している神経突起で一過的なカルシウムイオン濃度の上昇が起こることを見いだした。神経突起でのカルシウムイオン濃度の上昇は、マスト細胞との接着部位から神経突起を約160 μ m以上にわたって伝達していた。マスト細胞と接着していない神経突起では、このようなカルシウムイオン濃度の上昇は観察されなかった。マスト細胞の分泌顆粒内には生体活性アミンなど数多くの細胞活性化因子が存在しており、神経細胞の活性化にはマスト細胞の脱顆粒の際に放出される顆粒内物質が関与していると考えられる。共存培養システム、マスト細胞の上清、細胞内分子の選択的可視化解析を用いて活性化因子を追究していき、複数の活性化因子を同定することが生体防御反応におけるマスト細胞の機能を解明する上で極めて重要であると考えている。

R. Suzuki, T. Furuno and M. Nakanishi : Molecular mechanism of mast cell activation-induced neuronal response

2P207

神経細胞とマスト細胞の相互作用に関する接着分子の研究

○古野 忠秀¹、伊藤 彰彦²、北村 幸彦³、中西 守¹ (¹名市大院・薬、²神大院・医、³阪大院・医)

【目的】生体内の粘膜組織では、多くのマスト細胞が神経細胞の近傍に存在していることが知られている。我々は、神経細胞とマスト細胞のin vitro 共存培養系を用いて、両者が直接シグナルを伝達し合っていることを明らかにしてきた。また、神経細胞やマスト細胞の細胞応答がそれぞれの接着部位近傍で強く起こることを見出ししてきた。本研究では、神経細胞のシナプス形成への関与が示唆されている接着分子SynCAMに着目し、神経細胞とマスト細胞の相互作用におけるSynCAMの役割を明らかにすることを試みた。【方法】野生型マウス(+/+マウス)および小眼球症転写因子MITF全欠失突然変異マウス(tg/tgマウス)から骨髄由来マスト細胞(BMMC)を調製した。そして、CBAマウスの上頸神経節から単離した神経細胞とマスト細胞を3時間共存培養し、神経細胞とマスト細胞の接着効率を解析した。SynCAMの局在は免疫染色により調べた。【結果・考察】+/+マウスから調製したマスト細胞(+/+-BMMC)はSynCAMを発現していたのに対して、tg/tgマウスから調製したマスト細胞(tg/tg-BMMC)では発現が見られなかった。そこで、これらBMMCを神経細胞と共存培養して神経細胞との接着効率を比較したところ、tg/tg-BMMCの神経細胞への接着効率は+/+-BMMCの約3分の1であることが分かった。遺伝子導入によりtg/tg-BMMCにSynCAMを発現させると、接着効率が増大し、+/+-BMMCと同程度になった。また、+/+-BMMCの接着効率はSynCAMの細胞外領域を認識する中和抗体の濃度依存的に減少した。さらに、神経突起と+/+-BMMCの接着部位におけるSynCAMの分布を調べたところ、SynCAMはマスト細胞の細胞膜と神経突起に分布しており、特に両者の接着部位に強く集積していることが明らかになった。これらの結果から、神経突起とマスト細胞の接着にSynCAMが重要な役割を果たしていると考えられた。

T.Furuno, A.Ito, Y.Kitamura and M.Nakanishi : Involvement of SynCAM in the interaction between nerves and mast cells

2P206

表皮ケラチノサイトと神経細胞の相互作用

○河村 太一、鈴木 亮、古野 忠秀、中西 守 (名市大院・薬学系)

【目的】ケラチノサイトは表皮の大部分を占める細胞で、外来からの異物の進入や水分保持など生体内の恒常性を維持する重要な働きを担っている。通常、神経細胞は表皮にほとんど存在していないが、アトピー性皮膚炎の患者では表皮に多数存在することが報告されており、炎症性疾患に対する神経細胞とケラチノサイトの相互作用の関与が示唆されている。しかし、適切な研究手法がなく、その分子機構はほとんど明らかになっていない。そこで本研究では、脊髄後根神経節初代培養細胞とケラチノサイト細胞株のin vitro 共存培養システムを確立して、神経細胞からケラチノサイトへのシグナル伝達機構を追究した。【方法】マウス脊髄後根神経節から単離した神経細胞とラットケラチノサイト細胞株を共存培養し、両者のカルシウムイオン濃度変化を共焦点レーザー顕微鏡を用いて測定した。【結果・考察】神経細胞とケラチノサイトの共存培養の結果、神経突起とケラチノサイトが接着する様子が観察された。そこで、サソリ毒で神経細胞を特異的に刺激したところ、神経突起のカルシウムイオン濃度が上昇した後、神経突起と接着しているケラチノサイトのカルシウムイオン濃度の上昇が起こった。次に神経細胞から放出されるケラチノサイトの活性化因子を明らかにするため、サブスタンスPレセプターであるNK-1受容体のアンタゴニスト存在下で測定を行った。その結果、アンタゴニスト存在下では神経細胞の活性化に伴うケラチノサイトの応答率が減少し、カルシウムイオン濃度上昇の度合いも顕著に抑制された。これらの結果から、神経細胞から放出されるサブスタンスPがNK-1受容体を介してケラチノサイトの活性化を誘導することが明らかになった。

T.Kawamura, R.Suzuki, T.Furuno and M.Nakanishi : Interaction between neurites and keratinocytes

2P208

神経・マスト細胞相互作用におけるカドヘリンの役割

○鈴木 昭夫、鈴木 亮、古野 忠秀、中西 守 (名市大院・薬学系)

【目的】生体内では多くのマスト細胞が神経細胞と接着しており、両者は接着を介した相互作用により機能制御を行っていると考えられる。我々は神経細胞とマスト細胞の共存培養システムを用いて、神経細胞とマスト細胞がシナプス様構造を介して接着し、相互に活性化シグナルを伝達し合っていることを明らかにしてきた。しかし、両者の相互作用を担う接着分子については明らかになっていなかった。そこで、本研究では接着分子カドヘリンに着目し両者の相互作用の分子機構を追究した。【方法】神経細胞にはマウス上頸神経節初代培養細胞を、マスト細胞にはマウス骨髄由来マスト細胞を用いた。両者を3日間共存培養し実験に使用した。【結果および考察】神経細胞とマスト細胞はともにN-カドヘリンとE-カドヘリンを発現していた。マスト細胞におけるN-カドヘリンとE-カドヘリンの細胞内分布を調べたところ、いずれの蛋白質も細胞質に存在していた。次に、神経突起と接着したマスト細胞における両蛋白質の分布を調べたところ、E-カドヘリンが細胞質に留まっていたのに対して、N-カドヘリンは細胞膜に局在していた。一方、カドヘリンの裏打ち蛋白質の一つである β -カテニンもマスト細胞の細胞質に存在しているが、神経突起と接着するとN-カドヘリンと同様に細胞膜近傍に局在していた。また、神経突起と接着しているマスト細胞においては、アクチン繊維も神経突起との接着部位近傍に集積していた。これらの結果から、神経細胞とマスト細胞の相互作用にN-カドヘリンが重要な役割を果たしていることが示唆された。現在、N-カドヘリンおよび β -カテニンと蛍光蛋白質のキメラ遺伝子を作製し、神経細胞とマスト細胞の接着過程における両蛋白質の分子動態の解析を生細胞レベルで行っている。

A.Suzuki, R.Suzuki, T.Furuno and M.Nakanishi : The role of cadherins in neurite-mast cell communication