

## 脳グリア細胞と副腎皮質のカルシウム信号

東京大学大学院 / 総合文化研究科 / 広域科学専攻 / 生命物理 川戸 佳、木本哲也、  
太田善浩

我々は、ステロイド合成などに関わる情報変換過程を、脳グリア細胞や副腎皮質細胞の中で追いかけている。ビデオ蛍光顕微鏡(浜松ホトニクス ARGUS50)や共焦点レーザー顕微鏡(Bio-Rad MRC-600,1024)を改良して、細胞中に取り込ませたCa<sup>2+</sup>指示薬の蛍光強度が、細胞内のCa<sup>2+</sup>濃度で変化することを顕微イメージして、Ca<sup>2+</sup>信号とその役割を直接捕える事が出来る。ビデオ蛍光顕微鏡では、蛍光色素をキセノンランプで励起して、倒立蛍光顕微鏡(ニコン TMD300)に取り付けた超高感度 CCD カメラで捉えてビデオテープに録画し、リアルタイムで細胞1個や細胞内部の蛍光の画像を記録する。更に、この生画像のコントラストを強調しバックグラウンドを引き算したり疑似カラーをつけるなどの画像処理を行うことによって、Ca<sup>2+</sup>応答を鮮明な画像として得ることができる。一方、共焦点レーザー顕微鏡では細胞の光学断層撮影が出来る。励起光はAr<sup>+</sup>レーザーで、時間分解能は1秒くらいに落ちるけど、断層撮影でCa<sup>2+</sup>信号の位置情報が精度良くわかるという利点がある。Ca<sup>2+</sup>信号測定用の重要な改良点は、倒立顕微鏡ステージを保温箱の中に置き、37度高湿度の条件で細胞の刺激応答を観測することと、そのまま蛍光測定が出来るグラスボトムの培養皿に細胞を培養することである。また同一試料を、光路を切り替えることでビデオ蛍光顕微鏡と共焦点レーザー顕微鏡のどちらでも観測できるようにしてある(複合顕微イメージング装置)ことも重要な点である。時間経過をビデオ蛍光顕微鏡で追い、特別な時点で共焦点レーザー顕微鏡を使って細胞を輪切りにして調べる、と言う具合に用いると大変便利である。レーザー顕微鏡の励起波長は限られているので、多重染色観察をするときなどこの複合顕微イメージング装置が威力を発揮する。

副腎皮質は生体防御ステロイドホルモンを合成している。ステロイドホルモンは炎症を抑え、Na<sup>+</sup>濃度を調節し、肝臓での糖合成を促進する。副腎皮質束状層ではペプチドホルモン ACTH(脳下垂体から分泌される副腎皮質刺激ホルモン)が細胞に作用すると、ACTH 短期効果として、細胞内では5分以内に大体次のような経路で情報伝達・変換が進むと思われてきた。「ACTH がレセプター - に結合してレセプター - から G 蛋白などを経て蛋白キナーゼが活性化される、細胞質のCa<sup>2+</sup>濃度が上昇するか、または cAMP 濃度が増加する、短寿命蛋白が合成され、これがコレステロールをミトコンドリア内膜へ運搬されるのを促進する、ミトコンドリアでチトクロム P450<sub>scc</sub> がコ

レステロールをプレグネロンに変換する、ミクロソーム中の P450<sub>17</sub> や P450<sub>C21</sub> などの各チトクロム P450 が関与する多段階の反応を経て最終的なステロイドホルモンの形になる。」上記のステップで、副腎皮質細胞ではセカンドメッセンジャーが 20 年以上にわたり不明であった。近年まで Waterman 等の提案した cAMP セカンドメッセンジャー説が信じられてきた<sup>1)</sup>。確かに 1nM や 1 μM ACTH という pharmacological (薬学的) な高濃度では cAMP 濃度が上昇し、この場合 cAMP がセカンドメッセンジャーである可能性は大きい。しかし ACTH の生理濃度 1pM はこれより遥かに低濃度で、最近このような低濃度の ACTH では cAMP が動かないことが証明されてきた。一方、細胞外液に 1mM 程度の Ca<sup>2+</sup>がないとステロイドホルモンが合成されないことから、かなりの研究者が、もしかして Ca<sup>2+</sup>がセカンドメッセンジャーではないかということを考え、沢山の研究を行ってきた。しかし Ca<sup>2+</sup>信号は長い間発見されなかった。それでむしろ、アラキドン酸代謝物などが有力なセカンドメッセンジャー候補として指摘されている<sup>2)</sup>。筆者は、過去の Ca<sup>2+</sup>測定自身がへたくそだったせいではないかと思い、この問題に挑戦した。難問を解けばその価値も大きいからである。しかしさんざん苦労した。やはり、他人の言うように Ca<sup>2+</sup>信号はなかなかでないのである。まず、細胞が Fura-2 や Calcium Green-1 などなかなか染色されない。わずか 10% 程度の細胞しか染まらず、これは他の臓器の細胞(副腎由来 Y-1 継代培養細胞、神経細胞、脳グリア細胞、脳グリオーマ細胞、免疫細胞、肝細胞、等々)と全く異なる。最終的に我々はこの難問を、ごく僅かの 0.01% TritonX-100 を加えることによって解決し、Calcium Green-1 や Fura-2 をほぼ全部の細胞に導入できた。すると ACTH は生理濃度の 1pM で、Ca<sup>2+</sup>オシレーション信号を発生させることが観測できた<sup>3)</sup>。更にこの Ca<sup>2+</sup>オシレーション信号を外液に 1mM の EGTA を加えることで止めると、ステロイドホルモン(コルチコイド)産生が 1/10 以下に落ちて、Ca<sup>2+</sup>がセカンドメッセンジャーであることが証明できた。

-----

図1 (A) ACTH 刺激で引き起こされる、副腎皮質束状層細胞内の Ca<sup>2+</sup>濃度のオシレーションを、Ca<sup>2+</sup>指示薬 Calucium Green-1 の蛍光強度の変化として画像表示した。ビデオ蛍光顕微鏡による観測と解析。蛍光強度の高低と色の対応は、図の上部の色棒で高強度は白/赤、低強度は青色で示してある。各図の下に時刻 t が秒単位で示してある。時刻 t=0 で 1pM の ACTH を加えて後、約 25 秒の周期で Ca<sup>2+</sup>濃度がオシレーションする。(B) (A)と同じ実験を、Calucium Green-1 の規格化した蛍光強度の変化率  $F/F_0(\%)$  を縦軸に取って、時間経過を示したもの。単一の振動波形ではなく、図に示した様に、曲線 1、2、3 の 3 種類の代表的なパターンがある。曲線 1: Ca<sup>2+</sup>オシレーション、曲線 2: Ca<sup>2+</sup>濃度の段階的な上昇、曲線 3: Ca<sup>2+</sup>オシレーションが Ca<sup>2+</sup>濃度の段階的な上昇に重なったもの。図の矢印の所で 1pM の ACTH を加えている。

-----

ACTH 刺激で細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度は 25 秒くらいの周期で振動した(図1参照)。詳しく見ると  $\text{Ca}^{2+}$ オシレーション 33%、階段的  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度上昇 10%、これら2つの混合信号 57%という三種類の信号が見つかった。タブシガルギン(ミクロソームの  $\text{Ca}^{2+}$ ポンプの阻害剤)を入れたり、外液の  $\text{Ca}^{2+}$ を EGTA で除去すると、 $\text{Ca}^{2+}$ オシレーションが止まることから、細胞質の  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度オシレーションにはミクロソームからの  $\text{Ca}^{2+}$ の放出(多分  $\text{IP}_3$  レセプターの  $\text{Ca}^{2+}$ チャンネルを通して)と、細胞外からの  $\text{Ca}^{2+}$ の流入(細胞膜のカルシウムチャンネルを通して)の両方が効いていることもわかった。ACTH のみでなく、アンジオテンシン や ATP という副腎皮質ステロイド合成を刺激するホルモンでも  $\text{Ca}^{2+}$ 信号が出ることを観測している。この場合3種類の  $\text{Ca}^{2+}$ 信号の比率は大きく変わり、特に ATP は  $\text{Ca}^{2+}$ オシレーションを引き起こさず、階段的な  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度上昇のみを引き起こす。刺激ホルモンが違えば  $\text{Ca}^{2+}$ 信号が異なり、従ってステロイドホルモン合成過程のうちの異なった部分を加速するのではないかと考えられる。 $\text{Ca}^{2+}$ 信号の標的は何だろう?我々は、「ACTH の引き起こす  $\text{Ca}^{2+}$ オシレーションはミトコンドリアに伝播し、 $\text{Ca}^{2+}$ 依存的に NADPH を作り 周期的な電子伝達が起こりチトクロム P450<sub>scc</sub> が周期的に活性化されて コレステロール プレグネノロン変換というステロイドホルモン合成の律速反応が加速されるのでは?」という仮説を建てて研究を進めている。この仮説の検証のためには、ミトコンドリアの  $\text{Ca}^{2+}$ や電子移動を測定することの他に、実時間で P450<sub>scc</sub> の活性イメージングを行う必要があり、コレステロ - ル・レゾルフィンという蛍光基質を用いて測定を進めている。コレステロ - ル・レゾルフィンは P450<sub>scc</sub> に代謝されてレゾルフィンとプレグネノロンになり、遊離レゾルフィンの生成で蛍光強度が 500 倍にもなる。これを利用して細胞内ミトコンドリアでの P450<sub>scc</sub> の代謝活性を共焦点顕微鏡で観測している。この方法により、異なる  $\text{Ca}^{2+}$ 信号を発生する ACTH、ATP、NADPH では P450<sub>scc</sub> 活性化の様子が大きく異なることがわかってきた。更に我々は、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、 $\text{Ca}^{2+}$ 信号は細胞質のみでなく細胞の核にも同時に伝わることを発見した。 $\text{Ca}^{2+}$ 信号は核内で短寿命のコレステロール輸送蛋白質が合成される引き金になっている可能性が大きい。副腎皮質ステロイド合成反応の基質のコレステロ - ルは、低密度リポ蛋白質 LDL に結合して運ばれる。LDL は細胞表面の LDL レセプターに結合し コーティッドピッツ エンドソームというエンドサイトシスによって細胞内に取り込まれる。我々は、エンドソームに取り込まれて更にリソソームに輸送される様子を、R18 という蛍光色素で標識した LDL を細胞に加えて、共焦点顕微鏡で時間分解して撮影している。LDL はこれまで思われていたよりも速く、5 ~ 20分くらいでエンドソームに取り込まれるが、それからリソソームに行くのは3時間くらいかかることが直接断層撮影でわかった。また1個のエンドソームの運動を追跡すると、或ものは  $10 \mu\text{m}/\text{秒}$ という非常に速いスピードで(多分チューブリンの様な細胞骨格上を)動いていることがわかった。しかしほとんどのエンドソームは実時間ではわからないほどゆっくりと移動している。

筆者等は、副腎皮質の研究を通して確立した計測法を用いて、Ca<sup>2+</sup>信号など脳細胞の情報変換過程の実時間可視化を行い、脳機能の本質に迫ろうとしている。脳には、もともと同じ細胞から分化した、神経細胞とグリア細胞がある。神経細胞よりグリア細胞のほうが数はずっと多い。神経細胞は電気パルスを出して交信していることは誰もが知っているが、グリアはずっと沈黙の細胞として神経の栄養補給など補助的な仕事をしていると考えられてきた(教科書にはまだ堂々とそう書いてある)。神経細胞はアストログリア細胞の層の上で相性良く育つ。オリゴデンドロサイトは神経軸策がのびてゆき新しい配線を作るときに(神経可塑性)、軸策に巻き付いてミエリン鞘を作っていくグリア細胞である4)。このミエリン鞘は神経軸索を伝わる電気信号の伝達速度を大きく上昇させる。しかし最近の研究で、グリアはCa<sup>2+</sup>信号を発生して活発に活動しており、神経伝達物質を介して神経細胞と直接交信していることが明らかにされつつある5,6)。Ca<sup>2+</sup>波動信号がグリアネットワークを伝わり、最終的に神経細胞を興奮させて交信するらしい。我々は、Ca<sup>2+</sup>信号がニューロステロイド合成のセカンドメッセンジャーとして働いているのではないかと考え研究を進めている。グリア細胞は、脳内でのステロイド信号であるニューロステロイドを合成している。ニューロステロイドは抑制性神経細胞のGABAレセプターに作用することで、神経細胞間の情報伝達効率を制御している。ニューロステロイドは精神状態に密接に関係していて、各種の情動行動(怒り 攻撃、恐怖 逃避、不安)を起こしていると予測されている。グリア細胞でのニューロステロイド合成の機構が、近似的に副腎皮質のステロイドホルモン合成と良く似ていると仮定すると、「(1)刺激ホルモン(グルタミン酸・セロトニンなど)が細胞膜上のレセプターに作用してG蛋白や蛋白キナーゼの活性化 (2)細胞質でのCa<sup>2+</sup>などセカンドメッセンジャーの濃度変動(信号はミトコンドリアや核に達する) (3)ミトコンドリアでのチトクロムP450<sub>sc</sub>系の電子伝達に駆動された基質コレステロールのプレグネノロンへの変換 (4)出来たニューロステロイド(プレグネノロンの誘導體)の放出 (5)神経細胞のGABAレセプターに作用し抑制性信号を促進(長期増強)したり解除(長期抑圧)したりして、神経ネットワークの電気信号伝達を制御する」、という流れになる。我々は、ラット胎児の脳から調製したグリア培養細胞を用いて研究している。図2はセロトニン刺激でアストログリアの細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度が上昇した様子を示す。Ca<sup>2+</sup>信号は、Ca<sup>2+</sup>オシレーション(パルス幅10秒)と階段状のCa<sup>2+</sup>濃度上昇(300秒位で減衰)とその混合された信号という3種類の信号が観測された7)。この3種類の信号の比率は神経伝達物質の種類によって大きく変わり、セロトニン、グルタミン酸、ヒスタミンでは各々18%,7%,0%(オシレーション)、64%,70%,100%(階段的上昇)、18%,23%,0%(オシレーションと階段的上昇の混合)という具合であった。オリゴデンドログリアでもアストログリアと同様にCa<sup>2+</sup>信号が観測されたが、詳しい統計的解析にはもう少し実験が必要である。

-----

## 図2

(A) セロトニン 刺激で引き起こされる、アストログリア細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度のオシレーションを、 $\text{Ca}^{2+}$ 指示薬 Calucium Green-1 の蛍光強度の変化として画像表示した。ビデオ蛍光顕微鏡による観測と解析。蛍光強度の高低と色の対応は、図の上部の色棒で高強度は白/赤、低強度は青色で示してある。各図の下に時刻  $t$  が秒単位で示してある。時刻  $t=0$  で  $1\ \mu\text{M}$  のセロトニンを加えて後、約 25 秒の周期で  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度がオシレーションする。(B) (A)と同じ実験を、Calucium Green-1 の規格化した蛍光強度の変化率  $F/F_0(\%)$ を縦軸に取って、時間経過を示したもの。単一の振動波形ではなく、図に示した様に、曲線 1、2、3 の 3 種類の代表的なパターンがある。曲線 1 (18%の細胞):  $\text{Ca}^{2+}$ オシレーション、曲線 2 (64%の細胞):  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の段階的な上昇、曲線 3 (18%の細胞):  $\text{Ca}^{2+}$ オシレーションが  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の段階的な上昇に重なったもの。図の矢印の所で  $1\ \mu\text{M}$  のセロトニンを加えている。

我々は、基質のコレステロールが、LDL によってエンドサイトシスでグリア細胞内に取り込まれることを発見した(図3)(7)。LDL は蛍光脂質アナログ R18 で標識し、共焦点レーザー顕微鏡で断層撮影した。オリゴデンドログリアは細胞体のみならず突起の隅々までほぼ一様に LDL を取り込んでいるのがわかる。突起の間には水掻き様の形質膜が見える。オリゴは突起先端の形質膜を扇のように折り畳んで神経軸索にミエリン鞘を巻く。

図3 グリア細胞がエンドサイトシスで LDL を活発に取り込んでいる様子。LDL は蛍光脂質アナログ R18 で標識し、グリアと 20 分間インキュベーションした後、共焦点レーザー顕微鏡で断層撮影した。(A)オリゴデンドログリアは、細胞体のみならず突起の隅々までほぼ一様に LDL を取り込んでいるのがわかる。(B)アストログリアの細胞質内では、LDL は一様ではなく、局在しているのが見える。

ニューロステロイド合成の中心機能を担うのはチトクロム P450scc である。我々は P450scc がオリゴデンドログリアやアストログリアに存在するが、存在量は副腎皮質の約 1/100 であることを蛍光抗体法を用いて同定した。P450scc の量がこのように低いので、活性測定など生化学解析は大変難しく、高感度の方法を開発する必要がある。

ニューロステロイドを介さなくても、グリアはもっと直接神経細胞と交信している。神経の出すグルタミン酸などでグリアに  $\text{Ca}^{2+}$ 波動が引き起こされ、これがグリアネットワーク上を伝わり、最終的にグリアが出すグルタミン酸などの情報伝達物質で神経細胞が興奮する(5,6)。グリアネットワークを  $\text{Ca}^{2+}$ 信号が伝わる場合、ギャップジャンクシ

オンを通過して細胞間を直接伝わるのか？グリア細胞間では  $\text{Ca}^{2+}$  信号 情報伝達物質  $\text{Ca}^{2+}$  信号と変換されて伝わるのか？などこれからの研究課題は数多い。脳では  $\text{Ca}^{2+}$  信号の他に NO 信号も大変重要であり、我々は NO 信号の可視化にも挑戦している。この神経-グリア交信は、脳の記憶学習の重要な鍵を握る情報変換である。

所で、副腎皮質と比べて、脳グリア細胞は調製と培養が格段に難しい。顕微鏡下で母ラットのお腹にいる胎児の脳からスプーンで大脳をすくってくる。胎児脳細胞は成熟ラット脳細胞と比べてずっと生育しやすいからである。それでもアストログリアは育ちやすいが、オリゴデンドログリアは誘導をかけて十分な量に育つまでに、1ヶ月くらい植継ぎを繰り返して待つ必要があり、この誘導はなかなかうまく行かない場合も多い。信号測定の前に、細胞培養法を確立するのに(というか出来る大学院生を養成するのに)時間がかかっている。脳の生物物理計測の未来は明るい、全速力で走り出すにはもう少し時間がかかる。