

Satoh K, Shirabe S, Eguchi K, Yamauchi A, Kataoka Y, Niwa M, Nishida N, Katamine S.	Toxicity of quinacrine can be reduced by co-administration of P-glycoprotein inhibitor in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease.	Cell Mol Neurobiol.	24	873-875	2004
Dohgu S, Yamauchi A, Nakagawa S, Takata F, Kai M, Egawa T, Naito M, Tsuruo T, Sawada Y, Niwa M, Kataoka Y.	Nitric oxide mediates cyclosporine-induced impairment of the blood-brain barrier in coculture of mouse brain endothelial cells and rat astrocytes.	Eur. J. Pharmacol.	505	51-59	2004
Yamauchi A, Dohgu S, Shuto H, Oishi R, Kataoka Y. Cell. Mol. Neurobiol.	Tacrolimus-induced neurotoxicity and nephrotoxicity is ameliorated by the administration in the dark period in rats.	Cell. Mol. Neurobiol.	24	695-704	2004
Dohgu S, Yamauchi A, Takata F, Naito M, Tsuruo T, Higuchi S, Sawada Y, Kataoka Y	Transforming growth factor- β 1 supports maintenance of the blood-brain barrier function.	Cell. Mol. Neurobiol.	24	491-497	2004
Dohgu S, Yamauchi A, Takata F, Sawada Y, Higuchi S, Naito M, Tsuruo T, Shirabe S, Niwa M, Kataoka Y.	Uptake and efflux of quinacrine, a candidate for the treatment of prion diseases, at the blood-brain barrier.	Cell. Mol. Neurobiol.	24	205-217	2004
Dohgu S, Takata F, Yamauchi A, Nakagawa S, Egawa T, Naito M, Tsuruo T, Sawada Y, Niwa M, Kataoka Y	Brain pericytes contribute to the induction and up-regulation of blood-brain barrier functions through transforming growth factor- β production.	Brain Res.	1038	208-215	2005

Lee YJ, Kusahara H, Jonker JW, Schinkel AH, Sugiyama Y	Investigation of efflux transport of dehydroepiandrosterone sulfate and mitoxantrone at the mouse blood-brain barrier: a minor role of breast cancer resistance protein.	J Pharmacol EXP Ther	312	44-52	2005
Tohyama K, Kusahara H, Sugiyama Y	Involvement of multispecific organic anion transporter, Oatp 14 (Slc21a14), in the transport of thyroxine across the blood-brain barrier.	Endocrinology	145	4384-91	2004
Kusahara H, Sugiyama Y	Efflux transport systems for organic anions and cations at the blood-CSF barrier	Adv Drug Deliv Rev	56	1741-63	2004
楠原洋之、竹内健二、杉山雄一	肝シヌソイド側における異物排泄トランスポーター (MRP4) の機能解析	薬理と治療	32	S223-7	2004
Inoue, K., Denda, M., Tozaki, H., Fujishita, K., <u>Koizumi, S.</u> and Inoue, K.	Characterization of multiple P2X receptors in cultured normal human epidermal keratinocytes.	J. Invest. Dermatol	124	756-763	2005
Narita, M., Miyatake, M., Shibasaki, M., Tsuda, M., <u>Koizumi, S.</u> , Narita, M., Yajima, Y., Inoue, K. and Suzuki, T.	Long-lasting change in brain dynamics induced by methamphetamine: enhancement of protein kinase C-dependent astrocytic response and behavioral sensitization.	J. Neurochem.	93	1383-1392	2005
Nasu-tada, K., <u>Koizumi, S.</u> and Inoue, K.	The involvement of β 1 integrin in microglial chemotaxis and proliferation on fibronectin: different regulations by ADP through PKA	Glia	52	98-107	2005

Fujishita, K., <u>Koizumi, S.</u> and Inoue, K	Upregulation by retinoic acid of P2Y2 receptors in normal human epidermal keratinocytes.	Purinergic Signaling,	2	491-498	2006
Nasu-Tada, K. *, <u>Koizumi, S.*</u> , Tsuda, M.*, Kunifusa, E. and Inoue, K.	Possible involvement of increase in spinal fibronectin following peripheral nerve injury in upregulation of microglial P2X ₄ , a key molecule for mechanical allodynia.	Glia	53	769-775	2006
Shuto H, Yamauchi A, Ikeda M, Sohda Y, Koga A, Tominaga K, Egawa T, <u>Kataoka Y</u>	Forced exercise-induced flushing of tail skin in ovariectomized mice, as a new experimental model of menopausal hot flushes	J. Pharmacol. Sci.	98	323-326	2005
Yamauchi A, Shuto H, Dohgu S, Nakano Y, Egawa T, <u>Kataoka Y</u>	Cyclosporin A aggravates electroshock-induced convulsions in mice with a transient middle cerebral artery occlusion	Cell. Mol. Neurobiol.,	25	923-928	2005
Kuroda M, <u>Kusuhara H.</u> , Endou H, Sugiyama Y.	Rapid elimination of cefaclor from the cerebrospinal fluid is mediated by a benzylpenicillin-sensitive mechanism distinct from organic anion transporter 3.	J Pharmacol Exp Ther.	314	855-861	2005
Lee Y.J., Maeda J., Kusuhara H., Okauchi T., Inaji M., Nagai Y., Obayashi S., Nakao R., Suzuki K., Sugiyama Y. and Suhara T.	In Vivo Evaluation of P-glycoprotein Function at the Blood-Brain Barrier in Nonhuman Primates Using [11C]Verapamil.	J Pharmacol Exp Ther.	316	647-53	2006
Ikoma Y., Takano A., Ito H., Kusuhara H., Sugiyama Y., Arakawa R., Fukumura T., Nakao R., Suzuki K. and Suhara T.	Quantitative Analysis of 11C-Verapamil Transfer at the Human Blood-Brain Barrier for Evaluation of P-glycoprotein Function.	J Nucl Med.	47	1531-1537	2006

Takano A., Suhara T., Yasuno F., Suzuki K., Takahashi H., Morimoto T., Lee Y.J., Kusuhara H., Sugiyama Y. and Okubo Y.	The antipsychotic sultopride is overdosed - a PET study of drug-induced receptor occupancy in comparison with sulpiride.	Int J Neuropsychopharmacol.	9	539-545	2006
Koizumi, S., Shigemoto-Mogami, Y., Nasu-Tada, K., Shinozaki, Y., Ohsawa, K., Tsuda, M., Joshi, B.V., Jacobson, K.A., Kohsaka, S. and Inoue, K	UDP acting at P2Y ₆ receptors is a novel mediator of microglial phagocytosis.	Nature			in press
Shinozaki, Y., Koizumi, S., Ohno, T., Nagao, T. and Inoue, K.	Extracellular ATP Counteracts the ERK1/2-Mediated Death-Promoting Signaling Cascades in Astrocytes	Glia	54	606-618	2006
Tozaki-Saito, H., Koizumi, S., Sato, Y., Tsuda, M., Nagao, T. and Inoue, K.	Retinoic acids increase P2X ₂ receptor expression through the 5'-flanking region of P2rx2 gene in rat pheochromocytoma PC12 cells.	Mol. Pharmacol.	319-328	319-328	in press
小泉修一、藤下加代子、津田誠、井上和秀	ATP を介した皮膚ケラチノサイト間情報連絡と痛み	Pain Research	21,	133-139	2006
小泉修一、藤下加代子、津田誠、井上和秀	G 蛋白質共役型 ATP 受容体と痛み	ペインクリニック	27	560-568	2006
Takata F, Dohgu S, Yamauchi A, Sumi N, Nakagawa S, Naito M, Tsuruo T, Shuto H, Kataoka Y	Inhibition of transforming growth factor- β production in brain pericytes contributes to cyclosporine A-induced dysfunction of the blood-brain barrier	Cell Mol Neurobiol			in press
Yamauchi A, Dohgu S, Nishioku T, Shuto H, Naito M, Tsuruo T, Sawada Y, Kataoka Y	An inhibitory role of nitric oxide in the dynamic regulation of the blood-brain barrier function	Cell Mol Neurobiol			in press

<u>Doh-ura K, Tamura K, Karube Y, Naito M, Tsuruo T, Kataoka Y</u>	Chelating compound, chrysoidine, is more effective in both anti-prion activity and brain endothelial permeability than quinacrine	Cell Mol Neurobiol			in press
<u>Nishioku T, Takata F, Yamauchi A, Sumi N, Yamamoto I, Fujino A, Naito M, Tsuruo T, Shuto H, Kataoka Y</u>	Protective action of indapamide, a thiazide-like diuretic, on ischemia-induced injury and barrier dysfunction in mouse brain microvascular endothelial cells	J. Pharmacol. Sci.			in press

グリア細胞による シナプス伝達制御の研究

keywords ▶▶▶ ATP、P2受容体、グリア細胞、
アストロサイトーニューロン連関、海馬

小泉 修一

国立医薬品食品衛生研究所 薬理部室長



はじめに

「Stars at last (ついにスターに)」。これは、最近の『Trends in Neuroscience』の総説「アストロサイトの新しい役割」につけられたサブタイトルである¹⁾。星状を呈することから命名された星状膠細胞“アストロサイト”は、まさに脳機能研究のスターになりつつある。

これまでダイナミックな脳機能研究はニューロンの研究として展開されてきた。もちろん、脳のダイナミックな情報処理・発信機能を直接的に担っているのはニューロンであり、その複雑なニューロン回路網が多様な脳機能と直接的にリンクしていることは疑いようがないが、脳にはほかに多くの非ニューロン細胞が存在している。これらニューロン以外の細胞が脳内に豊富に存在するという事実は、19世紀末にニューロン説を唱えた Cajal (1852～1934) の時代からすでによく知られた事実でもある。このうち神経膠細胞(グリア細胞)は、分化、再生および修復などのキーワードとともに最近特に注目されている細胞であるが、ごく最近までニューロンの物理的支持、栄養因子放出や老廃物除去など、ニューロン活動を支える裏方として働いていると考えられるにすぎなかった。ましてや、脳機能のダイナミズムに関与するとは想像すらできなかった。

しかし、ごく最近、このグリア細胞が、なんとシナプス伝達そのものを制御し得るとして注目を集めている²⁾。

ヒト脳には、ニューロンの約10倍にも及ぶ多数のグリア細胞が存在する。なかでも数的優位を呈するアストロサイトは、ニューロンに寄り添い、ほとんどのシナプスを取り巻くように存在して各種の神経伝達物質に即時的に応答し、しかも活動依存的にグルタミン酸およびATPなどの液性伝達物質を放出する“信号発信機能”を有する。これらの事実は、グリア細胞—ニューロン間の積極的なコミュニケーションが脳機能のダイナミズムに重要である可能性を強く示唆するものである。

一方、ATPは“エネルギーの通貨”としてあまねく細胞内に存在するが、多くの組織で細胞外情報伝達物質として働く。1993年に最初の形質膜上のATP受容体蛋白質(P2受容体)cDNAがクローニングされ³⁾、現在ではイオンチャネル型P2X受容体7種類(P2X1~7)、代謝型P2Y受容体8種類(P2Y1、2、4、6、11~14)が知られ、脳をはじめほとんどの組織でその発現が確認されている。

筆者らは、神経系における神経伝達物質ATPの機能を研究してきたが、ごく最近になって、ATPがニューロンからグリア細胞へも情報を伝達すること、各種グリア細胞の多彩な機能を制御すること、さらにグリア細胞間情報伝達をも担っていることに気づき、神経伝達物質ATPはグリア細胞間およびニューロン—グリア細胞間の連絡をつかさどる重要な分子である、との考えにいたった。特にアストロサイトはきわめて低濃度のATPに応答し、刺激依存的にATPを放出する。これらの知見は、ATPがアストロサイトからシナプスへ即時的に情報を伝えている可能性、つまり「アストロサイトがATPを介してシナプス伝達を制御している」という作業仮説を提起させるものである。筆者は、ATPを切り口として、アストロサイト—ニューロン間コミュニケーションの生理学的および薬理的性質を示し、“静なる巨人”グリア細胞のシナプス伝達における動的な側面およびその重要性を明らかにすることを試みた。

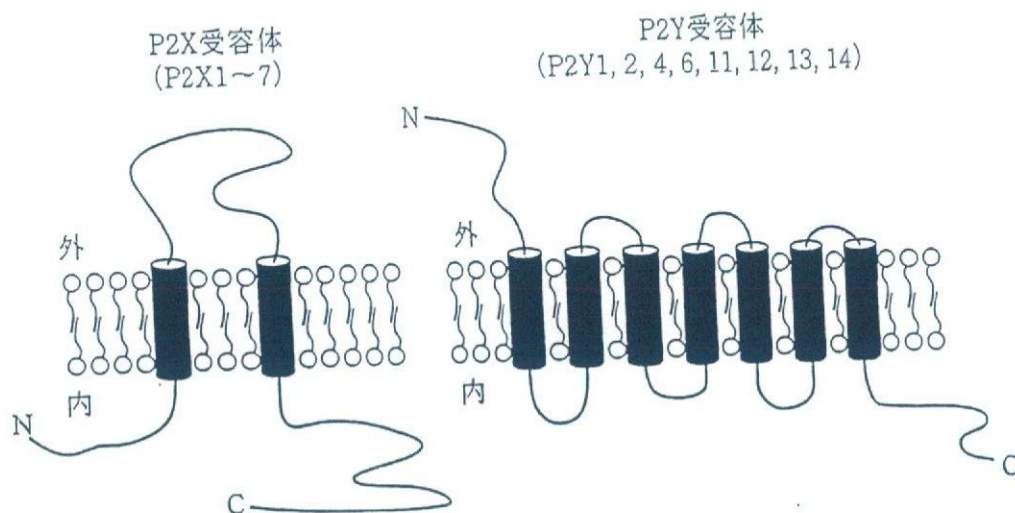


図1 P2受容体
ATP受容体 (P2受容体) は、イオンチャネル型P2X受容体と代謝型P2Y受容体に分類され、それぞれ7および8種類のサブクラスが報告されている。

1. ATP受容体“P2受容体”

ATPはあまねく細胞内に存在する“エネルギーの通貨”である。このように細胞の生死を決定するような貴重な物質が細胞外に放出され、情報伝達物質としても機能するという大胆な発想は、すでに1970年代初頭には提唱されていた⁴⁾。しかし、伝達物質として確たる市民権を得たのは、最初のATP受容体蛋白質 (P2受容体) cDNAがクローニングされた1993年以降であるといえる³⁾。

P2受容体は、大きく2つのファミリー、すなわちイオンチャネル型P2Xおよび代謝型P2Yファミリーに分類される (図1)。P2Xファミリー (P2X1～7) は膜2回貫通型の蛋白質構造をもち、3分子が会合して非選択性陽イオンチャネルを形成すると考えられており、7種類のサブユニットの異なる組み合わせにより少なくとも11種類のチャネル蛋白質として機能していることが知られている⁵⁾。それに対して、P2YファミリーはG蛋白質共役型受容体スーパーファミリーに属し、P2Y1、2、4、6、

11～14が認知されている。前4者はGq/11と(P2Y11はGsとも)、後4者はGiと共役している。

内在性のリガンドはアデニンヌクレオチドATPおよびピリミジンヌクレオチドUTPであるが、その代謝物であるADPおよびUDPもそれぞれリガンドとしてある種のP2受容体サブクラスに作用する。また最近では、ヌクレオチド糖であるUDP-グルコース^{6,7)}や、2分子のヌクレオチドがポリリン酸で結合した内因性因子が作用する受容体も発見され⁸⁾、ヌクレオチド関連物質は伝達物質として実に多様な生理機能と関連しているようである。

2. 脳内グリア細胞とアストロサイト間情報連絡 “gliotransmission”

ヒトは、ニューロンに対するグリア細胞の存在比が、ほかの生物、ほかの哺乳類と比べても格段に大きい。この事実は、グリア細胞が進化にともなってその存在比を増大させ、高度な精神活動を支えている可能性を提起するものである。脳内グリア細胞は大きく分けて3種類、星状膠細胞(アストロサイト)、乏突起膠細胞(オリゴデンドロサイト)および小膠細胞(ミクログリア)からなる。小脳のバークマングリア、網膜のミュラー細胞など部位特異的なアストロサイト様細胞もある。本稿では、特にアストロサイトに注目して話を展開する。

アストロサイトは、名前が示すように星形で、脳内でもっとも数の多いグリア細胞である。その役割は多岐にわたっている。たとえば、多くのサイトカイン、成長因子受容体が発現していることから、脳内の炎症・傷害時に応答し機能していることが、また種々のトランスポータの発現とシナプス周囲を取り囲むような存在形態から、神経伝達物質の除外・イオン恒常性保持機能との関連が示唆されている。

さらに注目すべき点は、アストロサイトはほとんどすべての神経伝達物質受容体を発現しており、各種神経伝達物質に即時的に応答すること、

また種々の細胞外液性因子を放出することである。アストロサイトは非興奮性細胞であり、各種イオンチャネルを発現しているが活動電位を発生しない。しかし、アストロサイトは巨大なネットワークを形成し、細胞内および細胞間に伝播する“ Ca^{2+} wave (Ca^{2+} 波)”を介して互いにコミュニケーションをとっていることが知られている。これは細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) 上昇が、時間・空間的にずれながら波のように細胞内および細胞間を伝わる現象である。

そして、細胞内 Ca^{2+} 波は、主にイノシトール三リン酸 (InsP_3) 受容体を介する小胞体からの自己再生的な Ca^{2+} 遊離により形成される。一方、細胞間 Ca^{2+} 波は、コネキシン 43 などのギャップ結合を介して Ca^{2+} イオンやセカンドメッセンジャーが細胞間を移動するという説と⁹⁾、グルタミン酸および ATP など細胞外液性因子が放出・拡散することに起因するという説があり¹⁰⁾、現在は後者の考え方が主流である。このような、細胞外因子によるアストロサイトーアストロサイトコミュニケーションは、ニューロン間コミュニケーションの“neurotransmission”に対応して、“gliotransmission”と呼ばれる。

初代培養アストロサイトに外から ATP 刺激を加えると、ほとんどの細胞で大きな $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇が観察される。ATP は、アストロサイトの増殖¹¹⁾、DNA 合成¹²⁾、突起形成および突起伸展など、増殖および形態変化を制御していると考えられている。これらの応答は P2Y 受容体を介し、ERK1/2MAP リン酸化酵素や Ca^{2+} 非依存的蛋白質リン酸化酵素 C などの細胞内情報伝達系が関与している¹³⁾。そして、ATP により惹起される $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇は、P2Y1 受容体および P2Y2 受容体の活性化により、Gq/11 蛋白質とリンクしたフォスホリパーゼ C (PLC) / InsP_3 を介した細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位からの Ca^{2+} 遊離によるものであり、結果として容量性 Ca^{2+} 流入をも引き起こし、持続的な非常に大きな細胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇として観察される¹⁴⁾。

この Ca^{2+} 応答は Ca^{2+} 波となって周囲の細胞に伝播するが、前述した

ように細胞間 Ca^{2+} 波は、これまでグリア細胞間のギャップ結合を介して Ca^{2+} および InsP_3 が拡散することにより誘発されると考えられてきた⁹⁾。しかし、グルタミン酸刺激によりアストロサイトの $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇が惹起されること、グルタミン酸が Ca^{2+} 依存的にアストロサイトから放出されることより、自己再生的な Ca^{2+} 依存的グルタミン酸放出など液性因子の放出と拡散が Ca^{2+} 波の伝播に必須ではないかと考えられるようになってきた。このことは、グリア細胞由来の液性因子がグリア細胞間、さらにはニューロン-グリア細胞間の情報伝達物質として機能していることを強く示唆するものである。

しかし最近の研究では、 Ca^{2+} 波伝播に関しては、グルタミン酸よりもむしろ ATP の放出と拡散が主因と考えられている。実際、単一アストロサイトを軽く機械刺激すると、まず被刺激細胞で $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が上昇し、これは数秒のタイムラグを経て周囲のアストロサイトに伝播する (図 2A 上)。ATP 分解酵素アピラーゼ (apyrase)、ATP 受容体拮抗薬の suramin は、この Ca^{2+} 波伝播を消失させる (図 2A 下)。

さらに詳細な薬理的検討により、この Ca^{2+} 波伝播には、P2Y1 受容体および P2Y2 受容体の活性化と、それに引き続くストアからの Ca^{2+} 遊離が必須であることが明らかとなった。ルシフェリン-ルシフェラーゼと高感度カメラを用いて ATP を画像化すると、ATP は確かに被刺激部位から放出・拡散され、その伝播速度は Ca^{2+} 波と相関していた (図 2B、D)。これは、内在性 ATP 放出および P2Y 受容体活性化が、アストロサイト間の Ca^{2+} 波形成に中心的役割を果たしていることを強く示唆する結果である。

従来の報告のように、グルタミン酸も Ca^{2+} 波に関与し得る。アストロサイトの $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇を惹起するグルタミン酸と ATP の最小有効濃度が約 50 倍異なることから、アストロサイトはこのような感受性の差を利用して細胞外因子を使い分け、情報伝達を制御していると考えられる。また、 Ca^{2+} 波がギャップ結合を介して伝播する成分もあると考えられる

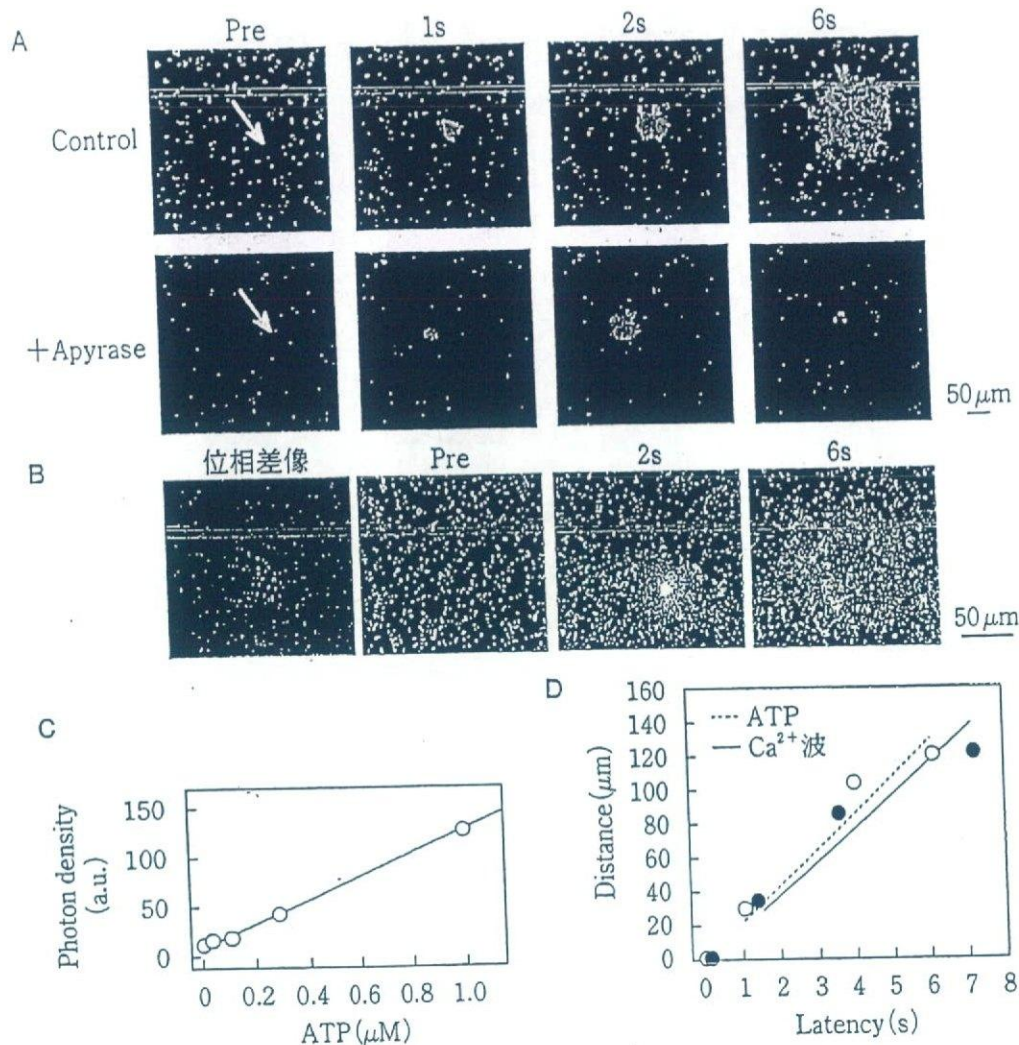


図2 アストロサイト刺激によるCa²⁺波伝播およびATP放出の画像化

A: アストロサイト間に伝播するCa²⁺波。アストロサイトをガラスピペットで軽く触れると(白矢印)、刺激部位でまず[Ca²⁺]_i上昇が観察され、周辺へ同心円状に伝播するCa²⁺波が観察される(対照;上段)。アピラーゼ(apyrase)(grade III、20 units/ml)を添加して同様の実験を行うと、このCa²⁺波伝播は著しく抑制される(+Apyrase;下段)。

B: アストロサイトからのATP放出。ルシフェリン-ルシフェラーゼ存在下で、海馬アストロサイトにガラスピペットで軽い機械刺激(位相差像参照;左端)を与え、発生する光子を高感度カメラで経時的にとらえた(露光時間500ms)。まず、刺激した部位で光子の増大が観察され、これは周辺へと広がった。

C: Photon-ATP濃度相関。既知濃度のATP標準液を用いて光子-ATP濃度の相関を示した。両者には非常に高い相関が認められた($r^2 = 0.9996$)。

D: Ca²⁺波とATP放出の相関。ATP伝播速度とCa²⁺波伝播速度を比較した。やはり、両者間には非常に高い相関が認められた。

が、ギャップ結合を形成するコネキシン 43 分子が ATP 放出能に強く影響すること¹⁵⁾、さらにコネキシンが ATP 放出チャネルである可能性¹⁶⁾などから、コネキシン分子は意外にも ATP 放出能とも関係があるようである。ATP を介する異種グリア細胞間の gliotransmission の存在も報告されている。アストロサイトの Ca^{2+} 波は、培養細胞¹⁷⁾でもスライス標本¹⁸⁾でも ATP を介して近傍のミクログリアに伝播する。

3. アストロサイトーニューロン連関

1) アストロサイトの Ca^{2+} 波はニューロンに伝播する

ニューロンの活動がグルタミン酸を介してアストロサイトの Ca^{2+} 動態に影響することは、かなり以前から知られていた¹⁹⁾。しかし、海馬ニューロンを用いた実験では、各種グルタミン酸受容体の拮抗薬存在下でニューロンを興奮させても、約 20% の近傍アストロサイトでは遅い $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇が観察され、 Ca^{2+} 波が伝播していくのが観察され、これはアピラーゼおよび suramin で消失する。ニューロンからのシグナルは ATP によってもアストロサイトに伝わるのである²⁰⁾。

それでは、このアストロサイト間に伝播する Ca^{2+} 波はニューロンにも伝わるのだろうか。

アストロサイトを局所的に刺激すると、アストロサイト間 Ca^{2+} 波に加えて、近傍の約 30% のニューロンで $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇が認められ、これはアピラーゼおよび suramin で抑制される。そして、この Ca^{2+} 波のニューロンへの伝播は細胞外 Ca^{2+} 非依存的である。

前述したように、海馬には P2X2 または P2X4、P2X6 mRNA²¹⁾ が発現し、錐体細胞層には P2Y1 受容体蛋白質の強いシグナルが²²⁾、さらに介在ニューロンでは機能的 P2Y1 受容体が²³⁾ 発現している。ニューロンへの Ca^{2+} 波伝播が細胞外 Ca^{2+} に非依存的であったことを考慮すると、主に P2Y 受容体、特に P2Y1 受容体がこのアストロサイトーニューロン間の Ca^{2+} 波伝播の責任受容体であると考えられる。ATP を介する gliotransmission

transmission はグリア細胞ばかりでなく、ニューロンの Ca^{2+} 動態、さらにはニューロンの活動に影響し得ることが明らかとなった。

2) アストロサイトーシナプス連関

ATP 依存的なアストロサイト Ca^{2+} 波は、ニューロンのシナプス伝達をもダイナミックに制御する。海馬のニューロン・グリア共培養細胞では、グルタミン酸神経の興奮性シナプス伝達に起因する自発的な Ca^{2+} オシレーションが神経細胞で認められる²⁴⁾。外から ATP を加えると、神経終末の P2Y 様受容体を介してグルタミン酸放出を抑制することにより、この Ca^{2+} オシレーションを抑制する (図 3Ab、トレース 1、2)。この抑制メカニズムの詳細は不明な点が多いが、少なくとも後シナプスの応答に影響を与えないこと、グルタミン酸放出が抑制されること、イオノマイシンによるグルタミン酸放出には影響しないが、脱分極刺激による放出を抑制することから、神経終末の電位依存性 Ca^{2+} チャネルの抑制が関係しているものと考えられる²⁵⁾。アストロサイトに局所刺激を与えると、ATP が放出され、拡散し、これにより周辺のアストロサイトで $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇が Ca^{2+} 波伝播として観察される (図 3Bc、トレース 1、2)。このとき同時に、刺激したアストロサイト近傍ではニューロンの Ca^{2+} オシレーション、つまり興奮性シナプス伝達も抑制されるのである (図 3Bd (v)、トレース 3~5)。この抑制作用はアピラーゼ処置により消失する。つまり、ATP はアストロサイトーニューロン間の液性情報伝達物質として働き、シナプス伝達をきわめてダイナミックに抑制し得るのである。これは、これまでニューロンの前シナプスおよび後シナプスのみで完結されると考えられていたシナプス伝達を、アストロサイト (周辺シナプス) を加えた三者で、三者間シナプス (tripartite synapse) として考える必要性を提起するものである²⁾。このとき、ニューロンーアストロサイトをつなぐ重要な分子として、ATP が中心的な役割を果たしているのである (図 6 参照)。

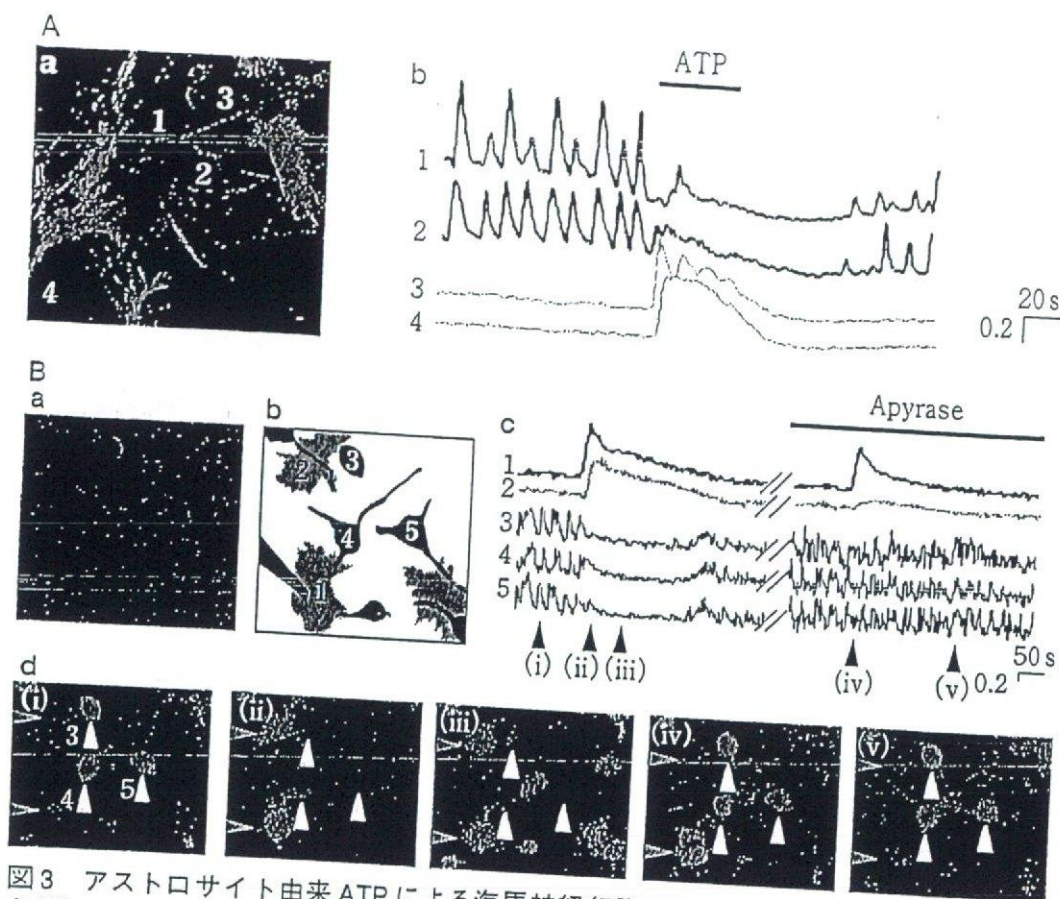


図3 アストロサイト由来ATPによる海馬神経細胞のシナプス伝達抑制 (口絵カラー参照)

A: aは海馬初代培養細胞の免疫染色像。細胞は、ニューロン特異的マーカーMAP2 (緑) およびアストロサイト特異的マーカー glial fibrillary acidic protein (GFAP; 赤) で同定した。ニューロン1および2、アストロサイト3および4の $[Ca^{2+}]_i$ 変動の時間経過をbに示した。ニューロンでは同期した興奮性シナプス伝達(Ca^{2+} オシレーション)が観察され、これはテトロドトキシン(TTX)、細胞外 Ca^{2+} 除去、さらにイオンチャンネル型グルタミン酸受容体拮抗薬で抑制されることから、グルタミン酸のシナプス伝達に起因していることがわかっている²⁴⁾。この Ca^{2+} オシレーションをシナプス伝達の指標として細胞外ATPの作用を検討した。ATP刺激($1\mu M$)により、ニューロンの Ca^{2+} オシレーションは消失し、アストロサイトでは $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が認められた。

B: 単一アストロサイトを刺激すると、ニューロンの Ca^{2+} オシレーションは抑制される。aは位相差像を、bはニューロン(緑)およびアストロサイト(赤)の位置を模式的に示した。図b中左下に刺激ピペットをおいた。アストロサイト1を刺激した場合の、アストロサイト(1, 2)およびニューロン(3~5)の $[Ca^{2+}]_i$ 変動をcに示した。それぞれトレース番号は模式図の細胞番号に対応している。アストロサイト1の機械刺激(矢頭)によりアストロサイト間 Ca^{2+} 波(1, 2)およびニューロンの Ca^{2+} オシレーション抑制(3~5)が認められた。これらのアストロサイトによるシナプス伝達抑制作用はアピラーゼ(20 units/ml)より消失した(トレース右)。トレースの下に記した矢頭(i)~(v)各時間における Ca^{2+} イメージを類似カラーでdに示した。d(i)図中の数字は模式図aの細胞番号と対応している。

3) アストロサイトからの自発的ATP放出による

恒常的なシナプス制御

アストロサイトの自発的な $[Ca^{2+}]_i$ 変動には、ニューロンの活動に依存しない成分が存在する。図4で示すように、テトロドトキシン (tetrodotoxin: TTX) で神経活動を完全に抑制した場合でも、アストロサイトは同期しない $[Ca^{2+}]_i$ 変動を呈した。この自発的な $[Ca^{2+}]_i$ 変動は、suramin、PPADS さらにアピラーゼによって抑制された (図4)。また、ニューロンを含まない精製したアストロサイトの培養系でも、自発的な

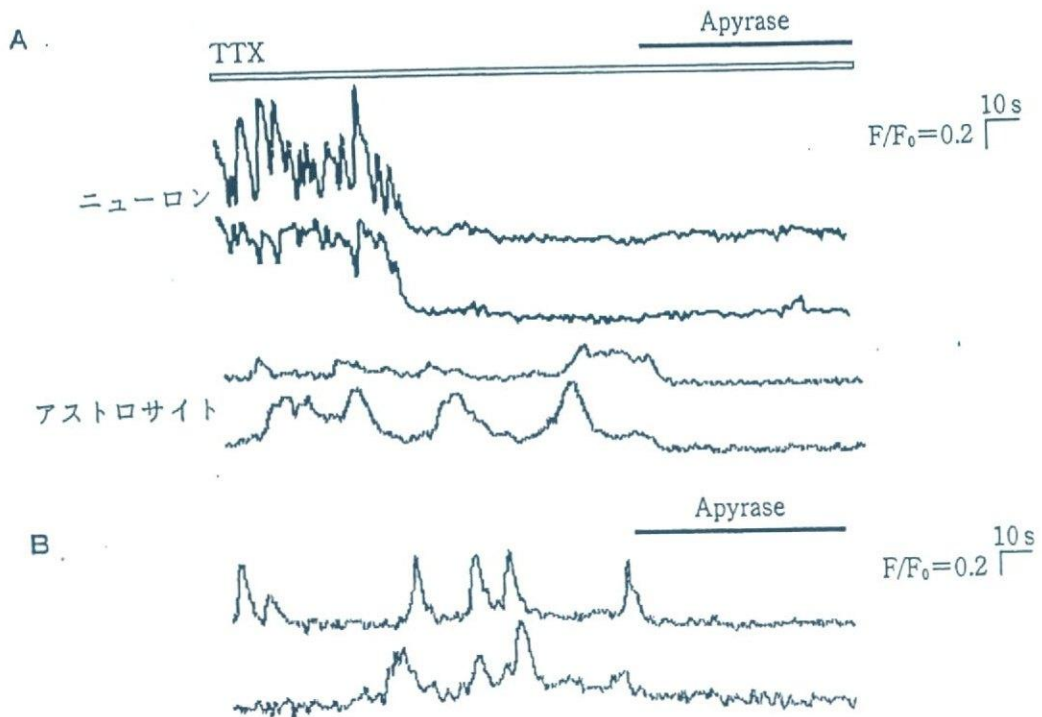


図4 アストロサイトのニューロン非依存的な Ca^{2+} 波の存在

A: ニューロン・グリア共培養系における $[Ca^{2+}]_i$ 変化。テトロドトキシン (TTX, $1\mu M$) によりニューロンの Ca^{2+} オシレーションは完全に抑制された。しかし、TTX 存在下でもアストロサイトの Ca^{2+} 波は観察された。

B: ニューロンを含まないアストロサイトのための純培養系における $[Ca^{2+}]_i$ 変化。アストロサイトの純培養系でも、アストロサイトは低頻度で同期しない Ca^{2+} 波を呈し、これは suramin (データ未掲載) およびアピラーゼによりほぼ90%のアストロサイトで抑制された。

$[Ca^{2+}]_i$ 変動が観察された。さらに、海馬のスライス標本でもアストロサイトの自発的な $[Ca^{2+}]_i$ 変動が認められ、これは TTX 非依存的であることが報告されている²⁶⁾。つまり、アストロサイトはニューロン活動に依存しない自発的な ATP 放出能をも有し、これにより自身の $[Ca^{2+}]_i$ 変

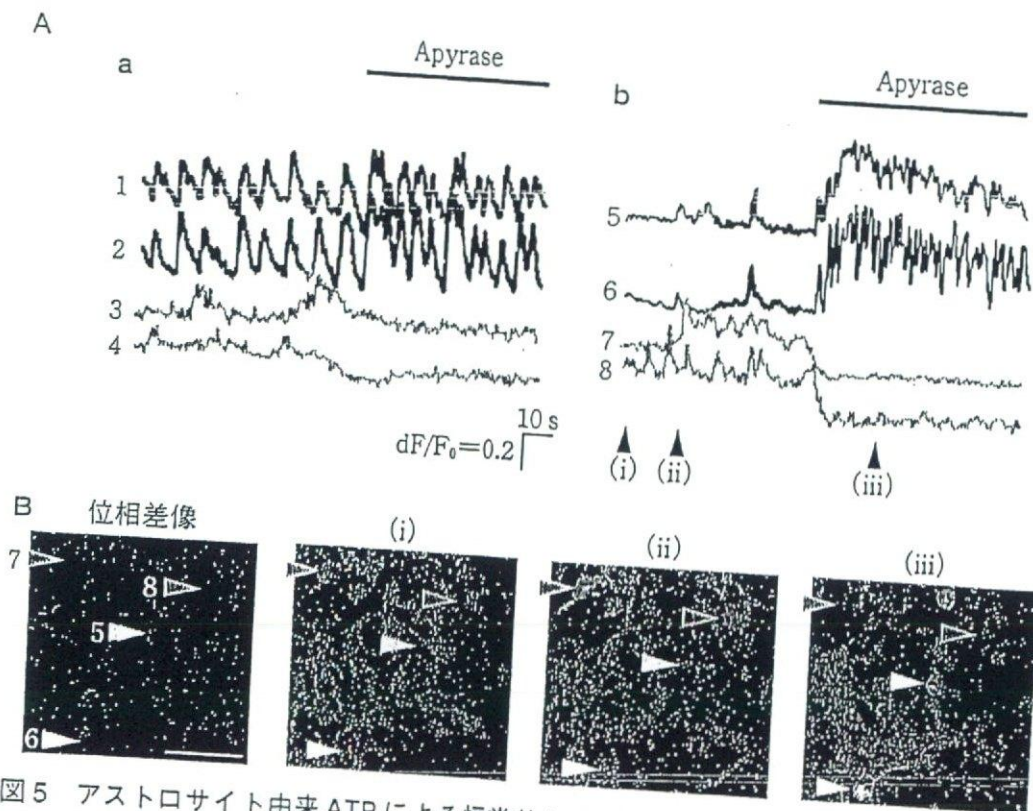


図5 アストロサイト由来ATPによる恒常的シナプス伝達制御(口絵カラー参照)
 A: aはグルタミン酸によるシナプス伝達 (Ca^{2+} オシレーション) に対するアピラーゼ (20 units/ml) の作用。アピラーゼを加えるとニューロンの Ca^{2+} オシレーション (1、2) の頻度および振幅は増大する。一方、アストロサイトの Ca^{2+} 変動 (3、4) は消失した。特にニューロンの Ca^{2+} オシレーション頻度が低いカバースリップにアピラーゼを加えると (b)、ニューロンの活動は爆発的に増大した (5、6)。このような細胞群でやはりアピラーゼでその活動が消失する。
 B: Abの Ca^{2+} イメージを疑似カラーで示した。左端は位相差像、番号はAbのトレースと対応している。疑似カラー上の番号は、Abのトレースの下に記した矢頭 (i) ~ (iii) 各時間における Ca^{2+} イメージを示す。(ii) ではアストロサイトのみが活動しており、アピラーゼ添加後の (iii) ではニューロンのみの $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が認められる。スケールバーは 50 μm 。

化を引き起こしているのである。

では、この自発的なATP放出は近傍のニューロンの活動に影響していないのだろうか。

図5に示すように、海馬のニューロン・グリア共培養細胞にアピラーゼを添加してアストロサイトから放出されるATPを除去すると、シナプス伝達に起因するニューロンの Ca^{2+} オシレーションは、その頻度と振幅ともに増強された(図5Aa、トレース1、2)。特にニューロンの活動が小さい標本では、アピラーゼにより爆発的なシナプス伝達の増大が認められた(図5Ab、トレース5、6)。このような標本では、アストロサイトの自発的 Ca^{2+} 活動が大きく(図5Ab、トレース7、8)、これはアピラーゼにより完全に消失する。したがって、アストロサイトは自発的に細胞外ATP放出を調節することにより、シナプス伝達を恒常的にも強力に制御している可能性が明らかとなった。ニューロンの何倍もの数を有し、またシナプスを囲むように存在するアストロサイトは、シナプス伝達において非常に重要なニューロンのパートナーとして機能しているようである。

図6に、シナプス前部、シナプス後部および周辺シナプスのアストロサイトが形成する三者間シナプスの形態を、その制御因子ATPを中心に模式的に示した。シナプス伝達によって漏れでた神経伝達物質は周辺アストロサイトに作用して、アストロサイト間へ、もとのシナプスへ、さらにほかのシナプスへさまざまな情報をダイナミックに伝える。このようなアストロサイトを含めたグリア細胞-ニューロンコミュニケーションは、複雑な脳の情報処理・発信機能の素過程である可能性が高い。また、アストロサイトがニューロン活動に依存しないATP放出能を有していたことから、アストロサイトはいわゆるシナプス伝達が行われるニューロンの周辺環境を積極的に整備する役割も有しているようである。これらの知見は、今後のシナプス伝達研究はグリア細胞をも十分考慮して進めていく必要性を提起するものであると考えている。

おわりに

ATPがアストロサイトーニューロン間の相互情報伝達物質として機能していることが明らかとなった。このようなグリア細胞によるシナプス伝達制御の生理的意義および病態との関連性解明には、今後の研究を待たなければならない。しかし最近、筆者らは、脊髄グリア細胞のATP受容体を介する情報伝達の変調が、神経因性疼痛を惹起することを明らかにし²⁷⁾、グリア細胞とニューロンのクロストークが重篤な疾患とリンクしている一例を示した。今後、このATPが介在するグリア細胞ーニューロン連関の研究は、中枢神経系の複雑な情報処理・発信機能を解明

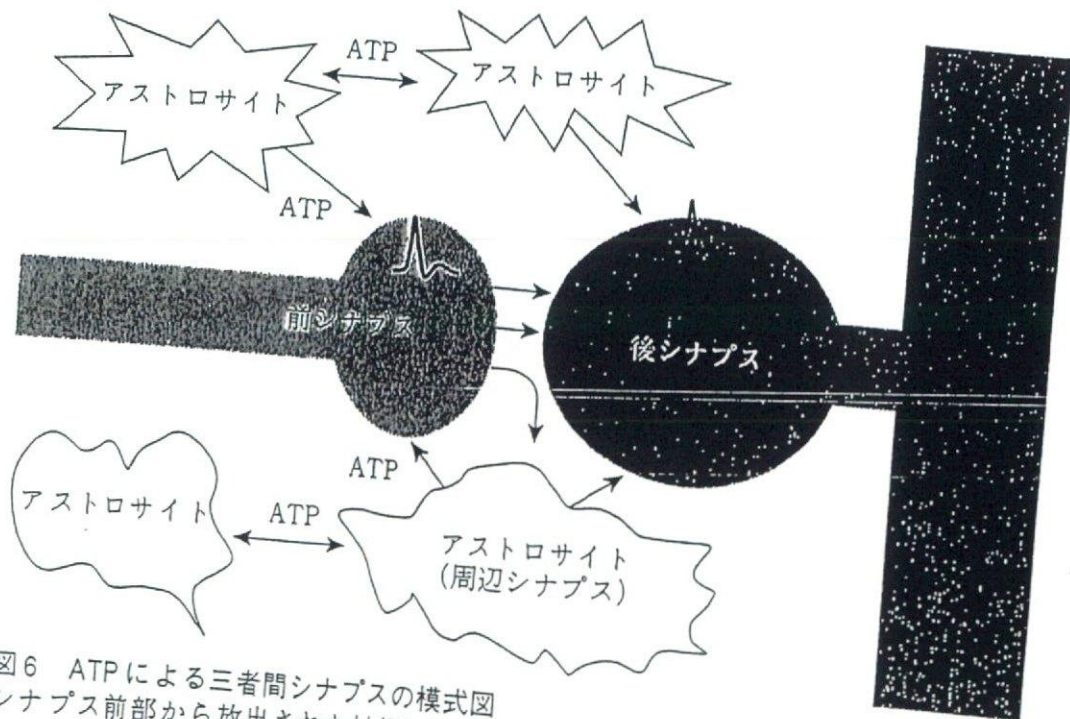


図6 ATPによる三者間シナプスの模式図
 シナプス前部から放出された神経伝達物質はシナプス後部の特異的受容体を刺激する。このとき、シナプス間隙から漏れた神経伝達物質は周囲を取り巻くアストロサイト(周辺シナプス)を刺激する。アストロサイトは刺激依存的に液性因子ATPを放出し、これはアストロサイト間の情報伝達物質として機能し、さらに神経細胞のシナプスへフィードバックされてシナプス伝達を即時的に制御する。

するひとつのキーワードになると思われる。

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始懇篤なるご指導、ご鞭撻をいただきました九州大学大学院薬学研究院教授・井上和秀先生に深く感謝申し上げます。また、実験にご協力くださいました国立医薬品食品衛生研究所・小濱とも子、藤下加代子、最上(重本)由香里、津田 誠(現・九州大学大学院助手)ほか共同研究者の方々、さらに的確なご助言をいただき自由な研究環境をつくっていただきました同研究所副所長・大野泰雄先生に深甚なる謝意を表します。

参 考 文 献

- 1) Ransom B, Behar T, and Nedergaard M : *Trends Neurosci.* 26, 520-522, 2003
- 2) Haydon PG : *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 185-193, 2001
- 3) Webb TE, Simon J, Krishek BJ, Bateson AN, Smart TG, King BF, Burnstock G, and Barnard EA : *FEBS Lett.* 324, 219-225, 1993
- 4) Burnstock G : *Pharmacol. Rev.* 24, 509-581, 1972
- 5) Torres GE, Egan TM and Voigt MM : *J. Biol. Chem.* 274, 6653-6659, 1999
- 6) Chambers JK, Macdonald LE, Sarau HM, Ames RS, Freeman K, Foley JJ, Zhu Y, McLaughlin MM, Murdock P, McMillan L, Trill J, Swift A, Aiyar N, Taylor P, Vawter L, Naheed S, Szekeres P, Hervieu G, Scott C, Watson JM, Murphy AJ, Duzic E, Klein C, Bergsma DJ, Wilson S, and Livi GP : *J. Biol. Chem.* 275, 10767-10771, 2000
- 7) Abbracchio MP, Boeynaems JM, Barnard EA, Boyer JL, Kennedy C, Miras-Portugal MT, King BF, Gachet C, Jacobson KA, Weisman GA, and Burnstock G : *Trends Pharmacol. Sci.* 24, 52-55, 2003
- 8) Pintor J, Torres M, Castro E, and Miras-Portugal MT : *Br. J. Pharmacol.* 103, 1980-1984, 1991
- 9) Giaume C, and McCarthy KD : *Trends Neurosci.* 19, 319-325, 1996
- 10) Guthrie PB, Knappenberger J, Segal M, Bennett MV, Charles AC, and Kater SB : *J. Neurosci.* 19, 520-528, 1999
- 11) Franke H, Krugel U, and Illes P : *Glia* 28, 190-200, 1999
- 12) Abbracchio MP, Saffrey MJ, Hopker V, and Burnstock G : *Neuroscience* 59, 67-76, 1994
- 13) Neary JT, Kang Y, Bu Y, Yu E, Akong K, and Peters CM : *J. Neurosci.* 19, 4211-4220, 1999