

神経系細胞の増殖制御機構 Regulatory Mechanisms for Proliferation of Nervous System Cells

山下勝幸*、杉岡美保**

Masayuki YAMASHITA*, Miho SUGIOKA**

*奈良県立医科大学教授、**日本学術振興会特別研究員

* Professor, Nara Medical University, ** Research Fellow of the Japan Society for the
Promotion of Science

We studied the regulatory mechanism for the proliferation of neuroepithelial cells. Release of Ca^{2+} from intracellular Ca^{2+} stores (Ca^{2+} mobilization) is induced by P2 purinoceptors in neuroepithelial cells of the early embryonic chick retina. After the Ca^{2+} mobilization entry of extracellular Ca^{2+} (capacitative Ca^{2+} entry) also occurs in the embryonic retina. Both of the Ca^{2+} responses decline during development parallel with retinal progenitor cell proliferation. To investigate their potential role in the regulation of neuroepithelial cell proliferation, we studied the effects of antagonists of P2 purinoceptors and blockers of Ca^{2+} mobilization and capacitative Ca^{2+} entry on DNA synthesis in retinal organ cultures. These inhibitors reduced the DNA synthesis in a dose-dependent manner, suggesting that the P2 purinoceptor-induced Ca^{2+} mobilization and capacitative Ca^{2+} entry are involved in the regulation of DNA synthesis in the developing neural retina.

1. 研究目的

本研究は神経系細胞の増殖制御機構を細胞生理学的に明らかにすることを目的とする。脊椎動物の胚発生において、神経発生期では神経上皮細胞が盛んに分裂を繰り返すが、最終分裂を終えた神経芽細胞は神経細胞として分化を開始し、永久に増殖能を失う。

我々は発生初期の鶏胚網膜神経層において、Gタンパク共役型受容体的一种であるP2型ATP受容体の活性化により、細胞内カルシウムストアからカルシウムイオンが放出されること(カルシウム動員、 Ca^{2+} mobilization)を発見した。一

方、カルシウム動員により細胞内カルシウムストアが枯渇すると、細胞外からカルシウムイオンが流入する。このカルシウム流入は容量性カルシウム流入(capacitative Ca^{2+} entry)と呼ばれ、電位依存性カルシウムチャンネルの未発達な細胞では、重要なカルシウム流入経路であると考えられる。胚発生の段階を追ってカルシウム動員、及び、容量性カルシウム流入の変化を調べた結果、これらのカルシウム応答は神経上皮細胞の増殖期に特異的に生じることが明らかとなった[1]。このことから、カルシウム動員、及び、容量性カルシウム流入が神経

発生期において細胞増殖の制御に関与しているのではないかという発想に至った。細胞内カルシウムイオンは遺伝子の転写や細胞分裂の制御に重要な役割を担っていることが知られている。そこで、本研究では P2 型 ATP 受容体によるカルシウム動員、及び、容量性カルシウム流入が細胞増殖の制御に実際に関与しているかどうかを明らかにすることを目的とした。

増殖制御に関する分子レベルでの研究は酵母から動物細胞まで各種の細胞で行われているが、発生過程における神経細胞の増殖制御機構はほとんど未開拓の分野である。分裂せずに生存し続ける細胞として、神経細胞は極めて特殊な細胞であり、分化した神経細胞は何故分裂、増殖しないかという疑問を解くことは、生物学的、医学的に重要な課題であると思われる。

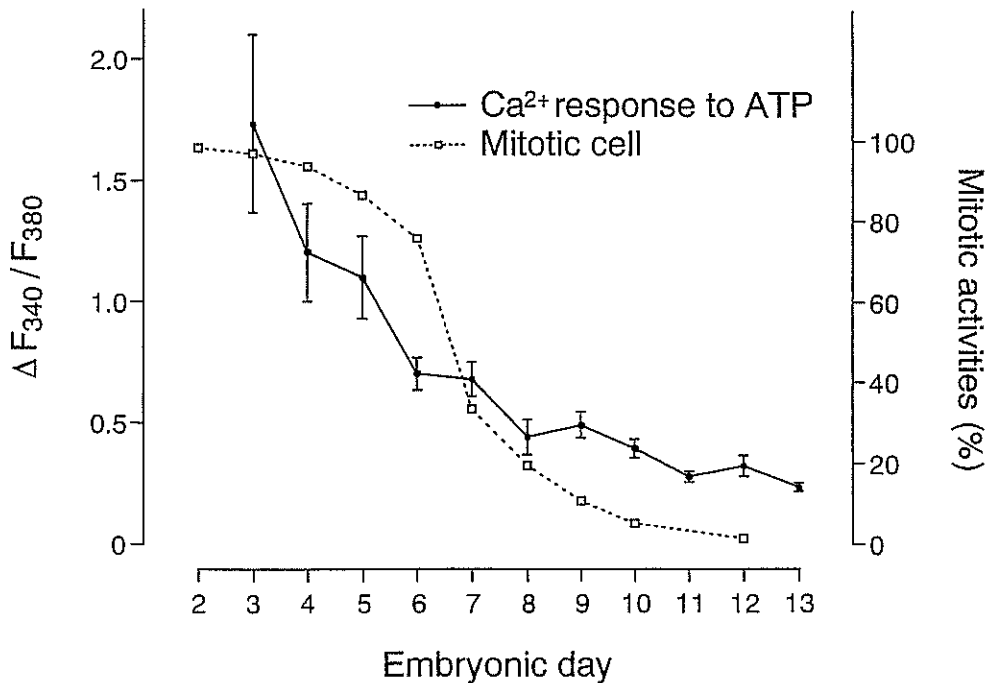


図1 鶏胚網膜神経層細胞での ATP (アデノシン三リン酸) 受容体によって生じる細胞内カルシウム濃度上昇、及び、鶏胚網膜神経層細胞の増殖活動の発生段階による変化。実線は、鶏胚網膜神経層細胞において ATP に対する細胞内カルシウム濃度上昇をカルシウム感受性蛍光色素で測定し、その変化 ($\Delta F_{340}/F_{380}$) を孵卵日数 (Embryonic day) 毎にプロットしたもの。破線は、鶏胚網膜神経層細胞のうち増殖中の細胞の割合を、DNA 合成時におけるトリチウムチミジンの取り込みを指標としてプロットしたもの。詳細については発表論文 1 参照。

Fig. 1. Developmental profile of the Ca²⁺ response to ATP in the neural retina of chick embryo from E3 to E13. Peak amplitudes of the increases in the fluorescence ratio ($\Delta F_{340}/F_{380}$) to 500 μ M ATP (filled circles) are plotted versus embryonic day of the retina tested. Each point indicates the averaged $\Delta F_{340}/F_{380}$ recorded from 4-13 retinae. Error bars indicate S.D. Open squares indicate mitotic activities of the retinal cells by calculating the whole number of the cells labeled with [³H]thymidine incorporation.

2. 研究経過

図1にATP受容体により生じるカルシウム応答、及び、発生初期鶏胚網膜神経層細胞の増殖活動の変化を示す。両者とも、孵卵3日目(embryonic day 3, E3)では高い活動を示すが、E8までに両者はほぼ平行して急激に低下することがわかる。この関係を踏まえて、ATP受容体の阻害、さらに、カルシウム動員、及び、容量性カルシウム流入の阻害が、網膜神経上皮細胞の増殖に抑制的に作用するかを定量的に明らかにすることを目的として実験を立案した。

3. 研究成果

E3の鶏胚から抽出した網膜神経層を無血清培養液中にて器官培養した。細胞増殖の定量的指標としては、トリチウムでラベルしたチミジンの取り込み量を測定した。P2型ATP受容体の阻害剤である、スラミン、及び、PPADSを培養液に添加した結果、濃度依存的にトリチウムチミジンの取り込み量が抑制された。逆に、ATPの添加によりチミジンの取り込み量は約2倍にまで増加した。次に、培養液中のATP濃度の変化を測定した。培養開始後、1時間、24時間、48時間の時間間隔で、微量の培養液を採取しガラスキューベット内に入れ、発光基質であるルシフェリン、及び、発光触媒酵素であるルシフェラーゼを添加した。その結果、培養開始後1時間で、培養液中のATP濃度が25倍に増加し、このレベルは少なくとも24時間は維持された。また、鶏卵中での発生過程と比較するために、羊水中のATP濃度を測定した結果、E3で3 μ Mであり、以後、急激に減少した。

これらの結果は、増殖中の網膜神経層において、ATPがP2型ATP受容体を介して増殖促進因子として作用することを示すのみならず、ATPがオートクライン/パラクライン的に組織中に放出されていることをも示唆するものである。

次に、細胞内カルシウムストアのカルシウムポンプの可逆的阻害剤であるDBHQ、及び、容量性カルシウム流入の阻害剤であるSK&F 96365を培養液に添加することにより、カルシウム動員、及び、容量性カルシウム流入が増殖の制御に関与しているかを調べた。E3鶏胚の網膜器官培養系、及び、E7、E9鶏胚網膜細胞の分散培養系において、これらの阻害剤は濃度依存的にトリチウムチミジンの取り込み量を抑制した。

以上の結果から、増殖期における鶏胚網膜神経層細胞においてATPの放出が実証され、放出されたATPがP2型ATP受容体-カルシウム動員系を介して増殖促進因子として作用することが示唆された[4]。さらに、網膜神経層細胞の増殖は容量性カルシウム流入によっても制御されていることが示された[5]。

4. 今後の課題と発展

今回の研究から、カルシウム動員、及び、容量性カルシウム流入が、神経上皮細胞の増殖制御に関与していることが明らかになった。神経上皮細胞が増殖している時は、細胞周期の進行に伴い、細胞体が上皮構造中を上下にエレベーター運動することが知られている。今後は、細胞周期のどの時期(G1, S, G2, M)において、カルシウム動員、及び、容量性カルシウム流入が生じるか、さらに、

細胞周期の進行に一致して神経上皮構造、即ち、網膜神経層のどの位置でカルシウム動員、及び、容量性カルシウム流入が生じるか、を明らかにする必要がある。

また、細胞が増殖する際は、成長因子受容体の活性化により MAP キナーゼカスケードが活性化されると考えられる。近年、Shc 等のアダプター分子を介して G タンパク共役型受容体から MAP キナーゼカスケードがトランスアクティブーションされるという知見が報告されており、細胞増殖の制御における G タンパク共役型受容体の役割が注目されつつある。神経細胞は神経上皮細胞の時期に最終分裂を終え、以後は増殖能を失う。神経発生期での G タンパク共役型受容体によるカルシウム動員は、神経上皮細胞の増殖期に特異的に起こり、増殖能の喪失とともに起こらなくなる。この点から G タンパク共役型受容体によるカルシウム動員系が、神経発生期における細胞増殖の制御系であると予想される。今後は、G タンパク共役型受容体によるカルシウム動員、及び、容量性カルシウム流入が、MAP キナーゼカスケードの活性化に対して、どのような細胞内情報伝達系を介しているかを解析する必要がある。

成体の中枢神経系において神経細胞が変性した後、生き残った神経細胞の増殖によって神経再生を促すことは現段階では不可能であるが、神経細胞が増殖能を失うメカニズムが解明されれば、この様な神経再生への道を拓くことができると期待される。

5. 発表論文リスト

- 1) Yamashita, M. and Sugioka, M. Calcium mobilization systems during neurogenesis. *News Physiol. Sci.* **13**: 75-79 (1998).
- 2) Ichikawa, J., Fukuda, Y. and Yamashita, M. In vitro changes in capacitative Ca^{2+} entry in neuroblastoma x glioma NG108-15 cells. *Neurosci. Lett.* **246**: 120-122 (1998).
- 3) 山下勝幸. ATP 受容体. *Clinical Neurosci.* **16**: 1331 (1998).
- 4) Sugioka, M., Zhou, W.-L., Hofmann, H.-D. and Yamashita, M. Involvement of P2 purinoceptors in the regulation of DNA synthesis in the neural retina of chick embryo. *Int. J. Dev. Neurosci.* **17**: 135-144 (1999).
- 5) Sugioka, M., Zhou, W.-L., Hofmann, H.-D. and Yamashita, M. Ca^{2+} mobilization and capacitative Ca^{2+} entry regulate DNA synthesis in cultured chick retinal neuroepithelial cells. *Int. J. Dev. Neurosci.* **17**: 163-172 (1999).
- 6) Zhou, W.-L., Sugioka, M. and Yamashita, M. Lysophosphatidic acid-induced Ca^{2+} mobilization in the neural retina of chick embryo. *J. Neurobiol.* (in press).
- 7) Zhou, W.-L., Sugioka, M., Sakaki, Y. and Yamashita, M. Regulation of capacitative Ca^{2+} entry by tyrosine phosphorylation in the neural retina of chick embryo. *Neurosci. Lett.* (in press).