

論文の内容の要旨

論文題目

ペプチドホルモン分泌を誘引する

細胞内シグナル伝達経路に関するイメージング解析

氏名 滝澤 舞

【背景・研究目的】

生物が個体として統合された行動をとるためには、外部から侵入してくる病原菌から内部環境を維持しつつ、内部環境のエネルギー収支を一定に保つシステムが必要不可欠である。このような生体恒常性維持機能は、中枢から末梢に至るまでの幅広い組織に分布する神経系と内分泌系の共同作用により達成されている。

中枢神経系の恒常性維持を担う重要な細胞として、グリア細胞の一種であるアストロサイトがある。アストロサイトは、神経伝達物質の回収や、神経細胞へのエネルギー供給、ペプチドホルモンの分泌、血液脳関門の形成などを介して、脳内の恒常性維持機構に寄与している。

一方で末梢に存在する内分泌系として最大の組織は消化管で、外部からの栄養素を感受し、消化・吸収作用、ホルモン分泌、そして免疫応答を通じて、体内のエネルギーバランスや体内免疫を維持する役割を担っている。消化管から分泌されるホルモンは、約 20 種類ほど存在すると考えられている。一方、消化管内分泌細胞には、12 種類があることが同定されている。つまり、1 種類の消化管内分泌細胞から、数種類の消化管ホルモンが分泌される場合もある。

近年、脳と消化管はホルモンや自律神経系を介して機能相関している、脳腸相関が重要であることが示唆されている。しかしながら、脳、特にアストロサイトや消化管内分泌細胞が、いつ、どのような刺激を受け、どのような細胞内シグナル経路を介して、互いの機能を調節しているのか、その詳細を明

らかにすることは、生体恒常性機能を理解する上で重要である。そこで本研究では、アストロサイトおよび小腸内分泌細胞から分泌されるペプチドホルモンの分泌制御機構を生細胞イメージング技術により解析し、その制御機構の分子機構を解明することを目的とした。

【研究1 アストロサイトからのペプチドホルモン分泌機構の解析】

アストロサイトは、神経伝達物質を受容し、その応答として、神経細胞と同様に、アミノ酸や ATP、ペプチドホルモンなどのグリア伝達物質と呼ばれる情報伝達物質を合成し、分泌することで、シナプス可塑性や神経活動を調節する。ペプチドホルモンである脳由来神経栄養因子（brain-derived neurotrophic factor: BDNF）と神経ペプチド Y（neuropeptide Y: NPY）は、神経発達や摂食制御など、脳機能に重要なペプチドホルモンであり、 Ca^{2+} 依存的にアストロサイトから分泌されることが報告されている。

アストロサイトでは、神経活動依存的または非依存的に Ca^{2+} シグナルが発生する。神経活動依存的な Ca^{2+} シグナル発生経路は、アストロサイトが神経伝達物質を受容し、G タンパク質共役型受容体（G-protein coupled receptors: GPCR）の活性化により細胞内 Ca^{2+} 濃度（ $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ）が上昇する。一方、神経活動非依存的な Ca^{2+} シグナル発生経路は、細胞膜上に存在する陽イオンチャネル transient receptor potential cation channel, subfamily A, member 1（TRPA1 チャネル）の開閉により自発的に $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇が引き起こされる。そこで、この自発的 Ca^{2+} シグナルと BDNF および NPY の分泌との関連について解析を行った。

Ca^{2+} 感受性色素 Fluo4 を用いて、ラット初代培養アストロサイトおよびラット神経膠腫細胞株 C6 細胞において、細胞内 Ca^{2+} 動態を可視化したところ、自発的な $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇が観察された。さらにこの自発的な $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇の回数は、細胞外 Ca^{2+} -free 溶液中で有意に抑制された。さらに、TRPA1 チャネル阻害剤によって減少し、TRPA1 チャネル作動薬によって増加した。これらのことから、自発的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇は TRPA1 チャネルの活性化によって細胞外から Ca^{2+} が流入することで惹起されることが示唆された。

続いて、この TRPA1 チャネルによる自発的な $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇によって、アストロサイトからペプチドホルモンの分泌が引き起こされるかを検討した。BDNF および NPY の分泌動態を可視化するため、緑色蛍光タンパク質 Venus に BDNF または NPY を融合した分泌マーカー、BDNF-Venus および NPY-Venus を作製した。BDNF-Venus および NPY-Venus をアストロサイトに遺伝子導入し、細胞膜近傍を特異的に可視化できる全反射蛍光顕微鏡を用いて観察した。その結果、BDNF-Venus および NPY-Venus が細胞内で蛍光輝点として観察され、薬理刺激を与えない条件下でも細胞外へ分泌される様子が捉えられた。そこで、TRPA1 チャネル阻害剤を投与したところ、NPY-Venus の分泌回数には影響しなかったのに対し、BDNF-Venus の分泌回数が有意に抑制された。また、TRPA1 チャネル作動薬を投与したところ、試薬投与前後での分泌回数比が BDNF-Venus では変化しなかったものの、NPY-Venus では有意に増加した。以上の結果から、TRPA1 チャネルを介した自発的な $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇によって BDNF および NPY の分泌が制御されることを見出した。さらに、BDNF および NPY の分泌がそれぞれ異なる分子メカニズムで

分泌されていることが示唆された。

【研究 2 L-グルタミン依存性 GLP-1 分泌におけるシグナル伝達経路の解析】

小腸内分泌 L 細胞 (L 細胞) は、消化管ホルモンの中でも特に血糖値制御に重要なペプチドホルモンであるグルカゴン様ペプチド-1 (glucagon-like peptide-1:GLP-1) を分泌する。GLP-1 は、膵 β 細胞に作用してグルコース濃度依存的なインスリン分泌を促進するだけでなく、迷走神経を介して中枢神経に作用し、食欲を抑制する。そのため、GLP-1 分解酵素の阻害剤や GLP-1 類似体は、低血糖のリスクを抑えながら血糖値制御が可能であり、糖尿病の治療薬として使用されている。近年の研究から、グルコースやアミノ酸、脂肪酸といった食餌由来の成分や、腸内細菌代謝産物が GLP-1 分泌を制御することが明らかになっている。マウス初代培養 L 細胞において、各種アミノ酸の中でも特に L-グルタミンが GLP-1 分泌促進効果をもつことが報告されている。また、その際、L 細胞の $[Ca^{2+}]_i$ および細胞内環状アデノシン一リン酸 (cyclic adenosine monophosphate: cAMP) 濃度 ($[cAMP]_i$) の両者が上昇することが明らかとなっていた。しかし、L-グルタミンがどのようなシグナル経路を介して Ca^{2+} および cAMP 動態を変化させるのか、その詳細なシグナル経路は未解明である。そこで本研究では、マウス小腸内分泌 L 細胞株 GLUTag 細胞を用いて、L-グルタミンが GLP-1 分泌を引き起こす際の、細胞内シグナル経路の解明を試みた。

GLUTag 細胞に様々なアミノ酸を投与し、 Ca^{2+} 感受性色素 Fluo3 および緑色蛍光タンパク質型 cAMP センサー Flamingo2 (fluorescent cAMP indicator 2) を用いて、 $[Ca^{2+}]_i$ および $[cAMP]_i$ の変化のイメージング解析を行った。すると、L-グルタミンを投与したときのみ、 $[Ca^{2+}]_i$ および $[cAMP]_i$ の両者が上昇した。 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇機構について、ナトリウム依存性グルタミン輸送体の関与を検討するため、細胞外 Na^+ 濃度の低い溶液中で L-グルタミンを投与したところ、L-グルタミンによる $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が抑制された。次に、GLUTag 細胞において、RT-PCR 法により L-グルタミンを受容するアミノ酸感受性 GPCR の発現を解析したところ、*Gprc6a* (G protein-coupled receptor class C group 6 member A)、*Casr* (Calcium-sensing receptor)、*Tas1r1* (Taste receptor type 1 member 1) と *Tas1r3* (Taste receptor type 1 member 3) の発現を mRNA レベルで見出した。TAS1R3 の阻害剤である lactisole を投与したところ、 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇には作用しなかったが、 $[cAMP]_i$ 上昇が抑制されたことから、L-グルタミンによる $[cAMP]_i$ 上昇には TAS1R3 が関与していると考えられた。しかし先行研究では、TAS1R3 は TAS1R1 とヘテロダイマーを形成しうまみ受容体 TAS1R1/3 として機能し、 G_{agust} (ガストデューション) と共役して $[cAMP]_i$ 低下させる、あるいは phospholipase C を介して $[Ca^{2+}]_i$ 上昇させると報告されており、cAMP を上昇させる経路は不明である。そこで、TAS1R1 と TAS1R3 の機能をさらに検討するため、ゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 を用いて、TAS1R1 または TAS1R3 の機能喪失変異 GLUTag 細胞を各 3 株ずつ樹立した。L-グルタミンを投与したところ、TAS1R1 変異細胞では、GLP-1 分泌、 $[Ca^{2+}]_i$ および $[cAMP]_i$ 上昇は、変異がないコントロール細胞と比較して差がなかった。しかし、TAS1R3 変異細胞では、L-グルタミン投与による GLP-1 分泌が

抑制され、また、3 株中 2 株で $[cAMP]_i$ 上昇が起こらなかった。以上の結果から、L-グルタミンによる GLP-1 分泌促進効果に、ナトリウム依存性グルタミン輸送体を介したシグナル経路によって $[Ca^{2+}]_i$ が上昇すること、そして、TAS1R3 の関与により $[cAMP]_i$ が上昇することが関与していることが示唆された。さらに、TAS1R3 は TAS1R1 とのヘテロダイマーだけではなく、TAS1R3 のホモダイマー、または TAS1R1 以外の GPCR とのヘテロダイマーとして機能し、 $[cAMP]_i$ 上昇を引き起こす可能性も示唆された。

【考察・結論】

本研究では、生体内で重要なホルモン分泌細胞である、アストロサイトと L 細胞のペプチドホルモン分泌制御機構を、生細胞イメージングにより解明することを目的とした。ホルモン分泌反応は、組織によって分泌を引き起こす誘因因子や受容体、分泌に至るシグナル経路がさまざまである。一方で、ペプチドホルモンを含有した有芯小胞が、最終的に Ca^{2+} および cAMP のシグナルを介して開口分泌に至るという分子機構は非常に類似している。本研究では、こうした背景を踏まえ、細胞イメージング技術を活かすことで、異なる細胞種においてホルモン分泌制御機構の解明に迫ることができた。

研究 1 の結果から、アストロサイトから BDNF および NPY が自発的に分泌されることにより、神経発達やシナプス活動に対して適切な脳内環境の維持に貢献していることが示唆された。今後は、有芯小胞に含有されるペプチドホルモンが、アストロサイトから自発的に分泌される生理的意義を明らかにするために、TRPA1 チャンネルの機能喪失による、アストロサイトおよび神経細胞の形態や機能への影響を解析することが必要である。研究 2 の結果から、今後 TAS1R3 の作用機序をさらに追及し、小腸にとって主要な栄養素である L-グルタミンによる GLP-1 分泌促進作用が明らかにすることは、血糖調節機構の解明だけではなく、食事による糖尿病治療への応用への貢献も期待できる。

本研究のように個々の細胞のホルモン分泌を制御する詳細なシグナル伝達経路の解析と、生体レベルでの生体維持機構の知見とを組み合わせることで、分子レベルでのホルモン分泌機構から生体における恒常性維持機構まで包括的な解析が可能になると期待する。