

氏名	三浦 ひとし
学位の種類	博士 (歯学)
学位授与番号	岩医大院歯博第284号
学位授与の日付	平成24年3月9日
学位論文題目	Role of Protease Activated Receptors in the Intracellular Calcium Dynamics of Neurons and Satellite Cells in the Rat Superior Cervical Ganglia (ラット上頸神経節中の神経細胞および衛星細胞の細胞内カルシウム変動に及ぼす PARs の役割)

論文内容の要旨

I 研究目的

Protease-activated receptor (PARs) は、特定のプロテアーゼによって活性化される G タンパク共役型 7 回膜貫通型受容体であり、4つのアイソタイプが存在する。これらの受容体は種々の機能制御に関与していると言われており、神経系においては炎症時の疼痛の情報伝達に関与すると考えられている。末梢神経系では、腸壁神経叢の神経細胞や脊髄後根神経節に PAR2 の発現が認められるものの、自律神経系における PAR2 の役割はまだよく分かっていない。本研究では、自律神経節であるラット上頸神経節 (superior cervical ganglia: SCG) を用いて、まだ明らかになっていない PARs の発現を調べ、更に体性神経系などに発現が認められている PAR2 に着目し、この受容体が $[Ca^{2+}]_i$ に及ぼす効果を、共焦点レーザー顕微鏡を使用して解析した。

II 研究方法

1. ラット (Wistar kyoto 8-12W) を CO_2 ガスにて屠殺し、SCG を摘出した。摘出標本を HEPES バッファー中で、純化コラゲナーゼ 300 U/ml と Ca^{2+} 感受性色素 Indo-1/AM 10 μ M 共存下で 37°C, 60 分消化した。その後、標本を細胞接着因子を用いてカバーガラスに固着し、リアルタイム共焦点レーザー顕微鏡 (Nikon RCM/Ab) にて $[Ca^{2+}]_i$ の画像解析を行った。
2. PARs の mRNA の発現について RT-PCR で確認した。

III 研究成績

1. RT-PCR により、SCG に PAR1, 2, 3 の mRNA の発現を認めた。
2. Ca^{2+} イメージングを行ったところ、PAR1, 3, 4 のアゴニストであるトロンビンと PAR2 のアゴニストであるトリプシンを含んだ液で灌流すると、一部のニューロンと多くの衛星細胞で $[Ca^{2+}]_i$ の律動的変動が認められた。神経細胞での反応が報告されている PAR2 に着目し、詳細を検討した。PAR2 の刺激ペプチドである PAR2-AP (SLIGRL-NH₂) を投与すると両細胞に $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を認めた。この反応は、まず神経細胞を取り巻く衛星細胞から始まり、引き続いて神経細胞に反応が見られた。複数の衛星細胞で反応の同期がしばしば観察された。両細胞とも反応パターンは急峰な上昇の初期相となだらかな下降相が区別された。細胞外 Ca^{2+} を除去あるいは Ca^{2+} チャネルブロッカーを用いても PAR2-AP あるいはトリプシン誘導性 $[Ca^{2+}]_i$ 変動は衛星細胞では抑制されなかったが、神経細胞ではかなり抑制された。従って、衛星細胞の PAR2 を介した $[Ca^{2+}]_i$ 変動は細胞内 Ca^{2+} 貯蔵場からの Ca^{2+} 動員が絶対的であるのに対し、神経細胞は SOCE などの Ca^{2+} 流入も大きな役割を演じていると思われた。U73122 (ホスホリパーゼ C 特異的阻害薬) による IP_3 産生の抑制や、ヘパリン (IP_3 受容体抑制薬) を使用すると、衛星細胞の反応は抑制されなかったが、神経細胞の反応はやや抑制された。

IV 考察及び結論

ラット SCG には PAR1, 2, 3 が存在していた。PAR2 刺激による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応は、細胞内ストアからの Ca^{2+} 放出によると考えられるが、衛星細胞の反応は、今までの報告にあるような IP_3 依存性の反応ではないことが示された。今後、さらに PAR2 の細胞内カルシウム動態に及ぼす影響を研究していく必要がある。

論文審査の結果の要旨

論文審査担当者

主査 教授 城 茂 治 (口腔外科学講座 歯科麻酔学分野)
副査 特任教授 藤 村 朗 (解剖学講座機能形態学分野)
副査 教授 佐 原 資 謹 (生理学講座 病態生理学分野)

Protease-activated receptor (PARs) のサブタイプである PAR2 は、神経系においては炎症時の疼痛の情報伝達に関与すると考えられているが、自律神経系における役割は不明な点が多い。本研究では、ラット上頸神経節 (superior cervical ganglia: SCG) を用いて、PARs の発現を調べ、更に体性神経系などに発現が認められている PAR2 に着目し、この受容体が $[Ca^{2+}]_i$ に及ぼす効果を、共焦点レーザー顕微鏡を使用して解析した。その結果、以下の知見を得た。

1. RT-PCR により、SCG に PAR1, 2, 3 の mRNA の発現を認めた。
2. Ca^{2+} イメージングを行ったところ、PAR1, 3, 4 のアゴニストであるトロンビンと PAR2 のアゴニストであるトリプシンで灌流すると、一部のニューロンと多くの衛星細胞で $[Ca^{2+}]_i$ で律動的変動が認められた。
3. PAR2 の刺激ペプチドである PAR2-AP (SLIGRL-NH₂) を投与すると両細胞に $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を認めた。
4. 細胞外 Ca^{2+} を除去あるいは Ca^{2+} チャネルブロッカーを用いても PAR2-AP あるいはトリプシン誘導性 $[Ca^{2+}]_i$ 変動は衛星細胞では抑制されなかったが、神経細胞ではかなり抑制された。
5. U73122 (ホスホリパーゼ C 特異的阻害薬) による IP_3 産生の抑制やヘパリン (IP_3 受容体抑制薬) で、衛星細胞の反応は抑制されなかったが、神経細胞の反応はやや抑制された。

以上の結果より、ラット SCG には PAR1, 2, 3 が存在していた。PAR2 刺激による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応は、細胞内ストアからの Ca^{2+} 放出によると考えられるが、衛星細胞の反応は、 IP_3 非依存性の反応であることが示された。しかし、本研究での PARs の活性化機序ならびに自律神経系での役割について十分解明するまでには至っておらず、今後の研究に期待する。

試験・試問の結果の要旨

本研究の目的、方法、結果など概要について本人から説明をうけ、PARs、上頸神経節細胞と衛星細胞、細胞内情報伝達機構に関連する基本的事項に関して質問を行った。また、本研究において問題となる点、今後の研究の展開ならびに試問を行ったところ、適切かつ十分な解答が得られたことから、学位に値する十分な学識と研究能力を有するものと認めた。