

論文の内容の要旨

論文題目 接着分子 CADM1 によって媒介される神経 - マスト細胞相互作用：細胞間接着力を規定する分子機構とその機能的意義の解析

氏名 萩山 満

マスト細胞は生理的に小腸や呼吸器粘膜、皮膚の真皮、硬膜、大脳を含む全身の様々な器官や組織に存在する。その分布は一見したところ無秩序であるが、注意深く観察するとマスト細胞は血管や神経周囲に好んで局在している。事実、そのいくつかは様々な器官の結合組織において、神経線維に近接して存在する。この神経とマスト細胞の近接した関係は神経免疫のメカニズムの機能的な単位として考えられ、免疫グロブリンスーパーファミリーに属する細胞間接着分子 cell adhesion molecule-1 (CADM1) のトランス・ホモフィリック結合によって媒介される。

本研究では、4つの CADM1 アイソフォーム (a-d) の選択的スプライシング・パターンがマウス大脳の発達に伴って顕著に変化する、つまり生後 14 日まで (発生期) では主に CADM1b と CADM1c を発現し、生後 14 日以降 (成熟期) ではそれに加えて、それまで発現が見られなかった CADM1d が発現することを見出した。個々の CADM1 アイソフォームが神経 - マスト細胞相互作用にどのように関係しているか調べるため、神経とマスト細胞の共生培養系を用いた。この共生培養系は神経とマスト細胞の解剖学的、機能的関係をあらわしたモデルとみなされている。内在性に CADM1c を発現する神経芽腫細胞株 Neuro2a 細胞に CADM1b (Neuro2a-CADM1b) あるいは CADM1d (Neuro2a-CADM1d) をそれぞれ外来性に発現させ、発生期あるいは成熟期における脳神経を模倣した細胞を複製した。Neuro2a、Neuro2a-CADM1b、Neuro2a-CADM1d 細胞から神経突起を伸長させ、内在性に CADM1c を発現するマウス骨髄由来マスト細胞 (bone marrow-derived mast cells; BMMCs) と外来性に CADM1c を発現させた BMMC 由来細胞株 IC-2 細胞 (IC-2^{CADM1c}) とそれぞれ共生培養した。

近赤外のフェムト秒レーザーパルスを顕微鏡下で培養液中に集光すると、熱や化学的変化を随伴せず、狙い定めた 1 細胞のみに衝撃力を負荷することが可能であるため、神経 - マスト細胞の接着力をフェムト秒レーザー誘導衝撃力によって定量した。神経突起に接着した BMMC を標的として無作為に選択し、標的 BMMC が神経突起から乖離するまで照射を漸近的に繰り返した。乖離した際のレーザー照射点と標的 BMMC までの距離 ($L_{\max \text{ to detach}}$) を測定した。 $L_{\max \text{ to detach}}$ のヒストグラムを最小 2 乗法によって正規分布に近似し、その平均値によって細胞間接着力を評価した。BMMCs は Neuro2a、Neuro2a-CADM1b 神経突起よりも強固に Neuro2a-CADM1d 神経突起に接着し、 $L_{\max \text{ to detach}}$ のヒストグラムをガウス分布に近似すると Neuro2a-CADM1d 細胞における $L_{\max \text{ to detach}}$ のヒストグラムが

二峰性を示すことを見出した。神経突起上の CADM1 アイソフォームの局在を調べるため、**green fluorescent protein (GFP)** を結合させて可視化すると、CADM1d は神経突起上でクラスターを成して分布することを明らかにした。また、CADM1 は細胞膜上で二量体を形成することでその機能を発揮するため、クロスリンク反応を行った。CADM1d クラスターにおいて、CADM1d はシス・ホモ二量体を形成しているのではないかと考えられた。CADM1d クラスターに接着した BMMCs と接着していない BMMCs の 2 つのグループに分けてフェムト秒レーザー照射アッセイに供したところ、CADM1d クラスターによって神経 - マスト細胞の接着力が有意に上昇することを明らかにした。

次に、3 タイプの細胞と IC-2^{CADM1c} 細胞 の共生培養系にそれぞれカルシウムイオン指示薬 **Fluo-8-AM** を入れた後、ヒスタミンによって Neuro2a 細胞を特異的に刺激し、細胞内カルシウムイオン濃度 (intracellular Ca^{2+} concentration; $[\text{Ca}^{2+}]_i$) の変化を観察した。神経活性後、神経突起に接着したいくつかの IC-2^{CADM1c} 細胞では $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇が見られた。神経活性に対するマスト細胞の応答率は Neuro2a、Neuro2a-CADM1b 細胞よりも Neuro2a-CADM1d 細胞の共生培養系で有意に高いことを見出した。また、神経突起上の CADM1d クラスターでは接着に依存した神経 - マスト細胞の刺激伝達の上昇が起こるのではないかと考えられた。CADM1d に **red fluorescent protein (RFP)** を結合させて可視化し、RFP シグナル陽性の神経突起に接着した IC-2^{CADM1c} 細胞を CADM1d クラスターに接着しているものと接着していないもの 2 つのグループに分けた。神経活性に対するマスト細胞の応答率は前者のグループほうが有意に高いことを明らかにした。さらに、神経活性に対してマスト細胞が応答することによって観察された $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇が実際にマスト細胞の機能とどのような関連があるか調べるため、神経突起に接着した IC-2^{CADM1c} 細胞の細胞内顆粒動態を観察した。共生培養系にキナクリンを添加し、細胞内顆粒を可視化した。その共生培養系にヒスタミンを添加したときのみ、神経突起に接着した IC-2^{CADM1c} 細胞内で、いくつかの細胞内顆粒が検出できなくなった。ヒスタミン添加後の細胞内顆粒の消失は Neuro2a 細胞よりも Neuro2a-CADM1d 細胞の共生培養系で多く観察された。神経に発現する CADM1d は神経 - マスト細胞の接着力を上昇させるだけでなく、マスト細胞の脱顆粒も促進させると考えられた。

以上の結果から、CADM1d は神経 - マスト細胞相互作用を強化する特異的なアイソフォームであることを明らかにし、脳が発達するにつれて CADM1d が発現してくる事実をもとに、脳成熟に随伴して神経 - マスト細胞相互作用が強化される可能性を示した。