

## [課程-2]

### 審査の結果の要旨

氏名 萩山 満

本研究はアトピー性皮膚炎、脱毛症、喘息、過敏性腸症候群といった多くの神経原性炎症の病態形成に関与すると考えられている神経 - マスト細胞相互作用の分子的背景を明らかにするため、神経 - マスト細胞の共生培養系を用いて、cell adhesion molecule-1 (CADM1) を介した神経 - マスト相互作用における接着力と機能的コミュニケーションの解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. CADM1 は細胞外の傍膜領域で選択的スプライシングを受け、少なくとも 4 つの膜貫通型アイソフォーム (a-d) をもつ。RT-PCR によって様々な週齢のマウス大脳における CADM1 mRNA 発現を調べたところ、マウス大脳において CADM1 の選択的スプライシングは発生時期特異的に制御されることを見出した。CADM1 スプライシング・パターンは生後 7 日と 14 日の間で顕著に変化していた、つまり生後 14 日まで (発生期) は、主なアイソフォームは CADM1b と CADM1c であったが、生後 14 日以降 (成熟期) はそれに加えて、それまでほとんど検出されなかった CADM1d の発現が見られた。
2. 海馬神経細胞を 2 週間初代培養し、RT-PCR によって各培養日数における CADM1 発現パターンを調べたところ、マウス大脳と同様に CADM1 のスプライシング・パターンが顕著に変化した。CADM1 スプライシングが single cell レベルで起こったと考えられ、海馬神経においても、CADM1d は複雑な神経ネットワークが構築してはじめて発現が見られた。
3. 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。野生型 C57BL/6J マウス骨髄由来培養マスト細胞 (BMMCs-WT) と *Cadm1* 欠損マウス骨髄由来培養マスト細胞 (BMMCs-CADM1<sup>-/-</sup>) をそれぞれ神経ネットワーク上に播種し、神経 - マスト細胞の接着力を比較したところ、BMMCs-WT は BMMCs-CADM1<sup>-/-</sup> よりも有意に接着力が強かった。神経 - マスト細胞の接着における CADM1 の重要な役割について再確認しただけでなく、フェムト秒レーザーによって生物学的環境を反映した細胞間接着力を測定することに成功した。
4. 神経 - マスト細胞の接着に対する CADM1 スプライシングの影響を調べるため、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作製した。この 3 タイプの細胞と BMMCs-WT の共生培養系を用いてフェムト秒レーザー誘導衝撃力によって両者の接着力を評価した。BMMCs-WT は Neuro2a、Neuro2a-CADM1b 神経突起よりも強固に

Neuro2a-CADM1d 神経突起に接着し、接着力のヒストグラムをガウス分布に近似すると Neuro2a-CADM1d 細胞のヒストグラムが二峰性を示すことを見出した。

5. 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したところ、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。
6. CADM1d が神経突起上でクラスターを成すため、Neuro2a-CADM1d 細胞のヒストグラムが二峰性を示したと考えられた。CADM1d クラスターに接着した **BMMCs-WT** と接着していない **BMMCs-WT** の 2 つのグループに分けてフェムト秒レーザー誘導衝撃力によって接着力を定量したところ、神経突起上に分布する 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。
7. 神経 - マスト細胞の刺激伝達に対する CADM1 スプライシングの影響を調べるため、細胞内カルシウムイオン濃度 (**intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration; [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>**) の変化を観察した。上記の 3 タイプの細胞と **IC-2<sup>CADM1c</sup>** 細胞の共生培養系を用いた。ヒスタミンによって Neuro2a 細胞を特異的に刺激したところ、神経突起に接着したいくつかの **IC-2<sup>CADM1c</sup>** 細胞では **[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>** 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。
8. 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<sup>CADM1c</sup>** 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。
9. 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 **[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>** 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<sup>CADM1c</sup>** 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<sup>CADM1c</sup>** 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、本論文は CADM1d が神経 - 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、

脳成熟に伴って神経 - マスト細胞相互作用が強化される可能性を示した。本研究によって、**CADM1** スプライシングが神経 - マスト細胞相互作用を制御する分子メカニズムのひとつである可能性を示し、神経原性炎症の病態形成の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。