

in vitro共存培養系を用いた感覚神経とマスト細胞の接着におけるN-cadherinの役割の研究

092A08 柴田 麻希

免疫細胞情報学講座

【目的】

神経系と免疫系の相互作用が生体内の恒常性の維持に深く関わっていると考えられている。なかでもマスト細胞は、皮膚などの様々な組織で神経線維の近傍に存在しており、神経系と密接に相互作用していると考えられてきた。免疫組織化学的手法により、マスト細胞が接着しているのは多くの場合、サブスタンスPやカルシトニン遺伝子関連ペプチドなどの神経ペプチドを含む感覚神経線維であることが分かってきている。

末梢神経の一つである感覚神経は、様々な組織からの情報を中枢神経に伝達する重要な役割を果たす一方で、外的因子などにより皮膚などが刺激されると軸索反射により神経ペプチドを放出する。放出された神経ペプチドは、マスト細胞の活性化を誘導して神経原性炎症反応を引き起こし、アトピー性皮膚炎、蕁麻疹などの炎症性疾患の一因になると考えられている。このように、感覚神経とマスト細胞は接着部位を介して直接相互作用していると考えられており、感覚神経とマスト細胞の相互作用の分子機構を解明することは非常に重要である。しかし、適切な研究手段の欠如からその分子機構はほとんど明らかになっていない。そこで本研究では、感覚神経である後根神経節初代培養細胞(DRG)とマスト細胞のin vitro共存培養系を用いて、神経シナプスの形成と維持に重要な役割を果たしている接着分子N-cadherinに着目し、両細胞の接着に対する関与を追究することを試みた。

【方法】

感覚神経には、生後3日以内のBALB/cマウスの新生児から単離したDRGを用いた。マスト細胞には8週齢のBALB/cマウスの骨髄細胞を5 ng/ml IL-3と1 ng/ml 幹細胞因子の存在下で3週間以上培養することによって分化させた骨髄由来マスト細胞(BMMC)を用いた。マトリゲルコートした培養ディッシュを用いて神経成長因子の存在下でDRGを培養した後、BMMCを添加し2日間共存培養を行い、両細胞間の接着や相互作用におけるN-cadherinの役割を追究した。

【結果及び考察】

まず、作製した共存培養系でDRGからマスト細胞へのシグナル伝達が起こっていることを確認するため、DRGを選択的に刺激するサソリ毒を加えて、両細胞のカルシウムイオン濃度変化を共焦点レーザー顕微鏡により測定した。その結果、刺激後にまず神経突起のカルシウムイオン濃度が上昇し、その後神経突起と接着しているBMMCのカルシウムイオン濃度が上昇した。また、神経突起と接着していないBMMCにはカルシウムイオン濃度の上昇が見られなかった。このことから、本研究で用いたDRGとマスト細胞の共存培養系において、接着部位を介したDRGからマスト細胞へのシグナル伝達が起こっていることが確認できた。

次に、DRGとマスト細胞の接着におけるN-cadherinの役割を追究した。まず、Western blottingにより両細胞におけるN-cadherinの発現を調べたところ、N-cadherinはDRGとBMMCの両者に発現していることが分かった。そこで、実際にDRGとBMMCの接着に対するN-cadherinの関与を調べた。培養2日目のDRGに 2×10^3 個のBMMCを添加し3時間共存培養した後、接着していない細胞を除去した。その後、神経突起とBMMCの接着率を1個のDRGあたりに接着しているBMMC数として算出したところ、接着率は 0.99 ± 0.36 であった。一方、N-cadherinに対する中和抗体(0.5 μ g/ml \sim 2 μ g/ml)存在下で共存培養したところ、接着率は中和抗体の濃度依存的に減少し、その効果は2 μ g/mlで飽和に達することが分かった。しかし、この抗体濃度においても両細胞が接着している様子(接着率 0.38 ± 0.10)が観察されたことから、N-cadherin以外の接着分子が両細胞の接着に関与していると考えられた。その候補としてDRGとBMMCともに発現しているCADM1が考えられた。そこで、N-cadherinに対する中和抗体とCADM1に対する中和抗体を同時に用いて接着率を求めたところ、接着率がさらに減少した。この結果から、DRGとBMMCの接着にはN-cadherinとCADM1が関与していると考えられた。

このことをさらに追究するため、まず免疫染色法によっ

てDRGとBMMCの接着部位におけるN-cadherinの分布を調べた。その結果、神経突起と接着していないBMMCでは細胞質全体にN-cadherinが観察されたのに対して、神経突起と接着しているBMMCでは細胞膜に分布しており、神経突起との接着部位に集積している様子が観察された。次に、二重免疫染色法によってN-cadherinとCADM1の共局在を調べたところ、CADM1はN-cadherinに比べてBMMC同士の接着部位に強く分布している様子が観察された。これらのことから、N-cadherinとCADM1はDRGとBMMCの接着に重要な役割を果たしていると考えられた。

本研究では、感覚神経とマスト細胞のin vitro共存培養系を用いることにより、両細胞の接着の分子機構の一端を明らかにすることができた。今後、これらの接着分子が両細胞の相互作用に及ぼす影響を明らかにすることができれば、炎症性疾患の新たな治療薬の開発の一助になると期待される。