

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19721

研究課題名(和文) 体温調節を担うヒト汗腺器官のコイル収縮部とその近傍の血管・神経の三次元的構造解析

研究課題名(英文) Analysis of three-dimensional structure of human sweat glands

研究代表者

倉田 隆一郎 (Kurata, Ryuichiro)

大阪大学・薬学研究科・招へい教員

研究者番号：50773115

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ホールマウント染色を施したヒト汗腺のコイル構造(分泌部と導管で構成)の3Dイメージングから、以下のことを見いだした。1)導管は分泌部に包含されるように3次元的にコイル構造を形成していた。2)導管は3次元的に単純に管が折れ曲がっているのに対し、分泌腺は管自体も立体的に捻れた構造を取っていた。3)分泌腺の基底層に同在し、紡錘状の細胞形態を示す筋上皮細胞は、分泌腺の管の捻れに沿って長軸方向に配向していた。4)汗腺に存在する神経線維は、導管でなく分泌腺のみに管を覆うように配向していた。以上の結果から、汗腺の発汗は筋上皮を取り巻くように配向する神経から筋上皮細胞が同調して収縮することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：A whole-mount staining method was employed to visualize three-dimensional structure of human sweat gland that is unbranched coiled tubule consisting mainly of secretory portion and duct. We found that i) ductal tubule was spatially embraced in secretory tubule; ii) ductal tubule was occasionally bent, while secretory tubule was frequently bent and formed a self-entangled coiled structure; iii) secretory portion was surrounded by myoepithelial cells longitudinally elongated along entangled secretory tubules; iv) nerve fibers wrapped around secretory tubules, but not ductal tubules. These results suggest that multiple myoepithelial cells of sweat gland synchronously contract their secretory portion following innervations.

研究分野：解剖学(含む組織学)

キーワード：汗腺 3次元構造解析 ホールマウント免疫染色法 発汗 収縮機構

1. 研究開始当初の背景

ヒト汗腺の発汗による体温調節は、他の動物では見られない唯一無二の機能である。この汗分泌機能が低下すると、熱中症等の重篤な症状を招く。そこで、低下した汗腺器官の分泌機能の改善を目指し、汗腺器官の恒常性維持に関わる汗腺幹細胞の活性化に焦点を当て、研究を開始した。これまでに我々は、ヒト汗腺の幹細胞が筋上皮細胞であることを示している。筋上皮細胞は、神経からの発汗刺激を受けて収縮し、汗(血管から供給)を皮膚表面へ排出する。そのため、汗腺の分泌不全の要因が筋上皮細胞(汗腺幹細胞)の収縮機能低下であると考え、発汗機能の改善に向けて、汗腺の収縮機構を解明することにした。汗腺の収縮機構を解明するためには、汗腺器官の詳細な解剖学的構造を理解する必要がある。これまで、汗腺の構造は組織学的手法によって明らかにされてきた。汗腺は分泌部と導管部で構成された1本の管状の外分泌腺で、分泌部で放出された汗が導管部を通過して皮膚表面に排出される。汗腺の末端の分泌部と一部の導管部は、糸くずが絡まるようにコイル状に複雑に折りたたまれ、このコイル領域に存在する汗腺分泌部の最外層を筋上皮細胞が取り囲み、発汗時に収縮するとされている。しかし、2次元組織切断面での所見に依存する組織学的手法では、発汗収縮を理解するための解剖学的情報を得ることに限界があった。このような複雑な器官の解剖学的情報を得るために、ホルマウント免疫染色による3次元的可視化技術が近年開発されている。乳腺(汗腺と同じ外分泌腺)もこの技術により、収縮を理解するための解剖学的情報が得られている。

2. 研究の目的

本研究ではホルマウント免疫染色を用いて汗腺器官を3次元的可視化し、発汗による収縮機構を理解する為に必要な汗腺の解剖学的情報を得ることにした。

3. 研究の方法

新鮮なヒト皮膚組織(倫理審査承認済み)から色素(Neutral red)で可視化した汗腺のコイル部分を実体顕微鏡下で採取し、グリセロールによる透明化処理を施した後、免疫染色を行い、汗腺の3次元観察を行った(図1)。まず、汗腺コイル領域における導管部と分泌部の立体構造と空間的配置を可視化するため、分泌部(Keratin 8)と導管部(S100A2)を識別するマーカーを用いて可視化し、コイル領域における分泌部と導管部の立体構造と空間的配置を解析した。続いて、解明したコイル構造を元に、血管(CD31)と神経(PGP9.5)がどのように配置されているか、3次元的可視化した。

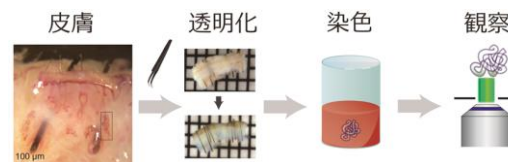


図1 汗腺の3次元構造解析

4. 研究成果

(1) 汗腺構成区画を識別する汗腺細胞マーカーの探索

汗腺コイル構造を正確に理解するために、コイルを構成する4つの汗腺区画を相互排他的に識別できるマーカーの探索を行った。汗管を構成する管腔細胞と基底層細胞を S100P と S100A2 で、分泌腺を構成する管腔細胞と筋上皮細胞を Keratin8 と α SMA でそれぞれ識別できることが確認された(図2)。さらに、これらマーカーとの共染色によって、コイルを構成する汗腺の4つの細胞区画をそれぞれ相互排他的に検出できることを確認した。このことから、引き続き汗腺コイルの詳細な3次元構造解析に、当該マーカーが非常に有用であることが示された。

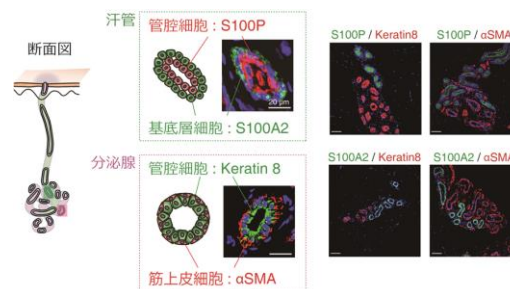


図2 汗腺構成区画を識別する汗腺細胞マーカーの探索

(2) 汗腺の3次元構造解析

汗腺の3次元構造を得るために、汗腺の透明化処理を検討した。透明化処理を施し、(1)で選定した汗腺細胞マーカー(Keratin8 と S100A2)を用いて、コイル領域を含めた汗腺3次元構造の全体像を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。汗管と分泌腺の3次元分布には規則性は観察されなかったが、管自体の立体構造に違いが観察された(図3)。汗管はコイル領域内でシンプルに折れ曲がっていたのに対し、分泌腺は管が折れ曲がっているだけでなく、管自体がタオルを絞った様なねじれた構造をとっていた。このような3次元解剖学的特長は、組織切片の様な2次元解析では明らかにすることができず、汗腺の3次元構造解析が汗腺コイル構造の詳細な解剖学的情報を理解するために有用であることが示された。

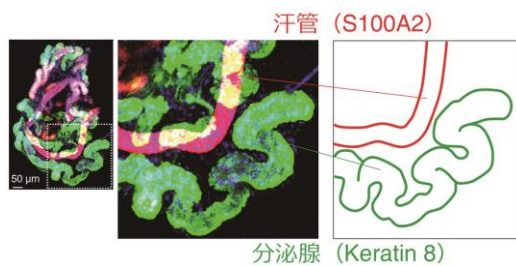


図 3 汗腺コイル領域における汗管と分泌腺の 3 次元構造解析

(3) コイル領域における単一細胞レベルでの 3 次元構造解析

(2)で観察された汗管と分泌腺の 3 次元構造の違いは、それらを構成している細胞の 3 次元的形状や配向性の違いに起因することが示唆されたため、単一細胞レベルの解像度で、汗腺のコイル構造の観察を試みた。汗管と分泌腺の基底層細胞である汗管基底層細胞と筋上皮細胞を S100A2 と α SMA によって単一細胞レベルでの観察を行ったところ、S100A2 陽性の汗管基底層細胞は立方状の形状を呈し、汗管に規則的に整列して配向していた(図 4)。一方、 α SMA 陽性の筋上皮細胞は、非常に伸張した紡錘状の形状を呈しており、分泌腺の長軸方向に沿って配向していた。特徴的な細胞の形状と配向性を示した筋上皮細胞について、より詳細な観察を行うため

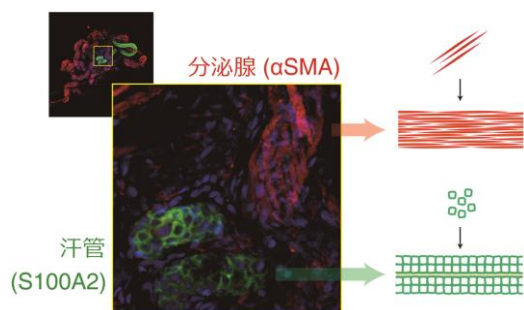


図 4 汗腺汗管および分泌腺の単一細胞レベルでの 3 次元構造解析

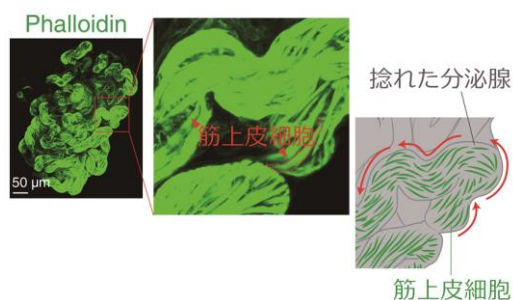


図 5 筋上皮細胞の 3 次元的形状と分泌腺における配向性

に、筋上皮細胞に多く存在するアクチンを可視化するため、アクチンに結合するファロイジンを用いて、筋上皮細胞の詳細な形状解析を行った。非常に興味深いことに、ファロイジンによって可視化された筋上皮細胞は、分泌腺の捻じれ方向に沿うように並行して長軸方向に配向していた(図 5)。これらの結果は、非常に長い汗腺の分泌腺を収縮させて汗を排出するために、分泌腺は 3 次元的に捻じれた構造を取り、さらにそれらを効果的に収縮させるために筋上皮細胞が分泌腺の捻じれ方向に沿って配向していることが示唆された。

(4) 神経の汗腺における 3 次元的配置

汗腺の発汗収縮は神経によって支配しているため、汗腺に存在する神経の 3 次元的解析を行った。PGP9.5 を用いて末梢神経を可視化したところ、神経は汗腺の管を取り囲むように配置していた(図 6)。可視化された神経の 3 次元的配置から、コイルを構成している管の中でも神経が取り巻いている管と、全く取り巻いていない管が観察された。 α SMA を用いて筋上皮細胞と神経の共染色を行ったところ、神経は α SMA 陽性の筋上皮細胞のみに取り巻いていた。これらの結果から、汗腺の分泌腺に配向している複数の筋上皮細胞を同調させて分泌腺を収縮させるために、神経が複数の筋上皮細胞を取り囲む様に 3 次元的に配置していることが示唆された。

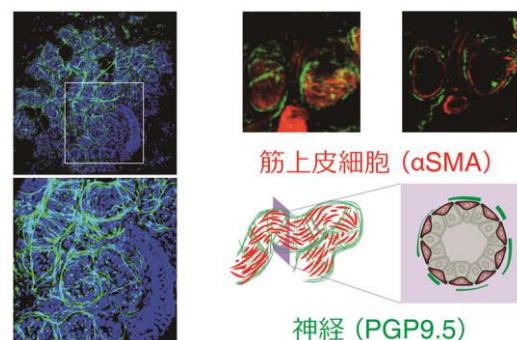


図 6 神経の汗腺における 3 次元的配置

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Kurata R, Sekiguchi K. Sweat gland stem cells in gland homeostasis and regeneration., H&PC Today、査読有、11 巻、2016、39-43 (2016)
- ② Kurata R, Futaki S, Nakano I, Fujita F, Tanemura A, Murota H, Katayama I, Okada

F, Sekiguchi K. Three-dimensional cell shapes and arrangements in human sweat glands as revealed by whole-mount immunostaining. PLoS One、査読有、21、e0178709

[学会発表] (計 12 件)

- ① 倉田隆一郎、藤田郁尚、岡田文裕、二木杉子、中野伊津子、種村篤、室田浩之、片山一郎、関口清俊 ヒト汗腺器官のコイル収縮部とその近傍の血管・神経の三次元的構造解析 第 24 回日本発汗総会(大阪) 2016 年 8 月 27 日～28 日
- ② 中島輝恵、倉田隆一郎、藤田郁尚、岡田文裕、種村篤、室田浩之、片山一郎、関口清俊 蛍光ライブセルイメージングを用いたヒト汗腺の動態観察 第 24 回日本発汗総会(大阪) 2016 年 8 月 27 日～28 日
- ③ 関口清俊 汗腺における筋上皮細胞の研究：汗腺幹細胞の同定から三次元イメージングまで 第 24 回日本発汗総会(大阪) 2016 年 8 月 27 日～28 日
- ④ Kurata R, Fujita F, Futaki S, Nakano I, Tanemura A, Murota H, Katayama I, Sekiguchi K. Development of a human three-dimensional sweat gland model to assess sweating IFSCC 2016 Congress (アメリカ) 2016 年 10 月 30 日～11 月 2 日
- ⑤ Kurata R, Fujita F, Futaki S, Nakano I, Tanemura A, Murota H, Katayama I, Sekiguchi K. Three-dimensional structural anatomy and sweat gland stem cells in human sweat glands The 27th CDB Meeting (神戸) 2016 年 11 月 14 日～15 日
- ⑥ Nakashima K, Kurata R, Fujita F, Futaki S, Nakano I, Tanemura A, Murota H, Katayama I, Sekiguchi K. Visualizing the contraction of human eccrine sweat glands ex vivo The 27th CDB Meeting (神戸) 2016 年 11 月 14 日～15 日
- ⑦ 倉田隆一郎、藤田郁尚、岡田文裕、二木杉子、中野伊津子、種村篤、室田浩之、片山一郎、関口清俊 発汗機能評価のための 3 次元汗腺モデルの構築 第 79 回 SCCJ 研究討論会(東京) 2016 年 11 月 29 日～30 日
- ⑧ Kurata R, Futaki S, Nakano I, Fujita F, Tanemura A, Murota H, Katayama I, Okada F, Sekiguchi K. Three-dimensional cell

shapes and arrangements in human sweat glands at single cell resolution 2017 Gordon Research Conference(イタリア) 2017 年 5 月 7 日～12 日

- ⑨ 石塚周太、森俊裕、倉田隆一郎 ヒト皮脂腺器官を用いた三次元的な皮脂腺細胞の系譜追跡法の開発 第 116 回日本皮膚科学会総会(仙台) 2017 年 6 月 2 日～4 日
- ⑩ 関口清俊 細胞外マトリックスと幹細胞ニッチ：生化学者の汗腺研究事始め 第 4 回汗と皮膚疾患の研究会 (連携研究者)
- ⑪ Ishizuka S, Kurata R, Mori T, Okada F. The establishment of a procedure for three-dimensional visualization of sebum production in human sebaceous glands. IFSCC 2017 Conference(韓国) 2017 年 10 月 23 日～25 日
- ⑫ Mori T, Ishizuka S, Kurata R, Yamaguchi K, Sakuyama S, Tokudome Y. Control of changes in skin conditions caused by hormonal balance. IFSCC 2017 Conference(韓国) 2017 年 10 月 23 日～25 日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 5 件)

名称：汗腺の動態の観察方法
発明者：中島輝恵、倉田隆一郎、藤田郁尚、関口清俊、種村篤、室田浩之、片山一郎
権利者：同上
種類：特許
番号：特願 2016-141740
出願年月日：2016 年 7 月 19 日
国内外の別：国外

名称：抗白髪剤
発明者：井口顕策、倉田隆一郎、原真也、石塚周太
権利者：同上
種類：特許
番号：特願 2017-61437
出願年月日：2017 年 3 月 27 日
国内外の別：国内

名称：皮脂腺の観察方法
発明者：石塚周太、倉田隆一郎
権利者：同上
種類：特許
番号：特願 2017-83741
出願年月日：2017 年 4 月 20 日
国内外の別：国外

名称：不死化汗腺筋上皮細胞およびその製造方法

発明者：早川智久、倉田隆一郎、藤田郁尚、岡田文裕、関口清俊

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2017-154503

出願年月日：2017年8月9日

国内外の別：国外

名称：制汗剤

発明者：中島輝恵、倉田隆一郎、藤田郁尚、岡田文裕、

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2018-062833

出願年月日：2018年3月28日

国内外の別：国外

〔その他〕

ホームページ等

① ヒトの汗腺幹細胞を発見し、生体外での汗腺様構造体の再生に成功

<https://www.mandom.co.jp/release/2016/src/2016102701.pdf>

② 体温調節を担う汗腺の三次元構造の可視化に成功

<https://www.mandom.co.jp/release/2017/src/2017062101.pdf>

http://resou.osaka-u.ac.jp/ja/research/2017/20170622_3

③ 科学新聞「ヒト汗腺の三次元構造を可視化」

日本経済新聞「阪大とマンダム、体温調節を担う汗腺の三次元構造の可視化に成功」

https://www.nikkei.com/article/DGXLSP448724_R20C17A6000000/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

倉田 隆一郎 (KURATA, Ryuichiro)

大阪大学薬学研究科・招へい教員

研究者番号：50773115

(2) 連携研究者

関口 清俊 (SEKIGUCHI Kiyotoshi)

大阪大学蛋白質研究所・寄附研究部門教授

研究者番号：50187845

室田 浩之 (MUROTA, Hiroyuki)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：90363499