

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 14 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590247

研究課題名(和文) 終末シュワン細胞極性発達過程の機能形態解析 特にカベオラと線毛について

研究課題名(英文) Functional and morphological analyses of the cell polarity in developing terminal Schwann cells with special reference to caveolae and primary cilia.

研究代表者

岩永 ひろみ (TAKAHASHI-IWANAGA, Hiromi)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30193759

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：皮膚感覚装置の終末シュワン細胞は丸い細胞体から突起を一本出した単極形で、その先が分かかれグリア薄板となる。幼若ラット頬ひげ毛包の槍型感覚終末単極形シュワン細胞と周辺の星形シュワン様細胞、両者の中間形の極性変化をカベオラと一次線毛に注目し免疫染色と電顕で比較した。また、細胞外ATPで誘発されるCa信号を共焦点顕微鏡解析した。星形シュワン様細胞では毛包基底膜に面した核中央の窪みから線毛がのび、線毛周囲膜ポケットにカベオラが多数開き、刺激誘発性信号は細胞体に始まるのに対し、中間形単極形シュワン細胞では痕跡的な線毛が突起基部にみられ、カベオラはグリア薄板に集まって、Ca応答は各薄板が細胞体に先行した。

研究成果の概要(英文)：The unipolar, terminal Schwann cells in the cutaneous sensory devices have a round body and a long process, with the latter branching into glial lamellae. These cells, stellate Schwann-like cells and morphological intermediates between them were examined by immunohistochemistry and electron microscopy of vibrissal lanceolate sensory endings in young rats with special reference to the caveolae and the primary cilium that govern the cell polarity. Purinergically-evoked Ca signals were analyzed in the cells by confocal microscopy. Primary cilia of the stellate cells projected from a central concavity of the nucleus facing the follicular basement membrane, with many caveolae opening into the ciliary pocket. Evoked signals originated from the main body of the cells. Only rudimentary primary cilia occurred at the base of the main process in the intermediate and the unipolar cells, with caveolae accumulated in the lamellae. Ca responses were initiated at individual lamellae in these cells.

研究分野：細胞生物学

キーワード：感覚神経終末 終末シュワン細胞 シュワン前駆細胞 カベオラ 一次線毛 カルシウム画像 アデノシン5'三リン酸

1. 研究開始当初の背景

普遍的細胞小器官であるカベオラと一次線毛(単一線毛)は、種々の受容体分子を集める機能区域として細胞極性・細胞の移動を統御するといわれる(文献)。皮膚・結合組織感覚装置のグリアである終末シュワン細胞は、丸い細胞体から突起を一本のばした特異な単極形を呈し、突起の先が分かれて感覚線維の無髄軸索終末を包む薄板をなす。こうした感覚終末周辺にはグリアマーカー陽性の星形細胞が散在しており、神経終末の発達・再生過程で新たな終末シュワン細胞の供給源となる可能性が指摘されている(文献)。終末シュワン細胞は多数のカベオラをもつことが以前から知られるが、細胞発達段階でのカベオラの細胞内分布変化は明らかでない。また、髄鞘形成過程でシュワン細胞の線毛が重要な役割を果たすとの報告があるが(文献),髄鞘をつくらぬ終末シュワン細胞における線毛の意義は未知である。

私たちはこれまでに、ラット頬ひげの動きセンサー毛包周囲槍型終末に随伴する典型的単極形シュワン細胞の形態をグリアマーカーS100β蛋白の免疫組織化学と電顕観察によって報告し(文献),その軸索終末を包む各シュワン薄板に細胞間信号物質アデノシン三燐酸(ATP)受容体 P2Y₂ がカベオラとともに集積して、局所刺激に応じ独自の Ca 信号を生成する細胞内区域を構成することを分離組織標本の実験で明らかにした(文献)。幼若ラット槍型終末の分離組織標本は、S100β免疫染色でみると突起を放射した星形シュワン様細胞やそれらと単極形シュワン細胞との中間形を多数含み、この細胞の極性発達過程の機能・形態解析に好適な材料を提供している。

2. 研究の目的

皮膚感覚装置をつくる終末シュワン細胞の極性発現過程を、特にカベオラと一次線毛の形態特徴、それらが細胞信号の時空特性に及ぼす影響に注目して追跡し、感覚装置の形態形成・維持のしくみを明らかにする目的で、以下のことを行った。

(1) ラット頬ひげ毛包周囲槍型終末周辺にみられる単極形シュワン細胞、星形シュワン様細胞および両者の中間形について、線毛の消長、軸索終末との局所解剖学的関係の変化を各種マーカー物質の免疫染色と遺伝子改変ラットの S100β-EGFP 蛍光観察を組み合わせる解析する。

(2) 発達段階のシュワン細胞の形態を特に線毛とカベオラに注目し、電顕観察する。

(3) 通常ラットまたは遺伝子改変ラット(S100β-EGFP)の分離組織標本で星形シュワン様細胞の細胞外 ATP 刺激に対する Ca 応答の有無とその責任受容体を生理・薬理的に調べるとともに、応答の時空特徴と線毛・カベオラとの関連を検討する。

3. 研究の方法

生後4週令 Wistar ラットまたは Wistar-Kyoto 系 S100β-EGFP トランスジェニック(Tg)ラットの頬ひげ毛包周囲槍型神経終末を観察対象とした。通常組織標本の観察では、動物をペントバルビタール(40 mg/kg 体重)の腹腔注射で麻酔し経心灌流固定した。固定液として、光顕免疫組織化学に 4%パラホルムアルデヒド、透過電顕に 2.5%グルタルアルデヒドを用いた。分離組織標本の実験では、ラットを頸椎脱臼と心臓からの瀉血で屠殺し、直ちに頬ひげ毛包を含む皮膚組織を取り出して材料とした。

(1) S100β 陽性細胞の免疫組織化学

パラホルムアルデヒド固定標本から厚切り凍結浮遊切片を作成し、Wistar ラットの場合はグリアマーカーS100β蛋白の免疫染色を蛍光抗体法間接法で行い、Tg ラットの場合は S100β 発現細胞の EGFP 緑色蛍光をそのまま、共焦点顕微鏡の立体再構築によって観察した。さらに、これらの観察法とニューロン軸索マーカー PGP9.5 蛋白、または線毛マーカー アセチル化 tubulin の免疫染色を組み合わせた蛍光二重染色を行い、共焦点顕微鏡の観察標本とした。

(2) 分離組織標本の超解像顕微鏡観察

Wistar ラットの未固定皮膚組織を培養液に移し、実体顕微鏡下の微小解剖とコラゲナーゼ消化を組み合わせたりやり方で槍型終末を含む毛包周囲結合組織を生きたまま膜片として分離し、観察チャンパー底に毛包基底膜側が下になるようにして貼り付けて分離組織標本とした(図1)。この標本を 4%パラホルムアルデヒドで固定し、S100β とアセチル化 tubulin の二重免疫染色を上記と同様のやり方で行い、共焦点顕微鏡の立体再構築によって各成熟段階のシュワン細胞の存在を確認した後、それらの細胞体付近を超解像顕微鏡の強拡大で観察した。

(3) 各成熟段階シュワン細胞の透過電顕

グルタルアルデヒド固定した頬ひげ毛包上半部を周囲組織とともに 1%OsO₄ で後固定し、常法に従って Epon-812 に包埋し超薄切片をダイヤモンドナイフで作成してタンニン酸-酢酸ウラニル-クエン酸鉛三重染色を施して観察標本とした。

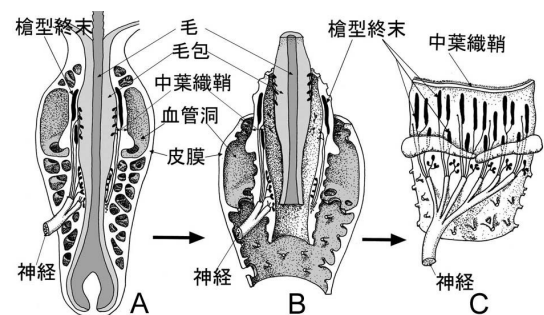


図1. 頬ひげ槍型終末分離標本の作成過程

(4) 分離組織標本の Ca 画像解析

上記方法(2)と同様にして分離組織標本を作成し、蛍光性 Ca²⁺指示薬として Wistar ラットの場合は fluo-4 (緑色蛍光)を Tg ラットの場合は Xrhod-1 (赤色蛍光)を負荷して倒立型共焦点顕微鏡のステージに置き、チャンパー灌流液に ATP またはその類似物質を加えたときの細胞応答を蛍光画像として記録した。

4. 研究成果

(1) S100 β 陽性細胞の免疫組織化学

Wistar ラット S100 β 免疫染色でも Tg ラット S100 β -EGFP 蛍光観察でも、槍型終末周辺に星形シュワン様細胞、中間形細胞、単極形シュワン細胞の細胞体と突起が強く蛍光標識され、2 系統のラットでの観察結果はよく一致した(図 2)。

さらに、神経軸索マーカー PGP9.5 または線毛マーカーアセチル化 tubulin の免疫染色を組み合わせた二重蛍光染色で観察したところ、星形シュワン様細胞は、丸い細胞体から細い突起を 5—10 本放射し、その多くは結合組織内に自由端で終わり、一部は有髄線維の表面に沿ってのびていたが、軸索に直接接触する突起はみられなかった。星形シュワン様細胞の核は、毛包基底膜に対向する面の中央が窪み、そこから一次線毛がのびていた。

中間形細胞は、細胞体の槍型終末寄り半球から 3—5 本の突起をのばし、残りの半球に核を偏在させていた。突起の少なくとも一部は槍型終末に接触し、多くの場合薄板状に広がって軸索終末を被った。しばしば、1—2 μ m の比較的短い線毛が、突起の集まる細胞半球の中央に認められた。

単極形シュワン細胞は、丸い細胞体の一極から 1, 2 本の太い索状突起をのばし、その先が分かれて軸索終末のグリア鞘をなした。腎形の核が突起の対極に偏在した。まれに、短い線毛が突起基部に認められた。

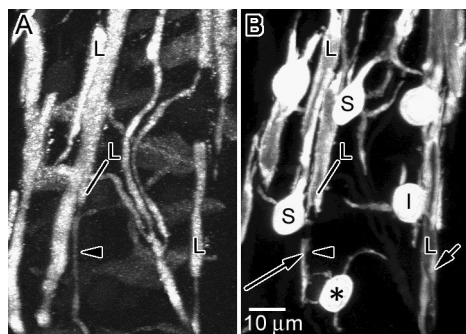


図 2 . Tg (S100 β -EGFP)ラット頬ひげ毛包周囲組織凍結切片にみられた槍型終末 A は PGP9.5 免疫染色, B は対応する領域の EGFP 蛍光像を共焦点顕微鏡の立体再構築で示す. L 槍型終末, S 単極形シュワン細胞, I 中間形細胞. 星形シュワン様細胞 (*)の突起 (矢印) が槍型終末をつくる有髄線維 (矢尻) に沿ってのびる.

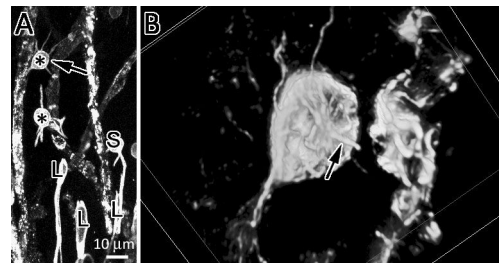


図 3 A . 分離組織標本 S100 免疫染色(共焦点顕微鏡立体再構築) L 槍型終末, S 単極形シュワン細胞, * 星形シュワン様細胞. B. A の矢印の細胞のアセチル化 tubulin 免疫染色(超解像顕微鏡)線毛が毛包基底膜側にのび出る(矢印).

(2) 線毛の超解像顕微鏡観察

分離組織標本で観察された星形シュワン様細胞、中間形、単極形シュワン細胞の形態特徴は組織切片での観察によく一致した。星形シュワン様細胞の一次線毛は長さ 2—3 μ m で、核中央の窪みから毛包基底膜に向かってのび出ていた(図 3)。

(3) 星形シュワン様細胞の透過電顕

星形シュワン様細胞は、頬ひげ毛包基底膜直下の疎性結合組織にみられ、細胞表面にカベオラが散在し、基板に包まれる点で単極形シュワン細胞に似ていた。しかし、前者の突起は後者に比べて細く、結合組織内で自由端に終わることが連続超薄切片の観察で確認された(図 4)。

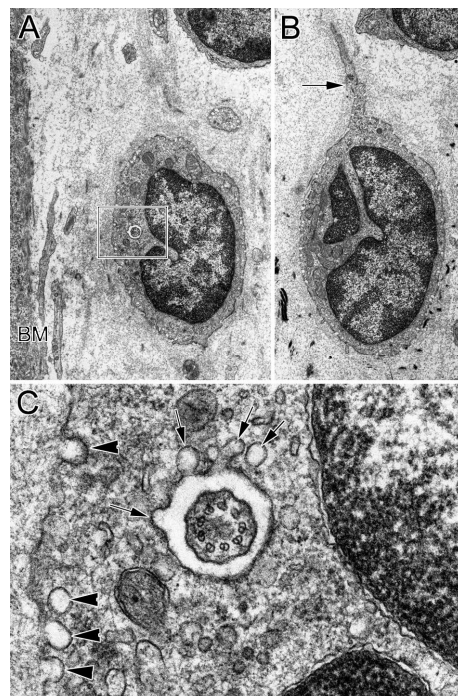


図 4 . 星形シュワン様細胞の透過電顕像 A, B は同じ細胞の異なる断面. 細胞突起が毛包基底膜(BM)直下の結合組織内で自由端に終わる(矢印). C は A の四角の強拡大. 細胞表面のカベオラ(矢尻)の他、線毛周囲細胞膜ポケットに多数のカベオラが開く(矢印).

星形シュワン様細胞の核は丸い細胞体の大部分を占め、毛包基底膜に面した側の中央の窪みに比較的発達したゴルジ装置が配置されていた。ここから毛包に向かい一次線毛がのびていた。一次線毛の近位部を囲む細胞膜ポケットにカベオラが特に集まって観察された。

(4) 分離組織標本の Ca 画像解析

単極形シュワン細胞と同様に、星形シュワン様細胞は 10 - 20 μM の細胞外 ATP 刺激に対し、一過性の細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を示した。単極形シュワン細胞の Ca 応答は軸索終末を包む薄板突起に始まり、細胞体の応答がそれに 2 - 3 秒遅れて続くのに対し、星形シュワン様細胞では細胞体の応答が先行した。細胞体のどこから Ca^{2+} 濃度上昇が始まるかは、測定系の限界のため明らかにできなかった。星形シュワン様細胞 Ca 信号に対し、ATP と UTP が同等の誘発効果を示し、P2X 受容体拮抗剤 α, β -methylene ATP は無効であったので、細胞応答の責任受容体は単極形シュワン細胞の場合と同じ P2Y₂ 受容体であることが強く示唆された (図 5)。

(5) 結果のまとめと考察

星形シュワン様細胞の毛包基底膜との対向面にみられる一次線毛が、中間形細胞では槍型軸索終末を包む細胞突起基部に移動することから、終末シュワン細胞成熟過程で、細胞極性の決定機構が毛包組織構築依存性から軸索との細胞間接触依存性へと切り替わると考えられる。後者に関わる細胞接着分子、液性因子の探索は今後の研究課題であろう。

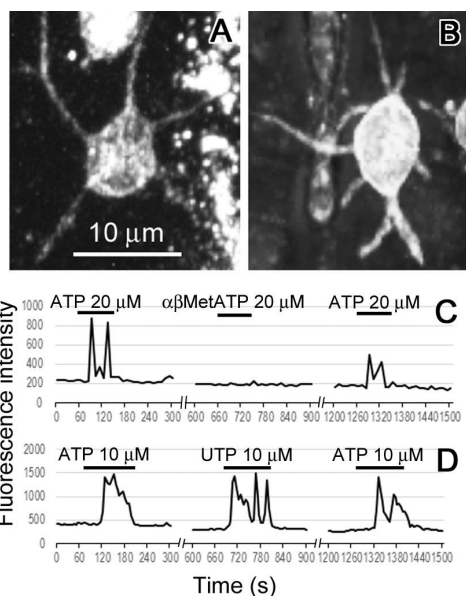


図 5 . 生理実験後の分離組織標本を S100 免疫染色して同定された星形シュワン様細胞 A, B の細胞外 ATP とその類似物質に対する Ca 応答の時間経過を fluo-4 の蛍光強度を指標とし、それぞれ C, D に示す。

また、星形シュワン様細胞の線毛周囲細胞膜ポケットへのカベオラ集積と、細胞外 ATP で賦活される Ca 信号生成が突起ではなく細胞体に始まる事実は、線毛とカベオラが機能複合体として細胞信号の時空調節に貢献する可能性を示唆する。信号系分子の詳しい細胞内局在と細胞内信号の時空特徴のより高分解能での解析が必要である。

<引用文献>

Grande-Garcia A, del Pozo MA: Caveolin-1 in cell polarization and directional migration. *Eur J Cell Biol* 87: 641—647 (2008)

Christensen ST et al.: The primary cilium coordinates signaling pathways in cell cycle control and migration during development and tissue repair. *Curr Top Dev Biol* 85:261—301 (2008)

Imai T et al.: Regeneration of periodontal Ruffini endings of rat incisors following nerve cross-anastomosis with mental nerve. *Brain Res* 992: 20—29 (2003)

Yoshimura K, Takeda S: Hedgehog signaling regulates myelination in the peripheral nervous system through primary cilia. *Differentiation* 83: S78—85 (2012)

Takahashi-Iwanaga H: Three-dimensional microanatomy of longitudinal lanceolate endings in rat vibrissae. *J Comp Neurol* 426: 259—269 (2000)

Takahashi-Iwanaga H, Nio-Kobayashi J, Habara Y, Furuya K: A dual system of intercellular calcium signaling in glial nets associated with lanceolate sensory endings in rat vibrissae. *J Comp Neurol* 510: 68—78 (2008)

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 5 件)

Konno K, Takahashi-Iwanaga H, Uchigashima M, Miyasaka K, Funakoshi A, Watanabe M, Iwanaga T: Cellular and subcellular localization of cholecystokinin (CCK)-1 receptors in the pancreas, gallbladder, and stomach of mice. *Histochem Cell Biol* 143: 301—312 (2015) 査読有

Zheng M, Kimura S, Nio-Kobayashi J, Takahashi-Iwanaga H, Iwanaga T: Three types of macrophagic cells in the mesentery of mice with special reference to LYVE-1-immunoreactive cells. *Biomed Res* 35: 37—45 (2014) 査読有

Takahashi-Iwanaga H: The three-dimensional microanatomy of the pancreatic duct system in the Japanese monkey, *Macaca fuscata*, with special reference to fine proximal passages of a high species-specificity. *Biomed Res* 34:

51—60 (2013) 査読有

Sato-Miyaoka M, Hisatsune C, Ebisui E, Ogawa N, Takahashi-Iwanaga H, Mikoshiba K: Regulation of hair shedding by the type 3 IP3 receptor. J Invest Dermatol 132: 2137—2147 (2012) 査読有

Takahashi-Iwanaga H, Iwanaga T: Accumulated caveolae constitute subcellular compartments for glial calcium signaling in lanceolate sensory endings innervating rat vibrissae. J Comp Neurol 520: 2053—2066 (2012) 査読有

〔学会発表〕(計 2件)

岩永ひろみ, 今野幸太郎, 岩永敏彦: マウス腎より分離した近位尿細管における CCK 受容体の機能発現. 第 119 回日本解剖学会全国学術集会, 2014 年 3 月 29 日, 栃木県下野市, 自治医科大学

岩永ひろみ, 岩永敏彦: ラット頬ひげ槍型知覚終末周辺にみられる星型シュワン様細胞の形態変化とくに線毛と極性について. 第 118 回日本解剖学会全国学術集会, 2013 年 3 月 28 日, 高松市, サンポートホール高松・かがわ国際会議場

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩永 ひろみ(TAKAHASHI - IWANAGA ,Hi romi)

北海道大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号: 3 0 1 9 3 7 5 9