

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590253

研究課題名(和文)皮膚感覚受容器のチャネル分子発現解析と感覚異常疾患モデルの分子病態解明

研究課題名(英文) Expression of ion-channel proteins in the cutaneous mechanoreceptors of normal rats and atopic dermatitis model mice

研究代表者

海藤 俊行 (Kaidoh, Toshiyuki)

鳥取大学・医学部・教授

研究者番号：70268837

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：ラットの正常皮膚の柵状神経終末には複数の感覚性イオンチャネル分子Piezo2、TRPV2、ASIC2、ASIC3が発現していた。柵状神経終末がポリモーダル受容器という発見は常識を覆すものであった。免疫電顕ではPiezo2とASIC2が軸索の細胞膜に局在した。NCヘアレスマウスにアトピー性皮膚炎を誘発すると柵状神経終末にTRPV4、TRPA1、ASIC2、ASIC3が認められ、アトピー性皮膚炎の過敏状態や掻痒に関与すると推測された。この遺伝的脱毛マウスの皮膚に残存する軟毛には柵状神経終末が存在した。この終末は感覚受容器としての役割は低い炎症時に発現する潜在的感覚機能を有していた。

研究成果の概要(英文)：Immunohistochemistry showed that ion-channel proteins, Piezo2, TRPV2, ASIC2, and ASIC3 were expressed in the palisade nerve endings (PN) of rat vellus hairs. These results means that the PN in this skin region might be function as not only mechanoreceptor but also thermoreceptor and nociceptor. Immunoelectron microscopy confirmed that ion-channel receptor proteins, Piezo2 and ASIC2 were expressed on the cytoplasmic surface of plasma membrane of the sensory nerve endings. These proteins probably function as receptors of mechanosensation of the lanceolate nerve endings in the rat auricular skin.

In the auricular skin of the normal NC-hairless mice the expression of ion-channel proteins was inconspicuous in the PN, whereas in that of the dinitrofluorobenzene-induced atopic dermatitis mice, TRPV4, TRPA1, ASIC2 and ASIC3 were detected in the PN. Induction and expression of these ion-channel proteins in PN might cause itchy skin sensation in this atopic dermatitis model.

研究分野：解剖学、超微形態

キーワード：皮膚 感覚 神経 アトピー性皮膚炎 チャネル分子

1. 研究開始当初の背景

申請者はこれまで、皮膚感覚受容器の接着分子やシグナル伝達分子に関する研究を行ってきた。

(1)近年、感覚受容に関わるチャネル分子が次々と発見され、感覚研究は新たな展開を見せているが、感覚受容のチャネル分子が生体の細胞膜上で機能的に発現している現場を、微細構造レベルで確認することが課題となっている(参考文献1)。

(2)一方、皮膚掻痒症(感覚過敏)は多くの患者を悩ます病態で、慢性的な痒みやしびれは患者に苦痛を与えてQOLを低下させ、難治性のことも多い。近年、皮膚感覚異常の疾患モデルとして、アトピー性皮膚炎を発症するトランスジェニックマウスが確立されてきた。このモデル動物の皮膚感覚受容器のチャネル分子を解析することで感覚異常の分子病態の解明が期待されている。

2. 研究の目的

(1)正常皮膚感覚受容器の特性を決定するチャネル分子(TRP一過性受容器電位チャネル、PIEZOピエゾタンパク、ASIC酸感受性イオンチャネル)等の発現を解析すること。

(2)皮膚感覚異常疾患モデルのトランスジェニックマウスを使用して、皮膚感覚受容器の炎症性過敏状態(アトピー性皮膚炎)および退縮過程(遺伝的脱毛)における分子発現の変化を解析し、感覚異常の分子病態を解明すること。

具体的な研究項目は、正常皮膚感覚受容器におけるチャネル分子等の発現解析、アトピー性皮膚炎発症マウスの皮膚感覚受容器における分子発現解析、遺伝的脱毛マウスの皮膚感覚受容器における分子発現解析である。

3. 研究の方法

(1)免疫組織化学法

・一次抗体: Piezo2, TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPA1, TRPM8, ASIC1, ASIC2, ASIC3, P2X3, PTGER, PGP9.5 等に対する家兎抗体を使用した。

・二次抗体: 抗ウサギ IgG 抗体 (EnVision™/HRP) を使用した。

・動物を4%ホルムアルデヒドで固定して皮膚を採取。皮膚組織の凍結切片を作製して、一次抗体、二次抗体に反応させて、陽性像を光学顕微鏡で観察した。二次抗体として蛍光抗体も使用したが、周辺組織との関係性が分かりやすいことから、EnVision™/HRP を使用して酵素組織化学的に発色する方法を採用した。

(2)免疫電子顕微鏡法

・一次抗体: Piezo2, ASIC2, p-Tau, 1-

Integrin, Paxillin 等に対する家兎抗体を使用した

・二次抗体: Nanogold®: -Fab' goat anti-rabbit IgG を使用した。

・詳細な染色方法は、参考文献2)と同様に行った。

(3)トランスジェニックマウスを使用したアトピー性皮膚炎の誘発

当初は2種類のトランスジェニックマウスを使用してアトピー性皮膚炎の誘発実験を行う予定であったが、NCヘアレスマウスが実験モデルとして優秀であるとの情報を得たことから、NCヘアレスマウスのみを使用して実験を行った。NCヘアレスマウスの耳介から背部の皮膚にジニトロフルオロベンゼン(DNFB)を週に1回、計6回塗布してアトピー性皮膚炎を誘発した。非誘発マウスと誘発マウスの皮膚について(1)(2)の方法で比較検討した。毛の退縮過程(遺伝的脱毛)における分子発現の変化については非誘発NCヘアレスマウスを実験対象とした。

4. 研究成果

(1)正常皮膚感覚受容器のチャネル分子の発現解析

ラットの正常皮膚における各種イオンチャネルタンパク質(Piezo2, TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPA1, TRPM8, ASIC1, ASIC2, ASIC3, P2X3, PTGER)の発現を免疫組織化学法で解析した結果、柵状神経終末の軸索シユワン細胞複合体にPiezo2(図1)、TRPV2、ASIC2、ASIC3の陽性反応が認められた。

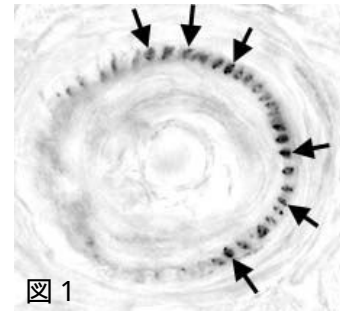
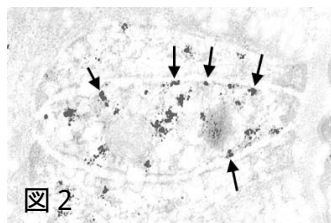


図1

柵状神経終末は皮膚の代表的機械受容器であるが、機械刺激を受容するチャネル分子としてはPiezo2とASIC2が存在している可能性が考えられた。また、温度受容チャネルのTRPV2および酸感受性チャネルのASIC3、ASIC2が検出されたことから、柵状神経終末は温度刺激や炎症時の痛覚受容にも関与するポリモーダルな性質を有する可能性が考えられた。皮膚では、これまで自由神経終末のみがポリモーダル受容器と考えられていたが、柵状神経終末もポリモーダル受容器である可能性を見出したのは、皮膚の感覚受容器の常識を覆す、重要な発見と言える。

Piezo2とASIC2については、免疫電子顕微鏡法による細胞内の局在解析に成功した。Piezo2は、主に軸索の細胞膜の裏打ち(図

2 : 矢印)と細胞質に認められた。細胞膜の陽性反応は密集せずに 100~300 ナノメートル程度の間隔で分布していた。軸索の細胞膜と細胞質を区分して分布を解析したところ、陽性率は軸索側面の細胞膜において約 80% の高値であった。



Piezo2 は、これまで mRNA がマウスの脊髄神経節に発現していることは確認されていたが、本研究により柵状神経終末を構成する軸索シュワン細胞複合体において軸索側面の細胞膜に分布することが明らかになった。毛に対する機械刺激は軸索側面の細胞膜の変形により Piezo2 イオンチャンネルを開いて陽イオン電流を引き起こすと推測され、これにより柵状神経終末は速順応性機械受容器として機能すると考えられた。一方、ASIC2 の陽性反応も軸索の細胞膜の裏打ちに認められた。このことから、柵状神経終末の機械受容には Piezo2 に加えて ASIC2 も関与している可能性が超微形態レベルで確認された。

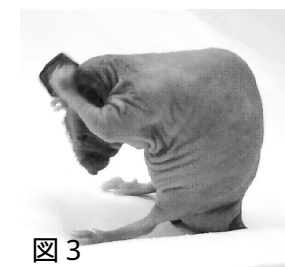
チャンネルタンパク質の分布と比較する目的で、軸索シュワン細胞複合体の形態維持や小器官の輸送に関わる微小管関連タンパク質 p-Tau (phosphorylated tau) の局在について検討を行った。微小管は軸索シュワン細胞複合体の形成に重要な役割を果たすと考えられており、Tau はその微小管を安定化させて、リン酸化された p-Tau は微小管を離れて不安定化させると考えられている。p-Tau の陽性反応は、軸索では微小管が多く分布するミトコンドリア周辺に集中していたので、軸索の中央部では細胞質のキナーゼにより Tau のリン酸化が起こり、微小管の重合調節が行われている可能性が考えられた。また、シュワン細胞突起における p-Tau の陽性反応は、突起の両端にある高電子密度の構造付近に認められた。ここには他に Integrin や Paxillin が作る接着斑が存在する。一般に

1-Integrin に結合している ILK は GSK3 を抑制して Tau のリン酸化を妨げ、微小管を安定化させると考えられているが、本研究の結果はこれに反して接着斑付近で Tau のリン酸化が起こっていることを示していた。軸索シュワン細胞複合体における Tau のリン酸化と微小管の重合調節については、今後更に検討していきたい。

(2)アトピー性皮膚炎発症マウスの皮膚感覚受容器における分子発現解析

アトピー性皮膚炎は著明な掻痒を伴う慢性の皮膚炎である。患者の皮膚は刺激に敏感で、掻破は皮膚炎を著しく悪化させるため、痒み

のコントロールはアトピー性皮膚炎の治療にとって非常に重要である。このため、本研究では、皮膚の掻痒状態に係る感覚神経のイオンチャンネル分子の発現を免疫組織化学的に明らかにしようと試みた。非誘発(正常)NCヘアレスマウスの皮膚では、柵状神経終末にイオンチャンネル分子の発現は検出できなかった。一方、ジニトロフルオロベンゼンを塗布してアトピー性皮膚炎を誘発したNCヘアレスマウスの皮膚では(図3)柵状神経終末に TRPV4, TRPA1, ASIC2, ASIC3 の陽性反応が認められた。これらのイオンチャンネルタンパク質の発現増加はこのアトピー性皮膚炎モデルにおける皮膚の過敏状態や掻痒状態に関与していると推測された。特に、TRPA1 はヒスタミン非依存性の痒みに関与するとも言われており、アトピー性皮膚炎モデルの過敏状態や掻痒状態に最も関与しているのではないかと推測された。



(3)遺伝的脱毛マウスの皮膚感覚受容器における分子発現解析

遺伝的脱毛マウスとしては非誘発(正常)NCヘアレスマウスを使用して検討を行った。まず、皮膚の組織切片を観察したところ、予想外にヘアレスマウスでも軟毛が残存していることが判明した。毛包に、柵状神経終末が存在するかどうか、神経特異的な PGP9.5 抗体を使用して免疫組織化学的に確認したところ、ヘアレスマウスの軟毛には柵状神経終末が存在することが明らかになった。しかしながら上述のようにチャンネル分子の発現は認められなかったことから、残存軟毛の感覚受容器としての機能的役割は低いと推測された。しかしながらアトピー性皮膚炎を誘発するとチャンネルタンパク質が発現してくることから、炎症時に発現する潜在的な感覚機能は有していると考えられた。

<引用文献>

- 1)Delmas P et al. Nature Review Neuroscience 12, 139-153, 2011
- 2)Kaidoh T. and Inoue T. Journal of Comparative Neurology 506, 525-534, 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 1件)

Toshiyuki Kaidoh, Toshio Kameie, Expression of ion-channel proteins in the cutaneous mechanoreceptors of mice

model of atopic dermatitis. The Journal of Physiological Sciences, 査読無、65 巻、2015、S120

〔学会発表〕(計 4 件)

海藤俊行、アトピー性皮膚炎モデルマウスにおけるイオンチャネルタンパク質の発現、第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2015.3.21 神戸国際会議場・展示場(神戸市)

海藤俊行、皮膚感覚受容器の形態形成と機械受容におけるイオンチャネルタンパク質の局在の検討、第 119 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2014.3.27 自治医科大学キャンパス(栃木県下野市)

海藤俊行、皮膚感覚受容器の形態形成と機械受容に関わる分子発現の検討、第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2013.3.30 サポートホール高松・かがわ国際会議場(高松市)

Toshiyuki Kaidoh, Toshio Kameie, Immunoelectron microscopic study of N-cadherin in the Mechanoreceptors of human skin. 14th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry, 2012.8.29 京都国際会議場(京都市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

海藤 俊行 (KAIDOH, Toshiyuki)
鳥取大学・医学部・教授
研究者番号：7 0 2 6 8 8 3 7

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

亀家 俊夫 (KAMEIE, Toshio)
鳥取大学・技術部・技術専門職員
森野 慎一 (MORINO, Shinichi)
鳥取大学・技術部・技術専門職員