

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

科学研究費助成事業

研究成果報告書



平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：32610

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26860893

研究課題名(和文) 無毛部皮膚エクリン汗腺におけるニューロトロフィン作用についての組織形態学的解析

研究課題名(英文) Histological study of neurotrophic effects in the eccrine sweat gland of rat glabrous skin.

研究代表者

長谷川 瑠美 (Hasegawa, Rumi)

杏林大学・保健学部・学内講師

研究者番号：90453521

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000 円

研究成果の概要(和文)：

手掌等にある無毛部皮膚の湿潤状態維持にはエクリン汗腺(EG)が重要である。本研究はラットを動物モデルとして用い、その前肢足蹠皮膚に免疫組織化学法を適用してニューロトロフィン(NT)関連分子の免疫反応(IR)がみられる組織細胞を調べた。NTの一種であるNT-3 IRがEG分泌部上皮内の筋上皮細胞に、NT受容体のうちTrkAおよびp75 IRがEG分泌部周囲のコリン作動性交感神経節後線維を含む神経組織内に、また、神経細胞の栄養因子であるGDNFの受容体GFR α -1 IRがNT-3と同様に筋上皮細胞にみられ、これらを介したNT作用の存在が示唆された。

研究成果の概要(英文)：

Eccrine sweat glands (ESG) in the glabrous skin such as palm is important to moisten glabrous skin. This study was applied to the immunohistochemistry and examined the immunoreactivity (IR) of the neurotrophins and the related molecules in the ESG and around the secretory coil of ESG by use of rat forepaw footpad as an animal model. NT-3 is one of the neurotrophins, and NT-3 IR was observed in the myoepithelial cells which compose the acini of ESG. TrkA and p75, these are receptors of neurotrophin, these IR was observed in the nerve tissue containing the presynaptic terminal around the secretory coil of ESG. In addition, the IR of GFR α -1 which is act as a trophic factor for a neuron was observed in the myoepithelial cells like NT-3. These results raise the possibility that neurotrophins acted on the cholinergic postganglionic sympathetic fibers around the secretory coil of ESG.

研究分野：顕微解剖学、細胞機能形態学

キーワード：エクリン汗腺 無毛部皮膚 ニューロトロフィン ラット 免疫組織化学 神経栄養因子 交感神経節
後線維 コリン作動性

1. 研究開始当初の背景

エクリン汗腺は全身の皮膚に存在するが、そのうち手掌や足蹠を構成する無毛部皮膚は脂腺を欠くため、無毛部皮膚の湿潤状態を維持するにはエクリン汗腺からの分泌が必要である。特にヒトでは手掌を用いて物を掴む等の作業が日常生活において頻繁に行われるため、エクリン汗腺の恒常的な分泌維持が重要であると考えられる。これまでの報告では、エクリン汗腺の分泌機能の維持には機能的な神経支配が中心的な役割を果たすこと、そののちに、ニューロトロフィン (neurotrophin, 神経栄養因子) 依存的な交感神経線維が存在すること、成獣マウス皮膚内における恒常的なニューロトロフィン作用が存在することが示唆されてきた。ニューロトロフィンの一種である神経成長因子 (nerve growth factor, NGF) については、汗腺において交感神経節後線維へ関与するとの報告がされるなど、汗腺を対象とした幾つかの報告が確認できた。これらのことから、汗腺分泌部の周囲を取り巻くコリン作動性交感神経節後線維の維持にはニューロトロフィンが関与している可能性が考えられるが、これまでの報告には無毛部皮膚エクリン汗腺の分泌維持に言及したものはなかった。

表1. 皮膚エクリン汗腺分泌部および周囲組織における NGF、NT-3、GDNF とその受容体の発現

リガンド	NGF	NT-3	GDNF
無毛部ラット	不明	不明	+
有毛部ヒト	不明	+	不明

受容体	TrkA	TrkC	RET	p75
無毛部ヒト	+	不明	不明	+
無毛部ラット	不明	不明	+	不明
有毛部ヒト	+	+	不明	+

汗腺における神経栄養的な作用を汗腺組織切片を用いて示唆する報告のうち、ニューロトロフィン関連分子の発現を検索したものについて、筆者の知る限りではあるが表にまとめた(表1)。NGFの特異的受容体はTrkA、ニューロトロフィン 3 (neurotrophin-3, NT-3)の特異的受容体はTrkCである。低親和性神経成長因子受容体(p75)は、全てのニューロトロフィンに対する受容体であり多くの神経系の細胞においてTrk受容体と共発現していることが知られている。グリア細胞株由来神経栄養因子(glial cell line derived neurotrophic factor, GDNF)はニューロトロフィンの分類外ではあるが、様々なニューロンに対して栄養因子としてはたらくことが知られてきているため、本研究の対象とした。RET(proto-oncogene protein c-Ret)は、GDNFの主な受容体であるGDNF family receptor-1(GFR-1)と相互作用する受容体チロシンキナーゼである。本表は、先行研究で主に用いられてきたラットおよびヒトでの報告を無毛部あるいは有毛部

皮膚で分類したものであり、「不明」は報告が見当たらなかったものであり、「不明」の項目は多い。

2. 研究の目的

無毛部皮膚エクリン汗腺におけるニューロトロフィン作用を明らかにすることを目指し、本研究では形態学的にニューロトロフィン関連分子の検索を免疫組織化学法により行う。前肢で物を掴む作業が可能なラットを動物モデルとして、前肢足蹠無毛部皮膚にあるエクリン汗腺分泌部とその周囲組織を対象とする。表1に示したニューロトロフィン関連分子が存在するであろう組織要素や細胞を明らかにし、エクリン汗腺分泌維持に関与するニューロトロフィン作用の可能性を示す。

3. 研究の方法

足蹠皮膚においてエクリン汗腺の分泌維持が行われている成獣 Wistar 系雄ラット、また、エクリン汗腺へのコリン作動性交感神経支配が確認されている生後 14 日齢の同系ラットを灌流固定し、前肢足蹠無毛部皮膚を採取してエクリン汗腺を含む薄切組織切片を作製した。この切片に免疫組織化学法である蛍光抗体法を適用し、抗体には、表1に挙げた NGF、NT-3、GDNF とその受容体に対する抗体、また標準的な組織構造を明らかにする為の抗体も用いた。多重標識法により、エクリン汗腺分泌部とその周囲組織、特にコリン作動性交感神経節後線維とその終末を含む神経組織における蛍光標識物質の分布領域を調べた。

4. 研究成果

(1) NGF-TrkA 作用

先行研究において汗腺における NGF の関与が報告されていたため NGF の検索を優先して実施したが、本期間中には成獣ラットの対象組織における明確な NGF 免疫反応が得られなかった。TrkA の検索には、細胞内領域を認識する抗 TrkA 抗体あるいは細胞外領域を認識する抗体を用いた。そのうち、細胞外領域認識抗体のみにて、TrkA 免疫反応はエクリン汗腺周囲の PGP9.5 (protein gene product 9.5) 免疫反応のある神経組織内にみられた(図1)。

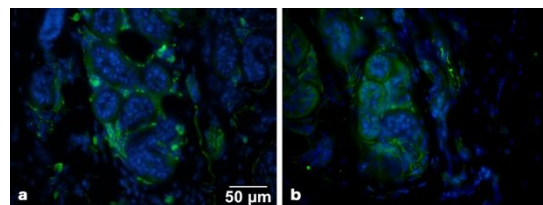


図1. 無毛部皮膚エクリン汗腺分泌部とその周囲組織における PGP9.5 (a) および TrkA (b) 免疫反応。青は核染。

この免疫反応は複数の抗体で確認出来なかったため追加実験が必要ではあるが、TrkA 作

用が存在する可能性を示した。TrkA の特異的なリガンドである NGF 免疫反応は未検出であるため、本期間中に NGF-TrkA 作用を示唆する結果を得ることはできなかった。

(2)ニューロトロフィン共通受容体 p75

p75 免疫反応は、細胞内領域 (図 2a, d, 赤) あるいは細胞外領域 (図 2b, 緑) を認識する抗体の双方において、エクリン汗腺周囲組織にみられた。抗 PGP 抗体を用いた多重標識法では、p75 免疫反応は汗腺分泌部周囲の神経組織に分布していた。さらに、シナプス前分泌小胞に存在する小胞アセチルコリン輸送体 (vesicular acetylcholine transport protein, VACHT) に対する抗体 (図 2c, 緑) との多重標識では、p75 免疫反応陽性領域の一部に VACHT 免疫反応がみられ (図 2d, 黄)、p75 がコリン作動性交感神経節後線維において作用している可能性が示唆された。

これらの免疫反応は、成獣 (図 2a-d) および生後 14 日齢 (図 2e, f) ラット共に確認され、汗腺組織ではコリン作動性交感神経による支配が確立した後の汗腺機能維持期に p75 が関与していることが示唆された。

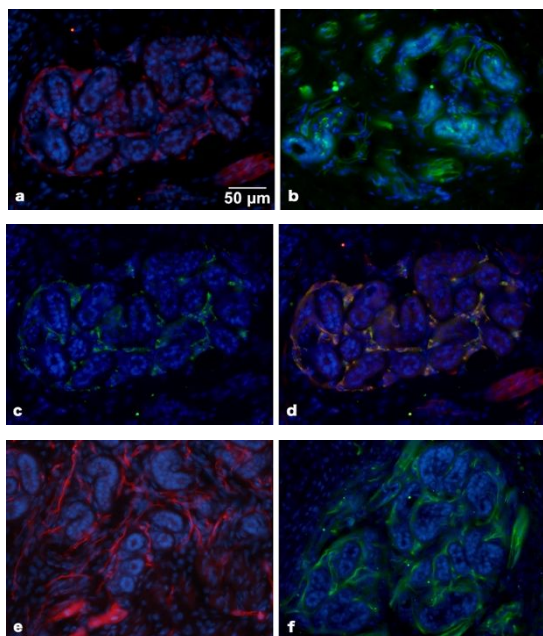


図 2. 成獣 (a-d) および生後 14 日齢 (e, f) 無毛部皮膚エクリン汗腺分泌部とその周囲組織における細胞内 (a, d-e, 赤) あるいは細胞外ドメイン (b, f, 緑) に対する抗体を用いた p75 免疫反応、青は全て核染。(c) a と同一視野における VACHT 免疫反応。(d) a の p75 免疫反応の一部に c の VACHT 免疫反応がみられる (黄色部分)。

(3)NT-3-TrkC 作用

NT-3 免疫反応は成獣および生後 14 日齢ラット双方の無毛部エクリン汗腺分泌部上皮内にみられた (図 3a, c)。筋上皮細胞のマーカーである平滑筋 アクチン (alpha smooth muscle actin) に対する抗体を用いた多重標識法を行うと、NT-3 免疫反応は筋上皮細胞に

みられることが明らかとなった (図 3a-d)。NT-3 免疫反応は 2 種の抗体で免疫反応の確認を得てはいるが、それらはメーカーは異なるが同領域を認識する抗体であり、異なる領域を認識する抗体では同等の免疫反応が得られなかったため、今後は他の抗体でも確認する必要がある。NT-3 の特異的受容体である TrkC は、皮膚組織における明確な免疫反応を得ることができなかった。本期間中に NT-3 が TrkC を介して作用することを示唆するデータは得られなかったが、NT-3 免疫反応が汗腺分泌部上皮の基底膜に最も近い筋上皮細胞にみられたことから、NT-3 が汗腺分泌部周囲の神経組織を標的として作用する可能性が示唆された。

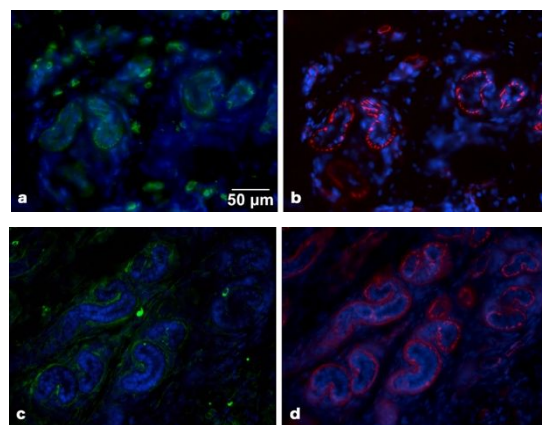


図 3. 成獣 (a, b) および生後 14 日齢 (c, d) 無毛部皮膚エクリン汗腺分泌部とその周囲組織における NT-3 (a, c, 緑) あるいは平滑筋アクチン (b, d, 赤) 免疫反応。青は核染。

(4)GDNF-GFR -1 作用

GDNF の特異的な免疫反応は本期間中に得ることができなかったが、主な受容体である GFR -1 に対する抗体を使用したところ、GFR -1 免疫反応が成獣ラット無毛部皮膚エクリン汗腺分泌部上皮内にある筋上皮細胞にみられた (図 4c)。汗腺組織も含む真皮および皮下組織には強い免疫反応をもつ細胞が

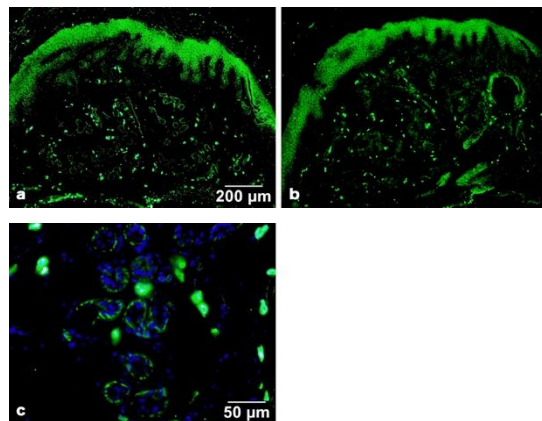


図 4. (a) 成獣無毛部皮膚における GFR -1 免疫反応。(b) a のアイソタイプコントロール像。表皮上皮細胞および真皮内の免疫細胞に反応がみられる。(c) 成獣無毛部皮膚エクリン汗腺分泌部とその周囲組織における GFR -1 免疫反応。青は核染。

散在していたが(図 4a)、抗 GFR -1 抗体と同じ動物種およびアイソタイプである抗体を用いて同時に行ったコントロール実験(図 4b)により、それらは非特異的反応であることが判明している。先行文献では、GDNF 機能を示唆するために RET を検索していたが、GDNF は Ret に依存しない機能も有すとの報告があったため、本研究では GFR -1 について調べた。GFR -1 免疫反応は、本研究においては筋上皮細胞にみられたが、先行文献では筋上皮細胞に GDNF が存在し、RET は筋上皮細胞に面している分泌細胞に存在することが示されていた。本研究の結果は、ある 1 抗体を用いてのみ得られたものであるため、精査が必要である。一方で、GFR -1 のリガンドには GDNF の他に神経栄養因子の一種であるニューロツリン(neurturin)が知られている。本期間中に GDNF の存在を示唆できなかったことから、ニューロツリンがリガンドとして作用し、筋上皮細胞の GFR -1 を介した何らかの作用が存在する可能性は否定できない。

以上の結果より、ラット無毛部皮膚エクリン汗腺分泌部周囲のコリン作動性交感神経終末には p75 が汗腺機能維持期において存在し、リガンドである NT-3 が作用している可能性が示唆された。ただし、p75 は多くの神経系の細胞において Trk 受容体と共発現し、Trk 受容体とのヘテロ二量体形成によりリガンドと高親和性に結合すると考えられていることから、TrkC の免疫反応も p75 と同領域、すなわち汗腺分泌部周囲の神経組織にみられる可能性があるが、本期間中には明らかにできなかった。また、異なる認識部位をもつ複数の抗体を用いて各結果の正確性を高める予定であったが、本期間中に完了することが出来なかった。未実施の項目については引き続き免疫組織化学的手法による検索を行い、成果が揃い次第、公表する予定である。筆者が目指す、無毛部皮膚エクリン汗腺分泌部周囲の神経組織におけるニューロトロフィンの機能の形態学的な解明には、本研究の結果が、上肢の無毛部皮膚に限局することなのかどうかを下肢無毛部や有毛部皮膚における結果等と比較し、さらに、他の形態学的手法も併用する必要がある。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長谷川 瑠美 (HASEGAWA, Rumi)

杏林大学 保健学部 学内講師

研究者番号: 90453521

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし