

94. 基底膜が異種組織を繋ぐ機構

藤原 裕展

Key words : 毛包, 細胞外マトリックス, 触覚

*理化学研究所
発生・再生科学総合研究センター
細胞外環境研究チーム

緒言

毛を作る器官である毛包は、発生過程で神経・血管・筋肉などと正確に接続されることにより、感覚受容、体温調節、威嚇などの高次機能を獲得する。しかし、これら異種組織間の接続と相互作用を制御する分子機構は殆ど明らかにされていない。本研究では、マウス毛包と触覚装置との接続に、両者のインターフェースに位置する細胞外マトリックスがどのように関わっているのかを明らかにすることを目的とした。

我々は、毛包と間充織組織との接続には、これら組織間の相互作用の場となる細胞外マトリックスの領域特殊化が重要な役割を担っているとの考えのもと、研究を展開している。最近、我々は、鳥肌形成を担う立毛筋の毛包バルジ領域(毛包幹細胞ニッチ)への接続が、立毛筋と毛包幹細胞とを隔てる基底膜のnephronectinによる特殊化によって制御されていることを見出した。これに加え、触覚装置が結合するバルジ上部の細胞外マトリックスが、nephronectinファミリーメンバーであるEGFL6で高度に特殊化されていることを見出している。本研究では、EGFL6の役割を切り口として、皮膚触覚装置と毛包という異種組織を繋ぐ機構の理解を目指した。

方法

1. EGFL6の局在解析

当研究室で作製したウサギ抗マウスEGFL6抗体により、発生期から成体にかけてのEGFL6の局在を解析した。胎生14.5日(E14.5)からP49のマウス背部皮膚凍結切片を、毛包幹細胞マーカーであるケラチン15の抗体と共染色した。

2. 皮膚3次元イメージング法を用いたEGFL6の局在解析

毛包とその付属器官の相互作用部位は空間的に限局されており、かつ複雑な立体構造を取る。このような構造を正確に把握するには、2次元的な組織切片解析から脱却し、3次元的な組織学を可能とする方法論が必須である。ここでは、毛包、EGFL6、触覚装置の3者の局在を、3次元的に高精度で捉えることができる「皮膚3次元イメージング法」を確立した。表皮と真皮を含む皮膚を切り出し1時間固定し、皮膚ホルマウント標本とした。毛包、EGFL6、触覚装置を長時間の抗体染色により標識し、共焦点顕微鏡によりZ-stack画像を取得した。3次元画像解析ソフトにより画像を再構成し、毛包-触覚装置接続部の3次元高精度画像を得た。

3. Egfl6ノックアウトマウスにおける触覚装置の構造解析

触覚装置の構造と配置におけるEGFL6の役割を検討するため、Egfl6ノックアウトマウス触覚装置を上記3次元イメージング法で可視化し、解析した。本研究では、EGFL6と直接相互作用すると考えられる終末シュワン細胞に焦点を絞り、その構造と配置の変化を定量的解析を交えて検討した。

結果

1. 毛包発生における EGFL6 沈着パターンの変化

我々は先行研究において、EGFL6 が成体マウス背部皮膚毛包のバルジ上部に特異的に沈着することを見出している¹⁾。ここでは、EGFL6 抗体を用いて、発生期における EGFL6 蛋白質の局在変化を詳細に解析した。毛包形成が始まる前のマウス胎仔皮膚では (E14.5), EGFL6 は表皮と真皮を区切る基底膜に一樣に存在した (図 1)。毛包形成が始まると (E16.5-18.5), 毛芽と毛乳頭を区切る基底膜からは消失し、表皮と真皮を区切る基底膜と毛包の幹部を覆う基底膜に局在した。毛包発生の後期には (P1, 5) 毛包幹細胞が存在する毛包バルジ部に局在した (矢印)。バルジ部の EGFL6 は、成体 (P49) では消失し、バルジ上部にその沈着部は移動した (矢印)。このように、EGFL6 の存在部位は基底膜に限局されながらも、その基底膜内における局在は発生段階に応じてダイナミックに変化することが明らかとなった。成体になり EGFL6 の分布がバルジ上部に限局されると、毛包の成長サイクルに関わらず、EGFL6 の沈着部は固定された。

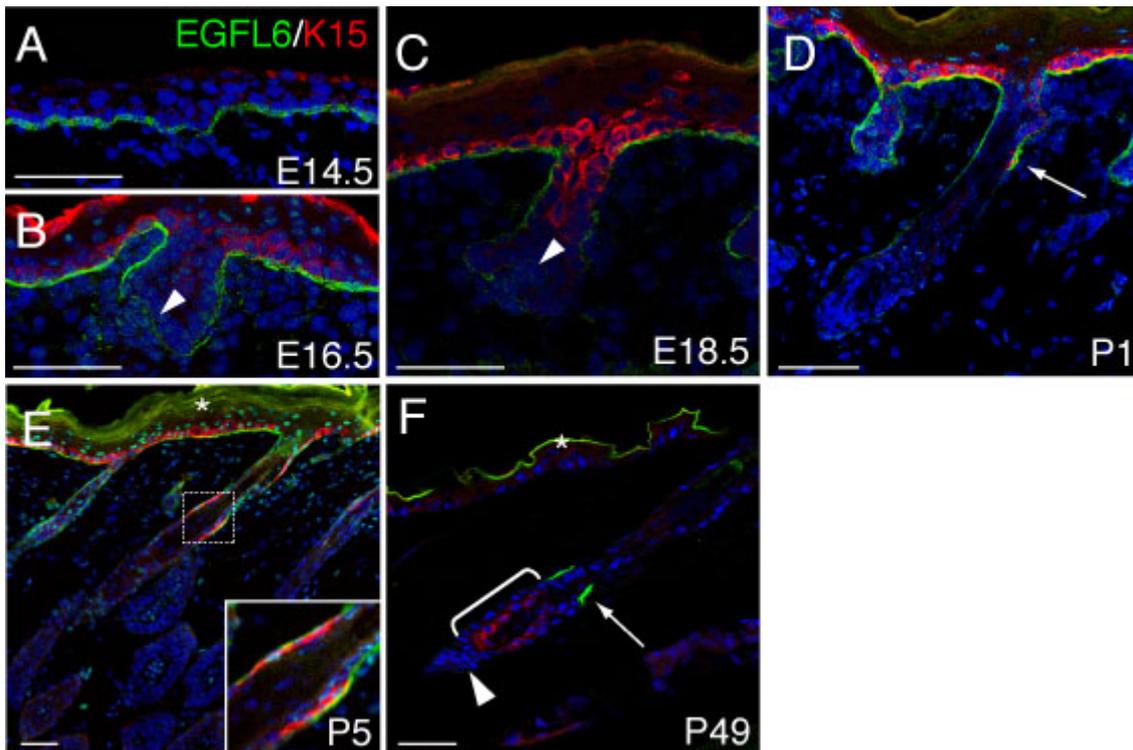


図 1. マウス背部毛包における EGFL6 蛋白質の局在。

凍結組織切片を EGFL6 抗体 (緑) と毛包幹細胞マーカーである Keratin15 の抗体 (赤) で染色した。矢印は毛包と毛乳頭の接続部を示す。スケールバーは 50 μ m。

2. EGFL6 と触覚受容器との共局在

バルジ上部には機械刺激を感知する触覚装置が接続されることが知られている²⁾。そこで、成体毛包において、EGFL6 が触覚装置と共局在するかどうかを検討した。毛包の触覚装置は、神経マーカー β III tubulin で染色される複数種類の低閾値機械感受性神経 (Low threshold mechano-receptors: LTMRs) のアクソンが、nestin 陽性の終末シュワン細胞の突起にサンドイッチされることにより形成される。触覚装置と EGFL6 の解剖学的構造は高度な 3 次元構造を形成することが予想されたため、ここでは、新たに開発した皮膚 3 次元高解像度イメージングにより、EGFL6 の局在パターンを詳細に解析した。先行研究では、解像度の低さから、EGFL6 がバルジ上部に連続的な帯状の染色パターンを示したが²⁾、改良された解析法では、EGFL6 は毛包長軸方向の柵状ストライプパターンとして沈着していることが示された (図 2)。

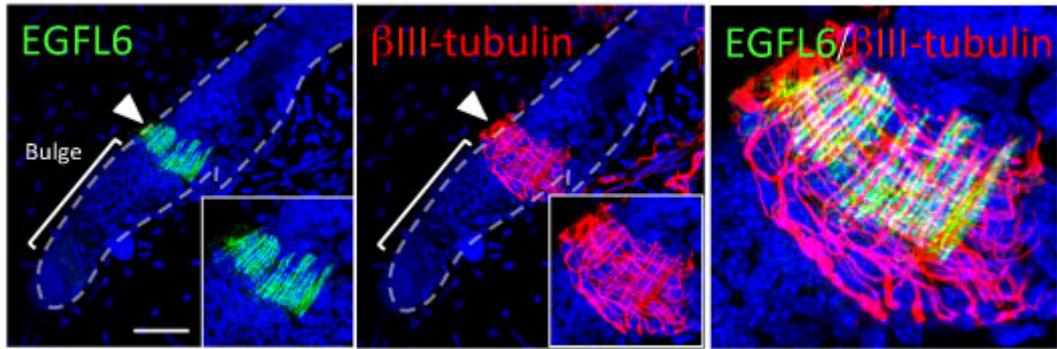


図2. 皮膚3次元高解像度イメージングにより可視化されたEGFL6と感覚神経終末.

マウス背部皮膚のホルマウント標本をEGFL6抗体(緑)と神経マーカーである β III-tubulinの抗体(赤)で染色した. 矢尻はバルジ上部を示す. スケールバーは $50\mu\text{m}$.

3. Eglf6 ノックアウトマウスにおける触覚受容器の構造と配置の変化

ここでは, EGFL6が終末シュワン細胞の形態及び配置の制御に関わるかどうかを, Eglf6 ノックアウトマウスを用いて解析した. まず, 毛包あたりの終末シュワン細胞数を調べたところ, Eglf6 ノックアウトマウスにおいて数が優位に減少していることが明らかとなった(図3). 次に, 終末シュワン細胞の突起部の幅及び各突起の長さを定量解析したところ, 突起部の幅には優位な差は認められなかったが, 突起の長さが減少していることが示された. 終末シュワン細胞の形態変化をいくつかの項目に分けて解析し, その結果をスコア化したところ, Eglf6を欠失しているシュワン細胞では, より多くの細胞で形態的な変化が観察されることが明らかとなった.

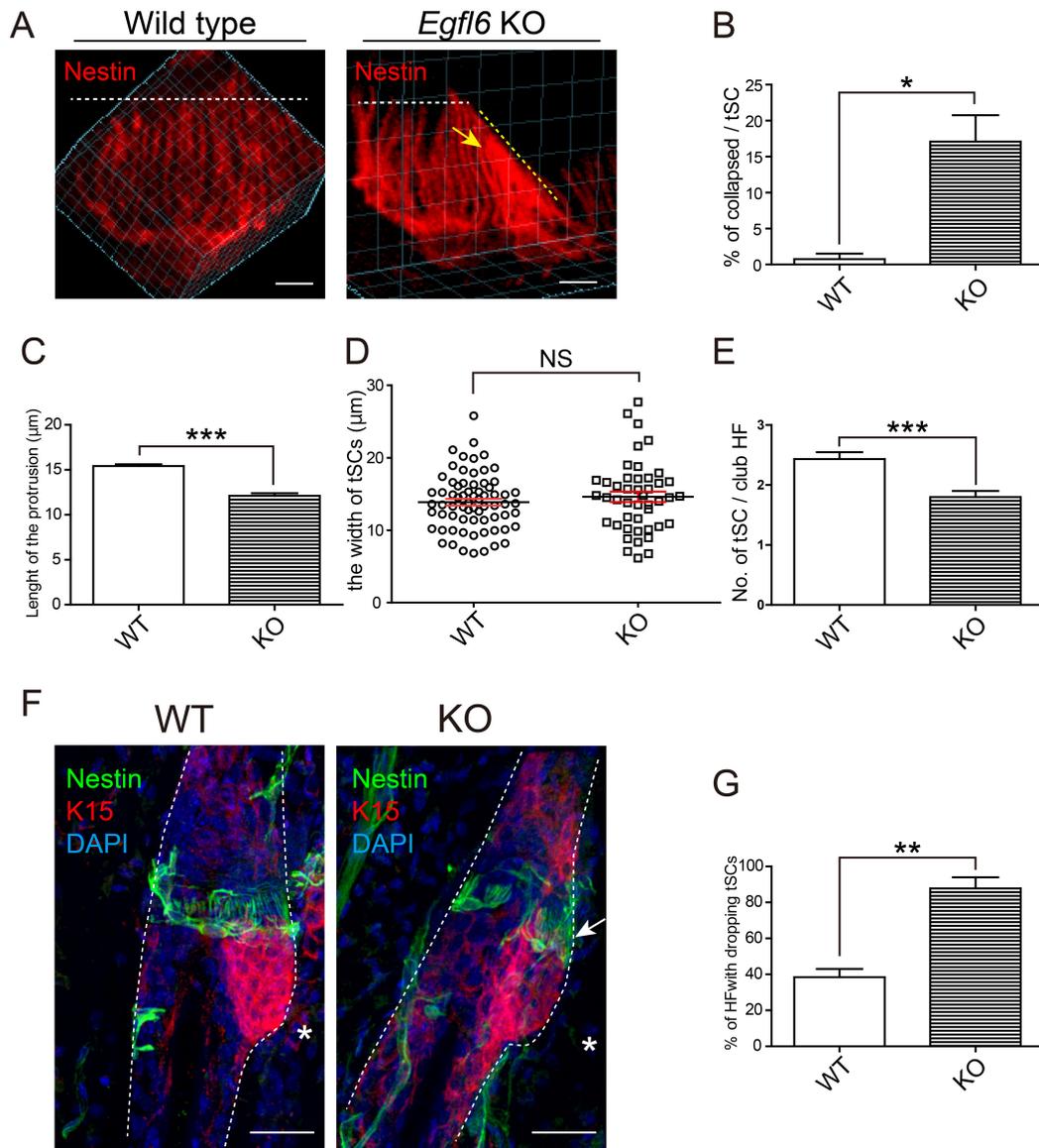


図3. *Egfl6* ノックアウトマウスにおける終末シュワン細胞の形態変化。

A) nestin 染色により終末シュワン細胞の形態を可視化した。 B) 終末シュワン細胞の形態異常をスコア化した。 C-E) 終末シュワン細胞の突起長，細胞体の幅，毛包当たりの細胞数を計測した。 F) K15 との共染色により，終末シュワン細胞の配置を検討した。 G) K15 陽性部に異所性に位置する終末シュワン細胞を持つ毛包の割合。スケールバーは $50\ \mu\text{m}$ 。 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Student t-test.

考 察

毛包上皮と間充織組織との相互作用には，主に 1) 毛包－毛乳頭相互作用，2) 毛包－立毛筋相互作用，3) 毛包－触覚装置相互作用がある³⁾。本研究では，この中でも特に報告がなかった³⁾毛包－触覚装置相互作用の理解につながる成果が得られた。すなわち，毛包幹細胞から分泌されると考えられる EGFL6 が，バルジ上部に投射される触覚装置と互いに組み合わせるようにストライプ構造を形成することにより，感覚神経複合体の終末シュワン細胞の形態と配置を制御することが示唆された。

EGFL6 の特徴的なストライプパターンは，感覚神経とシュワン細胞が平行パターンを形成した後に出現する。よって，EGFL6 マトリックスは，感覚神経やシュワン細胞のストライプパターンの形成を誘導するというよりは，むしろ一度形成された構造を維持するために作られるフレームワーク様の機能を持つと考えられる。EGFL6 のノックア

ウトマウスにおいて、シュワン細胞の形態に異常が現れるが、これは上記の仮説をサポートするものである。毛包は、皮膚の伸展などに伴う強い変形にさらされるが、そのような条件においても正確な機械刺激の受容機能と構造の維持が求められる。そのために、触覚装置は自身の機能に特化した細胞外マトリックス構造を周囲に形成している可能性が考えられる。今後は、Egfl6 ノックアウトマウスにおける触覚受容能の変化の有無を、電気生理や行動実験を通して解析する予定である。

文 献

- 1) Fujiwara, H., Ferreira, M., Donati, G., Marciano, D. K., Linton, J. M., Sato, Y., Hartner, A., Sekiguchi, K., Reichardt, L. F. & Watt, F. M. : The basement membrane of hair follicle stem cells is a muscle cell niche. *Cell*, **144** : 577-589, 2011.
- 2) Li, L., Rutlin, M., Abraira, V. E., Cassidy, C., Kus, L., Gong, S., Jankowski, M. P., Luo, W., Heintz, N., Koerber, H. R., Woodbury, C. J. & Ginty, D. D. : The functional organization of cutaneous low-threshold mechanosensory neurons. *Cell*, **147** : 1615-1627, 2011.
- 3) Brownell, I., Guevara, E., Bai, C. B., Loomis, C. A. & Joyner, A. L. : Nerve-derived sonic hedgehog defines a niche for hair follicle stem cells capable of becoming epidermal stem cells. *Cell stem cell*, **8** : 552-565, 2011.