

小腸絨毛上皮下線維芽細胞における細胞間シグナリング

Intercellular Signaling of Subepithelial Fibroblasts in Intestinal Villi

古 家 園 子^a, 古 家 喜四夫^bSonoko Furuya^a and Kishio Furuya^b^a生理学研究所・脳機能計測センター・形態情報解析室^b科学技術振興機構・細胞力覚プロジェクト

要 旨 消化管の上皮細胞の基底膜下にはアクチンに富んだ線維芽細胞がギャップ結合を介して細胞性網状構造を構築し、間質を包んでいる。この細胞は、1) エンドセリン、サブスタンス-P、ATP などに対する受容体を持ち、2) cAMP 依存的に可逆的に形態変化し、3) 機械的刺激感受性があり、ATP 放出を介して細胞間 Ca^{2+} 波を伝播させるなどの細胞外 ATP 情報伝達系を持ち、4) その機械刺激感受性は細胞の形態に依存して大きく変わる、等々の特徴的な性質を持つ。放出した ATP が ATP 受容体を持つ隣接した神経細胞を活性化するなど、上皮下線維芽細胞は神経網、血管網、上皮細胞、平滑筋、そして免疫系細胞とも相互作用し、絨毛における細胞間シグナル伝達系の要として機能している。

キーワード：小腸、絨毛上皮下線維芽細胞、 Ca^{2+} シグナリング、ATP 受容体、ギャップ結合

1. はじめに

消化管の上皮細胞の基底膜下にはアクチンに富んだ線維芽細胞がギャップ結合を介して細胞性網状構造を形成し間質を包んでいる^{1~4)} (図 6 参照)。この細胞は 1) コラーゲンやラミニンなど種々の基底膜成分や細胞外マトリックスを分泌し、上皮細胞の増殖、移動、分化を制御する、2) 組織の炎症や損傷により活性化してサイトカインやケモカインを分泌する、3) ノンプロフェッショナルな抗原提示細胞である、など様々な機能を持つが^{5,6)}、消化管の部位（小腸一大腸、絨毛一陰窩）によって多様な形態や機能を示す。小腸絨毛においては、陰窩の中ほどに上皮下線維芽細胞の幹細胞が位置し、細胞を新生している⁷⁾。新生された細胞は、絨毛下部から上部へ移動し先端で細胞死するが、陰窩一絨毛軸に沿って細胞の形態が異なることが走査電子顕微鏡にて観察されている^{4,8)}。絨毛上皮下線維芽細胞はシナプス小胞を含む神経の膨大部とシナプス様構造を形成しているが^{1,2)}、毛細血管やリンパ球、樹状細胞などの免疫系の細胞とも接触しており⁹⁾、これらの細胞間で情報伝達が行われていることが推測されてきた。

筆者の確立した小腸絨毛上皮下線維芽細胞の初代培養系の

実験から、この細胞が持つ 2 つのユニークな性質が明らかになった¹⁰⁾。1) cAMP 依存的に可逆的に形態変化する¹¹⁾。2) 機械的刺激を感じて ATP を放出し、P2Y1 代謝調節型 ATP 受容体を介して Ca^{2+} 波を発生する¹²⁾。本稿では、この特徴的な性質について述べるとともに、小腸絨毛における上皮下線維芽細胞間および、上皮下線維芽細胞網と神経や血管等の ATP を介した情報伝達機構について考察する。

2. cAMP 濃度依存性の可逆的形態変化

ラット十二指腸から単離した絨毛上皮下線維芽細胞は血清を含む培地では、幅の広い細胞突起をもつフラットな形態を示すが、dibutyryl cyclic AMP (dBcAMP)、フォルスコリン、プロスタグランデン E2 などの処理により細胞内 cAMP が上昇すると、F-アクチンが脱重合してストレスファイバーが消失し、30 分以内に星状（数本の細長い突起をもつ丸い細胞体）の形態に変化する¹¹⁾。星状の細胞は血清やエンドセリン (ET) 添加により数分以内にフラットな形態に戻る (図 1)。この速やかで可逆的な形態変化が絨毛上皮下線維芽細胞の特徴であり、免疫組織化学では α -SMA、デスミン、ビメンチン陽性の細胞である¹⁰⁾ (図 6 参照)。ヒト大腸由来の 18Co 細胞は初代培養の小腸絨毛上皮下線維芽細胞と同様に、細胞内 cAMP の上昇によりフラットから星状へ可逆的に形態変化する¹³⁾。しかし、小腸の絨毛上皮下線維芽細胞と異なり、大腸の上皮下線維芽細胞は α -SMA およびビメンチン陽性であるが、デスミン陰性である¹⁴⁾。この様に細胞内 cAMP の濃度変化に依存して速やかに形態変化をする細胞としては他にアストロサイト¹⁵⁾ が知られている。

^a 〒 444-8585 岡崎市明大寺町字西郷中 38
TEL: 0564-55-7827; FAX: 0564-52-7913
E-mail: sonoko@nips.ac.jp

^b 〒 466-8550 名古屋市昭和区鶴舞町 65
E-mail: furuya@med.nagoya-u.ac.jp
2008 年 2 月 8 日受付

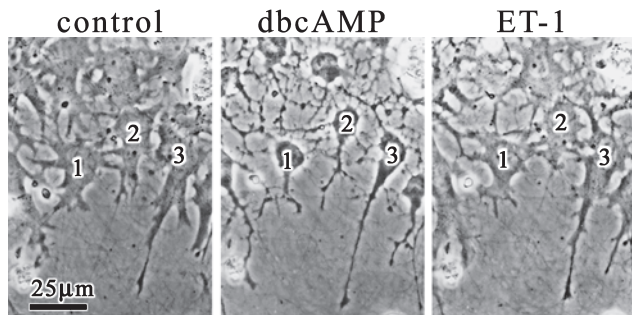


図1 初代培養した絨毛上皮下線維芽細胞の形態変化。dbcAMP 処理によりフラットから星状へ変化し、ET-1 投与によりフラットな形態に戻る。

3. 生理活性物質に対する Ca^{2+} 反応と受容体

種々の血管作働性物質や神経伝達物質に対する受容体の有無を Ca^{2+} 測光法にて測定すると、ほとんど全ての細胞は ADP, ATP, ブラジキニン, エンドセリン (ET-1>ET-3), サブスタンス-P に反応して細胞内 Ca^{2+} が上昇した^{10,16)}。セロトニンに反応した細胞は約 40% である。しかし、アセチルコリン, アドレナリン, ノルアドレナリン, グルタミン酸, GABA, VIP, アンジオテンシン II, バソプレシン, オキシトシン, ヒスタミン等には反応しなかった^{10,16)}。

4. ギャップ結合を介した細胞間シグナリング

多くの組織において隣接した細胞間ではイオンや小分子を通すギャップ結合を介して情報伝達が行われ、組織の同調性が保たれている。絨毛上皮下線維芽細胞間には Cx43 から成るギャップ結合が局在する^{11,17)}。絨毛上皮下線維芽細胞は絨毛の上部では星状の形態であるが下部ではフラットであり、細胞の形によってギャップ結合の透過性に差異が有る可能性が考えられた。そこで、細胞の形態を経時的に変化させ (control, dbcAMP 処理, ET-1 投与), ギャップ結合の透過性に変化があるか否かを FRAP (Fluorescent Recovery after Photobleaching) 法で計測した。同一の細胞における蛍光色素の透過性を経時的に追跡したが、この過程で有意の変化は見られなかった¹⁷⁾ (図 2A, B, C)。

ギャップ結合の開閉は pH や Ca^{2+} , 膜電位により制御されており、物質透過性はコネクシンのリン酸化やリサイクリング, 発現量の増減などを介して修飾される。細胞の種類によって制御のメカニズムは異なるが、多くの細胞で cAMP 濃度依存的に Cx43 がリン酸化され透過性が上昇する¹⁸⁾。絨毛上皮下線維芽細胞と同様に cAMP 依存性に可逆的に形態変化するアストロサイトでは、ET^{19,20)} やサイトカイン (IL-1 β , TNF- α)²¹⁾ によってギャップ結合の透過性が強く阻害される。しかし、絨毛上皮下線維芽細胞間のギャップ結合は cAMP 濃度や ET にほとんど影響を受けない。アストロサイトでは ET によるコネクシンのリン酸化阻害は ET_B 受容体を介して行われるが²⁰⁾、絨毛上皮下線維芽細胞では ET_A 受容体が主であり¹⁷⁾、阻害を受けにくいと考えられる。又、

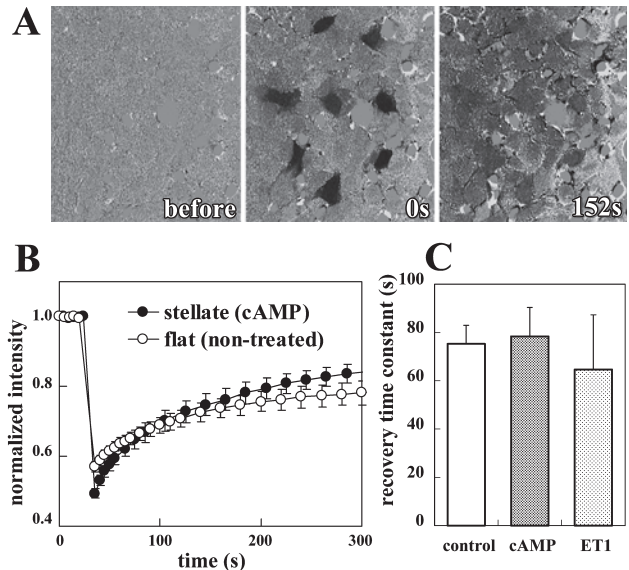


図2 FRAP 法により計測したギャップ結合の透過性。蛍光色素 (calcein: MW622.5) を取り込ませた細胞に強いレーザー光を照射、蛍光を photobleach し (A : 0 sec), 蛍光の回復 (A : 152 s) の過程を測定した (B)。同一の細胞においてフラット (control) と星状 (dbcAMP), ET-1 投与によりフラットに変化した時の、各々の蛍光の回復時定数を計測した (B, C)。

サイトカインの影響は未だ不明である。絨毛上皮下線維芽細胞におけるギャップ結合の開閉や透過性の制御機構の解明が待たれる。

5. ATP を介した細胞間シグナリング

5-1 機械的刺激による Ca^{2+} 波の発生と ATP 放出

近年、神経のみならず、多くの非興奮性の組織において ATP が普遍的な細胞外情報伝達物質であることが明らかになってきた²²⁾。アストロサイトや乳腺、骨芽細胞などでは機械的刺激によって ATP が放出され、細胞間 Ca^{2+} 波が発生する^{23,24)}。 Ca^{2+} 波は 1 つの細胞で起きた情報を周りの細胞に伝えて反応の同期, 情報伝達の制御に関与していると考えられている。

絨毛上皮下線維芽細胞を細いガラス棒の先端で軽く触れたり (タッチ刺激), シリコーン樹脂で作ったチャンパー上に培養しチャンパーの両端をひっぱる (伸展刺激) と、刺激を受けた細胞の細胞内 Ca^{2+} が一過的に上昇し、次いで周りの細胞に Ca^{2+} 上昇の波が 5-10 μ m/sec の速度で半径 150-200 μ m の距離まで伝播していく¹²⁾ (図 3)。この Ca^{2+} 波の伝播は P2Y1 受容体のアンタゴニストである MRS2179 で阻害され、ギャップ結合の阻害剤では阻害されない。タッチ刺激により 1 つの絨毛上皮下線維芽細胞から放出される ATP を Luciferin-Luciferase 発光法で可視化することができる (図 4)。ATP の拡散に伴い次々と周りの細胞の P2Y1 受容体が活性化されて細胞内 Ca^{2+} が上昇し、細胞間 Ca^{2+} 波が伝播していく¹²⁾。この細胞はフラットな形では ATP や ET に反応して細胞内 Ca^{2+} が上昇すると数十秒間収縮して弛緩するが、機

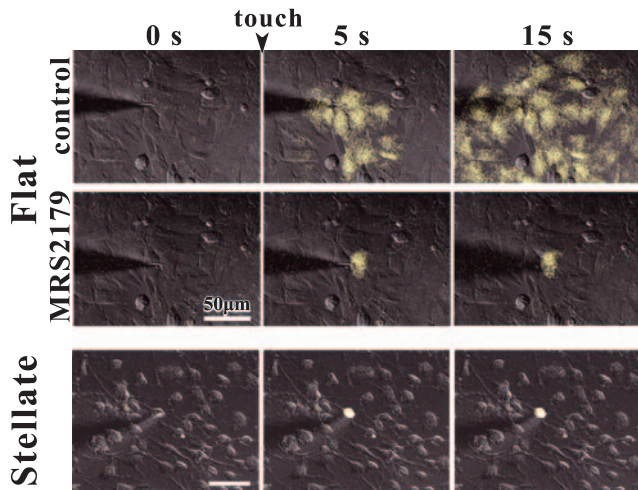


図3 機械的刺激による Ca^{2+} 波の発生. フラットな形態の細胞では、タッチ刺激により細胞内 Ca^{2+} が上昇すると共に周りの細胞へ Ca^{2+} 波が伝播する (control) が、P2Y1 受容体のアンタゴニスト MRS2179 により阻害される. 又、dBcAMP 処理により星状に変化した細胞では Ca^{2+} 波の伝播は起こらない.

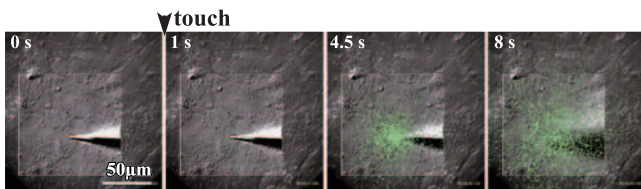


図4 タッチ刺激により細胞から ATP が放出され拡散していく様子を Luciferin-Luciferase 発光法で可視化し、高感度 CCD カメラで撮影した.

機械的刺激による Ca^{2+} 波の発生に伴って収縮の波も細胞網を伝播する¹²⁾.

5-2 機械刺激受容能の形態依存性

絨毛上皮線維芽細胞は機械刺激に反応するメカノセンサーであるが、その感受性は細胞の形に依存して変化する. dBcAMP 処理により星状に変化した細胞では、機械刺激による細胞間 Ca^{2+} 波の伝播は起きない¹²⁾ (図3). ATP 受容体の感受性の低下が一部関与しているが、主な原因は放出 ATP 量の減少である. 伸展刺激時の放出 ATP 量を Luciferin-Luciferase 発光法にて測定すると、星状の形態では 1/10 以下であり、ET-1 投与でフラットの形態に戻ると放出量は回復し増強も見られた¹²⁾. サイトカラシン D 処理によっても ATP の放出は阻害されることから、ATP の放出機序には F-アクチンが関与していると考えられる. アストロサイトではギャップ結合のヘミチャネル²⁵⁾ からの ATP 放出が報告されているが、絨毛上皮線維芽細胞での放出経路は不明である. アストロサイトや絨毛上皮線維芽細胞では種々の機械的および化学的なシグナルに対して細胞の形態と Ca^{2+} 波の伝播が変化し、局所的な機能制御が行われていると考えられる.

5-3 絨毛上皮線維芽細胞と神経細胞間のシグナリング

消化管では食べ物や水による機械的及び化学的刺激によりエンテロクロマフィン細胞や吸収上皮細胞から ATP やセロトニンが放出され²⁶⁾, P2X2, P2X3 イオンチャネル型 ATP 受容体を持つ内在性知覚神経 (IPAN) が興奮して腸管反射が引き起こされると考えられてきた^{27,28)}. 小腸絨毛上皮線維芽細胞は機械的刺激に反応して ATP を放出する. そこで、ATP 受容体を発現している神経モデル細胞 (NG108-15) と絨毛上皮線維芽細胞を共培養し、1つの上皮線維芽細胞にタッチ刺激を与えると、 Ca^{2+} 波は上皮線維芽細胞網のみならず NG108-15 細胞にも伝播した¹²⁾. この実験結果から、機械的刺激により絨毛上皮線維芽細胞から放出される ATP 量は生体内においても内在性知覚神経を興奮させる可能性が示された. 又、絨毛上皮線維芽細胞はサブスタンス-P に反応し、神経との間にシナプス様構造が存在することから、遠心性神経からの入力も受けていると考えられる.

6. おわりに

小腸絨毛上皮線維芽細胞における速かで可逆的な形態変化は、ギャップ結合を介した細胞間情報伝達には影響が小さいが、ATP を介した細胞間シグナリングや細胞の収縮性には大きな影響を与える (図5). 小腸絨毛において上皮線維芽細胞は下部 1/3 ではフラットで細胞間隙は小さいが、上部 2/3 では星状の形態を示し細胞間に 0.3-5 μm の間隙が生じてこの間隙をリンパ球などの免疫系細胞や栄養物、水などが通過している^{4,8)} (図6). 機械的な刺激に対して絨毛上部

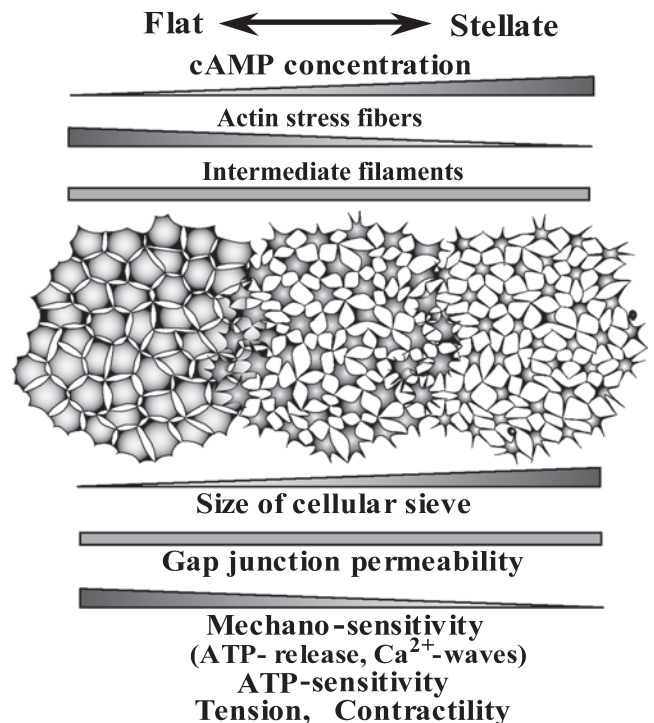


図5 形態変化と機能の関係を示す模式図.

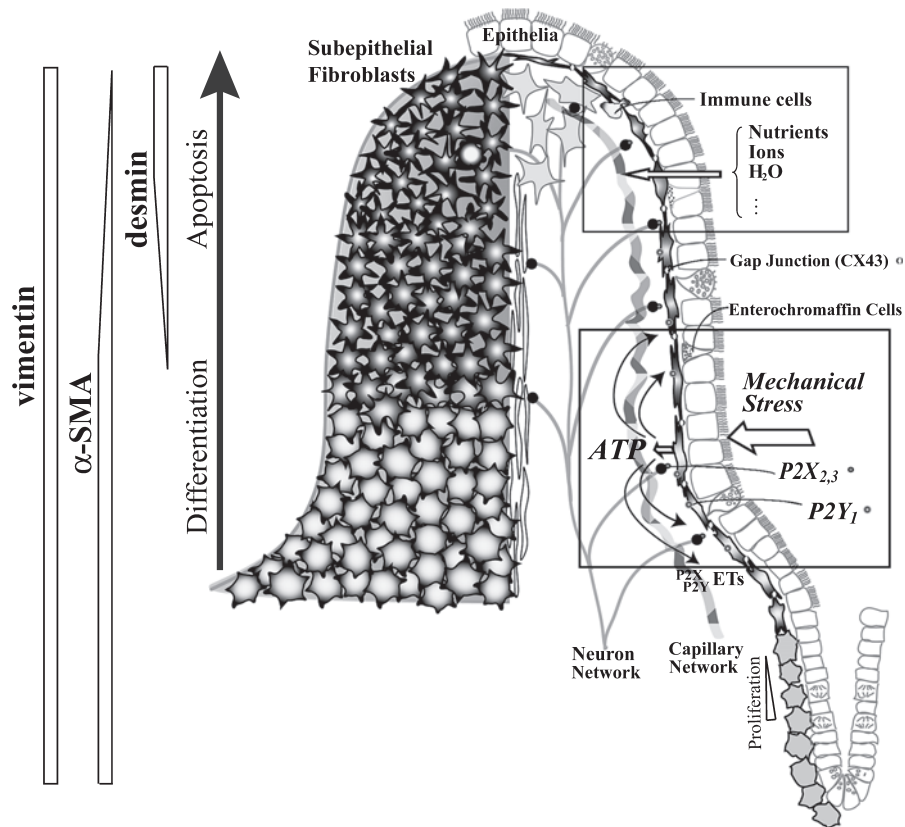


図6 小腸絨毛における上皮線維芽細胞の役割.

- 1) 細胞間隙の制御: 絨毛上部では星状の上皮下線維芽細胞の間隙を水や栄養物, 免疫細胞が通過している. 種々の要因で形態が変化すると, 細胞間隙の大きさが変化し物質や細胞の通過が制御される.
- 2) メカノセンサーとしての役割: 絨毛上皮線維芽細胞は機械的刺激にตอบสนองして ATP を放出する. ATP の拡散に伴い Ca^{2+} 波や収縮波が細胞網に伝播すると共に, 隣接した知覚神経や毛細血管が活性化される. 細胞がフラットな形態を示す絨毛下部で機械受容感受性が高い. 絨毛上下での収縮性の違いは絨毛全体の動きや柔軟さの制御にも関わっている.

は反応性が低い, 下部は反応性が高く ATP が多量に放出されて大きな Ca^{2+} 波が発生し収縮波も細胞網に伝播する. 絨毛上皮線維芽細胞の放出する ATP は内在性知覚神経の興奮に大きく寄与していると考えられる. 又, 上皮線維芽細胞網は P2Y や P2X 受容体を持つ毛細血管網に覆い被さっており, ATP の放出や細胞網の収縮は血流に影響を与える可能性が高い. 絨毛上皮線維芽細胞はノンプロフェッショナルな抗原提示細胞であるが, 血管内皮細胞や肥満細胞, マクロファージ²⁹⁾ から放出される ET によりフラットに形態変化して細菌などに対する物理的な防御壁としても機能していると考えられる. 絨毛上皮線維芽細胞のユニークな特性は栄養物や水などの物質透過や免疫防御機構, 腸管反射など小腸における多くの機能の局所的な制御に寄与していると思われる.

文 献

- 1) Güldner, F.H., Wolff, J.R. and Keyserlingk, D.G.: *Z. Zellforsch Mikrosk. Anat.*, 135, 349-360 (1972)
- 2) Desaki, J., Fujiwara, T. and Komuro, T.: *Arch. Histol. Jpn.*, 47, 179-186 (1984)
- 3) Joyce, N.C., Haire, M.F. and Palade, G.E.: *Gastroenterology*, 92, 68-81 (1987)
- 4) Komuro, T. and Hashimoto, Y.: *Arch. Histol. Cytol.*, 53, 1-21 (1990)
- 5) Powell, D.W., Mifflin, R.C., Valentich, J.D., Crowe, S.E., Saada, J.I. and West, A.B.: *Am. J. Physiol.*, 277, C183-201 (1999)
- 6) Saada, J.I., Pinchuk, I.V., Barrera, C.A., Adegboyega, P.A., Suarez, G., Mifflin, R.C., Di Mari, J.F., Reyes, V.E. and Powell, D.W.: *J. Immunol.*, 177, 5968-5979 (2006)
- 7) Parker, F.G., Barnes, E.N. and Kaye, G.I.: *Gastroenterology*, 67, 607-621 (1974)
- 8) Desaki, J. and Shimizu, M.: *J. Electron Microsc. (Tokyo)*, 49, 203-208 (2000)
- 9) Toyoda, H., Ina, K., Kitamura, H., Tsuda, T. and Shimada, T.: *Acta Anat.*, 158, 172-184 (1997)
- 10) Furuya, S. and Furuya, K.: *International Review of Cytol.*, 264, 165-223 (2007)
- 11) Furuya, S. and Furuya, K.: *Anat. Embryol.*, 187, 529-538 (1993)
- 12) Furuya, K., Sokabe, M. and Furuya, S.: *J. Cell Sci.*, 118, 3289-3304 (2005)
- 13) Valentich, J.D., Popov, V., Saada, J.I. and Powell, D.W.: *Am. J. Physiol.*, 272, C1513-1524 (1997)
- 14) Adegboyega, P.A., Mifflin, R.C., DiMari, J.F., Saada, J.I. and Powell, D.W.: *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 126, 829-836 (2002)

- 15) Goldman, J.E. and Abramson, B.: *Brain Res.*, **528**, 189–196 (1990)
- 16) Furuya, K., Furuya, S. and Yamagishi, S.: *Pflügers Arch.*, **428**, 97–104 (1994)
- 17) Furuya, S., Furuya, K., Sokabe, M., Hiroe, T. and Ozaki, T.: *Cell Tissue Res.*, **319**, 103–119 (2005)
- 18) Solan, J.L. and Lampe, P.D.: *Biochem. Biophys. Acta*, **171**, 154–163 (2005)
- 19) Giaume, C., Cordier, J. and Glowinski, J.: *Eur. J. Neurosci.*, **4**, 877–881 (1992)
- 20) Blomstrand, F., Venance, L., Siren, A.L., Ezan, P., Hanse, E., Glowinski, J., Ehrenreich, H. and Giaume, C.: *Eur. J. Neurosci.*, **19**, 1005–1015 (2004)
- 21) Mème, W., Calvo, C-F, Froger, N., Ezan, P., Amigou, E., Koulakoff, A. and Giaume, C.: *FASEBJ*, **20**, 494–496 (2006)
- 22) Burnstock, G. and Knight, G.E.: *Int. Rev. Cytol.*, **240**, 31–304 (2004)
- 23) Guthrie, P.B., Knappenberger, J., Segal, M., Bennett, M.V., Charles, A.C. and Kater, S.B.: *J. Neurosci.*, **19**, 520–528 (1999)
- 24) 古家喜四夫, 中野春男, 榎本浩一: *生体の科学*, **52**, 138–144 (2002)
- 25) Stout, C.E., Costantin, J.L., Naus, C.C. and Charles, A.C.: *J. Biol. Chem.*, **277**, 10482–10488 (2002)
- 26) Cooke, H.J., Wunderlich, J. and Christofi, F.L.: *News Physiol. Sci.*, **18**, 43–49 (2003)
- 27) Castelucci, P., Robbins, H.L., Poole, D.P. and Furness, J.B.: *Histochem. Cell Biol.*, **117**, 415–422 (2002)
- 28) Bian, X., Ren, J., DeVries, M., Schnegelsberg, B., Cockayne, D.A., Ford, A.P. and Galligan, J.J.: *J. Physiol.*, **551**, 309–322 (2003)
- 29) Liu, Y., Yamada, H. and O, J.: *Histochem. Cell Biol.*, **109**, 301–307 (1998)