

知覚終末シュワン細胞のプリン作動性信号系

Purinergic Signaling in Terminal Schwann Cells Associated with Sensory Endings

岩 永 ひろみ

Hiromi Takahashi-Iwanaga

北海道大学大学院医学研究科組織細胞学分野

要 旨 皮膚機械刺激受容器のグリアである終末シュワン細胞は、突起の先が分かれて異なる軸索終末を被う薄板をなす点の特徴とする。私たちは、ラット洞毛の動き受容器槍型終末の分離標本を用いた生理実験で、この細胞が細胞間信号物質 ATP の刺激に対し、プリン受容体 P2Y₂ を介して Ca 応答することを見出した。ここでは、私たちの最近の共焦点画像解析に基づき、(1) 終末シュワン細胞の各薄板突起が局所機械刺激で遊離する ATP を自身の受容体で検知し突起の長さに限局した Ca 信号を生成し得ること、(2) 内因性細胞外 ATP 分解酵素が細胞内信号伝播範囲を制限していること、(3) Ca 信号系分子群のシュワン薄板へのカベオラ依存的な局在がプリン作動性信号の細胞内区域化に欠かせないこと、を示したい。区域化された信号が惹き起こすシュワン細胞の活動が、生体内の器官で伴行軸索機械受容器に及ぼし得る効果について考察する。

キーワード：機械刺激受容器、槍型終末、ATP、グリア、共焦点顕微鏡

1. はじめに

イオンチャネル型 P2X と G 蛋白共役型 P2Y のプリン受容体発見を契機とした研究の進展は、アデノシン 5'-三リン酸 (ATP) などのプリン体が局所ホルモンとして広く生体機能調節に関わることを明らかにした^{1,2)}。ニューロンとグリアも、信号物質として ATP を相互に分泌・受容し調節効果を及ぼし合う^{3~5)}。Nakamura & Strittmatter (1996)⁶⁾ は、後根神経節ニューロンの mRNA をツメガエル卵細胞に発現させて接触刺激を与えたときの電氣的応答をしらべる実験によって、プリン受容体 P2Y₁ が皮膚の知覚神経終末で刺激に応じた活動電位生成に貢献する可能性を示した。いっぽう、知覚終末の特異なグリアである終末シュワン細胞は P2Y₂ 受容体を持ち、局所機械刺激で細胞外に遊離する ATP に対し、受容体を介した細胞内 Ca²⁺ 濃度上昇反応を示す⁷⁾。こうした所見は、プリン作動性信号に基づくニューロン・グリア間の相互作用が、皮膚感覚装置の機能調節に深く関わることを示唆する。

マイスナー触覚小体など、皮膚の機械刺激受容器は、ニューロン軸索の膨らみを終末シュワン細胞の薄板突起がサンドイッチした、三つ組みを共通の構造単位として含む^{8,9)}。終末シュワン細胞は分岐する突起をもち、その枝先がそれぞれ異なる軸索終末を被う薄板をつくっている^{10~12)}。細胞外 ATP に対する Ca 応答が、この奇態な細胞のどこに始まりどの範囲に伝播するかは、Ca 信号の賦活する細胞活動が軸索終末に与

える影響を予測する上で重要であろう。Idé & Saito (1980)¹³⁾ は光顕・電顕レベルの酵素組織化学で、皮膚知覚終末に細胞外 ATP 分解酵素の強い活性を検出したが、その局所プリン作動性信号系への調節効果は明らかでない。また、知覚終末シュワン薄板の細胞膜は多数の小陥凹カベオラを示し^{8,9)}、ここに、Ca 信号系分子を集積させる足場蛋白 caveolin-1 の局在が免疫組織化学的に報告されているが¹⁴⁾、その機能的意義は不明である。こうした点について、私たちが毛の動き受容器槍型終末分離標本の Ca 画像解析でしらべた結果を示し、終末シュワン細胞の機械刺激受容に果たす役割について考えたい。

2. 洞毛周囲槍型神経終末の形態特徴と分離組織標本の作成

槍型神経終末は、毛包に沿って上行する有髄線維の終末が髄鞘を失ってランセット状に膨らんだもので、毛包頸部を矢来のように取り囲む。材料として用いたラットの頬ひげは、血管洞が毛包を取り巻く洞毛であり、槍型受容器は毛包基底膜と血管洞の間の薄い結合組織内に並んでいる (図 1)。この結合組織層をコラゲナーゼ消化で膜片として分離し、基底膜側が下になるようにして観察チャンパー底に貼り付け、刺激を与えたときの終末シュワン細胞の細胞内 Ca²⁺ 濃度変化を Fluo-4 蛍光画像として共焦点顕微鏡で記録・解析した。

槍型終末に随伴するシュワン細胞は、丸い細胞体の一端から結合索と呼ばれる紐状の突起をのぼし、その先が 2-5 つに分かれて薄板状の終足をなし、軸索ランセットの平らな面を被う (図 2)。ガラスチャンパー上に展開した膜片標本では、ランセット終末両脇のグリア薄板とそれに続く結合索・シュワン細胞体が、しばしば、同一共焦点面上にとらえられる。

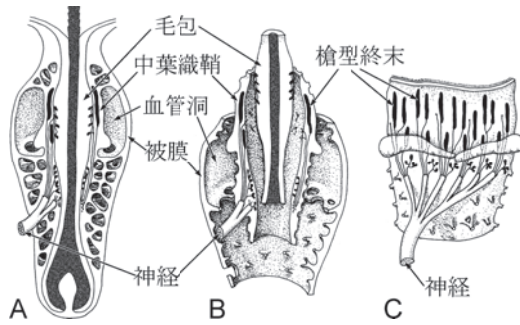


図1 ラット洞毛槍型知覚終末の分離過程。A. 毛根部の縦断。毛包と血管洞の間の結合組織層，中葉織鞘に槍型終末が分布。B. コラゲナーゼ処理によって被膜を除去し，中葉織鞘を毛包から剥離。C. 剥離した中葉織鞘を観察チャンパー底に展開。

3. プリン作動性グリア信号の時空特徴

観察チャンパーを灌流する培養液に ATP 10 μ M を加えて終末シュワン細胞を刺激したところ，まず，薄板で細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が起こり，3-10 秒遅れて，細胞体の Ca 応答が観察された。この Ca^{2+} 濃度変動は，各薄板の先端または中間部の特異な焦点に始まり，波として突起全体に速やかに広

がったのち結合索を介して細胞体に伝播した (図2)。一定の回復時間後に標本を再刺激すると細胞応答は再現され，シュワン薄板内の信号生成焦点の位置にも細胞各部位の応答順序にも変化はみられなかった¹⁵⁾。

ところで，グリア細胞を含めた非興奮性細胞は，損傷を与えない程度の軽い機械刺激に応じ未解明の機構によって ATP を放出することが知られる^{16,17)}。そこで，マイクロマニピュレーターに取り付けた直径約 2 μ m の微小ガラス棒の先端で分離標本に軽く触れ，このとき局所に遊離する ATP に対する終末シュワン細胞の Ca 応答を記録・解析した。ひとつの槍型終末にガラス棒に触れると，まず，刺激局所のシュワン薄板が応答し，つづいて，機械刺激で遊離した細胞外 ATP の拡散を示唆して，周辺の槍型終末のシュワン薄板が刺激点からの距離に応じた長さの潜時で，つぎつぎと一過性の Ca^{2+} 濃度上昇を示した(図3)。直接機械刺激を受けなかったグリア薄板の Ca 応答は，各薄板固有の焦点に始まって薄板内に広がった後，急速に減衰・消滅し，決して，他の細胞部位に波及しなかった。この薄板間 Ca 信号伝播が細胞外 ATP に依存することは，観察チャンパーを満たす培養液に ATP 分解酵素 apyrase を加える実験によって確認された¹⁸⁾。これらの結果は，終末シュワン細胞の各薄板突起が，局所ブ



図2 プリン作動性に誘発される槍型終末シュワン細胞の Ca 応答。左は，生理実験後ホルマリン固定し，グリア特異蛋白 S100 の蛍光免疫染色を施した分離標本の共焦点立体再構築。槍 (L) の両面を被うシュワン薄板が細長い結合索を介し，細胞体 (S) に続く。四角領域の Ca^{2+} 濃度変動を，Fluo-4 蛍光 F の増加分の初期値 F_0 に対する比 $(F - F_0)/F_0$ を指標とし，0.1 秒毎のコマ取り連続画像で右に示す。ATP 10 μ M を含む培養液による標本灌流開始を 0 秒とした時間を 5 コマ毎に表示。

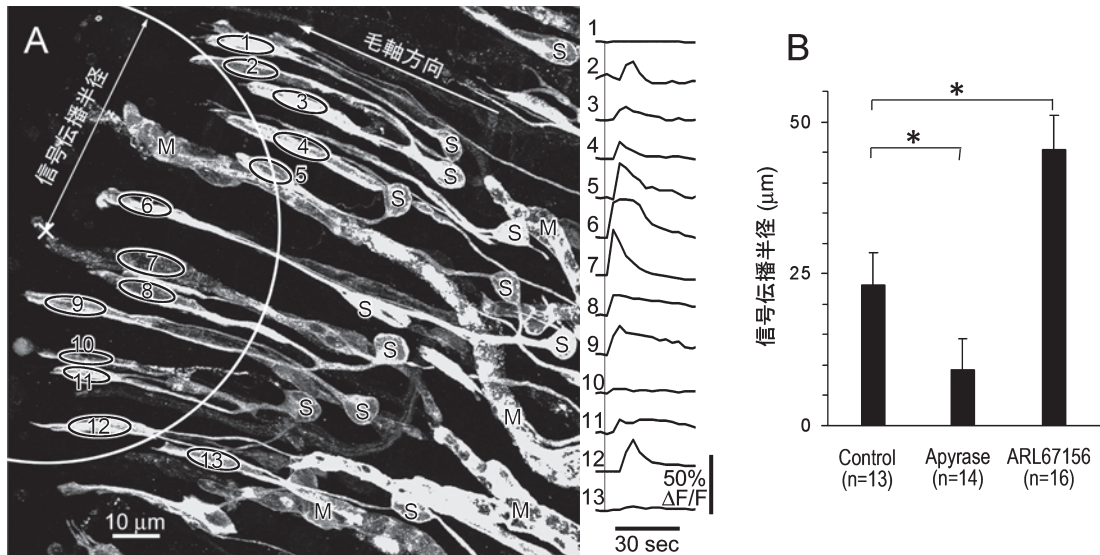


図3 機械刺激誘発性ATP放出に対する槍型終末シュワン薄板のCa²⁺応答。A. 標本チャンパーに細胞外ATP分解酵素阻害剤ARL67156を300 μM含む培養液を満ちし、×で示す点に微小ガラス棒で触れた。領域1-13のCa²⁺濃度の時間経過をFluo-4蛍光Fの増加分の初期値に対する比として、対応する番号の曲線で示す。グラフの縦線は接触刺激。B. Aと同様の実験を正常緩衝液中（Control）、20 U/mlのATP分解薬aprase存在下、または、300 μMのARL67156存在下で行ったときの薄板間Ca²⁺信号伝播範囲の比較。*は、ステューデントのt testによる有意差（P<0.01）。

リン作動性刺激に対し自身の受容体を介して独自のCa²⁺信号を生成できる、独立機能領域であることを示す。

4. 細胞外ATP分解酵素によるグリア信号の伝播調節

グリア細胞を含む種々の培養細胞の実験によれば、局所機械刺激で遊離するATPの傍分泌の効果に基づく細胞間Ca²⁺信号は、しばしば、刺激点から半径100 μm以上の範囲に伝播する。これに対し、分離槍型終末のシュワン薄板を応答単位とする信号伝播範囲は、刺激点から約30 μm以内に限定される（図3）。そこで、組織の内因性細胞外ATP分解酵素¹³⁾が信号伝播に及ぼす調節的效果を検討する目的で、特異的酵素阻害剤ARL67156を培養液に加え、機械刺激誘発性ATP放出に対するシュワン薄板の応答を画像解析した。

機械刺激用ガラス棒の接触点を中心とする円内の槍型終末86%以上からシュワン薄板のCa²⁺応答が検出される最大の円半径を薄板間信号伝播距離として計測したところ、細胞外ATP分解酵素阻害剤ARL67156を300 μM含む培養液中では正常対照よりも有意に伝播距離が拡大するのが観察された（図3）。また、ARL67156存在下では、プリン作動性信号がシュワン細胞の1つの薄板内に留まらず、細胞内Ca²⁺波として、結合索や細胞体へ、さらにそれらを介して同じ細胞の別の薄板にまで伝播する例が、しばしば観察された。こうして、細胞外ATP分解酵素による信号伝播調節が、各軸索終末に伴行するグリア薄板を機能単位とするプリン作動性信号系の構築に欠かせないことが示された。

5. カベオラ依存的にグリア薄板に集積するCa²⁺信号系分子

カベオラの細胞内分布を、グルタルアルデヒド灌流固定組

織の透過電顕観察と、パラホルムアルデヒド固定凍結切片のcaveolin-1免疫染色でしらべたところ、槍型終末シュワン細胞のカベオラは、細胞体や結合索よりも薄板突起に高密度に分布していた。コラゲナーゼ分離した槍型終末のシュワン細胞を同様の方法でしらべた場合も、カベオラは薄板に特異的に集まっていた。

つぎに、ATPに対する終末シュワン細胞の応答責任受容体P2Y₂とその共役分子G_{q/11}の細胞内局在を、それぞれの特異抗体を用いた免疫組織化学によって槍型終末分離標本でしらべたところ、これらの機能分子はcaveolin-1とともに、軸索終末を包む薄板突起に集まっていることがわかった（図4）。細胞膜のコレステロール除去剤methyl-β-cyclodextrinで分離標本を処理してカベオラを壊すと、上記3種の物質のシュワン薄板への局在傾向は、どれも著しく減弱した（図5, 6）。

Ca²⁺信号系分子のカベオラ依存的細胞内局在の機能的意義をしらべるため、同一分離標本をmethyl-β-cyclodextrin処理してカベオラを除去する前と後で、チャンパー灌流液に10 μM ATPを加えたときの終末シュワン細胞の応答を画像記録・比較した。刺激剤に対する細胞応答の大きさは、処理前後で殆ど変わらなかったが、カベオラ除去後、シュワン薄板の応答潜時が細胞体のそれに比較して有意に遅延し、ときに、細胞体のCa²⁺濃度上昇が薄板応答に先行する例さえ観察された。カベオラ除去後の薄板内Ca²⁺波は、除去前と同じ生成焦点から発せられたが、しばしば、自発的な減衰や新たな焦点に由来する波との衝突によって、伝播途中で消滅した。こうして、機能分子を伴って集積するカベオラ群は、局所プリン作動性刺激に独自に応答し得る細胞内機能領域を構築することが示された¹⁹⁾。

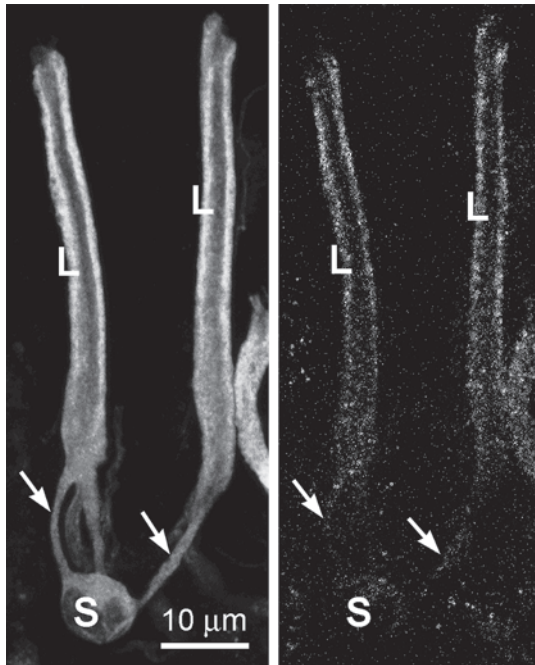


図4 ホルマリン固定し蛍光免疫二重染色を施した正常分離槍型終末の共焦点立体再構築. 左はグリア特異蛋白 S100 の抗体, 右はプリン受容体 P2Y₂ の抗体による標識を示す. 後者は槍型終末 (L) を包むシュワン薄板に局限し, シュワン細胞の結合索 (矢印) と細胞体 (S) からは殆ど検出されない.

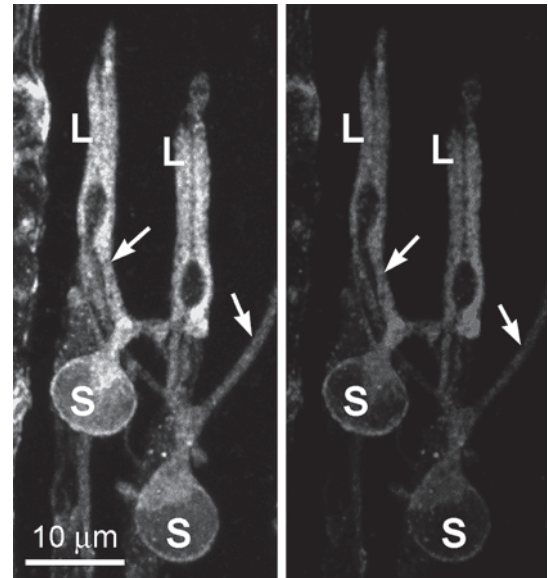


図5 カベオラ消去剤 methyl-β-cyclodextrin (2% 室温 40 分間) 処理後, 図4と同様に免疫染色した分離槍型終末. 左は S100 抗体, 右は P2Y₂ 抗体による標識. シュワン薄板 (L) もその結合索 (矢印) と細胞体 (S) も, 弱い P2Y₂ 免疫活性を示す.

6. プリン作動性グリア信号の生体内での役割

生きたラットの頬ひげ毛包では, どのようにして終末シュワン細胞のプリン作動性信号が賦活されるだろうか. マイルドな機械的刺激に応じた ATP 分泌は, ニューロンやシュワン細胞のほか, 線維芽細胞, 表皮ケラチノサイトなどでも起こることが, 培養系の実験で示されている^{2,20}. また, ニューロンでは電気的興奮に伴い ATP が放出される例も知られる^{6,21}. したがって, 頬ひげが動いて組織が変形するたびに, そうした複数起源の細胞外 ATP が知覚終末シュワン薄板の Ca 信号を惹き起こすと考えるのは, そう不合理ではない. 外力によって頬ひげがある方向に曲げられると, まず, 毛包周囲の比較的組織変形の大きい領域で槍型受容体の軸索終末

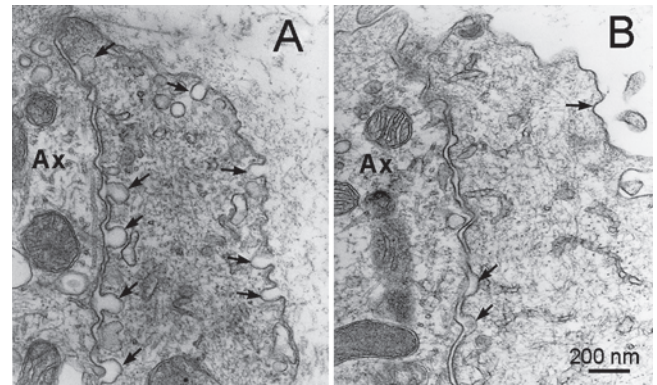


図6 Methyl-β-cyclodextrin のカベオラ消去効果. 分離槍型終末標本を正常緩衝液中 (A), または, methyl-β-cyclodextrin 2% を加えた緩衝液中 (B) に, 室温で 40 分間置いてグルタルアルデヒド固定し, 常法に従って透過電顕観察した. A ではシュワン薄板が多数のカベオラ (矢印) を見せるのに対し, B では, ごく少数の痕跡的な窪みしか認められない (矢印). Ax, 軸索終末.

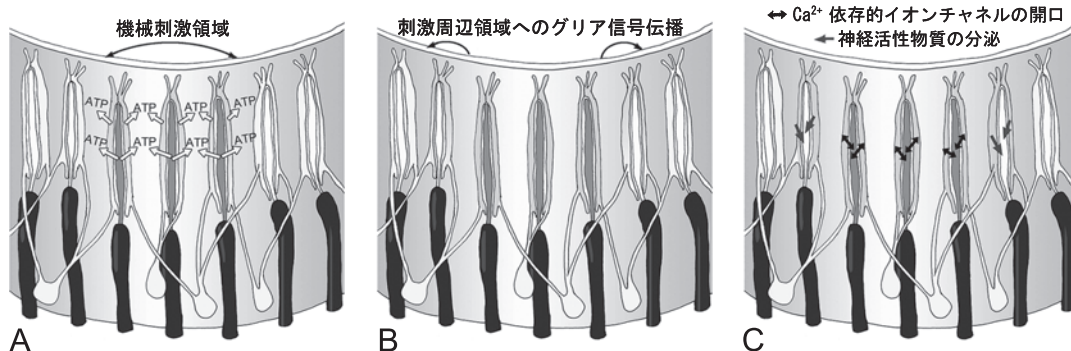


図7 生体内で予測される槍型終末グリア薄板のプリン作動性信号伝播.

が電氣的に興奮し、ほぼ同時に、伴行するシュワン薄板のCa信号も賦活される(図7A)。つぎに、ATPの自己分泌・傍分泌の効果で、Ca信号は機械刺激入力領域周辺の槍のシュワン薄板に伝播する(図7B)。ラットは、頬ひげをひくひくと規則的に動かして対象を繰り返しなぞり、その形や質感を把握するという²¹⁾。そうした探索行動のあいだ、刺激入力領域シュワン薄板のプリン作動性信号は、自身の細胞膜のCa²⁺依存的イオンチャネルの開閉調節を通して間質イオン環境の恒常性を保ち^{23,24)}、軸索終末の持続的興奮を助けるかもしれない。いっぽう、刺激周辺領域のシュワン薄板の信号活性化は、薄板からのATPやグルタミン酸などの生理活性物質の放出を促し^{25~28)}、軸索終末の興奮性調節に役立つかもしれない(図7C)。

光学顕微鏡の時代、Zimmermann (1935)はそれまで種々の知覚終末で観察されていたフラスコ形やフォーク形の細胞を自ら改良した鉄ヘマトキシリン染色法で精査し、それらが、軸索に寄り添う特殊なシュワン細胞であると看破し、ある種の感覚細胞として機能する可能性を指摘した²⁹⁾。新しいCa画像化技術が示すこの細胞の機械刺激に対する応答性は、皮膚感覚装置のシュワン細胞が動的機能要素であるとの古典的推測に、私たちを再び向き合わせる。こうしたプリン作動性信号を介するシュワン細胞と伴行ニューロン軸索との相互作用の解明には、より器官に近いタイプの分離標本を用いた実験や、関連機能分子の遺伝的改変動物を用いた広範な研究が必要であろう。

文 献

- 1) Ralevic, V. and Burnstock, G.: *Pharmacol. Rev.*, **50**, 413–492 (1998)
- 2) 古家園子, 古家喜四夫: 顕微鏡, **43**, 85–89 (2008)
- 3) Newman, E.A.: *J. Neurosci.*, **23**, 1659–1660 (2003)
- 4) Haydon, P.G. and Carmignoto, G.: *Physiol. Rev.*, **86**, 1009–1031 (2006)
- 5) Gulbransen, B.D. and Sharkey, K.A.: *Gastroenterology*, **136**, 1349–1358 (2009)
- 6) Nakamura, F. and Strittmatter, S.M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*,

- 93, 10405–10470 (1996)
- 7) Takahashi-Iwanaga, H. and Habara, Y.: *Neurosci. Lett.*, **324**, 137–140 (2002)
- 8) Andres, K.H. and von Düring, M.: Morphology of cutaneous receptors.: in Iggo, A. (Ed.), *Handbook of sensory physiology*, vol II. Somatosensory system, Springer, Berlin, 3–28 (1973)
- 9) Munger, B.L. and Ide, C.: *Arch. Histol. Cytol.*, **51**, 1–34 (1988)
- 10) Kannari, K.: *Arch. Histol. Cytol.*, **53**, 559–573 (1990)
- 11) Takahashi-Iwanaga, H.: *J. Comp. Neurol.*, **426**, 259–269 (2000)
- 12) Takahashi-Iwanaga, H. and Shimoda, H.: *J. Neurocytol.*, **32**, 363–371 (2003)
- 13) Idé, C. and Saito, T.: *J. Neurocytol.*, **9**, 207–218 (1980)
- 14) Iizuka, N., Suzuki, A., Nozawa-Inoue, K., Kawano, Y., Nandasena, B.G.T.L., Okiji, T. and Maeda, T.: *J. Anat.*, **214**, 267–274 (2009)
- 15) Takahashi-Iwanaga, H. and Habara, Y.: *J. Comp. Neurol.*, **475**, 416–425 (2004)
- 16) Enomoto, K., Furuya, K., Yamagishi, S., Oka, T. and Maeno, T.: *Pflugers Arch.*, **427**, 533–542 (1994)
- 17) Cotrina, M.L., Lin, J.H. and Nedergaard, M.: *J. Neurosci.*, **18**, 8794–8804 (1998)
- 18) Takahashi-Iwanaga, H., Nio-Kobayashi, J., Habara, Y. and Furuya, K.: *J. Comp. Neurol.*, **510**, 68–78 (2008)
- 19) Takahashi-Iwanaga, H. and Iwanaga, T.: *J. Comp. Neurol.*, in press
- 20) Lazarowski, E.R., Boucher, R.C. and Harden, T.K.: *Mol. Pharmacol.*, **64**, 785–795 (2003)
- 21) Stevens, B. and Fields, R.D.: *Science*, **287**, 2267–2271 (2000)
- 22) Kleinfeld, D., Ahissar, E. and Diamond, M.E.: *Curr. Opin. Neurobiol.*, **16**, 435–444 (2006)
- 23) Amédée, T. and Despeyroux, S.: *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **259**, 277–284 (1995)
- 24) Colomar, A. and Amédée, T.: *Eur. J. Neurosci.*, **14**, 927–936 (2001)
- 25) Parpura, V., Liu, F., Jęftinija, K.V., Haydon, P.G. and Jęftinija, S.D.: *J. Neurosci.*, **15**, 5831–5839 (1995)
- 26) Jęftinija, S.D. and Jęftinija, K.V.: *Neuroscience*, **82**, 927–934 (1998)
- 27) Liu, G.J., Werry, E.L. and Bennett, M.R.: *Eur. J. Neurosci.*, **21**, 151–160 (2005)
- 28) Pawson, L., Prestia, L.T., Mahoney, G.K., Guclu, B., Cox, P.J. and Pack, A.K.: *J. Neurosci.*, **29**, 2695–2705 (2009)
- 29) Zimmermann, K.W.: *Z. mikrosk.-anat. Forsch.*, **38**, 503–553 (1935)