

皮膚感覚神経-毛包幹細胞相互依存における基底膜領域特殊化の役割

理化学研究所 多細胞システム形成研究センター細胞外環境研究チーム

藤原 裕展

Accurate sensory perception requires the precise targeting and structure of sensory nerve endings and specialized non-neural end cells. However, the mechanisms that regulate the sensory terminal architecture remain poorly understood. We demonstrated that an extracellular matrix protein, EGFL6, which is localized in the upper bulge region of mouse hair follicles, sustains the architecture and location of the piloneural mechanoreceptor complex. During development of the piloneural complex, EGFL6 is deposited in a highly organized palisade pattern in the upper bulge region and interdigitates tightly with protrusions of the terminal Schwann cells and sensory axon endings of the piloneural complex. In *Egfl6* null mice, the structure of the terminal Schwann cells and sensory nerves is abnormal and they are often located in positions slightly lower than normal on the hair follicle. Electrophysiological analysis of skin-nerve preparation showed the decreased mechano-sensitivity in the KO mouse. Our results indicate that the specialized extracellular matrix acts as a framework to regulate the architecture and function of sensory terminals in the hair follicle.

1. 緒言

毛を作る器官である毛包は、発生過程で神経・血管・筋肉などと正確に連結されることにより、感覚受容、体温調節、威嚇などの高次機能を創発的に獲得する。しかし、これら異なる組織間の相互作用や連結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、毛包バルジ領域のわずか上部に特異的に結合する感覚神経複合体の毛包へのターゲティングとその複雑な末端構造の形成に、バルジ上部の毛包幹細胞及び、毛包と神経複合体とのインターフェースに位置する基底膜がどのように関わっているのかを明らかにする(図1)。また、感覚神経切除により毛包幹細胞の多能性が変化することが報告されていることから¹⁾、感覚神経複合体による毛包幹細胞制御機構も解析し、基底膜を介した神経-毛包幹細胞相互依存の可能性を探求する。本研究により、触覚と毛形成とをつなぐ分子基盤の解明を目指す。

我々は、毛包と間充織組織との連結には、これら組織間の相互作用とそれを仲介する基底膜の領域特殊化が重要な役割を担っているとの仮説を立て、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への結合が、立毛筋と毛包幹細胞とを隔てるバルジ基底膜の領域特殊化によって制御されていることを見出した²⁾。分子機構としては、毛包発生過程において毛包幹細胞が基底膜分子nephronectinを分泌することにより、真皮側に存

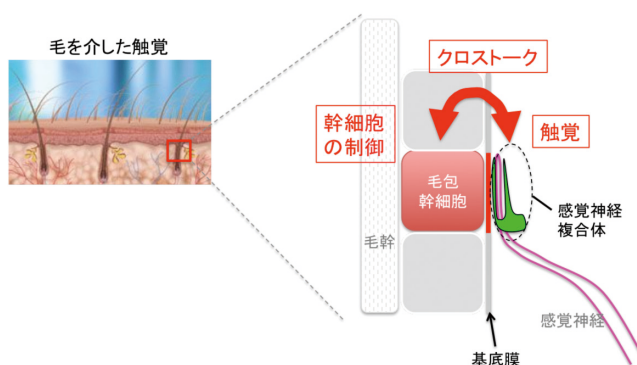


図1 特殊化された基底膜を介した皮膚感覚神経

在する立毛筋前駆細胞のバルジへの接続と立毛筋への分化を誘導するというものである。これに加え、感覚神経複合体が結合するバルジ上部の基底膜が、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(図1)。これらの知見を基盤とし、本研究ではEGFL6の役割を切り口として、皮膚感覚神経複合体と毛包幹細胞との相互作用を制御する機構の理解を目指した。

2. 実験

2.1. EGFL6抗体の作製

マウスEGFL6蛋白質を特異的に認識する抗体を作製した。抗体作製に用いる抗原を得るため、EGFL6たん白質のN末端部を欠くm*Egfl6*-Mucin-MAM-Myc-Hisコンストラクトを作製し、293細胞へ導入した後、培地への組換え蛋白質の分泌を確認した。培地に分泌されたEGFL6蛋白質を、ニッケルアフィニティカラムにより精製した。精製EGFL6をウサギに免疫し、免疫組織染色及び、ウェスタンブロッティングでEGFL6を特異的に認識する抗血清を得た。抗原アフィニティカラムを用い、抗血清からEGFL6蛋白質に特異的に結合するIgGを精製した。染色パターン



Role of the regionally specialized basement membrane in the interdependence between skin sensory nerves and hair follicle stem cells

Hironobu Fujiwara

Tissue Microenvironment, RIKEN Center for Developmental Biology

特異性は、*Egfl6* ノックアウトマウスにおける染色性の消失によって確認した。

2. 2. EGFL6 の局在解析

上記方法で作製したラビット抗マウス EGFL6 抗体により、発生期から成体にかけての EGFL6 の局在の変化を解析した。胎生 14.5 日 (E14.5), E16.5, E18.5, 生後 1 日 (P1), P5, 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 の抗体とともに染色した。

2. 3. 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(立毛筋、感覚神経など)の相互作用部位は空間的に非常に限局されており、かつ複雑な立体構造を取る。このような解剖学的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 次元的組織学を可能とする方法論の確立が必須である。ここでは、毛包、EGFL6、そして感覚神経複合体の 3 者の局在を、3 次元的に高精度で同時に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、4%パラホルムアルデヒド (PFA) で 1-3 時間固定し、皮膚ホルマウント標本とした。毛包、EGFL6、感覚神経複合体を長時間の抗体染色により標識し、組織の透明化を施した後、共焦点顕微鏡により 100 枚程度の Z-stack 画像を取得した。3 次元画像解析ソフト Imaris により Z-stack 画像を 3 次元的に再構成し、毛包-知覚神経接続部の 3 次元高精度画像を得た。

2. 4. *Egfl6* ノックアウトマウスにおける感覚神経複合体の構造解析

感覚神経複合体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における感覚神経複合体を上記 3 次元イメージング法で可視化し、その構造と配置の変化を、定量的解析を交えて検討した。

2. 5. 皮膚感覚神経の電気生理

8-12 週齢のマウス後ろ足から、感覚神経束を損じないようにして皮膚を切り出した。テストチャンバーに皮膚を固定し、32°C のクレブス溶液に浸した。A δ -LTMR (low-threshold mechano-receptor) 神経を同定し、電極を接続した。神経活動電位は DAPSYS データ取得システムで解析した。皮膚への触覚刺激は、Kleindiek nanotechnik 社の piezo-controlled micromanipulator を用い、4-1280 μ m の範囲でプローブを移動させることで、皮膚に組織の歪みを生じさせた。

3. 結果

3. 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²⁾。ここでは、独自に開発した 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 2)。毛包形成が始まると (E16.5 - 18.5)、毛芽と毛乳頭

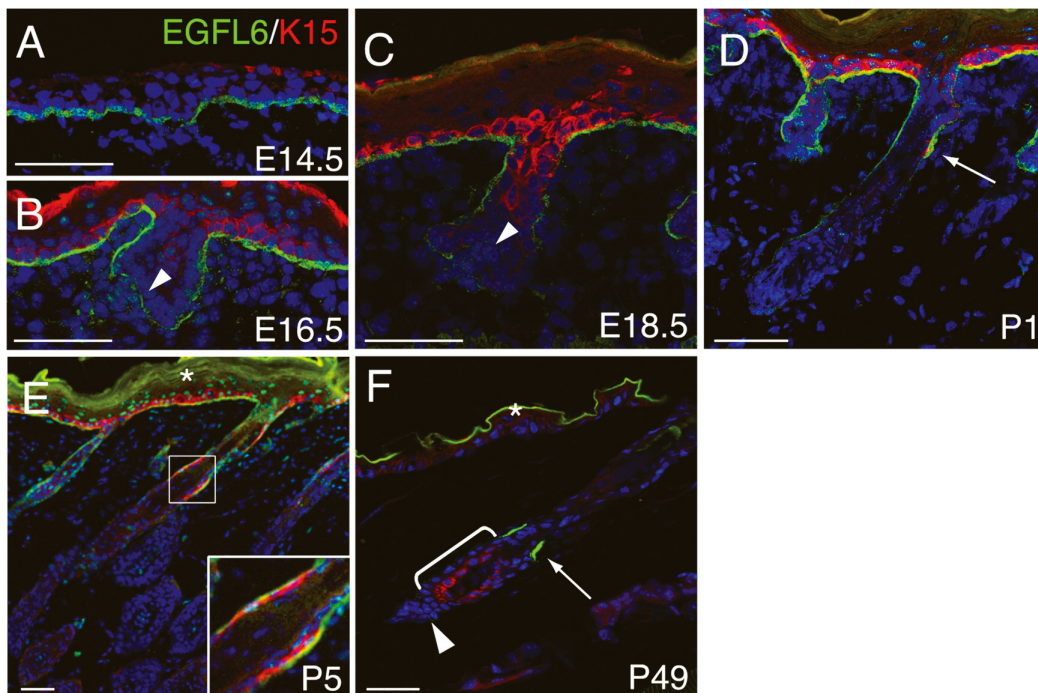


図 2 マウス背部毛包における EGFL6 蛋白質の局在。凍結組織切片を EGFL6 抗体 (緑) と毛包幹細胞マーカーである Keratin15 の抗体 (赤) で染色した。矢尻は毛包と毛乳頭の接続部を示す。バーは 50 μ m。

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領域に限局されながらも、その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の局在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。

3. 2. EGFL6と感覚神経複合体との共局在

バルジ上部には機械刺激を感知する感覚神経複合体が連続される³⁾。そこで、成体毛包において、EGFL6が感覚神経複合体と共局在するかどうかを検討した。毛包の感覚神経複合体は、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 mechanoreceptors; LTMRs) の軸索終末が、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。感覚神経複合体と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、イメージングの解像度の低さから、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3)。また、マウス背部皮膚には形態的に異なるGuard, Awl/Auchene, Zigzagと呼ばれる3種類の毛包が存在するが、全ての毛包のバルジ上部でEGFL6の柵状ストライプパターンが観察された。

EGFL6、β III-tubulin、nestinの共染色から、EGFL6は、

感覚神経とnestin陽性の終末シュワン細胞がバルジ上部に到達した後に、終末シュワン細胞の突起部の外周に沈着することが示された (図4)。特徴的なEGFL6のストライプパターンは、終末シュワン細胞がフォーク状構造を完成させてから形成されることも明らかとなった。また、蛍光染色像と電子顕微鏡写真の解析より、EGFL6は感覚神経とシュワン細胞の両者に接触する可能性が示唆された。

3. 3. *Egfl6* ノックアウトマウスにおける感覚神経複合体の構造と配置の変化

これまでの解析により、EGFL6が感覚神経複合体と高度に共局在していることが明らかとなった。ここでは、EGFL6が終末シュワン細胞と感覚神経の形態及び配置の制御に関わるかどうかを、*Egfl6* 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の数を数えたところ、*Egfl6* ノックアウトマウスにおいてその数が有意に減少していることが明らかとなった (図5)。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、突起部の幅には有意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、*Egfl6* 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。

次に、感覚神経の形態変化を検討した。Zigzag型毛包は、TrkB陽性のAδ-fiberと、Ret陽性のC-fiberから構成される。それぞれの本数と長さに変化は認められなかったが、軸索終末の平行構造が乱れ、交差を形成している軸索終末の数が有意に増加した (図6)。これらの結果から、EGFL6が感覚神経複合体の構造形成に重要な役割を果たしていることが示された。

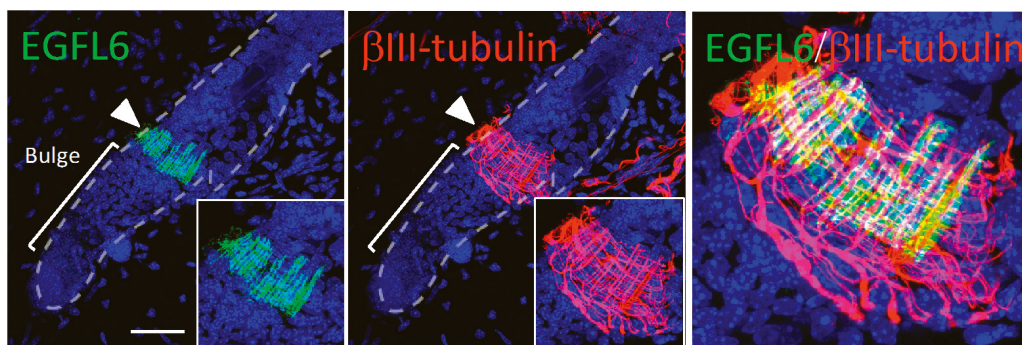


図3 皮膚3次元高解像度イメージングにより可視化されたEGFL6と感覚神経終末。マウス背部皮膚のホルマウント標本をEGFL6抗体 (緑) と神経マーカーであるβ III-tubulinの抗体 (赤) で染色した。矢印はバルジ上部を示す。バーは50μm。

3. 4. *Egfl6* ノックアウトマウスにおける触覚機能の低下

成体マウスの後肢から皮膚組織を切り出し、皮膚に機械刺激を与えた際の A δ -fiber 感覚神経の活動電位を測定した。Kleindiek piezo-controlled micromanipulator に取り付けられたプローブを、皮膚組織表面に接触させ、プローブを rostral-caudal の方向に 4-1280 μ m の範囲で動かすこと

で、皮膚に機械的刺激を与えた。その結果、EGFL6 ノックアウトマウスからの皮膚では、低度の機械刺激に対する活動電位のスパイクの数が顕著に減少していた (図 7)。一方、機械刺激の強度を増すと、その差は消失した。この結果から、感覚神経複合体周囲に局在する EGFL6 は、比較的軽い触覚刺激の受容に必須であることが示された。

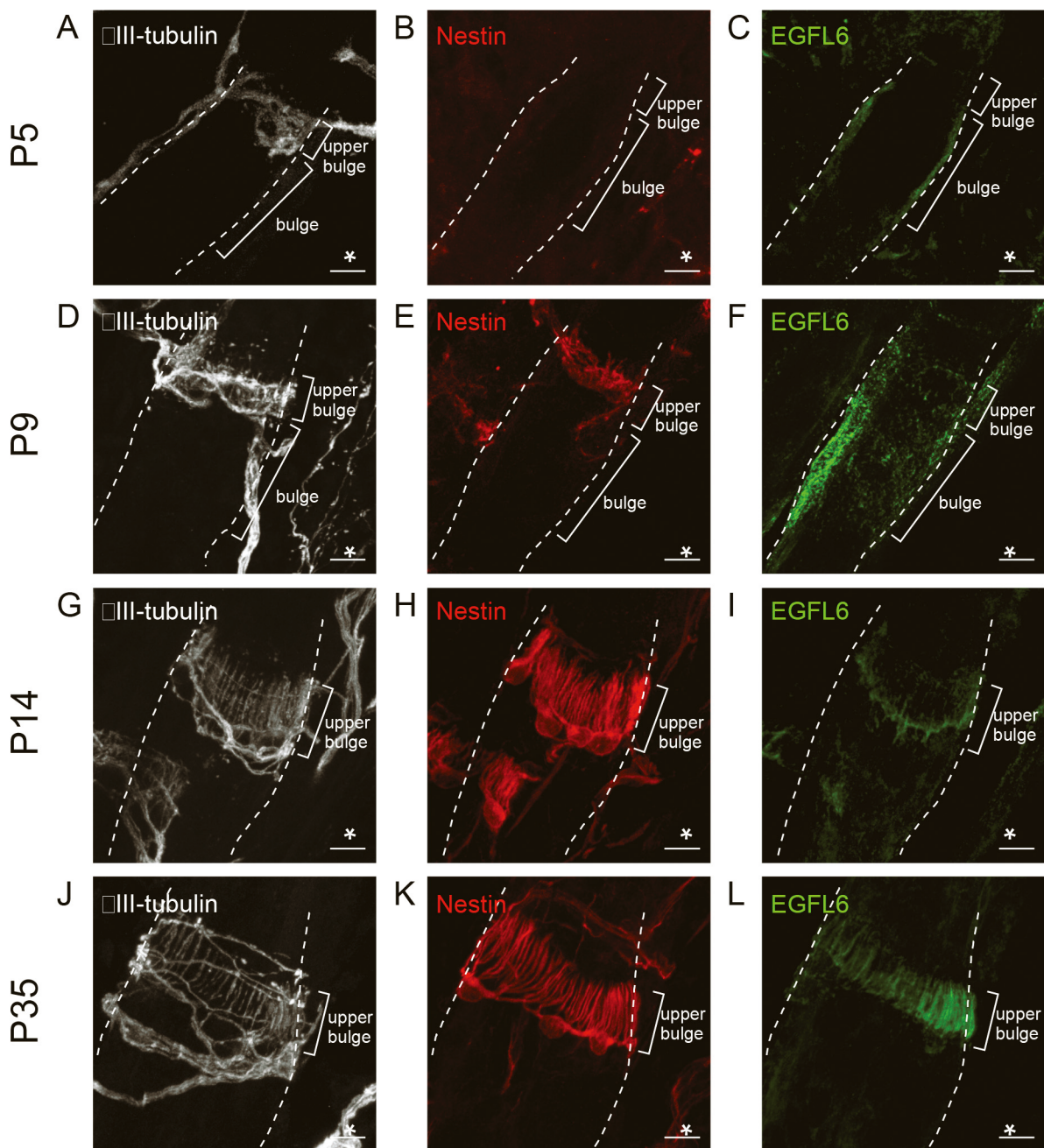


図4 マウス感覚神経終末の構成因子の発生順序。マウス背部皮膚のホールマウント標本を β III-tubulin の抗体 (白)、nestin 抗体 (赤)、EGFL6 抗体 (緑) とで共染色し、3次元画像を再構成した。

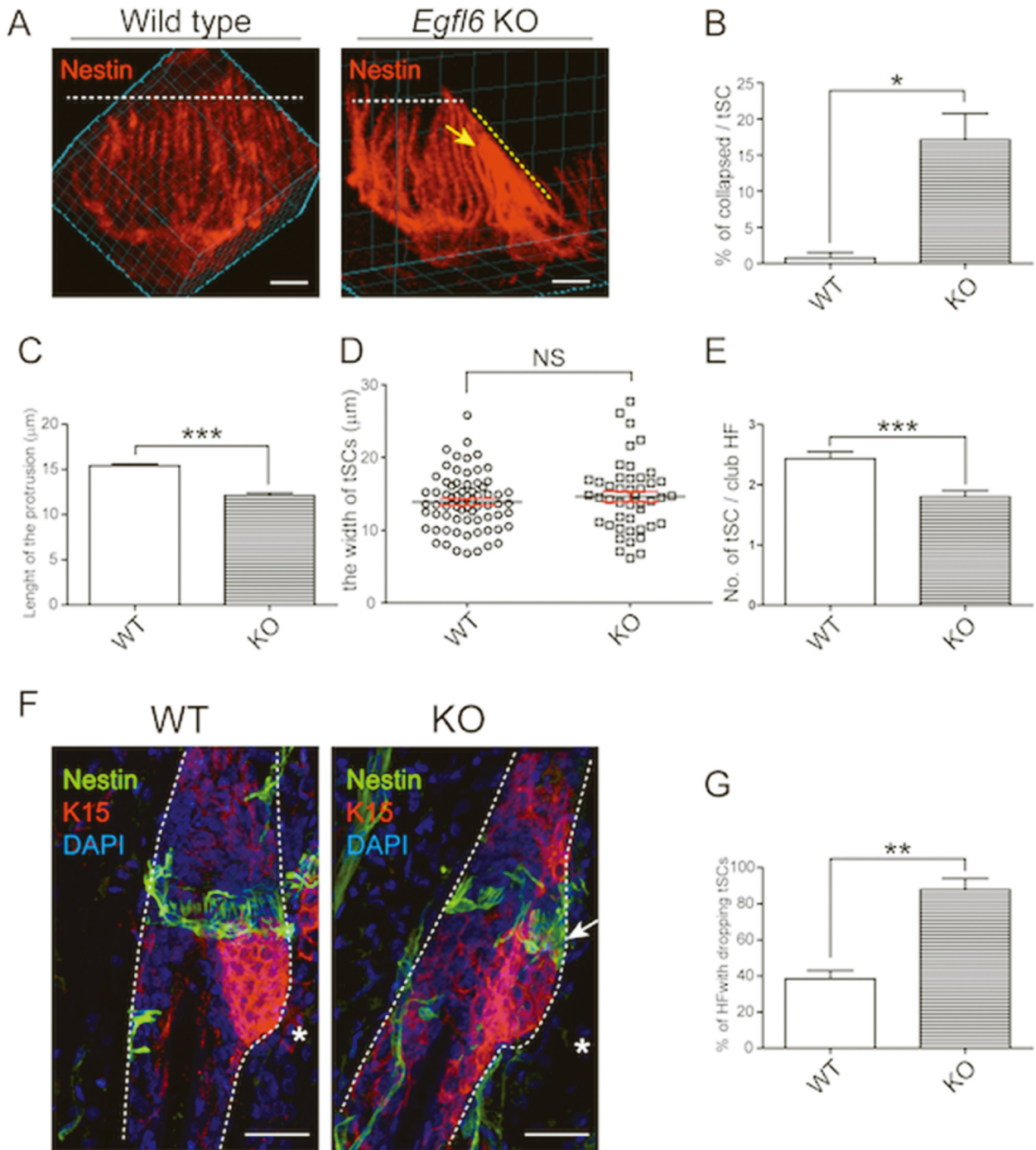


図5 *Eglf6* ノックアウトマウスにおける終末シュワン細胞の形態変化。A) nestin 染色により終末シュワン細胞の形態を可視化した。B) 終末シュワン細胞の形態異常をスコア化した。C-E) 終末シュワン細胞の突起長、細胞体の幅、毛包当たりの細胞数を計測した。F) K15 との共染色により、終末シュワン細胞の配置を検討した。G) K15 陽性部に異所性に位置する終末シュワン細胞を持つ毛包の割合。

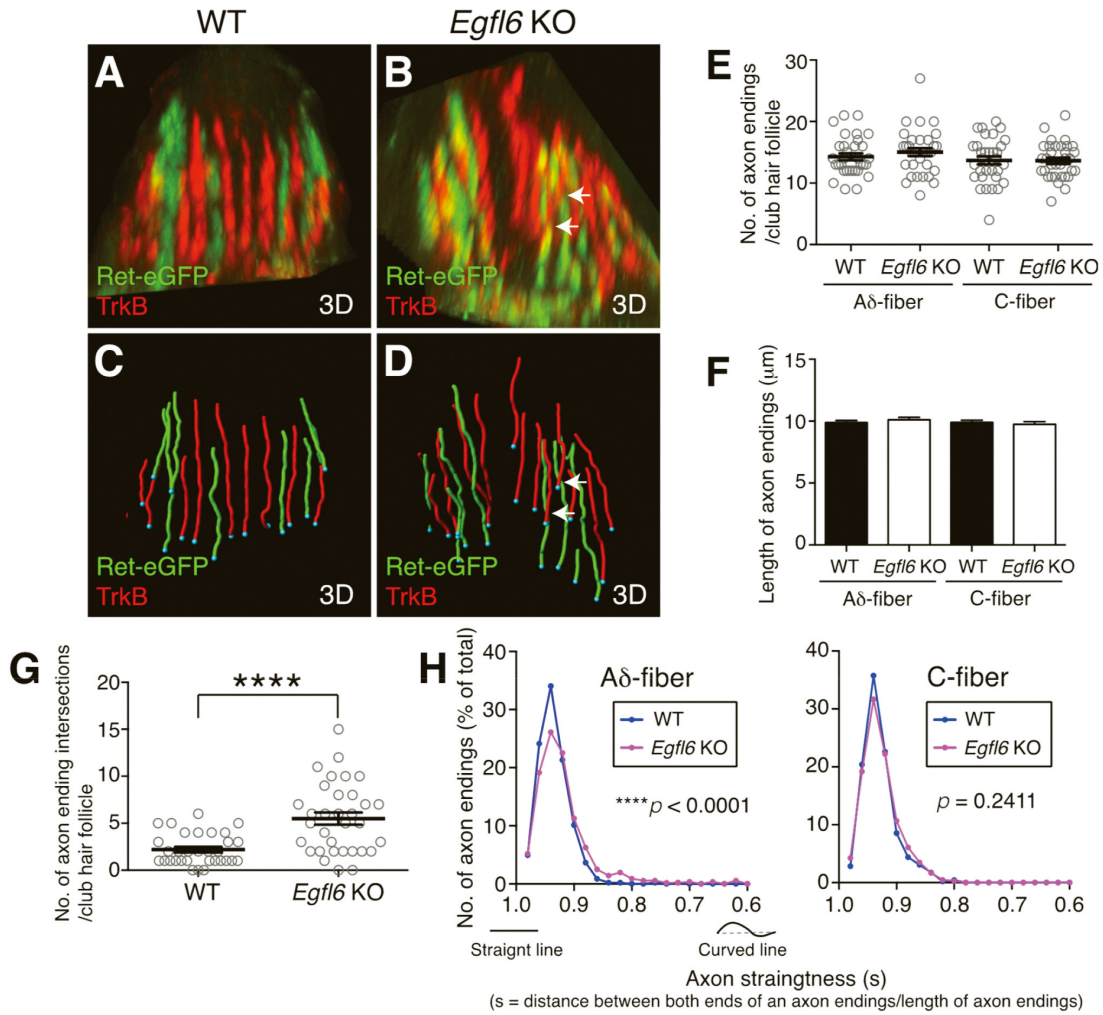


図6 *Egfl6* ノックアウトマウスにおける感覚神経終末の形態変化。A – D) Ret-eGFP と TrkB 染色により A δ -fiber と C-fiber 神経終末の形態を可視化した。E) 毛包当たりの軸索終末の数を定量した。F) 軸索終末の長さを定量した。G) 軸索終末の交差点の数を定量した。H) 軸索終末の直線性を定量した。

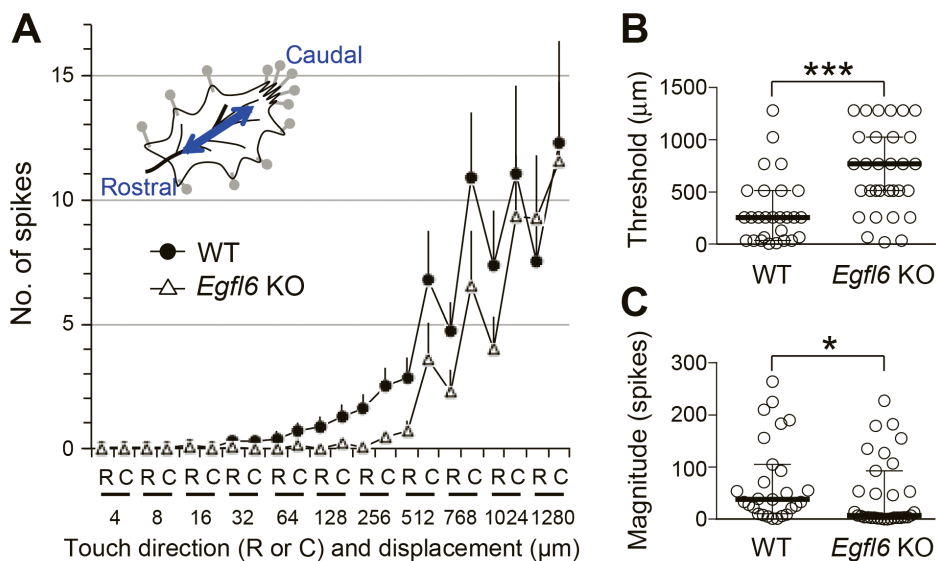


図7 皮膚を機械刺激した際の A δ -fiber 活動電位の測定。A) 皮膚組織に機械刺激を与えた際の活動電位の数を定量した。Kleindiek マニピュレータに取り付けたプローブを皮膚組織に接触させ、Rostral-Caudal 方向に 4~1280 μm の距離移動させた。B) 活動電位を発生させるために必要な機会刺激の閾値を測定した。C) 1回の機械刺激プロトコル (4~1280 μm) で誘発される活動電位の総数。

4. 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-感覚神経複合体相互作用がある⁴⁾。これら毛包と周囲の間充織組織との接続及び相互作用は、毛成長、立毛、体温調節、感覚受容などの毛包の高次機能の発現に不可欠である。しかし、これら異種組織間の相互作用の分子基盤は殆ど理解されていなかった。本研究では、この中でも特に報告がなかった3. 毛包-感覚神経複合体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 (data not shown)、バルジ上部に投射される感覚神経複合体と互いに組み合わさるようにストライプ構造を形成することにより、感覚神経複合体の形態、さらには触覚受容能を制御することが示された。これは、毛包の長軸に沿ってコンパートメント化される上皮系毛包幹細胞が、神経細胞に最適化された細胞外微小環境、つまりニッチを提供していることを示すものである。

EGFL6のバルジ上部への沈着は、感覚神経とシュワン細胞がパラレルパターンを形成した後に出現する(図4)。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の機能化のために作られるフレームワーク様の役割を持つと考えられる。EGFL6のノックアウトマウスにおいて、シュワン細胞と軸索終末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、感覚神経終末部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。

発生期を通じたEGFL6の局在パターンの解析より、EGFL6は表皮と間充織を区切る基底膜様の染色パターンを示した。これは、EGFL6が基底膜蛋白質として機能することを示唆している。但し、EGFL6の基底膜内での局在は、毛包器官形成の過程でダイナミックに変化し、発生初期においては感覚神経複合体が存在しない部位において

広範に沈着が認められる。よって、EGFL6は複数の異なる生物学的現象を、異なる細胞種に働きかけることにより仲介していることが予想される。EGFL6の機能を更に深く理解するには、EGFL6のノックアウトマウスの解析に加え、EGFL6を認識する細胞表面レセプターやEGFL6と結合する細胞外マトリックスや可溶性因子の同定が必要である。EGFL6のレセプターとしてはインテグリン $\alpha 8\beta 1$ が報告されているが⁵⁾、皮膚においては両者の局在はほとんど一致しない(data not shown)。今後は、生化学的・細胞生物学的な解析を通して、EGFL6の真のレセプターの同定を進める必要がある。

(文献)

- 1) Brownell, I., Guevara, E., Bai, C. B., Loomis, C. A., and Joyner, A. L. (2011) Nerve-derived sonic hedgehog defines a niche for hair follicle stem cells capable of becoming epidermal stem cells. *Cell stem cell* 8, 552-565
- 2) Fujiwara, H., Ferreira, M., Donati, G., Marciano, D. K., Linton, J. M., Sato, Y., Hartner, A., Sekiguchi, K., Reichardt, L. F., and Watt, F. M. (2011) The basement membrane of hair follicle stem cells is a muscle cell niche. *Cell* 144, 577-589
- 3) 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., and Ginty, D. D. (2011) The functional organization of cutaneous low-threshold mechanosensory neurons. *Cell* 147, 1615-1627
- 4) Watt, F. M., and Fujiwara, H. (2011) Cell-extracellular matrix interactions in normal and diseased skin. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3
- 5) Osada, A., Kiyozumi, D., Tsutsui, K., Ono, Y., Weber, C. N., Sugimoto, N., Imai, T., Okada, A., and Sekiguchi, K. (2005) Expression of MAEG, a novel basement membrane protein, in mouse hair follicle morphogenesis. *Experimental cell research* 303, 148-159