

Title	ハムスター頬粘膜Merkel 細胞の細胞膜伸展はtransient receptor potential vanilloid and ankyrin channels を活性化させる
Author(s)	征矢, 学
Journal	歯科学報, 115(2): 113-116
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10130/3575">http://hdl.handle.net/10130/3575</a>
Right	

## 解説 (学位論文 解説)

## ハムスター頬粘膜 Merkel 細胞の細胞膜伸展は transient receptor potential vanilloid and ankyrin channels を活性化させる

Plasma membrane stretch activates transient receptor potential vanilloid and ankyrin channels in Merkel cells from hamster buccal mucosa



征矢 学  
Manabu Soya

東京大学医学部附属病院麻酔科・痛みセンター 特任臨床医  
略歴 平成21年日本大学松戸歯学部卒業, 平成23年東京歯科大学口腔科学研究センター hrc 8 リサーチ・アシスタント, 平成26年東京歯科大学大学院歯学研究科(歯科麻酔学)修了・博士(歯学)の学位受領(東京歯科大学)を経て, 東京大学医学部附属病院にて医科麻酔研修, 現職に至る。研究テーマ: 口腔粘膜組織における感覚受容機構の特性解明。本研究テーマは第89回日本生理学会大会にてポスターアワードを受賞した。

キーワード: Merkel 細胞, TRP チャンネル, 機械受容器, 感覚伝達

Key words: Merkel cell, TRP channel, mechanoreceptor, sensory transduction

(2015年1月20日受付, 2015年3月4日受理, 歯科学報 115: 113-116, 2015.)

### はじめに

感覚は感覚受容体の細胞膜に存在するセンサープロテインにより感知されている。細胞膜上のセンサープロテインが特定の刺激を感知すると, 様々な受容体やイオンチャンネルを介し, 細胞内に  $\text{Ca}^{2+}$  を透過させ, 細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度 ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) が増加し, 末梢器官からの感覚情報を中枢神経系へ伝達する細胞内シグナル伝達を生じる。生体には Meissner 小体, Ruffini 小体, Krause 小体など複数の感覚受容体が存在する。感覚受容体のなかでも口腔粘膜上皮に存在する Merkel 細胞は  $\text{A}\beta$ -neuron と複合体を形成し, 遅順応性機械受容器 (Slowly-adapting type 1 (SA1) mechanoreceptors) として働くと考えられている<sup>1-3)</sup>。しかし, Merkel 細胞の機械刺激受容のメカニズムについては明らかにされていない。

近年, 感覚受容分子センサーとして, transient receptor potential (TRP) channel が広く研究されている。哺乳類において, TRP channel は6つのサブファミリーから成り立っており, 様々な刺激を受容しているポリモーダルな受容器である<sup>4,5)</sup>。TRP

channel は, 種々の生理活性物質により活性化され, 細胞内外の環境変化を感知し, 細胞内シグナルに変換する, いわゆる“センサー”として働く。また  $\text{Ca}^{2+}$  を流入させ, 様々な反応を引き起こし, 細胞の適応応答を生じる“シグナルトランスデューサー”としても機能する。TRP channel は感覚神経に多く存在し, サブファミリーのうち TRP vanilloid (TRPV) channel は温度変化, 機械刺激, 浸透圧変化, 酸刺激などにより活性化する<sup>6)</sup>。TRP ankyrin (TRPA) channel は17°C未満の温度変化や化学変化, 機械刺激などにより活性化し, TRP melastatin (TRPM) channel は25-28°Cの温度変化や化学変化により活性化する<sup>7-9)</sup>。

これまで, ラットの毛包に存在する Merkel 細胞が機械刺激を受容し,  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  が増加した報告<sup>10)</sup>や, マウス皮膚の Merkel 細胞において低浸透圧刺激により活性化する浸透圧感受性  $\text{Ca}^{2+}$  channel の発現を示唆する報告<sup>11)</sup>がある。Merkel 細胞における TRP channel に関する報告は TRPV subfamily member-1 (TRPV1) channel の免疫化学的発現<sup>12)</sup>と TRPV subfamily member-4 (TRPV4) channel の薬理活性

物質により Merkel 細胞が活性化したもの<sup>13)</sup>に限られており、生物学的・機能的な役割については明らかになっていない。そこで本研究は、Merkel 細胞における機械刺激受容メカニズムを明らかにするため、機械刺激で生じる細胞膜変形を低浸透圧溶液による細胞膜伸展刺激と置き換え、細胞膜伸展における機械感受性 TRP channel 活性について検討した。

### 結果および考察

#### ハムスターの Merkel 細胞における TRP channel の発現と局在

ハムスター頬粘膜から酵素処理と機械処理を施し、上皮細胞を単離した。上皮細胞内に含まれる Merkel 細胞を同定するために、Merkel 細胞に特異的に取り込まれる quinacrine 蛍光物質を腹腔内投与した。免疫蛍光染色により Merkel 細胞特異抗体として知られる cytokeratin20(CK-20)と quinacrine 蛍光陽性細胞の合致率は90%以上であった。すべての quinacrine 蛍光陽性 Merkel 細胞の細胞膜上に TRPV 1, TRPV 2, TRPV 4, TRPA subfamily membr-1 (TRPA 1), TRP subfamily member-8 (TRPM 8)channel の発現を認めた。

#### 低浸透圧刺激は Merkel 細胞の細胞膜伸展を引き起こし $[Ca^{2+}]_i$ を増加させる

ハムスター頬粘膜から単離した Merkel 細胞における浸透圧刺激感受性を、蛍光プローブである Fura-2 を用いた細胞内  $Ca^{2+}$  の蛍光測定を用いて検討した。Fura-2 はポリアミノカルボン酸からなる蛍光物質で、 $Ca^{2+}$  と非結合状態において 380 nm の励起光で 510 nm の蛍光を示し、 $Ca^{2+}$  と結合すると励起波長がシフトし、340 nm の励起光で 510 nm の蛍光を示す。この二波長の励起による蛍光強度の比から、 $[Ca^{2+}]_i$  を画像として取得し、 $[Ca^{2+}]_i$  の動態をライブイメージングした。細胞外  $Ca^{2+}$  存在下に、標準細胞外液を等張液(328 mOsm/L)から低浸透圧溶液(300, 250, 200, 150, 140 mOsm/L)に置換すると、低浸透圧依存性に細胞の表面積は膨張し、細胞膜伸展を生じた。これらの低浸透圧溶液で細胞膜伸展刺激をした場合の  $[Ca^{2+}]_i$  を測定した。細胞外  $Ca^{2+}$  存在下に、細胞膜伸展刺激を与えると Merkel 細胞は一過性に  $[Ca^{2+}]_i$  の増加を認め

た。この  $[Ca^{2+}]_i$  の増加は低浸透圧依存性( $K = 223$  mOsm/L)を示した。しかし、Merkel 細胞以外の上皮細胞ではこの応答を認めなかった。また、細胞外  $Ca^{2+}$  非存在下に、細胞膜伸展刺激を与えると Merkel 細胞と Merkel 細胞以外の上皮細胞のどちらも一過性の  $[Ca^{2+}]_i$  増加は認めなかった。つまり、この一過性の  $[Ca^{2+}]_i$  の増加は細胞外から細胞内への  $Ca^{2+}$  流入により生じることを示す。さらに、50%効果濃度( $EC_{50}$ )から算出した低浸透圧溶液(200 mOsm/L)で Merkel 細胞に5回連続して細胞膜伸展刺激を与えても  $[Ca^{2+}]_i$  の増加は脱感作を認めなかった。標準細胞外液の等張液から  $EC_{50}$  の低浸透圧溶液(223 mOsm/L)への浸透圧変化は  $-105$  mOsm/L である。生理食塩溶液(比重 1.0; 21°C) 1 mOsm/L は  $2.4 \times 10^{-3}$  N/mm<sup>2</sup> に相当するため、標準細胞外液を 105 mOsm/L 変化させた場合には細胞膜伸展刺激として  $0.25$  N/mm<sup>2</sup> の力が加わる。本研究で Merkel 細胞の表面積は標準細胞外液が等張液の場合で約  $60 \mu\text{m}^2$  であるので、1細胞あたり 1.5 mgf の力が作用していると考えた。

#### Merkel 細胞における TRP channel の機能的発現

低浸透圧溶液による細胞外からの  $Ca^{2+}$  流入経路を検討するため、ハムスター頬粘膜に発現する Merkel 細胞の種々の TRP channel の選択的作動薬および阻害薬を用いて、細胞内  $Ca^{2+}$  の蛍光測定を行った。細胞外  $Ca^{2+}$  存在下に、TRP channel 作動薬である capsaicin (TRPV 1 channel agonist), probenecid (TRPV 2 channel agonist), RN-1747 (TRPV 4 channel agonist), allyl isothiocyanates (AITC) (TRPA 1 channel agonist), WS-12 (TRPM 8 channel agonist) を与えると一過性の  $[Ca^{2+}]_i$  の増加を認めしたが、細胞外  $Ca^{2+}$  非存在下ではこの応答を認めなかった。ハムスター頬粘膜の Merkel 細胞には TRPV 1, TRPV 2, TRPV 4, TRPA 1, TRPM 8 channel が機能的に発現していることが示唆された。また、細胞膜伸展刺激による一過性の  $[Ca^{2+}]_i$  増加は、TRP channel の選択的阻害薬である capsazepine ( $IC_{50} = 9.14 \mu\text{M}$ ), A784168 ( $IC_{50} = 0.15 \mu\text{M}$ ) (TRPV 1 channel antagonists), tranilast ( $IC_{50} = 1.07 \mu\text{M}$ ) (TRPV 2 channel antagonist), RN-1734 ( $IC_{50} = 4.07 \mu\text{M}$ ) (TRPV 4 channel

antagonist), HC030031 ( $IC_{50} = 3.41 \mu M$ ) (TRPA 1 channel antagonist)により濃度依存性に減少したが, 5-benzyloxytryptamine hydrochloride (5-BOT) (TRPM 8 channel antagonist)は濃度を変化させても, その抑制を認めなかった。ハムスター類粘膜のMerkel細胞において, 機能的に発現しているTRP channelsのうち, TRPV 1, TRPV 2, TRPV 4, TRPA 1 channelはセンサープロテインとして機械刺激による細胞膜の伸展を感知し, これらのTRP channelを介して細胞内に $Ca^{2+}$ 流入させ,  $[Ca^{2+}]_i$ 増加に関与していることが示唆された(図1)。TRPM 8 channelの発現は認めるものの, 機械刺激をセンシングするような機能的な役割については明らかにならなかった。

さらに, TRP channelの選択的阻害薬(capsazepine, A784168, tranilast, RN-1734, HC030031)のそれぞれ $IC_{50}$ に相当する濃度でカクテルした混合液で細胞膜伸展刺激による一過性の $[Ca^{2+}]_i$ 増加の影響について検討を行った。一過性の $[Ca^{2+}]_i$ 増加はこれらの混合液を与えると有意に減少したが, 完全に応答を減少させることは出来なかった。近年, ラットとマウスのMerkel細胞でacid-sensing ionic channels (ASICs)/epithelial sodium channels (ENaCs)の免疫化学的発現が報告されている<sup>14,15)</sup>。今後, Merkel細胞における機械刺激受容のプロセスを明らかにするためにASICs/ENaCsの発現の有無

についても明らかにする必要がある。

本結果では, 皮膚または粘膜のMerkel細胞が機械刺激により細胞膜の伸展を引き起こすことで, 機械刺激感受性TRP channelを介した細胞外からの $Ca^{2+}$ 流入経路を明らかにした。過去の形態学的研究では, Merkel細胞は細胞質内に直径100nmの顆粒を豊富に含むことが特徴とされており, 5-hydroxytryptamine (5-HT), calcitonin gene-related peptide (CGRP), や vasoactive intestinal peptide (VIP)などの神経伝達物質を含有すると報告されている<sup>16)</sup>。さらに, 胎生13日のラットのMerkel細胞は半数以下が神経支配されており, その95%は出生直前に神経と複合体を形成し, 1本の神経線維はおおよそ50個のMerkel細胞を支配すると考えられており, このことはMerkel細胞と神経との間の相互作用の重要性を強調している<sup>2,17)</sup>。また, complin 1, neurexin 1, piccolo, synaptotagmin, syaptsin IIのようなシナプス小胞蛋白質のmRNA発現がMerkel細胞に報告されている<sup>18-21)</sup>。これらの報告はMerkel細胞と神経との間にシナプス伝達がある根拠として考えられている。Merkel細胞と神経間の連絡について同定されていないが, Merkel細胞に機械刺激を与えることで生ずる, 機械刺激感受性TRP channelを介した $Ca^{2+}$ の流入は感覚神経に神経伝達物質を放出する可能性を示唆するかもしれない。

Merkel細胞-神経終末複合体が機械刺激受容に重要な働きを示すために, どのようにMerkel細胞と神経の間で連絡を取り合っているのか, 今後明らかにする必要がある。

## まとめ

本研究は, ハムスター類粘膜のMerkel細胞にTRPV 1, TRPV 2, TRPV 4, TRPA 1, TRPM 8 channelが発現していることを示した。機械感受性TRPV 1, TRPV 2, TRPV 4, TRPA 1 channelは細胞膜伸展を感知するセンサープロテインとして働いており, TRPM 8 channelの発現は認めるものの, 細胞膜伸展の感知には関与しないことが示唆された。Merkel細胞のTRPV 1, TRPV 2, TRPV 4, TRPA 1 channelの活性化は, Merkel細胞と感覚神経のシナプス伝達に関与していることを示唆した。

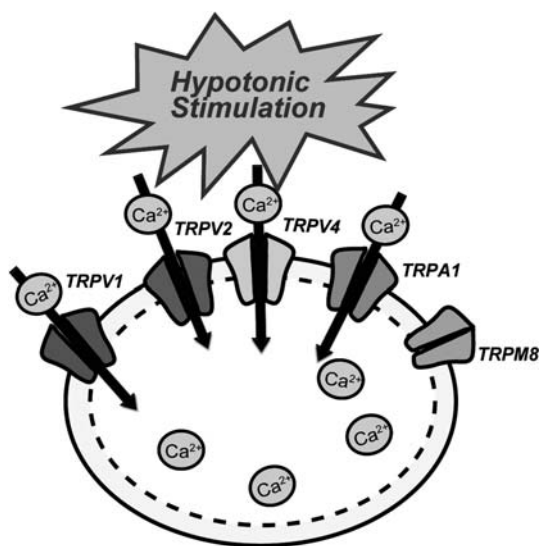


図1 低浸透圧刺激で活性化するMerkel細胞の細胞膜上のTRP channels

## 謝 辞

本研究を遂行し学位論文をまとめるに当たり、多くの支援とご指導を賜りました。指導教官である一戸達也教授に深く感謝しております。研究全般にわたる多大なご支援、ご指導を賜りました生理学講座の田崎雅和教授、澁川義幸准教授に深く感謝しております。本論文作成に当たり、主査を担当していただきました村松 敬教授、副査を担当していただきました柴原孝彦教授、一戸達也教授、田崎雅和教授、山本 仁教授には多くの助言を頂きました。深く感謝しております。生理学講座の佐藤正樹先生、木村麻記先生、東京大学医学部附属病院麻酔科・痛みセンターの黒田英孝先生には、日頃の議論から実験結果の解釈、論文作成までご指導頂きました。ありがとうございます。本研究は文部科学省から私立大学のためのプロジェクトとして東京歯科大学口腔科学研究センター hrc 8 (2011-2013)への科学研究費(No.23592751)の助成を受けたものです。

## 文 献

- 1) Munger BL : The intraepidermal innervation of the snout skin of the opossum. A light and electron microscope study, with observations on the nature of Merkel's Tastzellen. *J Cell Biol*, 26 : 79-97, 1965.
- 2) Halata Z, Grim M, Bauman KI : Friedrich Sigmund Merkel and his "Merkel cell", morphology, development, and physiology : review and new results. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*, 271 : 225-239, 2003. DOI : 10.1002/ar.a.10029.
- 3) Iggo A, Muir AR : The structure and function of a slowly adapting touch corpuscle in hairy skin. *J Physiol*, 200 : 763-796, 1969.
- 4) Clapham DE : TRP channels as cellular sensors. *Nature*, 426 : 517-524, 2003. DOI : 10.1038/nature02196.
- 5) Niemeyer BA : Structure-function analysis of TRPV channels. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 371 : 285-294, 2005. DOI : 10.1007/s00210-005-1053-7.
- 6) Woodbury CJ, Zwick M, Wang S, Lawson JJ, Caterina MJ, Koltzenburg M, Albers KM, Koerber HR, Davis BM : Nociceptors Lacking TRPV 1 and TRPV 2 Have Normal Heat Responses. *J Neurosci*, 24 : 6410-6415, 2004. DOI : 10.1523/JNEUROSCI.1421-04.2004.
- 7) Nilius B, Appendino G, Owsianik G : The transient receptor potential channel TRPA 1 : from gene to pathophysiology. *Pflüg Arch - Eur J Physiol*, 464 : 425-458, 2012. DOI : 10.1007/s00424-012-1158-z.
- 8) McKemy DD : How cold is it? TRPM 8 and TRPA 1 in the molecular logic of cold sensation. *Mol Pain*, 1 : 16, 2005. DOI : 10.1186/1744-8069-1-16.
- 9) Yudin Y, Rohacs T : Regulation of TRPM 8 channel activity. *Mol Cell Endocrinol*, 353 : 68-74, 2012. DOI : 10.1016/j.mce.2011.10.023.
- 10) Cha M, Ling J, Xu GY, Gu JG : Shear mechanical force induces an increase of intracellular Ca<sup>2+</sup> in cultured Merkel cells prepared from rat vibrissal hair follicles. *J Neurophysiol*, 106 : 460-469, 2011. DOI : 10.1152/jn.00274.2011.
- 11) Haeberle H, Bryan LA, Vadakkan TJ, Dickinson ME, Lumpkin EA : Swelling-Activated Ca<sup>2+</sup> Channels Trigger Ca<sup>2+</sup> Signals in Merkel Cells. *PLoS ONE*, 3 : e1750, 2008. DOI : 10.1371/journal.pone.0001750.
- 12) Boulais N, Pereira U, Lebonvallet N, Misery L : The whole epidermis as the forefront of the sensory system. *Exp Dermatol*, 16 : 634-635, 2007. DOI : 10.1111/j.1600-0625.2007.00590.x.
- 13) Boulais N, Pennec JP, Lebonvallet N, Pereira U, Rougier N, Dorange G, Chesne C, Misery L : Rat Merkel Cells Are Mechanoreceptors and Osmoreceptors. *PLoS ONE*, 4 : e7759, 2009. DOI : 10.1371/journal.pone.0007759.
- 14) Chen CC, Wong CW : Neurosensory mechanotransduction through acid-sensing ion channels. *J Cell Mol Med*, 17 : 337-349, 2013. DOI : 10.1111/jcmm.12025.
- 15) García-Añoveros J, Samad TA, Zúvela-Jelaska L, Woolf CJ, Corey DP : Transport and localization of the DEG/ENaC ion channel BNaC I alpha to peripheral mechanosensory terminals of dorsal root ganglia neurons. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*, 21 : 2678-2686, 2001.
- 16) Tachibana T, Nawa T : Recent progress in studies on Merkel cell biology. *Anat Sci Int*, 77 : 26-33, 2002. DOI : 10.1046/j.0022-7722.2002.00008.x.
- 17) Pasche F, Mérot Y, Carraux P, Saurat JH : Relationship between Merkel cells and nerve endings during embryogenesis in the mouse epidermis. *J Invest Dermatol*, 95 : 247-251, 1990.
- 18) Hitchcock IS, Genever PG, Cahusac PMB : Essential components for a glutamatergic synapse between Merkel cell and nerve terminal in rats. *Neurosci Lett*, 362 : 196-199, 2004. DOI : 10.1016/j.neulet.2004.02.071.
- 19) Diamond J, Holmes M, Nurse CA : Are Merkel cell-neurite reciprocal synapses involved in the initiation of tactile responses in salamander skin?. *J Physiol*, 376 : 101-120, 1986.
- 20) Fagan BM, Cahusac PM : Evidence for glutamate receptor mediated transmission at mechanoreceptors in the skin. *Neuroreport*, 12 : 341-347, 2001.
- 21) Haeberle H, Fujiwara M, Chuang J, Medina MM, Panditrao MV, Bechstedt S, Howard J, Lumpkin EA : Molecular profiling reveals synaptic release machinery in Merkel cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101 : 14503-14508, 2004. DOI : 10.1073/pnas.0406308101.

本論文は、下記学位論文の内容を解説した。  
Plasma membrane stretch activates transient receptor potential vanilloid and ankyrin channels in Merkel cells from hamster buccal mucosa. Manabu Soya, Masaki Sato, Ubaidus Sobhan, Maki Tsumura, Tatsuya Ichinohe, Masakazu Tazaki and Yoshiyuki Shibukawa., *Cell Calcium*, 55 : 208-218 : 2014.

別刷請求先：〒101-0061 東京都千代田区三崎町2-9-18  
東京歯科大学歯科麻酔学講座 征矢 学