

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：32607
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2015～2016
課題番号：15K15021
研究課題名(和文) 基底膜ライブイメージングシステムの開発とその応用

研究課題名(英文) Basement membrane live-imaging

研究代表者
門谷 裕一 (Kadoya, Yuichi)

北里大学・医療衛生学部・教授

研究者番号：10185887
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：基底膜の拡張やターンオーバーが亢進している発生期の唾液腺を例にとり、基底膜の動態を高精細にタイムラプス観察するシステムの構築を試みた。基底膜を標識するためのツールには、関口、二本らによって開発されたEGFP標識ナイドゲン-1組換え体(EGFP-hNid1)に着目した。ナイドゲンは基底膜の各成分を連結するリンクタンパク質である。

器官培養液に添加されたEGFP-hNid1は、15分以内に顎下腺上皮基底膜を蛍光標識し、本システムの有用性が示された。

研究成果の概要(英文)：We have recently generated recombinant human nidogen-1 whose C-terminus is fused to enhanced green fluorescent protein (hNid1-EGFP). Because nidogen-1 binds to several other major BM proteins, an attempt was made to label BM of living tissues with exogenous hNid1-EGFP and to reveal BM dynamics. Developing submandibular gland (SMG) of mouse was chosen because of its rapid expansion of BM as a result of epithelial branching. Embryonic day-13 SMG was organ cultured in the glass-bottom-dish with a medium containing hNid1-EGFP. After 15min of incubation, confocal microscopy revealed linear deposition of hNid1-EGFP in the epithelial BMs.

We conclude that hNid1-EGFP is a unique and useful tool to study BM dynamics in vitro.

研究分野：解剖学(含む組織学)

キーワード：基底膜 ライブイメージング ナイドゲン(nidogen) 顎下腺 分枝形態形成 EGFP

1. 研究開始当初の背景

基底膜は、ラミニン(laminin)、型コラーゲン(collagen IV)、パールカン(perlecan)、ナイドゲン(nidogen)等の細胞接着性タンパク質からなる超分子複合体であり、組織構築の機械的な足場、物質の選択的透過性を司る障壁としての機能に加え、細胞の極性形成・生存・増殖・分化・移動などとも深く関わる機能的な構造である。基底膜は、上皮組織、筋組織、神経組織と周囲の支持組織とを隔てる構造なので、その分解や新生の機構を明らかにするには組織・器官レベルでの調査が必須である。

申請者は、培養液に細胞膜非透過性の蛍光色素を添加し、共焦点顕微鏡上でタイムラプス観察することでマウス胎仔唾液腺器官形成時の組織の運動や変形を高精細ライブ観察してきた。その際、同様のシステムで基底膜を生きたまま蛍光標識することができれば、基底膜の動態やターンオーバーをライブ観察できるとの着想を得た。基底膜を蛍光標識するツールとして、共同研究者の関口、二木らによって開発された EGFP 標識ナイドゲン-1 (hNid-EGFP) に着目した。ナイドゲンは基底膜の各成分を連結するリンクタンパク質であり、分泌された各基底膜成分はこれにより複合体を形成する。

器官培養の培養液に hNid-EGFP を添加することで基底膜のライブ標識系が研究期間内に確立できるのとの予測のもと、本研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究は、細胞分化、増殖、移動等を調節する超分子複合体としての基底膜の機能を明らかにするために、基底膜の拡張やターンオーバーが亢進している発生の唾液腺を実験系とし、基底膜の動態を高精細にタイムラプス観察するシステムを構築する。これを用いて、実際に基底膜の拡張やターンオーバーの機構を調査する。特に後者において、マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)の役割に着目し、各種 MMP 阻害剤添加条件での基底膜ターンオーバー様式の比較することとした。

3. 研究の方法

1) 基底膜ライブ観察システムの構築

共焦点顕微鏡下での培養法が確立している胎生期顎下腺器官培養(Kadoya & Yamashina (2010) Dev Dyn;239:1739-47)を実験システムとする。まず、EGFP 標識ナイドゲン 1 (ヒト由来) 組換え体(hNid-EGFP)を培養液に添加し：i) hNid-EGFP が基底膜に取り込まれるか否か、また、取り込まれた領域が実際の基底膜と一致するか否かを

EGFP の局在部位とマウス基底膜ナイドゲン 1 の蛍光抗体法による局在部位を二重染色することで検証する。市販ナイドゲン 1 単クローン抗体(クローン EML-1)がマウスナイドゲン 1 に特異的でヒトナイドゲン 1 と反応しないことは確認済みである。

ii) hNid-EGFP 添加時に非標識 hNid を過剰に培養液に添加し hNid-EGFP が内因性のナイドゲン 1 と競合的に起こるか否かを検証する。

2) 基底膜ターンオーバー機構の検討

hNid-EGFP 標識した顎下腺器官培養を倒立顕微鏡上にセットし、基底膜に沿って蛍光が出現する様子を共焦点顕微鏡で経時的に観察する。この際、レーザー照射による光毒性を最小にするべく、i) 培養液に抗酸化剤(ビタミン E のアナログである trolox Sigma)を添加する、ii) レーザーの強度やタイムラプスの間隔が最適となる組み合わせを見いだす、等の措置を講じるものとする。また、細胞の移動や変形を確認するのに十分な解像度を得るために、対物レンズに液浸系(NA=1.2 程度)を用いることとする。これらの観察を 10 例ほど実施し、顎下腺上皮基底膜に hNid-EGFP が組み込まれる際の部位別取り込みタイムコースを比較する。

hNid-EGFP が取り込まれ基底膜の標識が完了したのち、EGFP 標識が経時的に消失するか否かを検討する。hNid-EGFP の組み込みの解析とは逆に、部位別の消失のタイムコースを明らかにする。

3) 基底膜の調節機構の検討

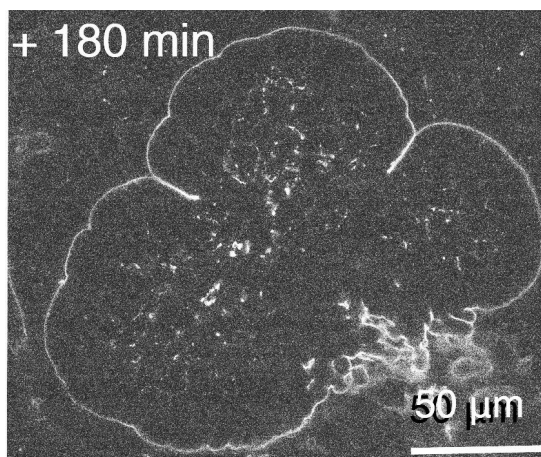
基底膜に組み込まれた hNid-EGFP が基底膜分解機構に注目し、以下の研究を実施する。基底膜の分解を司る因子の 1 つに組織メタロプロテアーゼ(MMPs)がある。様々な MMP 阻害剤のうち、まず、広範な MMP 種を阻害する TIMP を選び、hNid-EGFP と同時に唾液腺器官培養系に添加、hNid-EGFP の基底膜への組み込みに及ぼす作用を観察する。その後、より選択的 MMP 阻害剤の GM6001(ilomastat)などの作用を同様にして調査、相互に比較し、基底膜分解にはたらく MMP カスケードを明らかにする。このような比較に際し、共焦点顕微鏡による観察は定量性に欠けることが問題となる。そこで、培養液中に予め既知の濃度の Alexa555 ヒドラジドなどの細胞膜非透過性の蛍光色素をリファレンスとして培養液中に共存させ、EGFP と同一励起波長(Alexa555 は EGFP 同様 488nm でも励起される)で得られた Alexa555 と EGFP 蛍光強度の比を数値化する等して、異なった阻害剤の効果の定量的に比較することとする。

4. 研究成果

1) 基底膜観察システムの構築

胎生 13 日目のマウス顎下腺を、予め 2.5% マトリゲルをコートしたガラス底培養皿上

で培養し、翌日に種々濃度の hNid-EGFP を添加した培養液 (10% 牛胎児血清含有 DMEM/F12) に入れ替え、共焦点顕微鏡 (Nikon C2) で観察したところ、hNid-EGFP を 25~50 $\mu\text{g/ml}$ で添加した条件で、顎下腺上皮基底膜が明瞭にライブ染色された (図)。この顎下腺原基を 4% ホルマリンで短時間固定した後、EGFP 陽性部位とマウスナイドゲン特異的ラット単クローン抗体 (EML-1、ケミコン) の反応養成部位とを比較したところ、上皮基底膜で両者は一致した。また、EGFP で標識されていないヒトナイドゲン組換え体の大過剰共存下では、基底膜の EGFP 標識は失われた。以上から、hNid-EGFP は上皮基底膜に特異的に沈着するものと結論した。



hNid-EGFP 添加 3 時間後の器官培養顎下腺上皮基底膜部に連続した hNid-EGFP の沈着が認められる。

2) 基底膜への hNid-EGFP 沈着様式

顎下腺原基の基底膜をライブ観察できる本実験系の特徴を生かし、基底膜への hNid-EGFP 沈着の様子をタイムラプス観察した。hNid-EGFP の蛍光は添加後 10 分程度で基底膜に局在し始めた。hNid-EGFP 含有培養液で 3 時間処理後に基底膜の一部の蛍光をレーザー光の集中照射で褪色させ、その部位への新たな hNid-EGFP 蛍光の沈着に要する時間を見た (光褪色蛍光回復法) 所、褪色操作後 3-4 時間で周囲と同じ傾向強度まで回復した。これらは、上皮基底膜でナイドゲンのターンオーバーが起っており、数時間単位で基底膜ナイドゲンが入れ替わる可能性を示した。

3) 顎下腺器官形成における基底膜ダイナミクス

顎下腺上皮の器官発生では初め大きな集団をなしていた上皮遠位部の終末集塊に裂け目 (クレフト) が形成され、この侵入により、上皮組織が分割される。この過程が 1 次、2 次と進行し、やがて複雑に分岐した導管系とそれぞれの先端の終末部が形成される (分岐形態形成)。従来の申請者らの研

究により、クレフトの侵入には、その部分を覆う基底膜の伸長を伴うことが判っているので、クレフト伸長部位とそれ以外の部位とで基底膜の沈着様式に違いがあるか否かを精査した。3-6 時間の hNid-EGFP 処理後の顎下腺上皮基底膜角部での基底膜上の hNid-EGFP 蛍光強度を注意深く比較したところ、蛍光はクレフト部の基底膜ではそれ以外に比して約 2 倍の強度をもって観察された。このような強度の違いは hNid-EGFP 沈着開始時より現れていることがタイムラプス観察の結果判明した。興味深いことに、クレフト形成に先立ち出現する基底膜の微小な陥凹 (ノッチ) でもすでに、hNid-EGFP の集積が認められた。これらノッチの多くは時間経過とともに消失し、一部だけが本来のクレフトへと成長するのだが、消失してゆくノッチでは、hNid-EGFP の集積も失われた。これらの事実は、基底膜へのナイドゲンの集積とクレフト形成の関係を示唆している。

4) 顎下腺分岐形態形成に及ぼす各種 MMP 阻害剤の影響

クレフトで観察されたナイドゲンの集積と上皮形態形成との関連を検討するために、研究計画に従い基底膜成分の分解系に注目し、GM6001 (Santa Cruz Biotechnology 以下 SCT, 20 μM), Batimastat (SCT, 5 μM), actinonin (SCT, 50 μM) の 3 種の MMP 阻害剤を通常のフィルター上での顎下腺器官培養系に添加した所、いずれも顎下腺上皮分岐形態形成を阻害した。そこで、それぞれをガラス底培養皿上の培養顎下腺に添加し、3 時間後に hNid-EGFP を追加、さらに 30 分後に基底膜へ hNid-EGFP の蓄積の有無を検討した。予想に反して基底膜への hNid-EGFP の蓄積には影響は認められなかった。

考察と展望

hNid-EGFP を器官培養系に添加するだけで、短時間で顎下腺上皮基底膜をライブ蛍光染色することに成功し、これにより、当初の目的の 1 つである基底膜ライブ観察システムを構築することができた。基底膜の標識は長時間に亘り安定であり、このシステムは基底膜の動態を観察できることが示された。また唾液腺のみならず、種々の器官系にも原理的に応用可能で基底膜研究に極めて有用なツールであると言える。

このツールを駆使し、分岐形態形成が進行中の顎下腺上皮では、基底膜の沈着パターンとクレフト形成に興味深い関連性を認められたものの、その詳細については今後の検討にゆだねられた。

研究計画に従い、このツールを活用し、基底膜の分解システムを明らかにしようとしてみたが、MMP システムが上皮形態形成と深く関わる可能性は示されたものの、基底

膜分解との強い関連を示す結果は得られなかった。また、研究期間中に Alexa555 をレファレンスとする EGFP の半定量的なアッセイ法についての検討には至らなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 4件)

門谷裕一、二木杉子、下野知性、木村武俊、関口清俊: 発生期顎下腺の上皮基底膜ライブイメージング. 第 122 回日本解剖学会総会・全国学術大会. 2017.3.29-3.30 長崎大学(長崎県長崎市)

Kadoya Y, Futaki S, Shimono C, Kimura T, Sekiguchi K: Basement Membrane Dynamics in Developing Salivary Gland. Gordon Conference "Salivary Glands and Exocrine Biology". 2017.2.19-2.24 Hotel Galvez (Galveston TX USA)

Kadoya Y: Basement Membrane Dynamics in Developing Salivary Gland. 第 4 回ニールスステンセン記念国際唾液腺シンポジウム. 2016.11.30-12.1 生理学研究所(愛知県岡崎市)

門谷裕一: 分枝形態形成における基底膜-アクチン細胞骨格系の役割. 第 121 回日本解剖学会総会・全国学術大会. 2016. 3.28-3.30 ビックパレットふくしま(福島県郡山市)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

門谷 裕一 (Kadoya, Yuichi) 北里大学・医療衛生学部・教授

研究者番号: 10185887

(2)研究分担者

二木 杉子 (Futaki, Sugiko) 大阪医科大学・医学部・助教

研究者番号: 00403014

(3)連携研究者

()

研究者番号:

(4)研究協力者

関口 清俊 (Sekiguchi, Kiyotoshi) 大阪大学・蛋白質研究所・教授