

令和元年6月3日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08460

研究課題名(和文) 新開発のフルカラー3次元形態観察装置によるSNARE蛋白質欠損マウスの解析

研究課題名(英文) Phenotype analysis of mice lacking SNARE protein using a novel 3D imaging method; CoMBI.

研究代表者

多鹿 友喜 (Tajika, Yuki)

群馬大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：90400738

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：VAMP5は細胞内の小胞輸送に関わるタンパク群に属するが、その機能は明らかでない。私たちは、VAMP5の欠損マウスを作出し、VAMP5の生体での機能を探った。欠損マウスの表現形を形態解析したところ、呼吸器系、泌尿器系が機能不全になることを見いだした。形態解析のために技術開発も行った。同一標本から3Dデータと切片による2Dデータを得られる新しい技術である。この技術により欠損マウスの死因究明(肺の異常)や、泌尿器系の解析(嚢胞腎)が可能になった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

VAMP5欠損マウスの解析結果は、先天性腎尿路異常(CAKUT)の発症機序解明につながる可能性がある。CAKUTは先天性とはいえ、原因遺伝子が分かっているのは少数であり、膜輸送関連蛋白質、尿路上皮基底側の機能低下による発症機序はこれまで報告がなかった。新しく開発した3Dイメージング技術(CoMBI)は、本研究のみならず、他の共同研究にも利用されている。幅広い生物試料を3Dデータ化できるため、幅広い研究分野で3D形態解析が普及すると、期待できる。

研究成果の概要(英文)：VAMP5 is a member of SNARE proteins, which regulate intracellular membrane trafficking. The VAMP5 gene was cloned in 1998, however, little is known about the function of VAMP5. We generated VAMP5 knockout mice and analyzed its phenotype by morphological techniques. We found disfunctions in respiratory and urinary systems in VAMP5-null mice. We also developed a novel method for correlating 2D light microscopic data and 3D volume data based on block-face imaging. Our new method allowed to reveal cause of death of VAMP5-null mice, and to analyze the cystic kidney.

研究分野：膜小胞輸送に関する分子の解析および3Dイメージング技術の開発

キーワード：膜小胞輸送 SNARE蛋白質 VAMP 3Dイメージング CoMBI

1. 研究開始当初の背景

VAMP5は、細胞内の膜小胞輸送を制御するSNARE蛋白質の一種である。クローニングされた当初、VAMP5は骨格筋にmRNAが多く検出されたため、筋特異的なメンバーと称された(Zeng Q, 1998, Mol Biol Cell)。その後の私たちの解析で、VAMP5は神経系を除いた多くの組織に発現することが分かった(Takahashi M, 2012 Histochem Cell Biol)。さらに我々はVAMP5欠損マウスを作出し、VAMP5欠損によって出生数の低下、不規則呼吸、重複尿管を呈することを見いだした。遺伝子改変マウスの表現型解析において、VAMP5欠損マウスのように、少ない出生数、多臓器に渡る変異を示す場合、同一個体から多様なデータを取得せざるを得ない。形態解析では、全身をくまなく観察すると同時に、切片で細胞・分子レベルの顕微鏡解析ができることが望ましい。つまり、同一個体で3D全身解析と、2D切片解析を行えることが望ましい。本研究では、新しいブロックフェースイメージング装置を開発し、それを用いて、VAMP5欠損マウスの表現型、特に形態変化を、個体・組織・細胞・分子レベルで、シームレスに解明する。

2. 研究の目的

新規のフルカラー3次元形態観察装置の開発 出生数のすくないノックアウトマウス標本をくまなく形態解析するために、新規のブロックフェースイメージング手法を開発する。新規装置は、切削用に通常のクリオスタット、撮影用に市販カメラとマクロレンズを用いて構築する。クリオスタットとカメラシャッターを同期させ、ブロック面を自動で連続撮影し、3次元再構築する。同時に切片も取得し顕微鏡解析を行う。なお、本研究で開発した手法は、広く利用される可能性があるため、プロトタイプ製作の後、プリント基板やエンクロージャの製作を行い、どこでもだれでも構築できるようにプログラムや設計図をオープンアクセスとする。高い再現性を担保するため、連続画像の取得・処理においては、各種センサーの性能検証や、連続画像間のズレ最小化のためのレジストレーションの検証を行い、画像取得と処理の精度向上と、手順最適化する。VAMP5欠損マウスの全身3次元形態解析と切片による顕微鏡解析 ホモ欠損型、ヘテロ欠損型、野生型において、3次元形態解析を行い、VAMP5欠損マウスの表現型を全身で明らかにする。ほかに、全身観察から分かった変異部位に対して、VAMP5分布や細胞腫の特定などの顕微鏡解析を行う。特に、不規則呼吸が観られたことに対して、呼吸器系でのVAMP5欠損の影響を明らかにする。

3. 研究の方法

フルカラー3D形態観察装置の開発と改良 電動クリオスタットの正面に、一眼レフカメラを設置し、凍結試料を切削する度に、試料断面を撮影した。マイクロコントローラで、試料位置（反射センサー）と、シャッター（フォトカプラ）を同期させた。反射センサーの光源として、プロトタイプでは、LEDファイバーランプを使っていたが、位置決め精度の向上と、省スペース化をめざして、レーザー反射式、赤外線反射式で改良版を製作する。画像処理は、Adobe Bridge（RAW-JPEG変換）、Photoshop（画像調整、サイズ変更）、ImageJ（ズレ補正）を用いて、手順を確立した。連続画像の撮影時には、試料がゆっくりと動いた状態であるため、画像間で試料位置にわずかなズレが生じる。ズレ補正するためにImageJの機能を使うのだが、レジストレーション関連のプラグインは、数多くリリースされている。本法に最適なズレ補正手法を検討した。切片を採取する際は、撮影を一時停止し、凍結切片を取得し、抗体染色などを施し、光学顕微鏡観察にもちいた。凍結切片の取得は、3D撮影のためのカメラをよけながらの作業となるが、通常の取得方法であり、切片の品質は通常と変わらない。

VAMP5欠損マウスの形態解析 死産マウス (P0) を用いて、全身の3D形態解析を行った。肺の切片において、抗VAMP5抗体、Club細胞のマーカーとしての抗CC-10抗体で、免疫染色を行った。成体のマウスでは、泌尿器系の解析を行った。嚢胞腎は3D形態解析し、嚢胞の出現場所と、嚢胞の個数を調べた。3D解析と同時に、切片を取得し、抗ケラチン抗体などを用いて抗体染色し、嚢胞を形成する上皮細胞の種類を特定した。重複尿管に対して、凍結切片を作製し、尿管壁の構成と計測を行った。

4. 研究成果

フルカラー3次元形態観察装置を完成させ、新規技術として論文発表した (Tajika Y, 2017, Sci Rep)。装置は、通常用いるクリオスタットで、ブロックフェースイメージングによる3次元形態データを取得でき、同時に凍結切片も採取し解析できる点は、従来のブロックフェースイメージング法にはない機能である。Correlative Microscopy and Block-face imaging (CoMBI) と命名した (図1)。試料の位置決め (ブロック面の撮影タイミング) では、光反射を利用しているが、光源としてLEDファイバーランプ、赤色レーザー光、赤外線を試験した。その結果、赤外線反射を利用することで、より正確な位置決めができ、安全性に優れ、簡素な装置として開発することができた。位置決め装置のほかに、ブロック面の2灯傾斜照明、ブロック面を清掃するための電動ブラシを開発した。フレームやエンクロージャもデザインし、装置を完成させた。ブロック面の撮影は、ゆっくりと動く凍結ブロックを撮影するため、写真間で多少のズレが生じる。撮影後にImageJプラグイン (Image Stabilizer) によるズレ補正をかけたが、わずかに失敗する箇所が残った。これには、凍結ブロックの形状を、直円筒にすることで解消した。連続断面像のピクセルサイズは4.7 μm 、再構築像のボクセルサイズは20 μm であり、組織形態を観察するのに十分な画質が得られた。装置・手技ともに安定し、共同研究として利用が拡大している (カプトムシ角原基の3D形態変化の計算科学; Matsuda K, Gotoh H, 2017, Sci Rep, ヒト顔面神経根の3D微小解剖学; Iijima K, 2018, World Neurosug)。



図1 開発したCoMBI装置 クリオスタットに、カメラ、照明、制御盤、センサー (矢印) を取り付けした。(参照 Tajika Y, Sci Rep 2017)

VAMP5欠損マウスは、出生率が低かった。ヘテロ同士の掛け合わせから、野生型36%:ヘテロ58%:欠損6%の割合で生存していた。生存したVAMP5欠損マウスで、臓器を観察すると、嚢胞腎と重複尿管がみられた。嚢胞腎を開発したCoMBIで3D解析と2D切片解析を行い、嚢胞は腎盤由来で、嚢胞内面は尿路上皮細胞であることが分かった (図2)。尿の排出不全を疑い、尿管と膀胱におけるVAMP5の発現と分布を調べたところ、ともに重層上皮のうちの基底側の細胞にVAMP5が存在することがわかった。尿管壁の厚さに変化はなかった。次に、死産マウスを3D解析したところ、肺の拡張不全が見つかった。肺におけるVAMP5の発現は、細気管支に局限し、基底細胞に分布した。VAMPファミリーは小胞輸送に関わるため、サーファクタント分泌との関与を検証したが、分布の特性からそれには直接関与しないと考えら

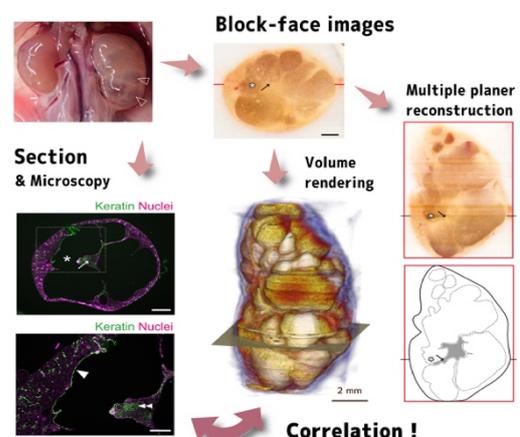


図2 VAMP5欠損マウスの嚢胞腎をCoMBIで形態解析した。ブロック面像から3D構築し、嚢胞がひとつつながりであることが分かった。切片で、尿路上皮細胞 (ケラチン陽性) を検出し、嚢胞の由来を特定した。

れる。VAMP5 欠損マウスの形態解析結果は、論文にまとめて報告することができた (Takahashi-Ikezawa M, 2018, Dev Dynam)。VAMP5 欠損の影響が肺や尿路の機能に出たことが明らかになったが、細胞内における VAMP5 の機能に関しては今後の検討課題である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件) 査読有

- 1) Iijima K, Tajika Y, Tanaka Y, Yorifuji H, Yoshimoto Y. Microanatomy around the facial nerve pathway for microvascular decompression surgery investigated with correlative light microscopy and block-face imaging. **World Neurosurg.** 2018 Oct;118:e526-e533. doi: 10.1016/j.wneu.2018.06.228. Epub 2018 Jul 6. 査読有
- 2) Ikezawa M, Tajika Y, Ueno H, Murakami T, Inoue N, Yorifuji H. Loss of VAMP5 in mice results in duplication of the ureter and insufficient expansion of the lung. **Developmental Dynamics**, 2018 May;247(5): 754-762. doi: 10.1002/dvdy.24618. Epub 2018 Feb 10. 査読有
- 3) Matsuda K, Gotoh H, Tajika Y, Sushida T, Aonuma H, Niimi T, Akiyama M, Inoue Y, and Kondo S. Complex furrows in a 2D epithelial sheet code the 3D structure of a beetle horn. **Scientific Reports**, 2017 Oct 24;7(1):13939. doi: 10.1038/s41598-017-14170-w 査読有
- 4) Tajika Y, Murakami T, Iijima K, Gotoh H, Takahashi-Ikezawa M, Ueno H, Yoshimoto Y, Yorifuji H. A novel imaging method for correlating 2D light microscopic data and 3D volume data based on block-face imaging **Scientific Reports**, 2017 Jun 16;7(1):3645. doi: 10.1038/s41598-017-03900-9. 査読有

[学会発表] (計 5 件)

- 1) Tajika Y, Murakami T Correlative microscopy and block-face imaging (CoMBI): a method to obtain a frozen section maintaining the positional information in the specimen. **2018 American Society of Cell Biology Annual Meeting**, San Diego, CA, USA 2018 年 12 月 8 日
- 2) 多鹿友喜 Correlative light microscopy and block-face imaging (CoMBI) : 凍結切片の由来位置を示す方法 **第 1 回 再生学異分野融合研究会** 2018 年 8 月 30 日 岡崎
- 3) 多鹿友喜、村上徹、高橋-池澤麻衣子、上野仁之、依藤宏 同一標本で切片観察と 3D イメージングを行う手法の開発 **第 123 回 日本解剖学会** 2018 年 3 月 30 日 東京
- 4) 多鹿友喜、村上徹、高橋-池澤麻衣子、上野仁之、依藤宏 その切片、どこから採ってきたの? **ConBio 2017 生命科学系学会合同年次大会 (第 40 回 日本分子生物学会年会)** 2017 年 12 月 6 日 神戸
- 5) 多鹿友喜、村上徹、高橋-池澤麻衣子、上野仁之、依藤宏 胎生期マウスの 2D および 3D 形態解析 **第 122 回 日本解剖学会** 2017 年 3 月 27 日 長崎

〔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：

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：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等 CoMBI による 3D データ配布、技術情報を発信している。

<http://pandora.med.gunma-u.ac.jp/portfolio/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：高橋 麻衣子(池澤 麻衣子)

ローマ字氏名：Maiko Takahashi-Ikezawa

所属研究機関名：群馬大学

部局名：大学院保健学研究科

職名：助教

研究者番号（8 桁）：50701322

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。