

令和 5 年 4 月 27 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22631

研究課題名(和文)細胞外マトリックスのダイナミクスの可視化

研究課題名(英文)Visualization of ECM dynamics

研究代表者

藤原 裕展(Hironobu, Fujiwara)

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・チームリーダー

研究者番号：20615744

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：近年、ECMの物理的性質(ダイナミクスや弾性等)の重要性が示されつつあるが、哺乳類生組織内で基底膜ダイナミクスを可視化できるツールの開発が進んでおらず、その実態や重要性は不明である。本研究課題では、基底膜の動態が可視化できるノックインマウスを作製し、基底膜ダイナミクスの4Dイメージングが可能なシステムを確立した。さらにFRAP法等を用い、基底膜の移動、伸長、ターンオーバーの定量解析も可能にした。薬剤で基底膜動態を阻害すると、皮膚上皮の細胞運命と組織形態に異常が生じることも明らかにした。今後は、本システムを用いて、基底膜ダイナミクスの皮膚発生、恒常性、疾患などへの関与を明らかにしていく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

基底膜遺伝子の異常は、皮膚を含む多くの臓器の先天性疾患や疾病の原因となるが、基底膜が働くメカニズムの理解は不十分である。本研究では、基底膜が「動く」「伸びる」「曲がる」といったダイナミックな特性の変化を細胞挙動とともに可視化できるマウスとイメージングシステムを確立した。これを用いることで、皮膚の発生、創傷治癒、がんの浸潤転移などの際の基底膜ダイナミクスとその役割の理解が飛躍的に進むと期待される。

研究成果の概要(英文)：In recent years, the importance of the physical properties of the ECM (e.g. dynamics and elasticity) has been demonstrated, but the actual dynamics and its importance in mammalian tissues is unknown, as no effective basement membrane live imaging tools have been developed. In this research project, we generated knock-in mice that can visualise basement membrane dynamics, and establish a system that enables 4D imaging of basement membrane dynamics. Furthermore, by combining FRAP method, we established quantitative methods for examining basement membrane movement, elongation and turnover in live tissues. In addition, perturbation of basement membrane dynamics with drugs caused abnormalities in the cell fate and tissue morphology of the skin epithelium. In the future, this system will be used to reveal the involvement of basement membrane dynamics in skin development, homeostasis and diseases.

研究分野：皮膚科学

キーワード：細胞外マトリックス 基底膜 ダイナミクス ライブイメージング 皮膚発生

1. 研究開始当初の背景

正常な器官の発生や再生を達成するには、細胞動態や組織の変形に応じて、周囲の細胞外マトリックス (ECM) の構造と分子組成もダイナミックかつ適切にリモデリングされる必要がある。近年、細胞集団の動態やそれを制御する機構の理解は進んだが、ECM のダイナミクスやその制御メカニズムは殆ど明らかにされていない。その理由は、細胞外に分泌される巨大で複雑な分子間相互作用ドメインをもつ ECM 分子を、その機能を阻害することなく標識し、その細胞外での時空間動態を、3次元組織内で長時間ライブイメージングする手法が十分に確立されていなかったからである。特に、哺乳類での成功例はなく、哺乳類の複雑な胚発生や疾病原理 (線維化、がんの浸潤・転移、創傷治癒など) に ECM のダイナミクスがどのように関わっているかは殆ど不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、マウス器官の発生・再生過程における基底膜の動態やターンオーバーを4次元的に観察できる実験系を構築する (図1)。そして皮膚の毛包をモデルに基底膜と細胞の動態を同時に定量解析することで、その協調的な関係性を明らかにする。基底膜ダイナミクスの鍵を握るマトリックス分解酵素や細胞骨格の機能を操作することで、基底膜ダイナミクスを支える分子機構や、その器官形成への関与を解明していく。

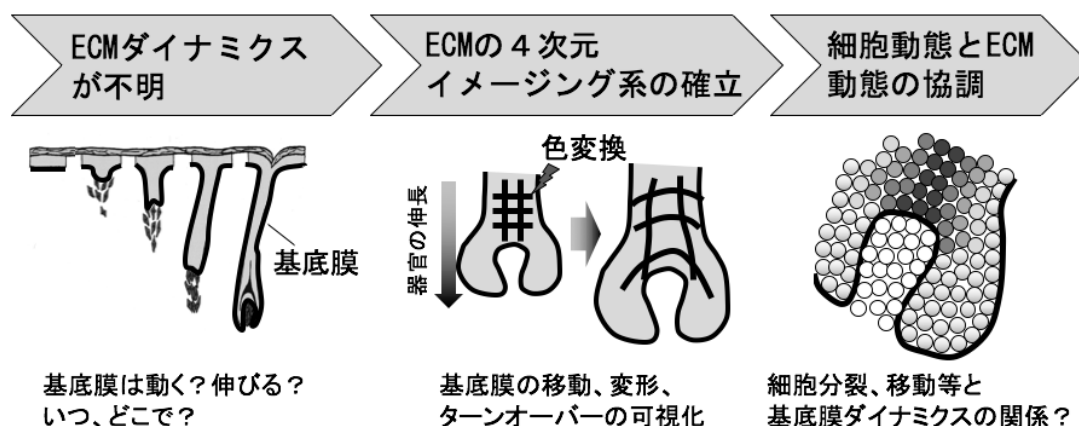


図1. 研究計画「細胞外マトリックスのダイナミクスの可視化」の概要。

3. 研究の方法

本研究では、基底膜のダイナミクスを4次元観察できる実験系を確立し、その動態を制御する機構の理解を目指した。蛍光標識抗体を用いる方法 (課題1) と、遺伝子組換えマウスを用いる方法 (課題2) により研究を進めた。

【課題1】 蛍光標識抗体を用いた基底膜動態のイメージングとその動態制御機構の解明

当研究室のマウス胎仔毛包の *ex vivo* 培養系に、基底膜に広範に存在するラミニン γ 1鎖等の蛍光標識抗体を加え、基底膜を蛍光標識した。基底膜の動態追跡は、基底膜由来の蛍光を (複数箇所) 局所的に退色 (ブリーチング) させ、その退色部位の移動や変形を定量解析することで調べた (図1)。

【課題2】 新規 ECM レポーターマウスの開発と、ECM 動態及びターンオーバーの解析

上記の抗体法は、標識する抗体を変えるだけで様々な分子の動態を追跡できるという利点があるものの、撮像中の蛍光の退色や、動態トラッキングのための局所的な蛍光退色の必要性など、欠点も存在する。また、蛋白質量の測定が蛍光抗体と蛋白質の結合に依存する等ため、ECM のターンオーバーを正確に計測することも難しい。これらの問題を克服するために、光による色変換が可能な基底膜を持つマウスを作製する。具体的には、ラミニンなどの普遍的な基底膜遺伝子に、mKikGR や mEos4b などの光変換蛍光遺伝子を付加する。まずは培養細胞を用いて光変換蛍光分子の遺伝子をノックインし、融合蛋白質が基底膜に組み込まれレーザーにより色変換されるかをチェックする。その後、同じコンストラクトを用いてノックインマウスを作製する。基底膜レポーターマウスから毛包を取り出し、*ex vivo* 培養系で基底膜の色変換を行う。毛包の様々な部位の基底膜を任意のサイズと形 (格子型など) で色変換し、その移動と変形に関する定量データを得る (図1)。定量データの解析から、細胞の動態や器官の変形に応じて、基底膜がどのように

拡張、変形するかを明らかにする。また、色変換後の赤蛍光を持つ ECM 分子と、新たに分泌される緑色蛍光を持つ *de novo* ECM 分子の割合を経時計測することで、ECM ターンオーバーのキネティクスを得る。これらデータを統合的に解析することで、組織の拡大や変形に応じて ECM がどのようにその形態を変化させるのかについてはじめての動態データが得られる。

4. 研究成果

はじめに、蛍光標識抗体を用いた基底膜動態のイメージング系を確立した（課題 1）。ラミニン γ 1 鎖抗体に Alexa-647 を共有結合させ、それを *ex vivo* 毛包発生培養系に添加した。図 2 のとおり、毛包基底膜や血管様基底膜が標識され、その Z-stack time lapse イメージングにより、4D イメージングが可能であることを確認した。さらに、基底膜の特定部位の蛍光のブリーチングを行った。ブリーチング部位は、20 分のインターバルで 2, 3 時間のイメージングが可能ではあったが、基底膜の全体的な蛍光の退色と、ブリーチング部の蛍光の回復により、長時間の継続的な追跡は困難であった。よって、本法は、短時間の基底膜動態の解析には有用であるが、長時間の解析には適さないと判断し、課題 2 の基底膜レポーターマウスの開発に注力することにした。

基底膜のレポーターマウスを作製するため、基底膜の基本骨格を形成する Col4a2 遺伝子内に蛍光蛋白質遺伝子を挿入した（課題 2）。具体的には、Col4a2 遺伝子内に、eGFP, mKikGR、あるいは mEos4b 遺伝子を挿入するための CRISPR/Cas9 ノックインベクターを作製し、受精卵の前核に当該ノックインベクター、gRNA、そして Cas9 蛋白質の混合液をマイクロインジェクションした。ゲノム解析により、蛍光蛋白質遺伝子が適切にノックインされている産仔を選別した。胎仔や成体の各器官における COL4A2-蛍光融合蛋白質の局在は、内在性 COL4A2 蛋白質の分布と完全に一致した。細胞内蛍光シグナルも観察されなかったため、翻訳後の細胞外への分泌もスムーズに行われていることが確認できた。さらに、ホモ接合体マウスは正常に発生し、正常な繁殖能力を有していたことから、COL4A2-蛍光融合タンパク質は、内在性 COL4A2 と同等の機能と局在を示すと判断できた。

次に、各マウスラインから胎仔皮膚を切り出し、*ex vivo* ライブイメージングを実施した（図 3）。蛍光輝度は、胎仔皮膚の 4D ライブイメージングを行うのに十分な明るさがあり、また長時間のイメージングでも退色は殆ど見られなかった。FRAP 法やレーザー照射による蛍光色変換を行うことで、マウスの毛包プラコード基底膜の動態とターンオーバーの速度が定量解析できるイメージングシステムを確立した（図 2）。

そして基底膜の移動、伸長、ターンオーバーが発生過程で時空間的に大きく異なることを見出した。さらに、薬剤を用いて基底膜の動態を阻害すると、上皮の細胞運命と組織形態が変化することも明らかにした。本研究により、生組織内での基底膜ライブイメージングの技術基盤が確立され、基底膜動態の定量・数理・機能解析に道を拓いた。さらに、基底膜の動態やターンオーバーの適切な制御が、器官発生における上皮細胞の動態や運命のコントロールに関与することも判明した。今後は、本研究成果の論文発表準備を進めるとともに、他の臓器、オルガノイド、疾患などへの研究の展開を図る。

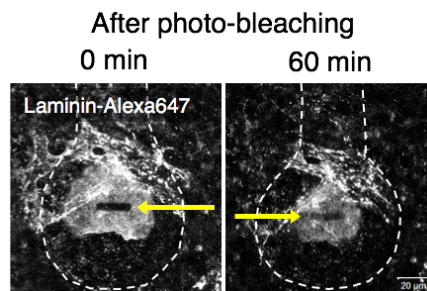


図 2.毛包基底膜の退色部(矢印)が毛包の伸長とともに下方に移動する。

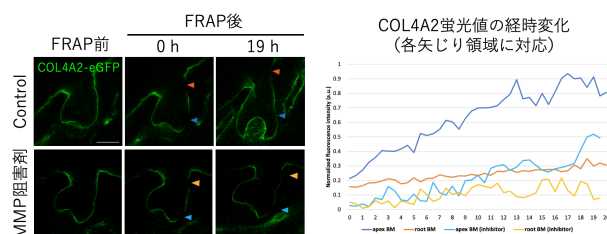


図 3 : 基底膜分子の動態とターンオーバーが定量化できるシステムを開発した。MMP 阻害剤を加えると、基底膜分子のターンオーバーと毛包の形態形成が阻害される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Tsutsui Ko, Machida Hiroki, Nakagawa Asako, Ahn Kyungmin, Morita Ritsuko, Sekiguchi Kiyotoshi, Miner Jeffrey H., Fujiwara Hironobu | 4. 巻 12 |
| 2. 論文標題 Mapping the molecular and structural specialization of the skin basement membrane for inter-tissue interactions | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Nature Communications | 6. 最初と最後の頁 2577 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-22881-y | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 該当する |
| 1. 著者名 Ichijo R., Kabata M., Kidoya H., Muramatsu F., Ishibashi R., Abe K., Tsutsui K., Kubo H., Iizuka Y., Kitano S., Miyachi H., Kubota Y., Fujiwara H., Sada A., Yamamoto T., Toyoshima F. | 4. 巻 7 |
| 2. 論文標題 Vasculature-driven stem cell population coordinates tissue scaling in dynamic organs | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Science Advances | 6. 最初と最後の頁 2575 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.abd2575 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Tsutsui Ko, Machida Hiroki, Morita Ritsuko, Nakagawa Asako, Sekiguchi Kiyotoshi, Miner Jeffrey H., Fujiwara Hironobu | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Mapping the molecular and structural specialization of the skin basement membrane for inter-tissue interactions | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 bioRxiv | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2020.04.27.061952 | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 該当する |
| 1. 著者名 Morita Ritsuko, Sanzen Noriko, Sasaki Hiroko, Hayashi Tetsutaro, Umeda Mana, Yoshimura Mika, Yamamoto Takaki, Shibata Tatsuo, Abe Takaya, Kiyonari Hiroshi, Furuta Yasuhide, Nikaido Itoshi, Fujiwara Hironobu | 4. 巻 594 |
| 2. 論文標題 Tracing the origin of hair follicle stem cells | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Nature | 6. 最初と最後の頁 547 ~ 552 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41586-021-03638-5 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 6件 / うち国際学会 4件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 Fujiwara H |
| 2. 発表標題 Origin and induction process of hair follicle stem cells |
| 3. 学会等名 RIKEN BDR-CuSTOM Joint Symposium Virtual (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Fujiwara H |
| 2. 発表標題 若手セミナー招待講演「若者よ、越境しよう」 |
| 3. 学会等名 第52回日本結合組織学会学術大会, Web開催 (招待講演) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Hironobu Fujiwara |
| 2. 発表標題 A new model for coordinated hair follicle morphogenesis and stem cell induction. |
| 3. 学会等名 18th Surugadai International Symposium & Joint Usage/Research Program of Medical Research Institute International Symposium (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Hironobu Fujiwara |
| 2. 発表標題 Developmental origin and induction processes of hair follicle stem cells. |
| 3. 学会等名 JAPAN-SINGAPORE International skin conference 2019 (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Hironobu Fujiwara |
| 2. 発表標題 A new model for coordinated hair follicle morphogenesis and stem cell induction. |
| 3. 学会等名 The 2019 Epithelial Differentiation & Keratinization Gordon Research Conference (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Hironobu Fujiwara |
| 2. 発表標題 A new model for coordinated hair follicle morphogenesis and stem cell induction. |
| 3. 学会等名 44th Japanese Society for Investigative Dermatology (招待講演) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--------------------------------|
| 1. 発表者名 Hironobu Fujiwara |
| 2. 発表標題 毛包発生と幹細胞誘導の新モデル |
| 3. 学会等名 皮膚科学と数理科学の接点 (招待講演) |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計2件

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 筒井仰、待田大輝、藤原裕展 | 4. 発行年 2019年 |
| 2. 出版社 毛髪科学の新展開 | 5. 総ページ数 19 |
| 3. 書名 細胞外マトリックスの多様性が支える毛包の異種組織間相互作用 | |

| | |
|-----------------------------|-----------------|
| 1. 著者名 筒井仰, 藤原裕展 | 4. 発行年 2019年 |
| 2. 出版社 自動車技術 超の世界 | 5. 総ページ数 2 |
| 3. 書名 皮膚が触覚センサとして機能するしくみ | |

〔産業財産権〕

〔その他〕

| |
|--|
| 理化学研究所生命機能科学研究センター細胞外環境研究チーム https://www.bdr.riken.jp/jp/research/labs/fujiwara-h/index.html 理化学研究所生命機能科学研究センター細胞外環境研究チーム http://www.cdb.riken.jp/tme/ 藤原研究室 http://www.cdb.riken.jp/tme/ |
|--|

6. 研究組織

| 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|