

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590265

研究課題名(和文)次世代ストラクトーム解析による真皮細胞間相互作用の形態的評価と病態との関連

研究課題名(英文)Pathological relevance of spatial relationships between dermal macrophages and fibroblasts by new generation structome analysis

研究代表者

太田 啓介(Ohta, Keisuke)

久留米大学・医学部・准教授

研究者番号：00258401

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：真皮を構成する線維芽細胞とマクロファージは正常皮膚において頻りにコンタクトを持つ。今回、FIB/SEMを用いた次世代ストラクトーム解析によって、細胞同士の関係性を三次元空間的に可視化したところ、マクロファージは線維芽細胞にくるまれるように存在し、密接な接触を持つが明らかになった。一方、病態組織ではこの接触が減少傾向にあり、細胞間接触が正常組織の維持に何らかの働きを持つことが示唆された。線維芽細胞とマクロファージを共培養すると、両細胞は頻りに接触を見せ、遺伝子発現を網羅的に解析した所、接触により細胞内シグナル関連タンパクの上昇が見られた。これは、両細胞の接触が機能と関連することを示唆している。

研究成果の概要(英文)：In this study, we attempted to visualize detail spacial relationships between macrophages and fibroblasts in the dermis using recent advanced 3D reconstruction technic "FIB-SEM tomography". We showed the cells in normal skin frequently made contacts each other. The macrophage located near the fibroblast was wrapped by the cellular processes of the fibroblasts almost 1/3 of the total surface of it. On the other hand, the cells in the pathologic dermis tended to reduce the contact frequency than the normal dermis. Co-culture of fibroblast and macrophage also showed the close contacts between them, and promoted the gene expression which related to the intracellular signaling. These results suggest that the direct cell to cell contact between fibroblast and macrophage relates to some sort of tissue maintenance functions.

研究分野：解剖学

キーワード：真皮 創傷治癒 マクロファージ 線維芽細胞 FIB-SEM 三次元再構築 ストラクトーム

1. 研究開始当初の背景

皮膚真皮は線維芽細胞とマクロファージ(組織球)が膠原線維の間にまばらに存在する組織である。真皮の細胞のうち80%はこの2種類の細胞で占められ、両者は皮膚の炎症や治癒過程で相互に重要な働きを担っている。急性期の真皮の病態では両者はサイトカインを中心としたケミカルメディエータによって相互に密接な関わり中心的な役割を演じることが知られている。一方で、安定状態、また安定状態に戻るための過程については研究が進んでいない。日本人を含む有色人種の多くはケロイド体質である。怪我をするとその部分が増殖し病変となる。しかし、何故治癒過程で異常な増殖が生じてしまうのか、その機構は判っていない。組織の安定状態維持機構に何らかのヒントが得られたならば、このような有色人種特有の病態に悩む人々に朗報になることが期待できる。ところで、ヒト以外の動物や新生児の皮膚ではケロイドは生じない。傷は癒痕すら作ることなく治癒(スカーレス創傷治癒)することが知られている。しかし、なぜそうなるのか理由は分かっていない。

我々は先行研究において、ネズミの正常皮膚では線維芽細胞とマクロファージが免疫組織化学的に頻りに接触していることを見いだしていた。細胞同士が接触することは当たり前のものであるが、全体の95%がコラーゲン線維で埋め尽くされる組織の中で、この両者がランダムに配置すると仮定した場合、両者が接触する確立は高くはない。何か意味があるのではないかと我々の問である。

細胞間の接触が重要な働きを持つ例は多い。なかでもステムセルニッチと呼ばれる異種細胞間の接触は、骨髄の場合、血液の源となる「骨髄幹細胞」の多能性を維持する機構として知られている。「窪み」という言葉に由来するニッチは、細胞同士がその接触において様々な因子を介して相互に影響し合い、その恒常性とシステムの堅牢性を維持していると考えられている。

ニッチは様々な幹細胞の機能維持機構として研究されているが、同様の機構は幹細胞の維持機構だけでなく、相互の細胞を制御するより一般的なしくみではないかと我々は考えている。本課題で注目する皮膚の真皮では、前述の様に、線維芽細胞とマクロファージが頻りに接触している。この接触が何らかのニッチのような役割をはたしているのではないだろうか？我々はこの点を明らかにすべく研究を行った。

2. 研究の目的

真皮構成細胞間の細胞接着については、これまで注目されておらず、特に形態学的な先行研究はない。我々は線維芽細胞とマクロファージが頻りに接触していることを見

いだしてはいたが、この接触が空間的にどの様な広がりを持っているのか、またその分子実体は何か、病態によって変化するのか、そのいずれもが明らかではなかった。そこで、本研究では以下の3点を明らかにすることを目的とし、このコンタクトが実質的な機能を持つ可能性について検討した。

- (1) 次世代ストラクチャー解析により真皮構成細胞の空間的関係の全体把握する
- (2) 細胞間コンタクトと病態との関係性をラット実験モデルおよびヒト病態組織を用いて評価する
- (3) 細胞間コンタクトの分子実体の把握

3. 研究の方法

(1) 細胞間コンタクトの空間的広がりにはFIB搭載走査型電子顕微鏡を用いた次世代ストラクチャー解析により行った。従来、細胞およびコラーゲン線維の広がりを3次元的に、且つ電子顕微鏡レベルの分解能で解析する事は極めて難しい課題であった。しかし、FIB/SEMを用いた解析はこの問題を解決する可能性がある現実的な方法である。一方、本課題で観察する真皮はコラーゲン線維が多いため帯電しやすく基本的な手法では、観察が難しいことが明らかとなった。そこで我々は、本研究の一環として、新型帯電防止樹脂の開発も同時に行い、この問題を解決した。試料はハーフカルノフスキー固定液で固定後、重金属 *en bloc* 染色を行い、樹脂に包埋後、FIB/SEMを用いたストラクチャー解析に供した。試料は60 μ m角~100 μ m角の領域を30~50nm程度の解像度でデータを取得、三次元解析ソフト Amira を用いて可視化した。

(2) 細胞間コンタクトと病態との関係性を明らかにするため、試料にはラット背側の正常皮膚、および熱傷モデルにより作製した皮膚、ヒトケロイドおよび肥厚性癒痕組織を用いた。ヒト組織は久留米大学の倫理委員会の承認のもと、術中取得標本の一部の提供を受けた。

免疫組織学的染色用には、試料を4%ホルムアルデヒド溶液で固定し、定法に従い、凍結切片を作製、線維芽細胞をHSP47抗体、マクロファージをIba1抗体でラベルし、共焦点レーザー顕微鏡で解析を行った。ストラクチャー解析は前述(1)に準じて試料作製を行い、観察した。

(3) 細胞間コンタクトの分子実体を把握するため、マウス皮膚初代培養線維芽細胞と腹腔マクロファージの共培養系を作出し、細胞の接触の有無により細胞がどの様な動態を取るのか、また、遺伝子発現がどの様に変わっていくのかを、光学顕微鏡的、およびDNAアレイによるトランスクリプトーム解析を

行った。

4. 研究成果

(1) FIB/SEM 次世代ストラクチャー解析により、真皮組織の正確な三次元データをうる事が可能となった。本研究で用いた新開発の帯電防止樹脂は、2011年度に開発をし、特許出願をしていたものであるが、本研究においてさらなる改良を行い、表面抵抗値の低下に成功している。この成果はCPT出願時に追加して記載した。本研究により得られたデータを三次元解析したところ、線維芽細胞は膠原線維束間に広く突起を伸ばし、相互に連絡する姿が見られたのに対し、マクロファージの多くは、細胞体近くで線維芽細胞に抱え込まれるように存在する様子が観察された。細胞表面から、数十 nm 程度の距離で接触する領域はマクロファージの全細胞表面面積の数十パーセントに及び、両者が、偶然接触しているものではなく、積極的な接触を形成していると予想された。しかし、両者間に明確な細胞接着装置は発達しておらず、分子レベルでの点接触で相互に情報交換をしている可能性が示唆された。このデータは現在投稿準備中であるが、正確な三次元再構築により、従来の断面による電子顕微鏡観察では明らかにすることができなかった空間的関係性を示すことができた。この成果に基づいて(2)の実験を開始した。

(2) 正常と病態で真皮線維芽細胞とマクロファージ間の接触様態について免疫組織化学的手法と前述のストラクチャー解析により比較検討を行った。免疫組織学的には正常皮膚に比べて熱傷後の早期炎症期・肉芽形成期において正常組織との境界部では細胞数が増えるものの、相互に接触している細胞の数は統計学的に優位に低下していた。ストラクチャー解析を行うと、線維芽細胞は活性化しているものの、細胞突起を伸ばしている構造は、正常のものと類似していた。一方、マクロファージは卵円形で、接触していても、突起の一部と、僅かに触れる程度であった。すなわち、炎症や創傷治癒過程において、両者の空間的な関係性は、正常の真皮置けるものとは異なっており、細胞接着と病態との間に何らかの関係性があることが示唆された。本データは、現在投稿中である。

一方、ケロイドおよび肥厚性癬痕では、線維芽細胞は活性化されたものが多く、豊富な粗面小胞体を持つ様子が観察されたが、マクロファージの数は少なく、また接触した細胞も少ないという傾向が見られた。これは前者モデルと同様であり、細胞接触が病態形成に何らかの要因と成る可能性を示唆している。このデータについては、当初 n=5 で優位な差として確認できるであろうと期待して計画していたが、個体差が大きく、現時点では十分とは言えない。そこで本研究はさらに古賀

を代表とし、さらに臨床的側面を強めた課題として、継続する予定である。

(3) 細胞接着に関わる分子動態を把握するため、マウス皮膚初代培養線維芽細胞と腹腔マクロファージの共培養系を作出した。線維芽細胞は容易に単離できたが、当初、マクロファージについては真皮マクロファージを取得すべく検討をおこなったが、簡単ではなかった。CD115 標識磁気ビーズ等を用いて単離を試みたが収量・生存率が悪く、安定した共培養系を作る事ができなかった。代替策として、マクロファージ源を腹腔マクロファージに求めた。一般的にはチオグリコレートなどマクロファージ誘因剤を用いて取得するが、本研究では活性化を避けるため正常マウス腹腔より、未処理のまま腹水と共に滲出細胞を回収した。一頭より $0.5 \sim 1 \times 10^6$ 程度の細胞を回収し、これらの細胞うち、播種後 2h でシャーレに付着したものを常在型腹腔マクロファージとした。一度付着した常在型マクロファージは接着性が強く通常の細胞剥離剤で再度回収することは難しかったため、マクロファージを播種したシャーレに、別途単離した線維芽細胞を添加する形で共培養系とした。培養後 24h 後の光学顕微鏡レベルでの観察では、多くのマクロファージが、線維芽細胞の下に潜り込んでいる様子が確認できた。また、線維芽細胞が少ないところではマクロファージの数も少なく、両者は何からの関係性を持って存在していることが予測された。長時間培養を行い、相互作用の経時的なライブイメージングを行ったところ、線維芽細胞とマクロファージはお互いに短い突起を伸ばし、線維芽細胞の下でマクロファージが動き回っている様子が確認できた。

共培養系が確立し、形態的な相互作用が確認できたため、分離培養と共培養との間で遺伝子産物の動的変化をトランスクリプトーム解析に掛けた。細胞接着に関わる分子の増加・減少を網羅的に検討したが、細胞接触によって変動する接着分子として有望なものは見つからなかった。しかし、共培養後 *Focal Adhesion* に関わる細胞内タンパクには大きな動きが見られた。したがって、両細胞の接着が細胞表面を介して何らかの情報と成っていることが予想された。では、接着分子として何が重要なのか？現時点では、明言できるだけの確定的な証拠ではないため、特定の名称は避けるが、いくつかの細胞接着関連タンパクが線維芽細胞で発現していることを明らかとした。免疫組織学的にもこのタンパク質が組織中の線維芽細胞に発現していることを確認しており、これが両細胞間の接着に関わる有望な因子であると予想している。

今回得られた結果は、少なくとも、真皮の主要な 2 細胞の間に何らかの細胞接着因子を介した Cell-Cell コンタクトが存在し、それら

が病態時に変化する事を示唆している。我々はこれらのコンタクトの機能として病態時に駆動するものというよりも、定常状態の維持や定常状態に入る上で重要な機能を果たす機構ではないかと考えている。現時点で十分有意差を得られる段階に至らなかったが、これまで解決の糸口が見いだされていない、ケロイド等の有色人種に優位な病態について、動物のモデルと同様の傾向が見られたことは、今後の研究の道筋を示す可能性を秘めていると考えている。特に、本研究において、標的となる分子の候補が挙げられたことは重要な意味があり、病態において、これらのタンパクが変動するのか、また発現抑制を掛けたときにどのような現象が引き起こされるのかについて明らかにすることで、臨床課題の解決に向け大きく進むことが予想される。幸い本課題は同研究組織で継続して採択を受けており(研究代表者:古賀憲幸) 今回の結果に基づいて、より臨床に沿った検討を進めていく予定である。さらなる研究が必要ではあるが、マクロファージの動きを制御することで、ケロイドや肥厚性癬痕といった病態を治療する可能性を秘めており、これらの病態に対して全く新しいアプローチでの治療法の開発に発展することが期待される。

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 9 件)

K.-I. Uemura, K. Ohta, T. Kanazawa, T. Hayashi, R. Tanoue, M. Yoshitomi, S. Hirashima, S. Suekane, K. Matsuoka, T. Igawa, and K.-I. Nakamura, "Subcutaneous transplantation promotes organ formation of the fetal rat urogenital sinus," *Acta Histochem.*, Apr. 2015. 査読有 doi:10.1016/j.acthis.2015.03.008

T. Kanazawa, M. Gotoh, K. Ohta, N. Shiba, and K. Nakamura, "Novel characteristics of normal supraspinatus insertion in rats: an ultrastructural analysis using three-dimensional reconstruction using focused ion beam/scanning electron microscope tomography" *Muscles Ligaments Tendons J*, vol. 4, no. 2, pp. 182-187, Jul. 2014. 査読有 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4187601/>

太田啓介, "SEM 連続断面 3次元解析法" *細胞*, vol. 45, no. 9, pp. 449-452, Sep. 2013. http://hokuryukan-ns.co.jp/magazines/archives/2013/07/20138_1.html

R. Tanoue, K. Ohta, S. Ogasawara, H. Yano, J. Kusakawa, and K. Nakamura, "Bone marrow stromal cells can cause subcutaneous fibroblasts to differentiate into osteocytes in a physically stable spatial microenvironment in rats" *Acta Histochemica*, vol. 115, no. 5, pp. 512-518, 2013. 査読有 doi:10.1016/j.acthis.2012.11.007

小林正利, 太田啓介, 東龍平, 中村桂一郎, 櫻井忠義, "収束イオンビーム搭載走査型電子顕微鏡(FIB-SEM)による骨格筋間質細胞" *日本体育大学紀要*, vol. 42, no. 1, pp. 45-50, Sep. 2012.

K. Ohta, S. Sadayama, A. Togo, R. Higashi, R. Tanoue, and K. Nakamura, "Beam deceleration for block-face scanning electron microscopy of embedded biological tissue" *Micron*, vol. 43, no. 5, pp. 612-620, 2012. 査読有 doi:10.1016/j.micron.2011.11.001

太田啓介, "「電子顕微鏡用包埋剤」~電子顕微鏡の画質をよくする新素材~, " *Material Stage*, vol. 12, no. 3, pp. 57-60, 2012.

太田啓介, "最新電子顕微鏡技術に対応する高機能試料包埋樹脂," *月刊プラスチック*, vol. 2012, no. 6, pp. 110-115, 2012.

太田啓介, 都合亜記暢, 東龍平, 中村桂一郎, "新型電子顕微鏡 FIB/SEM による医学・生物学超微形態観察法の新展開: Structome" *久留米医学雑誌*, vol. 75, no. 1, pp. 1-10, 2012. 査読有

[学会発表](計 27 件)うち 18 件抜粋

太田啓介, 岡山聡子, 中村桂一郎, "SEM 連続切片法による三次元再構築と CLEM 観察への応用,"第 71 回日本顕微鏡学会学術講演会, 京都, 2015/5/13 シンポジウム;招待講演

K. Ohta, "Recent Serial Slice Scanning Electron Microscopy Analysis Uncover the Structural Hierarches between Tissues and Organelles," *IGER International Symposium on Frontiers in Biological Research with advanced Electron Microscope Technologies*, Nagoya, 2015/1/15-16 シンポジウム;招待講演

A. Togo, K. Ohta, R. Higashi, and K. Nakamura, “En bloc staining with hydroquinone treatment for block face imaging,” 第 58 回日本顕微鏡学会シンポジウム, 福岡, 2014/11/16-17 ポスター発表

太田啓介, “3D ボリュームデータのセグメンテーションの現状と課題,” SEM 連続断面観察による生物組織 3 次元再構築法第 2 回研究会, 福岡, 2014/11/15 指定講演

力丸由起子, 右田尚, 力丸英明, 太田啓介, 清川兼輔, 中村桂一郎, “ラットを用いた移植肋骨の経時的变化に関する組織学的研究,” 日本解剖学会第 70 回九州支部学術集会, 北九州, 2014/10/25 口頭発表

K. Ichimura, N. Miyazaki, S. Sadayama, K. Murata, M. Koike, K. Nakamura, K. Ohta, and T. Sakai, “Newly characterized structure of podocytes revealed by three-dimensional analysis using block-face scanning electron microscopy.,” Opening International Symposium Next-Generation Microscopic Science Japan Society of Microscopy, Awaji, 2014/10/3-4 ポスター発表; 優秀ポスター受賞

太田啓介, 中村桂一郎, “SEM 連続断面法における FIB/SEM トモグラフィー法の特徴,” 日本顕微鏡学会第 70 回記念学術講演会, 幕張, 2014. シンポジウム; 招待講演

太田啓介, 中村桂一郎, “SEM 連続断面観察法 FIB/SEM トモグラフィー 3 次元解析のターゲットと試料作製,” 第 119 回日本解剖学会全国学術集会, 宇都宮, 2014/3/28 シンポジウム; 招待講演

小林正利, 太田啓介, 岡山聡子, 東龍平, 櫻井忠義, 中村桂一郎, “FIB/SEM 観察による骨格筋損傷後に現れる筋線維間質細胞の細胞性ネットワーク,” 第 119 回日本解剖学会全国学術集会, 宇都宮, 2014/3/28 ポスター発表

岡毅, 金澤知之進, 太田啓介, 中村桂一郎, “熱傷形成ラットにおける細胞の分布と配列の差違,” 第 65 回日本皮膚科学会西部支部学術集会, 2013/11/9-10 口頭発表

太田啓介, “FIB/SEM トモグラフィー 3 次元解析のターゲットと試料作製,” SEM 連続断面観察による生物組織 3 次元再構

築法第一回研究会, 久留米, 2013/10/20 指定発表

太田啓介, 岡山聡子, 吉富宗健, 力丸由起子, 都合亜記暢, 岡毅, 金澤知之進, and 中村桂一郎, “FIB/SEM トモグラフィー法による生体組織メソスケールと免疫組織学的観察の接点,” 第 54 回日本組織細胞化学会学術集会, 東京, 2013/9/27 シンポジウム; 招待講演

K. Ohta and K. Nakamura, “3D reconstruction of the cells and tissues using FIB/SEM tomography method,” XXIII international Symposium on Morphological Sciences, Niigata, 2013. シンポジウム; 招待講演

太田啓介, “FIB-SEM を用いた連続ブロック表面観察による生物組織のメソスケール 3 次元形態観察,” 第 69 回日本顕微鏡学会全国学術集会, 大阪, 2013/9/10-13 シンポジウム; 招待講演

中村桂一郎, 林篤正, 東龍平, 武谷三恵, 岡山聡子, 金澤知之進, 太田啓介, 鷹野誠, “間葉細胞は組織の区画化に重要な役割を果たす: FIB/SEM による超微形態解析,” 第 90 回日本生理学会大会, 東京, 2013/3/27 シンポジウム; 招待講演

太田啓介, “FIB-SEM トモグラフィー 生体組織のメソスケール三次元構造解析,” 第 13 回医学生物学電子顕微鏡シンポジウム, 大阪, 2012/11/24 シンポジウム; 招待講演

太田啓介, 都合亜記暢, 東龍平, 中村桂一郎, “Cathode bias による生物組織 FIB/SEM トモグラフィー高分解能観察,” 日本顕微鏡学会大 68 回学術講演会, 筑波, 2012/5/14-16 p. 80. シンポジウム; 招待講演

中村桂一郎, 太田啓介, 東龍平, 林篤正, 武谷三恵, and 鷹野誠, “FIB/SEM による平滑筋組織間質細胞の解析,” 第 89 回日本生理学会記念講演会, 松本, 2012/3/26 シンポジウム; 招待講演

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: Embedding resin composition for electron microscope, and method for observing sample on electron microscope using said composition

発明者: Ohta K.

権利者: Kurume Univ.

種類:

番号: CPT/JP2012/072418

出願年月日: 2014年3月3日

国内外の別: 有

〔その他〕

ホームページ:

<http://www.med.kurume-u.ac.jp/med/anat2/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

太田 啓介 (Ohta, Keisuke)

久留米大学・医学部・准教授

研究者番号: 00258401

(2) 研究分担者

力丸 由起子 (Rikimaru, Yukiko)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号: 90368960

(3) 研究分担者

古賀 憲幸 (Koga, Noriyuki)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号: 30309851

(4) 連携研究者

中村 桂一郎 (Nakamura, Kei-ichiro)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号: 20172398

(5) 研究協力者

岡 毅 (Oka Takeshi)