

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25440155

研究課題名(和文) 基底膜ライブイメージングによる組織構築メカニズムの解析

研究課題名(英文) Analysis of basement membrane dynamics by live-imaging

研究代表者

二木 杉子 (Futaki, Sugiko)

大阪医科大学・医学部・助教

研究者番号：00403014

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：表皮や臓器の表面、血管の内面などは、互いに密着した細胞でおおわれている。基底膜はその細胞を下から支えるシートで、細胞の構造を保つために重要な役割をもつ。しかし生体内で基底膜がどのように変化しているかはほとんどわかっていない。そこで本研究では基底膜を蛍光標識する方法を開発し、マウス体内での基底膜の形成や分解を観察することを目的とした。蛍光標識を遺伝子導入したマウスでは、胎仔から成体まで、全身の基底膜に蛍光標識がみられることが確認された。このマウスを利用することで、将来的に血管の異常やがんの浸潤などの際に基底膜がどのように変化するかを解析し、病気のメカニズムの解明につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Basement membranes (BMs) are sheet-like extracellular matrices that are formed at basal sides of epithelial and endothelial cell layers. BMs regulate cell behaviors and essential to organize tissue architecture. During embryogenesis and tissue regeneration, structure and composition of BMs are dynamically changed as well as changes of epithelial tissues. However, dynamics of BMs has been hardly studied in mammalian tissues. Recently we have developed a fluorescent probe for live-imaging of BMs in mammalian tissues. We have established a transgenic (Tg) mouse line in which Nidogen-1, a ubiquitous BM protein, fused with a red fluorescent protein mCherry (nid1-mCherry) is expressed. The Tg mouse showed red fluorescence of nid1-mCherry in BMs of multiple tissues. Also the Nid1-mCherry fluorescence was detected from embryo to adult. These observations strongly suggest that the nid1-mCherry Tg mouse is a powerful tool to study the BM dynamics in mammalian tissues in vivo.

研究分野：発生生物学、細胞生物学

キーワード：基底膜 細胞外マトリックス ライブイメージング

1. 研究開始当初の背景

基底膜は細胞外マトリックスの薄いシート構造で、上皮組織や内皮細胞の足場として機能し、組織構築に重要な役割を担っている。基底膜の形成・分解は近接する細胞によって厳密に制御されており、器官形成や創傷治癒、がん細胞の浸潤などの病態とも深く関わっている。また、基底膜を構成する分子の組成は組織や発生段階によって異なっている。このような基底膜の形成・分解や組成の変化は組織構築において重要な要素だと考えられているが、生体内での基底膜の動的な変化についてはほとんど明らかにされていない。従来の研究法では固定組織を用いた解析が主であり、基底膜の変化を詳細に追跡することが困難であった。近年、蛍光イメージング技術の発達等により、線虫やショウジョウバエなどのモデル生物では生体内の基底膜を可視化した解析が報告されている。これに対し、哺乳類組織における基底膜の動態については未だモデルとなる系が報告されていなかった。そこで本研究では、蛍光イメージング技術を使用して *in vitro*、*in vivo* での哺乳類組織における基底膜可視化と動態解析にとりくむこととした。

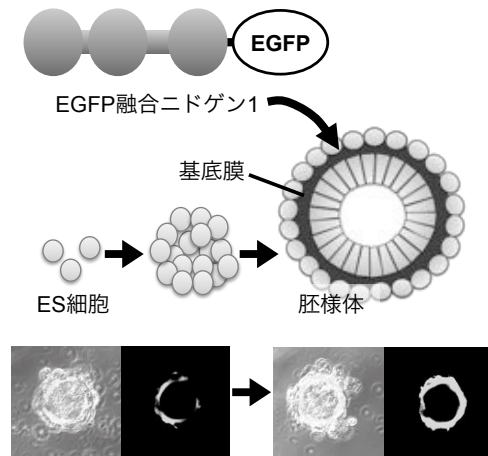
2. 研究の目的

本研究では、哺乳類組織における基底膜の形成・分解・リモデリングを蛍光ライブイメージングにより解析するためのモデル開発に取り組んだ。そのため、(1)哺乳類組織の基底膜を可視化するプローブ開発、(2)培養細胞で基底膜形成が観察できる *in vitro* モデルを用いた基底膜イメージング、(3) *in vivo* で基底膜を蛍光標識できるモデルマウスの作製と評価を目標とした。

3. 研究の方法

(1)哺乳類組織の基底膜を可視化するプローブ開発: 基底膜蛋白質の一つである Nidogen1 に着目し、ヒト由来 Nidogen1 に様々な蛍光たんぱく質を付加した融合タンパク質 (蛍光 Nid1) の発現系を構築して比較を行った。

(2) *in vitro* モデルを用いた基底膜イメージング: 培養細胞を用いた *in vitro* 基底膜形成モデルを利用し、上記蛍光 Nid1 発現系の評価を行った。具体的には、蛍光 Nid1 を安定発現するマウス ES 細胞株を作製し、3次元培養下で胚様体へと分化誘導し、内部に形成される基底膜に蛍光 Nid1 たんぱく質が組み込まれるかどうかを評価した。また、同様の評価をイヌ MDCK 細胞でも行った。

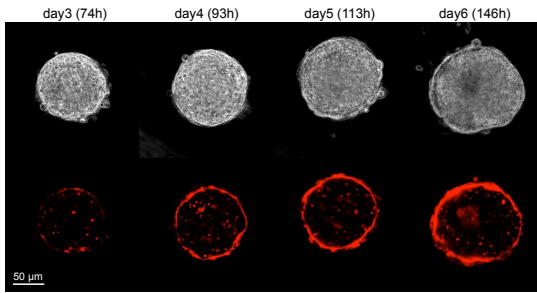


(3) *in vivo* で基底膜を蛍光標識できるモデルマウスの作製と評価: 蛍光 Nid1 のなかで最も発現効率の良かった Nid1-mCherry 発現系をマウス胚に導入し、全身で Nid1-mCherry を発現するトランスジェニック (Tg) マウスを作製した。このマウスを用いて Nid1-mCherry の基底膜組み込みについての評価を行なった。

4. 研究成果

(1)哺乳類組織の基底膜を可視化するプローブ開発: 平成 25 年までに作製した EGFP 融合型ヒト由来 Nidogen-1 (Nid1-EGFP) 組換えたんぱく質は、基底膜標識能は有するものの発現・分泌効率に問題があると考えられた。そこで、EGFP 以外の蛍光蛋白質として Venus、mCherry 等を融合させた Nidogen1 発現系を新たに作製し、哺乳類培養細胞において発現効率を比較した。その結果、赤色蛍光たんぱく質 mCherry を融合させたもの (Nid1-mCherry) がもっとも発現効率が高く、基底膜標識能もつことが明らかとなった。蛍光たんぱく質の性質 (たんぱく質成熟効率、修飾、多量体形成など) によって Nidogen-1 組換えたんぱく質の分泌効率が影響を受けるものと考えられる。

(2) *in vitro* モデルを用いた基底膜イメージング: 上記課題で作製した Nid1-mCherry 発現系をマウス ES 細胞に導入し、安定発現株を作製した。これらの ES 細胞を非接着条件で培養することで 3 次元的な構造をもつ胚様体へと分化させ、その内部に形成される基底膜を観察した。その結果、分化した胚様体の基底膜部位に Nid1-mCherry が集積していることが確認され、培養下で継続的に基底膜の動態観察が可能であることが示された。

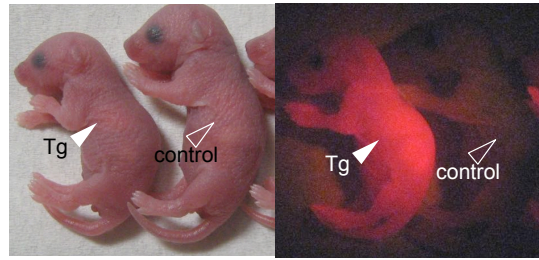


さらに、イヌ由来 MDCK 細胞に Nid1-EGFP、Nid1-mCherry 発現系をそれぞれ導入して安定発現細胞株を作製し、3次元ゲル上で cyst を形成させる分化誘導を行って、基底膜の形成と蛍光標識を観察した。ゲル上に単一細胞で播種された MDCK 細胞は、細胞分裂を繰り返してコロニーを形成しながら中空構造をもつ cyst へと分化する。MDCK 細胞自身が発現する Nid1-EGFP, Nid1-mCherry は、いずれも cyst 表面に形成される基底膜部位に局在することが確認された。また cyst 形成初期の詳細な観察を行なったところ、MDCK 細胞が分裂して少数の集団になった状態で一部の細胞内に Nid1-EGFP や Nid1-mCherry の蛍光の上昇が見られ、ついで細胞の表面に蛍光が集積する様子も観察された。これらの系は、基底膜形成の初期段階を詳細に観察し、細胞の上皮化と基底膜形成の関係を明らかにする上で有用なモデルになるものと期待される。

(3) *in vivo* で基底膜を蛍光標識できるモデルマウスの作製と評価: *In vitro* で哺乳類細胞において高い発現効率を示した Nid1-mCherry 発現系を利用し、これを導入したコンディショナルトランスジェニックマウスを作製した。このマウスは ROSA26 遺伝子座に CAG プロモーター制御下で発現する Nid1-mCherry cDNA 配列が挿入されており、の上流には LoxP 配列で挟まれて stop コドン を有する薬剤耐性遺伝子 cDNA を挿入し、Nid1-mCherry が Cre リコンビナーゼ依存的に発現するように設計されている。トランスジェニックマウスの作製は理化学研究所との共同研究で行った。得られたトランスジェニックマウスにおける基底膜蛍光標識を評価するため、Cre 発現マウスと交配して全身で Nid1-mCherry を発現するようにした娘系統 (Nid1-mCherry Tg) を作製し、組織学的に基底膜標識の評価を行なった。

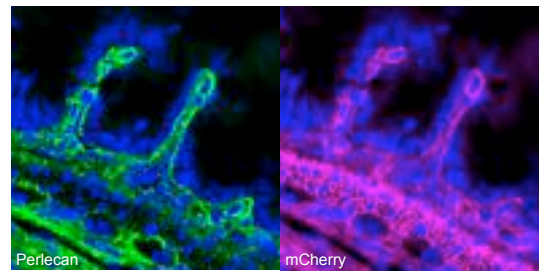
Nid1-mCherry Tg マウスは正常に出生し、繁殖可能であることから、Nid1-mCherry の強制発現がマウスの発生や繁殖に影響を及ぼさないことが示された。

Nid1-mCherry Tg マウスは胎仔期から全身で mCherry 蛍光が観察され、新生仔の外観でも赤色蛍光で識別可能であった。



P1

Nid1-mCherry Tg 消化管組織を観察したところ、小腸上皮、血管、および平滑筋基底膜において明瞭な Nid1-mCherry の蛍光が見られた。これらの蛍光は、抗パーレカン抗体を用いた免疫組織染色による内在性の基底膜の局在とよく一致していた。



これらの基底膜蛍光標識は、消化管のほか皮膚、胚、腎臓などの様々な器官の基底膜において、胎仔から成体まで局在していることも明らかとなった。さらに、胚発生のもっとも初期に基底膜が形成される胎生 4.5 日胚でも基底膜の蛍光観察が可能であることが明らかとなった。

これらの観察結果から、本研究課題で作製した Nid1-mCherry Tg マウスおよび蛍光 Nid1 発現系は、*in vivo*、*in vitro* での哺乳類組織における基底膜の動態観察に有用なモデルといえる。基底膜の変化は器官形成や様々な病態と結びついていることから、今後はこれらのモデルを用いた器官形成メカニズムや病態の解析が期待される。

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 0 件)

〔学会発表〕 (計 12 件)

1. 門谷 裕一, 二木 杉子, 下野 知性, 木村 武利, 関口清俊, Basement Membrane Dynamics in Developing Organs. 上皮基底膜のダイナミクス. 第 48 回 日本結合組織学会学術大会, 三重県総合文化センター (三重・津), 2017 年 6 月 24 日~25 日

2. 二木 杉子, 関口 清俊, 近藤 洋一, トランスジェニックマウスを用いた in vivo 基底膜イメージングモデルの評価. 第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 長崎大学 (長崎・長崎), 2017 年 3 月 28 日～30 日
 3. 二木 杉子, 関口 清俊, 前村 憲太郎, Analysis of a transgenic mouse as a model for live-imaging of basement membranes in vivo. 第 48 回日本結合組織学会学術大会, 長崎大学 (長崎・長崎), 2016 年 6 月 24 日～25 日
 4. 二木 杉子, 矢野 真理子, 下野 知性, 関口 清俊, 前村 憲太郎, 哺乳類組織における基底膜ライブイメージング. 第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会, ビッグパレットふくしま (福島・郡山), 2016 年 3 月 28 日 (月)～30 日 (水)
 5. 二木 杉子, 矢野 真理子, 下野 知性, 関口 清俊, 大槻 勝紀, 蛍光基底膜プローブ発現系を用いた基底膜ライブイメージング. 第 47 回日本結合組織学会学術大会, コクヨホール (東京・港), 2015 年 5 月 14 日～16 日
 6. Sugiko Futaki, Ayano Horimoto, Mariko Yano, Chisei Shimono, Kiyotoshi Sekiguchi, Yoshinori Otsuki, Live-imaging of the basement membranes in mammalian systems. 第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 神戸国際会議場 (兵庫・神戸), 2015 年 3 月 21 日～23 日
 7. 二木 杉子, 堀本 絢乃, 矢野 真理子, 下野 知性, 関口 清俊, 大槻 勝紀, ほ乳類組織における基底膜ライブイメージングのためのプローブ開発. 第 55 回日本組織細胞化学会総会・学術集会/第 11 回日中合同組織細胞化学セミナー, 松本市中央公民館 (長野・松本), 2014 年 9 月 27 日～28 日
 8. 二木 杉子, 矢野 真理子, 木村 武俊, 門谷 裕一, 関口 清俊: 哺乳類組織における基底膜ライブイメージング. 第 46 回日本結合組織学会学術大会・第 61 回マトリックス研究会大会合同学術集会, ウィンクあいち (愛知・名古屋), 2014 年 6 月 5 日～7 日
 9. 門谷 裕一, 二木 杉子, 関口 清俊, 木村 武俊: 分枝形態形成の基底膜ライブイメージング, 第 119 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 自治医科大学 (栃木・下野), 2014 年 3 月 27 日～29 日
 10. 二木 杉子, 堀本 絢乃, 矢野 真理子, 関口 清俊: Live-imaging of the Basement Membranes in Mammalian System, 61st NIBB conference “ Cellular Community in Mammalian embryogenesis, 岡崎コンファレンスセンター (愛知・岡崎), 2013 年 7 月 10 日～12 日
 11. 門谷 裕一, 二木 杉子, 関口 清俊, 木村 武俊: 唾液腺分枝形態形成の基底膜ライブイメージング観察, 第 45 回日本結合組織学会・第 60 回マトリックス研究会合同学術集会, 和歌山県立医科大学 (和歌山・和歌山), 2013 年 6 月 29 日
 12. 二木 杉子, 堀本 絢乃, 矢野 真理子, 下野 知性, 関口 清俊: ほ乳類組織における基底膜ライブイメージングのためのプローブ開発. 第 45 回日本結合組織学会・第 60 回マトリックス研究会合同学術集会, 和歌山県立医科大学 (和歌山・和歌山), 2013 年 6 月 28 日～29 日
- [図書] (計 0 件)
- [産業財産権]
- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
- 二木 杉子 (FUTAKI Sugiko)
- 大阪医科大学・医学部・助教
- 研究者番号: 00403014