

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：13802

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14558

研究課題名(和文) NanoSuit法により新規同定された微小仮足に注目した発生・再生制御機構の解明

研究課題名(英文) A pseudopod-like nano structures are involved in wound healing: observations by NanoSuit method in field-emission scanning electron microscopy.

研究代表者

高久 康春 (Takaku, Yasuharu)

浜松医科大学・医学部・特任助教

研究者番号：60378700

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々は革新的電子顕微鏡技術(NanoSuit法)の開発に取り組み、これまでとは全く異なる画像を得ることに成功していた。特に、再生時にみられる『微小仮足』は、従来の形態学では全容を捉えることができない構造であった。本課題では、再生能力が高い腔腸動物ヒドラを主な研究対象とし、創傷治癒にはじまる再生最初期の微小仮足を継時的に解析した。その結果、微小仮足の働きとして修復の駆動力を担っている可能性が考えられた。また同様の構造は、ヒドラ以外の動物の発生における器官形成や組織再生過程、活発に活動するガン細胞においても確認された。このような結果から、発生や再生における新しい調節機構の存在が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We have previously described a method that allows the investigator to keep a variety of specimens wet in the high vacuum environment of the electron microscope by encasing the organisms in a thin, vacuum-proof suit, the 'NanoSuit'. In the present study, to examine the function of pseudopod-like nano structures in wound healing, which had been detected by NanoSuit method, we analyzed the regenerative tissues in hydra. The results provide evidences that the number of nano structures changed with time in the beginning of the tissue repair, which process seemed consistent with wound closing. Histological and pharmacological studies suggest that actin filaments play an important role in the regulation of the nano structures. Furthermore, we found that such structures were detected in other animals in regenerative or growing processes. Taken together, the results suggest the possibility that these nano structures would contribute to animal development and/or regeneration.

研究分野：発生・再生

キーワード：電界放出形走査電子顕微鏡 高真空 含水状態 NanoSuit

1. 研究開始当初の背景

(1) 生物試料は、構成成分の70~80%が水であるため、高真空環境 ( $10^{-3}$ - $10^{-7}$ Pa) を必要とする電子顕微鏡で観察するには、事前の化学固定や脱水が不可欠と考えられてきた。しかしこれらの処理は、試料の変形やアーティファクトを生じさせる為、従来法による観察・解析による結果は、生体本来の構造を正確に捉えてはいなかった(図1a, c)。我々は既に、全く新しいアプローチで生物試料の高真空・高分解能観察に成功している。昆虫の体表面物質(および疑似物質)を試料に塗布し、電子線およびプラズマ照射により体表全面に高気密 NanoSuit®を形成することにより(図2)、高真空中で試料を生きたまま維持・観察することが可能となった(図1b)。(Takaku et al, 2013; Suzuki et al, 2013; Ohta et al, 2014; Takaku et al, 2015 等)。

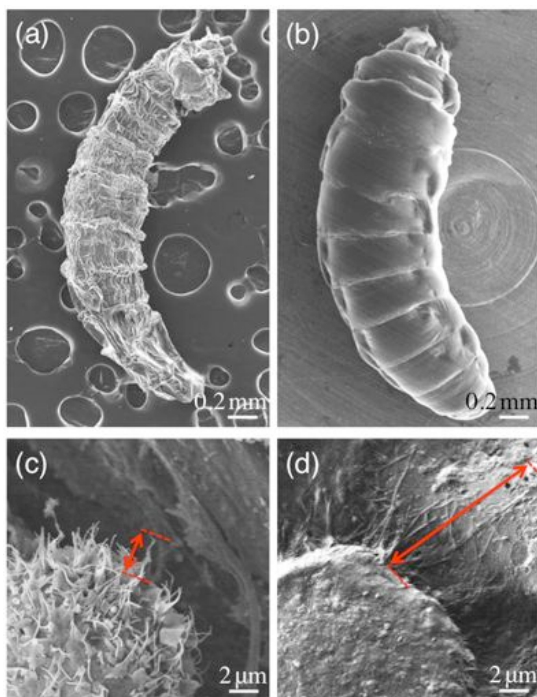


図1. 死んだ試料「従来法」(左列) と生きたままの「NanoSuit®法」(右列) のFE-SEM像。ショウジョウバエ幼虫(a, b)、単離したガン細胞(c, d)。cでは壊れて短い仮足が、dでは瑞々しいままの伸長した状態で観察できる。

(2) その後、この方法の展開によって、五界説で分類される原核生物、原生生物、菌類、植物、動物を電界放射型走査型電子顕微鏡(FE-SEM)内で観察可能にし、さらに切り出した組織切り出した組織・単離した細胞などをFE-SEMで観察することに成功し、これまでとは全く異なる画像を得ていた。

2. 研究の目的

特に、NanoSuit®法によって発見された『微小仮足』は、従来の形態学の技術では(壊れて

しまつて) 全容を捉えることが出来なかった構造体である(図2c, d)。本申請では、微小仮足の高解像度電子顕微鏡観察に適するように NanoSuit®法の最適化を図り、このよ

うな未知の構造に焦点を当て、様々なモデル生物の発生や再生における微小仮足による制御・調節機構の解明を目的とする。

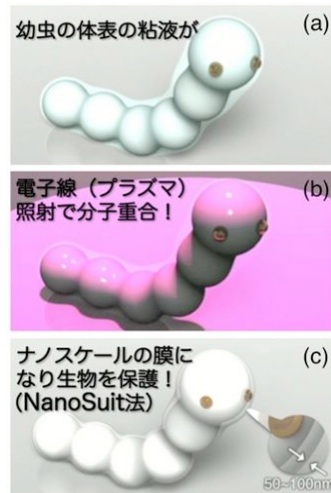


図2. NanoSuit®による生命維持(Science News 2013より改変)。

3. 研究の方法

本課題では、再生能力が高い腔腸動物ヒドラを主な研究対象とし、創傷治癒にはじまる再生初期における微小仮足の変化を継時的に解析する。まず、NanoSuit®法により含水状態の細胞や組織をFE-SEMで観察し、非再生・再生部位における微小仮足の状態を比較解析する。透過型電子顕微鏡(TEM)による観察を行ない、さらに、抗体や薬剤処理による仮足機能阻害法を組み合わせることにより機能を推測する。得られた知見に基づき、微小仮足による制御機構を明らかにする。

4. 研究成果

(1) ヒドラの頭部をメスで切除すると体腔中央に大きな穴が生じるが、1時間ほどでは塞がって見えなくなる(図3)。

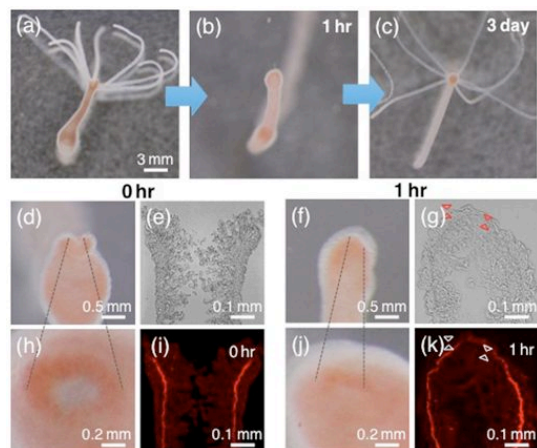


図3. ヒドラの頭部再生過程。失った頭部は約3日で再生するが(a-c)、再生の極初期の変化を調べると、1時間ほどで傷口は塞がる(d, h, f, j)。その際、切断されたアクチンの束が再結合している状態が確認された(e, i, g, k)。

(2) この過程を超微細構造に注目して調べるために、再生開始から15分経過したところで化学固定処理を行い(再生を停止させ)、NanoSuit®法により試料を保護し、含水状態の断面をFE-SEMで観察した。すると再生部位には、直径が数百nmと細く、且つ全長が20~50 $\mu\text{m}$ に達する微小仮足が多数見られた(図4b)。これに対し、事前に化学固定を行って(殺してしまって)再生を起していない個体の断面を観察すると、そのような微細構造はあまり見られなかった(図4a)。この結果から、微小仮足は再生時にその発現量が増加する可能性が示唆された。そこで、再生過程における微小仮足の変化をさらに詳細に解析するために、再生直後(1分)・15分後、50分後における個体の断面を、同様の手法により観察した。すると、再生直後に比べ、再生15分後ではより多くの微小仮足が発現していた。ところが、再生開始50分後になるとその発現量は減少に転じていた(図4b, c, d)。

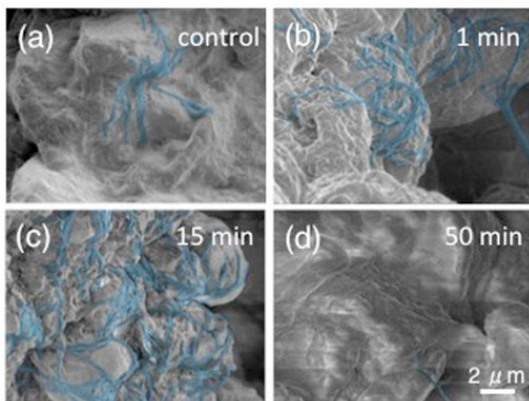


図4. ヒドラ頭部再生過程にみられる微小仮足の発現量の変化。非再生部位(a)、再生1分後(b)、15分後(c)、50分後(d)の微小仮足のFE-SEM像。

(3) 透過形電子顕微鏡(TEM)では、試料を70nmの超薄切片にして観察するために、微小仮足は(切れてしまうので)その一部分しか観察できないが、FE-SEM観察と同様に、非再生部位にくらべ再生部位では有意に多くの微小仮足が観察された(図5)。またファイバー構造の中心に見られるフィラメント様構造は、径のサイズおよび電子密度からアクチンと考えられた。そこで、アクチンの重合阻害剤であるサイトカラシンによって前処理をすると、微小仮足の発現は抑制されることが明らかになった。

(4) 本研究結果から、微小仮足の継時変化(発現量:再生1min<再生15min>再生50min)は、傷口が修復されるタイムスケールと一致していた。すなわち大きく開いた傷口は、15分ほどで急速に小さくなり、約1

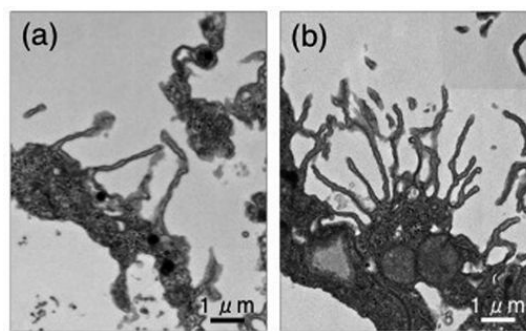


図5. 非再生部位(a)と再生15分後の個体の断面にみられる微小仮足のTEM像。

時間の後には塞がる。このことから、微小仮足の働きとして、ひとつには傷口修復の駆動力を担っている可能性が示唆された。一方、細胞性アクチンは細胞の運動能を司ることが知られているが、ヒドラの再生においても細胞選別現象などで必須の駆動力となっている(Takaku et al, 2005)。アクチンの重合により微小仮足が制御され、再生の最初期に寄与していることが考えられる。また同様の微細構造は、ヒドラ以外の動物の、発生における器官形成や組織再生過程において、あるいは活発に活動するガン細胞においても確認された(図6)(Takaku et al, 論文作成中)。

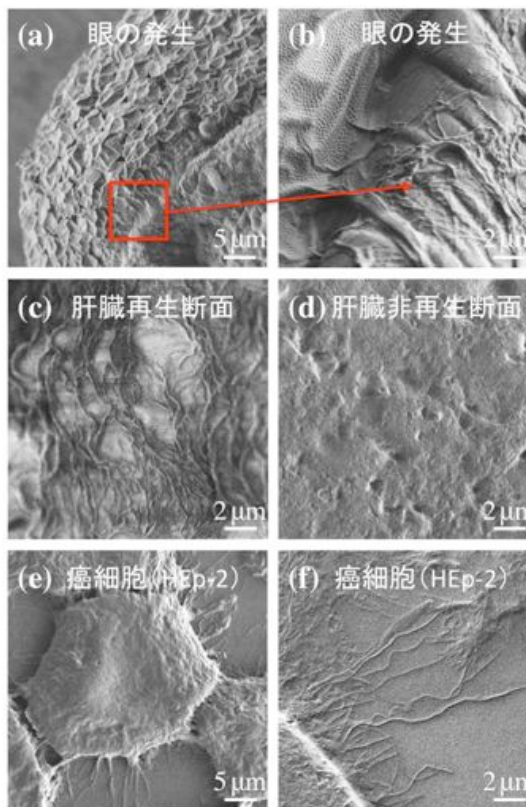


図6. 発生や再生時にみられる微小仮足のNanoSuit®像。ショウジョウバエの眼の発生(a, b)、マウス肝臓(c, d)、単離した「生きたままの癌細胞」(e, f)。

このような微小仮足の機能解明は、医学・

生物学分野に新たな展開をもたらすだけでなく、一般社会での医療・工業などの応用生命科学の進歩に結びつく。例えば、再生における微小仮足の役割を詳細に解明すれば、人工多能性幹細胞系譜制御での新機構を提案できる可能性がある。がん細胞に見られる微小仮足の制御により浸潤や転移が抑止できれば、その基板材料の開発や抑制試薬の開発に多大な貢献ができる。また、本研究により新たに設定された課題を速やかに遂行し、NanoSuit®の有用性を世界に先立って示すことは、日本のみならず世界の基礎科学技術の大きな飛躍に繋がると考える。

#### <引用文献>

① Takaku Y, Suzuki H, Ohta I, Ishii D, Muranaka Y, Shimomura M, Hariyama T, A thin polymer membrane, nano-suit, enhancing survival across the continuum between air and high vacuum, Proc Natl Acad Sci USA 110(19)、2013、7631-7635

② Suzuki H, Takaku Y, Ohta I, Ishii D, Muranaka Y, Shimomura M, Hariyama T: *In-situ* preparation of biomimetic thin films and their surface shield effect for organisms in high vacuum, PLOS ONE 8(11), 2013, Published online

③ Ohta I, Takaku Y, Suzuki H, Ishii D, Muranaka Y, Shimomura M, Hariyama T、Dressing living organisms in a thin polymer membrane, NanoSuit, for high vacuum FE-SEM observation, Microscopy, 2014, Published online

④ Takaku Y, Suzuki H, Ohta I, Tsutsui T, Matsumoto H, Shimomura M, Hariyama T、A “NanoSuit” surface shield successfully protects organisms in high vacuum: observations on living organisms in a FE-SEM, Proc Biol Sci 282 (1802)、2015、Published online

⑤ Takaku Y, Hariyama T, Fujisawa T: Motility of endodermal epithelial cells plays a major role in reorganizing endodermal and ectodermal tissue layers, Mech Dev 122(1)、2005、109-122

#### 5. 主な発表論文等

##### [雑誌論文] (計3件)

① Takaku Y, Suzuki H, Kawasaki H, Ohta I, Ishii D, Hirakawa S, Tsutsui T, Matsumoto H, Takehara S, Nakane C, Sakaida K, Suzuki

C, Muranaka Y, Kikuchi H, Konno H, Shimomura M, Hariyama T、 “A modified “NanoSuit” preserves wet samples in high vacuum: direct observations on cells and tissues in field-emission scanning electron microscopy.”、R Soc Open Sci、査読有り、2017、Published online、DOI: 10.1098/rsos.160887.

② 高久 康春, 針山 孝彦、「生きた生物試料のSEM観察を可能にする表面処理：ナノスーツ法」、表面技術、査読無し、68(4):、2017、178-180

③ 高久 康春, 鈴木 浩司, 針山 孝彦, 石井 大佑, 森 直樹, 平井 悠司, 下村 政嗣、「Biomimetic Biofilm としてのNanoSuit®: 生態観察の革新的手法」、表面科学、37(5)、2016、査読有り、202-206

##### [学会発表] (計4件)

① Sakaida K, Takaku Y(共筆頭著者), Kawasaki H, Shimomura M, Hariyama T、 “A modified NanoSuit® preserves living cells in FE-SEM.”、American Society for Neurochemistry 2017、2017年3月18-22日、リトルロック (USA)

② 松本 晴子, 高久 康春(共筆頭著者), 下村 政嗣, 針山 孝彦、「ナノスーツ・真空下で命を守る宇宙服-生きたままの生体の構造と元素を電子顕微鏡分析」、第65回高分子討論会、2016年9月12-14日、神奈川大学(横浜)

③ Sakaida K, Takaku Y(共筆頭著者), Kawasaki H, Shimomura M, Hariyama T、 “A modified “NanoSuit” preserves living eukaryotic cells in FE-SEM.”、第38回日本比較生理生化学会 東京大会、2016年9月2-4日、玉川大学(町田)

④ 坂井田 佳奈, 高久 康春(共筆頭著者), 河崎 秀陽, 針山 孝彦、「NanoSuit®法による生きたままの培養細胞観察」、日本顕微鏡学会・第72回学術講演会、2016年6月14-16日、仙台国際センター(仙台)

##### [図書] (計1件)

① 高久 康春、日刊工業新聞社、トコトンやさしいバイオミメティクスの本「電子顕微鏡のための宇宙服」、2016、総ページ数: 2

##### [産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称：含水状態の生物試料の電子顕微鏡観察用保護剤、電子顕微鏡観察用キット、電子顕微鏡による観察、診断、評価、定量の方法並びに試料台

発明者：針山 孝彦，高久 康春，鈴木 浩司，平川 聡史，河崎 秀陽，下村 政嗣，石井 大佑，太田 勲，村中 祥悟

権利者：JST

種類：PCT/JP2015/052404

番号：2014-014910/2014-179660

出願年月日：2015年1月28日

国内外の別：国外

〔その他〕

ホームページ等

タイトル：浜松医大、電子顕微鏡で生きた細胞観察

URL:[http://www.nikkei.com/article/DGXLASGG02H50\\_V00C17A3TJM000/](http://www.nikkei.com/article/DGXLASGG02H50_V00C17A3TJM000/)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高久 康春 (TAKAKU, Yasuharu)

浜松医科大学・医学部・総合人間科学・特任助教

研究者番号：60378700

### (3) 連携研究者

平川 聡史 (HIRAKAWA, Satoshi)

浜松医科大学・医学部・皮膚科学講座・准教授

研究者番号：50419511

河崎 秀陽 (KAWASAKI, Hideya)

浜松医科大学・医学部・再生・感染病理学講座・助教

研究者番号：90397381