

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590197

研究課題名(和文) ゆっくりした細胞形態変化の可視化法の開発とそれを用いた上皮形態形成の研究

研究課題名(英文) Cellular Dynamics of Epithelial Branching Morphogenesis

研究代表者

門谷 裕一 (KADOYA YUICHI)

北里大学・医療衛生学部・准教授

研究者番号：10185887

研究成果の概要(和文)：分枝形態形成は、外分泌腺の基本的な組織形成様式である。細胞膜非透過性の蛍光色素存在下で器官培養した胎生期マウス顎下腺をタイムラプス共焦点顕微鏡で観察したところ、上皮集塊内の細胞がダイナミックに移動、変形することが判明した。分枝形態形成は上皮集塊基底部のクレフト形成に始まる。このクレフトは上皮集塊の内部に向かって先端をくねらすように侵入したが、これにはクレフト基部の微細線維束を芯とする細胞質突起が関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We cultured the rudimental submandibular gland (SMG) of mice with a non cell-permeable fluorescent tracer, and observed cell behavior during epithelial branching morphogenesis using confocal time-lapse microscopy. We traced movements of individual cells as shadowgraph movies. Individual epithelial cells migrated dynamically but erratically. The epithelial cleft extended by wiggling and separated a cluster of cells into two buds during branching. We examined the ultrastructure of the clefts in SMG rudiments treated with the laminin peptide A5G77f, which induces epithelial clefting. A short cytoplasmic shelf with a core of microfilaments was found at the deep end of the cleft. We propose that epithelial clefting involves a dynamic movement of cells at the base of the cleft, and the formation of a shelf within a cleft cell.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：解剖学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般(含組織学・発生学)

キーワード：組織形成、唾液腺、微細構造、タイムラプス、共焦点顕微鏡法

1. 研究開始当初の背景

膵臓、肺、唾液腺などの外分泌腺の器官形成は、上皮組織の塊からなる「芽」が、周囲の間葉組織中で増殖しながら1次、2次・と枝分れを繰り返すことで進行し、分枝形態形成

(branching morphogenesis) と呼ばれる。このような組織の変形は、器官を構成する1つ1つの細胞の変形や移動が統合された結果である。しかしながら、分枝形態形成の機構についての知見の多くは、様々な発生ステージや実験条件

下での、「固定」された組織像の比較によっており、実際の分枝形態形成における細胞動態の実際は不明な部分がきわめて大きい。

発生期のマウス唾液腺組織は分枝形態形成研究の格好のモデルである。胎生12日のマウス顎下腺では、ストーク stalk とよばれる導管系組織とその遠位部に連なる終末集塊 terminal cluster とよばれる上皮細胞の一塊が、間葉組織の内部に埋まっている。分枝形態形成は終末集塊の基底部にクレフト cleft が生ずる事により始まる。クレフトは伸長しやがて終末集塊を2つの終末部に分割する。この過程が引き続いて進行する事により、よく発達した導管系と、その遠位端に連絡する多数の終末部 end bud が完成する。野川(1983)によると、分枝形態形成に際し、終末集塊基部に浅い陥凹が多数出現し、そのうちの一部が伸張しクレフトとなるもの、おおくは一過性ですぐに消失するという。この観察は、通常の顕微鏡を用いてなされたもので、残念ながら、細胞レベルでの変化をうかがい知る事はできない。近年になり、Larsenら(2006)は、顎下腺上皮細胞を緑色蛍光タンパク質 green fluorescent protein (GFP)によって標識する事に成功し、分枝形態形成時の上皮系細胞の動態をタイムラプスによる動画としてとらえる事に成功している。しかしながら、彼女らの標識法では、1つ1つの細胞の動きをとらえる事はできるものの、集団としての細胞運動の全体像をとらえる事は不可能であった。

2. 研究の目的

本研究は、(1)細胞のゆっくりした形態変化を、多細胞体丸ごとのままで観察するための手法を開発し、(2)唾液腺分枝形態形成過程を例にとり、上皮形態形成に際しての細胞形態の変化の動的過程の解明をめざした。さらに、これらの知見にもとづき、(3)上皮分枝形態形成の最も基本的な細胞運動である上皮組織のクレフト形成に関わる機構の超微形態学的解析をめざした。

3. 研究の方法

(1) 器官培養

胎生13日目(膣栓確認の朝を胎令0日とする)のICR系マウス顎下腺原基を材料とした。共焦点顕微鏡で観察するために、ガラスボトムディッシュ(アサヒテクノガラス)のガラス表面をマトリゲル(培養液で2.5%に希釈)でコート(37°C、1時間)し、その上に置いた顎下腺原基を少量の培養液(10%牛胎仔血清含有DMEM/F12培養液)で覆った。そのまま20時間インキュベーター(37°C、5%炭酸ガス含有)内で静置する事により、ガラスボトムディッシュ上にマウス顎下腺を固定した。

一部の顎下腺原基は、常法に従いポリカーボネイト製の膜(Nucleopore)上で培養し、クレ

フト形成を促進させるために無血清培養液(50 μ g/ml トランスフェリン含有DMEM/F12培養液)にA5G77f ラミニンペプチド(LVLFNLHGH、東京薬科大学野水教授より分与)を0.19mMで添加し、3日間培養した。

(2) 共焦点顕微鏡によるタイムラプス観察法

瀬川(1999)は培養液に細胞膜非透過性の蛍光色素を添加した条件で培養した組織丸ごとを共焦点顕微鏡下に観察し、細胞の形態を影絵として観察することに成功している。そこで、この技法を改良し、器官培養法と共焦点レーザー顕微鏡とを組み合わせる1つ1つの細胞の形態を、器官を生かしたまま観察する技法を開発することとした。(1)で作成したガラスボトムディッシュ上の顎下腺原基器官培養の培養液に蛍光色素(スルフォローダミン B sulforhodamin B)を添加した後、培養装置(東海ヒット、富士宮市)を組み込んだ共焦点顕微鏡(ニコン製倒立顕微鏡に組み込んだバイオラド社製 Radianc2100 または MRC1024)にセットした。対物レンズには油浸プランアポ60倍(ニコン)を用い、共焦点観察のためにはアルゴンレーザー514nm またはヘリウムネオンレーザー543nmで励起した。

顕微鏡上で培養しながら共焦点像を経時的に取得し、一連の画像をQuick time(Apple)ソフトウェアを用いて動画として解析に用いた。

(3) 透過電子顕微鏡法

組織片は2.5%グルタルアルデヒドで固定、1%四酸化オスミウムで後固定した。一部の試料は、タンニン酸(1%)もしくは酢酸ウラン(0.5%)によるブロック染色を施した。これらをエタノールの上昇系列で脱水後、常法に従いエポキシ樹脂に包埋し、超薄切片を作成した。切片はウランと鉛による2重電子染色後、透過型顕微鏡(1200EX、日本電子)で観察した。

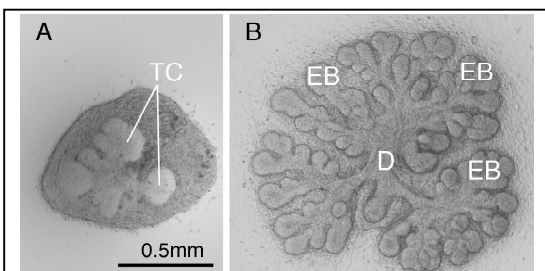


図1 ガラスボトムディッシュ上で器官培養したマウス顎下腺原基(A)培養開始時、(B)培養2日目
TC:終末集塊、EB:終末部、D:導管

4. 研究成果

(1) 培養顎下腺の共焦点顕微鏡観察
ガラスボトムディッシュ上で顎下腺原基の分枝

形態形成を3日にわたって追跡することが可能であった(図1)。培養液中に蛍光色素を添加して、共焦点顕微鏡下で観察したところ、蛍光色素が細胞間隙に侵入し、原基を構成する1つ1つの細胞を影絵の様に明瞭に観察することができた(図2)。これにより、終末集塊には、集塊中央部の多型細胞(central polymorphic cell、CP細胞)と集塊の最外層の円柱細胞(outer columnar cell、OC細胞)とが区別できた。ストークもしくは導管部は円柱細胞の層から成ることがわかった。また、間葉細胞は三角-多角形に観察されたが、上皮系細胞に比べてその輪郭は不明瞭であった。

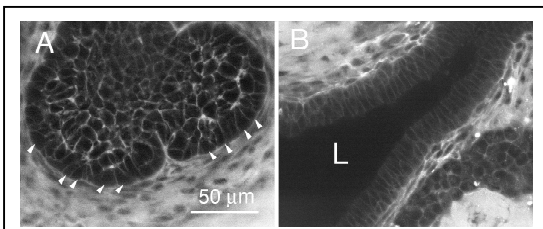


図2 蛍光色素添加後共焦点顕微鏡で観察した終末細胞集塊(A)と導管(B)
L: 管腔

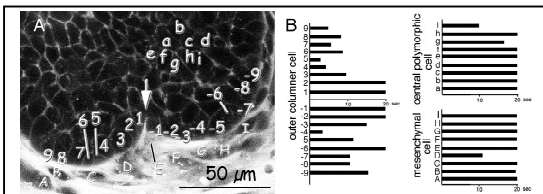


図3 培養顎下腺の細胞動態
タイムラプス共焦点顕微鏡法による動画から、a-iのCP細胞、1-9のOP細胞、A-Iの間葉細胞が今の光学平面にとどまる期間を20秒間にわたって追跡した。CP細胞、間葉細胞に比してOP細胞はよりダイナミックに移動する。

(2) 顎下腺原基のタイムラプス観察

タイムラプス観察により、顎下腺原基を構成する上述細胞の運動(変形、移動、分裂)を詳細に記録することが可能であった。同時に、終末集塊に出現するクレフトの伸長の様子も記録することができた。

①細胞の変形と移動

器官培養下の顎下腺上皮細胞(CP細胞とOC

細胞)はきわめてダイナミックに運動し、私たちのシステムでそれぞれの変形や移動を追跡するためには75秒に1コマ程度の頻度で画像を取り込む必要があった。これに比して、導管系上皮細胞の運動は緩慢であった。間葉系細胞もきわめてダイナミックに形を変えたが、位置の変化はほとんど観察されなかった。CP細胞とOC細胞との運動の詳細を解析するため、動画上の各細胞の軌跡を追跡したところ(図3)、OC細胞の方が、CP細胞より活発に移動することが判明した。これらの細胞の移動はクレフト形成とは無関係に生じているようであり、クレフトの伸長に伴い、クレフトの壁を形づくる細胞は徐々に入れ替わるものと考えられた。

②クレフト伸長時の細胞運動

クレフトはダイナミックに伸長し、細胞集塊の内部に向かって先端をくねらすように侵入することがわかった。クレフトの伸長に伴い、クレフトの壁を形づくる細胞は徐々に入れ替わるものと考えられた(図4)が、このような細胞の移動とクレフトの伸長そのものとは関連性を見いだせなかった。

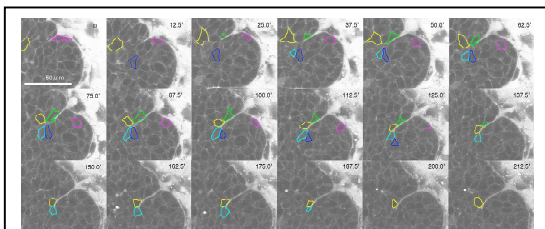


図4 クレフト伸長時の細胞動態
タイムラプス共焦点顕微鏡法で見た培養顎下腺を、12.5分間隔で示す。赤、黄、青、緑、シアンで示す各細胞の移動様式は異なる。

(3) クレフトの微細構造

クレフト伸長に関わる細胞構造を明らかにするためにクレフトの超微形態を精査した。その際、ラミニンペプチドA5G77f(Kadoyaら2003)を培養液に加え、培養顎下腺上皮のクレフト出現頻度を高めた。クレフトは幅 $0.3\mu\text{m}$ 長いものでは $10\mu\text{m}$ 以上の上皮細胞間の裂溝として観察された。その最奥部には、微細線維束を芯とする細胞質突起が高頻度で認められ(図5)、クレフトは突起基部の陥凹に侵入した。一方、クレフト先端の空間には間葉細胞の突起や膠原線維束は認められなかった。以上より、クレフト形成は上皮細胞自身の形態変化によるダイナミックな過程であることが判明した。

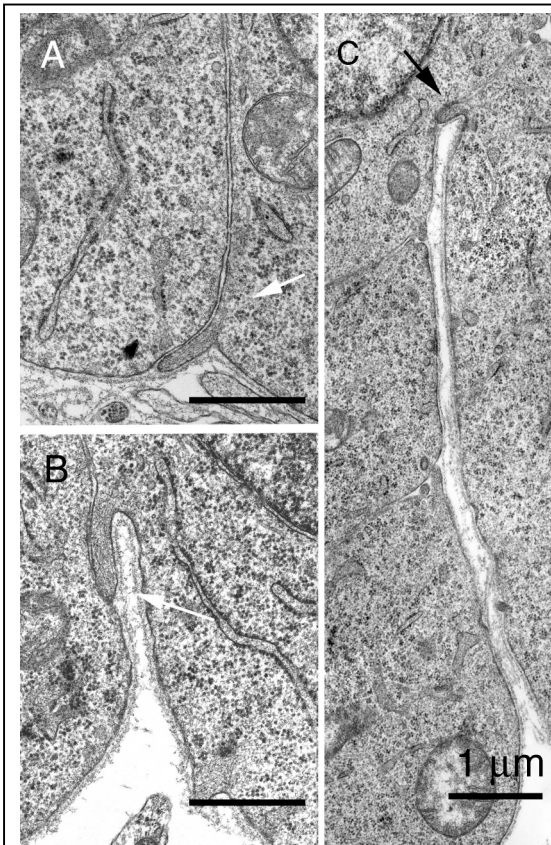


図5 クレフトの微細構造

A5G77f ラミニンペプチド添加条件で器官培養した唾液腺上皮に誘導された様々な長さのクレフト。いずれもその最奥部に微細線維を芯とする細胞質突起(矢印)が認められる。

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1件)

- ① Kadoya, Y., Yamashina, S.: Cellular dynamics of epithelial clefting during branching morphogenesis of the mouse submandibular gland. *Developmental Dynamics*. 査読有り 239: 1739-1747, 2010.

[学会発表] (計6件)

- ① 門谷裕一: Roles of shelf and its core actin filaments on the epithelial branching of embryonic salivary gland. 第88回日本生理学会大会第116回日本解剖学会総会・全国学術集会合同大会, 2011. 3. 28-30, 紙上大会
- ② Kadoya, Y.: Cellular dynamics during branching morphogenesis of the mouse submandibular gland. Gordon Research Conference Salivary Gland and Exocrine

Biology. 2011. 2. 6-11, Hotel Galves (米国・テキサス州ガルベストーン)

- ③ Kadoya, Y.: Time-lapse observation of the epithelial cleft elongation during branching morphogenesis of salivary gland. The 11th International Symposium on Exocrine Secretion. Tokushima 09. 2010.7.23-25. 徳島大学蔵本キャンパス (徳島県徳島市)
- ④ 門谷裕一: 唾液腺分枝形態形成におけるクレフト形成の細胞ダイナミズムとその機構. 第115回日本解剖学会総会・全国学術総会, 2010. 3. 29, 岩手県民会館 (岩手県盛岡市)
- ⑤ 門谷裕一: 唾液腺分枝形態形成時の上皮細胞動態解析. 第114回日本解剖学会全国学術集会, 2009. 3. 29, 岡山理科大学 (岡山県岡山市)
- ⑥ Kadoya, Y.: Ultrastructure of the clefts in the branching salivary gland epithelium treated with the laminin peptide. Gordon Research Conference on Basement Membrane. 2008.6.22-27, ニューイングランド大学 (米国・メイン州ビッドフォード)

[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

門谷 裕一 (北里大学・医療衛生学部・准教授)

研究者番号: 1 0 1 8 5 8 8 7

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし