

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18469

研究課題名（和文）マルチイメージングによる線維芽細胞のコラーゲン線維合成・分解調節機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of collagen fiber synthesis and dissolution by fibroblast using novel multi-imaging

研究代表者

平嶋 伸悟（Hirashima, Shingo）

久留米大学・医学部・講師

研究者番号：70647784

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：歯根膜線維芽細胞のコラーゲン線維束の線維形成の方向性について、Picrosirius red染色とFIB-SEMを組み合わせたCLEMを用い、培養液にギャップ結合阻害薬を添加した実験群と添加していない対照群にわけ、Deep learningを駆使した解析を行った。実験群と対照群では形成された線維について、電子顕微鏡による連続切削画像を3次元再構築し定量的に解析することで、線維形成の方向性について形態学的に有意な差があることがわかった。これらにより歯根膜におけるコラーゲン線維束形成、とくにその線維の方向性決定に関しては歯根膜線維芽細胞間のギャップ結合が関連している可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯根膜線維は局所で一定の方向性を持つ。しかしながら、その決定方法や線維の合成・分解の方法については明らかではない。当研究による結果は、歯根膜におけるコラーゲン線維束形成や方向性決定について、歯根膜線維芽細胞間のギャップ結合が関連している可能性を示しており、今後コラーゲン線維束の形成方法の解明や新規治療法の開発への基盤的知見となり得る。

研究成果の概要（英文）：The directionality of fiber formation of collagen fiber bundles in periodontal ligament fibroblasts was examined using CLEM combined with Picrosirius red staining and FIB-SEM. The experimental group was divided into two groups: one with gap junction inhibitor added to the culture medium and the other without, and analyzed using deep learning. The results showed that there was a significant morphological difference in the direction of fiber formation between the experimental and control groups, based on quantitative analysis of 3D reconstructions of serial electron microscopy images of fibers formed in the experimental and control groups. These results suggest that gap junctions between periodontal ligament fibroblasts may be involved in the formation of collagen fiber bundles in the periodontal ligament, especially in determining the directionality of these fibers.

研究分野：口腔組織学

キーワード：歯根膜 電子顕微鏡 FIB-SEM 線維芽細胞 超微形態解析 3次元解析

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

線維芽細胞はコラーゲン線維や弾性・細網線維を産生・維持し、結合組織の形態形成に重要な役割を果たす。皮膚真皮の交織性結合組織や靭帯・歯根膜では一定の方向性もつ秩序立ったコラーゲン線維束の配列がみられる。また近年、線維芽細胞は結合組織形成以外にも創傷治癒、臓器の線維化病変、癌の浸潤・転移、免疫寛容、幹細胞維持のため微小環境形成と関連し、ギャップ結合を介した cell-to-cell communication を行うことが報告されている(図1)。コラーゲン線維形成については(1)細胞内でのプロコラーゲン分子の合成、(2)細胞外での会合という流れで、コラーゲン線維分解については(3)線維芽細胞自身による細胞内分解、(4)マトリックスメタロエンドプロテアーゼによる細胞外分解の2種類が報告されている。しかしながら、細胞外でのプロコラーゲン分子の会合過程・線維束の形成過程と cell-to-cell-communication との関連性や、規則性のあるコラーゲン線維束の配列はどのように形成されるのか、線維芽細胞が分解すべきコラーゲン線維または線維束の選択はいかに行われるのかなど未だ不明な点が多い。従来、これらの現象を捉えることは技術的な問題から困難であった。そこで、本研究の学術的「問い」(図2)は「線維芽細胞のコラーゲン線維合成/分解はいかに調節されるのか?」、「コラーゲン線維合成/分解調節機構とギャップ結合を介した cell-to-cell communication はいかに関連するのか?」、「ギャップ結合は線維化病変における新規治療法の標的となるのか?」である。

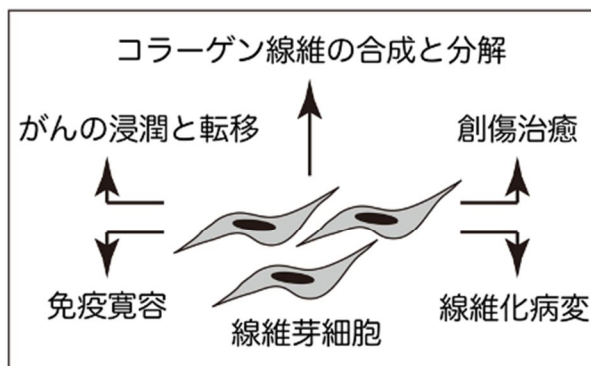


図1 線維芽細胞の多様な機能

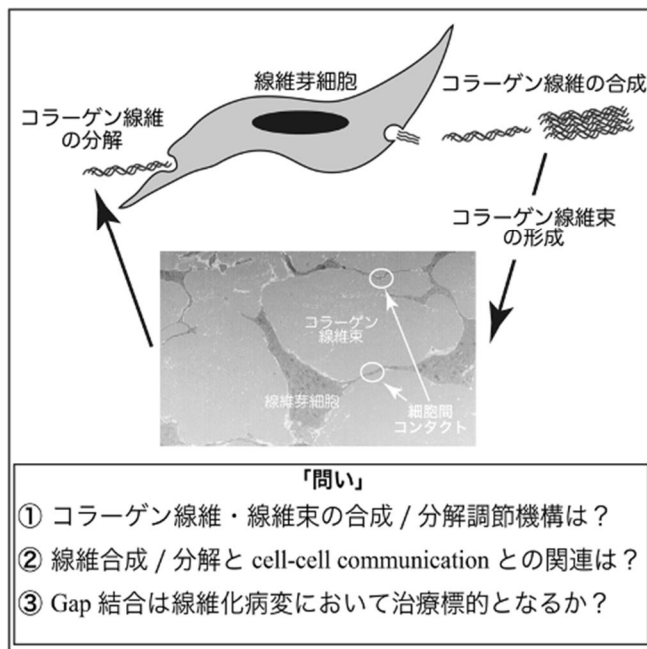


図2 学術的な問い

2. 研究の目的

本研究の目的は、各種イメージング法により *in vitro* において線維芽細胞のコラーゲン線維合成/分解過程・調節機構について、細胞小器官から細胞・細胞群全体像へのスケール、さらには時間軸を加えた解析をし、機能形態学的・動態学的に明らかにするとともに、線維化病変における新たな治療標的としてギャップ結合について検討することである。

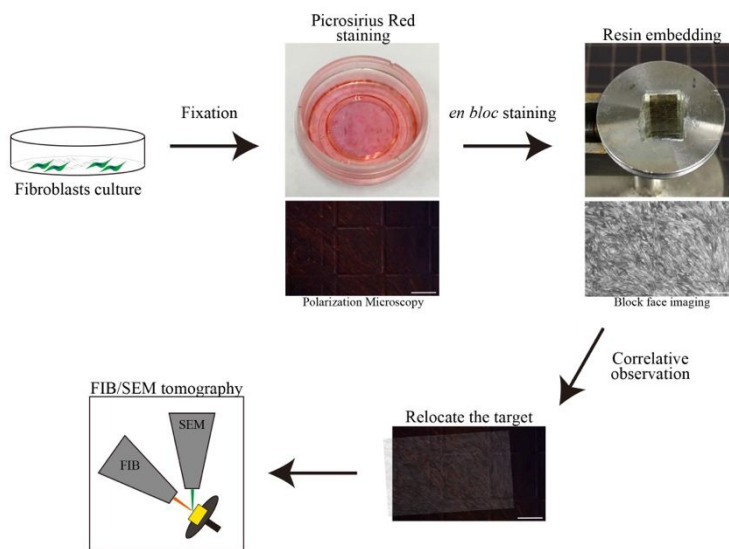
3. 研究の方法

計画 1. *in vitro*における線維芽細胞のコラーゲン線維合成/分解過程の機能形態学的解析
 計画 2. 線維化病変における新たな治療標的としてのコネキシン 43 の検討

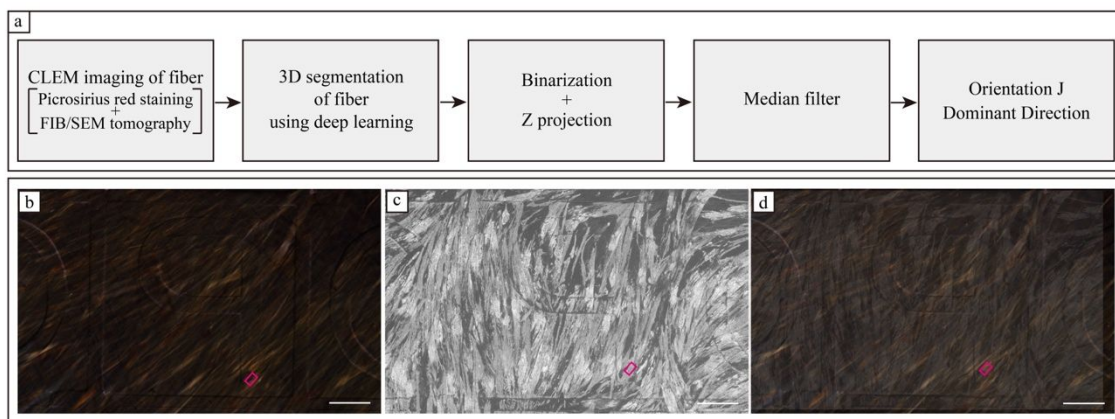
1、2の計画においては *in vitro* コラーゲン産生環境下¹³に、性質が異なる(1)ヒト皮膚線維芽細胞、(2)ヒト歯根膜線維芽細胞、(3)ヒト肺線維芽細胞、(4)ヒト肝星状細胞(コラーゲン産生能をもつ)を培養し、各種細胞内-外におけるコラーゲン線維合成/分解過程をマルチイメージングにより3次元かつ4次的に明らかにし、比較検討する。培養は通常の平面培養(2次元培養)に加え、スキャホールドを用いた3次元培養も同時に行う。

4. 研究成果

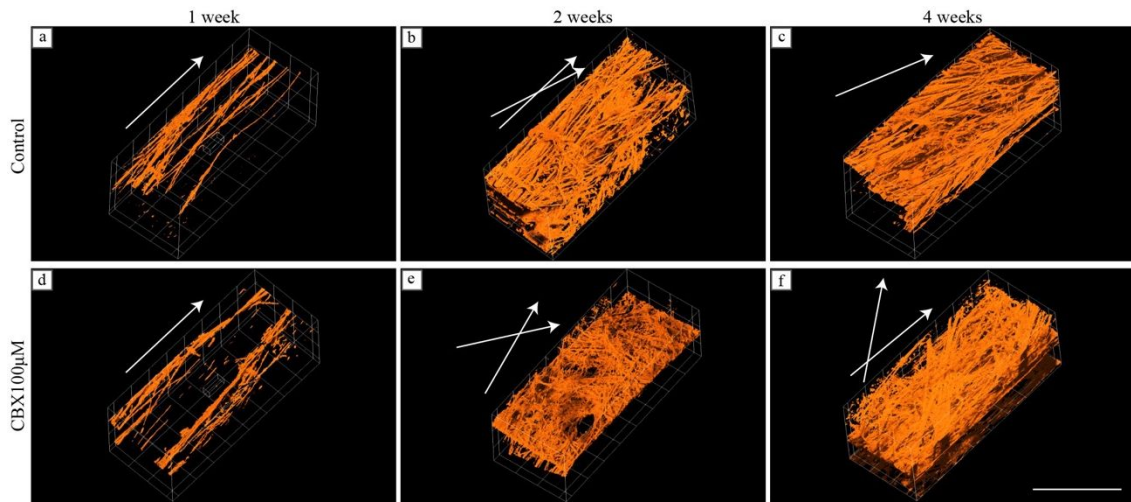
本研究ではまずピクロシリウスレッド染色と FIB-SEM 法を合わせた新規 CLEM 法を開発した。(下図)



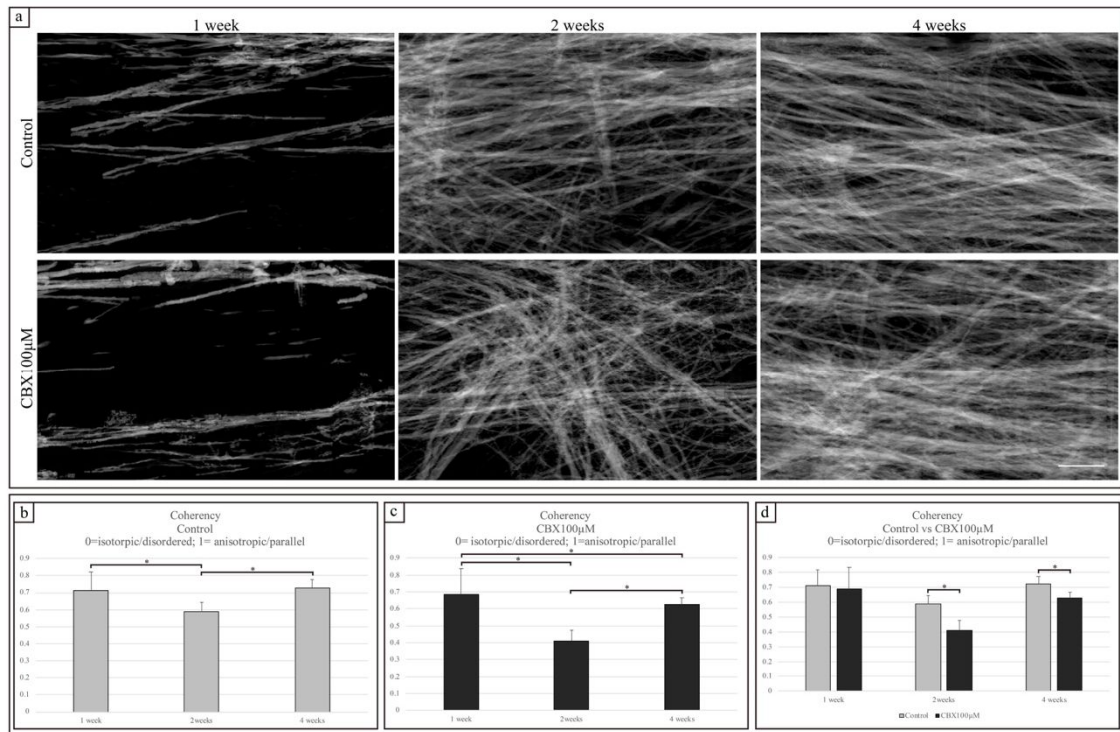
次にこの方法を応用し、培養歯根膜線維芽細胞における線維形成について、ギャップ結合阻害薬がどのような影響を与えるかについて、下図の解析法フロー(a)を用いて検討した。



その結果、FIB-SEMによる連続切削画像を3次元再構築したところ、実験群と対照群の間で線維に形態学的な変化が見られた。(下図)



上記データを基に、線維の方向性について定量的に解析したところ、実験群と対照群の間で有意な差が見られた（下図）



これらの結果より、線維の方向性決定に関しては歯根膜線維芽細胞間のギャップ結合が関連している可能性が考えられた。

参考文献

1. **Hirashima S**, Ohta K, Kanazawa T, Togo A, Tsuneyoshi R, Kusukawa J, Nakamura K. Mesoscopic Structural Analysis Via Deep Learning Processing, with a Special Reference to in vitro Alteration in Collagen Fibre Induced by a Gap Junction Inhibitor. *Microscopy (Oxf)* 72:18-26, 2023.
2. **Hirashima S**, Ohta K, Kanazawa T, Togo A, Tsuneyoshi R, Miyazono Y, Kusukawa J, Nakamura K. Correlative imaging of collagen fibers and fibroblasts

using CLEM optimized for picosirius red staining and FIB/SEM tomography.
Microscopy (Oxf) 69:324-329, 2020

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hirashima Shingo, Ohta Keisuke, Rikimaru-Nishi Yukiko, Togo Akinobu, Funatsu Takashi, Tsuneyoshi Risa, Shima Yuichi, Nakamura Kei-ichiro	4. 巻 71
2. 論文標題 Correlative volume-imaging using combined array tomography and FIB-SEM tomography with beam deceleration for 3D architecture visualization in tissue	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microscopy	6. 最初と最後の頁 187 ~ 192
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jmicro/dfac015	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 -
1. 著者名 Hirashima Shingo, Ohta Keisuke, Togo Akinobu, Tsuneyoshi Risa, Kusukawa Jingo, Nakamura Kei-ichiro	4. 巻 72
2. 論文標題 Mesoscopic structural analysis via deep learning processing, with a special reference to <i>in vitro</i> alteration in collagen fibre induced by a gap junction inhibitor	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microscopy	6. 最初と最後の頁 18 ~ 26
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jmicro/dfac044	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 -
1. 著者名 Hirashima Shingo, Ohta Keisuke, Rikimaru-Nishi Yukiko, Togo Akinobu, Funatsu Takashi, Tsuneyoshi Risa, Shima Yuichi, Nakamura Kei-ichiro	4. 巻 -
2. 論文標題 Correlative volume-imaging using combined array tomography and FIB-SEM tomography with beam deceleration for 3D architecture visualization in tissue	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microscopy	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) 10.1093/jmicro/dfac015	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 -
1. 著者名 Hirashima Shingo, Ohta Keisuke, Kanazawa Tomonoshin, Togo Akinobu, Tsuneyoshi Risa, Miyazono Yoshihiro, Kusukawa Jingo, Nakamura Kei-ichiro	4. 巻 69
2. 論文標題 Correlative imaging of collagen fibers and fibroblasts using CLEM optimized for picosirius red staining and FIB/SEM tomography	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microscopy	6. 最初と最後の頁 324 ~ 329
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jmicro/dfaa024	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6件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 1. Shingo Hirashima, Keisuke Ohta, Yuichi Shima, Kei-ichiro Nakamura.
2. 発表標題 3D imaging analysis of cellular mesoscopic architecture.
3. 学会等名 日本顕微鏡学会総会第78回学術講演 最先端電子顕微鏡法に関する国際若手シンポジウム. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 平嶋伸悟.
2. 発表標題 歯根膜組織構造をモデルとしたコラーゲン線維束形成および配列機構の解析.
3. 学会等名 日本顕微鏡学会総会第77回学術講演 第22回 (2021年度) 日本顕微鏡学会奨励賞受賞講演. (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平嶋伸悟, 太田啓介, 金澤知之進, 都合亜記暢, 常吉梨沙, 宮園 佳宏, 楠川仁悟, 中村桂一郎.
2. 発表標題 In vitroにおけるコラーゲン線維配向性の定量解析.
3. 学会等名 日本顕微鏡学会総会第77回学術講演 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平嶋伸悟, 太田啓介, 金澤知之進, 都合亜記暢, 常吉梨沙, 宮園 佳宏, 楠川仁悟, 中村桂一郎
2. 発表標題 Picrosirius red 染色とFIB/SEM tomographyによるCLEMを用いた線維芽細胞とコラーゲン線維の3次元微細構造解
3. 学会等名 日本顕微鏡学会 第63回シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 太田啓介, 平嶋伸悟
2. 発表標題 生命科学を照らす革新的イメージング技術 骨のメソスケール形態を計測する3D電子顕微鏡技術
3. 学会等名 第40回日本骨形態計測学会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平嶋伸悟, 太田啓介, 金澤知之進, 都合亜記暢, 常吉梨沙, 宮園 佳宏, 中村桂一郎
2. 発表標題 CLEM (ビクロシリウスレッド染色 + FIB/SEM)によるコラーゲン線維の解析
3. 学会等名 日本顕微鏡学会総会第76回学術講演
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究協力者	中村 桂一郎 (Nakamura Kei-ichiro)		
研究協力者	太田 啓介 (Ohta Keisuke)		
研究協力者	都合 亜記暢 (Togo Akinobu)		

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
---------	---------