

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591608

研究課題名(和文) 大気圧走査電子顕微鏡を用いた肺胞上皮におけるサーファクタント関連蛋白イメージング

研究課題名(英文) Surfactant-associated protein imaging in alveolar epithelial cells by Atmospheric Scanning Electron Microscope

研究代表者

松崎 陽平 (Matsuzaki, Yohei)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：60327583

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)：CARS顕微鏡のC-Hモードで肺胞 Ⅱ型上皮細胞を観察すると非常に強いCARSシグナルを発するラメラ体と思われる構造体を観察した。肺胞 Ⅱ型上皮細胞をASEM用のディッシュ上で培養、4%ホルムアルデヒドで固定し、ASEMでABCA3免疫染色の観察を行った。ABCA3は肺胞 Ⅱ型上皮細胞内でCARS顕微鏡での脂質と同様に細胞内に存在していた。今回の検討では、残念ながら肺胞 Ⅱ型上皮細胞のASEM用のディッシュへの固着率が低く、限られた検討しか行えなかった。ようやく、液状コラーゲンをを用いたコーティングで固着が安定出来るようになったので、今後、電子顕微鏡所見も含め、さらなる検討をしていく。

研究成果の概要(英文)：We observed lamellar body which emits very strong CARS signal in alveolar type II epithelial cells by C-H mode of CARS microscope. Primary cultured alveolar type II epithelial cells on a special dish for ASEM were fixed with 4% formaldehyde, immunostained with ABCA3 antibodies and observed by ASEM. ABCA3 was observed as similar to lipid observer by CARS microscopy in alveolar type II epithelial cells. Since fixed rate of alveolar type Ⅱ epithelial cells to a dish for ASEM was low unfortunately, only limited study was performed. Finally, because sticking with a coating using a liquid collagen began to be stable, we will continue to further consideration, including the electron microscope observations.

研究分野：新生児学

キーワード：サーファクタント 慢性肺疾患 ASEM CARS顕微鏡 脂質

1. 研究開始当初の背景

新生児は出生後、新生児一過性多呼吸、呼吸窮迫症候群、慢性肺疾患などのさまざまな病態を呈することがある。肺胞環境の恒常性維持には肺水の除去、間質を含めた水の輸送、サーファクタント分泌など、水の輸送や脂質分泌が不可欠となっている。大気圧下で走査電子顕微鏡観察が可能な大気圧走査電子顕微鏡 Atmospheric Scanning Electron Microscope (ASEM)と Coherent Anti-Stokes Raman Scattering (CARS)顕微鏡を用いて脂質の移動を観察することが可能となる。本研究は、肺胞上皮細胞でのサーファクタントを含む脂質の分布変化および開口放出などの動態、サーファクタント蛋白との関連を観察することで、肺胞の恒常性維持の理解を深め、新生児の慢性肺疾患の予防、治療にも大変重要な意味を持つと考えた。

2. 研究の目的

(1)研究の学術的背景

新生児は出生と同時に呼吸を開始し、胎内環境から胎外環境への変化に適応していく。特に胎盤を通してのガス交換から、胎内では全く使われていない肺呼吸へという大きな変化が起こる。出生時の肺水の除去、その後の肺胞環境の恒常性維持には肺上皮細胞での水の輸送が重要であり、肺胞 I 型上皮細胞、肺胞 II 型上皮細胞上の水や電解質イオンの移動のためのチャンネル・ポンプ群が共同して働いている。出生時の肺水除去がうまく出来ない新生児一過性多呼吸や新生児のショック後の肺水腫、また、慢性肺疾患でも肺の間質の浮腫が原因の 1 つであり、これらは水、電解質の輸送の異常により引き起こされている。

一方、サーファクタントは界面活性剤であり、約 90%のリン脂質と 10%のサーファクタント蛋白より構成され、出生時に新生児が外界に適応する際、肺の表面張力を下げ、肺呼吸を可能にする。サーファクタントは肺胞 II 型上皮細胞で産生され、lamellar body に層状に蓄積されている。lamellar body に蓄積されたサーファクタントは常に肺胞腔へ輸送、分泌されており、肺の表面張力を低下

させている。一方、早産児ではサーファクタント欠乏による呼吸窮迫症候群 (RDS) が知られているが、正期産児でも致死性の RDS 症状を呈することがある。サーファクタントの輸送に関連している ABCA3 の遺伝子異常による肺疾患の病態が示され、ABCA3 の様々な遺伝子変異による新生児期の呼吸窮迫から慢性肺疾患まで多様な病態が報告されている (Shulenin et al. N Engl J Med, 2004)。

このように、肺胞環境の機能維持には水や電解質イオンの移動のための水・イオンチャンネル群、界面活性剤であるサーファクタントが不可欠である。これらの機能異常により、多くの新生児が病気に罹患したり、命を落としたりしている。研究申請者は、この問題を解決すべく、10 年前より Stat3 蛋白とサーファクタント蛋白の関連性、ABCA3 蛋白とサーファクタント脂質合成や肺胞 II 型上皮細胞でのラメラ体形成に関する研究を行ってきた。

(2)研究の目的

現在までの肺胞環境および機能についての知見は、組織学、生物物理学、生化学、分子生物学で示されたデータから類推、構築されたものであり、実際に肺胞で起きている現象を可視化することは不可能であった。Coherent Anti-Stokes Raman Scattering (CARS) 顕微鏡は、生きた細胞中の脂肪や水をそれぞれ無染色で可視化できる新しい非線形光学生物顕微鏡である。しかし、CARS 顕微鏡だけでは脂質の局在や細胞外への分泌を観察することが中心になり、より具体的な機能の探索のため、本研究では ASEM を用い、生きた細胞を電子鏡レベルの強拡大で観察できる新しい走査電子顕微鏡である。さらに ClairScope (JEOL) は ASEM と光学顕微鏡を同軸上に持つため、光学顕微鏡と ASEM により同一試料を観察できる。これらの顕微鏡を用いて、肺胞 II 型上皮細胞内のリン脂質の移動、lamellar body から肺胞腔へのサーファクタントの開口放出を観察でき、さらにサーファクタントと関連蛋白の局在を調べることにより、サーファクタント分泌の制御因子を解明できると考え、本研究を計画した。

Atmospheric Scanning Electron Microscope (ASEM)

走査電子顕微鏡は 10 nm 以下と光学顕微鏡を遙かに上回る分解能を持つが、試料を真空中に保持する必要があった。ASEM は SEM の先端に薄膜でシールドを形成し、真空と大気を完全に隔離することで、水環境で細胞・組織の微細構造をそのまま観察できる。培養液中での観察が可能であり、生きた細胞を SEM で観察可能としている。また、同軸上に光学顕微鏡を配置し、SEM と同視野での観察も可能である (図 1)。

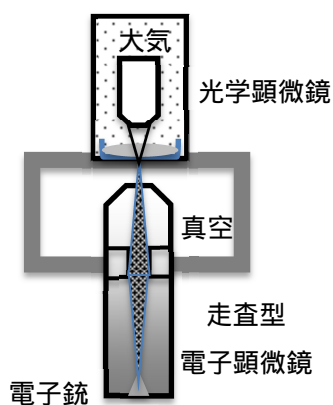


図 1 ASEM

Coherent Anti-Stokes Raman Scattering (CARS) 顕微鏡

3 次元像を得ることが可能な共焦点蛍光顕微鏡や 2 光子励起蛍光顕微鏡が開発され、生物、医学研究に広く用いられるようになってきた。しかしながら、これらは蛍光顕微鏡であるため、試料を蛍光色素で染色しなければならず、蛍光色素を介して試料の情報を得ている。ラマン分光や赤外分光は非染色に分子構造を知ることのできる方法であるが、水は赤外線を吸収するため、赤外分光は生体計測には応用しにくい。一方、自然放出ラマン散乱光は非常に微弱なため、生体試料の自己蛍光など不要なバックグラウンド光により検出が困難である。CARS は、非線形ラマン散乱の一種である。Pump 光 (P) と Stokes 光 (S) (P > S) を試料に入射すると、試料分子との相互作用によって、角周波数 $\omega_{\text{CARS}} = 2\omega_{\text{P}} - \omega_{\text{S}}$ のコヒーレントな光が放出される (図 2)。このコヒーレントな光を CARS と呼

ぶが、CARS 光は $\omega_{\text{P}} - \omega_{\text{S}}$ が試料のラマン活性振動数 ω_{R} に等しいとき極大となる。この振動数を 3200 cm^{-1} に合わせると、O-H 結合を持つ水分子の、 2850 cm^{-1} に合わせると C-H 結合、主として C-H 結合を数多く持つ脂質からの CARS シグナル (イメージ) が観察される。CARS は、アンチストークス域の発光であるために蛍光などのストークス光の影響を回避でき、非常に信号強度が強いなどの利点がある。また、CARS は非線形な光学現象であり、2 光子励起蛍光顕微鏡と同様に、優れた奥行き分解能を持つ。

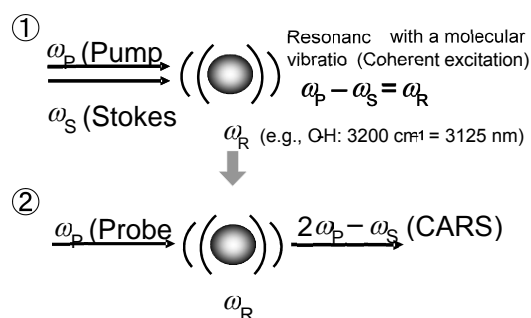


図 2 CAR 光の発生原理

慶應義塾大学医学部薬理学教室 (安井正人教授) では、この CARS を利用した非線形光学顕微鏡を生物医学に応用すべく (株) オリンパスと共に共同開発を行っており、特に生命科学分野への応用研究に関しては世界でも進んでいる。

3. 研究の方法

(1) Atmospheric Scanning Electron Microscope (ASEM) 顕微鏡

ASEM 顕微鏡は走査電子顕微鏡でありながら、SEM の先端に薄膜でシールドを形成し、真空と大気を完全に隔離することで、液体あるいはガス中の試料をそのまま観察可能である。本研究では特殊なマイクロディッシュに肺胞型上皮細胞を固着させ、その後固定した。走査電子顕微鏡とその同軸上に配置されている光学顕微鏡を用い、肺胞型上皮細胞を走査電子顕微鏡と光学顕微鏡で上皮細胞の観察を行った。

(2) Coherent Anti-Stokes Raman Scattering (CARS) 顕微鏡

Coherent Anti-Stokes Raman Scattering (CARS) 顕微鏡は、生きた細胞・組織中での水および脂質のリアルタイムでの直接的イメージングを可能にする最新の非線形光学顕微鏡である。本研究ではマイクロディッシュの中央の薄いガラス状になっている部分に薄くマトリジェルでコーティングした後、肺胞 型上皮細胞をセットし、振動数が 2850 cm^{-1} になるように Pump 光 (P) と Stokes 光 (S) を細胞に入射し、脂質のシグナルを観察した。

(3) 肺胞 型上皮細胞の単離

野生型マウスから collagenase 処理した肺を取り出し、 $20\text{ }\mu\text{m}$ の網で肺の細胞を単細胞にばらす。その後、CD16/32/45 の抗体をあらかじめ付着させたシャーレで 12 時間培養し、培養液に浮遊した肺胞 型上皮細胞を単離する。この単離した細胞をマトリゲルをコートしたマイクロディッシュに BEGM/FBS/KGF で培養する。1-2 日の培養ではマトリゲル上に単細胞として存在するが、1 週間程度培養すると、肺胞 型上皮細胞のみの Cyst を形成する。

その後、ASEM 顕微鏡で固定した肺胞上皮の観察を行った。また、CARS 顕微鏡を用いて、生きた状態での肺胞上皮および肺胞上皮細胞における水および脂質の動きのリアルタイム観察を行い、下記の研究を行った。

肺胞上皮 型細胞におけるサーファクタントの細胞内動態観察

肺胞 型上皮細胞あるいは肺胞 型上皮細胞による Cyst をシャーレごと CARS 顕微鏡のステージ上にセットして、C-H モードでの CARS イメージを撮影し、その画像データをもとにラメラ体内のサーファクタントを観察した。

ASEM による肺胞 型上皮細胞でのサーファクタント関連蛋白の観察

肺胞 型上皮細胞ではリン脂質とサーファクタント蛋白を合成、lamellar 体へパッキング、分泌している。SP-A, SP-C, pro-SPC, ABCA3 などのサーファクタント関連蛋白は

免疫染色・免疫電顕により認識することが可能である。

肺胞 型上皮細胞のプライマリカルチャーを行い、サーファクタント関連蛋白を含めた微細構造・動態を ASEM と光学蛍光顕微鏡により観察した。

肺胞 型上皮細胞を ASEM 用のマイクロディッシュ上で培養、固着させた後、4%フォルムアルデヒドで固定した。ディッシュ上で ABCA3 抗体 (Seven Hills Bioreagents, OH, USA) での 1 次免疫染色を行った。蛍光での 2 次染色及び ASEM での観察は産業技術総合研究所、佐藤主税先生の研究室で行った。

4. 研究成果

(1) 肺胞上皮 型細胞におけるサーファクタント細胞内動態観察

肺胞 型細胞はサーファクタント産生細胞で、肺胞の恒常性維持に重要な働きをしている。サーファクタントは肺胞 型上皮細胞内のラメラ体内に層状に蓄積されている。サーファクタントの組成の 90% はリン脂質が占めており、CARS 顕微鏡の C-H モードで肺胞 型上皮細胞を観察すると非常に強い CARS シグナルを発するラメラ体と思われる構造体を観察した (図 3)。

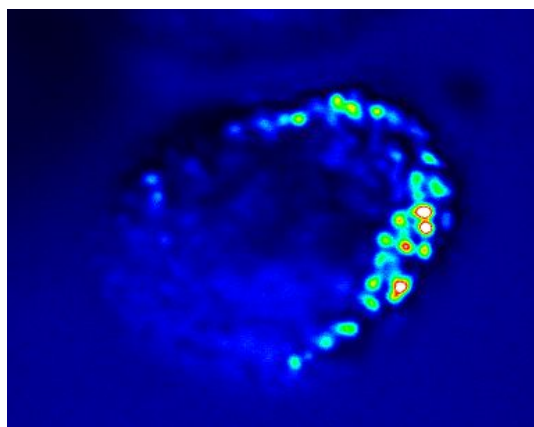


図 3 肺胞 型上皮細胞内の Lipid
1 μm sliced Cross Section

CARS 顕微鏡は解像度に優れるため、細胞内の微小構造であるラメラ体 (1-2 μm) も観察可能であったと思われる。また、CT のように 1 μm のスライスで撮影を行った。その画像を合成することも可能であった (図 4)。

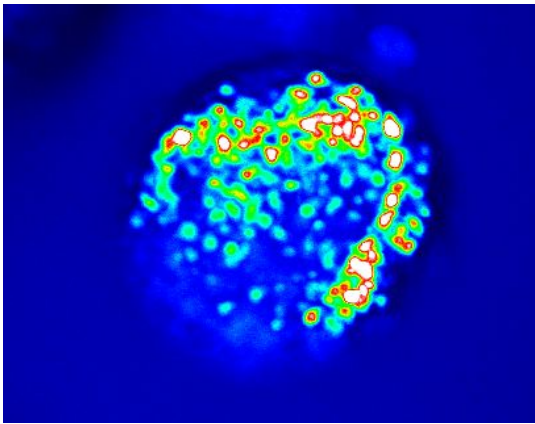


図4 肺胞 型上皮細胞内のLipid
1 μm sliced を1細胞分合成したもの

(2) ASEM による肺胞 型上皮細胞でのサーファクタント関連蛋白の観察肺胞 型上皮細胞におけるサーファクタントの開口放出の観察

肺胞 型上皮細胞を ASEM 用のマイクロディッシュ上で培養、固着させた後、4%フォルムアルデヒドで固定した。ディッシュ上で ABCA3 抗体 (Seven Hills Bioreagents, OH, USA) での1次免疫染色を行った。

しかし、プライマリカルチャーした肺胞 型上皮細胞は ASEM 用のマイクロディッシュに固着率が非常に悪く、条件の設定に苦慮した (図5)。液状コラーゲンをマイクロディッシュに常温で一昼夜インキュベーションし、PBS で洗浄後に肺胞 型上皮細胞を蒔くことで固着率は上昇した。

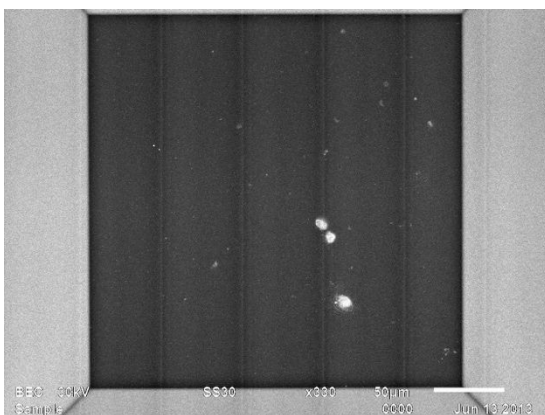


図5 肺胞 型上皮細胞の ASEM の ABCA3 の
蛍光所見 (弱拡大)

強拡大では ABCA3 は肺胞 型上皮細胞内で CARS 顕微鏡での脂質のように細胞内にびまん性に存在していた (図6)。

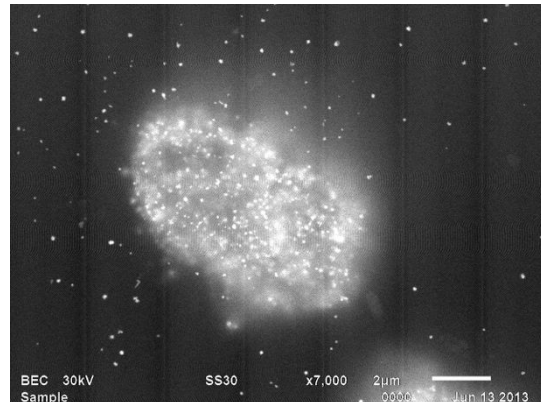


図6 肺胞 型上皮細胞の ASEM の ABCA3 の
蛍光所見 (強拡大)

また、一部の細胞では肺胞 型上皮細胞から ABCA3 が細胞外に拡散していた (図7)。

ABCA3 はラメラ体の表面に存在し、脂質分泌の際、ラメラ体ごと細胞外に分泌され、その後、折りたたまれていた脂質とサーファクタント蛋白が広がっていく。

この ABCA3 の拡散は今回の検討で何台であった固着不十分による細胞破壊を観察している可能性も否定できないが、肺胞 型上皮細胞の脂質分泌を観察できている可能性が示唆された。

今回の検討では、残念ながら肺胞 型上皮細胞の ASEM 用のマイクロディッシュへの固着率が低く、限られた検討しか行えなかった。ようやく、液状コラーゲンをういたコーティングで固着が安定出来るようになったので、今後、電子顕微鏡所見も含め、さらなる検討をしていく。

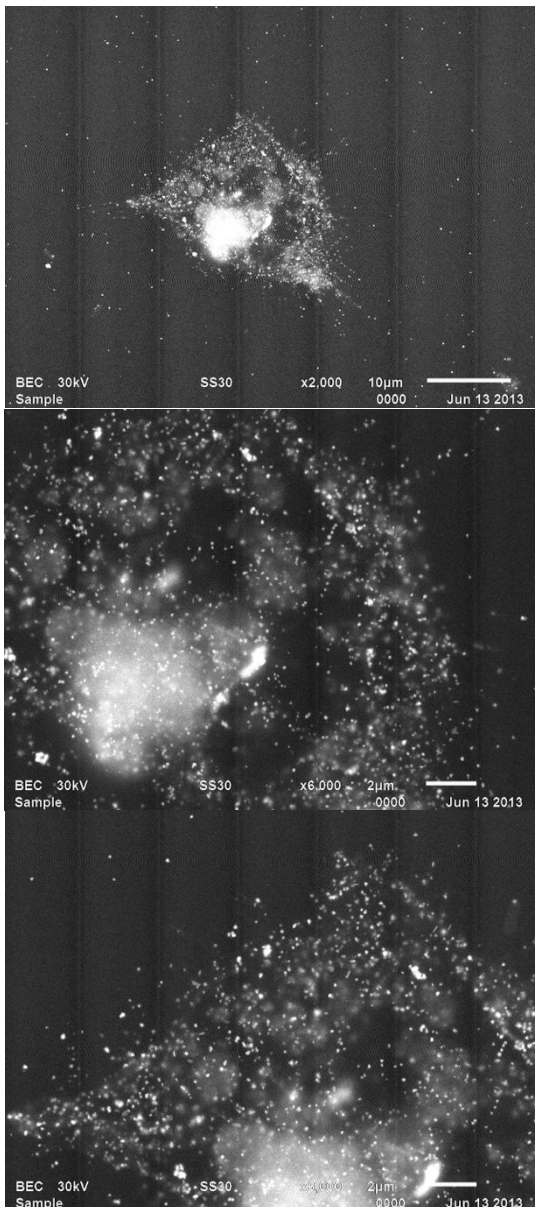


図7 肺泡型上皮細胞のASEMのABCA3の蛍光所見(強拡大)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

- 1) 松崎 陽平, 池田 一成、Coherent Anti-Stokes Raman Scattering 顕微鏡による II 型上皮細胞におけるサーファクタントの動態観察、日本周産期・新生児医学会雑誌、査読なし、49 巻 2 号、2013、P726
- 2) 松崎 陽平、池田 一成 et al、肺の発生発達の分子メカニズム、Fetal & Neonatal Medicine、査読なし、5 巻、2013、P102-103

〔学会発表〕(計 2 件)

- 1) 松崎 陽平, 池田 一成 et al、Coherent Anti-Stokes Raman Scattering 顕微鏡による II 型上皮細胞におけるサーファクタントの動態観察、第 49 回日本周産期・新生児医学会学会集會、2013 年 7 月 14-16 日、パシフィコ横浜(神奈川県)
- 2) 松崎 陽平, 池田 一成 et al、Coherent Anti-Stokes Raman Scattering 顕微鏡を用いた肺泡 II 型上皮細胞におけるサーファクタントの観察、肺サーファクタント分子病態研究会、2012 年 6 月 23 日、札幌医科大学 記念ホール(北海道)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

特にありません

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松崎 陽平 (Yohei Matsuzaki)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号: 60327583

(2) 研究分担者

相馬 義郎 (Yoshiro Sohma)

慶應義塾大学・医学部・准教授

研究者番号: 60268183

(3) 連携研究者

安井 正人 (Masato Yasui)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号: 90246637

佐藤 主税 (Chikara Sato)

産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・研究グループ長

研究者番号: 00357146