APPLICATION NOTE

共焦点レーザー顕微鏡システム A1/A1 R, AX/AX R

位相差および共焦点顕微鏡が捉えた、浸透圧勾配がもたらす上皮細胞シートの安定な3次元ドーム構造形成

生体における臓器の形成過程では、平らな上皮細胞シートの屈曲や折り畳み、および伸長が起こり、臓器の持つ複雑な三次元形状が形成される。屈曲による臓器形成の一例にドーム形成が挙げられるが、そのメカニズムは多くが未解明である。近年、浸透圧勾配がドーム形成の要因として示唆されている。具体的には、(1) 経上皮細胞輸送による基底側でのイオン濃度の上昇とそれに伴う浸透圧勾配の発生、(2) 浸透圧勾配による基底側への流体の流入、(3) 液体の流入による静水圧の発生、というステップを介してドーム構造が形成されると考えられている。しかし、浸透圧勾配存在下での細胞シートの具体的な振る舞いは調べられていない。さらに、生体内でみられるような安定性を有した３次元ドーム構造が再現できておらず、ドーム形成における浸透圧勾配の役割は十分に検証されていない。

本アプリケーションノートでは、北海道大学の芳賀永先生、石原誠一郎先生、石原すみれ先生らによる報告について紹介する。この報告では、生体内に近い環境で細胞シートに浸透圧勾配を与えた場合に安定性を有したドーム形成が起こるかを、位相差顕微鏡および共焦点顕微鏡を用いて検証し、その形成メカニズムに迫っている。

キーワード：位相差顕微鏡、共焦点顕微鏡、上皮細胞シート、浸透圧勾配

研究の概要

細胞外マトリクス (ECM) は生体内において、上皮細胞シートの三次元形態形成を支持する役割を持つ。底面に0.4 μmの穴の空いた培養容器 (Transwell) の内部にECM (ゲニピン架橋を施したマトリゲル) を敷き、その上にMDCK上皮細胞の細胞シートを作った。その後、細胞シートに浸透圧勾配を与え、安定なドーム形成が起こるかを位相差顕微鏡および共焦点顕微鏡でそれぞれライブイメージングを行った。また、ドーム形成に対する細胞内張力の寄与を調べるために、アクトミオシンの張力を増強させることが知られている二重リン酸化ミオシン調節軽鎖 (2P-MRLC) の固定染色を行った。

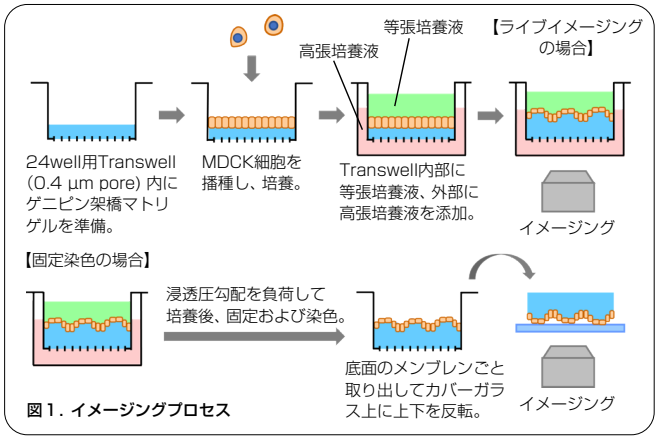

図１. イメージングプロセス

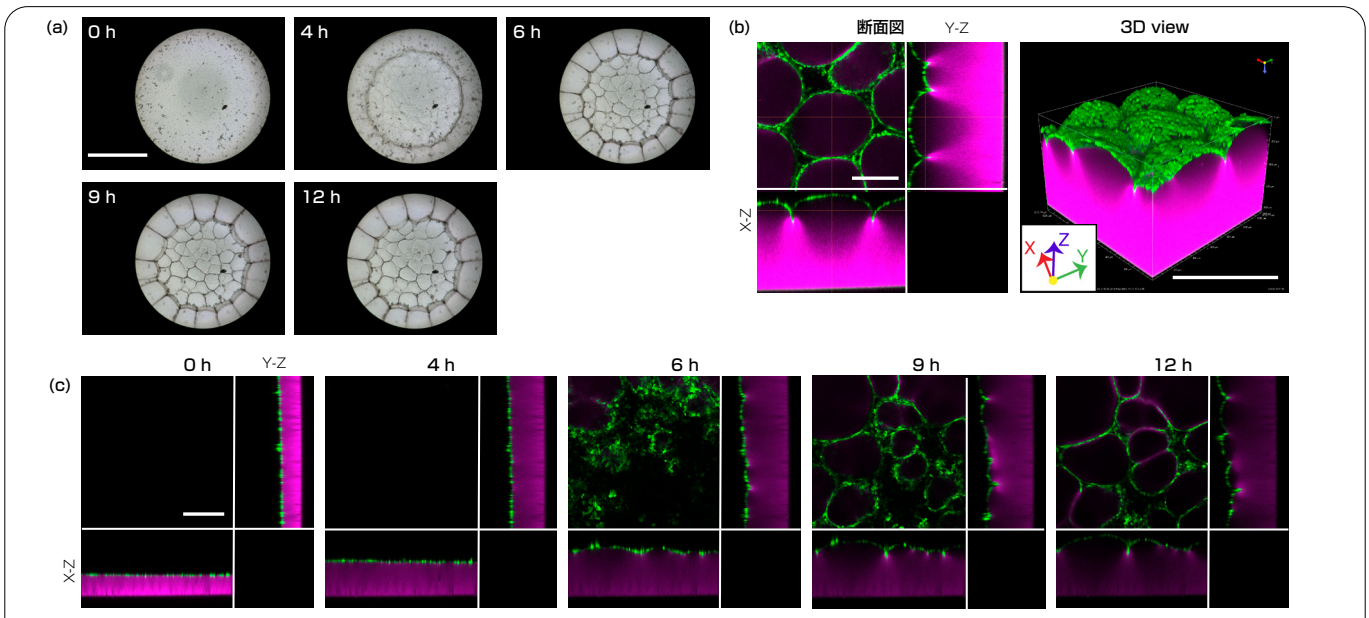

図2 浸透圧勾配負荷後の細胞シートのライブイメージング
(a) 位相差顕微鏡によるタイムラプス画像、Scale bar = 2 mm
(b) 共焦点顕微鏡による蛍光三次元画像、Scale bar = 200 μm
(c) 共焦点顕微鏡による三次元ライブ画像、緑：MDCK細胞 (細胞膜を緑色蛍光タンパク質で標識)、赤/マゼンタ：ゲニピン架橋マトリゲル、Scale bar = 200 μm
対物レンズ：(a) CFI プランフルオール 4X (NA 0.13) PhL DL、(b)および(c) CFI プランフルオール 10X (NA 0.30) DIC L

結果

位相差顕微鏡によるタイムラプス観察の結果、浸透圧勾配を与えた上皮細胞シートでは、丸い構造が同時多発的に出現していた。またその構造は壊れることなく維持されていた（図2a）。細胞膜を蛍光標識したMDCK細胞を用いてこの丸い構造を共焦点顕微鏡で三次元観察したところ、丸い構造のひとつひとつは半球状のドーム様の構造を有していた（図2b）。さらに、3Dライブイメージングの結果から、上記で見られた安定なドーム構造の形成過程では、上皮細胞シート下のECMが不均一に膨潤していることも明らかとなった（図2c）。

上皮細胞シートは浸透圧勾配に応答して、アクアポリン（AQP）を介した水輸送を行う。そこで、AQPの水輸送を水銀イオンによって阻害したところ、ECMの膨潤およびドーム形成が阻害された（図3）。さらに数理モデル解析により、不均一な膨潤は細胞の高さが低いほどより多くの水をECM側へ輸送するためであることが示された。

次に、形態形成時に重要な役割を持つことが知られているアクトミオシンの寄与を調べた。2P-MRLCはアクトミオシンの張力を増強させることが知られている。そこで固定染色法で2P-MRLCの局在を調べたところ、細胞シート内に部分的に局在が観察された（図4a）。しかし、ミオシン阻害剤であるBlebbistatin, Y27632をそれぞれ投与した場合でもドーム形成は阻害されず（図4b-c）、細胞内張力は本ドーム形成には寄与していないことが示唆された。

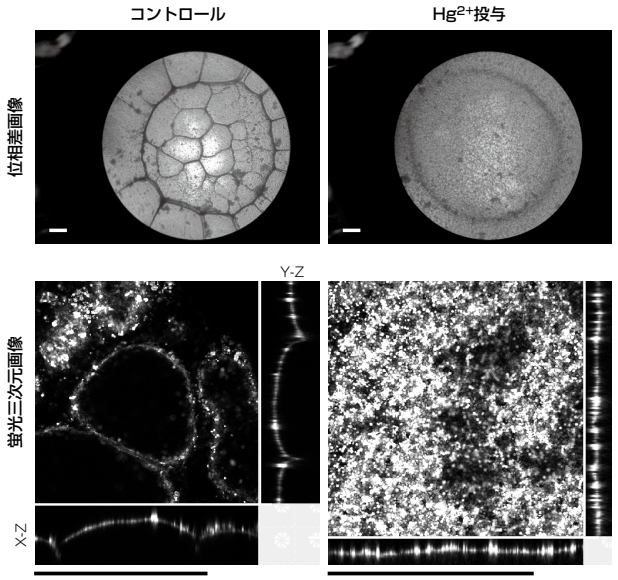

図3 アクアポリン阻害時におけるドーム形成
アクアポリン阻害剤水銀イオン（Hg^{2+}）投与時の細胞シートの位相差画像および蛍光三次元画像。（蛍光像）白：calcein-AM、Scale bar = 0.5 mm
対物レンズ：CFI プランフルオール 4X (NA 0.13) PhL DL（位相差画像）
CFI プランフルオール 10X (NA 0.30) DIC L（蛍光三次元画像）

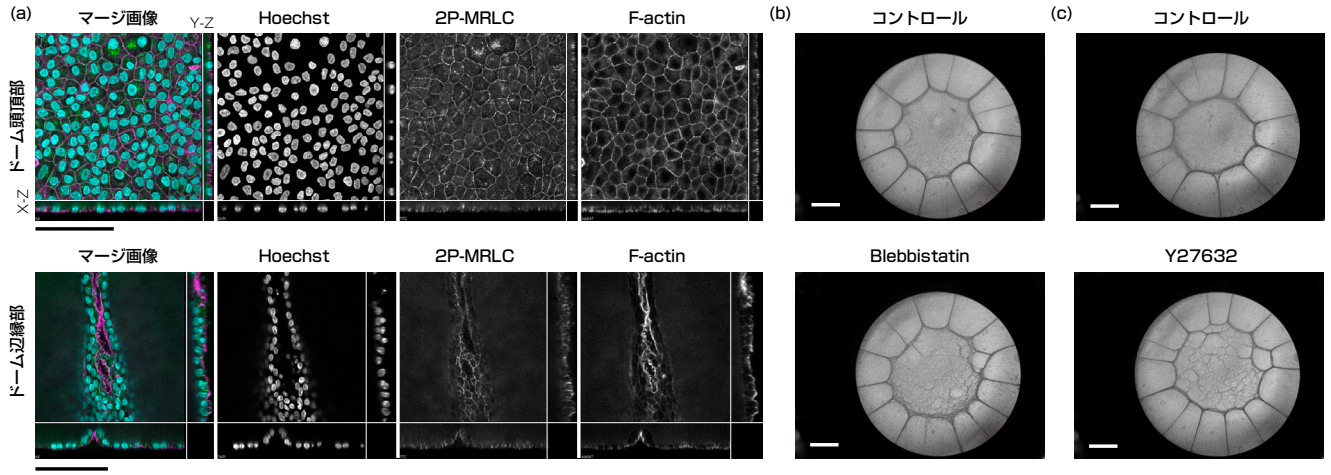

図4
(a)二重リン酸化ミオシン調節軽鎖（2P-MRLC）の固定染色画像。シアン：Hoechst、緑：2P-MRLC、マゼンタ：F-actin、Scale bar = 100 µm
(b) 20 µM blebbistatinを投与した細胞シートの位相差画像。Scale bar = 1 mm
(c) 20 µM Y27632を投与した細胞シートの位相差画像。Scale bar = 1 mm
対物レンズ：(a) CFI プランアポクロマート VC 60XC WI (NA 1.20)、(b)および(c) CFI プランフルオール 4X (NA 0.13) PhL DL

まとめ

インサート内にゲルを入れてさらに細胞を播種した厚みのある状態でも、共焦点顕微鏡および低倍率対物レンズを用いることで、浸透圧勾配の誘引によりECM上の細胞シートに形成された、安定なドーム構造の全体像を捉えることが出来た。

今回、顕微鏡により捉えることに成功したドーム構造は、AQPによる不均一な水輸送がECMの局所的な膨潤を引き起こすことにより出現することが分かった。浸透圧勾配は生体内に普遍的に存在する現象であるが、形態形成との関わりはほぼ未解明である。本研究により、*in vivo*での形態形成における浸透圧勾配の重要性が提起される。

参考文献

"Osmotic gradients induce stable dome morphogenesis on extracellular matrix"
Sumire Ishida-Ishihara, Masakazu Akiyama, Kazuya Furusawa, Isao Naguro, Hiroki Ryuno, Takamichi Sushida, Seiichiro Ishihara and Hisashi Haga
Journal of Cell Science (2020) 133, jcs243865.
https://doi.org/10.1242/jcs.243865

製品情報

共焦点レーザー顕微鏡システム AX/AX R

生細胞への光毒性が低く光退色の少ない高速・高解像度・広視野の共焦点イメージングをサポート。
・高速：最速毎秒720フレーム（レゾナント 2048 ×16画素）
・高解像度：最高8K（ガルバノ）/2K（レゾナント）
・高スループット：視野数25 mmの超広視野