

巨核球による血小板産生と樹状細胞による細菌貪食の液中電顕観察 Observation of Megakaryocyte and Dendritic Cells in Liquid Using Atmospheric Scanning Electron Microscope (ASEM)

佐藤 主税^a, 渡邊 要平^a, 丸山 雄介^a, 佐藤 真理^a, 山本 雅之^b, 辻 典子^a, 本橋ほづみ^c
Chikara Sato, Yohei Watanabe, Yuusuke Maruyama, Mari Sato, Masayuki Yamamoto, Noriko M Tsuji and Hozumi Motohashi

^a産業技術総合研究所 バイオメディカル研究部門

^b東北大学大学院医学系研究科 医化学分野

^c東北大学加齢医学研究所 加齢制御研究部門 遺伝子発現制御分野

要旨 血液中の細胞成分の一つである血小板は、骨髄において巨核球から生産される。巨核球は多核細胞であり、成熟に伴い胞体突起を伸長する。その突起がちぎれることにより血小板が形成される。一方、樹状細胞は抗原提示細胞として機能する自然免疫細胞である。細菌などを食作用により細胞内にとりこみ、抗原情報をT細胞に提示すると共にサイトカインなどの様々な液性因子を産生して獲得免疫を誘導する。これら細胞の微小な内部器官とタンパク質複合体による機構には、未知の部分が多い。巨核球を、コーティングしたSiN薄膜上で初代培養し、前血小板中の接着因子P-selectinを免疫ラベルした。大気圧走査電子顕微鏡(ASEM)で水中観察したところ、前血小板はラベルされた α 顆粒らしい構造を含み、周囲に微小管が張りめぐらされていた。また、細菌が樹状細胞に貪食され、細菌を取り込んだ食胞がF-actinに囲まれる様子をASEMで観察した。

キーワード：免疫電子顕微鏡，巨核球，血小板，樹状細胞，微小管

1. はじめに

大気圧走査電子顕微鏡(ASEM: Atmospheric Scanning Electron Microscope)は、走査電顕を倒立させることで、水中のサンプルを電子線透過膜から2-3 μm の深さで観察する^{1,2)}。SiN膜近くでの分解能は8 nmである¹⁾。ASEMでは、サンプルはディッシュ上に置かれ、ディッシュ底の100 nm(原子400個程度)厚の強靱なSiN薄膜を透過して反射電子により観察される。さらに、上に備えた光顕と相関観察(CLEM: Correlative Light and Electron Microscopy)できる。ASEMディッシュは、取り外し可能でCO₂培養器で培養でき、細胞に対するこれまでの生理的刺激法・蛍光ラベル法のほとんどを適用可能にした。SiN膜は、ガラス板と同様に、タンパク質などで表面をコートできる。そのため、株細胞のみならず、培養が難しい組織からの初代培養を膜上で行うことが可能である³⁻⁵⁾。それは、SiN膜の製造過程で、膜表面が酸化されSiO_xになっておりガラス様の性質を持つからと思われる。しかも、水中観察は観察までの処理の手間が少ない。光顕とほぼ同じである。

巨核球と樹状細胞は、生理学的に重要で疾患治療の観点からも高い注目を集める。初代培養が可能であることが知られ、

様々な刺激下で培養して、細胞応答を観察できる。しかし、細胞の長い末端突起は基質上に薄く2次元的に広がるため、通常の超薄切片による透過電顕法では、接着基質と水平に薄切する必要がある容易ではない。ASEMディッシュを用いて、巨核球と樹状細胞を初代培養・実験し、化学固定後に水溶液中でASEM観察した。

2. 結果と考察

2.1 巨核球

巨核球は、前駆細胞から分化して成熟するにつれて、多核化し細胞質が豊富な大型の細胞になる。やがて、胞体突起とよばれる突起を伸長して、そこから血小板が形成される。血小板は、止血機構だけでなく、動脈硬化・炎症・がん転移など、様々な病態において重要な役割を果たしていることが近年報告されている。血液細胞の中でも、巨核球は生体内の存在数が非常に少ないために、解析が難しい細胞系列の一つである。しかし、血小板の減少時に特異的に血小板増加作用を示す因子として trombopoietin (thrombopoietin: TPO) が発見され試験管内での巨核球の分化誘導が可能となり、一方、発生工学の技術が進歩し様々な遺伝子改変マウスの作製が可能となったことにより、巨核球の分化成熟と血小板形成の分子機構が徐々に明らかになってきた。これまでに我々は、転写因子 NF-E2 が巨核球の成熟と血小板産生、さらに血小板の反応性の獲得に重要であることを明らかにしてきた⁶⁻¹⁰⁾。

^a 〒305-8566 茨城県つくば市東1-1-1

E-mail: ti-sato@aist.go.jp

2014年2月10日受付

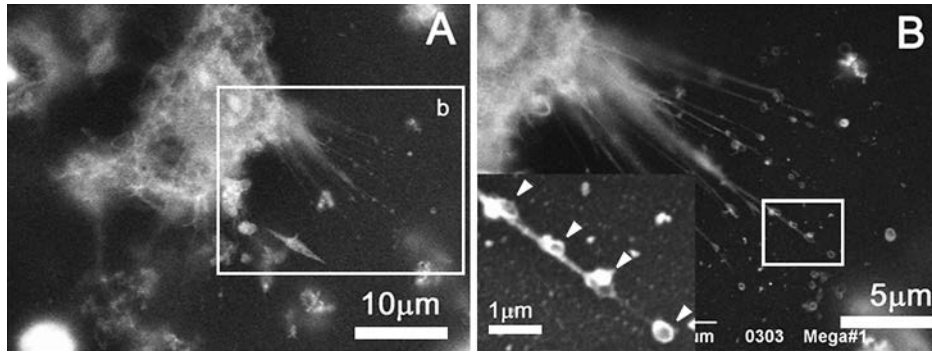


図1 巨核球による胞体突起形成のASEM観察。(A) Ti-Blue染色後に水中でASEM観察。白枠を拡大撮影したのが(B)であり、その中のサブパネルは胞状突起の先端をさらに高倍撮影。4)より改変。

また、近年では、NF-E2を線維芽細胞へ導入することにより、血小板を産生できることが報告されたり¹¹⁾、ヒトES細胞やiPS細胞から巨核球を分化させて血小板を産生できることが報告されている¹²⁾。しかしながら、巨核球から血小板が放出される分子機構については、まだ多くの謎が残されている。

このプロセスは、巨核球の初代培養からの胞体突起形成として観察することが可能である。マウス骨髄から単離した巨核球をディッシュに蒔き、12時間ほど培養すると、胞体突起形成が起こり始める。ASEMを用いて観察するために、ASEMディッシュをフィブロネクチンでコートすることにより巨核球の接着性を増加させた。Ti-Blueを用いた染色では、ビーズ状のふくらみを有する胞体突起が観察された(図1)。血小板の機能に極めて重要とされるPセレクトインは、血小板の α 顆粒の膜に存在しているとされている。Pセレクトイン抗体により標識し、FluoroNanogold Fab'で2次標識し金増感したところ^{3,4)}、たしかに、血小板内の顆粒状の構造体を観察することができた(図2)。金属溶液でカウンター染色することで周辺の構造や細胞境界を可視化することができ、矢

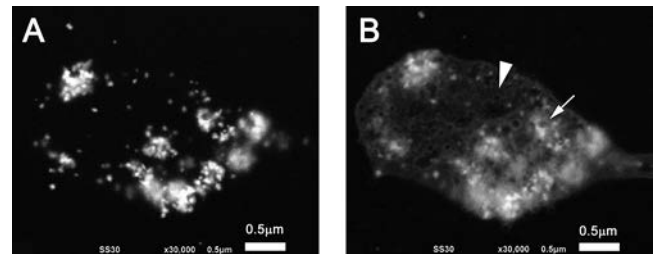


図2 胞体突起のPセレクトインを免疫ラベル。(A)膜透過後に、Pセレクトインを抗体ラベルし、蛍光と金(FluoroNanogold)標識Fab'で2次ラベル。金増感後にASEM撮影。(B)タンニン酸/酢酸ウラン/クエン酸鉛で追加染色。前小胞体の膜構造などが見える。矢印はPセレクトインを含む α 顆粒で、矢頭は密顆粒。4)より改変。

印はPセレクトインを含む α 顆粒で、矢頭はPセレクトインを含まず密顆粒と思われる。さらに、Pセレクトインと微小管との関係を調べると、前血小板内部に微小管が張り巡らされており、それに結合するようにPセレクトインが存在すると思われる構造物(矢印)が確認できた(図3)。一般に、ASEM dish

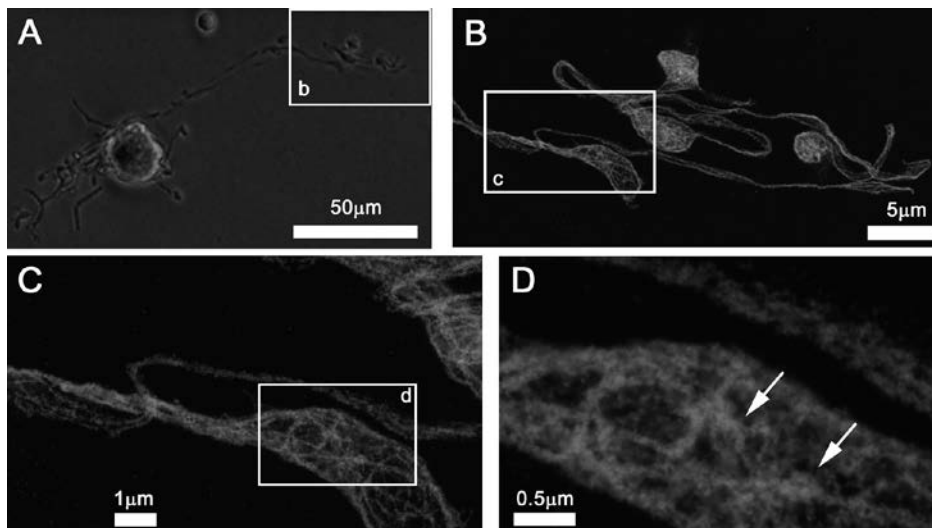


図3 巨核球の α -チューブリンとPセレクトインを免疫ラベル。(A)位相差顕微鏡。(B-D)免疫ラベル後にASEM観察。それぞれ白枠を拡大撮影。(B)胞体突起と連結部は微小管が豊富で(C)高倍像では一本一本の微小管が観察され(D)顆粒状の構造(矢印)も見える。4)より改変。

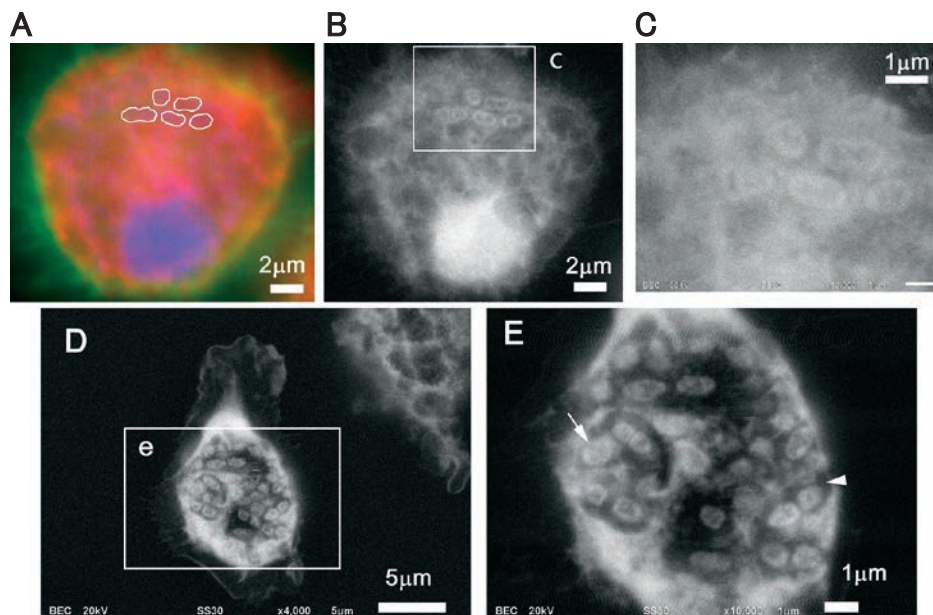


図4 樹状細胞による食作用. (A) 蛍光写真. (B-C) タンニン酸/酢酸ウラン/クエン酸鉛染色像. (D-E) 燐タングステン酸染色像. 白枠は右図でそれぞれ拡大撮影された. とりこまれた乳酸菌 (矢印) は, 細胞質と区分けされたエンドソーム (矢頭) と思われる器官に包まれ, さらにラベルされた F-actin (緑)・microtubule (赤) に取り囲まれる. 青は DAPI による染色で, 核が染まって見える. 4) より改変.

上の細胞の水中での免疫ラベルは, 光顕並にハイスループットに行うことができる. 今後, 血小板形成に関わる分子が実際に血小板形成のどの局面で機能しているかを検証するためには, ASEM が有効な解析手段を提供するものと期待される.

2.2 樹状細胞による食作用

樹状細胞は免疫系による防護の引き金をひく重要な自然免疫細胞である. マクロファージや好中球と同様に, 細菌などを食作用によって細胞内にとりこむ (ファゴサイトーシス). とりこんだ抗原情報を T 細胞に提示するとともに, 様々な液性因子を産生して獲得免疫を誘導する¹³⁾. 無菌飼育動物では, 自然免疫細胞と獲得免疫細胞の連携が十分に機能せず, 免疫系は未熟なままである. これは共生細菌が免疫系の成熟にとって重要であることを示唆している. 腸管は多くの腸内細菌と共生関係にあり, 自然免疫刺激を受けている. 特に小腸には免疫誘導器官であるパイエル板と多くの免疫細胞が存在し, 主要な共生細菌として乳酸菌が常在している.

これまでに我々は, 乳酸菌が骨髄由来樹状細胞を活性化することを報告してきた^{14,15)}. 乳酸菌は, 樹状細胞の活性化とサイトカインやインターフェロンの分泌を促すことで, NK 細胞・T 細胞・B 細胞を活性化する^{14,16,17)}. 樹状細胞などは食作用の際, 細胞骨格の動態をともなって細菌や抗原粒子をとりこむ¹⁸⁾. ここでは, 骨髄細胞から分化誘導した樹状細胞に, 乳酸菌 *Lactococcus lactis* C60 の加熱死菌体を共培養してとりこませた⁴⁾. 固定後, 細胞骨格を蛍光ラベルで特定した (図 4A). さらに, 重金属で染色し, ASEM で相関観察をおこなった. ASEM では, 乳酸菌は膜区画に閉じ込められて観察される (図 4B-C). おそらくエンドソームであろう. F-actin と α -Tubulin との位置関係は, F-actin がよりエンドソーム近

くに分布しているように見える (図 4A). 細菌の輸送には, 主に F-actin が使われるのであろうか. ここでは, 細菌をとりこんだ樹状細胞は細胞質が厚くなり, 上方からの蛍光観察は各層の蛍光が重なり合うため明解ではない. 光顕側を Confocal 顕微鏡にする必要性が感じられる. ここでの染色はタンニン酸, 酢酸ウラン, クエン酸鉛染色であるが, 燐タングステン酸単独の染色に変えても綺麗に染まる (図 4D-E). ここで, 乳酸菌を囲むエンドソームと思われる小胞の内部は黒く (密度が低く), その周りの細胞質は白く (密度が高く) 見える.

3. 今後の展望

ASEM dish での初代培養技術は, 遺伝子改変動物から得られた細胞にも適用することができる⁵⁾. これまでの巨核球研究におけるマウス遺伝子改変の蓄積を用いて, 今後は分子・複合体レベルでの血小板産生機構の解明が進むことが期待される. また, 蛍光と電子線による水中 CLEM は, 多色による複数種分子のラベルを高分解能ラベルと比較することを可能にした³⁻⁵⁾. 複合体形成など様々な研究に応用できる. 樹状細胞が乳酸菌を取り込んだ像は, 肺胞上皮細胞がレジオネラ菌を取り込んで肺炎が慢性化している様子とも似ている. ASEM の各種感染症・炎症性疾患研究への応用の可能性を示唆すると思われる.

謝 辞

産総研の小椋俊彦博士に ASEM (ClairScope) 開発における貢献に感謝します. 本研究は, 新学術領域「構造細胞生物学」, CREST, ヤクルト・バイオサイエンス研究財団の支援を受けて行われました.

文 献

- 1) Nishiyama, H., Suga, M., Ogura, T., Maruyama, Y., Koizumi, M., Mio, K., Kitamura, S. and Sato, C.: *J. Struct. Biol.*, **169**, 438–449 (2010)
- 2) 西山英利, 須賀三雄, 小椋俊彦, 丸山雄介, 小泉 充, 三尾和弘, 北村真一, 佐藤主税: *顕微鏡*, **44**, 262–267 (2009)
- 3) Maruyama, Y., Ebihara, T., Nishiyama, H., Suga, M. and Sato, C.: *J. Struct. Biol.*, **180**, 259–270 (2012)
- 4) Hirano, K., Kinoshita, T., Uemura, T., Motohashi, H., Watanabe, Y., Ebihara, T., Nishiyama, H., Sato, M., Suga, M., Maruyama, Y., Tsuji, N.M., Yamamoto, M., Nishihara, S. and Sato, C.: *Ultramicroscopy*, in press
- 5) Kinoshita, T., Mori, Y., Hirano, K., Sugimoto, S., Okuda, K., Matsumoto, S., Namiki, T., Ebihara, T., Kawata, M., Nishiyama, H., Sato, M., Suga, M., Higashiyama, K., Sonomoto, K., Yoshimitsu Mizunoe, Y., Nishihara, S. and Sato, C.: *Microsc Microanal*, **20**, 469–483 (2014)
- 6) Shavit, J.A., Motohashi, H., Onodera, K., Akasaka, J., Yamamoto, M. and Engel, J.D.: *Genes Dev.*, **12**, 2164–2174 (1998)
- 7) Onodera, K., Shavit, J.A., Motohashi, H., Yamamoto, M. and Engel, J.D.: *EMBO J.*, **19**, 1335–1345 (2000)
- 8) Motohashi, H., Katsuoka, F., Shavit, J.A., Engel, J.D. and Yamamoto, M.: *Cell*, **103**, 865–875 (2000)
- 9) Takayama, M., Fujita, R., Suzuki, M., Okuyama, R., Aiba, S., Motohashi, H. and Yamamoto, M.: *Mol. Cell Biol.*, **30**, 2668–2680 (2010)
- 10) Fujita, R., Takayama-Tsujimoto, M., Satoh, H., Gutiérrez, L., Aburatani, H., Fujii, S., Sarai, A., Bresnick, E.H., Yamamoto, M. and Motohashi, H.: *Mol. Cell Biol.*, **33**, 2659–2670 (2013)
- 11) Ono, Y., Wang, Y., Suzuki, H., Okamoto, S., Ikeda, Y., Murata, M., Poncz, M. and Matsubara, Y.: *Blood*, **120**, 3812–3821 (2012)
- 12) Takayama, N. and Eto, K.: *Methods Mol. Biol.*, **788**, 205–217 (2012)
- 13) Banchereau, J. and Steinman, R.M.: *Nature*, **392**, 245–252 (1998)
- 14) Kosaka, A., Yan, H., Ohashi, S., Gotoh, Y., Sato, A., Tsutsui, H., Kaisho, T., Toda, T. and Tsuji, N.M.: *Int. Immunopharmacol.*, **14**, 729–733 (2012)
- 15) Kawashima, T., Kosaka, A., Yan, H., Guo, Z., Uchiyama, R., Fukui, R., Kaneko, D., Kumagai, Y., You, D.J., Carreras, J., Uematsu, S., Jang, M.H., Takeuchi, O., Kaisho, T., Akira, S., Miyake, K., Tsutsui, H., Saito, T., Nishimura, I. and Tsuji, N.M.: *Immunity*, **27**, 1187–1197 (2013)
- 16) Rizzello, V., Bonaccorsi, I., Dongarra, M.L., Fink, L.N. and Ferlazzo, G.: *J. Biomed. Biotechnol.*, **2011**, 473097 (2011)
- 17) Tsai, Y.T., Cheng, P.C., Liao, J.W. and Pan, T.M.: *Int. Immunopharmacol.*, **10**, 791–798 (2010)
- 18) Niedergang, F. and Chavrier, P.: *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **291**, 43–60 (2005)