

特集：キズが治るメカニズムときれいに治す治療**上皮細胞を支える基底膜のダイナミクス**栗栖 修作¹⁾, 米村 重信^{1,2)}¹⁾徳島大学大学院医歯薬学研究部細胞生物学分野²⁾理化学研究所生命機能科学研究センター超微形態研究チーム

(令和3年3月18日受付) (令和3年4月2日受理)

はじめに

基底膜はラミニン・IV型コラーゲンを主成分とする細胞外マトリックス (extracellular matrix; ECM) タンパク質のシート状の集合体であり, 上皮組織をはじめとして神経組織や筋細胞・脂肪細胞などの体の至る所に見られる。上皮組織において, 基底膜は上皮と結合組織を隔てる境界膜になっており, この関係は内皮・中皮を問わずあらゆる上皮組織で普遍的に見られる。基底膜の第一の役割は, 上皮細胞の接着の足場となり組織に機械的強度を与えることである。しかしそれだけでなく, 基底膜それ自身が上皮細胞の増殖・生存を制御したり, 極性や分化状態を決定するなど多岐にわたる強力な生理活性を持つ。そのため, ひとたび基底膜に異常があれば上皮組織は壊滅的なダメージを受ける。事実そのような多くのヒト遺伝性疾患が知られている¹⁾。また, 上皮細胞から原発するがんでは基底膜の形成不全が浸潤・転移の大きな一因となっている。すなわち, 基底膜を正しく編成し, 空間的に配置することが上皮組織の維持や形づくりに必要不可欠である。

恒常性を保っている上皮組織では, 基底膜は動かない静かな構造体のように見える。しかし組織の発生が進む胎児期では, 基底膜は時々刻々と分布を変え多彩なダイナミクスを見せる。また表皮や角膜上皮での創傷治癒では, 数日から数週間に渡って基底膜の再構築が継続し, 組織再生の土台となる。最近になって, この動的な基底膜の形成・再生の進み方によって, 出来上がってくる上皮組織そのものの形や機能が大きく左右されることが分

かってきた。本稿ではその経緯について概説し, 当分野で取り組んでいるアプローチについて紹介する。

1. 基底膜とは? その成分・厚さ・硬さ

基底膜はラミニン, IV型コラーゲン, ニドゲン, ヘパラン硫酸プロテオグリカン (パーレカンやアグリン) という四種類の主要 ECM タンパク質から成る。ラミニンとIV型コラーゲンは自発的に自己集合して, それぞれが巨大な網目状ネットワークを作ることで基底膜に機械的強度を与えている。糖タンパク質のニドゲンやパーレカン・アグリンは, ラミニンとIV型コラーゲンのネットワークの間を繋ぐ役割を果たしていると考えられている。ただし, 主要タンパク質をコードする遺伝子はそれぞれ複数存在し, 個々の上皮組織で発現する組み合わせは異なる。さらに主要 ECM 以外の微量構成成分も組織ごとに違いがある。このことが基底膜の組織特有の機能的要請を満たしていると考えられている。例えばヘテロ三量体であるラミニンは, 単量体をコードする遺伝子の違いによって16のアイソフォームが存在する²⁾。腎糸球体のろ過装置である糸球体基底膜 (glomerular basement membrane; GBM) には他の組織ではあまり見られないラミニン-521が主に含まれる。また, 皮膚の基底膜は係留線維として知られるVII型コラーゲンを含み, 表皮と真皮の間の接着を強固にしている。

基底膜の厚さについては一部の例外 (水晶体嚢や気管支) を除き, 多くの上皮組織で50~100nmと考えられてきた³⁾。しかしこれらの値は透過電子顕微鏡 (transmission electron microscope; TEM) の観察に基づくもので, 脱

水による圧縮を考慮すると過少に評価されている可能性がある。近年になって原子間力顕微鏡 (atomic force microscope; AFM) や超解像顕微鏡による厚さの測定が可能になり、網膜の内境界膜では TEM の測定値に比べ2~4倍程度の厚さであることが報告されている^{4,5)}。未だ定まった見解ではないが、基底膜の厚さは組織ごとにさまざまであり50nm~数 μm 程度と考えるのが妥当とみられている (表)。

基底膜の硬さ (弾性率) はどうだろうか。硬さの測定は基底膜に直接物理的なアクセスが可能な組織に限られるため、厚さに比べ報告例は少ない。網膜の内境界膜や腎尿細管基底膜は比較的アクセスが容易であり、種は異なれどショウジョウバエの初期胚も基底膜が表出している。それらの測定値 (表) によると、基底膜は1~数MPaの硬さ (これは硝子軟骨と同程度の硬さ) であることが報告されている^{4,6,7)}。一方で間質マトリックスの硬さは1~100kPaと見積もられており^{8,9)}、上皮細胞は「柔らかい」間質の上にシート状に広がる「硬い」基底膜を足場としていると言えよう。一つ興味深い点として、皮膚や網膜では基底膜の厚さや硬さが加齢に伴い増加することが知られているが、その医学的な意味は明らかでない^{4,10)}。

2. 基底膜の形成・再生過程

このように比較的硬い基底膜であるが、上皮組織の発生過程や修復過程ではその成分や空間的配置を変えながらダイナミックな挙動を見せる。このような動的過程での基底膜の形成について不明な点が多く、かつ組織ごとに異なる面もあるが、ここでは最も研究されている皮膚の創傷治癒を例にとって基底膜形成の分子機構を見ていこう (図1A)。

外傷などで基底膜が破れると血液凝固・炎症反応が起こり、創傷部は2~3日のうちに種々のサイトカインや成長因子で満たされる。そのシグナルを受けて表皮の上皮細胞であるケラチノサイトや真皮の線維芽細胞が増殖し、傷を覆うようにケラチノサイトの遊走が始まる。同時にケラチノサイトと線維芽細胞は炎症シグナルによって自身の分泌プロファイルを変化させ、基底膜の再生に必要なタンパク質を産生する¹¹⁾。ラミニン-332は創傷からわずか数時間で遊走ケラチノサイト内で発現が上昇し、再生する基底膜において最も初期に現れるECMである¹²⁾。一方、表皮基底膜を構成するもう一つのラミニンアイソフォームであるラミニン-511の発現は遅く、傷が上皮で覆われ仮の基底膜が形成された後にケラチノサイ

表 基底膜の厚さと硬さ

	種・組織	測定法	測定値	文献
厚さ	ラット・口唇表皮	TEM	90nm	Osawa <i>et al.</i> , 2003
	ラット・口唇粘膜上皮	TEM	90nm	
	マウス・GBM	STORM*	150-200nm	Suleiman <i>et al.</i> , 2013
	ヒト・下腹部表皮	TEM	(age 35)70nm	Vazquez <i>et al.</i> , 1996
			(age 60)110nm	
		TEM	(age 47)350nm	
ヒト・網膜内境界膜	AFM	(age 85)1.2 μm	Candiello <i>et al.</i> , 2010	
		(age 47)1.7 μm		
			(age 85)4.0 μm	
硬さ (弾性率)	ウサギ・腎近位尿管	応力ひずみ	2-5MPa	Welling and Grantham, 1972
	ヒト・網膜内境界膜	AFM	(age 45)1.2MPa	Candiello <i>et al.</i> , 2010
			(age 86)4.0MPa	
ショウジョウバエ・卵胞上皮	AFM	0.1-1MPa (発生が進むと硬化)	Chlasta <i>et al.</i> , 2017	

*Stochastic optical reconstitution microscopy

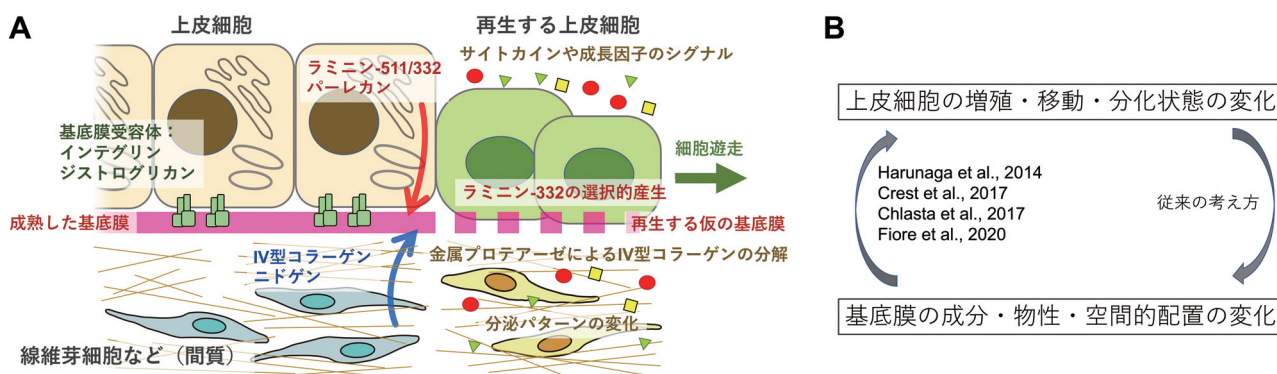


図1 基底膜の形成・再生と上皮組織形態の関係
(A) 創傷治癒時の基底膜形成の分子メカニズム
(B) 上皮細胞形態と基底膜の形成の間にある相互フィードバック

トから分泌され表皮幹細胞の維持・分化に関わる^{13,14)}。パーレカンも創傷治癒後期にケラチノサイトから分泌され基底膜に組み込まれる。その役割はケラチノサイトと基底膜の間の接着を強めると考えられている¹⁵⁾。

表皮基底膜の再生ではIV型コラーゲンとニドゲンは主に線維芽細胞から分泌される^{16,17)}。ニドゲンは傷ができて数日後から徐々に発現量を増し、上皮化が完了した後の基底膜の成熟に関わる^{17,18)}。IV型コラーゲンは創傷から4日後には再生中の基底膜に少量見られ、8日から21日の間にかけて多く検出されるようになる^{19,20)}。初期の創傷ではマトリックスメタロプロテアーゼ-1(matrix metalloproteinase-1; MMP-1)などの金属プロテアーゼが多量に存在しコラーゲンが分解されやすい環境にある。これが基底膜IV型コラーゲンの蓄積を妨げている可能性がある²¹⁾。基底膜中のIV型コラーゲンの含有量はその硬さと相関することが知られており^{7,22)}、創傷治癒の過程で一過的に形成される「ラミニン-332に富みIV型コラーゲンが少ない基底膜」は柔らかく、時間の経過とともに硬化することが考えられ興味深い。

最終的に基底膜が傷を完全に覆い成熟してくると、基底膜を超えた液性因子の拡散がブロックされ創傷治癒が収束へと向かう。角膜上皮の創傷治癒では基底膜の再生の度合いと角膜の透明性が相関することからも、基底膜が上皮組織の修復を左右する一つの要因になっていることが伺える²³⁾。

3. 基底膜の物性変化による上皮形態の制御

表皮の創傷治癒に見られるように、従来上皮細胞が増殖・移動し基底膜はその結果として受動的に形成されると見られてきた。しかし、最近になって基底膜そのものの空間的配置や物性変化が上皮細胞の分布や分化を制御し、上皮組織の形態に大きな影響を与えることが分かってきた(図1B)。

マウスの唾液腺の発生過程では、上皮細胞の集団は基底膜の小袋に包まれており、発生が進むにつれてこの袋状の構造(上皮芽)が先端部で拡大・枝分かれを繰り返し成熟した腺房-導管構造を形成する。この時期の基底膜を観察すると、各小袋の先端部は小さな孔(サイズはおおよそ $2\mu\text{m}^2$)が多数開いたメッシュ構造になっており、基部(将来の導管方向)に向かうにつれて孔の数は少なくなり、また基底膜は肥厚する。興味深いことに、この基底膜の孔の形成を実験的に抑制すると上皮芽の拡大が見られなくなる²⁴⁾。基底膜の小袋は成長先端で柔らかく伸縮性に富み、基部の方向に向かって硬くなるという硬さの勾配があり、それによって上皮芽が先端部に拡張しやすくなっていると考えられている。

ショウジョウバエの卵形成では、卵室は球状から前後に長細い楕円体へ変形する。卵室は卵胞上皮によって覆われ、最表面に基底膜が存在する。卵室が変形する時期になると、この基底膜に含まれるIV型コラーゲンは均一なネットワークではなく微細な原線維として存在する

ようになり、さらにそれらは前後軸に垂直な方向に整列する。これによって卵室基底膜に硬さの異方性が与えられ、卵室は前後軸方向に伸びやすくなると考えられている²⁵⁾。また、AFMを用いてこの時期の基底膜の硬さの分布を調べると、前後軸に沿って中央部で硬く、前後の端で柔らかくなっており、このことも卵室の伸長に寄与している^{7, 22)}。

上の二つの例は基底膜の物性の制御によって上皮組織の形が決まっていることを如実に示している。また発生過程だけではなく、腫瘍の形態形成や悪性進展においても基底膜の硬さの調節やターンオーバーに関わることが報告されており、基底膜の物性制御がさまざまな上皮組織の生理・病理に影響を与えている可能性がある^{26, 27)}。

4. 基底膜ダイナミクスの解明に向けて

上述のように、上皮組織の形づくりや再生のメカニズムを解明する上で、基底膜形成の制御が一つの鍵になるだろう。しかし、基底膜が具体的にどの細胞で、どのような時間経過で形成されるかといった詳細なダイナミクスは、最も研究の進んでいる皮膚においてさえ明らかでない。また基底膜の成分・物性の変化はなぜ起きるのか？その制御を司る分子機構も謎に満ちている。

そのような基底膜のダイナミクスの解明を阻んでいる一つの要因として、数日から数週間に及ぶ基底膜の再編現象を追跡する分子ツールが無いことが挙げられる。そこでわれわれは基底膜ECMタンパク質にHaloタグを融合することで基底膜ダイナミクスの解明に挑んでいる。Haloタグは、それ自体は蛍光性を示さないが、温和な条件下で外部から添加したハロアルカン修飾蛍光リガンドと高い特異性で反応する²⁸⁾。蛍光リガンドは緑色蛍光タンパク質 (green fluorescent protein; GFP) などの蛍光タンパク質タグと比較して非常に明るく化学的に安定なものを選ぶことができる。これにより基底膜タンパク質に任意のタイミングで蛍光性を持たせ、顕微鏡下で長期に渡って追跡することが可能になる。

われわれはブタ由来腎尿細管細胞株を上皮基底膜形成モデルとして用いている (図2A)。この細胞はECMゲル中で三次元的に培養すると基底膜に包まれた上皮シス

トを形成し、肝細胞成長因子 (hepatocyte growth factor; HGF) を添加することでシストから尿細管様の上皮の管 (管腔) を誘導することができる。この細胞にラミニン $\gamma 1$ -Halo 融合タンパク質を発現し、ラミニンの動きを追跡した。HGF 添加前に Halo タグを蛍光ラベルしておくことで、3日前に存在したラミニンと現在ある全てのラミニンを分けて可視化することができる (図2B)。3日前のラミニンは元々あったシストに留まり、誘導された管腔部では新たな基底膜の形成が起きていることが示された。また、新たな基底膜のラミニン含有量は少なく、管腔が形成された後でも基底膜の成熟が続くことが示唆される。

Halo タグは細胞が生きた条件下でも明瞭に基底膜を可視化することができるため、ライブイメージングによってより詳細な分子追跡も可能である。当分野ではラミニンだけでなく、他のECMタンパク質についても同様の追跡を行っており、管腔形成時の基底膜の動態が上皮細胞の振る舞いにどう影響するのか、その関連について明らかにしようと試みている。

おわりに

上皮組織における基底膜の成分・物性変化の重要性は、主にショウジョウバエや線虫を用いた発生研究において認識されつつあるが、ヒトの疾患や組織再生での意義についてはこれからの研究で明らかになることが望まれる。そこから得られた知見は学術的価値があるだけでなく医学的な応用にも直結する。基底膜は細胞外にあり外部からの治療介入が容易であるため、例えば基底膜ECMを人為的に改変することで傷や潰瘍からの上皮組織の再生を加速させたり、傷跡の残らないより綺麗な修復が可能になるかもしれない。また静的な基底膜でも常に新たに成分が合成され古い分子と入れ替わっており、このターンオーバーの速度が糖尿病や加齢で変化することが知られている²⁹⁾。つまり基底膜の健全性を保つことが健康寿命を延ばすことに繋がるかもしれない。このように基底膜の動態研究は今後益々重要になってくるだろう。

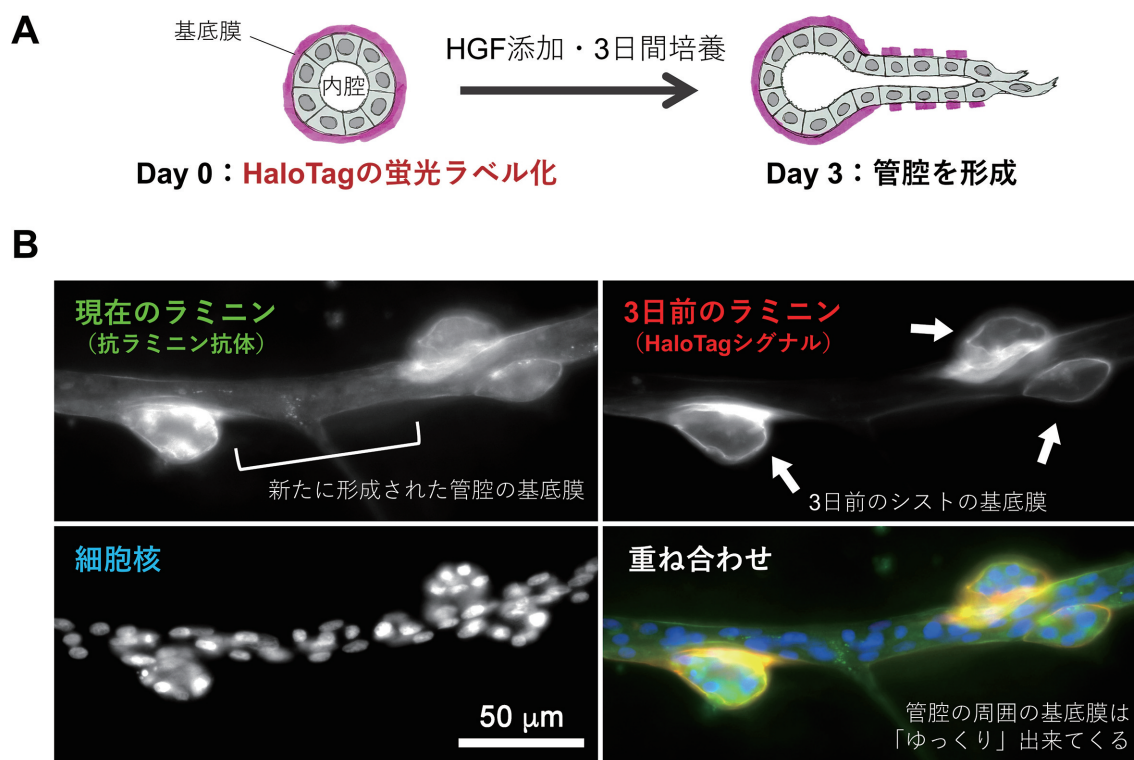


図2 Halo タグによる上皮管腔形成時の基底膜成分の追跡
 (A) ブタ由来腎尿管細胞の管腔誘導を用いた基底膜形成のモデル
 (B) ラミニニン γ 1-Halo を時間差 (3日) をつけて可視化し、蛍光顕微鏡下で観察した画像

文 献

- 1) Pozzi, A., Yurchenco, P. D., Iozzo, R. V.: The nature and biology of basement membranes. *Matrix Biol.*, **57-58** : 1-11, 2017
- 2) Yurchenco, P. D.: Basement Membranes: Cell Scaffoldings and Signaling Platforms. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **3** : a004911, 2011
- 3) Osawa, T., Onodera, M., Feng, X. Y., Nozaka, Y.: Comparison of the thickness of basement membranes in various tissues of the rat. *J. Electron Microsc.*, **52**: 435-440, 2003
- 4) Candiello, J., Cole, G. J., Halfter, W.: Age-dependent changes in the structure, composition and biophysical properties of a human basement membrane. *Matrix Biol.*, **29** : 402-410, 2010
- 5) Suleiman, H., Zhang, L., Roth, R., Heuser, J. E., *et al.*: Nanoscale protein architecture of the kidney glomerular basement membrane. *eLife*, **2** : 1-18, 2013
- 6) Welling, L. W., Grantham, J. J.: Physical properties of isolated perfused renal tubules and tubular basement membranes. *J. Clin. Invest.*, **51** : 1063-1075, 1972
- 7) Chlasta, J., Milani, P., Runel, G., Duteyrat, J. L., *et al.*: Variations in basement membrane mechanics are linked to epithelial morphogenesis. *Development*, **144**: 4350-4362, 2017
- 8) Pailler-Mattei, C., Bec, S., Zahouani, H.: *In vivo* measurements of the elastic mechanical properties of human skin by indentation tests. *Med. Eng. Phys.*, **30**: 599-606, 2008
- 9) Booth, A. J., Hadley, R., Cornett, A. M., Dreffs, A. A., *et al.*: Acellular normal and fibrotic human lung

- matrices as a culture system for in vitro investigation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **186** : 866-876, 2012
- 10) Vázquez, F., Palacios, S., Alemañ, N., Guerrero, F.: Changes of the basement membrane and type IV collagen in human skin during aging. *Maturitas*, **25** : 209-215, 1996
 - 11) Rousselle, P., Montmasson, M., Garnier, C.: Extracellular matrix contribution to skin wound reepithelialization. *Matrix Biol.*, **75-76** : 12-26, 2019
 - 12) Kainulainen, T., Häkkinen, L., Hamidi, S., Larjava, K., *et al.*: Laminin-5 expression is independent of the injury and the microenvironment during reepithelialization of wounds. *J. Histochem. Cytochem.*, **46** : 353-360, 1998
 - 13) Nyström, A., Velati, D., Mittapalli, V. R., Fritsch, A., *et al.*: Collagen VII plays a dual role in wound healing. *J. Clin. Invest.*, **123** : 3498-3509, 2013
 - 14) Morgner, J., Ghatak, S., Jakobi, T., Dieterich, C., *et al.*: Integrin-linked kinase regulates the niche of quiescent epidermal stem cells. *Nat. Commun.*, **6** : DOI: 10.1038/ncomms9198, 2015
 - 15) Botta, A., Delteil, F., Mettouchi, A., Vieira, A., *et al.*: Confluence switch signaling regulates ECM composition and the plasmin proteolytic cascade in keratinocytes. *J. Cell Sci.*, **125** : 4241-4252, 2012
 - 16) Marinkovich, M. P., Keene, D. R., Rimberg, D. S., Burgeson, R. E.: Cellular origin of the dermal-epidermal basement membrane. *Dev. Dyn.*, **197** : 255-267, 1993
 - 17) Smola, H., Stark, H. J., Thiekötter, G., Mirancea, N., *et al.*: Dynamics of basement membrane formation by keratinocyte-fibroblast interactions in organotypic skin culture. *Exp. Cell Res.*, **239** : 399-410, 1998
 - 18) Baranowsky, A., Mokkapati, S., Bechtel, M., Krügel, J., *et al.*: Impaired wound healing in mice lacking the basement membrane protein nidogen 1. *Matrix Biol.*, **29** : 15-21, 2010
 - 19) Betz, P., Nerlich, A., Wilske, J., Tübel, J., *et al.*: The time-dependent rearrangement of the epithelial basement membrane in human skin wounds-immunohistochemical localization of collagen IV and VII. *Int. J. Legal Med.*, **105** : 93-97, 1992
 - 20) Larjava, H., Salo, T., Haapasalmi, K., Kramer, R. H., *et al.*: Expression of integrins and basement membrane components by wound keratinocytes. *J. Clin. Invest.*, **92** : 1425-1435, 1993
 - 21) Saarialho-Kere, U. K., Kovacs, S. O., Pentland, A. P., Olerud, J. E., *et al.*: Cell-matrix interactions modulate interstitial collagenase expression by human keratinocytes actively involved in wound healing. *J. Clin. Invest.*, **92** : 2858-2866, 1993
 - 22) Crest, J., Diz-Muñoz, A., Chen, D. Y., Fletcher, D. A., *et al.*: Organ sculpting by patterned extracellular matrix stiffness. *eLife*, **6** : 1-16, 2017
 - 23) Saikia, P., Medeiros, C. S., Thangavadivel, S., Wilson, S. E.: Basement membranes in the cornea and other organs that commonly develop fibrosis. *Cell Tissue Res.*, **374** : 439-453, 2018
 - 24) Harunaga, J. S., Doyle, A. D., Yamada, K. M.: Local and global dynamics of the basement membrane during branching morphogenesis require protease activity and actomyosin contractility. *Dev. Biol.*, **394** : 197-205, 2014
 - 25) Haigo, S. L., Bilder, D.: Global tissue revolutions in a morphogenetic movement controlling elongation. *Science*, **331** : 1071-1074, 2011
 - 26) Rodriguez-Teja, M., Gronau, J. H., Breit, D., Zhang, Y. Z., *et al.*: AGE-modified basement membrane cooperates with Endo180 to promote epithelial cell invasiveness and decrease prostate cancer survival. *J. Pathol.*, **235** : 581-592, 2015
 - 27) Fiore, V. F., Krajnc, M., Quiroz, F. G., Levorse, J., *et al.*: Mechanics of a multilayer epithelium instruct tumour architecture and function. *Nature*, **585** : 433-439, 2020
 - 28) Los, G. V., Encell, L. P., McDougall, M. G., Hartzell, D. D., *et al.*: HaloTag: A novel protein labeling technology for cell imaging and protein analysis. *ACS*

Chem. Biol., 3 : 373-382, 2008

- 29) Marshall, C. B.: Rethinking glomerular basement membrane thickening in diabetic nephropathy : Ada-

ptive or pathogenic? Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.,
311 : F831-F843, 2016

Basement membrane dynamics in epithelial morphogenesis

Shusaku Kurisu¹⁾ and Shigenobu Yonemura^{1,2)}

¹⁾*Department of Cell Biology, Tokushima University Graduate School of Biomedical Sciences, Tokushima, Japan*

²⁾*Laboratory for Ultrastructural Research, RIKEN Center for Biosystems Dynamics Research (BDR), Hyogo, Japan*

SUMMARY

In homeostatic epithelial tissues, the basement membrane appears to be a quiet, motionless structure. However, during embryonic development and tissue regeneration, the basement membrane dramatically changes its distribution and shows a variety of dynamics such as compositional transition and physicochemical alterations. Recently, it has been pointed out that the shape and function of epithelial tissues is greatly influenced by the way of formation and arrangement of the basement membrane. Here, we outline the current understanding of the roles of the basement membrane dynamics in epithelial morphogenesis, and briefly introduce our approach to visualize the movement of basement membrane components.

Key words : Basement membrane, Laminin, Type IV collagen, Epithelial morphogenesis