

令和 2 年 7 月 10 日現在

機関番号：32684

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08525

研究課題名（和文）マイクロウェーブ急速凍結法による機能的シナプスのコネクトミクス解析

研究課題名（英文）Connectmics analysis of functional synapses by microwave rapid freezing method

研究代表者

中舘 和彦（Nakadate, Kazuhiko）

明治薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：80372895

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題は、神経回路再編のメカニズムを形態学的、特に超微形態学的に解析することを目的に研究を行った。まず、急速凍結置換法の実験を開始し、高感度で高解像度の像を観察可能な条件を明らかにした。その条件下で、神経回路再編のモデルを用い、神経可塑性の変化を単一ニューロン上に分布する全スパインを網羅的に解析した。機能的シナプス変化を解析するため、c-Fosを用いたActivity Mapping法を併用し、Zif268やCREBのリン酸化、またFosBをターゲットに検討した。その結果、入力依存的に感受していることを明らかにした。形態変化が引き起こされたスパインの割合と神経活動との相関の結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、基礎的な脳神経回路研究の飛躍的な解明に寄与すると考えられる。さらに、これまで困難と考えられてきた微細形態学的解析と神経活動マーカーとの相関を取れる技術の革新により、脳神経回路研究だけでなく、医療分野や生命研究分野をはじめ、多くの分野に寄与できるものと示唆される。今後のさらなる検討により、飛躍的な研究へとつながる礎となった。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this research is to analyze the mechanism of neural circuit reorganization morphologically, especially ultra-morphologically. First, we started the experiment of rapid freezing and substitution method and clarified the conditions under which high-sensitivity and high-resolution images can be observed. Under these conditions, we analyzed all the spines in which neural plasticity changes were distributed on a single neuron using a model of neural network reorganization. To analyze functional synaptic changes, we used the Activity Mapping method with c-Fos in combination with phosphorylation of Zif268 and CREB and FosB as a target. As a result, it was clarified that they are sensitive to input. The results of the correlation between the percentage of spines that caused morphological changes and neural activity were obtained.

研究分野：神経解剖学

キーワード：超微細形態 シナプス コネクトミクス

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本研究遂行のための必須条件は急速凍結法である。これまで多くの研究者が電子顕微鏡レベルで解析可能な急速凍結法の確立を目指し研究してきている。しかしながらその多くは、凍結面からわずかな深さしか解析可能な部位が得られていないのが現状である。この組織細胞凍結保存で問題となるのが細胞死につながる細胞内外の氷晶形成である。この氷晶形成を可能な限り減弱しアモルファス様凍結が可能になることで本研究が実現可能になるが、研究開始時点では、その手法の確立がなされていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、電子顕微鏡下で広範囲に解析する必要があり、さらに機能的シナプス解析のためには、免疫組織化学法を併用した免疫電子顕微鏡法が必須である。そこで本研究は2つの目的を設定し、順次研究を行うこととした。1つ目の目的は、電子顕微鏡下で広範囲に解析可能な凍結技法の確立である。2つ目の目的は、機能的シナプスを解析するための神経活動マーカーの探索である。

これらを組み合わせ、機能的シナプスを超微細レベルで解析する。

3. 研究の方法

(1) マイクロウェーブ発生装置を用いて、凍結時の氷晶形成を振動で抑制し、**viability** を有した細胞凍結保存が可能か検討する。(研究成果項目に詳細を示す)

(2) 免疫電子顕微鏡法を用いた機能的シナプスマーカーの検討を行う。(研究成果項目に詳細を示す)

4. 研究成果

(1) 凍結時の氷晶形成抑制効果の検討

吸入麻酔による全身麻酔下に雄のWistar系ラット(8~9週齢体重250~300g)の坐骨神経又は大腿神経を2cm採取し、凍結保護液(セルバンカー®、ZENOAQ、福島県郡山市、日本)に浸漬後凍結実験を行った。使用機器はラットの尾を用いたCAS®凍結実験⁴⁾(以下先行実験)時のものを基本とした。組織凍結の設定条件は凍結最低温度を -50°C とした上で、設定温度(先行実験の凍結設定を参考とした設定(図1a)、氷晶形成を生じる温度帯(0°C ~ -5°C 、以下氷晶形成帯)前後の予備冷却設定⁶⁾あり(図1b)、予備冷却を設定なし温度設定(図1c))、磁場付加(以下CAS)の有無、凍結速度($0.5^{\circ}\text{C}/\text{分}$ ⁷⁾、もしくはCAS®凍結装置の最大速度)、解凍方法(37°C 恒温槽による急速解凍、自然解凍、磁場付加解凍(以下CAS解凍))を変えながら最適条件を検討した。**viability**の評価として光学顕微鏡と電子顕微鏡を用いて観察した上で、さらに、コラゲナーゼを用い細胞成分を分離洗浄後、35 mm dishで 37°C 2日間培養し、抗S100抗体を用い免疫染色後に蛍光顕微鏡を用いて10視野におけるシュワン細胞を観察した。

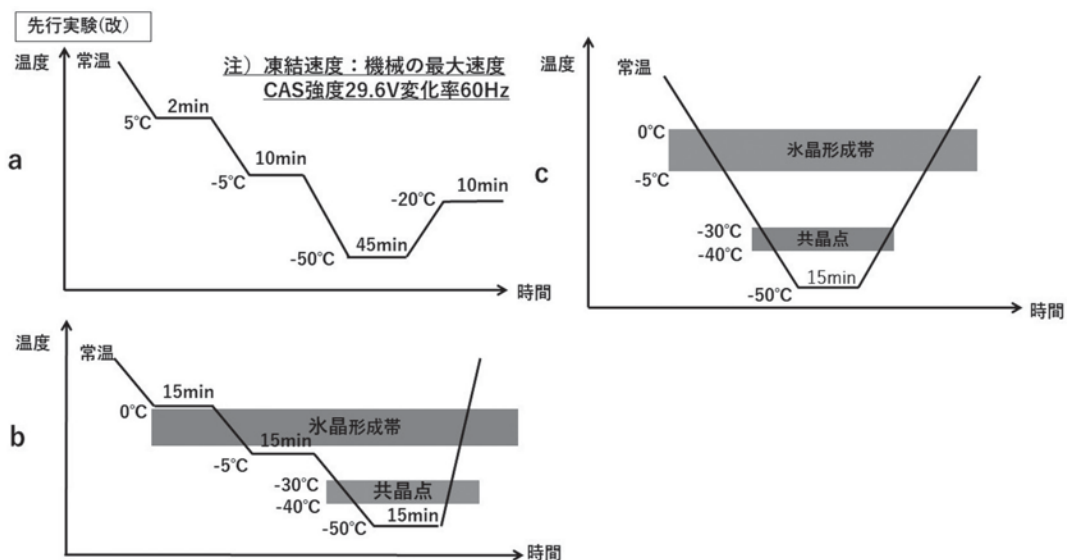


図1. a 凍結温度設定は、先行実験を参考に設定した。凍結速度は機械の最大速度で磁場強度は 29.6V 変化率を 60 Hz

とした。

b 氷晶形成帯前後に予備冷却を設定した。

c 予備冷却を設定なし。 -30°C で酵素が停止する為、 -50°C を凍結最低温度とした。

① CASの有無について

先行実験の設定温度(図1a)でCAS有又はCAS無凍結後、1週間後に37℃恒温槽で解凍し電顕を用い観察を行った。また、坐骨神経採取直後に固定したものをコントロールとした。コントロールと比較してCASの有無に関わらず、ミエリン鞘の空胞化、軸索の狭小化を認めていたが、CAS無と比べCAS有はミエリン鞘の空胞化、軸索の狭小化が少なかった(図2)。画像所見上、CAS凍結は氷晶形成が抑制され有効であると考えられた。

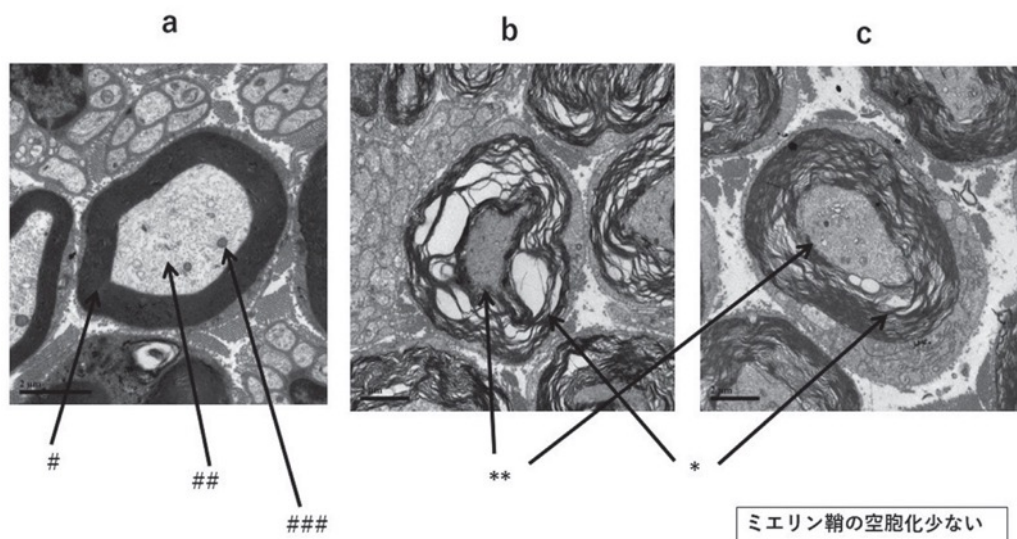


図2. a control b CAS- c CAS+

電顕像では、コントロールと比べるとCASの有無両方でミエリン鞘の空胞化(*)は生じ、軸索への圧迫所見(**)を認めるが、CASの有無で比較するとCAS有が少ない様子が観察される。ミエリン鞘(#) 軸索(##) ミトコンドリア(###)

② 凍結・解凍速度の設定について

CAS下に図1bの温度設定とし、緩徐速度(0.5℃/分)7と機械の最大速度で凍結解凍を行った。その結果、緩徐速度でのHE染色では神経線維同士の間隙、ミエリン鞘の空胞化を認め(図3a)、細胞生存は神経細胞培養において軽度認めていた(図3b)。最大速度での凍結解凍は、HE染色において神経線維同士の間隙が軽度となり、ミエリン鞘の空胞化も明らかに減少していた(図4a)。電顕像においても同様にミエリン鞘の空胞化は緩徐速度と比べ減少していた(図4b)。神経細胞培養においても細胞生存は増加しており(図4c)、凍結解凍速度は最大速度が有効と考えられた。

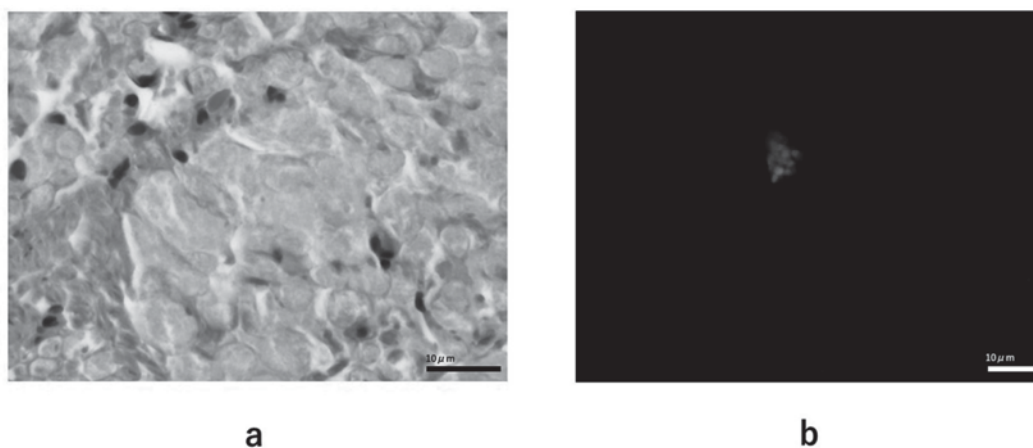


図3. a HE染色画像。神経線維同士の間隙は軽度認めるが、細胞質の染色は良く空胞化は少ない。 b 神経細胞培養。細胞生存を軽度認める。

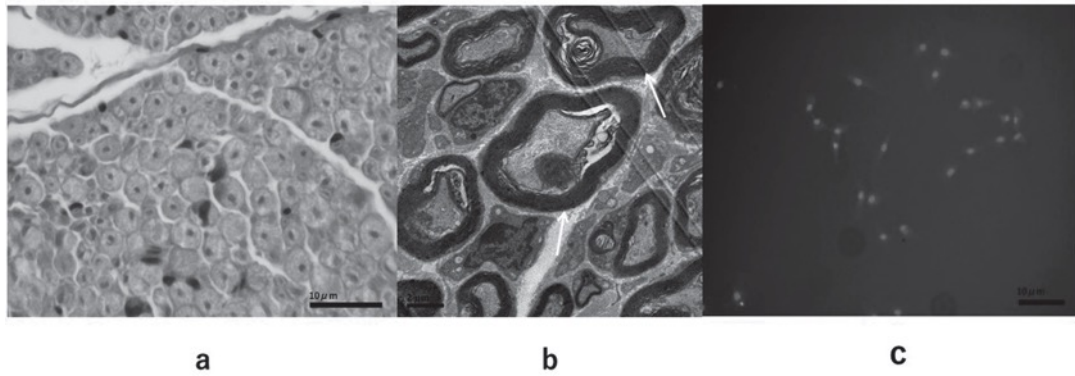


図4. a HE 染色画像。神経線維同士の間隙は軽度認めるが、ミエリン鞘の空胞化が少ない。
b 電顕像。ミエリン鞘 (矢印) やミトコンドリアの空胞化は減少している。
c 神経細胞培養。細胞生存を多く認める。

③ 解凍方法 (自然解凍・37°C恒温槽解凍・CAS 解凍) について

解凍時の再氷晶形成を考慮に入れ、図1bの温度設定、機械の最大速度で凍結を行い、解凍方法は自然解凍と37°C恒温槽、CAS解凍として比較した。電顕像において、自然解凍、37°C恒温槽解凍共にミエリン鞘の空胞化、軸索の狭小化が顕著に認め (図5a, b)、細胞生存が悪いことが容易に想像できた。その一方でCAS解凍では、電顕像においてミエリン鞘の空胞化は減少し (図4b)、明らかに細胞生存の増加を認めていた (図4c)。解凍方法は、CAS解凍が再氷晶形成を抑制し有効と考えられた。) 予備冷却の設定の有無について氷晶形成帯前後に予備冷却の設定を行わずに最大速度でCAS凍結解凍を行った (図1c)。HE染色において神経線維同士の間隙は少ないが電顕像含めミエリン鞘の空胞化を認めていた (図6a, b)。神経細胞培養でも細胞生存は軽度認めていた (図6c)。次に予備冷却を設定した温度設定 (図1b) で、凍結解凍速度を機械の最大速度とし行った。その結果、HE染色において神経線維同士の間隙は軽度となり、ミエリン鞘の空胞化は明らかに減少していた (図4a)。電顕像においても同様にミエリン鞘の空胞化は減少しており (図4b)、細胞生存は明らかに増加していた (図4c)。氷晶形成帯前後に予備冷却を設定が氷晶形成を抑制し、有効と考えられた。以上の結果より凍結解凍は、CASによる磁場付加下に機械の最大速度で凍結し、さらに氷晶形成帯前後に予備冷却を設定する事によって viability が向上し、本研究の最適な凍結解凍プログラムと考えられた。

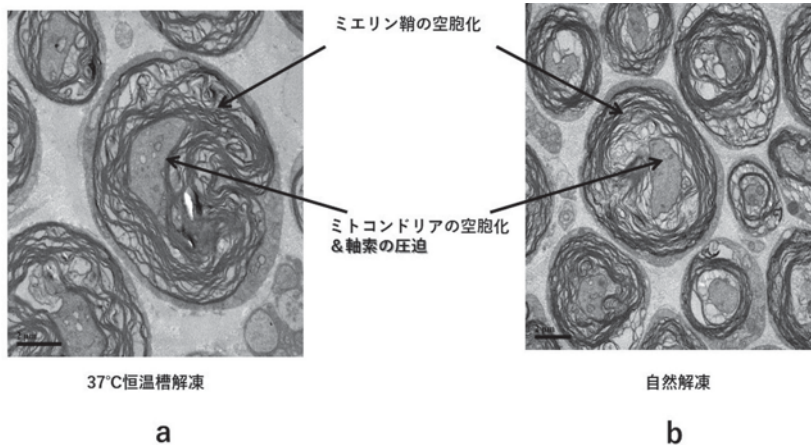


図5. 電顕像では37°C恒温槽解凍、自然解凍共にミエリン鞘やミトコンドリアの空胞化を多く認める。

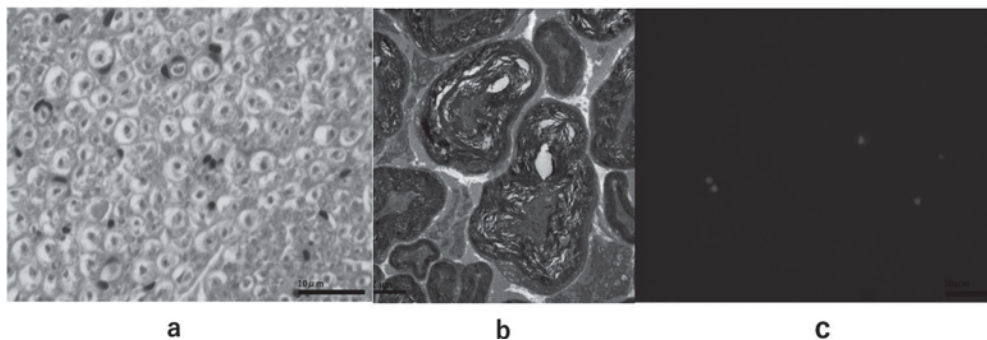


図6. a HE 染色画像。神経線維同士の間隙は少ないがミエリン鞘の空胞化は多い。
b 電顕像。ミエリン鞘の空胞化を認める。
c 神経細胞培養。細胞生存を認める。

(2) 機能的シナプスマーカーの検討

吸入麻酔による全身麻酔下に雄の Wistar 系ラット（8～9 週齢体重 250～300 g）の脳皮質又は小脳を採取し、凍結保護液（セルバンカー®、ZENOAQ、福島県郡山市、日本）に浸漬後凍結実験を行った。上記条件から最も保存が良い条件を用いて急速凍結後、 -20°C にてアルコール系列で脱水、K4M 樹脂に置換し、紫外線重合装置を用いて7日間で重合した。

室温に戻した後、100nm 厚の薄切切片を作製し、各シナプスマーカーや最初期発現遺伝子を用いて染色後、電子顕微鏡による解析を行った。

図7、8にその一例を示す。

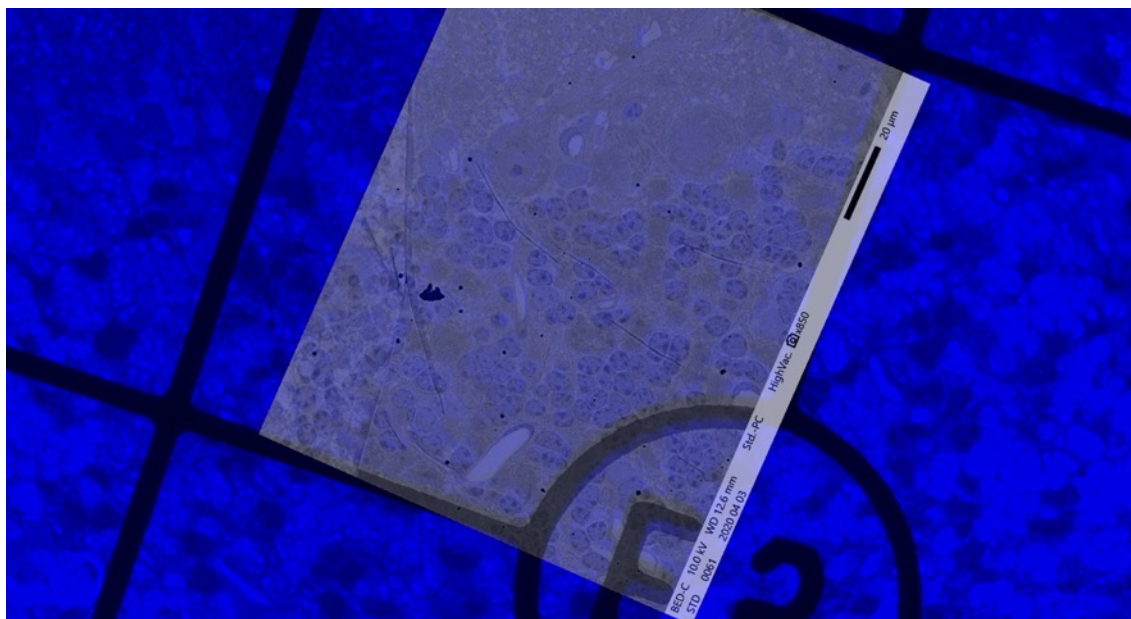


図7. 小脳の免疫染色と電子顕微鏡像の結合図（弱拡大像）青が最初期発現遺伝子の1つ c-Fos 陽性細胞核

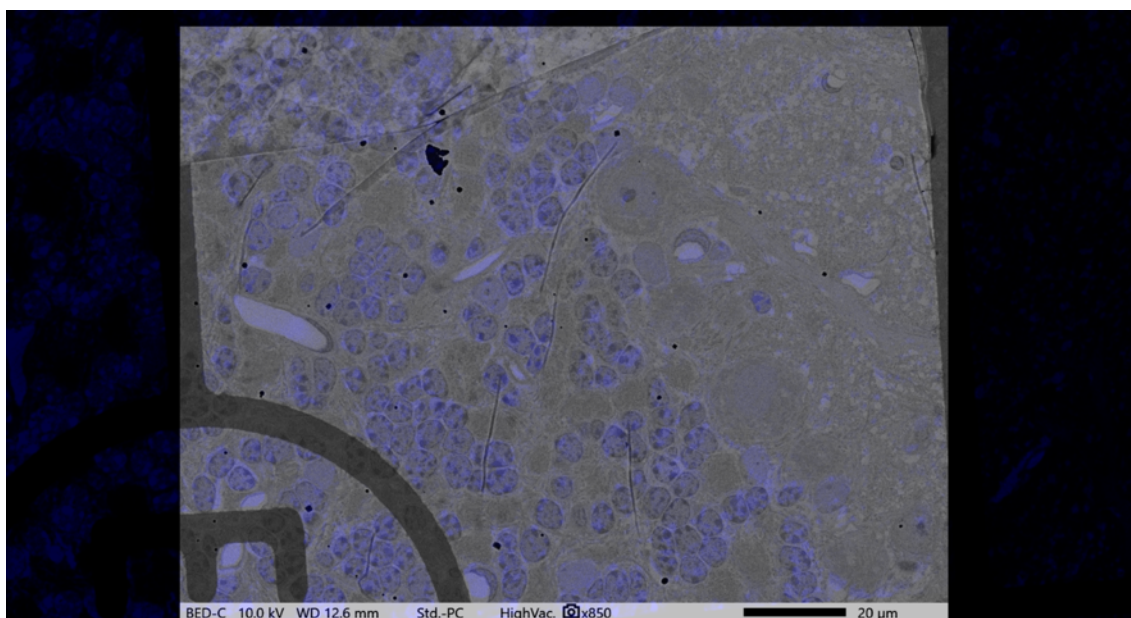


図8. 小脳の免疫染色と電子顕微鏡像の結合図（強拡大像）青が最初期発現遺伝子の1つ c-Fos 陽性細胞核

神経刺激後、プルキンエ細胞には刺激が伝わらず、顆粒層の細胞にのみ刺激誘発が可能となる条件が可能となり、その動態を微細形態解析法を用いて明らかにすることが可能となった。

しかしながら、現在までの解析においては機能的シナプスのマーカーとして電子顕微鏡法をもちいて解析可能な有用なものが見つかっておらず、今後、この方法のさらなる確立とともに、最善のマーカーの探索が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13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 Hashimoto T, Kazufumi S, Satoru O, Nakadage K.	4. 巻 21(1)
2. 論文標題 Effect of the Cell Alive System on Nerve Tissue Cryopreservation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Tissue Bank	6. 最初と最後の頁 139-149.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10561-019-09807-1.	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 Sano K, Nakadate K, Hanada K.	4. 巻 20(1)
2. 論文標題 Minocycline Prevents and Repairs the Skin Disorder Associated With Afatinib, One of the Epidermal Growth Factor Receptor-Tyrosine Kinase Inhibitors for Non-Small Cell Lung Cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 279
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12885-020-06797-2	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 Ogawa C, Inoue M, Yatabe M, Nagayama Y, Gomi H, Nakadate K, Adachi S, Yachi Y, Itoh T.	4. 巻 112
2. 論文標題 Analysis of Inline-Filter Blockage With Trastuzumab Formulation Using Scanning-Electron Microscopy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biomed Pharmacother	6. 最初と最後の頁 108711
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biopha.2019.108711	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 Tanaka H, Ehara A, Nakadate K, Yoshimoto K, Shimoda K, Ueda S.	4. 巻 199
2. 論文標題 Behavioral, Hormonal, and Neurochemical Outcomes of Neonatal Repeated Shaking Brain Injury in Male Adult Rats	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Physiol Behav	6. 最初と最後の頁 118-126
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.physbeh.2018.11.025	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 Nakadate K, Hirakawa T, Tanaka-Nakadate S.	4. 巻 44(6)
2. 論文標題 Small Intestine Barrier Function Failure Induces Systemic Inflammation in Monosodium Glutamate-Induced Chronically Obese Mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Appl Physiol Nutr Metab	6. 最初と最後の頁 587-594
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1139/apnm-2018-0560	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 Matsuda W, Ehara A, Nakadate K, Yoshimoto K, Ueda S.	4. 巻 58(1)
2. 論文標題 Effects of environmental enrichment on the activity of the amygdala in micrencephalic rats exposed to a novel open field.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Congenit Anom	6. 最初と最後の頁 16-23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cga.12228	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 Ehara A, Maekawa M, Hori Y, Nakadate K, Ueda S.	4. 巻 93(3)
2. 論文標題 Age-related behavioral, morphological and physiological changes in the hippocampus of zitter rats.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Anat Sci Int	6. 最初と最後の頁 332-339
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12565-017-0416-8	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 Akiyama H, Nakadate K, Sakakibara SI.	4. 巻 526(6)
2. 論文標題 Synaptic localization of the SUMOylation-regulating protease SENP5 in the adult mouse brain.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Comp Neurol	6. 最初と最後の頁 990-1005
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cne.24384	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 Yamaguchi T, Ehara A, Nakadate K, Ueda S.	4. 巻 90
2. 論文標題 Tyrosine hydroxylase afferents to the interstitial nucleus of the posterior limb of the anterior commissure are neurochemically distinct from those projecting to neighboring nuclei.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Chem Neuroanat	6. 最初と最後の頁 98-107
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jchemneu.2017.12.010	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 Ehara A, Nakadate K, Sugimoto H, Yoshimoto K, Ueda S.	4. 巻 78
2. 論文標題 Role of neuronal nitric oxide synthase in slowly progressive dopaminergic neurodegeneration in the Zitter rat.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nitric Oxide	6. 最初と最後の頁 41-50
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.niox.2018.05.007	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 Itoh M, Nakadate K, Matsusaka T, Hunziker W, Sugimoto H.	4. 巻 23(7)
2. 論文標題 Effects of the differential expression of ZO-1 and ZO-2 on podocyte structure and function.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genes Cells	6. 最初と最後の頁 546-556
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12598	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 Nakadate K, Hirakawa T, Tanaka-Nakadate S.	4. 巻 21
2. 論文標題 Small intestine barrier function failure induces systemic inflammation in monosodium glutamate-induced chronically obese mice.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Appl Physiol Nutr Metab	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1139/apnm-2018-0560	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 Hattori K, Nakadate K, Morii A, Noguchi T, Ogasawara Y, Ishii K	4. 巻 492(2)
2. 論文標題 Exposure to nano-size titanium dioxide causes oxidative damages in human mesothelial cells: The crystal form rather than size of particle contributes to cytotoxicity.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 218-223
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2017.08.054	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9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 川又安史, 中館和彦, 上田秀一
2. 発表標題 ラット小脳におけるAttractinの分布およびZitterラット小脳の発達・加齢に伴う形態学的変化
3. 学会等名 日本組織細胞化学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 上田秀一, 江原鮎香, 大桃秀樹, 中館和彦, 榊原伸一
2. 発表標題 選択的神経毒の新生仔髄液内投与における再生セロトニン線維の特性
3. 学会等名 日本組織細胞化学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 上原咲子, 河原千容, 佐藤陽香, 増山美咲, 佐野和美, 中館和彦, 池上洋二, 佐野和彦
2. 発表標題 マウスにおけるafatinibの経口投与により生じる皮膚障害に対するminocyclineの効果
3. 学会等名 日本薬学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長山佳之, 小川千晶, 井上元基, 矢田部恵, 中館和彦, 足立茂, 松井哲, 伊藤智夫, 谷地豊
2. 発表標題 Trastuzumab投与におけるフィルター閉塞に関する一考察
3. 学会等名 日本臨床腫瘍薬学会学術大会2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田口大輔, 江原鮎香, 中館和彦, 上田秀一
2. 発表標題 下肢骨格筋におけるアトラクチンの機能解析
3. 学会等名 日本解剖学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 江原鮎香, 前川正夫, 堀雄一, 中館和彦, 上田秀一
2. 発表標題 Zitter ラットにおける痙攣発作と歯状回形態変化との因果関係
3. 学会等名 日本解剖学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 橋本 智久, 佐野 和史, 大関 覚, 中館 和彦
2. 発表標題 Cells alive system (CAS) による神経凍結保存の組織学検討
3. 学会等名 第28回日本末梢神経学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Etsuko Yoshimura, Yuko Chida, Kenji Hattori, Kazuhiko Nakadate, Yuki Ogasawara, Kazuyuki Ishii
2. 発表標題 The difference of absorption rate of crystal form of titanium dioxide nanoparticle can elucidate the difference of cytotoxicity between anatase and rutile form
3. 学会等名 衛生薬学・環境トキシコロジー フォーラム2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 秋山 博紀, 中館 和彦, 榊原 伸一
2. 発表標題 脱SUMO化酵素SEN5の新規アイソフォームの機能解析
3. 学会等名 第40回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2017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