

令和 2 年 5 月 15 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09377

研究課題名(和文) 次世代3D電顕を用いた腸管グリア細胞の神経制御および運動制御機構の形態学的解析

研究課題名(英文) The morphological analysis of the enteric nervous system and regulation mechanisms for gut motilities with the three-dimensional microscopy

研究代表者

玉田 宏美 (Tamada, Hiromi)

名古屋大学・医学系研究科・助教

研究者番号：60712817

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)：本研究課題では、新たな電子顕微鏡技術である集束イオンビーム走査型電子顕微鏡 Focused Ion Beam / Scanning Electron Microscopy (FIB/SEM)を用いて、消化管の腸管神経系の神経ネットワーク、またその調整役として重要であるグリア細胞とのインタラクションを明らかにすることを目的とした。従来の形態学的解析では、微細構造レベルでの立体構造の理解は困難であったが、本研究により、筋層間神経叢の神経節の微細立体像を得ることができた。特に細かな突起を多く持つグリア細胞の詳細な形態や、それらとインタラクションを持つ神経線維の形態の詳細を理解することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で研究対象としている腸管神経系は、脳や他の神経系と比べると比較的研究が進んでいない分野ではあるが、消化管の機能異常は人々の日常生活に身近な不調である。その制御機構は複雑であり、従来の研究法だけでは限界があるが、本研究課題で用いている新たな電子顕微鏡技術により、あらゆる機能理解のベースとなるべく、新たな形態学的基礎データを得ることができ、これまでの課題の解決の大幅な加速が期待される。

研究成果の概要(英文)： In this study, the morphological analysis for the enteric nervous system (ENS) was performed with a new electron microscopic analysis, a focused ion beam / scanning electron microscopy (FIB/SEM). With the FIB/SEM, we can obtain big volume and three-dimensional ultrastructural images. Especially, we focused on complicated structures of synaptic structures and their interactions with enteric glial cells surrounding them. This strategy made it possible to accelerate the understanding of basic morphological findings in order to explain a complicated system for controlling gut functions. Furthermore, high-pressure cryo fixations were performed in order to keep more native tissue structures, comparing with the normal chemical fixations. It could be a critical point how the native structures could be maintained during quantitative analyses with FIB/SEM data.

研究分野：細胞組織学

キーワード：腸管神経系 微細構造 集束イオンビーム走査型電子顕微鏡 FIB/SEM

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

消化管の運動制御は、第三の自律神経系である腸管神経系 (Enteric Nervous System) による支配を大きく受ける。腸管神経系は、知覚ニューロン・介在ニューロン・運動ニューロンを腸壁の神経節内に備えており、独自の神経ネットワークを構成している。神経節内にはおびただしい数の神経節細胞と神経線維、さらに腸管グリア細胞 (Enteric glial cells) も存在しており、その数は神経節細胞のそれを大きく超えている。この腸管グリア細胞は、神経支配の複雑な調節にも関わっていることがカルシウムイメージング法や免疫組織化学的手法により示唆されているが、これまでの所不明な点が多く残されている。これは、これまでの研究手法が間接的なものであり、機能説明に至る直接的な形態学的所見が未だ得られていないからではないかと考えられた。

2. 研究の目的

そこで本研究では、近年の新しい電子顕微鏡技術である集束イオンビーム走査型電子顕微鏡 Focused Ion Beam / Scanning Electron Microscopy (FIB/SEM) を用い、腸管神経系の神経ネットワークの詳細、特に腸管グリア細胞 (EGC) について、新たな形態所見を得るべく、技術の確立と形態解析を行うことを目的とした。従来の形態学的解析の主たる手法である光学顕微鏡観察では、特にグリア細胞の突起といったような微細、かつ広範囲に渡る構造の全体像を理解するには限界があり、一方で微細構造を理解することができる従来の電子顕微鏡では、限局された狭い一断面の形態情報しか得られないというデメリットがあった。しかしながら、FIB/SEM を用いることで、ある一定 Volume の X, Y, Z 軸方向の電子顕微鏡像を連続的に得ることができ、広範囲の立体微細構造を理解することが可能である (Fig.1)。

特に FIB/SEM の特性を生かし、従来の電子顕微鏡解析ではほとんど意味をなさなかった定量解析も可能であると考えられる。一定量の立体像を得た後に定量解析への展開を想定した場合、従来以上により生体に近い状態の維持が重要であるが、これまでの強いアルデヒドを用いた化学固定では、本来の形が失われているという問題がある。そこで、より Native に近い形態の維持が期待できる高圧凍結 Cryo-fixation 法の検討を目的とし、本研究課題を基課題とし、科研費 (国際共同研究加速基金 (国際共同研究強化 (A))) の研究課題をさらに立ち上げた。

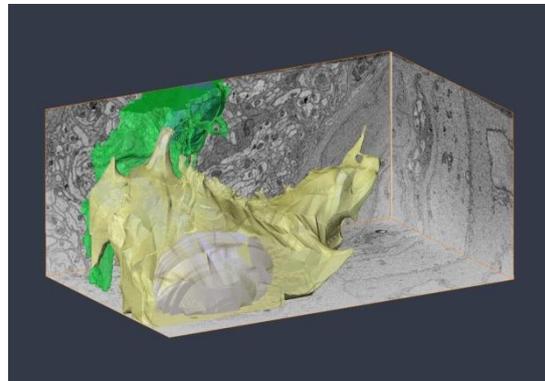


Fig.1 FIB/SEM により得られる腸管神経節の X,Y,Z 面電子顕微鏡像の例

神経細胞、グリア細胞の一部を立体再構築している。

3. 研究の方法

(1) 化学固定法による FIB/SEM サンプルの作製

マウスの小腸を摘出し、内腔を切り開き、シリコンシャーレ上に針で固定した。パラホルムアルデヒドとグルタルアルデヒドの混合液で前固定を行い、適当なサイズにトリミング後、四酸化オスミウム、チオカルボを用いた rOTO 法、酢酸ウラン、鉛による電子染色を組織の状態ですらした。脱水後にエポキシ樹脂包埋し、サンプルとした。

(2) FIB/SEM による解析

準薄切片を作製し、トルイジンブルーで染色後、対象となる神経節 (今回は筋層間神経叢の神経節に注目した) を同定後、グリア細胞の一部を含む部分に注目し、FIB/SEM にて観察を行い、連続電顕像を取得した。

(3) 画像解析ソフト Amira による立体再構築

取得した連続電顕像を画像解析ソフト Amira に取り込み、観察対象を Segmentation (区画化) し、立体再構築した (Fig.2)。

(4) 高圧凍結 Cryo-fixation の検討

マウスの組織をなるべく迅速に摘出し高圧凍結装置にて高圧凍結後、凍結置換法により電子染色と樹脂包埋まで行った。同様に電子顕微鏡観察を行い、従来の化学固定法の所見と比較検討した (本研究は国際共同研究加速基金 (国際共同研究強化 (A)) として行った)。

4. 研究成果

マウス小腸筋層間神経節において、腸管グリア細胞の同定は細胞質の特徴から可能である。グリア細胞の一部が含まれており、かつシナプス小胞が同定できる部分を指標とし、シナプス小胞を含む膨大部の三次元化を行い、さらにその近傍に分布する全ての要素を立体再構築した。

その結果、一本の神経線維内にシナプス小胞を含む膨大部が複数存在する典型的な Varicosity 様構造が観察できた。さらに、その周辺には近傍を通過する神経線維が複数存在し、突起を多く持つびつな形態をした腸管グリア細胞の立体再構築像を得ることができた。特に、シナプス結合の Pre と Post 部分を包み込むように突起を伸ばす、比較的突起が少ない、典型的な腸管グリア細胞とは異なる形態を示す細胞の存在が確認できた。神経線維様の構造ではないため、グリア細胞である可能性が考えられ、これまでに報告されてきた腸管グリア細胞とは異なる、特に機能的にも特化した新たなサブタイプである可能性が示唆された。

高圧凍結 Cryo-fixation と従来の化学固定法との比較には、まずマウスの大脳皮質を用いて検討を行った。その結果、化学固定では大きく消失してしまう細胞外間隙 Extracellular space が Cryo-fixation では維持されており、特にスパインの形態に注目した所、スパインネックの径に二者間で有意な差が見られ、Cryo-fixation を用いた方が、極めて細いスパインネックの形態が維持されていることが示唆された。このことは、スパインネックの部分を電気抵抗の場として捉えた際、シナプス後膜の機能理解に大きく影響するもので、Cryo-fixation を用いた方がより Native な構造、実測値を得るために適していると考えられた。

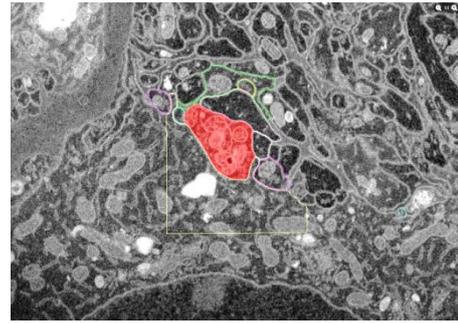


Fig.2 画像解析ソフトにおける Segmentation 画像

赤く塗りつぶした部分がシナプス小胞を含む部分。多数の周辺に存在する要素をそれぞれ色分けし区画化している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 玉田 宏美、木山 博資
2. 発表標題 腸管神経系におけるシナプス結合 腸管グリア細胞間 インタラクシヨンの三次元微細構造解析
3. 学会等名 第79回解剖学会中部支部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 玉田 宏美, Carl CH Petersen, Graham W Knott
2. 発表標題 Cryo固定マウス大脳皮質スパインネックの三次元解析
3. 学会等名 日本顕微鏡学会 第75回学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 玉田 宏美
2. 発表標題 Three-dimensional electron microscopy analysis of spine neck morphology with cryo-fixed mouse cortex
3. 学会等名 第11回名古屋グローバルリトリート
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 玉田 宏美
2. 発表標題 SSSEM法を用いた立体微細構造の解析
3. 学会等名 第59回日本平滑筋学会総会（招待講演）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

BioRxivに掲載
"Ultrastructural comparison of dendritic spine morphology preserved with cryo and chemical fixation"
Hiromi Tamada, Jerome Blanc, Natalya Korogod, Carl CH Petersen, VGraham W Knott
doi: <https://doi.org/10.1101/2020.03.02.972695>

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
--	---------------------------	-----------------------	----