

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：13901

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2018～2020

課題番号：17KK0191

研究課題名（和文）Cryo-fixationによる腸管グリア細胞の3D微細構造解析

研究課題名（英文）Three-dimensional ultrastructural analysis of enteric glial cells with Cryo-fixation

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） 4,600,000円

渡航期間： 6ヶ月

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、腸管グリア細胞の三次元微細構造の理解を目指した基課題において、新たな固定法を検討するために国際共同研究を計画した。その結果、従来のアルデヒド固定と急速高圧凍結固定Cryo-fixationを施したマウス大脳皮質の三次元微細構造の比較において、細胞間スペースがCryo-fixationでは維持される他、特に細い構造であるスパインネックの径に二者間で大きな差があることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新しい電子顕微鏡技術の発展に伴い、これまでは不可能であった電子顕微鏡像による定量的評価が可能となった。そのような中、従来の電顕用組織固定法である強いアルデヒドを用いた化学固定では、細胞膜の構造は明瞭に維持されるものの、細胞や組織本来の形態が消失する可能性が特に強く危惧される。本研究で検討した化学固定液を用いない急速高圧凍結固定法Cryo-fixationは、細胞や組織のより本来の姿に近い形態を維持するものと考えられ、今後のあらゆる生理機能の根幹をなす形態解析において重要な成果である。

研究成果の概要（英文）：In this study in order to understand the native ultrastructure of enteric glial cells with novel three-dimensional electron microscopy, such as the Focused ion beam / Scanning electron microscopy (FIB/SEM), a snap freezing method of liquid nitrogen jets, combined with very high pressures (cryo-fixation), was analyzed. At first, with using the mouse cortex tissues, the difference among the cryo-fixation and conventional chemical-fixations was confirmed. As a result, dendritic spines showed significantly thinner necks with cryo-fixation. This work highlights the usefulness of cryo-fixation for obtaining a more native and detailed view of the architecture of cells and tissues.

研究分野：細胞組織学

キーワード：電子顕微鏡 Cryo-fixation 急速高圧固定 スパイン グリア細胞

1. 研究開始当初の背景

腸管神経系は、独自の神経ネットワークをもつ第三の自律神経系である。Motor neurons, interneurons, sensory neurons を兼ね備える他、腸管グリア細胞と線維芽細胞やカハールの介在細胞と呼ばれる種々の細胞が統合的にその機能を制御している。その複雑な制御機構については、未だ十分に理解されていない部分も多い。

近年、新しい電子顕微鏡技術として、FIB/SEM などの連続断面像三次元解析法が発展してきている。これは、ある一定ボリュームの構造の電顕像を取得することができる技術であり、これまでの局限された厚みや領域しか観察できない電顕解析の弱点を解決し、構造全体像の理解と定量解析を可能にするものである。この技術を用いることにより、コネクトミクスと呼ばれる、主に中枢の神経回路の形態を遍く明らかにしようとする研究領域が進んでいる。腸管神経系でのコネクトミクス解析はこれまでに存在しないが、制御機構の本質理解につながりうるものと考え、腸管神経系での FIB/SEM 解析を目指した。

そのような中、従来の電顕標本作製時における化学固定法 Chemical-fixation では、膜構造は極めて良好に維持される一方で、強いアルデヒドにより、細胞や組織の本来の姿が消失するのではないかという点が時として議論にあがっていた。特に、前述した新しい三次元電顕解析によって可能になった定量解析を展開するにあたり、より本来の姿に近い全体像の理解が重視されると考えられる。

2. 研究の目的

そこで本研究では、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。とくに、腸管神経系ネットワークのより Native な微細構造の観察から、定量解析も含めた形態解析を目指すため、従来の化学固定法を用いない急速高圧凍結固定法 Cryo-fixation を検討することを目的とした。これまでの固定法とそれに基づく形態学的理解との比較検討を可能とするため、まずは観察対象として、既に比較的十分に研究が進んでいるマウス大脳皮質を材料とした。

従来の電顕固定は、パラフォルムアルデヒドとグルタルアルデヒドの混合液によって化学的に組織を固定する。一方で Cryo-fixation では、これらのアルデヒドを用いることなく、速やかに高圧で液体窒素を組織に噴射することにより、組織構造を維持しようとするものである。これらの固定法を施した後、三次元電顕解析に進め、定量解析を行うことで、これら二者間に差が見られるか、またそこから考えられる影響を考察する。このことは、生理機能理解をはじめとしたあらゆる研究の根底をなすともいえる形態解析において、極めて重要なステップとなり得ると考えられる。

3. 研究の方法

(1) 電子顕微鏡標本の作製

マウス小腸および大脳皮質を材料とした。従来の化学固定法 Chemical-fixation として、グルタルアルデヒドとパラフォルムアルデヒドの混合液を灌流後、組織を摘出し、オスミウム、酢酸ウラン、鉛による処理、脱水処理と樹脂包埋といった一般的な行程によりサンプルとした。急速高圧凍結固定法 Cryo-fixation では、マウス安楽死直後にすばやく大脳皮質のサンプルを実体顕微鏡下で摘出し、高圧凍結装置 (HPM100; Leica Microsystems) を用いて、液体窒素で瞬間的に組織を固定した (マウス安楽死後 90 秒以内に完了することが望まれる)。その後、凍結置換システム (EM AFS2; Leica Microsystems) によって徐々に温度を上昇させながら、オスミウム、酢酸ウラン、鉛、脱水処理を行い、樹脂に包埋した。

(2) 電子顕微鏡解析

上記のそれぞれの手法により作製した電顕標本を用い、①透過型電子顕微鏡 Transmission Electron Microscopy: TEM による連続超薄切片観察と②集束イオンビーム走査型電子顕微鏡 Focused Ion Beam / Scanning Electron Microscopy: FIB/SEM を用いた解析を行った。

① TEM による連続超薄切片観察

ウルトラミクロトームを用い 50nm の超薄切片を連続的に作製し、グリッドに回収していく。その連続切片の同一の観察領域を一枚ずつ連続的に TEM (Tecnai Spirit, FEI Company with Eagle CCD camera) で撮像した。

② FIB/SEM による解析

FIB/SEM では微細な切削加工が可能なガリウムイオンビームを用い、観察領域を数 nm おきに切削、新しく切削された面の SEM での撮像を連続的に繰り返すことにより、ある一定ボリューム

ムの連続電顕像を得ることができる。本研究では Scios (FEI) あるいは 3 View (Zeiss) を用いた。

(3) 立体再構築および定量評価

(2) で取得された連続電顕像から関心領域を決定後、Amira あるいは Trak EM(ImageJ)により区画化 (セグメンテーション)、立体再構築像を得た。その後、得られた立体像の体積や面積、長さなどを NeuroMorph (<https://neuromorph.epfl.ch/about/>) により定量評価した。

(4) 免疫組織化学的染色

細胞の種類を同定するため、マウス小腸を Zamboni 固定液で固定後、免疫組織化学的染色を施し、蛍光顕微鏡にて観察した。

4. 研究成果

(1) マウス小腸筋層間神経節の三次元微細構造

通常のアルデヒドを用いた化学固定を施したマウス小腸筋層間神経節において、シナプス小胞を含む神経膨大部およびその近傍に分布する全ての要素を立体再構築した (Figure 1)。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、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する他、突起を多く持つ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細胞の存在も確認できた。これまでに報告されてきた腸管グリア細胞とは異なる、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。

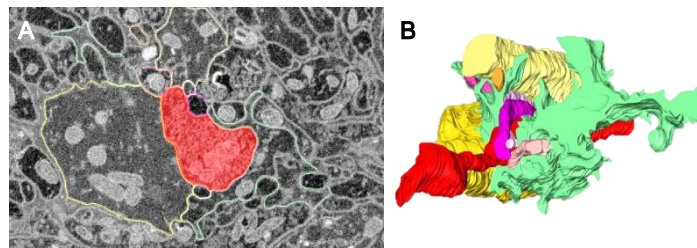


Figure 1 マウス小腸筋層間神経節内の神経線維およびその周辺の構成要素の立体三次元像 (A)得られた連続電顕像の Segmentation

画面。赤く塗りつぶされた部分がシナプス小胞を含む神経膨大部。(B) 左図に対応する色で表示した各要素の三次元像。複数の校正要素が神経膨大を取り囲むように位置していることが示されている。

このように、腸管神経節内の各要素の間には一切のスペースを含まず、互いに密にコンタクトし、取り囲むような三次元像が得られた。

(2) 消化管マクロファージの形態学的特徴

通常、グリア細胞は中枢でのマクロファージと称されるため、まだ報告がほとんどなされていない腸間膜のマクロファージについても、免疫組織化学的手法により解析した結果、CD206 などの典型的なマクロファージマーカーを発現する多極性の細胞が、膜全体に分布することがわかった。

(3) Cryo-fixation によるマウス大脳皮質における細胞間隙(Extracellular space: ECS)の維持

前述のように従来の Chemical-fixation では神経組織の各細胞は密に接しあい、お互いの細胞膜は他方の細胞膜におされるような変形が見られ、細胞間にスペースは見られないのが通常であり、マウス大脳皮質の組織においても同様であった (Figure 2 A,B)。しかしながら、Chemical-fixation により、細胞間隙のスペースが保たれ、細胞膜のいびつな変形も見られなかった (Figure 2 D,E)。

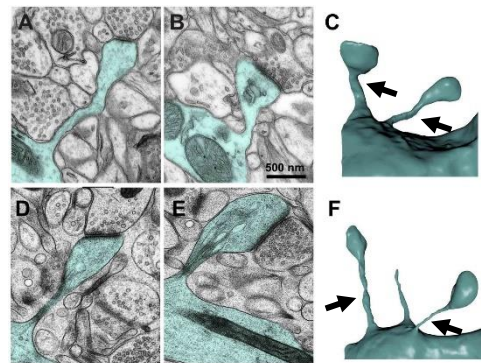


Figure 2 Chemicalおよび Cryo-fixation 後のマウス大脳皮質スパインの立体三次元像

(A,B)Chemical-fixation 後の EM 像。緑がスパイン部分。周辺要素との間にほとんど間隙がない。(C) (A,B) の立体再構築像

(D, E)Cryo-fixation 後の EM 像。各要素の間にスペースが存在する。(F) (D, E)の立体再構築像。スパインネック(矢印)が(C)のものとは比べて極めて細い。(Tamada et al 2020 eLife より一部改変)

(4) Chemical-fixation によるスパインネック径の維持

スパインを立体再構築したところ、スパインネックの部分が Cryo-fixation の標本において、Chemical-fixation のそれよりも極度に細いことが示された (Figure 2 C, F, 3 A; スパインネック径: Cryo fixation $0.770 \pm 0.057 \mu\text{m}$, Chemical fixation $0.107 \pm 0.037 \mu\text{m}$; unpaired Kolmogorov-Smirnov

test, $p < 0.0001$)。一方でスパインヘッドやネックの長さなどについては、Cryo-fixation と Chemical-fixation の間に有意差は見られなかった。

(5) スパインヘッドの体積とスパインネック径間の Correlation

これまでも、Chemical-fixation によって得られた連続電顕像から、スパインを定量評価し、スパインネック径とヘッドの体積間など、各パラメータ間で相関が見られるという報告が少なからず存在していた。しかしながら、本研究では、Cryo-fixation では同様の傾向は見られないことを示した (Figure 3B; cryo fixed; $r = 0.145$, $p = 0.121$; chemically fixed; $r = 0.358$, $p < 0.0001$, Spearman)。

(6) 定量値から算出されたスパインヘッドの抵抗値

定量評価で得られたパラメータを用いて、オームの法則にあてはめてスパインネックの抵抗値を検討した。その結果 Cryo-fixation によって得られた抵抗値は、Chemical-fixation で得られるそれらの値よりも大きく、ばらつきも大きかった (Figure 3C)。このことから、Chemical-fixation によって得られたサンプルで評価される抵抗値は、実際よりも過小評価されている可能性が示唆された (cryo-fixed cortex ; $109.7 \pm 113.4 \text{ M}\Omega$; chemically fixed cortex ; $44.1 \pm 37.8 \text{ M}\Omega$)。

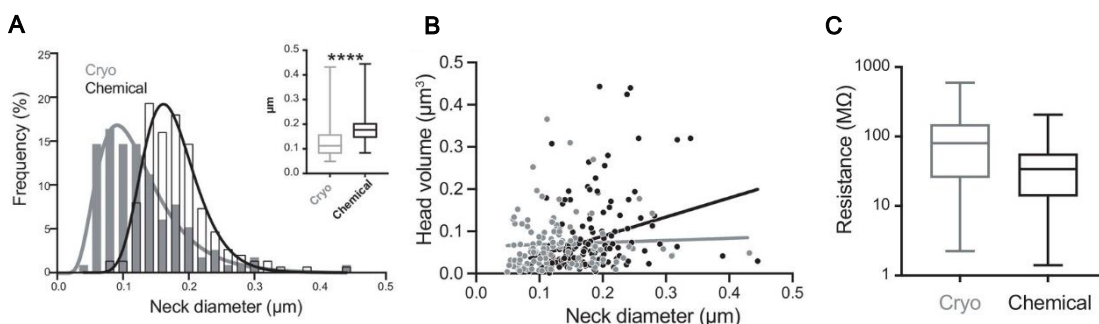


Figure 3 スパインの立体再構築像の定量評価 (A)Cryo-fixation および Chemical-fixation によるスパインネック径の比較。Cryo-fixation では、Chemical-fixation と比べスパインネックの径が細いスパインの割合が多く、またそれぞれの平均は Cryo-fixation で小さい値をとることを示している。(B) スパインネック径とスパインヘッド体積との相関の検討。Chemical-Fixation(黒色ライン)ではネック径とヘッド体積には相関が見られるが、Cryo-fixation (灰色ライン) ではほとんど相関がないことが示されている。(C) 得られた計測値をオームの法則($R = \rho \times \text{spine neck length} / \text{spine neck cross-sectional area}$, with a resistivity constant $\rho = 109 \text{ }\Omega \text{ cm}$, Cartiailler et al., 2018 Neuron)に基づいて導き出したスパインの抵抗値。Cryo-fixation の方が大きい抵抗値が導き出された。(Tamada et al 2020 eLife より一部改変)

(7) FIB/SEM による神経細胞とグリア細胞とのインタラクションの解析

FIB/SEM を用い、さらに神経細胞、特に運動神経の軸索起始部とその周辺のグリア細胞 (ミクログリア) や、さらにミトコンドリアとのインタラクションについても注目し、損傷時に特徴的なインタラクションを示すことが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tamada H, Blanc J, Korogod N, Petersen CC, Knott GW.	4. 巻 9
2. 論文標題 Ultrastructural comparison of dendritic spine morphology preserved with cryo and chemical fixation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Elife	6. 最初と最後の頁 e56384
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.56384	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Konishi H, Okamoto T, Hara Y, Komine O, Tamada H, Maeda M, Osako F, Kobayashi M, Nishiyama A, Kataoka Y, Takai T, Udagawa N, Jung S, Ozato K, Tamura T, Tsuda M, Yamanaka K, Ogi T, Sato K, Kiyama H.	4. 巻 39(22)
2. 論文標題 Astrocytic phagocytosis is a compensatory mechanism for microglial dysfunction.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 EMBO J	6. 最初と最後の頁 e104464
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embj.2020104464	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 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

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ライスの三次元解析
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, 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 インタラクシオ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、木山 博資
2. 発表標題 小腸腸間膜マクロファージの急性損傷への応答
3. 学会等名 第73回日本自律神経学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 玉田 宏美、木山 博資
2. 発表標題 損傷運動神経軸索起始部におけるミトコンドリア局在とミクログリア活性化の相関
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会 第98回日本生理学会大会 合同大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>名古屋大学プレスリリース https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical_J/research/pdf/e_Li_201204.pdf EPFL News https://actu.epfl.ch/news/snap-freezing-reveals-a-truer-structure-of-brain-c/ BioRxiv掲載 https://doi.org/10.1101/2020.03.02.972695</p>
--

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
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	ピーターソン カール (Petersen Carl)	スイス連邦工科大学ローザンヌ校・School of Life Sciences・Professor	
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	ノット グラハム (Knott Graham)	スイス連邦工科大学ローザンヌ校・School of Life Sciences・Professor	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
スイス	Ecole Polytechnique Federale de Lausanne		