

機関番号：17102

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791690

研究課題名 (和文) 新世代透過型電子顕微鏡電子線トモグラフィー法による3次元再構成高分解能観察法

研究課題名 (英文) Three dimensional reconstruction of electronmicroscopic images by New electron microscopic tomography

研究代表者

久富 智朗 (HISATOMI TOSHIO)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：50404033

研究成果の概要 (和文)：

電子顕微鏡試料作成に適した免疫組織学的染色法の確立と H-7650 を用いた電子線トモグラフィー、自動傾斜取込み条件設定、安定した連続画像取得方法および連続取得画像からの3次元再構成法の開発。

研究成果の概要 (英文)：

The immunohistochemistry for electron microscopy was established for electron microscopic tomography. The automatic input of continuous serial images and 3D reconstruction from these images were examined for tomography.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：眼科学

キーワード：眼細胞生物学

1. 研究開始当初の背景

我々は現在まで蛍光顕微鏡や共焦点顕微鏡、また Western blotting など免疫学的種法を用いて、アポトーシス関連蛋白の細胞内局在の変化を報告した。しかしこれらの分子間相互作用やそれに伴うミトコンドリア内外膜の変化や薬物動態の観察は光学顕微鏡レベルが限界であった。

2. 研究の目的

今回我々は九州大学、米国 Harvard Medical School 等で今までに培った豊富な超微細構

造解析技術と免疫組織化学法に加えて教室の新世代透過型電子顕微鏡 (Hitachi High Technologies Corp. H-7650 120kV TEM) をベースに、今回画像解析・三次元再構成ユニットを調達することで、電子線トモグラフィーを用いた3次元高分解能観察法を確立し、アポトーシス分子群の局在、相互作用を明らかにする。

3. 研究の方法

H-7650 を用いた電子線トモグラフィー、自動傾斜取込み装置の条件設定および安定し

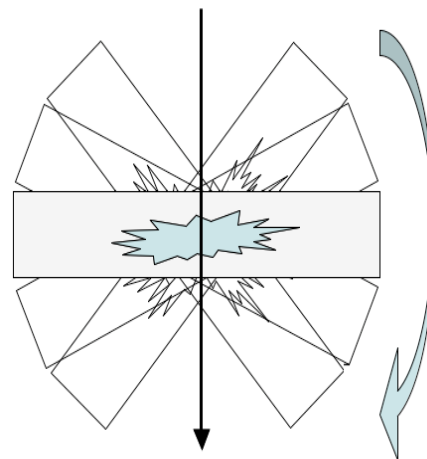
た連続画像取得方法の開発。免疫組織学的染色法の確立。我々のエポン樹脂包埋、100~150nm 切片作製に適した方法確立のために、1) pre-embedding 法として whole mount in-situ immunohistochemistry、2) 低濃度 glutaraldehyde 含有固定液の選定、3) post-embedding 法として LR white を用いた染色法、4) 我々の条件で良好な染色性を示す抗体の選定または作製について検討する。

4. 研究成果

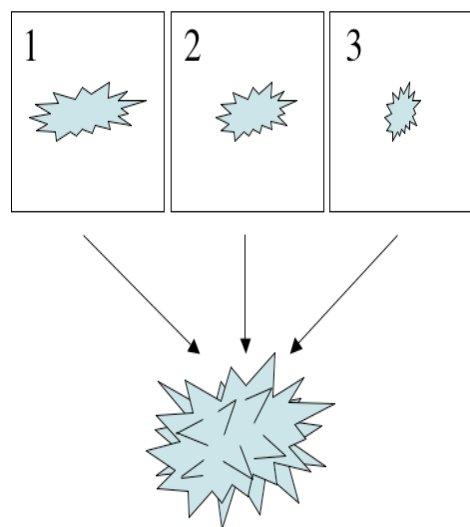
現在自動傾斜装置は-60度より+60度まで電子線画像の連続撮影可能である。高精度の連続画像取得にはまず機械的な標本軸調整を行った。ソフトウェアのアルゴリズムの設定や金コロイドを用いた組織内基準点参照法などを検討した。



自動試料傾斜機能による連続傾斜像取得のフローチャート



電子線 Tomography による自動傾斜連続撮影



連続画像より3次元再構成

免疫組織学的染色法の確立についても検討した。我々は現在まで主に paraformaldehyde 固定標本の免疫組織化学法を行ってきた。今回は我々のエポン樹脂包埋、100~150nm 切片作製に適した方法確立のために、1) pre-embedding 法として whole mount in-situ immunohistochemistry、2) post-embedding 法として LR white を用いた染色法、また我々の条件で良好な染色性を示す抗体の選定または作製について検討し、数種類の良好な組合せ方法を選び出した。これらの方法で、pre-embedding、

post-embedding 法、どちらにおいても良好な染色を得ることが出来た。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

- 1: Salehi-Had H, Roh MI, Giani A, Hisatomi T, Nakao S, Kim IK, Gragoudas ES, Vavvas D, Guccione S, Miller JW. Utilizing Targeted Gene Therapy with Nanoparticles Binding Alpha v Beta 3 for Imaging and Treating Choroidal Neovascularization. PLoS One. 2011 Apr 29;6(4)
- 2: Trichonas G, Murakami Y, Thanos A, Morizane Y, Kayama M, Debouck CM, Hisatomi T, Miller JW, Vavvas DG. Receptor interacting protein kinases mediate retinal detachment-induced photoreceptor necrosis and compensate for inhibition of apoptosis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Dec 14;107(50):21695-700.
- 3: Jo YJ, Sonoda KH, Oshima Y, Takeda A, Kohno R, Yamada J, Hamuro J, Yang Y, Notomi S, Hisatomi T, Ishibashi T. Establishment of a new animal model of focal subretinal fibrosis that resembles disciform lesion in advanced age-related macular degeneration. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2010 Nov 4.
- 4: Ikeda Y, Hisatomi T, Murakami Y, Miyazaki M, Kohno R, Takahashi H, Hata Y, Ishibashi T. Retinitis pigmentosa associated with asteroid hyalosis. Retina. 2010 Sep;30(8):1278-81.
- 5: Kohno R, Hata Y, Mochizuki Y, Arita R, Kawahara S, Kita T, Miyazaki M, Hisatomi T, Ikeda Y, Aiello LP, Ishibashi T. Histopathology of neovascular tissue from eyes with proliferative diabetic retinopathy after intravitreal bevacizumab injection. Am J Ophthalmol. 2010 Aug;150(2):223-229.
- 6: Noda K, Melhorn MI, Zandi S, Frimmel S, Tayyari F, Hisatomi T, Almulki L, Pronczuk A, Hayes KC, Hafezi-Moghadam A. An animal

model of spontaneous metabolic syndrome: Nile grass rat. FASEB J. 2010 Jul;24(7):2443-53.

7: Almulki L, Noda K, Nakao S, Hisatomi T, Thomas KL, Hafezi-Moghadam A. Localization of vascular adhesion protein-1 (VAP-1) in the human eye. Exp Eye Res. 2010 Jan;90(1):26-32.

8: Hisatomi T, Ishibashi T, Miller JW, Kroemer G. Pharmacological inhibition of mitochondrial membrane permeabilization for neuroprotection. Exp Neurol. 2009 Aug;218(2):347-52.

9: Almulki L, Noda K, Amini R, Schering A, Garland RC, Nakao S, Nakazawa T, Hisatomi T, Thomas KL, Masli S, Hafezi-Moghadam A. Surprising up-regulation of P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) in endotoxin-induced uveitis. FASEB J. 2009 Mar;23(3):929-39.

[学会発表] (計 14 件)

- 1: 久富智朗 網膜剥離による視細胞死 ; ミトコンドリア脂質二重膜透過性亢進を介した分子機構、眼分子生物学研究会、福岡、2009 年 1 月
- 2: 久富智朗 網膜剥離と視細胞死 ; ミトコンドリア透過性亢進を介した分子機構 北九州九州大学眼科同門会 小倉、2009 年 6 月
- 3: 久富智朗 眼科血管・リンパ管研究の最前線 実験的脈絡膜血管新生の発生および退縮過程におけるアポトーシスの発生と役割 (シンポジウム)、日本眼科学会 東京 2009 年 4 月
- 4: 久富智朗、納富昭司 視細胞保護と血管新生抑制におけるアポトーシスの関与、眼創傷治癒研究会、仙台、2009 年 8 月 7 日 久富智朗 網膜剥離による視細胞死 ; ミトコンドリア脂質二重膜透過性亢進をした分子機構、

若手神経保護研究会、東京、2009年9月26日

5: 久富智朗 網膜剥離でなぜ視細胞は変性するのか? ミトコンドリアの謎 (インストラクションコース)、日本臨床眼科学会、福岡、2009年

6: Toshio Hisatomi The Bird's Eye View Analysis of Internal limiting membrane; Cellular migration around the macular hole, JCK meeting, Fukuoka 2009

7: 久富智朗 胞状網膜剥離と浅い網膜剥離における視細胞死の比較 2010年2月 分子生物学研究会、大阪

8: 久富智朗 胞状網膜剥離と浅い網膜剥離における視細胞死の比較 日本眼科学会 2010年4月、名古屋

9: 納富昭司、久富智朗 マウス脈絡膜新生血管の蛍光走査型電子顕微鏡 (FL-SEM) による観察 分子生物学研究会、2010年2月大阪

10: 納富昭司、久富智朗 マウス脈絡膜新生血管の蛍光走査型電子顕微鏡 (FL-SEM) による観察 日本眼科学会、2010年4月名古屋

11: 久富智朗 Brilliant Blue G の細胞染色性と細胞膜透過性の検討 班会議 2011年1月、名古屋

12: 久富智朗 Brilliant Blue G の細胞染色性と細胞膜透過性の検討 日本眼科学会 2011年5月、東京

13: 納富昭司、久富智朗、P2X7 受容体遮断薬 Brilliant Blue G による網膜神経細胞保護効果の検討 班会議 2011年1月、名古屋

14: 納富昭司、久富智朗、P2X7 受容体遮断薬 Brilliant Blue G による網膜神経細胞保護効果の検討 日本眼科学会 2011年5月、東京

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久富 智朗 (HISATOMI TOSHIO)
九州大学・医学研究院・助教
研究者番号: 50404033

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号