

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：31201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24650181

研究課題名(和文) 拡散的神経情報伝達経路の超微細形態基盤の確立

研究課題名(英文) Basic research on the ultrastructural framework of the route for diffuse modulatory transmission in CNS

研究代表者

遠山 稿二郎 (TOHYAMA, KOUJIRO)

岩手医科大学・医学部・研究員

研究者番号：10129033

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：近年、シナプスを介さない神経伝達物質の拡散による神経情報修飾の重要性が指摘されている。この伝達物質の拡散を支える脳内の細胞間隙について、極低温(-269℃)での急速凍結法・2軸電子線トモグラフィ法・反射電子像解析法を用いて立体的に調べた。その結果、(1)細胞間隙は組織全体の体積の約3.7%であること、(2)シナプス間隙にはナノレベルの構造が存在すること、(3)神経情報伝達で重要な役割を担う、絞輪部(髄鞘に巻かれていない部位)軸索表面の3/4が細胞間隙に接し、1/4がグリア細胞に覆われ、(4)その一部は、軸索内の不要物処理に関与する可能性を示唆する形態を認めた。

研究成果の概要(英文)：Elucidation of the diffuse modulation system (DMS) is important to solve the role of neurons in the brainstem nuclei. To understand the 3D-ultrastructure (3DU) of the extra-cellular space (ECS), which support DMS transmission, we employed three high-technologies for electron microscopy, (i) rapid-freeze/substitution at ultra-low temperature (-269C) by liquid helium method (He-RF), (ii) double-axis electron beam tomography (DT), and (iii) back-scattered electron beam image analysis (BSE). We obtained following new findings: (1) ECS occupied about 3.7% of whole tissue in volume; (2) He-RF and DT demonstrated details of 3DU in the synaptic cleft; (3) BSE made clear 3DU of the node: glial processes enwrapped only 25% area of node axon, and 75% open to ECS; (4) tear-drop like protrusions from the node with denatured organelle were found and exhibited phagocytic appearance by glia, suggesting the possibility of a new concept that axon-derived debris are processed by glia.

研究分野：神経微細解剖学

キーワード：細胞間隙 反射電子像 電子線トモグラフィ 三次元再構築 シナプス間隙 Ranvier絞輪 グリア細胞 拡散的神経情報伝達

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、脳高次機能および精神疾患との関連から、拡散的神経情報伝達経路 (diffuse modulatory system) が注目されている。主に脳幹モノアミン系の神経核に細胞集団を持つシステムで、比較的少数の神経細胞の集団が、脳全体に軸索を送る。これらの神経伝達物質は細胞間隙に、すなわち非シナプ的に放出していると考えられる。例えば、人においては、12000個程度と考えられる青斑核のNE神経細胞は大脳皮質・視床・視床下部・嗅球・小脳・中脳・脊髄に軸索を送り25万箇所を越える神経細胞に作用しているとの報告もある。中枢神経組織における細胞間隙はこのようなトランスミッターの経路となるばかりでなく、他の分子の移動・拡散においても重要な意味を持っており、神経活動の場として重要な要素である。しかし、神経組織における細胞間隙の把握は形態的に難しく、これまでいくつかの報告があるものの技術的に問題があり、いまだ確立したデータはない。また、神経情報の修飾可能部位として、軸索が細胞間隙に接するランヴィエ絞輪が考えられるが、その3次元形態はほとんど不明である。

(2) 上記課題を明らかにする方法は電子顕微鏡を用いることが最も有効であるが、化学固定による従来法で透過電子顕微鏡用試料を作製すると、標的の細胞間隙は人工的要因が大きく影響し、その有無を客観的に判断し難い。これに対し、急速凍結・凍結置換法により作製された標本では、化学固定とは異なり、より実際に近い状態の形態を把握できる。幸い、近年、臨床用MRIの普及に伴い、本手法に必須の液体ヘリウムの入手が格段に容易になり、装置も改良されてきた。また、電子顕微鏡画像でもデジタル化が進み、電子線トモグラフィ法による試料の解析が比較的容易になった。しかし、課題開始時点では、一方向のトモグラフィが主流であったため、よりひずみの少ない2軸トモグラフィ法を実現する必要があった。また、反射電子像取得技術が大きく進歩し、様々な活用が試みられており、比較的一般的な機器により解析が可能となっていた。とはいえ、共に、確立した技術とは言いがたく、本研究により、より安定した技術の確立にも貢献できる好機であった。

2. 研究の目的

(1) これまで不明な点が多い中枢神経における細胞間隙、ランヴィエ絞輪およびその周囲、シナプス間隙の超微細構造について「ナノレベルからミクロンレベルまでのシームレスな3次元微細形態」を明らかにする。

(2) 上記目的を達成するため、以下の技術的手法を確立する。

- (i) 近年、応用が広がりつつある走査電顕 (SEM) の反射電子像解析法を活用し、超広範囲観察を視野に、連続切片解析法と組み合わせることで、より効率のよい正確な解析法を確立すること。
 - (ii) 透過電顕 (TEM) においては、2軸電子線トモグラフィを確立すること。
- 高度先端技術を比較的安価な機器で実施できれば、研究機会を広げ、更なる神経基盤の解明研究を支える重要な技術となろう。

3. 研究の方法

(1) 【急速凍結・凍結置換法】: 深麻酔下の動物 (ラット・マウス) の小脳を液体ヘリウム温度 (-269°C)

で急速凍結し、凍結置換法で樹脂包埋試料を作製した。また、通常の方法 (心左心室からの還流化学固定) による試料 (小脳、視神経など) も作成した (ラット、マウス、コモンマーモセット)。

(2) 樹脂包埋試料はウルトラマイクロームにより厚さ、大きさの異なる超薄切片 ((a) 100nm 厚の大型切片 (約20mm²) ; (b) 200nm厚の従来の大きさのTEM用切片) を得た。反射電子像解析用には、得られた樹脂切片をコーティングされたスライドガラス上に拾い、ウラン・鉛の電子染色後SEMで観察した。また、(b)のTEM用切片はグリッドに載せ、電子染色後、TEMで2軸電子線トモグラフィ (DT) により解析した。

(3) (a) においては、連続切片より得られた画像を基に三次元再構築し全体像を把握した (NIH/ImageJによる)。

4. 研究成果

(1) 以下の方法について技術的基盤を確立した。
 (i) 超広域電顕観察を実現した。BSEにより、従来のTEM観察の最大約50倍 (約50mm²) の範囲を対象に検索できる手法を確立した (業績・論文1,4; 学会発表4,5)。

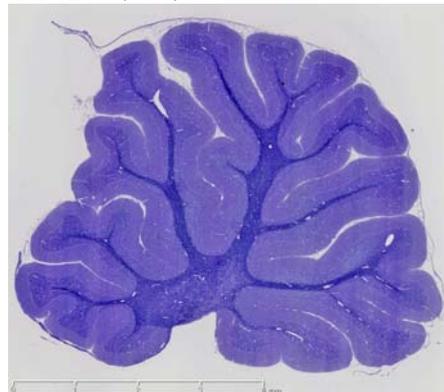


図1. ラット小脳の正中断である。この領域のすべての部位を約2万倍程度までの電顕画像を取得できる。なおトルイジン・ブルー染色した切片をBSEにより観察できることを確認した。このことにより、光学顕微鏡から電顕レベルの超微細形態までのシームレスな情報取得が可能であることを示す。

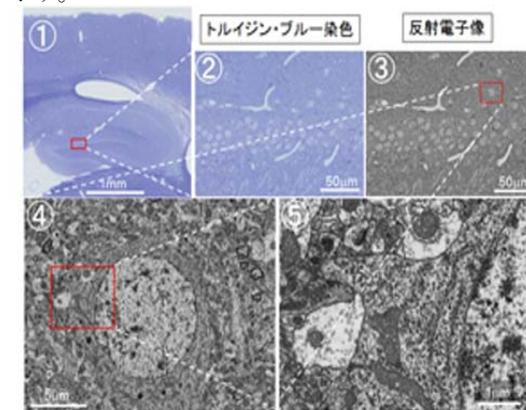


図2. 実際の光学顕微鏡画像から同一の切片の電子顕微鏡画像を示す。①から⑤の順で拡大した。

これにより、ランヴィエ絞輪部などの出現頻度の低い構造の連続切片画像を得ることが可能となった (後述(3))。また、最近の電子顕微鏡画像はデ

デジタルデータであるため、一定の領域を撮影し画像を統合することで、一つの画像データとできる。これを活用し、さらに、大容量画像のビューアソフトを使うことで、研究者が電子顕微鏡の前になくとも電子顕微鏡による検索が可能となった。実際、私は得られた画像をPC上で解析し、研究を進めた。活用したソフトは浜松フォトニックスのNanoZoomerである。もし、一定の基準で画像が得られれば、多くの研究者が同時に同一のデータについて解析できる。病理診断で活用されだした、いわゆるバーチャルスライドの電子顕微鏡版が可能となる。これにより、研究上電子顕微鏡による検索が必要な場合でも、高額な機器である電子顕微鏡を必ずしも設置する必要がなくなる。一方、専門的な技術を維持し常に先端技術定着を目指す中心的組織が必須となり、将来を見据えた早急な対応が望まれる。

(ii) 2軸電子線トモグラフィ法を確立した。これにより、これまで1枚の超薄切片内(80nm)で重なり、影絵としてしか把握できなかった超微細構造を明らかにすることができた(後述(4);業績・論文3)。

(2) 中枢神経の細胞間隙を理解する基礎データを得ることができた。超低温で急速凍結されたラット小脳の細胞間隙を把握できた(図3の赤い部分)。立体構築し三次元的に解析すると(図4:細胞間隙の立体像)、細胞間隙は組織の約3.7%であった。しかし、技術的限界で、目的の一つであった、間隙の広がりや確定するにはいたらなかった。

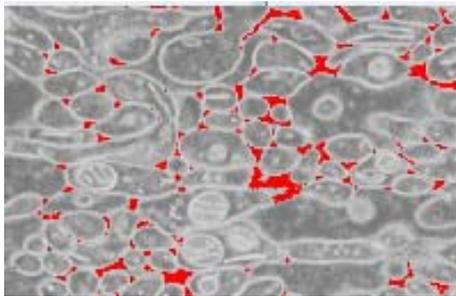


図3 超低温急速凍結・凍結置換法で得られたラット小脳皮質の反射電子像。これを反転処理すると透過電子顕微鏡像と同様な画像となる。細胞間隙を赤で示す。

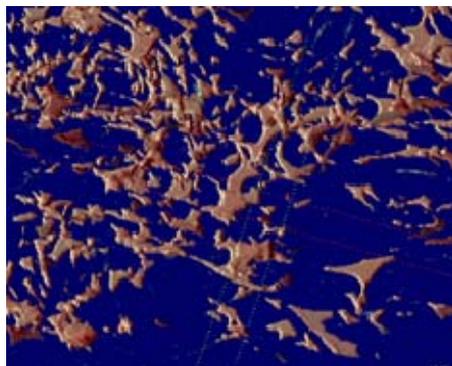


図4 細胞間隙を三次元再構築した画像。

この事実により、非シナプスの神経情報修飾を支える構造の存在を明らかにできた。

(3) ラット白質(視神経)のランヴィエ絞輪(46箇所)の連続切片BSE画像を基に立体再構築した。新知見は以下のとおり。

(i) 絞輪部軸索の長さは軸索径と相関しない(図5)。

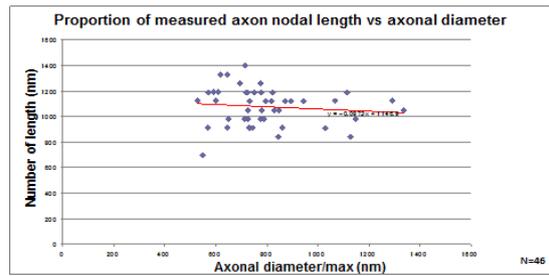


図5 縦軸: 絞輪部軸索長、横軸: 軸索直径

これまで、絞輪部での軸索の長さは伝導速度にかかわる要素とは考えられていなかった。今後、生理的研究も加え、検討する必要がある。

(ii) 絞輪部軸索表面の76%が細胞間隙(ECM)に接し、これまでの教科書的な記載によるアストログリアとは13%、特定できないグリア細胞とは11%であった(図6)。なお、グリア細胞およびECMと接する様式は確認した絞輪部ごとに極めて多様で一定の様式は見られなかった(図7)。

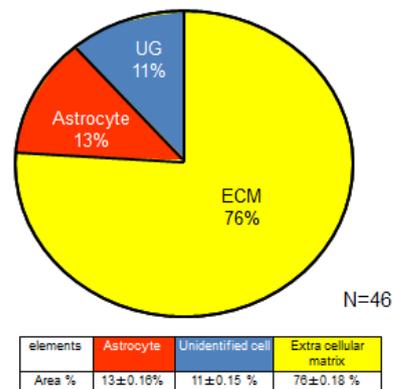


図6: 絞輪部軸索表面と接する各要素の割合を示す。赤: アストロサイト、青: 特定できないグリア

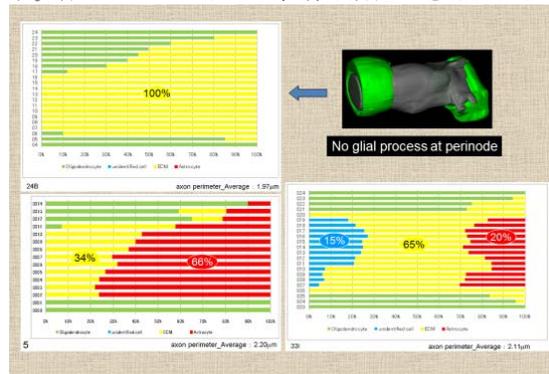


図7 各要素と絞輪部軸索表面に接する割合三種類の例を示す。右上は三次元再構築されたグリア細胞と接しない絞輪部の一例。緑は希突起膠細胞。他は図5と同じ。

(iii) また、65.2%の絞輪部の軸索には軸索膜の雨だれ状の突起が確認され(図8)、その多く(86.7%)は、周囲のグリア細胞に囲まれ、貪食像が観察された(図9)。

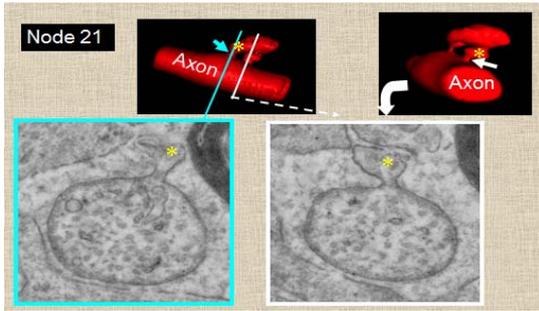


図8 軸索からのくびれを持った2箇所突起(*)、青線と白線での電頭像(断面)を下に示す。軸索膜直下には **undercoating** が見られ絞輪部軸索であることがわかる。

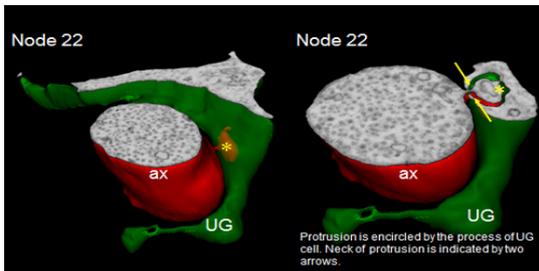


図9 左図では雨だれ状の突起(*)が未特定グリア(緑:UG)に囲まれている全体像。右図は、突起(*)が出ているレベルでの断面像を示す。二つの黄色矢印で示される細い部分で軸索の突起であることがわかる。また、突起内には変性した膜様構造が見られる。

雨だれ状の軸索からの突起内には変性したオルガネラの一部(膜用構造)が認められることが多く、おそらくミトコンドリア由来である可能性が高い。近年、網膜内での視神経で、神経由来のミトコンドリアが周囲のアストロサイトに移行し(貪食され)、処理されることが証明された。この報告では、他組織に比較した場合、網膜内の酸素分圧が低い、など特殊事情で出現した現象と解釈されている。しかし、本研究で、上記の現象が46箇所中、約半数(56%)の絞輪部で認められた事実は、本現象が一般的であることを示している。もし、処理されているものがミトコンドリア由来のものを含まないと考えると、有髄軸索中最も生理的活性の高い絞輪部周囲では、ミトコンドリアの消耗も激しいと考えられ、すべての役に立たなくなったミトコンドリアを神経細胞体に輸送し処理するより、各絞輪部で処理できる方が、エネルギー効率上優れた方法である可能性が高い。したがって、新たな不要小器官処理機構との可能性が高まる。このように、以上の所見は、近年注目を浴びているミトコンドリアの処理に関する新たな考え方^①^②を支持する新知見でもある。

(4) 2軸電子線トモグラフィ法により、極低温急速凍結法で得られたラット小脳皮質のシナプスについて三次元解析した。これまで把握できなかったシナプス間隙のシナプス面方向での超微細構造が明らかとなった(図10)。そこでシナプス面に沿った曲面(図11の赤破線)でのシナプス間隙画像をソフト上で得ると、図10で確認されたクレーター状の構造が広く見られた(図11:右図)。

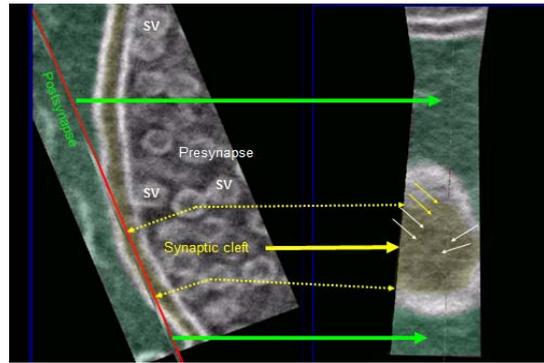


図10 左図は得られた三次元データより、シナプス面に垂直な断面像である。前シナプス(presynapse)はシナプス小胞(SV)で満たされ、これに対する後シナプス(緑:postsynapse)およびシナプス前膜とシナプス後膜の間にシナプス間隙(黄色:synaptic cleft)が見られる。赤線に沿った断面像が右図である。シナプス間隙に黒いクレーター状構造(白矢印)が見られる。

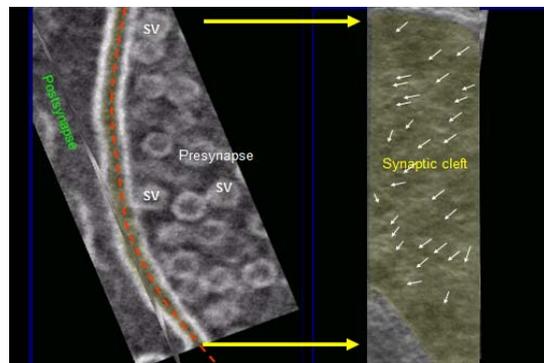


図11 画像処理により得られた、シナプス間隙のほぼ中央部(左図:赤破線)でのシナプス面に沿った画像を右図に示す。黄色で着色された範囲はシナプス間隙である。

このクレーター状構造は、電子密度を基に考えると、十数ナノのドーナツ状で中心部に数ナノの電子密度のない領域、おそらく物質が通過できる小孔(小管)があると考えられる。これは、シナプス間隙における神経伝達物質を含む物質の拡散・移動にかかわる構造である可能性もあり、今後の重要なテーマである。

〈引用文献〉

- ① Davis CD et al. (2014) Transcellular degradation of axonal mitochondria. *PNAS*, 111(26):9633-9638, July
- ② Burdett TC & Freeman MR (2014) Astrocyte eyeball axonal mitochondria. *Science*, 345(6195):385-396, July

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計7件)

- ① Ian A McKenzie, David Ohayon, Huiliang Li, Joana Paes de Faria, Ben Emery, Koujiro Tohyama, William D Richardson (2014) Motor skill learning requires active central myelination. *Science* (New York,

N.Y.) 346: 6207. 318-322 Oct.
DOI: 10.1126/science.1254960

- ② Gen Haba, Hidekazu Nishigori, Makoto Sasaki, Koujiro Tohyama, Kohsuke Kudo, Yutaka Matsumura, Toru Sugiyama, Keisuke Kagami, Yu Tezuka, Atsushi Sanbe, Hideo Nishigori .2014. Altered magnetic resonance images of brain and social behaviors of hatchling, and expression of thyroid hormone receptor β mRNA in cerebellum of embryos after Methimazole administration. *Psychopharmacology* 231: 1. 221-230 Jan
DOI 10.1007/s00213-013-3229-z
- ③ Takashi Sawai, Akihisa Kamataki, Miwa Uzuki, Kinji Ishida, Tomohito Hanasaka, Kensuke Ochi, Takahito Hashimoto, Takashi Kubo, Akinari Morikawa, Takahiro Ochi, Koujiro Tohyama (2013) Serial block-face scanning electron microscopy combined with double-axis electron beam tomography provides new insight into cellular relationships. *J Electron Microsc* (Tokyo) 62: 2. 317-320 10.
DOI: 10.1093/jmicro/dfs069
- ④ Kaylene M Young, Konstantina Psachoulia, Richa B Tripathi, Sara-Jane Dunn, Lee Cossell, David Attwell, Koujiro Tohyama, William D Richardson (2013) Oligodendrocyte Dynamics in the Healthy Adult CNS: Evidence for Myelin Remodeling. *Neuron* 77: 873-885 Mar
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2013.01.006>
- ⑤ K.Tohyama, T.Hanasaka, K.Ogasawara, E. Matsuura, T. Nozaki, K. Ishida: A New Approach to understanding the 3D structure of the CNS node of Ranvier.(2013) *Glia* 61:S120.July
DOI: 10.1002/glia.22530
- ⑥ Yan-Chao Li, Wan-Zhu Bai, Norio Hirano, Tsuyako Hayashida, Takahide Taniguchi, Yoichi Sugita, Koujiro Tohyama, Tsutomu Hashikawa (2012) Neurotropic virus tracing suggested a membranous-coating mediated mechanism for the trans-synaptic communication. *J Comp Neurol* 521:1.203-212 January
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2013.01.006>
- ⑦ H Fukuoka, J Sasaki, H Kamishina, R Sato, J Yasuda, M Katayama, K Tohyama, M Ohshida, M Goryo (2012) Gliomatosis Cerebelli in a Saint Bernard Dog. *J Comp Pathol* 147: 1. 37-41 Jul.
DOI:10.1016/j.jcpa.2011.08.013

[学会発表] (計5件)

- ① K.Tohyama, T.Hanasaka, K.Ogasawara, E. Matsuura, T. Nozaki, K. Ishida: A New Approach to understanding the 3D structure of the CNS node of Ranvier. European Meeting on Glia Cells in Health and Disease. Berlin, Germany. July 3 – 6, 2013
- ② Koujiro Tohyama: A new approach to

understanding the 3D structure of the CNS. Gordon Research Conferences: Myelin – Biology and Pathology of Myelinating Glia, Lucca(Barga), Italy, April 29-May 4,2012

【招待講演】

- ③ K.Tohyama: Ultrastructure of the node of Ranvier and its cellular micro-environment, Wolfson Institute for Biomedical Research, University College London, London, UK, December 12, 2014
- ④ K.Tohyama: Present and Future of Electron Microscopy for Neuroscience -Multi-scale biological analysis-. Florida State University, Tallahassee, Florida, USA, November 2, 2012
- ⑤ 遠山 稿二郎:「これからの電子顕微鏡が目指すもの」、特別講演、医学生物学電子顕微鏡技術学会、盛岡、2012年5月12日

[図書] (計0件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

http://www.hitachi-hightech.com/file/jp/pdf/sinews/sinews_03.pdf

6. 研究組織

(1) 研究代表者

遠山 稿二郎 (TOHYAMA, Koujiro)
岩手医科大学・医学部・研究員(元教授)
研究者番号: 10129033

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

岩手医科大学・医歯薬総合研究所
石田 欣二 技師長 (ISHIDA Kinji)
花坂 智人 (HANASAKA Tomohito)
松浦 絵里 (MATSUURA Eri)
小笠原 勝利 (OGASAWARA Katsutosi)
野崎 貴介 (NOZAKI Takayuki)
浅田 千架子 (ASADA Chikako)

研究協力者(海外)

University College London,
William D Richardson, Professor,
David Attwell, Professor,
Patrick N Anderson, Professor,
Alexander R Lieberman,
Emeritus Professor,