

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06734

研究課題名(和文) 高解像度イメージング法を用いたグリア細胞の構造解析

研究課題名(英文) Structural Analysis of glial cells by using high resolution imaging method

研究代表者

岩崎 広英 (Iwasaki, Hirohide)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・講師

研究者番号：30342752

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：中枢神経系を構成するグリア細胞としては、アストロサイト、ミクログリア、オリゴデンドロサイトなどが知られている。このうちオリゴデンドロサイトは神経細胞の軸索の髄鞘形成に関わるが、アストロサイトやミクログリアはシナプスの形成・消失などを介して脳機能に関与している可能性が示唆されている。そこで本研究ではこれまでに研究代表者が取り組んできた、電子顕微鏡と光学顕微鏡の融合的手法である光-電子相関顕微鏡法(CLEM)によりアストロサイトおよびミクログリアの微小突起の形態学的解析および分子局在解析を行った。また、電子顕微鏡による三次元再構築法を用いて、ミクログリアの微細突起構造の三次元再構築に成功した。

研究成果の概要(英文)：In the central nervous system of the mammalian brain, three types of glial cells have been identified; astrocyte, microglia and oligodendrocyte. Among them, oligodendrocyte forms myelin around axons. Other types of glial cells might contribute to the synaptic functions of the brain by affecting the synapse formation/elimination. In this research, I analyzed the precise structure of astrocyte and microglia by using CLEM (Correlative analysis of light- and electron- microscopy) method. Particularly, I succeeded the comprehensive three-dimensional reconstruct of the fine protrusions of single microglia.

研究分野：神経形態学

キーワード：グリア細胞 微細形態解析 電子顕微鏡 光学顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

(1) 脳は神経細胞とグリア細胞から構成される。神経細胞は互いにシナプスを介して結合し、神経回路ネットワークを構成することで様々な情報処理を行うのに対し、従来、グリア細胞は、神経細胞に栄養因子等を供給するなどの支持的細胞と従来考えられてきた。近年、神経伝達物質であるグルタミン酸の細胞外領域での濃度制御を行ったり、シナプス形成・除去に関与したりと、積極的に脳機能に関与することが明らかになった一方、まだまだ不明の点も多い。

(2) アストロサイトから出る無数の微細突起は、機能的にも構造的にも高度に分化しているが、このような形態および機能の分化がどのようなメカニズムによりもたらされるのかは不明である。またアストロサイト同士は互いにテリトリーを形成し、排他的に位置しているが、ひとつのアストロサイトが何個の神経細胞と相互作用するのか、また同じアストロサイトと相互作用する神経細胞どうしが機能的に連関するのか、異なるアストロサイトに取り囲まれる神経細胞どうしについては機能的に連関するのかなどについては不明である。

(3) ミクログリアは、正常時においてはラミファイドミクログリアと呼ばれる、無数の微細突起を有する形態を取るが、炎症等により活性化されると微細突起が消失し、アメボイドミクログリアと呼ばれる構造を取る。しかし、これらの形態変化がどのようなメカニズムで引き起こされるのか、さらにこのような形態変化がミクログリアの機能にどのような変化をもたらすのかについては充分に明らかになっていない。

2. 研究の目的

(1) アストロサイトやミクログリアは無数の微細突起を有する。特にアストロサイトについては比較的広い範囲に突起を伸ばすことから、広範囲にわたる微細形態を明らかにすることが必要となる。そこで本研究では、以前から推進してきた電子顕微鏡と光学顕微鏡の融合的手法による新規イメージング技術を用いてグリア細胞の電子顕微鏡による三次元再構築と、光学顕微鏡的手法を用いてグリア細胞の突起に局在すると考えられる分子の抗体を用いて詳細な局在解析を行う。これらの解析を通じてグリア細胞の微小突起の機能分化の分子メカニズムに関わる知見を得る。

(2) グリア細胞の三次元再構築像から神経細胞とグリア細胞との近接部位に着目し、その特徴について抽出する。

3. 研究の方法

(1) グリア細胞の三次元再構築に際しては、超薄連続切片回収機 ATUM(Automatic Tape-collecting UltraMicrotome)を用いることを当初の計画とした(引用文献)。

従来法では、電子顕微鏡による三次元再構

築は主として超薄連続切片の回収と透過型電子顕微鏡での画像取得が一般的であった。しかしこの方法は実験者の手技の熟練や長時間にわたる作業が必要とされるため、大規模な三次元再構築を行うのは困難であった。

近年、走査型顕微鏡を用いた新しい手法が次々と実用化されており、今回使用を計画していた ATUM は、グリッドの薄膜上に実験者が切片を回収する代わりに、プラスチックテープの上に機械が自動的に切片を回収していく。これにより実験者の労力を大幅に軽減させることが可能である。回収された切片はプラスチックテープの上にあるため、電子線が通り抜けられないことから、透過型電子顕微鏡を使用することができず、代わりに走査型電子顕微鏡を利用する。

(2) グリア細胞の突起に集積する分子の局在解析については、Array Tomography 法を用いた(引用文献)。Array Tomography 法は脳試料を LRWhite などの親水性の電子顕微鏡用樹脂に包埋し、ウルトラマイクロトームで超薄連続切片化したものを抗体染色する手法である。

通常の光学顕微鏡の分解能は試料と平行な平面においては約250nmであるのに対し、試料に垂直な方向では750nm-1000nmと低分解能であり、グリアの微細突起構造を観察するには不十分である。しかし電子顕微鏡用樹脂に包埋して試料を光学顕微鏡の分解能以下の厚さ(50nm-200nm程度)に超薄化することで、分解能の向上が期待できる。

4. 研究成果

(1) まずアストロサイトに比べて突起の複雑さや空間的な広がり小さいミクログリアを対象として、三次元再構築を試みた。しかし、当初予定していた ATUM では、期待したような結果を得ることが困難であった。具体的な理由としては、切片回収時に皺が生じる頻度が高く、一旦皺が入ってしまうとその部分は再構築に使えないことから、標的とするミクログリアを再構築することが困難であった。そこで、ATUM の代わりに FIB-SEM を利用することとした。

(2) FIB-SEM では、切片を作製する代わりに、試料ブロックの表面を集束イオンビーム(focused ion beam)を用いて切削し、表出した面を走査型顕微鏡(scanning electron microscopy)でスキャンして画像取得し、このステップを繰り返し行うことで試料の三次元再構築像を得るという手法である(引用文献)。この手法のメリットは、切片を切る必要がないことから、皺の問題をクリアすることができる。また、全ての操作が自動化されているため、実験者の技術や労力等も大幅に軽減される。さらに、従来切片法で回収できる切片の厚さは50nm程度が限界であったが、集束イオンビームは10nmずつ表面を削り取ることが可能であり、これにより解像

度を大幅に向上させることが可能である。一方、従来の透過顕微鏡法ではグリッド上に、また ATUM ではプラスチックテープ上に切片が保持されることから、複数回に亘る観察が可能であるが、FIB-SEM による観察方法は破壊的手法のため、同じ試料を二度と観察することができないというデメリットもある。

(3) ミクログリアは染色体や核小体などの特徴から、神経細胞や他のグリアと見分けることも可能であるが、三次元再構築する標的のミクログリアを確実に同定するために、まず iba1-GFP マウスを利用した(引用文献)。iba1-GFP マウスはミクログリアに特異的に発現している iba1 プロモーターの下流に GFP 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスであり、ミクログリアが特異的に GFP で標識されることから、ミクログリアを容易に識別することができる。

(4) しかし、光学顕微鏡で iba1-GFP マウスのミクログリアを同定し、三次元再構築すべき細胞を決めても、電子顕微鏡用試料作製の過程において GFP の蛍光は消光してしまうため、正しく細胞を同定することは困難である。そこで NIRB(Near-infrared branding)法の導入を試みた(引用文献)。NIRB 法は、二光子顕微鏡において焦点面のみが照射され、その点像分布関数が、焦点面の極めて小さい領域に限られるという長所を活かし、レーザーパワーを最大限上げて組織を焼灼することで、位置合わせ用の傷をつける手法である。焼灼痕は電子顕微鏡においても容易に識別できることから、光学顕微鏡で同定しておいた細胞を電子顕微鏡で正確に同定することが可能である。

(5) 以上の方法をふまえ、まず二光子顕微鏡を用いて標的とするミクログリアを観察し、その微小突起の広がりについて観察・画像取得する。その上でレーザーパワーを上げて組織を焼灼し、電子顕微鏡用樹脂に包埋した。次に試料ブロックの面出しを行い、焼灼痕を指標として、標的とするミクログリアが正しく表出されていることを確認した上で、FIB-SEM による画像取得を行った。画像取得にあたっては、FIB-SEM で観察できる範囲は限られることから、 $50\mu\text{m} \times 50\mu\text{m} \times 50\mu\text{m}$ の範囲で画像取得を行った。このため、ミクログリア全体を含むことはできず、また細胞の同定の際に既に細胞が表出していることから、全体の 1/8 に当たる部分の三次元再構築に限られる。しかし、観察した領域に関しては全ての微細突起の三次元再構築に成功した。現在、その特徴について解析中である。具体的には神経細胞との関係や微細突起の分岐パターンや細胞内構造等について詳細に検討しており、これらについて纏めた時点で論文化することが可能と思われる。

(6) 一方、アストロサイトについては、その範囲が大きすぎることや、アストロサイトの突起が極めて微細なため、現在の観察条件では全ての突起を明瞭に観察できていない。今後は観察条件および試料作製のプロトコルの改良を試みることで、アストロサイトの微細突起の網羅的解析を実現させたい。

(7) また、アストロサイト微細突起に局在する分子としてはアクアポリン 4 が血管周囲を取り囲む微細突起特異的に発現することが知られていることから、抗アクアポリン 4 抗体を用いた Array Tomography 法を実施したが、特異的な染色が観察できる抗体は見つからなかった。これは、Array Tomography 法は高解像度の光学顕微鏡像取得には有用な方法であるものの、LRWhite 樹脂に包埋された試料に使用できる抗体が極めて限られているためと考えられる。そこで今後はアクアポリン抗体の作製や、或いは他の候補分子に着目して、同様の解析を実施したい。

<引用文献>

Hayworth, K.J et al., "Imaging ATUM ultrathin section libraries with WaferMapper: a multi-scale approach to EM reconstruction of neural circuits", *Front. Neural Circuits*. 8:68, 2014

Micheva, K.D. and Smith, S.J., "Array tomography: a new tool for imaging the molecular architecture and ultrastructure of neural circuits.", *Neuron*, 55: 25-36, 2007

Briggman, K.L. and Bock, D.D., "Volume electron microscopy for neuronal circuit reconstruction.", *Current Opinion in Neurobiology*, 22: 154-161, 2012

Hirasawa, T. et al., "Visualization of microglia in living tissues using Iba1-EGFP transgenic mice".

Bishop, D. et al., "Near-infrared branding efficiently correlates light and electron microscopy.", *Nature Methods*., 8: 568-570, 2011

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 5 件)

岩崎広英

「超薄連続切片自動回収機 ATUM を用いた試料作成法」
顕微鏡, 49(3): 176-180, 2014、査読有

岩崎広英、田中慎二、岡部繁男
「大脳皮質におけるシナプス-グリアアセ
ンブリ相互作用」
生体の科学, 66(6): 531-535, 2015、査読無

井口 理沙, 岩崎広英, 岡部 繁男
「中枢神経系シナプス形成の多様性の分子
的基盤」
生化学, 89:77-80, 2017、査読有

Koeberle S., Tanaka S., Kuriu T.,
Iwasaki H., Koeberle A., Schulz A.,
Helbing D., Yamagata Y., Morrison H.
and **Okabe S.**
“ Developmental stage-dependent
regulation of spine formation by
calcium-calmodulin dependent protein
kinase II and Rap1 ”
Sci.Rep., 7:13409, 2017、査読有

Chen S., Weitemier A.Z., Zeng X., He
L., Wang X., Tao Y., Huang A.J.Y.,
Hashimotodani Y., Kano M., **Iwasaki H.**,
Parajuli L.K., **Okabe S.**, Tsutsui-Kimura
I., Tanaka K.F., Liu X. and McHugh T.J.
‘Near-infrared deep brain stimulation via
upconversion nanoparticle-mediated
optogenetics’
Science, 359(6376):679-684, 2018、査読有

{学会発表}(計 11 件)

岩崎広英、岡部繁男, 「自動切片回収機
ATUM を用いた神経組織の解析」, 日本顕
微鏡学会第 70 回記念学術講演会, 2014 年 5
月、幕張メッセ国際会議場(千葉県千葉市)

岩崎広英, 「光学顕微鏡技術と電子顕微
鏡技術の融合による神経組織の三次元再構
築解析」, 生理学研究所研究会「シナプス機
能の普遍性と多様性」, 2014 年 5 月、生理
学研究所(愛知県岡崎市)

岩崎広英, 「超薄連続切片回収機 ATUM
を用いた神経組織解析」, 光操作研究会,
2014 年 8 月、東北大学民陵会館(宮城県
仙台市)

岩崎広英、岡部繁男, 「自動切片回収機
ATUM を用いた神経組織解析」, 生理学研
究所研究会「電子顕微鏡イメージングの医
学・生物学への応用」, 2014 年 10 月、生
理学研究所(愛知県岡崎市)

岩崎広英、一色真明、石田綾、柏木有太
郎、**岡部繁男**, 「光学顕微鏡技術と電子顕
微鏡技術の融合的手法によるスパイン形成
解析」, 第 120 回日本解剖学会総会・全国集
会 第 92 回日本生理学会大会 合同大会,
2015 年 3 月、神戸コンベンションセンタ
ー(兵庫県神戸市)

岩崎広英、**岡部繁男**, 「ATUM を用い
た連続切片からの SEM による神経組織の
立体再構築」, 日本顕微鏡学会第 71 回学術
講演会 IIRS シンポジウム, 2015 年 5 月、
京都国際会館(京都府京都市)

Hirohide Iwasaki and **Shigeo Okabe**,
“ Three-Dimensional Reconstruction of
Neural Tissue from Serial Sections
Collected by ATUM ”, The 2nd East-Asia
Microscopy Conference, 2015 年 11 月、姫
路商工会議所(兵庫県姫路市)

Hirohide Iwasaki,
“ Three-dimensional reconstruction of
neural tissue from serial section collected
by ATUM”, I.M.A. workshop on neural
imaging in neuroscience, 2016 年 3 月、ケ
ンブリッジ大学(英国、ケンブリッジ市)

Hirohide Iwasaki,
“Three-dimensional reconstruction of
dendritic spines using scanning electron
microscopy”, invited seminar, 2017 年 8
月, Korea Brain Research Institute(韓国、
大邱市)

Hirohide Iwasaki and **Shigeo Okabe**,
“Three-dimensional reconstruction of
dendritic spines using scanning electron
microscopy”, The 3rd East-Asia
Microscopy Conference, 2017 年 11 月,
BEXCO(韓国、釜山市)

岩崎広英、田中慎二、岡部繁男
“Three-dimensional reconstruction of
dendritic spines using scanning electron
microscopy” 第 123 回 日本解剖学会総
会・全国学術集会、2018 年 3 月(東京、
日本医科大学武蔵境校舎・日本獣医生命科
学大学)

{図書}(計 1 件)

Iwasaki, H., Tanaka, S and **Okabe, S.**,
“Dendrites: Development and Disease”,
Chapter 15: ‘Molecular Assembly of

Excitatory Synapses',pp.359-385,
Springer, 2016

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩崎 広英 (IWASAKI, Hirohide)
東京大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：30342752

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

岡部 繁男 (OKABE, Shigeo)
東京大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：60204012

(4) 研究協力者

該当なし