

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08128

研究課題名(和文) -プロトカドヘリンの中枢神経系および頭部器官の発生・構造維持における機能的意義

研究課題名(英文) Functional significance of the delta-protocadherins in the development of the CNS and the rostral structures

研究代表者

村上 徹 (Murakami, Tohru)

群馬大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：10239494

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：胚から成体まで -カドヘリンの中枢神経系・頭部器官の発生や構造維持における機能を示すことを本計画目的とした。そのために胚から成魚までのスケールの標本に対して高スループットで立体的に形態解析する方法の開発に臨んだ。4、5ミリメートルから数センチメートルまでの標本については良好な画像を得る技術が完成し、遺伝子改変動物の形態的スクリーニングに応用した。より高解像度の画像を得るための技術開発をし、拡大率1:2までは良好な画像を得られ、これによりゼブラフィッシュ成魚の3Dデータを蓄積した。それ以上の拡大には課題が生じた。現在は、装置の改善と染色や包埋法のベストプラクティスを検索する過程にある。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this project was to elucidate the significance of the delta-protocadherins in the development and maintenance of the CNS and rostral structures. High throughput 3D analysis technology was developed to make structural analyses of the embryos though adult animals, which successfully yielded detailed 3D images of specimens of several millimeters to centimeters. There were encountered some difficulties on a development of technologies for higher resolution 3D images, which prompted further pursuit for the best practices of imaging and molecular staining technologies.

研究分野：解剖学、発生学、発生生物学、細胞生物学

キーワード：発生学・形態形成学 エースイメージング 細胞接着因子 プロトカドヘリン ゼブラフィッシュ 3D画像解析 ブロックフ

1. 研究開始当初の背景

細胞接着因子カドヘリンは、クラシック・カドヘリン、デスモソーム・カドヘリン、プロトカドヘリン(Pcdh)に大別される。プロトカドヘリンはさらにゲノム上の構造によりクラスター型と非クラスター型に分けられる。クラスター型 Pcdh はいずれも脳に発現し細胞の多様性や神経網の複雑性の分子基盤をなすと考えられている。

一方、非クラスター型 Pcdh は系統発生的に 1、2、の3つのファミリーに分けられる。-Pcdh(1と2)は中枢神経系、頭部構造、体節などに発現して、それらの発生および構造維持に関与すると考えられている。それらの発現パターンはクラスター型と比較して極めて多様であり、複数因子間の相互作用もあり、その複雑性の意義には解明の余地が多く、特に、成体における発現解析や機能解析は限定的だった。

2. 研究の目的

ゼブラフィッシュの胚から成魚まで、

-Pcdh の中枢神経系・頭部器官の発生や構造維持における機能を示すことを本計画目的とした。そのために、胚から成魚までのスケールの標本に対して高スループットで立体的に形態解析する方法の開発に臨んだ。

3. 研究の方法

申請者は、研究協力者とともに 4、5 ミリメートルから数センチメートルまでの標本を高スループットで 3D 画像データを取得する装置を開発した。すなわち、標本を凍結して連続削切しながらその断面を撮影し、3D データにする。それを元に、医療画像ソフトウェアの OsiriX を利用して再構築などの解析をする。連続削切しながら切片を回収して組織染色することも可能である。本計画では、組織染色された標本や数ミリメートル未満の標本もデータ化できるよう、装置や技術を改良した。

4. 研究成果

形態を 3D 画像で解析する方法を調査・開発から計画が始まった。4、5 ミリメートルから数センチメートルまでの標本については良好な画像が得られ研究成果にも役立った。数ミリ以下の標本については技術開発に困難があり、当初の目的に沿って十分な成果を得るべく検索を続けているところである。

(1) クライオスタットを用いたシリアルブロックフェイスイメージング:

一般的なクライオスタット(凍結切片作成装置)に市販のデジタル一眼レフカメラを取り付け、試料ブロックの切削面をマクロ撮

影した。この際、クライオスタットのモーターとカメラとを同期させる装置を自作し、自動的に連続撮影できるようにした。撮影した画像をボリュームデータ(xyzの3方向の画像データ)にまとめ、医療用の画像処理ソフトウェアを用いて任意断面像や 3D 像を作成した(論文, 学会)。この技術を遺伝子改変マウスの形態的スクリーニングに応用した(論文, 学会)。

(2) 滑走式マイクロトームを用いたシリアルブロックフェイスイメージング:

(1)の方法では、拡大比がたかだか 1:1 までで、胚や小組織片には解像度が不足していた。より高倍率のレンズを使えるよう、滑走式マイクロトーム(ナイフが試料上を滑走するタイプの切片作成装置)を利用し、上と同様に試料の切削面を連続撮影する装置を開いた。樹脂包埋した試料の場合、試料が半透明なために切削面だけの良好な画像が得られなかった。そのため、滑走式マイクロトームに取り付けられる凍結装置を用い、凍結試料を使った(図1)。拡大率 1:2 までは良好な画像を得られた。これを用いて、ゼブラフィッシュ成魚の 3D データを蓄積した(図2)(学会)。



図1 装置全景

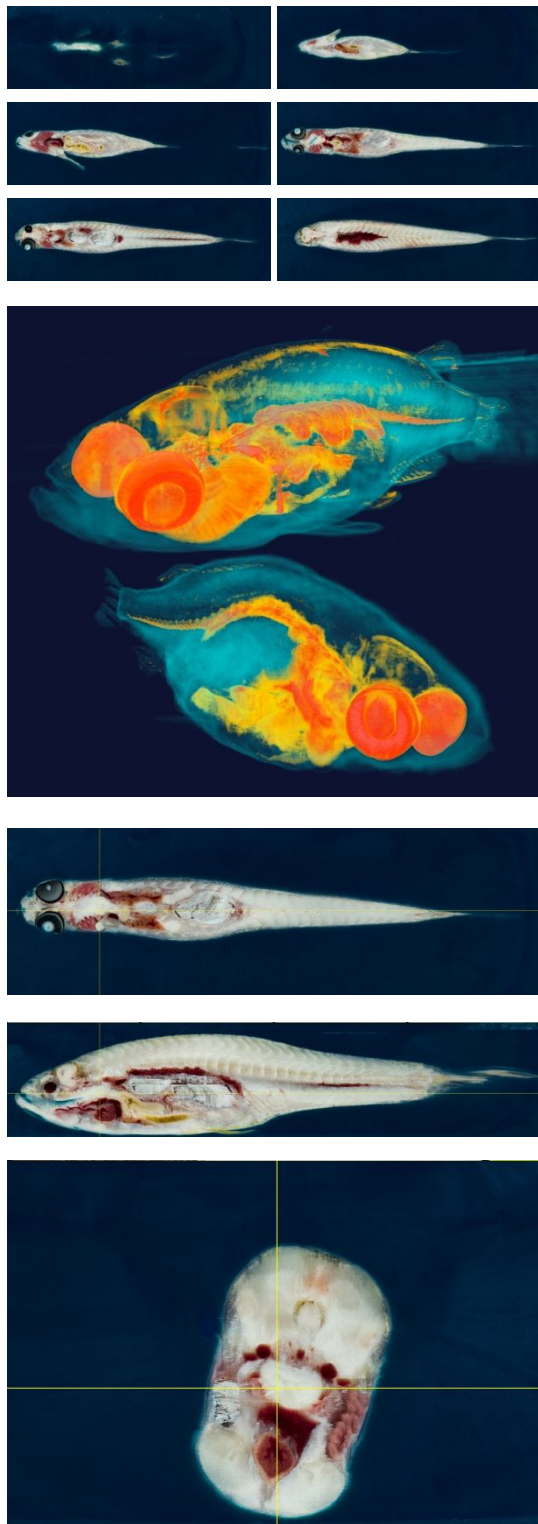


図2 連続画像(一部)と、それから再構築した画像。(上から)連続画像(6枚を抜粋)、再構築3D像、再構築前頭面、再構築矢状面、再構築横断面

しかし拡大率 1:4~1:5 になると、装置の振動が画像上で顕著に表れるため、3D化に困難が生じた。また、拡大による露光量の低下のため撮影自体にも困難が増した。

(3) 全載標本への染色技法：

ブロックフェイスイメージングで効果のある染色法や包埋法の開発を行った。染色法については対象ごとの調整が求められた。包埋法については、凍結包埋材を着色することによって良好なコントラストが得られる場合があった(学会)。いずれもベストプラクティスを検索している過程にある。

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2件)

Ikezawa, M., Tajika, Y., Ueno, H., Murakami, T., Inoue, N., & Yorifuji, H. (2018). Loss of VAMP5 in mice results in duplication of the ureter and insufficient expansion of the lung. *Developmental Dynamics*, 247(5), 754-762.

<http://doi.org/10.1002/dvdy.24618>

(査読あり)

Tajika, Y., Murakami, T., Iijima, K., Gotoh, H., Takahashi-Ikezawa, M., Ueno, H., et al. (2017). A novel imaging method for correlating 2D light microscopic data and 3D volume data based on block-face imaging. *Scientific Reports*, 7(1), 3645. <http://doi.org/10.1038/s41598-017-03900-9> (査読あり)

〔学会発表〕(計4件)

多鹿友喜、村上 徹、上野仁之、依藤 宏. 2018/3. 同一標本で切片観察と3Dイメージングを行う手法の開発. 第123回日本解剖学会総会・全国学術集会. 日本獣医生命科学大学(東京都武蔵野市).

多鹿友喜、村上 徹、池澤麻衣子、上野仁之、依藤 宏. 2017/3. 胎生期マウスの2Dおよび3D形態解析. 第122回日本解剖学会総会・全国学術集会. 長崎大学坂本キャンパス(長崎県長崎市).

村上 徹、多鹿友喜、上野仁之、池澤麻衣子、依藤 宏. 2016/3. Visible Fish *Danio rerio*. 第121回日本解剖学会総会・全国学術集会. ビッグパレットふくしま(福島県郡山市).

Yuki Tajika, Tohru Murakami, Maiko Takahashi, Hitoshi Ueno, Hiroshi Yorifuji. 2015/12. Serial block-face imaging system for both 3D morphology and section histology. ASCB Annual Meeting. Moscone Center (San Diego, USA).

(4)研究協力者
多鹿 友喜 (Tajika, Yuki)

〔図書〕(計0件)

〔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

Protocols (実験方法)
<http://pandora.med.gunma-u.ac.jp/protocols/>

Portfolio (公開データ)
<http://pandora.med.gunma-u.ac.jp/portfolio/>

6. 研究組織
(1)研究代表者
村上 徹 (Murakami, Tohru)
群馬大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：10239494

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：