

令和元年6月4日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08480

研究課題名(和文) サテライトグリアの亜種をマルチモダル組織化学観察によって斬る！

研究課題名(英文) Multi-mode 3D-histochemical observation of satellite glia.

研究代表者

山田 久夫 (YAMADA, Hisao)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：00142373

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)：終脳皮質と脊髄後根神経節を対象に、サテライト細胞をはじめとするニューロンに接するグリア細胞を、一般組織化学法・3次元電顕・質量顕微鏡など先端的手技を多面的(マルチモダル)に相関させつつ観察した。この方法で、化学物質の細胞局在とともに細胞形態を立体的把握し、サテライト細胞をはじめとするグリア細胞の亜種を特徴づけることができた。さらに3次元電顕のデータを3次元プリンタソフトに取り込ませ、再成形した模型を手にとって観察する手技を確立した。これによってPCのモニター画面で立体観察するより、正確に細胞形態を理解することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の大きな特徴は、先端的な観察手技(CLEM法、3次元電顕、質量顕微鏡)を用いたうえで、それらを組み合わせるという斬新なアイデアを実行したことである。さらに3次元プリンタでの再現は、真核細胞では世界初の取り組みで、身体の立体地図帳づくりという「知」の財産を提供する社会的意義を持っている。一方、新種の細胞発見や脳由来胆汁酸(ニューロステロイド)という新規概念の提唱は、学術的に大きな意義を持つ。

研究成果の概要(英文)： To observe the glia cells including satellite cells which encroach on the neurons in the telencephalic cortex and the dorsal root ganglia, we made the advanced procedures such as the imaging mass spectrometry, three-dimensional (3D) electron microscope and correlative light and electron microscopy histochemistry. These multi-modal observation method revealed 3D cell shape with the subcellular localization of the biochemical substance to characterize the glia cells. Furthermore, the segmentation data of the cells was converted into STL file, and then the model cell was created with a 3D printer. Thereby we became able to understand 3D cell shape more precisely than we observed on the monitor screen of the PC. As one of our results, we characterized a new type of glia (p75-positive glia) in the rat dorsal root ganglia.

研究分野：神経解剖学

キーワード：サテライト細胞 グリア細胞 脳由来胆汁酸 質量顕微鏡 光 電子相関観察(CLEM) マルチモダル観察 3次元電顕 3次元プリンタ

## 1. 研究開始当初の背景

- (1) サテライトグリアは、ニューロンに食い込んで接するグリア系の細胞で、終脳皮質では、この範疇の細胞本体はオリゴデンドロサイト・アストロサイト・ミクログリアのいずれかであると考えられている。われわれはこの中に、この3者に属さないで、NG2 というマーカーに陽性の細胞群を見出し発表している(引用文献 - )。この細胞は分裂能を持ち、内在性神経系幹細胞と理解されている。障害刺激後、新生したグリア細胞がどのような性質をもって分化していくのか、ニューロン近傍にはさらに他の性質を持つグリア細胞が存在するのか、即ちサテライト細胞の亜種を明らかにする必要がある。
- (2) 一方、終脳のように神経管由来ではなく神経堤由来の神経組織である後根神経節(DRG)にもサテライト細胞が存在する。ここでは、サテライト細胞がDRGニューロンの細胞体を取り囲む一方、有髄または無髄の神経突起はそれぞれ別のタイプのシュワン細胞が取り囲むと考えられている。しかしながら、偽単極性のニューロンの有髄突起がT字にわかれるまでの起始部では、有髄シュワンのように1:1で神経突起を巻き込みながらも髄鞘を形成しないグリア細胞が存在する。このグリア細胞は数十年以上前に軸索型サテライトと命名されていたが、その後全く研究対象とならずに忘れ去られていた。われわれはこのグリア細胞に着目した研究をおこなっていて、計画立案時までには、チャネル分子や分裂能における多様性を見出している。この亜種の特徴を明らかにしたいと考えた。

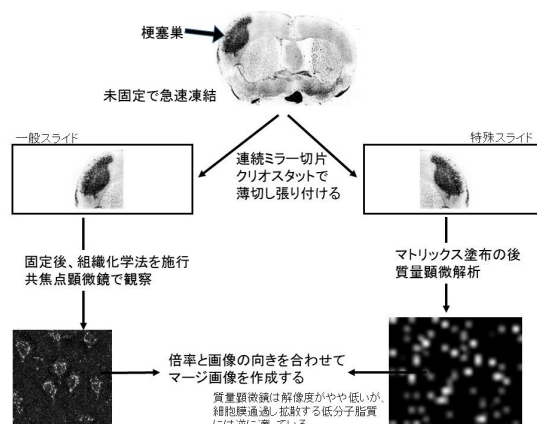
## 2. 研究の目的

近年、化学物質の局在を顕微鏡下にとらえる「組織化学法」が、染色(化学反応)系のみならず、透明化技術という標本作製手技や共焦点レーザー स्क্যান顕微鏡のような観察手技においても発展を遂げている。その結果これまで明らかにできなかった化学物質の組織局在や物質相互関係および立体観察が可能となった。一方、一般の組織化学法では全く観察不可能な、低分子脂質に関しては、質量顕微鏡(質量分析イメージング)の手技が、解像度や他の組織化学との併用不可などのデメリットを抱えながらも有用な知見を与えるようになってきた。また、電子顕微鏡の領域では、走査電顕の反射電子を観察することによって、透過電顕と同様の画像を得る手技が使用され始め、組織ブロック表面を物理的に切削させながらブロック側の表面を観察することによって断層観察し、そのデータをもとに3次元解析することができるようになってきた。しかしながらこの方法では、走査電顕のひとつの特徴である広範囲観察ができないことや、組織化学法を施すことができない事など大きな欠点をも併せ持っていた。そこでわれわれは、ブロック表面からではなく連続切片からデータを取得する array-tomography 法を改良することを試みてきた。

本計画の目的は、これらの最先端の手法を改良しつつ、マルチモダルに組み合わせ、終脳皮質と脊髄後根神経節内のグリア細胞(とりわけニューロンに近接するサテライト細胞)の形態的・組織化学的観察をおこない、その差異をもとに亜種の特徴付けをおこなうことが本計画の目的である。

## 3. 研究の方法

- (1) 質量顕微鏡: 安楽死させた動物から脳標本を取り出し、直ちに凍結の後、クリオスタットで薄切する。質量顕微鏡用の非固定標本は、導電性のある特殊スライドガラスに張り付けマトリックスを塗布したのち、島津 iMScope 質量顕微鏡にて解析した。隣接切片は通常のスライドガラスに張り付け、固定液に浸してから

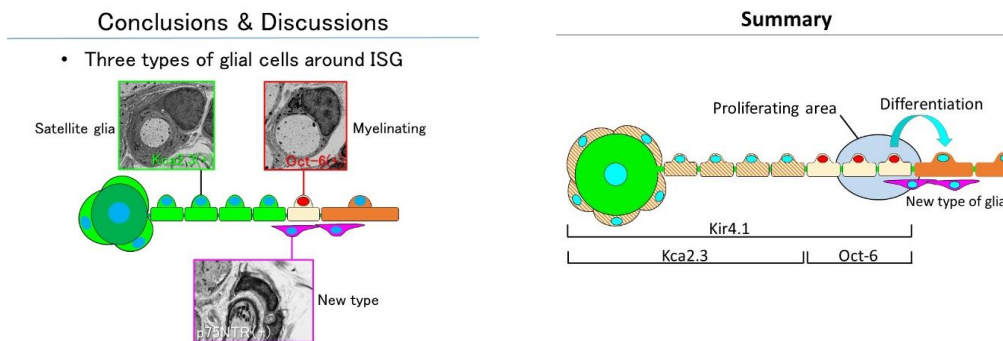


- 合成酵素などを免疫組織化学的に染色し、質量顕微鏡画像と重ね合わせた。(学会発表 )
- (2) 組織化学法と立体観察: マウス・ラットを用い、かん流固定後クリオスタットで神経組織標本作製し、各種抗体を用いて免疫組織化学法を施す。この標本を共焦点レーザー走査顕微鏡で観察、そのデータから立体観察像を得た。
- (3) CLEM correlative light and electron microscopy: 単純には光顕像と電顕像を相関させながら観察する事であるが、最近では特に、光顕レベルの組織化学画像と3次元電顕を組み合わせて相関観察することをさす。われわれは、厚切り切片で光顕レベルの組織化学をおこなったのち再包埋し3次元電顕観察をおこなう方法、水溶性樹脂に包埋した電顕切片に金粒子を組織化学的標識し電顕観察する方法、同じく水溶性樹脂包埋しシリコンウエハーに張り付けた切片に蛍光標識の組織化学をおこなって落射型蛍光顕微鏡と走査電顕で観察するという、3種のCLEM法を試した。(学会発表 )
- (4) 3次元電顕: われわれは、array-tomography用のリボン状連続切片作製を安価・簡便におこなうための器具作成法を開発し、報告した(雑誌論文、学会発表)。この器具を使用し、理化学研究所(理研-JEOL連携センター)に設置の走査電顕で反射電子データを取得した。
- (5) 3次元プリンタ: 3次元電顕で得られた画像データをモニター画面上でセグメンテーションし、その電子データを3次元プリンタ用に変換後、Stratasys社製のEden260VSにて造形した。その結果、3次元像をモニター画面上で確認するよりはるかに正確に、細胞の板状突起や絡み合いなどがわかりやすく理解できた。(雑誌論文、学会発表)
- (6) 脳梗塞モデルマウス: 中大脳動脈電気焼灼によって、極めて安定的に、永久脳梗塞動物を作出することができる。正常動物以外に、病態モデルとして、このモデルを用いた。

#### 4. 研究成果

- (1) 皮質型サテライト細胞-オリゴデンドロサイト系譜の研究: まず質量顕微鏡にて、髄鞘形成細胞・オリゴデンドロサイトがもつ低分子脂質を追究した。複合糖脂質・スルファチド類は、含まれる脂肪酸の種類が様々である。一方、オリゴデンドロサイトのマーカーとして確立された04モノクローナル抗体のエピトープは、髄鞘に豊富なC22やC24の脂肪酸を含むスルファチドと考えられてきたが、スルファチド合成が生化学的手法により確認できない幼若期オリゴデンドロサイトでも、この抗体によって免疫組織化学的陽性となること、長らくこの分野の研究者にとって謎であった。それらを解決するために質量分析および質量顕微鏡にて分子種を同定した結果、幼若期のオリゴデンドロサイトはC16やC18の脂肪酸を含むスルファチドを含有することが明らかとなった。また、04モノクローナル抗体は脂肪酸の炭素鎖以外の部分をエピトープとし、炭素数に影響されることなくスルファチド全般を認識するという成果も得られた。(雑誌論文、学会発表)
- (2) 皮質型サテライト細胞-オリゴデンドロサイト系譜の研究: 次に病態モデルとして、クプリゾン投与による脱髄モデルを考えていたが、異なる発想から中大脳動脈を電気焼灼しラットの終脳皮質に安定して永久梗塞を生じさせるモデルを開発し、こちらを用いるよう修正した。このモデルマウスをもちいて、脳標本の隣接切片を取得、片側に組織化学法(合成酵素・抱合化酵素・受容体などに対する免疫組織化学)を適用、もう片側に質量顕微鏡法を適用し、梗塞巣のニューロンやグリアで、コレステロールから胆汁酸(タウロコール酸)合成を証明した。また、その機能についても培養細胞などを用いて検討を加えた。その成果は論文執筆中であるが(学会発表)、胆汁酸産生と標的への作用の過程に、ニューロン・アストロサイト系細胞・ミクログリア系細胞などが関与していることが明らかとなった。また本成果の副産物として、脳由来胆汁酸(ニューロステロイド)という新規神経内分泌因子の発見となった。(雑誌論文)ただし、3次元電顕観察を試みたが、質量顕微鏡・光顕組織化学・走査電顕で互いに相いれない標本作製条件であり、これをクリアできなかった。この改良が今後の課題と考えている。

- (3) 脊髄後根神経節のサテライト細胞-シュワン細胞系譜の研究： 偽単極性ニューロンの神経突起無髄部に存在するグリア細胞（神経突起型サテライト）は、すべて細胞体型サテライト細胞と同じでカリウムチャンネル分子 Kir4.1 を持つが、近位側ではカルシウム依存性カリウムチャンネル Kca2.3 を持ち、遠位側ではこのチャンネルを持たずに Oct6 という未分化マーカーを持つ。また、チミジンアナログ投与実験で分裂能が確認されたグリア細胞のうち、遠位部に存在する 60-70%は Oct6 陽性グリアであった。Oct6 は髄鞘形成期のマーカーと考えられるので、第 1 髄鞘付近を検索したところ、分裂・新生したサテライト細胞が髄鞘を形成し、有髄シュワンに分化していく過程が観察された。つまり 3 群の亜種細胞の特徴付けがおこなえた。（学会発表 ）



- (4) 一方、これらの実験の過程で、DRG 内に、さらに新たなグリア系細胞を発見した。髄鞘開始部周辺を外側から覆うように存在する細胞で、数種のグリア系マーカーに陽性を呈することから、本計画で明らかにするべき新分類の細胞と考えて、詳細に解析した。この過程で 3 次元電顕による解析に加え、このデータを変換して 3 次元プリンタに應用したところ、無数にある板状の小突起の絡み合う様子が観察された。模型を手にとって観ることはモニター画面で 3 次元的に観るよりも優れた観察が可能で、「切り刻んで観る」から「造形してみる」という「解剖学のパラダイムシフト」が、研究推進に役立ったといえる（雑誌論文、学会発表）。光顕レベル組織化学法・3 次元電顕 3 次元プリンタを組み合わせる CLEM-3D-printer 法は、真核細胞への世界初の応用であり、所属大学広報からメディアリリースされ、全国版新聞紙上に取り上げられた。

#### <引用文献>

Tamura Y, et al.,  
Multi-directional differentiation of doublecortin- and NG2-immunopositive progenitor cells in the adult rat neocortex in vivo.  
*Eur J Neurosci*, 25(12): 3489-3498, 2007

Tamura Y, et al.,  
Intracellular translocation of glutathione S-transferase pi during oligodendrocyte differentiation in adult rat cerebral cortex in vivo. *Neuroscience*, 148(2): 535-540, 2007.

Kataoka Y, et al., Perineuronal germinal cells in the rat cerebral cortex.  
*Med Mol Morphol*, 39(1): 28-32, 2006.

Kataoka Y, et al., Neural activity-dependent cellular proliferation in the rat cerebral cortex. *Acta Histochem Cytochem*, 38(2): 93-98, 2005.

Tamura Y, et al., Cellular proliferation in the cerebral cortex following neural excitation in rats. *Neurosci Res*, 50(1): 129-133, 2004.



## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕（計6件）

Koike T, Tanaka S, Hirahara Y, Oe S, Kurokawa K, Maeda M, Suga M, Kataoka Y, Yamada H.

Morphological characteristics of p75 neurotrophin receptor-positive cells define a new type of glial cell in the rat dorsal root ganglia.

*J Comp Neurol*, 527(12): 2047-2060, 2019. doi: 10.1002/cne.24667.

Koike T, Yamada H.

Methods for array tomography with correlative light and electron microscopy.

*Med Mol Morphol*, 52(1): 8-14, 2019. doi: 10.1007/s00795-018-0194-y.

Takamori Y, Hirahara Y, Wakabayashi T, Mori T, Koike T, Kataoka Y, Tamura Y, Kurebayashi S, Kurokawa K, Yamada H.

Differential expression of nuclear lamin subtypes in the neural cells of the adult rat cerebral cortex.

*IBRO Rep*, 5:99-109, 2018. doi: 10.1016/j.ibror.2018.11.001.

Hirahara Y, Wakabayashi T, Mori T, Koike T, Yao I, Tsuda M, Honke K, Gotoh H, Ono K, Yamada H.

Sulfatide species with various fatty acid chains in oligodendrocytes at different developmental stages determined by imaging mass spectrometry.

*J Neurochem*, 140(3): 435-450, 2017. doi: 10.1111/jnc.13897.

山田久夫, 平原幸恵 .

ニューロステロイド研究の歴史的経緯

*Horm Front Gynecol*, 24(2): 103-108, 2017.

Koike T, Kataoka Y, Maeda M, Hasebe Y, Yamaguchi Y, Suga M, Saito A, Yamada H.  
A Device for Ribbon Collection for Array Tomography with Scanning Electron Microscopy.

*Acta Histochem Cytochem*, 50(5): 135-140, 2017. doi: 10.1267/ahc.17013.

### 〔学会発表〕（計13件）

和田早織、大江総一、平原幸恵、齋藤育、山田久夫

虚血脳における胆汁酸産生の解析

第124回日本解剖学会総会 2019/03/27 新潟

大江総一、和田早織、平原幸恵、小池太郎、田中進、山田久夫

虚血脳におけるCYP7A1発現制御のメカニズムの解析

第124回日本解剖学会総会 2019/03/27 新潟

小池太郎、田中進、平原幸恵、大江総一、山田久夫

3Dプリンターを用いた新規DRGグリア細胞の立体構造観察

第124回日本解剖学会総会 2019/03/27 新潟

第59回日本組織細胞化学学会総会・学術集会 2018/09/29 宮崎

小池太郎、田中進、平原幸恵、大江総一、山田久夫

後根神経節における新規グリア細胞の三次元形態

第59回日本組織細胞化学学会総会・学術集会 2018/09/29 宮崎

小池太郎、山田久夫

CLEM-Array tomographyを用いた後根神経節内グリア細胞の観察

第50回日本臨床分子形態学会総会・学術集会 2018/09/07 東京

Koike T, Maeda M, Suga M, Tanaka S, Hirahara Y, Oe S, Kataoka Y, Yamada H.

CLEM-3D view reveals new type glial cell in the DRG

第41回日本神経科学大会 (Neuroscience2018) 2018/07/27 神戸

小池太郎、齋藤育、山田久夫

Array tomographyのための基板吊り下げ型リボン回収装置

医学生物学電子顕微鏡技術学会 第34回学術講演会および総会 2018/05/18 東京

平原幸恵、山田久夫

質量分析イメージング法による低分子化合物の可視化と応用

第123回日本解剖学会総会・全国学術集会 シンポジウム 2018/03/30 東京

小池太郎, 田中進, 平原幸恵, 大江総一, 高森康晴, 山田久夫  
CLEM Array tomography を用いた後根神経節におけるグリア細胞の解析  
第 123 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2018/03/29 東京  
和田早織, 大江総一, 平原幸恵, 齊藤育, 山田久夫  
脳梗塞急性期における胆汁酸生合成  
第 123 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2018/03/28 東京  
小池太郎, 大江総一, 平原幸恵, 田中進, 山田久夫  
DRG ニューロン突起起始部を被うグリア細胞の分類と分布パターン  
第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2017/03 長崎  
小池太郎, 片岡洋祐, 前田光代, 齊藤育, 高森康晴, 山田久夫  
基板吊り下げ型補助具を用いた超薄連続切片回収法  
第 57 回日本組織細胞化学会総会・学術集会 2016/09 東京  
平原幸恵, 小池太郎, 高森康晴, 山田久夫  
TOF-SIMS 法を用いたマウス成獣脳におけるスルファチドバリエーションの局在解析  
第 57 回日本組織細胞化学会総会・学術集会 2016/09 東京

[ その他 ]

- 研究室の研究紹介のホームページ ( 入り口ページ ) :  
<http://www3.kmu.ac.jp/anat1/kenkyu/index.html>
- メディアリリース : 「 3D プリンタが開いた新たな世界 」 2019 年 3 月 4 日  
<http://www.kmu.ac.jp/news/laaes70000006xlt-att/laaes70000006xmh.pdf>
- メディアへの取り上げ : 日刊工業新聞 3 月 13 日号 26 面  
「 関西医大 新種の細胞発見 3D プリンタで詳細観察 」

6 . 研究組織

(1) 研究協力者

研究協力者氏名 : 田中 進                      ローマ字氏名 : TANAKA, susumu  
所属研究機関名 : 関西医科大学              部局名 : 医学部                      職名 : 准教授  
研究者番号 ( 8 桁 ) : 30399472

(2) 研究協力者

研究協力者氏名 : 平原 ( 和田 ) 幸恵          ローマ字氏名 : HIRAHARA, yukie  
所属研究機関名 : 関西医科大学              部局名 : 医学部                      職名 : 講師  
研究者番号 ( 8 桁 ) : 70457969

(3) 研究協力者

研究協力者氏名 : 大江 総一                      ローマ字氏名 : OE, souichi  
所属研究機関名 : 関西医科大学              部局名 : 医学部                      職名 : 助教  
研究者番号 ( 8 桁 ) : 70599331

(4) 研究協力者

研究協力者氏名 : 小池 太郎                      ローマ字氏名 : KOIKE, taro  
所属研究機関名 : 関西医科大学              部局名 : 医学部                      職名 : 助教  
研究者番号 ( 8 桁 ) : 00735590

(5) 研究協力者

研究協力者氏名 : 和田 早織                      ローマ字氏名 : WADA, saori  
所属研究機関名 : 関西医科大学              部局名 : 医学部  
職名 : 研究医養成コース学生

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。