

令和 5 年 5 月 4 日現在

機関番号：32202

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21506

研究課題名（和文）生体3次元構造-元素相関解析の技術開発を基盤とした老化メカニズム解明への挑戦

研究課題名（英文）Challenge to clarify mechanisms of aging on the basis of technological development of 3 dimensional structural-element correlative analyses in the body

研究代表者

大野 伸彦（Ohno, Nobuhiko）

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：10432155

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：長期高リン食負荷マウスの腎組織を用いて試料作製法を検討し、リン酸カルシウム粒子(CaP)の組織内観察に適した方法を開発した。この過程で高圧凍結-凍結置換固定を用いることに加えて電子染色を低減し、走査型電子顕微鏡における高感度検出器を用いたイメージングを応用して、CaPを組織内に保ち、3次元解析にも応用可能と考えられる微細形態観察技術確立した。蛍光プローブを用いた光電子相関顕微鏡観察も併用し、軽度なCaP形成を検出可能な手法を開発した。これらの技術を応用し、皮質髄質境界部の近位尿管内部のCaPの形成、および粒子の成長過程におけるマグネシウムの関与の可能性を見出し、論文発表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リン代謝異常に伴うリン酸カルシウム粒子(CaP)の形成は、老化の加速と臓器機能低下につながる可能性が指摘されたが、CaPの微細構造レベルでの観察は困難で、組織内のCaP形成過程や周囲組織への影響などの進行過程の大部分が不明であった。本研究では、技術開発によりCaPの初期形成過程を明らかにするとともに、マグネシウムがその生体内での形成に深く関わる可能性を明らかにした。本研究の成果は、走査型電子顕微鏡を用いた新たな形態イメージング技術確立してCaPによる病態の理解のための今後の研究の基礎を築くとともに、CaPが関与する臓器障害の予防や改善に向けた介入方法の開発に貢献すると期待される。

研究成果の概要（英文）：We developed sample preparation methods using renal tissue from mice on a long-term high-phosphate diet and developed methods suitable for observation of calcium phosphate particles (CaP) in the tissues. In addition to using high-pressure freezing and freeze-substitution, we minimized electron staining and utilized imaging with a highly sensitive detector in scanning electron microscopy to keep CaP in the tissues, and finally established technique for ultrastructural observation that could be applicable to 3-dimensional analyses. Combined with correlative light and electron microscopy using fluorescent probes, we developed a technique that can detect small CaP. By applying these techniques, we found the formation of small CaP particles in the proximal tubules at the corticomedullary border and the possible involvement of magnesium in the growth of CaP, and published the results.

研究分野：解剖学

キーワード：電子顕微鏡 リン酸カルシウム エネルギー分散型X線分析 光電子相関顕微鏡

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

リン代謝異常に伴うリン酸カルシウム(CaPi)の沈着は、細胞障害や慢性炎症を介して、老化の加速と臓器機能低下につながる可能性が指摘されている。しかし CaPi の精緻かつ微細構造レベルでの観察は困難で、組織内の CaPi 形成過程や、その伝搬、そして周囲組織への影響など、臓器障害の進行過程の大部分がよくわかっていなかった。また、走査型電子顕微鏡(SEM)によるエネルギー分散型 X 線分析(EDX)は、試料の元素組成情報を得るため、材料科学分野を中心に活発に用いられていたが、こうした手法の組織内 CaPi 形成過程の解明への応用は、ほとんど行われていなかった。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、試料の元素組成情報を得る目的で活発に用いられているエネルギー分散型 X 線分析(EDX)による元素マッピングに走査型電子顕微鏡 (SEM) による 3 次元構造解析と関連技術開発を組み合わせ、生体内元素成分の分布を正確にとらえる技術を開発し、高リン負荷状態下を中心とした生体腎臓内の CaPi の形成過程の可視化に応用することである。

### 3. 研究の方法

高リン含有食を摂取したマウスより、腎などの組織を採取し、化学固定、導電ブロック染色、樹脂包埋を行った。連続切片の導電性基盤上への回収、もしくは集束イオンビーム(FIB)切削の反復などを SEM 観察と組み合わせ、反射電子検出による電顕画像と EDX による元素マップの相関画像を取得した。3次元再構築と相関解析を行い、得られたデータを光顕、生化学データと統合し、CaPi の形成と伝搬過程の解明を目指した。この中で、組織内成分の保持に優れる高圧凍結法を用いて、高リン含有食摂取マウスの腎などの組織を採取、凍結することを試みた。そして、タンニン酸、ウランなどを用いた凍結置換固定法により、強い導電染色も検討した。樹脂包埋後、電顕画像-元素マッピング像の取得を行う際、生物組織の包埋用の樹脂は導電性が極めて低く、SEM 観察ではチャージングのアーチファクトや電子線ダメージが起きやすい。そのため、この問題に対して樹脂に特殊な添加剤を加え、樹脂自体の導電性と物理特性を改善し、高解像度の構造-元素相関観察のための樹脂包埋法の開発・応用も目指した。

### 4. 研究成果

まずは明らかな CaPi 結晶の形成が認められる高リン食を長期間負荷したマウスの腎組織を用いて試料作製法を検討し、SEM と EDX による元素観察による CaPi の組織内観察に適した方法を開発した。化学固定および導電染色による試料作製方法によっても大きな CaPi 粒子の元素分析と微細形態観察は可能であったが、高圧凍結固定-凍結置換固定法を用いることで、微細形態が非常に良好に保たれること、その中で CaPi の観察が可能であることが明らかになった。

この過程で、生物試料の電子顕微鏡観察に広く用いられている鉛を含む金属染色が、CaPi の安定性に影響を及ぼすことも明らかになった。そこで高圧凍結-凍結置換固定を用いることに加えて構造観察のための電子染色を極力低減し、オスmium酸による凍結置換固定のみによる処理を行い、さらに走査型電子顕微鏡における高感度検出器を用いた block-face imaging を応用した。このようにすることで、CaPi を組織内に保ったまま、3次元開発にも応用可能と考えられ

る微細形態観察技術を確立した。

次に、より軽度な CaPi の形成が起こる可能性のある短期間の高リン食負荷マウスの腎組織の解析を行った。この過程で、電子顕微鏡で観察可能な非常に限られた領域内に CaPi を捉えることができないという問題が明らかになった。そのため、光学顕微鏡により広領域を観察して CaPi をスクリーニングし、CaPi が観察される領域の電子顕微鏡観察を行うことを試みた。この目的で、蛍光標識アレンドロネート誘導体を応用した蛍光プローブを電子顕微鏡用試料の切片上に濃度を最適化して用いることで、組織内の CaPi を樹脂包埋試料の切片上で検出する技術を開発した。

これらの技術を統合した光電子相関顕微鏡観察を用いて、小さい CaPi を広い腎組織内で光顕レベルで検出した上で、SEM と EDX により詳細な解析を行うことのできる手法を確立した。このアプローチの結果、内腔表面に刷子縁を有する近位尿管の特に皮質髄質境界部の管腔内部において、CaPi の微細な粒子が形成されていることが分かった。さらに、小さい CaPi 粒子では大きい粒子に比較して、比較的高い Mg のシグナルが検出されることが分かった。この結果は、生体の腎組織内における CaPi 粒子の成長過程を、マグネシウムの含有が抑制する可能性を示唆していると考えられた。

以上の成果を 2 報の原著論文として発表し、さらに複数の学会発表として報告した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Shiizaki K, Tsubouchi A, Miura Y, Seo K, Kuchimaru T, Hayashi H, Iwazu Y, Miura M, Battulga B, Ohno N, Hara T, Kunishige R, Masutani M, Negishi K, Kario K, Kotani K, Yamada T, Nagata D, Komuro I, Itoh H, Kurosu H, Murata M, Kuro-O M	4. 巻 131
2. 論文標題 Calcium phosphate microcrystals in the renal tubular fluid accelerate chronic kidney disease progression	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Investigation	6. 最初と最後の頁 e14569
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1172/JCI145693	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Battulga Batpurev, Shiizaki Kazuhiro, Miura Yutaka, Osanai Yasuyuki, Yamazaki Reiji, Shinohara Yoshiaki, Kubota Yoshiyuki, Hara Toru, Kuro-o Makoto, Ohno Nobuhiko	4. 巻 13
2. 論文標題 Correlative light and electron microscopic observation of calcium phosphate particles in a mouse kidney formed under a high-phosphate diet	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 852
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-28103-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 4件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 大野伸彦
2. 発表標題 SBF-SEM生物組織の連続電子顕微鏡画像取得の後処理における最近の進展と課題
3. 学会等名 日本顕微鏡学会 ソフトマテリアル分科会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大野伸彦
2. 発表標題 3D電顕が見せる新しいイメージと応用
3. 学会等名 第50回日本腎臓学会東部学術大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大野伸彦
2. 発表標題 ポリウム電子顕微鏡による生体の3次元微細構造の探求
3. 学会等名 日本顕微鏡学会 第78回学術講演会 日本-タイ顕微鏡学会国際交流シンポジウム(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大野伸彦
2. 発表標題 電子顕微鏡のルネッサンス：細胞検査士、細胞診指導医が知っておくべき電顕の現況
3. 学会等名 第61回日本臨床細胞学会秋期大会(招待講演)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	黒尾 誠  (Kuro-o Makoto)  (10716864)	自治医科大学・医学部・教授   (32202)	
研究 分担者	原 徹  (Hara Toru)  (70238161)	国立研究開発法人物質・材料研究機構・技術開発・共用部門・ステーション長   (82108)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------