

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：13501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659336

研究課題名(和文) 3次元画像解析を用いた細胞内小器官の生活反応の解明

研究課題名(英文) Study on a vital reaction of organelles by three-dimensional image analysis using high-resolution fluorescent microscope

研究代表者

猩々 英紀 (SHOJO, Hideki)

山梨大学・総合研究部・准教授

研究者番号：60284626

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)：本研究では細胞内小器官の生活反応を指標とした新たな法医診断法を開発するために、高分解能蛍光顕微鏡を用いた3次元画像解析により細胞内小器官の形態を可視化し、脳損傷の痕跡が生活反応としてミトコンドリアの形態に保存されているか検討した。脳組織標本において、頭部外傷後の大脳皮質でミトコンドリアの形態が変化する事が示唆された。また、培養細胞ではミトコンドリアの形態は細胞が死に至る過程を反映しており、死後の細胞においても生活反応として保存されている可能性が示唆された。以上の結果から、高分解能蛍光顕微鏡を用いた3次元画像解析はミトコンドリアの生活反応を指標とした法医診断の開発に有用である事が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The goal of the current study was to investigate whether vital reaction of organelles considers as innovating forensic diagnosis, and to assess its potential as a novel biomarker; the 3-dimensional image (3DI) visualized the mitochondrial morphology via a the high-resolution fluorescent microscopy. To identify whether there was a causal relationship between brain damage and mitochondrial construction, we studied the fluctuation of mitochondrial morphology in the rat cerebral cortex after traumatic brain injury (TBI). In TBI damaged brain, the mitochondrial morphology was changed in comparison with control groups. In vitro model of cell death, the mitochondrial dynamics are associated with the process of cell death, suggesting that the mitochondrial structure was retained in the postmortem cells as a vital reaction. These results demonstrated that the 3DI analysis an effective manner to develop the novel forensic diagnosis that regards as a vital reaction of mitochondrial morphology.

研究分野：法医学

キーワード：法医学 細胞内小器官 ミトコンドリア 3次元画像解析 生活反応

1. 研究開始当初の背景

法医学において、死体から生活反応を可視化する事は、死因や事件・事故との因果関係を精査するうえで重要である。従来の法医診断は組織や器官レベルでの形態変化やタンパク質や遺伝子の発現変化など分子レベルでの解析が主であり、細胞内小器官を指標とした解析は少ない。高分解能蛍光顕微鏡 DeltaVision は非焦点面の蛍光も情報として利用する事で、3次元像を構築する時に切れ目の無い画像を再現できる。また、微弱な蛍光を高速で取得することができ、デコンボリューション技法と3次元画像解析を組み合わせる事により細胞内小器官の構造を高精度に復元できる。即ち、DeltaVision を用いた3次元画像解析は、これまで観察出来なかった細胞内小器官の形態変化や生活反応を可視化できる可能性がある。

一方、ミトコンドリアは二重膜構造の細胞内小器官であり、融合と分裂を頻りに繰り返してダイナミックに形態を変化させている [Nature Cell Biology (2009)]。また、生理的条件下においてミトコンドリアの形態の変化はミトコンドリアの機能を反映しており、細胞や生体のおかれた状態を理解する上で重要であると考えられている。さらに、神経変性疾患や頭部外傷後の脳においてもミトコンドリアの形態や局在が変化する事が示唆されている [Exp Neurology (2009), Prog Neurobiol(2006)]。従って、ミトコンドリアの形態はその機能を反映しており、死後の組織・細胞においても死の直前の状態がミトコンドリアの形態として保存されている可能性があると考えられる。そこで、3次元画像解析を用いた細胞内小器官の生活反応を解明する本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では高分解能蛍光顕微鏡を用いた3次元画像解析により細胞内小器官の形態を可視化する事によって、細胞内小器官の生活反応を指標とした新たな法医診断法の開発を目指し、脳損傷の痕跡が生活反応としてミトコンドリアの形態に保存されているかについて検討する事を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 頭部外傷モデル動物の作製

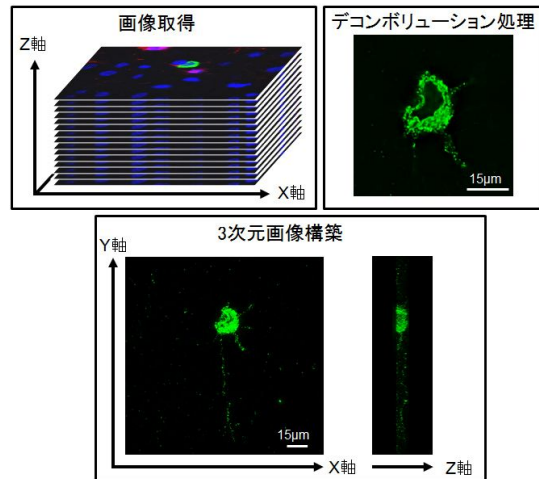
wistar 系ラットの右頭頂骨正中中部に骨窓を開け、脳挫傷作製装置を用いて側方打撃を加えた。その後、受傷3、6、12及び48時間後に灌流固定し、脳を摘出後、脳組織標本作製した。得られた脳組織標本を厚さ3~100 μm に薄切し、3次元画像取得の条件検討に用いた。

(2) 3次元画像解析

高分解能蛍光顕微鏡 DeltaVision を用いて画像を取得した [図 1]。また、DeltaVision 内蔵 SoftWoRx 4 と Huygens Essential を用

いて、それぞれアルゴリズムの異なるソフトでデコンボリューション処理し、3次元像構築後、画像を比較検討した。

図1. 3次元画像解析



(3) 免疫組織化学

頭部外傷により引き起こされる脳細胞及びミトコンドリアの形態を調べるために、抗 MAP2 及び抗 NeuN 抗体 (神経細胞)、抗 GFAP 抗体 (アストロサイト)、抗 IBA1 抗体 (ミクログリア) 及びミトコンドリア蛋白の一つであるチトクローム c に対する抗体を用いて免疫蛍光染色を行った。

(4) 培養細胞を用いたミトコンドリアの形態観察

ミトコンドリアの形態変化が、その機能及び生活反応を反映しているかについて調べるために、培養細胞 (ヒト神経芽細胞 SH-SY5Y、対照細胞としてヒト扁平上皮由来 HeLa 細胞及びヒト腎臓由来 HEK293) を用いた。

ミトコンドリア特異的試薬 (MitoTracker Deep Red FM, Red 580, Red CMXRos, Mito-ID Red Detection Reagent) を用いて蛍光染色後、ミトコンドリアの形態を観察した。

さらに、大腸菌を用いてミトコンドリア輸送シグナルに蛍光蛋白遺伝子を持つプラスミドを作製し、培養細胞に一過性に導入後、ミトコンドリアの形態観察を実施した。

なお、死に至る過程及び死の直前の細胞の状態を観察するために、固定条件 (固定温度 37 及び 4) を変化させる事により細胞死を誘導した。

4. 研究成果

(1) 脳組織標本において高分解能蛍光顕微鏡を用いた3次元画像解析は、脳細胞及びミトコンドリアの形態を可視化可能である。

組織標本から高分解能顕微鏡を用いて脳細胞やミトコンドリアの形態について詳細な観察を実施するために、まず3次元画像取得条件の検討を行った。厚さ3~10 μm 脳組織標本のでは均一な抗体 (抗 MAP2 抗体、抗

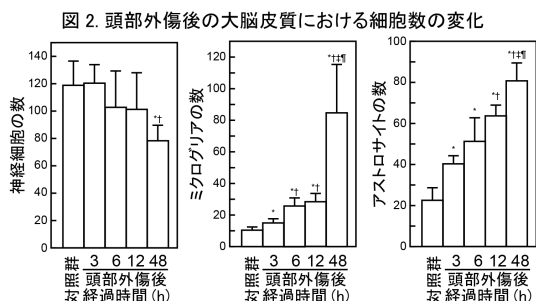
GFAP 抗体、抗 IBA1 抗体及び抗チトクローム c 抗体)の浸透を認めた。また、退色などによる明らかな蛍光強度の低下は認められず、精細な3次元画像を構築する事が可能であった。一方、厚さ 50 μm 以上の標本では、自家蛍光の影響が認められ、蛍光強度の低下が認められた。以下の実験では、安定して3次元画像を取得するために厚さ 6 μm の脳組織標本を実験に用いた。

さらに、DeltaVision 内蔵 SoftWoRx 4 と Huygens を用いて、それぞれデコンボリューションを行なった。その結果、Huygens は顕微鏡や画像の取得条件等を詳細にわたって入力可能であり、より精細な3次元像が構築可能である事が示唆された。

以上の結果から、脳組織標本において高分解能蛍光顕微鏡を用いた3次元画像解析は、脳細胞及びミトコンドリアの形態を可視化可能であった。

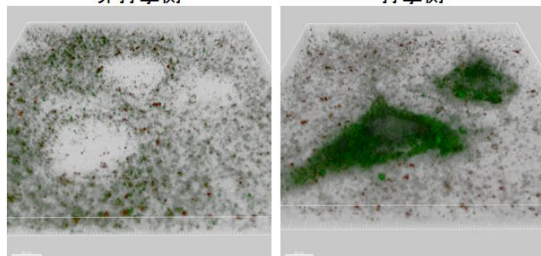
(2)頭部外傷後の大脳皮質では脳細胞及びミトコンドリアの形態変化が引き起こされる。

神経細胞は、頭部外傷3時間後に明らかな細胞体の委縮が認められた。また、神経細胞の数は受傷後時間経過に伴って減少し、受傷後48時間で有意に減少していた[図2]。



さらに、DeltaVision を用いた3次元画像解析において、受傷3時間後にチトクローム c のミトコンドリアからの漏出が認められ、受傷後早期にアポトーシスが引き起こされている事が分かった[図3]。

図3. DeltaVisionを用いた3次元画像解析
非打撃側 打撃側



チトクロームcの免疫蛍光染色(緑色)
頭部外傷後3時間の脳組織

一方、グリア細胞(ミクログリア及びアストロサイト)では、頭部外傷3時間後に細胞体の明らかな肥厚を認め、受傷後時間経過に

伴って細胞数が減少していた[図2]。

頭部外傷後の大脳皮質では神経細胞の委縮及びグリア細胞の肥厚などの明らかな形態変化が認められた。さらに、神経細胞ではアポトーシスに伴ってミトコンドリアの形態が変化する可能性が示唆された。この様に、脳組織標本において、高分解能蛍光顕微鏡を用いた3次元画像解析により、脳細胞及びミトコンドリアの詳細な形態を可視化する事が可能であった。

(3)ミトコンドリアの形態変化は、死後の細胞においても保存されている可能性がある。

SH-SY5Y 細胞、HeLa 細胞及び HEK293 用いてミトコンドリアの形態変化について検討を行った。ミトコンドリア特異的試薬を用いた蛍光染色では、全ての試薬において著しい蛍光強度の減少が認められ、正確なミトコンドリアの3次元像を取得する事が困難であった。

一方、ミトコンドリア輸送シグナルに蛍光蛋白遺伝子を持つプラスミドを一過性に導入した培養細胞では固定後明らかな蛍光強度の低下は認められなかった。そこで、種々の固定条件でミトコンドリアの形態変化を観察した。その結果、固定温度 4 °C では 37 °C に比べ著しいミトコンドリアの断片化を認め、固定条件の変化に伴ってミトコンドリアの形態が変化していた。即ち、ミトコンドリアの形態は、細胞が死に至る過程を反映しており、死後の細胞においても保存されている可能性が示唆された。

さらに、本研究において高分解能蛍光顕微鏡を用いた3次元画像解析はミトコンドリアの生活反応を指標とした法医診断の開発に有用である事が明らかとなった。

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)

Kaneko Y, Shojo H, Burns J, Staples M, Tajiri N, Borlongan CV. DJ-1 ameliorates ischemic cell death in vitro possibly via mitochondrial pathway. Neurobiol Dis. (2014) 62: 56-61. 査読有
DOI: 10.1016/j.nbd.2013.09.007.

Kaneko Y, Tajiri N, Shojo H, Borlongan CV. Oxygen glucose-deprived rat primary neural cells exhibit DJ-1 translocation into healthy mitochondria: A potent stroke therapeutic target. CNS Neurosci Ther. (2014) 20: 275-281. 査読有
DOI: 10.1111/cns.12208.

Adachi N, Umetsu K, Shojo H. Forensic strategy to ensure the quality of

sequencing data of mitochondrial DNA in highly degraded samples. Leg med. (2014) 16: 52-55. 査読有
DOI: 10.1016/j.legalmed.2013.10.001.

安達登, 猩々英紀, 梅津和夫. 東アジア人集団のミトコンドリア DNA 多型解析を目的とした新しい APLP システム. DNA 多型 (2014) 22: 140-143. 査読有
ISSN: 2188-3815

Borlongan CV, Burns J, Tajiri N, Stahl CE, Weinbren NL, Shojo H, Sanberg PR, Emerich DF, Kaneko Y, van Loveren HR. Epidemiological survey-based formulae to approximate incidence and prevalence of neurological disorders in the United States: a meta-analysis. PLoS One. (2013) 8(10):e78490. 査読有
DOI: 10.1371/journal.pone.0078490.
eCollection 2013.

[学会発表](計4件)

Shojo H, Tsuboi N, Iguchi R, Furuya H, Mochizuki A, Nakanishi H, Kakuda T, Takekawa K, Adachi N. Cross check is necessary for convenient drug-screening tests: two drug abuse cases. 9th International symposium on Advances in Legal Medicine. Jun. 16-20. (2014) 福岡国際会議場(福岡県・福岡市).

Kakuda T, Shojo H, Tsuboi N, Iguchi R, Umetsu K, Adachi N. New multiplex amplified product-length polymorphism system for haplogrouping extraordinarily degraded mitochondrial DNAs. 9th International symposium on Advances in Legal Medicine. Jun. 16-20. (2014) 福岡国際会議場(福岡県・福岡市).

安達登, 猩々英紀, 梅津和夫. ハプログループ D4 の細分化を目的としたミトコンドリア DNA 検査. 第 35 回日本法医学会学術中部地方集会, 2013 年 10 月 12 日, 金沢医科大学(石川県・河北郡).

猩々英紀, 安達登, 馬淵正. 頭部外傷におけるシクロオキシゲナーゼの分子動態の解析. 第 97 次日本法医学会学術集会, 2013 年 6 月 28 日, ロイトン札幌(北海道・札幌市).

[その他]

ホームページ等

http://www.med.yamanashi.ac.jp/social/legal0me/classroom_member/shohjoh.html

http://erdb.yamanashi.ac.jp/rdb/A_DispI

nfo.Scholar/3_61/F8AD215DD10A64A4.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

猩々英紀 (SHOJO, Hideki)
山梨大学・総合研究部・准教授
研究者番号: 60284626

(2) 研究分担者

馬淵正 (MABUCHI, Tadashi)
山梨大学・総合研究部・助教
研究者番号: 80150308

(3) 連携研究者

安達登 (ADACHI, Noboru)
山梨大学・総合研究部・教授
研究者番号: 60282125