

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 25 日現在

機関番号：37104

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670102

研究課題名(和文)カハール細胞ネットワークはシート状か? : 次世代電顕による間葉細胞の形態解析

研究課題名(英文)The three dimensional fine structural analysis of ICC by FIB/SEM tomography

研究代表者

中村 桂一郎(Nakamura, Kei-ichiro)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号：20172398

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)：結合組織に分布する間質細胞の形状・大きさ・周囲組織との関連についてFIB/SEMにより三次元微細構造解析を行った。透過型電子顕微鏡観察に匹敵する高解像度観察、光顕観察に匹敵する広範囲の観察、鏡筒内におけるガリウムイオンビーム精密切削とSEM撮影の繰返しによる高解像連続画像取得を可能とする画期的顕微観察装置であるFIB/SEMの間質細胞研究への応用は、二次元画像では紡錘形または星状とされていた一群の間質細胞は実際には非常に薄く、広く広がるシート状であり、また隣接する細胞間の辺縁が近接し、所々で接着することを明らかにした。また、これら細胞は全体として壁構造を成し、組織空間を隔てることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the three-dimensional (3D) ultrastructure of intestinal stromal cells by FIB/SEM, a novel scanning electron microscope technique, which enabled to establish 3D ultrastructure of the cells; shape, size, distribution pattern, and spatial relationship between neighboring cells and surrounding tissues. Our observations revealed that the stromal cells which had previously been considered as bipolar or stellate in shape by their long thin cytoplasmic processes in each single section, were in fact cells with broad, thin and wavy "sheet-like" cytoplasmic processes. They approached one another and appose each other at several points along the edge to form an incomplete wall within the connective tissue. Thus these stromal cell structures seem to create spatial divisions to form functional units within the tissue (compartmentalization). Similar structures known in other connective tissues are the future target to understand the cellular architecture of the connective tissue.

研究分野：医歯薬系

キーワード：線維芽細胞 間葉組織 平滑筋 次世代電子顕微鏡 FIB/SEM ブロック表面SEM観察 連続精密切削画像 三次元超微形態再構築

## 1. 研究開始当初の背景

消化管平滑筋組織に分布し、消化管運動を調節するとされるカハールの介在細胞(ICC)について、これまで多くの生理・解剖学的研究が積み重ねられてきた。形態学的・免疫組織化学的に平滑筋または線維芽細胞様の特徴をもち、平滑筋組織に絡まるように分布する ICC は、消化管以外の平滑筋組織にも存在する。近年、c-Kit や PDGFR などのレセプターチロシンキナーゼが特異的マーカーとなることが示され、細胞種の検討と共に、それら分子の医学生物学的意義も注目されるようになった。これら間葉組織中に分布する細胞群の組織全体としての機能的意義を理解するためには、個々の細胞の形状・大きさ、さらに周囲の細胞との連携など、形態的情報を欠くことはできない。しかしながら、組織全体の三次元的微細構造構造については、必ずしも想像の域を出ていないにも拘わらず、方法論的制約により、これまで明解な解析は行われていなかった。

最近、医学生物学分野の研究に導入された FIB/SEM およびその応用である FIB/SEM tomography 法は、微細構造レベルの三次元構造解析を可能とする次世代型走査型電子顕微鏡法であり、様々な臓器・器官・組織・細胞のメソスケールの構造解析に広く摘要できる画期的な技術イノベーションである。ミトコンドリアの cristae junction などの我々の観察から、これまでの医学生物学分野の形態解析の方法論の限界を打ち破る方法となる可能性が示されている (Ohta et al., Micron 2012、太田・中村、久留米医学会誌 2013)。

## 2. 研究の目的

本研究では、対象を消化管間質の線維芽細胞(間質細胞)に絞り、次世代電子顕微鏡 FIB/SEM (Quanta3D FEG, FEI) をもちいた間葉細胞群の三次元微細構造解析 FIB/SEM tomography により、“mesoscale” 構造に属する個々の細胞の三次元微細構造と組織構築を明らかにすることを目的とする。

ところで、これまでの常法である切片による二次元的観察所見の解析の積み重ねにより、同様の細胞群が消化管以外の様々な領域の間葉組織(結合組織)にも分布することが知られている。本研究の成果がこのような類似の間質細胞に一般化できる可能性についても検討したい。

## 3. 研究の方法

本研究の方法論の柱となる FIB/SEM は、最近の走査型電子顕微鏡の技術発展を医学生物学分野に導入したものであり、材料系研究において発展を遂げてきた二つの技術革新; すなはち、走査型電子顕微鏡(SEM)のシグナル検出器の大きな進歩、および、ガリウムイオンビームによる精密切削技術の発展に依存する。

医学生物学分野におけるこれまでの SEM 観察は、シグナルとして二次電子をもちいた表面形状の微細構造観察が主であった。新しい方法は、検出器の性能向上により、反射電子、または、二次電子をもちいて材料表明の物性に基づくコントラスト(material contrast)を画像化できるようになったものであり、樹脂包埋された組織ブロックの平滑な表面の観察により、透過型電子顕微鏡(TEM)画像に匹敵する形態画像が得られる。また、加速電圧を下げられることから、試料のごく表面のみの微弱なシグナルを画像化することが可能となり、分解能の向上に大きく貢献する。また、この方法では、超薄切片作製という熟練を要する技術を必要としないばかりでなく、切片の脆弱性や変形から解放されることから、顕微鏡に匹敵する広範囲な領域について、電顕レベルの高解像度の観察を実現し、また、定量的解析が可能となる。次に、ガリウムイオンによる切削は非常に高精度なものであり、ダイヤモンドナイフによる切削面に相当する平滑性をもつ。また、切削の厚さは 20nm までは特に困難なく薄くすることが可能であり、これは超薄切片の 1/2 以下であることから、個々の Z 軸方向の画像解像度向上効果も期待できる。これら二つのイノベーションを合体させることにより、FIB/SEM tomography 法が実現したものである。

一晩で約 1000 枚の微細形態画像が得られるこの方法では、まさにビッグデータと呼べる形態情報が得られ、学術的にはその解析が重要となる。本研究では、AVIZO/AMIRA という画像処理/解析専門のソフトウェアをもちいて解析を行い、新たな解析アルゴリズムの開発も行った。

## 4. 研究成果

精嚢間質の FIB/SEM tomography による解析から、この領域に分布する間質細胞は紡錘形や星状ではなく、扁平なシート状であることが示された。また、隣接するそれら細胞が辺縁において接着して、組織空間を区分けする隔壁状構造を形成することが示され、全体として compartmentalization と呼べる機能的構造体を構成することが示唆された。

今後、本方法による組織解析の精度を上げるために、画像解像度の設定および試料切削面の方向の決定が検討課題として浮上した。

同様の細胞は、他の様々な平滑筋組織、および、粘膜固有層に存在していることが多くの研究で示されている。しかしながら、機能的分化を遂げた間質細胞の種類は組織間で異なるものの、共通点として、個々の細胞のサイズとシート状の広がりに関して、全体として構築された蜂の巣様の枠組みをもつという特徴が、今回、観察を試みた、皮膚真皮、角膜、歯根膜、膀胱上皮等で挙げられた。

## 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 18件)

- 1) Munetsugu Hara, Tomoyuki Takahashi, Chiaki Mitsumasu, Sachiyo Igata, Makoto Takano, Tomoko Minami, Hideo Yasukawa, Satoko Okayama, Keiichiro Nakamura, Yasunori Okabe, Eiichiro Tanaka, Genzou Takemura, Ken-ichiro Kosai, Yushiro Yamashita, Toyojiro Matsuishi. Disturbance of cardiac gene expression and cardiomyocyte structure predisposes Mecp2-null mice to arrhythmias. SCIENTIFIC REPORTS 2015 5:11204 doi:10.1038/srep11204 (査読有)
- 2) Kei-ichiro Uemura, Keisuke Ohta, Tomonoshin Kanazawa, Tokumasa Hayashi, Ryuichiro Tanoue, Munetake Yoshitomi, Shingo Hirashima, Shigetaka Suekane, Kei Matsuoka, Tsukasa Igawa, Kei-ichiro Nakamura. Subcutaneous transplantation promotes organ formation of the fetal rat urogenital sinus. Acta Histochemica Available online 6 April 2015 (査読有)
- 3) Kensuke Oshita, Masayuki Itoh, Shingo Hirashima, Yoshihiro Kuwabara, Keiko Ishihara, Koichiro Kuwahara, Kazuwa Nakao, Takeshi Kimura, Kei-ichiro Nakamura, Kazuo Ushijima, Makoto Takano. Ectopic automaticity induced in ventricular myocytes by transgenic overexpression of HCN2. Journal of Molecular and Cellular Cardiology 80 (2015) 81-89 (査読有)
- 4) Koichiro Ichimura, Naoyuki Miyazaki, Shoji Sadayama, Kazuyoshi Murata, Masato Koike, Kei-ichiro Nakamura, Keisuke Ohta, Tatsuo Sakai. Three-dimensional architecture of podocytes revealed by block-face scanning electron microscopy. SCIENTIFIC REPORTS | 5 : 8993 | DOI: 10.1038/srep08993, 2015 (査読有)
- 5) Kanazawa T, Gotoh M, Ohta K, Shiba N, Nakamura K. 3D-ultrastructural analysis at repaired supraspinatus tendon/bone insertion in rat. Journal of Shoulder and Elbow Surgery 2014 23(5) 602 (査読有)
- 6) Togo A, Ohta K, Higashi R, Nakamura K. En bloc staining with hydroquinone treatment for block face imaging. Microscopy 2014 63 36 (査読無)

7) Okayama S, Ohta K, Higashi R, Nakamura K. Correlative light and electron microscopic observation of mitochondrial DNA in mammalian cells by using focused-ion beam scanning electron microscopy. Microscopy 2014 63 35 (査読無)

8) Ohta K, Okayama S, Togo A, Nakamura K. Three-dimensional organization of the endoplasmic reticulum membrane around the mitochondrial constriction site in mammalian cells revealed by using focused-ion beam tomography. Microscopy 2014 63 34 (査読無)

9) Tokumasa HAYASHI, Mitsue TAKEYA, Kei-ichiro NAKAMURA, Kei MATSUOKA. Effects of Silodosin and Tamsulosin on the Seminal Vesicle Contractile Response. Lower Urinary Tract Symptoms 2014 DOI: 10.1111/luts.12072 (査読有)

10) Tomonoshin Kanazawa, Takashi Soejima, Kouji Noguchi, Kousuke Tabuchi, Megumi Noyama, Kei-ichiro Nakamura, Naoto Shiba. Tendon-to-bone healing using autologous bone, marrow-derived mesenchymal stem cells in ACL reconstruction without a tibial bone tunnel -A histological study-. Muscles, Ligaments and Tendons Journal 4 (2): 201-206, 2014 (査読有)

11) Tomonoshin Kanazawa, Masafumi Gotoh, Keisuke Ohta, Naoto Shiba, Kei-ichiro Nakamura. Novel characteristics of normal supraspinatus insertion in rats: an ultrastructural analysis using three-dimensional reconstruction using focused ion beam/scanning electron microscope tomography. Muscles, Ligaments and Tendons Journal 4 (2): 182-187, 2014. (査読有)

12) Yuki Gotanda, Fan-Yan Wei, Hideki Harada, Keisuke Ohta, Kei-ichiro Nakamura, Kazuhito Tomizawa, Kazuo Ushijima. Efficient Transduction of 11 Poly-arginine Peptide in an Ischemic Lesion of Mouse Brain. Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases, 25 March 2014 (accepted) Volume 23, Issue 8, September 2014, Pages 2023-2030 (査読有)

13) 太田啓介、金澤知之進、中村桂一郎、FIB/SEM トモグラフィ法による三次元再構築の特徴、顕微鏡、Vol.49、pp.161-165 (査読有)

14) 小林正利、太田啓介、東龍平、中村桂一郎、マウス骨格筋組織における骨髄由来細胞の分布 久留米医学会誌 77(1): 34-44 (2014) (査読有)

15) 岩本修、田上隆一郎、太田啓介、中村桂一郎、楠川仁悟、早期口腔癌特殊光観察の臨床的意義、久留米医学会誌、77: 8-17, 2014 (査読有)

16) 小林正利、太田啓介、東龍平、中村桂一郎、櫻井忠義：収束イオンビーム搭載走査型電子顕微鏡 (FIB/SEM) 観察による筋損傷修復時に現れる骨格筋間質細胞の3D ネットワーク 日本体育大学紀要 .Sep;43(1):1-7.2013 (査読無)

17) Fukata Mitsuhiro, Fumihiko Ishikawa, Yuho Najima, Takuji Yamauchi, Yoriko Saito, Katsuto Takenaka, Kohta Miyawaki, Hideki Shimazu, Kazuya Shimoda, Takaaki Kanemaru, Keiichiro Nakamura, Keita Odashiro, Koji Nagafuji, Mine Harada, Koichi Akashi. Contribution of Bone Marrow-Derived Hematopoietic Stem/Progenitor Cells to the Generation of Donor-Marker+ Cardiomyocytes In Vivo. PLOS ONE 8(5):e62506, 2013 doi: 10.1371/journal.pone.0062506. May 07 (査読有)

18) Yamamoto S, Hirata A, Ishikawa S, Ohta K, Nakamura K, Okinami S. Feasibility of using gelatin-microbial transglutaminase complex to repair experimental retinal detachment in rabbit eyes. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 251(4): 1109-1114, 2013 doi: 10.1007/s00417-012-2245-8. Epub 2013 Jan 3. (査読有)

[学会発表](計24件)

1. Kei-ichiro Nakamura, Ryuhei Higashi, Mitsue Takeya, Tokumasa Hayashi, Shingo Hirashima, Tomonoshin Kanazawa, Michael Nguyen, Richard Lang, Hikaru Hashitani, Keisuke Ohta: A novel stromal cell network visualized by FIB/SEM tomography. Symposium on "Multicellular Inputs Regulating Muscle Excitability" June 14-17, 2015 Tahoe City アメリカ合衆国

2. Tokumasa Hayashi, Mitsue Takeya, Kei-ichiro Uemura, Tomonoshin Kanazawa, Satoshi Iino, tsukasa Igawa, Kei-ichiro Nakamura. Symposium on "Multicellular Inputs Regulating Muscle Excitability" June 14-17, 2015 Tahoe City アメリカ合衆国

3. 太田啓介、北原陽介、渡辺瑞希、忠成斗、池澤綾子、青島利裕、中村桂一郎、材料上に培養した藻類のFIB/SEMを用いた形態学的評価法、日本顕微鏡学会第71回学術講演会 2015.5.13-15 京都(国立京都国際会館)

4. 太田啓介、岡山聡子、中村桂一郎、SEM連続切片法による三次元再構築とCLEM観察への応用、日本顕微鏡学会第71回学術講演会 2015.5.13-15 京都(国立京都国際会館)

5. Kobayashi M, Ohta K, Nakamura K, Sakurai T. The stromal cells interaction and formed 3D network following acute muscle trauma. 第120回日本解剖学会全国学術集会シンポジウム 2015.3.21-23 神戸市(神戸国際会議場)

6. Takeya M, Hayashi T, Nakamura K, Takano M. Epithelium-dependent periodical excitation in response to stretch of guinea pig seminal vesicle. 第120回日本解剖学会全国学術集会 2015.3.21-23 神戸市(神戸国際会議場)

7. Ichimura K, Miyazaki N, Sadayama S, Murata K, Koike M, Nakamura K, Ohta K, Sakai T. Newly characterized structure of podocytes revealed by three-dimensional analysis using block-face scanning electron microscopy. 第120回日本解剖学会全国学術集会シンポジウム 2015.3.21-23 神戸市(神戸国際会議場)

8. Kanazawa T, Ohta K, Hirashima S, Okayama S, Nakamura K. 3D-ultrastructural analysis of the development at the supraspinatus tendon insertion with FIB/SEM tomography. 第120回日本解剖学会全国学術集会 2015.3.21-23 神戸市(神戸国際会議場)

9. Kitahara Y, Ohta K, Sotogaku N, Nakamura K, Nishi A. Analysis of synaptic connectivity with FIB/SEM: anti-depressant-induced morphological changes in perforant path synapse in the dentate gyrus. 第120回日本解剖学会全国学術集会シンポジウム 2015.3.21-23 神戸市(神戸国際会議場)

10. Nakamura K, Higashi R, Nguyen M, Lang R, Hirashima S, Kanazawa T, Takeya M, Hayashi T, Hashitani H, Ohta K: A novel somal cell network visualized by FIB/SEM tomography. 第 120 回日本解剖学会全国学術集会シンポジウム 2015.3.21-23 神戸市(神戸国際会議場)

11. 中村 桂一郎、東 龍平、Nguyen MJ、Lang RJ、金澤 知之進、林 篤正、太田 啓介 . FIB/SEM tomography による腎盤内尿管起始部の細胞構築の観察 . 第 56 回日本顕微鏡学会九州支部学術集会 2014.12.6 宮崎市(宮崎市民プラザ)

12. Togo A, Ohta K, Higashi R, Nakamura K: *en bloc* staining with HQ treatment for the block face imaging. 第 58 回日本顕微鏡学会シンポジウム. 2014.11.16-17 福岡(九州大学医学部百年講堂)

13. Okayama S, Ohta K, Higashi R, Nakamura K: Correlative light and electron microscopic observation of mitochondrial DNA in mammalian cells by using focused-ion beam scanning electron microscopy. 第 58 回日本顕微鏡学会シンポジウム. 2014.11.16-17 福岡(九州大学医学部百年講堂)

14. Ohta K, Okayama S, Togo A, Nakamura K: Three dimensional organization of the endoplasmic reticulum membrane around the mitochondrial constriction site in mammalian cell revealed by using focused-ion beam tomography. 第 58 回日本顕微鏡学会シンポジウム. 2014.11.16-17 福岡(九州大学医学部百年講堂)

15. 右田尚、力丸由起子、力丸英明、太田啓介、清川兼輔、中村桂一郎 : ラットを用いた移植肋軟骨の経時的変化に関する組織学的研究. 第 70 回日本解剖学会九州支部学術集会. 2014.10.25 北九州市(産業医科大学ラムツィーニホール)

16. 金澤知之進、太田啓介、都合亜記暢、中村桂一郎他 : 出生後における正常腱骨付着部形成過程の超微形態構造解析-肩関節腱板縫合後の組織変化との比較-. 第 46 回日本臨床分子形態学会総会・学術集会. 2014.10.17-18 東京都(TKP 市ヶ谷カンファレンスセンター)

17. Togo A, Higashi R, Ohta K, Nakamura K: Effect of hydroquinone treatment on OTO *en bloc* stained biological specimens. 18th International Microscopy Congress. 2014.9.7-12 プラハ・チェコ

18. Okayama S, Ohta K, Higashi R, Nakamura K: Three-dimensional distribution of the mitochondrial DNA in the mammalian cell using FIB/SEM. 18th International Microscopy Congress. 2014.9.7-12 プラハ・チェコ

19. Ohta K, Okayama S, Togo A, Nakamura K: Detailed membrane association between mitochondria and surrounding endoplasmic reticulum in mammal cells revealed by three-dimensional reconstruction using focused ion beam scanning electron microscope. 18th International Microscopy Congress. 2014.9.7-12 プラハ・チェコ

20. 都合亜記暢、東龍平、太田啓介、中村桂一郎 : SEM 断面観察用 *en bloc* 染色における Hydroquinon 処理の効果について. 第 70 回日本顕微鏡学会記念学術集会 2014.5.10-13 千葉市(幕張メッセ国際会議場)

21. 太田啓介、中村 桂一郎 : SEM 連続断面観察法における FIB/SEM トモグラフィ法の特徴. 第 70 回日本顕微鏡学会記念学術集会 2014.5.10-13 千葉市(幕張メッセ国際会議場)

22. 太田啓介、中村桂一郎 . SEM 連続断面観察法における FIB/SEM トモグラフィ法の特徴. 第 119 回日本解剖学会全国学術集会 2014.3.27-29 下野市(自治医科大学付属病院)

23. 吉富宗健、太田啓介、東龍平、都合亜記暢、中村桂一郎 : FIB/SEM による下垂体前葉細胞と血管との空間的関係性. 第 55 回日本顕微鏡学会九州支部総会・学術講演会. 2013.12.14 福岡市(九州大学伊都キャンパス)

24. 吉富宗健、太田啓介、東龍平、都合亜記暢、中島慎二、中村晋彦、岡田洋介、中村桂一郎、森岡基浩 . FIB/SEM による下垂体前葉と血管との空間的関係性. 第 25 回日本循環代謝学会総会 2013.11.1-2 札幌市(京王プラザホテル札幌)

〔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：  
出願年月日：  
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

中村 桂一郎 (Nakamura Kei-ichiro)  
久留米大学・医学部・教授  
研究者番号：20172398

### (2) 研究分担者

太田 啓介 (Ohta Keisuke)  
久留米大学・医学部・准教授  
研究者番号：00258401

金澤 知之進 (Kanazawa Tomonoshin)  
久留米大学・医学部・講師  
研究者番号：50529518

力丸 由起子 (Rikimaru yukiko )  
久留米大学・医学部・助教  
研究者番号：90368960

東 龍平 (Higashi Ryuhei )  
久留米大学・医学部・技能職員  
研究者番号：70569516

都合 亜記暢 (Togo Akinobu )  
久留米大学・医学部・技能職員  
研究者番号：80569517

林 篤正 (Hayashi Tokumasa )  
久留米大学・医学部・講師  
研究者番号：20341357

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：