

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K13376

研究課題名(和文)2光子励起イメージングに最適化した生体臓器透明化方法の開発

研究課題名(英文)Optical cleaning method of living animal skull for 2photon imaging

研究代表者

小野寺 宏 (Onodera, Hiroshi)

東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・特任教授

研究者番号：20214207

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)：本研究は生きたマウスの頭蓋骨を透明化することにより、脳活動を広範囲にしかも長期間観察する技術の開発を目的とする。27年度、頭蓋骨透明化試薬の開発を終了し、マウス摘出頭蓋骨を24時間以内に透明化することに成功した。28年度、透明化試薬をマウス頭蓋骨の外側から適用し、マウス頭蓋骨透明化を目指した。透明化処理24時間後、頭蓋骨の透明度が上がり脳表面の血管および大脳皮質を透見できるようになった。トランスジェニックマウスに上記の頭蓋骨透明化技術を適用すると、大脳皮質の神経活動ネットワークを連続的に解析することが可能であった。本技術は脳全体の神経活動解析に広く活用できるものと期待している。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to clarify skull bone of mice in order to analyze neuronal network in the cerebral cortex of living animal. First, we successfully optically cleaned mouse skull bone in vitro by using cleaning agent LUCID-vivo. Then we applied the LUCID-vivo solution on living mouse skull bone for 24 hours. We could observe cerebral cortex and blood vessels on the cortex through transparent skull bones. Neuronal networks of the cerebral cortex were visualized by using transgenic mice (GCAMP). This method can be applicable for many research fields, such as memory, motor function, sensory function, and emotion.

研究分野：生命科学

キーワード：臓器透明化 神経科学 情報伝達機構

1. 研究開始当初の背景

・内外の動向と位置づけ

2 光子励起イメージングでは数 mm の深さまで撮影可能ですが、生体は不透明であり 0.1mm 程度しか透見できません。そこで多くの臓器透明化技術が提案されました。高濃度尿素法 (文献 1, 透明度不足と蛋白喪失), 有機溶媒脱脂法 (文献 2, 易燃物と発癌物質使用), 電気泳動脱脂法 (文献 3, 脂質喪失と神経毒使用) は透明化まで時間を要するうえ特殊設備を必要とします。さらにこれらの方法の場合、元々半透明な脳は透明化できるものの他の臓器の透明化は困難です。我々は (小野寺, 五神, 小西ら), 光学技術を駆使して全く新しい臓器透明化技術 LUCID を開発し (細胞膜屈折率, 細胞浸透性を基に開発), 医学研究に活用しています。しかし生きた細胞や血管の変化を連続的に解析するには、生きた臓器の深部観察が必要です。北海道大の根本は限界まで頭蓋骨を薄く削り脳表面の神経細胞を観察しましたが脳深部の観察は困難でした。

・これまでの成果の発展, 着想

我々が開発した透明化試薬 LUCID の臓器浸透スピードは 1~3 mm/day ですが、透明化液の皮膚浸透速度を安全に 1mm/hour までアップできれば生きた動物の臓器透明化が可能です。薬学領域では貼付薬技術が進歩し (細胞同士の結合性と細胞膜流動性を制御), 多くの貼付薬が臨床治療に用いられています。この薬物伝達技術を透明化試薬の皮膚透過促進に応用すれば、迅速で安全な皮膚と骨の透明化が可能との着想に至りました。

2. 研究の目的

27 年度, 貼付薬成分の体内移行に用いられる化合物 (細胞間 tight junction 弛緩, 細胞膜流動性制御, 浸透圧制御) とその類似構造物から、迅速に皮膚と骨を透明化できる候補物質をスクリーニングします。一次評価にはエリプソメトリーと電子スピン共鳴 (ESR) を用います。

28 年度, 透明化試薬と透過促進剤 (27 年度決定する候補物質カクテル) を単純貼付およびイオン泳動法, あるいは皮内投与法等を用いて皮膚と骨に適用し, 安全・迅速に皮膚と骨を透明化できる技術を開発します。蛍光試薬や second harmonic generation 観察を妨害しない透過剤を選定するとともに, 撮像ステージ傾きを変化させてレーザー照射 CT マトリクス計算画像を得て深部解像度を向上させます。これにより, 生きた動物を長期間観察可能な透明化技術を確立します。

3. 研究の方法

透明化試薬 LUCID と透過促進剤を混合して皮膚・骨表面に塗布することで, 短時間に LUCID を皮膚および骨に浸透させることを目指します。

我々が開発した臓器透明化試薬 LUCID は臓器屈折率と細胞膜透過性を調節するための溶媒カクテルであり (多糖, チオール化合物, ヨード化合物, アルコール類の混合物), そのほとんどは医薬品としての使用が認可されている安全な物質を使用しています。ホルマリン等で固定された臓器への透明化試薬 LUCID の浸透速度は平均 1~3 mm/day ですが, 本研究では生きた状態 (および未固定状態) における皮膚と骨への浸透速度として 1mm/hour を目指します。1LUCID の組織移行を促進する薬物についても, 可能な限り臨床使用が認められている安全な薬物から選定します。貼付薬の体内移行促進剤を参考に細胞間隙拡張剤 (高浸透圧液および有機溶媒を予定) と細胞膜流動性制御剤 (貼付薬成分等の有機化合物) を種々の濃度で混合し, 迅速に皮膚と骨を透明化できる候補薬をスクリーニングします。評価には未固定の皮膚と骨 (マウスおよびラットより調製) を用い, エリプソメトリー (紫外~可視光~赤外領域の屈折率測定), 電子スピン共鳴 ESR (スピントラッパー試薬を用いて膜流動性測定), および多光子顕微鏡観察 (コラーゲンの second harmonic generation SHG) を用います。

貼付薬の皮膚透過には ESR による膜流動性測定法が標準的な手法として確立しており, 本研究においても鋭敏なスクリーニングマーカーとして期待しています。細胞間隙拡張 (細胞間の tight junction における分子移動性促進) は脳への薬剤移行法として知られています。脳血管は容易に外来分子の脳内移行を許しませんが (脳血管閉門), 高浸透圧薬の動脈注射により tight junction を一時的に緩めると, 薬剤の脳内移行が一時的に可能になります。本研究では臨床で広く使用されるマンニトールやグリセリンを, 組織障害を起こしにくい細胞間隙拡張試薬の候補と考えています。

28 年度 生きた実験動物の皮膚と骨の透明化効果を判定

透明化試薬と透過促進剤 (27 年度決定する候補薬のカクテル) を単純貼付およびイオン泳動法を用いてマウス皮膚と骨に適用し, 安全・迅速に皮膚と骨を透明化できる方法を確立します。

・透明化試薬 + 透過促進剤

エリプソメトリーと ESR による物理特性ならびに実際の動物での組織透過促進効果をすり合わせ候補薬カクテル組成を最適化します。剃毛したマウスの皮膚および頭蓋骨 (頭頂骨) に透明化試薬 LUCID と透過促進剤を適用し, 透明化の程度と速度を多光子顕微鏡でリアルタイム観察します。

4. 研究成果

27 年度, 生きた動物の頭蓋骨を透明化処理することにより, 頭蓋骨を除去することなく大脳皮質を透見することを目指しました。数種類の候補溶媒カクテルを準備し, マウス頭

骨を浸漬することにより骨の透明度（可視光領域での透過率上昇）および透明化までの所要時間を指標としてスクリーニングしました。その結果、28年春には約16時間で摘出マウス頭蓋骨透明化が可能になりました（図1）。

試薬の安全性について、ヘアレスラットを用いて検討しました。ヘアレスラットの背部に透明化試薬を皮内投与し1か月観察しました。対照には生理食塩水投与群を使用しています。透明化試薬投与1か月後もラットの健康状態は良好で体重減少や異常行動は認められません。皮内投与部の皮膚を図2に示します。生理食塩水投与では皮膚は透明になりませんが、透明化試薬投与により表皮（角質を含む）の全層が透明化し、皮下の血管が透見できるようになりました（図2）。このことから本透明化試薬 LUCID は皮膚の透明化が可能であることがあきらかになりました。

次に、マウスの頭蓋骨を露出し、透明化試薬を塗布してその効果検討に進みました。生きたマウスを非麻酔条件で透明化試薬を頭蓋骨上に保持するためのシステム開発が必要でした。また、頭蓋骨に透明化試薬を保持するためのタンク搭載・タンクを頭蓋骨に接着するための接着剤選定に時間を要しました。精密造形が可能な（2種類の材料）3Dプリンターを用い、液漏れのない透明化液投与タンクを試行錯誤の末に完成させました。この結果、マウス頭蓋骨を破壊することなく長期間マウス脳表面や脳血管を観察できるようになりました（図3）。頭蓋骨を破壊損傷していないため、脳出血や脳表面の損傷は全く認められません。GCAMP5 遺伝子導入マウスの頭蓋骨を透明化し、マウスに外部刺激を与えると、関連する大脳領域の神経活動が活性化することを見出しました（投稿準備中）。透明化処理後のマウスの成長（体重）および生存率は未処置動物と差が無く、1か月間透明化試薬タンクを搭載した動物においても神経学的異常も明らかではありませんでした。このことから、本透明化試薬による頭蓋骨透明化方法はマウスに明らかな毒性を示さないと推測されます。

本研究により、脳を露出せずに連続的に大脳全体という、これまで不可能であった大脳皮質表面全体の観察が可能になりました。記憶・認知症・運動機能の研究への応用が期待されます。また、本試薬は生体の皮膚透明化にも使用可能であることが明らかになりました。皮膚科領域での病態解析や化粧品等の開発に活用可能と考えられます。

透明化試薬 LUCID の明らかな生体毒性は今のところ認められておらず、動物実験に広く活用可能な技術として開発することができました。創薬における薬物効果判定、副作用の迅速なスクリーニングに活用可能であり、とくに抗がん薬の効果判定、皮膚などの転移巣への薬効を同一動物個体を連続観察することにより、薬効スクリーニング精度向上、

実験動物数削減、労働負荷の軽減に貢献できると期待しています。さらに遺伝子改変動物のフェノタイプ解析に威力を発揮するものと考えます。

謝辞

本研究実施に当たり、東京大学理学部物理小西邦明先生、大学院生 鳴海紘也君に感謝します。

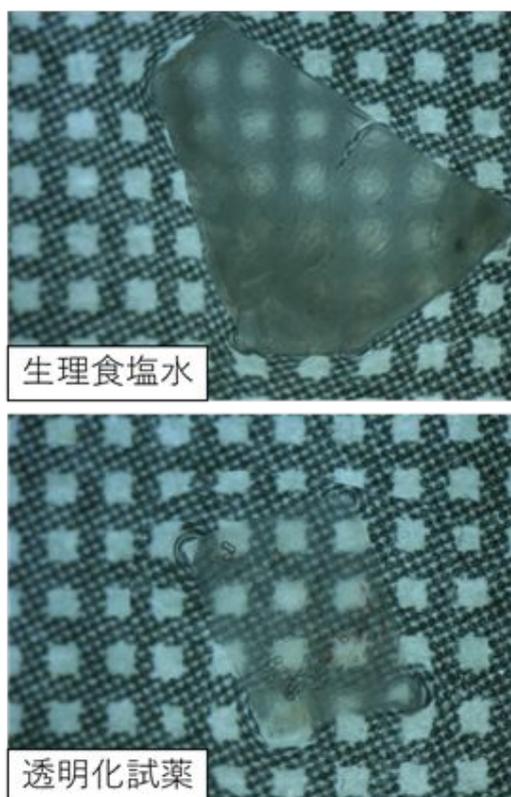


図1 摘出マウス頭蓋骨の透明化

透明化試薬への浸漬により数時間（最短2時間）でマウスの頭蓋骨の透明度が上がり骨の下に置いた新聞の文字の判読が可能になり、12時間後には頭蓋骨の下に敷いた新聞を苦も無く読めるまでに透明度があがる。いっぽう、生理食塩水への浸漬のみでは頭蓋骨は透明化しない。

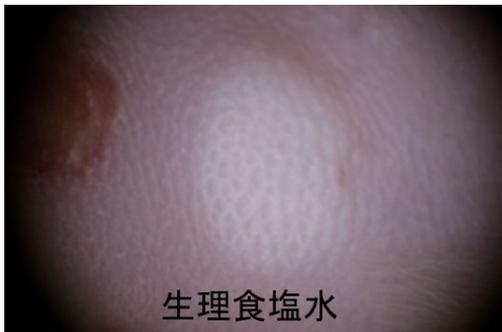


図2 ラット皮膚の透明化

生理食塩水の皮内注射では皮膚や皮下組織は透明化できない。いっぽう、透明化試薬 LUCID の皮内注射により角質を含む表皮が透明化し、皮下組織や血管が透見できるようになった。投与 12 時間後の写真を示す。

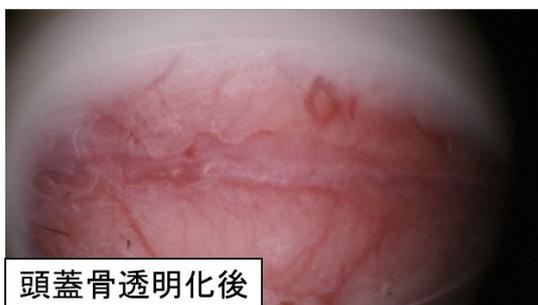


図3 生きたマウスの頭蓋骨透明化

マウス頭部へ透明化試薬を連続投与することにより、頭蓋骨越しに脳と脳表血管が観察できる。頭蓋骨透明化前には頭蓋骨を透かして脳表を観察することは不可能だが、透明

化処理の後には脳表の血管、大脳皮質を観察することができる。頭蓋骨を破壊していないため脳表面の出血や損傷は全く認められない。

生きたままの状態で大脳皮質を直視下に観察するためには骨に穴をあけて脳のごく狭い範囲を短時間観察するのが一般的である。長期間の観察のため、頭蓋骨を極限まで薄く削って脳の一部を観察する方法が知られているものの、頭蓋骨の切削作業には長時間を要し、難易度の高い技術の習得が不可欠であり普及には至っていない。しかも観察できる範囲は非常に狭く、大脳皮質を簡便かつ広範囲に観察する方法が待たれていた。

今回我々が開発した LUCID 頭蓋骨透明化技術は、露出した頭蓋骨に透明化試薬 LUCID(改良版)を適用するのみであり、頭蓋骨切削作業は不要であり、神経科学初心者であっても大脳皮質全体の神経活動を観察することができる。

引用文献

- 1)Hama, H. et al. Nature Neurosci. 14, 1481-1488(2011),
- 2)Zucker RM. Cytometry Part A 69A:1143-1152 (2006).
- 3)Chung, K. et al. Nature 497, 332-337 (2013).

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3件)

1. Sekitani T, Yokota T, Kuribara K, Kaltenbrunner M, Fukushima T, Inoue Y, Sekino M, Isoyama T, Abe Y, Onodera H, Someya T. Ultraflexible organic amplifier with biocompatible gel electrodes. Nature Communications 7,11425-,2016
10.1038/ncomms11425 査読あり

2. Kojima C, Nishioka E, Imai T, Nakahira A, Onodera H Dendrigrft polylysine coated-poly(glycolic acid) fibrous scaffolds for hippocampal neurons. J Biomedical materials Research. 119,2744-2750,2016
10.1021/acs.jpcc.5b01553 査読あり

3. Zesendorj Otgon-Uul, Shigetomo Suyama, Hiroshi Onodera, Toshihiko Yada. Optogenetic activation of leptin- and glucoseregulated GABAergic neurons in dorsomedial hypothalamus promotes food intake via inhibitory synaptic

transmission to paraventricular nucleus
of hypothalamus. Molecular Metabolism.
5,709-715,2016
10.1016/j.molmet.2016.06.010 査読あり

〔学会発表〕(計1件)

4. 鳴海紘也, 小野寺宏 In vivo でのマウス 頭蓋骨 透明化 に向けた骨片透明化
応用物理学会 . 2016(新潟県新潟市 朱鷺メッセ)

〔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

6. 研究組織

(1)研究代表者

小野寺 宏 (Onodera Hiroshi)

東京大学・大学院工学系研究科・特任教授

研究者番号：20214207

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()