

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15717

研究課題名(和文)骨包透明化による全内耳イメージング技術の開発

研究課題名(英文)Development of whole labyrinth imaging by bone tissue transparency

研究代表者

山嵜 達也 (Yamasoba, Tatsuya)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：60251302

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：既存の透明化手法では蝸牛内全有毛細胞を満足に観察する透明化手法は確立していなかった。我々は改良を加え内耳組織化学で頻用されるMyosin7a, Rhodamine-Phalloidinなどによる蝸牛内全有毛細胞観察に満足する透明化手法を確立した。蝸牛内全有毛細胞観察可能となったことから、有毛細胞情報データベース作成を進めている。機械学習を用いて蝸牛内全有毛細胞座標情報をもとにコルチ器の直線化を行い、全残存有毛細胞カウントを自動化するプログラムを作成した。プログラム精度は99.7%と高く、蝸牛内推定脱落細胞カレント自動化プログラムもhuman manipulationと高い相関であった。

研究成果の概要(英文)：We successfully modified a sorbitol-based optical clearing method, ScaleS, for use in high resolution imaging of the entire cochlea, an essential hearing organ within the temporal bone. We reported a tissue clearing-based analytical pipeline for the construction of a single-cellular resolution imaging of the entire cochlea. This method can be completed within two days for the fluorescent protein detection or within three days for immunohistochemistry of endogenous proteins. We generated entire cochlear maps at different postnatal ages with or without noise-induced cochlear damage by recording the cell distribution along the entire longitudinal axis. We next reported machine learning-based pattern recognition automated high-fidelity detection and analysis of total hair cell positions along the longitudinal axis of the organ of Corti. Our method of cellular mapping is highly effective in system-level phenotyping of the organ of Corti under both physiological and pathological conditions.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：神経科学 脳・神経 解剖学 蝸牛 内耳 細胞・組織

## 1. 研究開始当初の背景

内耳は3次元的に複雑な構造を形成し、かつ骨密度の高い蝸牛骨包に覆われている。内耳の組織解析では大きく薄切片標本と摘出標本の surface preparation が用いられ、前者は固定・脱灰や凍結を経て作成する方法で現在も主流であるが、小さな内耳では面出しに熟練した技術が不可欠である。後者は動物から速やかに内耳組織を摘出する方法であるが、構造物を損傷なく外科的に摘出することは困難であり、特に遺伝子改変動物として重要なマウスの蝸牛では、モルモットに比べ、感覚上皮を温存した標本採取はかなり困難である。

近年、脳科学領域では透明化試薬を用いた「全脳イメージング」が注目を浴びており(Susaki EA et al. Cell 2014)、さらに腎臓、肝臓などの実質臓器、腫瘍組織なども透明化により組織の深部観察、3次元的な構造解析などが可能となってきた(Taninaka K et al. Cell 2014)。しかし骨に覆われた内耳では困難とされ、まだ報告が無かった。

従って、本研究ではマウス蝸牛の「透明化無傷標本」の作成と屈折率均一化浸水液の開発を行うことにより「全内耳イメージング」を行うこととした。内耳疾患モデルマウスでの蝸牛細胞障害の網羅的解析による病態解析や、3次元的關係にある有毛細胞、シナプス、蝸牛神経、らせん神経節などの空間的關係を経時的に観察するなど、内耳の新しい生理機構の解明及び予防、治療方法の確立を目指している。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、3次元構造を保ったまま内耳骨包を透明化させる手法の開発であり、同一標本の洗浄再標識による多重蛍光染色と3次元画像解析による image fusion 技術を組み合わせ、「全内耳イメージング技術の確立を目指す。

従来の組織解析では内耳を覆う骨包を除去したのち、標本を化学処理、免疫染色するという過程を経ていたため、機械的アーチファクトによる組織破壊・損失が免れなかった。特にマウスでは骨包を除去するときにコルチ器の外側も同時に取れてしまいやすく、定量的な障害の解析が困難であった。今回開発する手法では内耳骨包を化学処理で透明化して免疫蛍光染色を可能にするため、物理的な組織の損傷を回避できる。また3次元的に構造が保たれた状態での内耳形態学的解析が可能となり、蝸牛側壁、有毛細胞、シナプス、蝸牛神経、らせん神経節などを3次元的に解析することも可能となり、内耳の病態生理の解明において飛躍的な進歩が見込まれる。

## 3. 研究の方法

脳科学領域では既に透明化手法がいくつか確立されている試薬(BABB, THF-DBE, Sca/e, SeeDB, Cubic-reagent1, Cubic-reagent2 など)と手法(3DISCO, CLARITY, PACT-PARS, CUBIC)が存在する。まずこれら既存の試薬、手法を用いた透明化方法で蝸牛表面の骨組織を透明化するか検討した。次に CLARITY の脂質除去能と CUBIC の組織内屈折率均一能を組み合わせることにより、内耳骨包もある程度透明化出来る条件を探索した。さらに骨組織内に密に存在するコラーゲン内への透明化試薬の浸透性及び細胞内目的蛋白を保存した状態での脂質除去を目的として、EDTA での骨脱灰での骨組織内透明化試薬の浸透性亢進、Cleaning solution を用いた膜組織内脂質二重膜除去、Cubic-reagent2 での骨組織、膜組織両組織の同時透明化、の3ステップでの透明化を試みた。

免疫染色については、内耳組織解析で汎用される抗体(有毛細胞(myosin7a)、支持細胞(p27kip1)、神経線維(Neurofilament200)、リボンシナプス(CtBP2)など)を用い、三重染色なども行って、それぞれの三次元的な関係など、構造の解析をまず行った。

3次元画像の取得は共焦点顕微鏡、多光子顕微鏡および光シート顕微鏡を用いた。共焦点顕微鏡では可視光を用いた高解像度観察、多光子顕微鏡ではある程度非透明な組織でも観察可能であった。光シート顕微鏡では透明化条件が厳しくなるものの褪色やピンぼけの少ない画像取得が可能であり、それぞれの特長を活かし、実験目的に則した画像取得を選択した。

動物はマウスを用い、主に C57BL/6 と遺伝子改変マウスを使用した。障害モデルとしては騒音暴露などによる音響外傷モデルと加齢性難聴モデルを用いた。音響外傷ではノイズボックスにマウスを入れ、115dB SPL ~ 125dB SPL のオクターブバンドノイズに数時間曝露した。加齢性については14日齢、30日齢、60日齢、360日齢などの比較で行った。これらの病変モデルでは有毛細胞、シナプス、蝸牛神経や側壁のマクロファージなどの変化を三次元的に解析し、また有毛細胞の欠損を自動解析するソフトの開発も行った。

## 4. 研究成果

脳科学領域で既に透明化手法がいくつか確立されている試薬と手法では蝸牛骨組織を完全には透明化することはできなかった。そこで、Sca/e 法に改良を加え、条件を変えて何回も試みた結果、内耳骨包・内耳の透明化に成功した(図1)。

染色では Myosin7a(有毛細胞)、Neurofilament200(神経線維)、Rhodamine-Phalloidin(聴毛)、VGLUT3(内有毛細胞内小胞グルタミン酸トランスポーター)など多くの染色に成功し、特許出願した。この手法を用い、蝸牛の

すべての有毛細胞数のカウント、老化マウスや音響外傷マウスでの障害の観察なども成功し、障害時のシナプスや蝸牛神経線維の変性の進行なども解析した(図2)。また骨や関節の透明化にも応用できることを確認した。

さらに、得られた膨大な蝸牛有毛細胞を解析するために、機会学習を用いて蝸牛内全有毛細胞解析を行った。蝸牛内全有毛細胞の座標情報をもとに3次元情報を保存した上で頂部から基底部にかけてコルチ器の直線化を行った(図3)。残存有毛細胞ならびに推定脱落細胞の自動カウントプログラムを作成した。解析までは20から60分で完了し残存有毛細胞カウント精度は99.7%、推定脱落細胞カウントはヒトの行ったカウントと正相関した( $R=0.9882$ )。また、直線化されたコルチ器を標準化することで蝸牛内脱落細胞のシミュレーション解析を行った。結果、蝸牛有毛細胞脱落には1つの脱落細胞があると近傍細胞に影響する(近傍効果)と脱落細胞は蝸牛内特定部位での障害されやすい(領域効果)が存在することが解明された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計0件)

[学会発表](計4件)

・浦田真次、岡部繁男、山岨達也: The effects of noise-induced hearing loss on the cochlea revealed by the new optical clearing method. 第122回解剖学会 2017年3月28-30日 長崎

・浦田真次、岡部繁男、山岨達也: Three-dimensional imaging of the whole intact cochlea by optical clearing methods. IFOS 2017年6月24-28日 Paris, France

・浦田真次、岡部繁男、山岨達也: Rapid clearing and labeling of mouse cochlea by modified Sca/eS enable exhaustive analysis of hair cell. 第40回神経科学会 2017年7月20-23日 千葉

・浦田真次、山岨達也: 透明化技術を用いた全蝸牛イメージング. 第27回日本耳科学会 2017年11月22-24日 横浜

[産業財産権]

○出願状況(計1件)

名称: 生物試料の透明化方法

発明者: 浦田真次、山岨達也、岡部繁雄

種類: 四法: 特許

番号: PCT/JP2017/032738

出願年月日: 2017年9月12日

出願国: 国内

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

山岨達也 (YAMASOBA, Tatsuya)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号: 60251302

### (2)連携研究者

岡部繁男 (OKABE, Shigeo)

東京大学・医学部・教授

研究者番号: 60204012

松本有 (MATSUMOTO, Yu)

東京大学・医学部附属病院・特任講師

研究者番号: 80548553

藤本千里 (FUJIMOTO, Chisato)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 60581882

櫻尾明憲 (KASHIO, Akinori)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 20451809

### (3)研究協力者

浦田真次 (URATA, Shinji)

東京大学・大学院医学系研究科・大学院生

研究者番号: なし

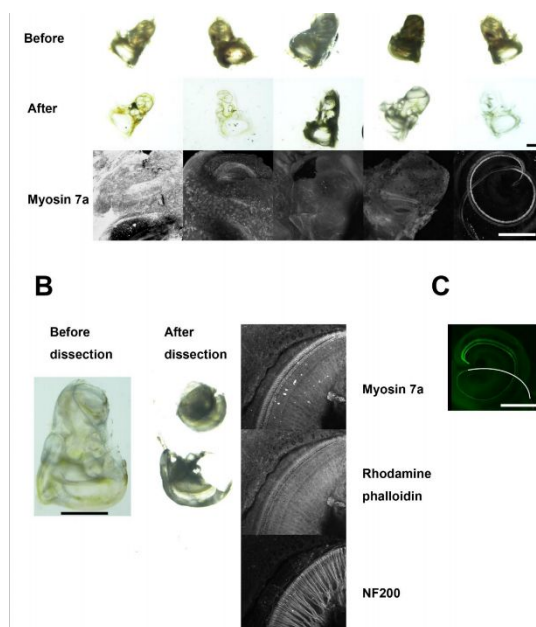
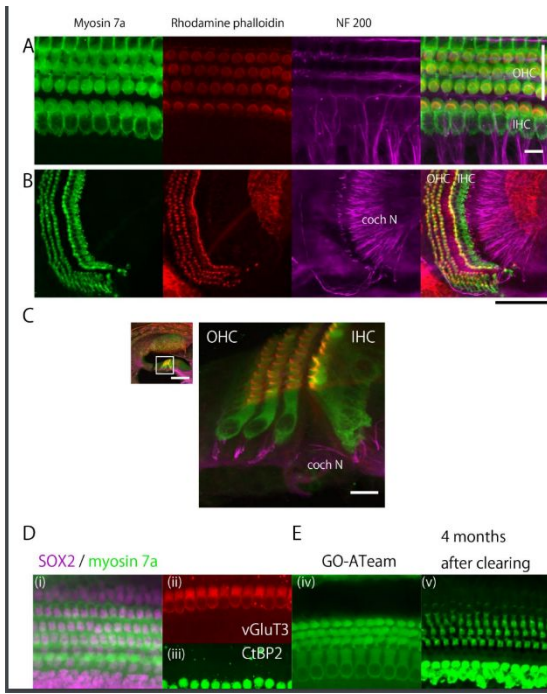
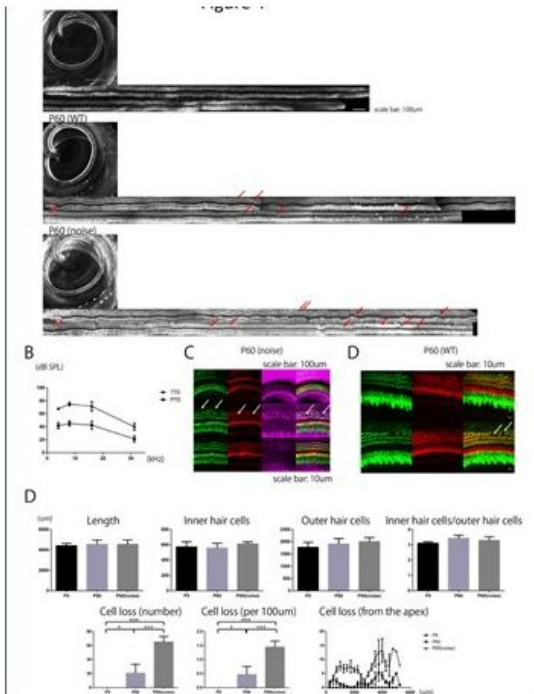


図1



☒ 2



☒ 3