

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H02105

研究課題名(和文) ヒト脳組織特異的染色による先進的3D神経病理学の確立

研究課題名(英文) Advanced 3D neuropathology based on whole-mount tissue staining methods

研究代表者

田井中 一貴 (Tainaka, Kazuki)

新潟大学・脳研究所・教授

研究者番号：80506113

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、つくりや機能単位が複雑なヒト脳組織の異常を立体のまま全てを観察することで判断する次世代神経病理学の開発に取り組んだ。組織透明化技術による3次元蛍光イメージングは、スループット・解像度を満たす最も有用なアプローチである。そこで、透明化技術に適用可能な特異的標識手法の開発に取り組んだ。ヒト組織の光学的障壁となる可視光透過性を向上させ、自家蛍光を褪色させることで、マルチカラーイメージング基盤を確立した。更に、色素ライブラリを用いて、神経細胞の胞体や残留血液成分、軸索、老人斑などに特異的なケミカルプローブを発見した。また、様々な標的分子に対して標識可能な汎用性の高い免疫染色手法を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は透明化処理に適用可能な蛍光プローブを探索・設計するための一般的な化学的概念の創出を目的としており、先駆的な研究課題である。これにより、有機化学者がヒト脳剖検サンプルを用いた蛍光プローブ開発を展開するための基盤を確立できるため、化学と医学の間の壁を突破するケミカルメディシンを拓く一つのマイルストーンになりえる。また、3次元神経病理学が確立されることにより、「定量的な診断基準の確立」・「病変部位の網羅的探索」・「立体構造の異常に基づく疾患概念の体系化」が期待され、神経病理学分野の発展に大きく寄与できる。

研究成果の概要(英文)：Current biopsy and histology have long relied on thin-sectioned 2D images with several chemical staining methods and specific immunohistochemistry. Facile 3D visualization of human brain tissue with single-cell resolution would provide a novel concept of the neuropathological diagnosis and contribute our understanding of pathological mechanisms based on comprehensive and quantitative analysis of individual biomarker. In this project, we aimed at establishing a novel 3D neuropathology by developing highly efficient clearing and staining protocol for human brain tissue and combining with a rapid 3D imaging using light-sheet fluorescence microscopy. As a result, we developed versatile immunohistochemical method and a series of chemical probes for vasculature, cytoplasm, and senile plaques in human brain tissue.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：透明化 3Dイメージング 神経病理 ケミカルプローブ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

これまでの神経病理学では、薄切標本に基づく2次元平面の病理学的解析が基盤となり、全ての中枢神経疾患の疾患概念が確立・定義されている。にもかかわらず、2次元平面の病理学的解析だけでは対処困難な多くの課題がある。

(1) 異常所見に対する定量性が欠落しているため、病理医ごとに判断が変わりうる

(2) 著名な臨床症状にも関わらず、病変部位を特定できない場合がある

(3) 神経細胞・グリア細胞・血管・病変マーカーの空間分布を把握できない

この課題を解決するには、至ってシンプルに「立体的な脳組織を立体のままもれなく観察すること」である。従来の連続切片画像の再構成による3次元解析では、膨大な解析時間を要するため、高速かつ高解像度に3次元イメージングできる解析手法であることが望ましい。我々は、これまでに光シート照明顕微鏡と組織透明化技術を組み合わせた3次元イメージング技術 CUBIC を開発した。ヒト脳組織透明化に適した種々の染色手法を確立することができれば、「定量的な診断基準の確立」、「病変部位の網羅的探索」、「立体構造の異常に基づく疾患概念の体系化」が期待される。

2. 研究の目的

本研究では、つくりや機能単位が複雑なヒト脳組織を立体のまま観察する3次元神経病理学を実現するために、組織透明化・3Dイメージング技術に適用可能な染色技術の開発を目的とする。透明化と組み合わせた染色アプローチとしては、免疫組織化学的染色法と低分子蛍光プローブによる染色手法が挙げられる。本研究では、未だに特異的なプローブが開発されていない蛍光プローブの探索を中心に実施すると共に、汎用性の高い免疫組織化学的染色法を開発を実施した。いずれのアプローチにおいても以下の課題が挙げられる。

課題1：現行の透明化手法で生じるヒト脳組織の褐変による低い可視光透過率

課題2：リポフスチンや残留血液などによる広い波長領域における強度の自家蛍光

課題3：透明化処理中の屈折率調整過程におけるプローブの解離

上述の課題1・2の組織側の光学的課題を克服するために、透明化ヒト脳組織の褐変を抑制することで可視光透過性の向上を図るとともに、組織の自家蛍光を高効率に褪色させる透明化プロトコルを開発する。課題3は、透明化条件において標識したプローブを組織内に留める工夫が必要であることを意味している。そこで、染色後のホルマリン固定により染色性の保持を前提とした染色プロトコルを開発した。また、市販の蛍光プローブライブラリを用いて、特異的な染色パターンが認められるプローブのスクリーニングを実施した。

3. 研究の方法

上記の課題1・2の組織側の光学的課題を克服するために、透明化ヒト脳組織の褐変を抑制することで可視光透過性の向上を図るとともに、組織の自家蛍光を高効率に褪色させる透明化プロトコルの開発に取り組んだ。ヒト脳組織の透明化プロトコルは、組織の外液浸透性を亢進させるための脱脂処理と、外液-組織の屈折率の均一化を図る屈折率調整の2段階からなる。脱脂処理では、高温で処理するため、メイラード反応様に組織が褐変する。メイラード反応に伴う架橋反応を、還元剤やシッフ塩基捕捉剤を含む脱脂試薬、並びに過酸化水素を用いることで効率的に褐変を抑制することができた。また、興味深いことにこれらの化学処理を施したヒト脳組織は高度に自家蛍光が褪色していることが示された。この結果より、ヒト脳組織を複数の蛍光色素により標識するマルチカラーイメージングの基盤が確立された。

課題3の屈折率調整による染色色素の解離を防止するために、染色後にホルマリンによる追加固定が可能、もしくは透明化によって結合が乖離しない蛍光色素のスクリーニングを実施した。また、脱脂処理を行った脳組織が電解質ゲルの性質を有していることを見出した。この性質に類似する人工ゲルを用いて抗体分子を効率よく組織内に透過させるための溶液条件の探索を実施した。

4. 研究成果

蛍光プローブライブラリから、ニッスル様、繊維状構造、微小血管、老人斑、残留血液関連因子などの染色像を示す蛍光プローブを発見した(図1参照)。また、汎用的な免疫染色・3Dイメージング技術であるCUBIC-HV法を開発し、ヒト脳組織ブロックのみならず、マウスの全脳、マモセットの半脳を均一に染色し、3次元的全臓器組織観察を可能にした(図2参照, Susaki et al., Nat. Commun. 2020)。

本研究では主に水溶性透明化試薬に基づくCUBIC法を用いた染色手法を開発したが、CUBIC法では組織の強度を維持したまま組織の白質部位を完全に透明化することは困難であることが判明した。今後は、有機溶媒に基づく透明化手法を開発し、その手法に適合する染色技術の開発が必要と考えられる。

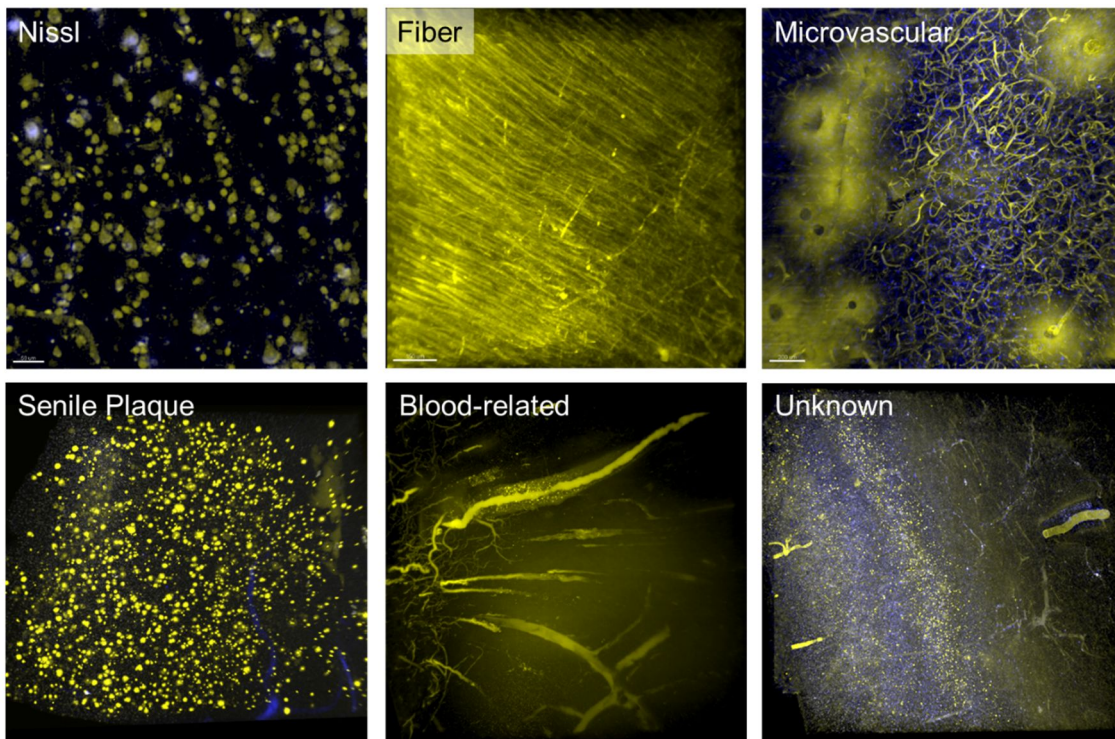


図1 . ヒト脳サンプルに対する各種ケミカルプローブによる 3D 画像の例
黄色：シグナル、青色：自家蛍光

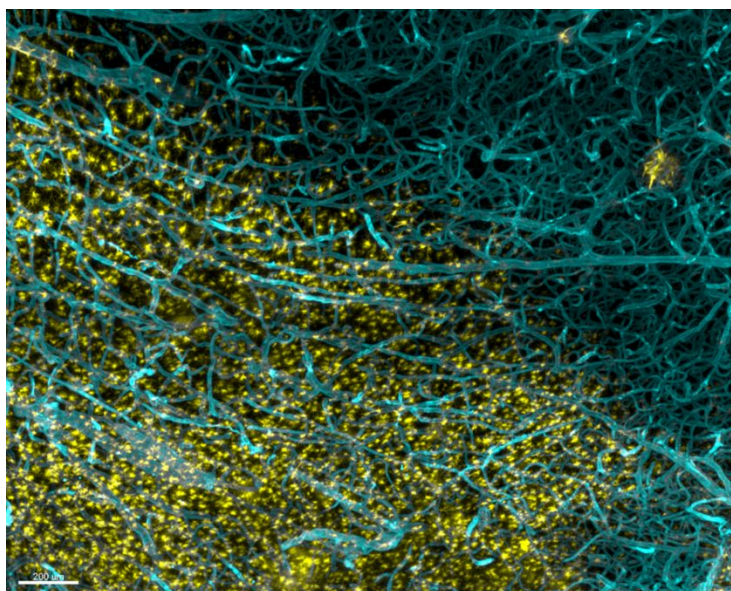


図2 . 脳アミロイドアンギオパチー(CAA)の 3D 免疫染色イメージング、GFAP (黄) Laminin (シアン)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Susaki EA, Shimizu C, Kuno A, Tainaka K, Li X, Nishi K, Morishima K, Ono H, Ode KL, Saeki Y, Miyamichi K, Isa K, Yokoyama C, Kitaura H, Ikemura M, Ushiku T, Shimizu Y, Saito T, Saido TC, Fukayama M, Onoe H, Touhara K, Isa T, Kakita A, Shibayama M, Ueda HR.	4. 巻 11
2. 論文標題 Versatile whole-organ/body staining and imaging based on electrolyte-gel properties of biological tissues.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nat. Commun.	6. 最初と最後の頁 1982
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-15906-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Saito N, Tainaka K, Macpherson T, Hikida T, Yamaguchi S, Sasaoka T.	4. 巻 156
2. 論文標題 Neurotransmission through dopamine D1 receptors is required for aversive memory formation and Arc activation in the cerebral cortex.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neurosci. Res.	6. 最初と最後の頁 58-65
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neures.2020.04.006.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kubota SI, Takahashi K, Mano T, Matsumoto K, Katsumata T, Shi S, Tainaka K, Ueda HR, Ehata S, Miyazono K.	4. 巻 4
2. 論文標題 Whole-organ analysis of TGF- β -mediated remodelling of the tumour microenvironment by tissue clearing.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Commun. Biol.	6. 最初と最後の頁 294
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-021-01786-y.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamaguchi M, Yoshihara K, Suda K, Nakaoka H, Yachida N, Ueda H, Sugino K, Mori Y, Yamawaki K, Tamura R, Ishiguro T, Motoyama T, Watanabe Y, Okuda S, Tainaka K, Enomoto T.	4. 巻 24
2. 論文標題 Three-dimensional understanding of the morphological complexity of the human uterine endometrium	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 102258
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2021.102258.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Inoue M, Saito R, Kakita A, Tainaka K.	4. 巻 29
2. 論文標題 Rapid chemical clearing of white matter in the post-mortem human brain by 1,2-hexanediol delipidation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioorg. Med. Chem. Lett.	6. 最初と最後の頁 1886-1890
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2019.05.049.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tainaka K, Murakami TC, Susaki EA, Shimizu C, Saito R, Takahashi K, Hayashi-Takagi A, Sekiya H, Arima Y, Nojima S, Ikemura M, Ushiku T, Shimizu Y, Murakami M, Tanaka KF, Iino M, Kasai H, Sasaoka T, Kobayashi K, Miyazono K, Morii E, Isa T, Fukayama M, Kakita A, Ueda HR.	4. 巻 24
2. 論文標題 Chemical Landscape for Tissue Clearing Based on Hydrophilic Reagents.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Rep.	6. 最初と最後の頁 2196-2210.e9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2018.07.056.	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14件 (うち招待講演 9件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 田井中一貴
2. 発表標題 脳透明化
3. 学会等名 第3回若手育成セミナー「神経回路の可視化・操作・モデリングのための最先端技術」(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kazuki Tainaka
2. 発表標題 CUBIC: Whole-brain/body imaging with single-cell resolution using hydrophilic chemical cocktails
3. 学会等名 International Symposium of Biofunctional Chemistry (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田井中一貴
2. 発表標題 CUBIC: 生体組織透明化による包括的3Dイメージング技術
3. 学会等名 新潟医学会特別講演（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田井中一貴
2. 発表標題 CUBIC: 組織透明化技術による3Dイメージング
3. 学会等名 第60回新潟生化学懇話会プログラム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田井中 一貴・齋藤 理恵・井上 雅文・柿田 明美
2. 発表標題 3D 神経病理学に向けたホールマウント染色手法の開発
3. 学会等名 第60回日本神経病理学会総会学術研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazuki Tainaka
2. 発表標題 Comprehensive 3D Imaging by Tissue Clearing Technique CUBIC
3. 学会等名 Neuro2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田井中一貴
2. 発表標題 組織透明化による3D神経病理学
3. 学会等名 第16回 日本病理学会カンファレンス (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazuki Tainaka
2. 発表標題 CUBIC: Whole-organ, whole-body imaging with single-cell resolution using chemical cocktails
3. 学会等名 リエゾンラボ炎症シンポジウム in北海道大学 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田井中一貴
2. 発表標題 有機化学が拓く次世代3D組織化学
3. 学会等名 第5回 北海道大学部局横断シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田井中一貴
2. 発表標題 組織透明化技術CUBICによる3D神経病理学
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会 第13回年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田井中一貴
2. 発表標題 組織透明化技術CUBICによる3D神経病理学
3. 学会等名 第107回日本病理学会総会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田井中一貴
2. 発表標題 水溶性試薬による組織透明化の化学
3. 学会等名 第12回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kazuki Tainaka, Rie Saito, Akiyoshi Kakita
2. 発表標題 Development of 3D neuropathology based on tissue clearing technique
3. 学会等名 ICN2018, 19th International Congress of Neuropathology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kazuki Tainaka
2. 発表標題 CUBIC: Whole-brain/body imaging with single-cell resolution using hydrophilic chemical cocktails
3. 学会等名 BRI The 9th international symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 田井中一貴	4. 発行年 2019年
2. 出版社 公益社団法人 日本分析化学会	5. 総ページ数 8
3. 書名 『ぶんせき』2019年10号 入門講座 組織透明化技術と蛍光顕微鏡 3D イメージング	

1. 著者名 田井中一貴	4. 発行年 2020年
2. 出版社 文光堂	5. 総ページ数 4
3. 書名 『病理と臨床』2020年3月号 組織・細胞の透明化	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------