

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：12602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23989

研究課題名（和文）マウス足底の組織透明化による汗腺および近傍の神経線維の網羅的解析手法の開発

研究課題名（英文）Whole-organ analysis of sweat glands in mouse footpad by tissue clearing

研究代表者

飯田 忠恒 (Tadatsune, Iida)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：80844381

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：発汗は中枢神経からの指令が皮膚の汗腺に伝わることで生じるが、多汗症や無汗症などの発汗障害は原因がどこにあるのか未解明の部分が多い。そこで本研究ではマウスを用いた発汗研究を行うための解析技術の開発を行った。汗腺は複雑なコイル状構造を持つため、その変化を正確に捉えるためには全体を3次元観察することが有効である。まず組織透明化法や染色法の最適化を行うことで、汗腺全体を顕微鏡撮影することに成功した。さらに撮影した汗腺を画像処理によって直線化することで、形態解析を容易に行えるプログラムを作成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多汗症や無汗症などの発汗障害は、その病態が未解明な部分が多く、治療は対症的に行われる場合が多い。発汗は神経系と、汗腺の平滑筋細胞、分泌細胞など多種の細胞の協調によって生じるため、培養細胞を用いた研究には限界があり、マウス等の動物個体を用いた実験が必須である。本研究で確立した、マウスの汗腺を周囲組織を含めて丸ごと形態評価できる新しい手法は、発汗障害の病態解明を通じて医学の発展に寄与するものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：The process of sweating involves command from the brain, transmission through peripheral nerves, sweat production and ejection by sweat glands in the skin. However, the cause of the sweating disorders, including primary hyperhidrosis and hypohidrosis, are often not clear. In this study, we established a pipeline for morphological analysis of the whole sweat glands in mouse footpad, for studying mouse models of sweating disorders. The pipeline includes three-dimensional imaging of the whole glands and nerve fibers surrounding them, which could effectively capture morphological changes in the complex structure of the glands. We also developed an image processing program that create a linearized image of sweat gland from the captured image, which could facilitates morphological assessment of the gland.

研究分野：皮膚科学

キーワード：組織透明化 皮膚 発汗

## 1. 研究開始当初の背景

発汗は、温熱や精神的緊張を契機として中枢神経から指令が出ると、皮膚にある汗腺が反応して汗を作り、皮膚表面に送り出すことで生じる。多汗症や無汗症といった発汗障害は、日常生活に大きな支障をもたらし、特に無汗症は体温調節障害により生命の危機をもたらす病気である。しかしその原因は不明な点が多く、治療は対症的に行われる場合がほとんどである。発汗障害の病態解明には、汗腺の形態変化を詳しく解析することが必要と考えられるが、汗腺は複雑な3次元構造を取るため、従来の2次元的な観察方法ではその全体像を捉えることは難しかった。近年、組織透明化技術を用いた3次元的な組織解析方法が発展しているが、この技術を用いれば汗腺や神経などの細長く蛇行する構造全体をトレースすることや、汗腺周囲の細胞の空間分布等を正確にとらえることができる。また、マウスは足底に唯一汗腺を有し、発汗障害の研究には欠かせない部位と考えられるが、この部位に着目した組織透明化による3次元組織解析の報告は調べうる限り行われていなかった。そこで、本研究課題ではマウスの足底にある汗腺を3次元的に観察し解析する技術を開発し、発汗障害の研究基盤技術の確立を目指すこととした。

## 2. 研究の目的

本研究では、げっ歯類が唯一汗腺を有する部位である足底を対象に、組織透明化を利用した広範囲かつ3次元的な組織学的解析手法を開発することを目的とした。特に、複雑な構造をとる汗腺から正確に形態学的情報を取得するための、3次元的な画像解析システムを作ることを重視し、発汗障害のモデルマウスを用いた今後の病態研究に役立てることを目指した。

## 3. 研究の方法

マウス足底にある汗腺の3次元的な形態解析手法を確立するため、以下の4項目に沿って研究を進めた。

### (1) マウス足底の透明化・イメージング法の最適化

マウス足底に有効な透明化・イメージング手法は報告されていなかったため、まず脳などの他の臓器で開発された各種の手法を、マウス足底に適用して検討し、最適化した。

### (2) 汗腺と神経線維の3次元染色法の確立

薄切された切片で有用な染色法も、3次元的に観察を行うためには試薬の浸透の問題等で使用できない場合が多い。そのため汗腺および神経線維をサンプル全体で染色できる方法を探索した。

### (3) 汗腺3次元画像の解析プログラムの作成

組織透明化技術により広範囲の3次元画像の取得が可能となったが、取得した画像を解析するには従来の2次元的手法では限界があり、各臓器に適した3次元解析法の開発も並行して行う必要がある。本研究でも汗腺の形態情報を取得するための解析プログラムの作成を行った。

### (4) 発汗障害モデルマウスによる検証

開発した画像取得および解析手法が有用であることを確認するため、発汗障害を起こすことが知られる糖尿病モデルマウスに適用することで検証を行った。

## 4. 研究成果

### (1) マウス足底の透明化・イメージング法の最適化

マウスは、足底のfootpad(肉球)と指先に汗腺を持つ。この汗腺を薄切せず丸ごと3次元イメージングする方法を検討した。組織透明化方法としては、主にマウス脳を対象として開発された技術であるCLARITY(文献)、Scale S(文献)、CUBIC(文献)、SeeDB2(文献)や70%グリセロール浸漬などを試したが、最も透明度が高く深部観察に適していたのはRapiClear®(SunJin Lab)への単純浸漬であった。透明化した汗腺を含む足底組織は、長作動距離対物レンズを装着した共焦点顕微鏡や、2光子顕微鏡を用いて撮影することで、汗孔からコイル状分泌部に至るまでの汗腺全体を、細胞レベルの解像度で観察することが可能であった(図1)。

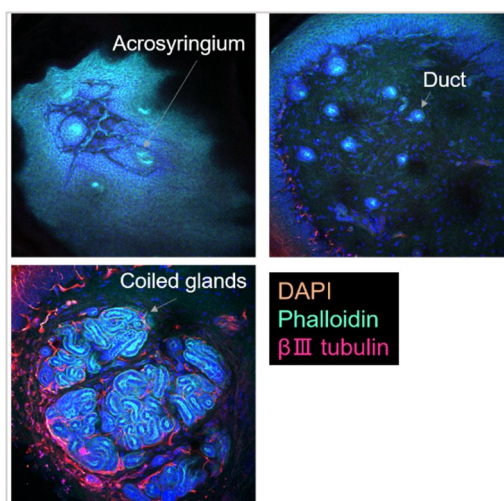


図1 透明化した汗腺の撮影像(2光子顕微鏡)

## (2) 汗腺と神経線維の3次元染色法の確立

汗腺の形態や周囲を走行する神経線維の密度を把握するため、厚みを持つ組織全体で汗腺や神経が均一に標識できる染色方法を探索した。その結果、汗腺を含む足底組織では DAPI による各染色、phalloidin を用いたアクチン染色が汗腺の標識に、 $\beta$ 3 Tubulin に対する免疫染色が神経線維の標識に用いることができることを確認した(図1)。組織固定と染色、透明化を含め、6日間で3次元イメージング用のサンプル作成を完了するプロトコルを確立した。

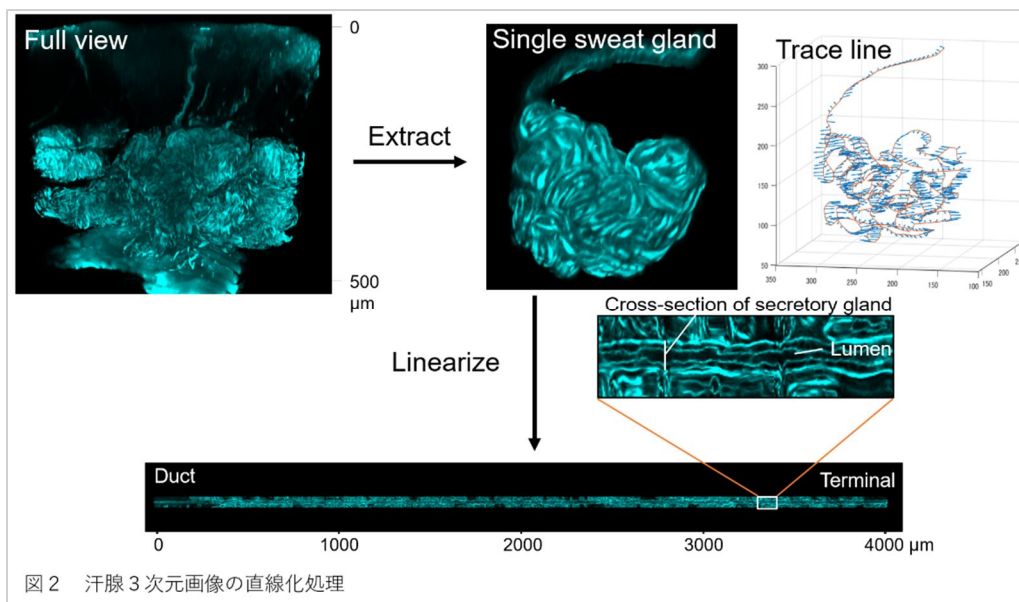


図2 汗腺3次元画像の直線化処理

## (3) 汗腺3次元画像の解析プログラムの作成

汗腺は複雑なコイル状構造をとるため、全体像が撮影できてもその全長や太さ、周囲の神経密度などの形態学的情報を得ることは容易ではない。そこで、管腔をトレースしたデータをもとに汗腺を直線状に展開するプログラムを開発した(図2)。このプログラムは、汗腺の走行に垂直な断面像を、一定方向に整列させるよう画像変換することで展開を行う処理内容となっている。直線化した画像からは、容易に腺管径および神経密度を計測することができた。

## (4) 発汗障害モデルマウスによる検証

開発したマウス足底汗腺の3次元イメージングおよび画像解析法の有用性を確かめるため、発汗障害を起こすマウスモデルを用いて解析を行った。その結果、発汗障害を合併する糖尿病モデルマウスである db マウスでは、汗腺周囲の神経密度が減少し、管腔が狭小化する傾向を捉えることができた(図3)。

以上から、マウスを用いた発汗研究の基盤技術として活用できる手法が、当初の計画通りに開発できたものと考えられる。今後は、開発した手法を用いて無汗症や多汗症、発汗異常の関わる各種疾患の病態解析を行っていく予定である。

### <引用文献>

Douglas S. Richardson and Jeff W. Lichtman, Clarifying Tissue Clearing, Cell, Volume 162, 2015, 246-257.

Hiroshi Hama, Hiroyuki Hioki, Kana Namiki, et al. Sca/eS: an optical clearing palette for biological imaging, Nature Neuroscience, Volume 18, 2015, 1518-1529.

Meng-Tsen Ke, Yasuhiro Nakai, Satoshi Fujimoto, et al. Super-Resolution Mapping of Neuronal Circuitry With an Index-Optimized Clearing Agent, Cell Reports, Volume 14, 2016, 2718-2732.

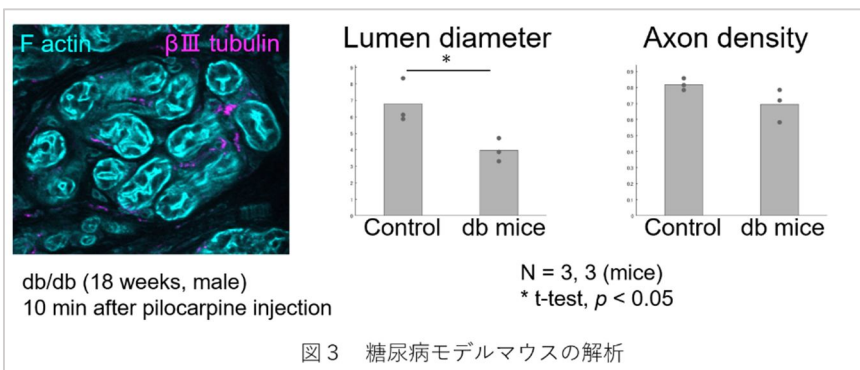


図3 糖尿病モデルマウスの解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 飯田忠恒, 中村美智子, 宗次太吉, 藤本智子, 並木剛, 大嶋雄一郎, 中里良彦, 横関博雄
2. 発表標題 特発性後天性全身性無汗症の予後調査結果
3. 学会等名 第119回日本皮膚科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 深江大毅, 飯田忠恒, 宗次太吉, 並木剛, 横関博雄
2. 発表標題 特発性後天性全身性無汗症の組織学的解析
3. 学会等名 第28回日本発汗学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tadatsune Iida, Daiki Fukae, Hiroo Yokozeki
2. 発表標題 Multicolor three-dimensional reconstruction of whole murine sweat glands using optical clearing and two-photon excitation microscopy
3. 学会等名 The 45th Annual Meeting of The Japanese Society for Investigative Dermatology (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 深江大毅, 飯田忠恒, 宗次太吉, 小林大輔, 横関博雄
2. 発表標題 特発性後天性全身性無汗症の病態解析-汗腺の形態変化と炎症細胞浸潤について
3. 学会等名 第120回日本皮膚科学会総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔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
---------	---------