

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24240053

研究課題名(和文)生物構造の大規模かつ高精細3次元再構築技術の多面的開発研究

研究課題名(英文)Technological innovations for large-scale high-resolution 3D reconstruction of biological structures.

研究代表者

宮脇 敦史(Miyawaki, Atsushi)

独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・チームリーダー

研究者番号：80251445

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 36,100,000円

研究成果の概要(和文)：生体固定組織を透明にする試薬Scale技術を改良、改善、および多様化することを行ってきた。まず、新たなScale試薬を開発し、組織体積の不変、透明化スピードアップを達成した。また、組織を切らずに免疫組織染色および組織化学染色を可能にする技術Ab-Scale、Chem-Scaleを開発し、たとえば、アルツハイマー病モデルマウスあるいは患者死後脳におけるアミロイドプラークの大規模3次元再構築を得ることに成功した。合わせて、3次元空間で距離、面性、体積、物体数などを定量する解析ソフトウェアを開発した。

研究成果の概要(英文)：We developed a new Scale system with diverse applications on a spectrum from clearing to preservation. On the one hand, we cleared brain slices within hours; on the other hand, we achieved consecutive light and electron microscopic analysis for whole brain clearing at synaptic vesicle resolution. The new Scale solution was engineered for aging brain in mouse models of Alzheimer's Disease (AD) and two applications, AbScale and ChemScale, used immunological and chemical labelling, respectively, for lucid visualization of amyloid plaques, neurons, and microglia in close proximity. The solution also cleared postmortem human brain tissue from AD patients to reveal novel and nascent amyloid plaque distribution patterns. Thus, our new Scale system is a simple, powerful, versatile, and reproducible clearing method for adult tissue with applications for multi-scale neural circuit analysis, high-resolution clinical pathology, and precise 3D visualization of cellular microenvironments.

研究分野：バイオイメージング

キーワード：組織透明化 3次元構築 神経回路 免疫組織学

1. 研究開始当初の背景

脳神経系において、神経細胞同士の連絡を網羅的に調べるコネクトミクス・プロジェクトが世界規模で行われている。神経回路の構造を高精細に観察するためには、脳組織の切片の蛍光画像を何枚も連続的に取得し、それらを積み上げていくことが必要である。切片の作り方には、機械的に切る方法と光学的に切る方法の2つがある。機械的な方法では、脳表面からの深さにかかわらず高精細な蛍光観察が可能だが、大変な労力を伴い、また3D再構築が非常に困難である。一方、光学的な方法では、光が脳組織内部で散乱するため、観察部位が脳表面から深くなるにつれ画像が暗くぼやけるという問題がある。蛍光イメージング技術においては、生体試料の表面から深部に向かってどこまで蛍光を観察できるか(観察深度限界)という課題があるが、脳組織の場合、通常の一光子励起顕微鏡で0.15 mm、二光子励起顕微鏡でも0.7 mm程度が限界である。マウス成獣の脳の場合は、表層の皮質の厚さが約1 mmあり、皮質よりも脳の内側にある海馬や視床を観察するには、数mmまで観察深度限界を広げる必要がある。

これまでに、光の散乱を取り除く技術(透明化試薬)がいくつか開発されてきたが、いずれも有機溶媒が基になっており、ホルマリン固定した組織を脱水する過程や透明化試薬そのものの影響で、観察したい生物構造の蛍光が消失してしまうという問題があった。生体試料の脱水を必要としない水溶性で、かつ蛍光色素にやさしい透明化試薬の開発が求められていた。

2. 研究の目的

生物組織を透明化するScale技術の改良を元に、様々な実験動物の様々な組織・器官を透明化する技術を多角的に開発し、標識3次元構造を大規模かつ高精細に可視化・再構築する技術基盤を築く。最新の遺伝子導入技術と

蛍光蛋白質技術、或いは古典的な組織染色技術を組み込み、生物構造を様々な空間スケールで理解するための技術を実践的に開発する。

3. 研究の方法

以下の3つを並行して行った。

Scale技術の改善。組織透明化に要する時間を短縮する方法、および透明化に伴う組織膨潤を防ぐ方法の確立。

マウスの脳以外の組織・器官・臓器を対象とする方法の最適化。マウス以外の実験動物を対象とする方法の最適化。

サンプルを全く切らない3D免疫組織観察、3D in situ hybridization法の開発。

試料の透明化については、試薬の開発およびプロトコール作成を進める。画像データの取得と3D再構築については、ハードウェアおよびソフトウェアの開発を併せて行う。

4. 研究成果

平成24年度は、Scale化した組織の特異抗体を用いた染色法、すなわち「3D免疫組織観察法」の確立をほぼ終了することができた。また「マウスの脳以外の組織・器官・臓器を対象とする方法の最適化、ならびにマウス以外の実験動物を対象とする方法の最適化」について、マウスの脊髄、心臓、肺、脾臓、腎臓、ならびに筋組織の透明化に最適な条件をほぼ確立した。

平成25年度は、Scale技術および他の追従する透明化技術によって、我々が2011年度の論文発表で強調したコンセプト「2Dから3Dへ」の共有認識が拡がりつつあった。固定脳透明化技術に内在する問題点も明らかになり、当該技術を開発しながら新しい課題を見出すことができた。脳組織の処理技術に始まり、蛍光色素、光学顕微鏡、電子顕微鏡、データ解析などに拡がる学際的技術開発研究を進めた。

平成26年度は、ScaleS試薬を用いた固定組織透明化技術を開発した。ScaleA2試薬による固定組織（主として脳）の膨張・長い処理時間を大幅に改善することができた。ScaleS試薬が、透明化が難しい老齢動物脳や高齢のヒト脳由来の固定組織についても適応可能であることを確認した。また、ScaleS試薬が組織にマイルドに作用し、透明化後も組織の超微形態を良好に保つことがわかった。特に後者に関連しては、光学顕微鏡で可視化された特徴的構造部位を電子顕微鏡に持ち込んでズームインすることが可能になった。特に神経組織におけるシナプスなどの解析に効果を発揮する。

組織透明化技術にとって、透明化した組織の観察から得られる大容量の画像データ処理は大きな課題であり、効率的なハードウェアの構築ならびにこれまでの概念を超えた画像のタイリングソフトなどの新たな専用ソフトウェアの開発が重要な鍵である。この点について種々の研究機関を含めて情報交換を行い、一方で、独自の方法の開発を進めた。

3次元免疫組織染色についてAbScale法というプロトコルを、3次元組織化学染色についてChemScale法というプロトコルを開発した。これらの方法により、老齢化とともにアミロイドプラークを多発するアルツハイマー病モデルマウス脳の全半球、さらにはアルツハイマー病患者由来の3-4 mm角の大脳組織ブロックで、免疫組織染色および組織化学染色が可能になった。染色後の組織をScaleS試薬による透明化技術と組み合わせることで3次的に染色の様子を観察することができ、さらには同じ組織から特徴的な染色像を示す部位を容易に切り出し、前述したように電子顕微鏡観察用のサンプルとして移行させることが可能になった。引き続きアルツハイマー病を始めとした神経変性疾患モデルマウス、またヒト組織を用いて特徴的な3次元免疫染色を行い詳細な解析を行った。

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 0件)

〔学会発表〕(計 9件)

1. 宮脇敦史: Cruising inside X, 第29回Wakoワークショップ 「蛍光生体イメージング：見ることによって切り拓く新しい研究展開」, The Grand Hall (東京品川区), 2013.11.5.
2. 宮脇敦史: 脳神経系を解析するための学際的技術開発, 第37回日本神経科学大会, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市), 2013.9. 11.
3. 宮脇敦史: Cruising inside cells, 第12回日本再生医療学会, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市), 2013.3. 21.
4. Atsushi Miyawaki: Cruising inside X, EMBL Symposium: Seeing is Believing- Imaging the Processes of Life, Heidelberg, Germany, 2013.10. 6.
5. 宮脇敦史: Cruising inside X, 16th Medical Image Computing and Computer Assisted Intervention, 名古屋大学 (愛知県名古屋市), 2013.7. 20.
6. Atsushi Miyawaki: New fluorescent probes and new perspectives in neuroscience, Cold Spring Harbor Asia Conference on New Advances in Optical Imaging of Live Cells and Organisms, Suzhou, China, 2013.5. 6.
7. Atsushi Miyawaki: Fluorescent proteins and biological sensors, HHMI Janelia Farm Conference on Fluorescent proteins and biological

sensors III, Janelia Farm, USA, 2012.11.5

8. 宮脇敦史: Cruising inside cells, 日本生物物理学会第 50 回年会, 名古屋大学(愛知県名古屋市), 2012.9.23.

9. Hiroshi Hama, Hiroshi Kurokawa, Hiroyuki Kawano, Atsushi Miyawaki: ScaLE: A Chemical Approach For High-Resolution Fluorescence Imaging And 3d Reconstruction Of Transparent Mouse Brain, 8th FENS Forum of Neuroscience, Barcelona, Spain, 2012.7.15.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 1 件)

名称: 抗体組成物、抗体組成物調製用キット、及び免疫染色方法

発明者: 宮脇敦史、濱裕

権利者: 理化学研究所

種類: 特許

番号: WO2014010633 A1

出願年月日: 2013 年 7 月 10 日

国内外の別: 国内

○取得状況(計 1 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

<http://www.brain.riken.jp/jp/faculty/details/30>

6. 研究組織

(1)研究代表者 宮脇敦史 (Miyawaki Atsushi)
独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・チームリーダー

研究者番号: 80251445

(2)研究分担者 濱裕 (Hama Hiroshi)
独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員

研究者番号: 30261796

(3)連携研究者 下郡智美

(Shimogori Tomomi)

独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・チームリーダー

研究者番号: 30391981

(4)連携研究者 黒川裕 (Kurokawa Hiroshi)
独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員

研究者番号: 60631653

(5)連携研究者 阪上朝子 (Sakaue Asako)
独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員

研究者番号: 10415169

(6)連携研究者 吉原良浩

(Yoshihara Yoshihiro)

独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・チームリーダー

研究者番号: 20220717

(3)連携研究者 安藤亮子 (Ando Ryoko)

独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員

研究者番号: 10706170