

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15402

研究課題名(和文) 脳内分子可視化による新たな病因分子診断法の開発

研究課題名(英文) Development of a tissue-clearing protocol for postmortem diagnosis of molecular pathogens in the brain

研究代表者

松本 博志 (MATSUMOTO, HIROSHI)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：60263092

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：死因究明において、死後の臓器・組織の病的変化を明らかにすることは重要である。しかしながら、画像撮影や従来からの組織検査では限界があり、たとえば、精神障害等脳機能障害や急性脳症、睡眠時無呼吸症候群、不整脈等の存在すら死後で証明することは難しい。そこで、この研究では、脳にフォーカスを絞って、死後脳を可視化させてその機能的評価をすることを検討した。透明化については脳、肺、膵臓で完全な透明化が出来たのに対し、心臓、肝臓、脾臓では若干色が残った。透明化脳に対して神経線維染色とヘキスト核染色を行ったところ、ヘキストでは鮮明な画像が得られ、最重要課題であった透明化プロトコルを確立できた。

研究成果の概要(英文)：It is important to clarify the pathological changes of organs / tissues after death in investigating the cause of death. However, there are limitations in image photographing and histological examination in the past, and it is difficult to prove the presence of brain dysfunction such as mental disorders, acute encephalopathy, sleep apnea syndrome, arrhythmia, etc. after death. Therefore, in this research, we focused on the brain, visualized the brain after death and examined its functional evaluation. As to transparency, it was completely transparent in the brain, lungs and pancreas, whereas in the heart, liver, spleen some color remained. When nerve fiber staining and Hoechst nuclear staining were performed on the transparent brain, clear images were obtained in Hoechst, and a tissue-clearing protocol which was the most important task could be established.

研究分野：法医学

キーワード：死因究明 脳 透明化 死後分子同定

## 1. 研究開始当初の背景

### 学術的背景

法医学実務において、未だ機能性疾患および機能性障害による死亡について明らかにできない。このことは、たとえば浴槽内死亡における原死因が、溺水、虚血性心疾患、脳梗塞、熱性失神等に分かれているおり、いずれにおいても死後診断が明確にできないことが知られている。そこで、私たちは、iPS 細胞(山中ら、Cell 2006)を用いて生前の機能性疾患を証明する試みを行っている(平成 26 年度挑戦的萌芽研究)。その中で、分化させた神経細胞においては遺伝的背景がない機能性疾患の証明が難しいことを得られてきた(論文準備中)。一方、昨年、Chung らがマウス全脳を可視化する方法(C L A R I F Y)を考案し(Nature 2013)、さらに今年に入って、Susaki らがマウス脳を可視化する方法(C U B I C)を考案した(Cell, 2014)。また、Tomer らはそれを進化させた脳を可視化する Advanced CLARITY を発表した(Nature Protocols, 2014)。いずれも脂肪組織を排除して全脳を透明固定させる技術で、標的細胞や標的分子を可視化することができるものである。

## 2. 研究の目的

### 1) どこまで明らかにしようとするのか

以上の背景から、この研究では C L A R I F Y と C U B I C の技術を用いて、古典的てんかんモデルマウスにおいて、てんかん発作前と発作後の脳を可視化させ、その活性化部位つまり皮質領域におけるドーパミン系、グルタミン系ニューロンの活性化を検出する。次に死後 12 時間経過した脳において同様の試

みを行う。次に薬物誘発てんかんモデルにおけるてんかん死亡例において同様の試みを行って、検出可能なことを証明することを目指す。但し、明らかな死後における挑戦のため、透明化そのものの原理からうまく既存の方法でうまく行かない可能性もある。したがって、透明化プロトコルの確立を最重要の目的とした。

### 2) 学術的な特色及び予想される結果と意義

C L A R I F Y および C U B I C は脳の脂肪成分を除去し可視化させる技術である。現在はその技術的な部分について論文化されてはいるものの、病態脳に関する応用はもちろん死因に関係する部分についての検討はなされていない。現在、てんかんをはじめとする脳における機能障害は死後証明できていない。この形態学的に可視化する技術を用いて機能障害を明らかにすることがこの研究の特色である。予想される結果として活性化したニューロンの検出が可能であることが明らかになり、結果としてヒトへの応用が可能となる。一方で、明らかな死後における挑戦のため、透明化そのものの原理からうまく既存の方法でうまく行かない可能性もある。したがって、透明化プロトコルの確立が重要かつ意義深いと考えた。

## 3. 研究の方法

C L A R I F Y (Nature Protocols, 2014) および C U B I C 法 (Cell, 2014) にしたがって脳可視化法を確立する。その後、てんかん誘発モデルマウスにおいて、同様に脳を可視化させ、活性化したニューロンを検出する。さらに誘発させたてんかんにて死亡したマ

ウスモデルについても同様に検討し、てんかんで死亡したことを可視化させた脳で証明できることを確立させる。順調に進んだ場合は、倫理委員会の承認後にヒト剖検脳に応用し可能か否かを検討し、死因診断技術の確立を目指した。

1) CLARIFYおよびCUBIC法を用いた脳可視化法の確立

Nature Protocols ( Nature Protocols 9:1682-1697 ) に従って、ラットを麻酔下で脳、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、副腎をホルマリンとアクリルアミドが含有したHM液にて20分間灌流固定する。その後摘出しHM液で丸1日暗室にて4℃でインキュベートした。次に脳から、真空ポンプを用いて酸素を除去した後、37℃の水槽にて密封されたコニカルチューブ内に脳を入れて3～4時間おき、重合を促進させた。SBC緩衝液にて24時間室温で洗った後、ETCチャンバーで透過するまで37℃で最大4週間までSBC緩衝液を灌流した。

2) 透明化した各臓器を蛍光顕微鏡にて観察した。

3) 透明化脳に対して、特殊染色の可能性の有無、抗体染色法の確立を試みた。

#### 4. 研究成果

CUBIC法を採用して透明化を行い、抗体を用いて分子検出までを検討した。CUBIC法については、透明化と観察に対して2種類の特別調整液を用いて、ラット脳、心臓、脾臓、肺臓、膵臓、肝臓、副腎に対して、ヘパリン含有によるPBSで灌流固定をした後、4度で1日静置、PBSで1日洗浄した後、脱脂肪・脱色を37度で7日間から10

日特別調整薬を行った。その後PBSで1日洗浄した後、2日間特別調整試薬でRIマッキングを行った。

透明化については、脳、肺、膵臓で完全な透明化が出来たのに対し、心臓、肝臓、脾臓では若干色が残った。

透明化脳に対して、神経線維染色とヘキストによる核染色を行ったところ、ヘキストでは鮮明な画像が得られ、重要な、透明化についてプロトコルを安定させ、確実に透明化することができた。この結果を用いて、さらなる透明化とゴルジ染色等の特殊染色と免疫組織染色に検討を行った。特殊染色については、透明化技術そのものの、物質の屈折率等によるものであるため、逆に透明化できなくなるという結果が得られ、特殊染色については適用できないことが明らかになった。免疫組織染色については、比較的深部にまで抗体をアプライさせることが可能なことを証明した。ただし、二次抗体のアプライ等にはブロッキングや洗浄等の諸課題に関する解決が課題として得られた。以上については、死後臓器透明化法として特許申請準備中とともに投稿準備中である

#### 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 件)

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 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 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

松本 博志 (MATSUMOTO, Hiroshi)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：60263092

### (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

杉本 香奈 (SUGIMOTO, Kana)

大阪大学・医学系研究科・講師

研究者番号：00581034