

令和 2 年 7 月 27 日現在

機関番号：82610

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16522

研究課題名（和文）透明化技術を用いた肝臓内部可視化による移植後膵島の研究

研究課題名（英文）Study of post-transplant islets by visualization inside the liver using transparentization technique

研究代表者

篠原 孝也 (Shinohara, Koya)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・研究員

研究者番号：90751735

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）：本研究では1型糖尿病の治療法として期待される膵島移植の術後検証モデルを作成し、実際の治療に役立てることを目標として開始した。膵島移植の課題の一つに門脈注入後の低い膵島の生着率があり、その原因・メカニズムの解明が必要であるが、門脈注入後は移植された膵島を直接観察できなくなることが大きな障害になっている。そこで、近年注目されている臓器の透明化技術に着目し、センチメートル単位で観察可能なシートレーザー蛍光顕微鏡と併せて用いることで、マウスの肝臓内部を可視化し、マクロ視野および微細構造の双方で3次元構造を保ったままに詳細な観察が可能になった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、生物の内部構造を把握するために多くの生物が解剖されてきた。しかし、解剖には限界があり、特に臓器の様に複雑な細胞や神経系、血管網を把握することはとても困難であった。本研究の透明化技術によって生物を透明化することによって、血管網や中枢神経系などの分析が難しい部位の構造を把握が容易になった。また本研究によって血管等に移植した移植片の検出も可能となったので、今後さらにこの技術の研究を進めることで様々な応用が可能になると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we created a post-operative verification model of islet transplantation, which is expected as a treatment for type 1 diabetes, and started it with the goal of using it for actual treatment. One of the issues of islet transplantation is the low engraftment rate of islets after portal vein injection, and it is necessary to elucidate the cause/mechanism, but after transplantation of the portal vein, it may become impossible to directly observe the transplanted islets. It is a big obstacle. Therefore, focusing on the technology of organ transparency, which has been attracting attention in recent years, by using it together with a sheet laser fluorescence microscope that can observe in centimeters, the inside of the liver of a mouse can be visualized, and both macroscopic and microscopic structures can be visualized. Detailed observation became possible while maintaining the three-dimensional structure.

研究分野：生命科学

キーワード：透明化 移植 膵島

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

現在 1 型糖尿病の根治的治療として膵臓移植や膵島移植が行われており、特に膵島移植は負担が少ない治療として有望である。通常膵島は門脈内に注入され、肝臓内に生着する。しかしながら、移植後早期に instant blood mediated inflammatory reaction (IBMIR) と呼ばれる凝固・炎症反応が引き起こされ、さらに分離時に血管網も寸断されているため半数以上の膵島が破壊されるとされている。さらに長期的には拒絶反応、免疫抑制剤毒性、脂質毒性、高血糖毒性、自己免疫再燃などにより徐々に機能が低下することも課題である。これらの克服のためには各現象の原因・メカニズムの解明および解決法の開発が必要だが、現実的には門脈注入後の肝臓内の膵島は外部から観察できず、その分布や経時的細胞数の変化を直接検証するのが難しかった。これまでも肝臓を薄切して 2 次元的に観察するか、超音波や MRI など外部から検査する方法はあったが<sup>1)</sup>、簡便性、解像度、染色不可等の問題で微細な検証はできていなかった。

近年、小動物の臓器を形態・3 次元構造を保ったまま透明化する技術が発展してきている。特に以前の技術では困難であった、容易かつ安定的な組織の透明化が可能になってきた。加えて、透明化技術の進歩も格段に進んでおり、その透明度や透明化に掛かる日数なども改良されてきている。また、顕微鏡が発達し、ライトシートレーザー蛍光顕微鏡というシート状の励起光を照射する蛍光顕微鏡を用いることで、数 cm 程度の厚みであれば 3 次元の構造を詳細に観察することが可能となった。

上記の臓器透明化技術と顕微鏡技術を組み合わせて、マウスなどの脳を透明化して、神経細胞等の染色を行った検体を 3 次元的に観察し、神経線維の走行などを詳細に検証できるようになったと報告されている<sup>2)</sup>。しかし、他の臓器、特に肝臓などの血流が多くサイズの大きな実質臓器の透明化は以前困難なままであった。

## 2. 研究の目的

そこで申請者は、膵島移植の移植生着部位である肝臓全体の透明化を試み、これに成功した。そのため、次段階として膵島モデルの蛍光ビーズを肝臓内に注入後、肝臓の透明化し、3 次元イメージングを図った結果、これにも成功した。本研究では、本技術を応用し、肝臓内に移植した膵島を 3 次元構造を保持したまま臓器全体ならびに細胞レベルで詳細に解析し、膵島移植後のモデルを作成することを目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究ではマウスを用いて経門脈的に膵島を移植し、その後急性期～長期にわたって経時的に肝臓全体を透明化 (Scale/CUBIC<sup>3,4)</sup> 法) し、内部を 3 次元的に観察する。

分離した膵島の移植、肝臓の透明化、3 次元観察という一連の流れを確立し、移植後膵島の肝全体の分布、膵島周囲の血管新生・炎症・線維化・免疫細胞浸潤等を経時的にマクロ、ミクロ視野双方で 3 次元観察する。

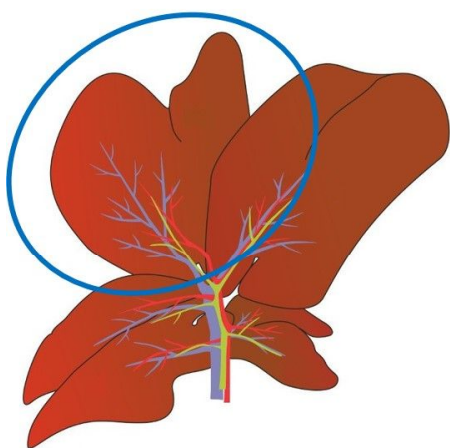
膵島移植の課題の一つである門脈注入後の低い膵島の生着率の原因・メカニズムの解明を試みる。膵島の生着を阻害している機構がわかれば、それを改善する方法 (新しい

免疫抑制剤や抗炎症薬など)を用いて本方法にて比較検証を行う。

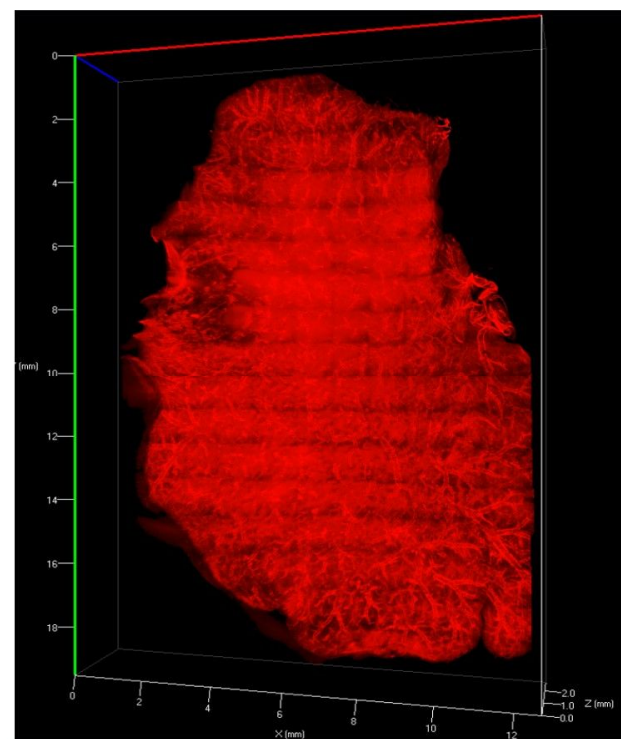
#### 4. 研究成果

平成 29 年度はまず本研究の基礎的な手技でもある「マウス膵島の単離法」と「単離した膵島の移植法」のに関してプロトコルの見直しを行い、手技の均一化とその再現性を高めることを目標として研究を行っていた。「マウス膵島の単離法」については、本年度で大きく改善された。そのポイントとしては胆管へのカニューレーションの際に、カニューレーションチューブを予め伸ばして細くしておくことによって性差・個体差による胆管の広狭に対応できるようになった。これにより胆管へのカニューレーションの成功率が格段に上昇し、安定した膵島の採取が可能となった。「単離した膵島の移植法」については、移植部位を“門脈”からその下流あたる“上結腸静脈”に変更することで、移植後のマウスの致死率が3~4割程度だったものが1割未満となり大幅に改善された。

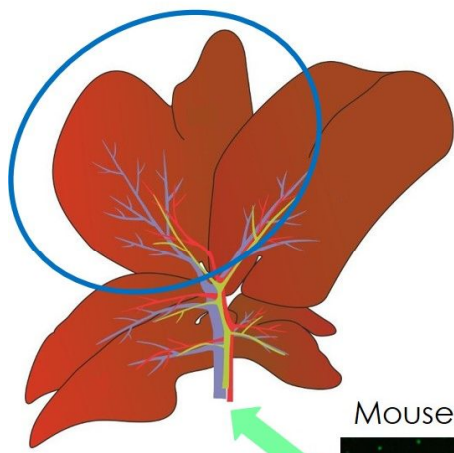
平成 30 年度においては、本研究の基礎的な手技でもある「マウス膵島の単離法」について更に改良が加えられ、コラゲナーゼによる膵臓の消化時間を最適化することで一度に単離できる膵島数が 200 個程度から 300 個程度に大きく増加させることができるようになった。また、本年度は「PFA による固定」と「TrioInX-100 による組織の透過」を調節することで、以前より課題であった透明化の過程で生じる GFP 蛍光の退色問題を解消することができた。これにより GFP 膵島の蛍光の長期的な維持が可能となった。加えて、かねてより課題とされていた「透明化臓器の免疫蛍光染色」に関しても、肝臓摘出後の再灌流経路を構築することで、灌流しながら免疫染色を行うという画期的な染色法を確立し、再現性を得ることができるようになった。



Transparentizing  
Immunostaining



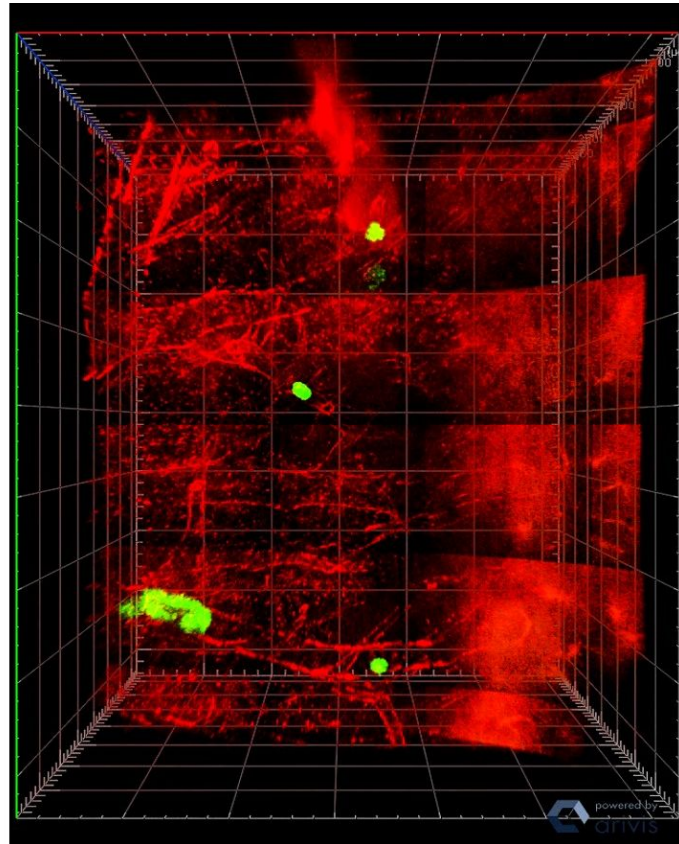
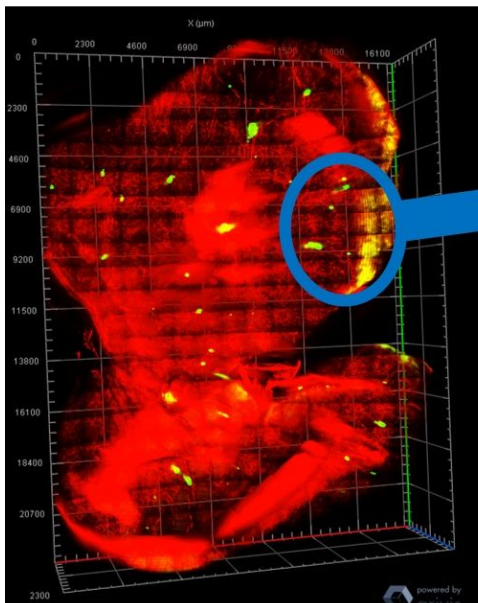
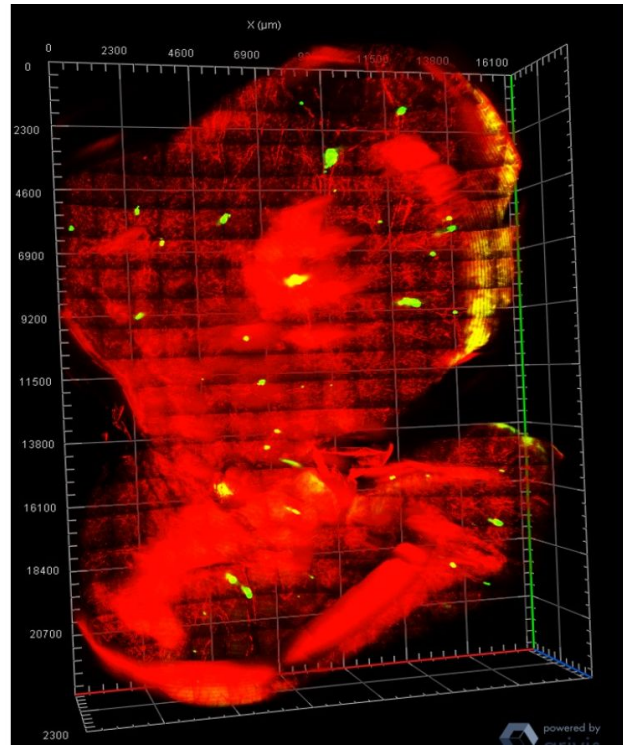
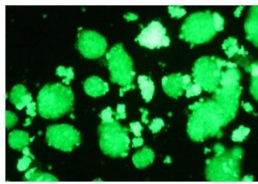
平成 31 年度においては、これまでの結果を踏まえて、膵島移植から透明化、免疫染色という工程を終えてから 3 次元的解析を行った。



Transparentizing  
Immunostaining



Transplantation  
Via portal



その結果上記のように、移植した膵島が肝臓門脈内の血管内に生着している画像が得られるようになった。しかしながら、肝臓深部は透明化の程度が浅く、また肝臓自体が曲面構造であるためレーザーの透過が一様でなくなってしまう、蛍光のハレーションやノイズが生じている部分が出てきてしまっている。さらに肝臓自体が比較的強めの自家蛍光を発することや抗体による非特異的染色などもあり目的としていた細胞レベルでの解析が難しくなっている。現在、膵島移植後の膵島周囲の経時的な変化を追うとともに、自家蛍光を減弱させる餌の検証や抗体の選定も行い当初の目的である膵島周囲の血管新生・炎症・線維化・免

疫細胞浸潤等を検証中である。

1. Malosio ML, et al. Mr imaging monitoring of iron labeled pancreatic islets in a small series of patients: islets fate in successful, unsuccessful and auto-transplantation. *Cell Transplant*. 2014 Aug 29.
2. Hama H, et al. Scale: a chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain. *Nat Neurosci*. 2011 Aug 30;14(11):1481-8.
3. Tainaka K, Ueda HR, et al. Whole-body imaging with single-cell resolution by tissue decolorization. *Cell*. 2014;159:911.
4. Kubota SI, Ueda HR, et al. Whole-Body Profiling of Cancer Metastasis with Single-Cell Resolution. *Cell Reports*. 2017;20:236.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Koya Shinohara
2. 発表標題 Analysis of changes in pancreatic islets after transplantation in the liver by organ transparency and macro 3D imaging
3. 学会等名 International Pancreas and Islet Transplant Association (国際学会)
4. 発表年 2017年～2019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
--	---------------------------	-----------------------	----