

令和 2 年 5 月 21 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19373

研究課題名（和文）脳小血管病の3D病理解析基盤の確立

研究課題名（英文）Development of 3D pathological analysis of cerebral small vessel disease

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） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、脳小血管病の3Dイメージングを実現するための、ヒト脳新規透明化プロトコルの開発と共に、血管に関連する因子のホールマウント免疫染色プロトコルを開発した。ヒト脳透明化において重要な白質の脱脂を効率的に遂行する脱脂試薬を開発し、ヒト脳剖検サンプルの光学的課題であるリポフスチンなどの強度な自家蛍光を効率よく抑制する透明化プロトコルが得られた。これらの技術基盤により、各種ホールマウント免疫染色技術を確立すると共に、遺伝性脳小血管病の剖検例から血管変性の3D病理像が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳小血管病は脳梗塞の再発、認知機能、歩行障害などと関連することが知られており、臨床の現場では病態の解明および予防策の検討が急務とされている。しかしながら、毛細血管を構成する細胞種の同定や周囲のグリア細胞との関係性、並びに血液脳関門の機能的破綻などを立体的かつ高解像度に可視化する研究手法が確立されていなかったため、治療戦略に繋がる病理所見を得ることが難しかった。本研究により、ヒト脳病理標本の高度な透明化技術と共に血管やその他の関連因子を立体的に可視化する汎用性の高い免疫染色プロトコルが得られた。従って、脳小血管病の3D病態解析を推進する上で必要なシーズとなる萌芽的技術が得られた。

研究成果の概要（英文）：In this study, we developed a novel tissue clearing protocol for postmortem human brain tissue, and whole-mount immunohistochemistry for visualizing vasculature-related molecules to achieve 3D imaging of cerebral small vessel disease. We obtained an efficient delipidation chemicals for human white matter, and succeeded to suppress strong autofluorescence derived from human brain such as lipofuscin. According to a series of these techniques, we analyzed denaturation of capillary, functional disorders of astrocyte, and white matter lesion in clinical tissue samples from such as CADASIL.

研究分野：神経病理学

キーワード：脳小血管病 組織透明化 3Dイメージング

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

脳梗塞の再発、認知機能、歩行障害などの臨床症状を示す血管性認知症に代表される脳小血管病は、100  $\mu\text{m}$  以下の径からなる微小血管の障害および機能破綻、並びにそれらにより惹起される白質変性が主な原因とされている。しかしながら、これらの微小血管は、MRI では検出できず、従来の2次元病理解析では立体像を得ることが困難であるため、脳小血管の病態の本質に迫る技術基盤は確立されていなかった。脳小血管病の病態解析を行うためには、毛細血管だけでなく各種神経細胞、グリア細胞、軸索などの構成因子を立体的かつ包括的に捉えて、正常脳との統計的な比較解析を行う事が必須である。孤発性の動脈硬化性疾患のBinswanger病における大脳動脈の3次元解析は、本疾患におけるランドマーク的業績として評価されていた。しかしながら、上述の報告例は標本の連続切片を作製し、それぞれの明視野画像を取得した上で解析されていたため、一検体あたり膨大な解析時間を要し、汎用性の高い解析技術に昇華していなかった。脳小血管病の特徴的な病理所見は、現在でも微小血管の断面における分子動態の変化しか捉えられておらず、立体構造に基づく汎用性の高い病態解析技術が求められていた。これを実現するには、立体構造を保ったまま、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、ヒト脳組織の高度な透明化技術を用いた高速に3D画像を取得可能なイメージング手法CUBICの開発に成功した。本研究では、脳小血管病の立体的病変構造の可視化を実現する新規の組織透明化・3Dイメージング手法の開発に取り組んだ。

### 2. 研究の目的

本研究では、ヒト脳に適用可能な組織透明化・3Dイメージング技術を開発して、微小血管および周囲の関連因子の空間分布を可視化し、脳小血管病の病態を明らかにすることを目的とする。水溶性溶剤を用いた組織透明化技術においては、組織内の脂質を高度に除去する必要がある。ヒト脳白質は極めて脂質を潤沢に含んでいるため、ヒト脳は透明化の困難な組織の一つである。また、リポフスチンに代表される強度な自家蛍光は、免疫染色による特異的染色の阻害因子になるため、組織の自家蛍光の抑制も大きな課題である。本研究ではこれらの課題を克服し、血管に関連する因子を免疫染色により可視化するホールマウント免疫染色を開発すると共に、遺伝性脳小血管病などの検体を用いた病理解析に取り組んだ。

### 3. 研究の方法

#### 1) 1 cm ブロックのヒト剖検脳サンプルの透明化・3Dイメージング技術の開発

固定組織の透明化プロトコールは、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。1  $\text{cm}^3$  を超える大きな白質病変部位における毛細血管の立体的な配向変化を可視化するためには、現行の脱脂プロトコールでは脱脂効率が不十分である。そのため、高速の脱脂プロトコールを新たに開発する必要がある。また、種々のケミカルプローブや3D免疫染色技術を駆使して脳小血管病の病態解明に取り組むためには、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や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を解決しなければならない。そこで、漂白活性の高い試薬の探索を行った。

#### 2) ホールマウント免疫染色による脳小血管病病理サンプルの3D解析

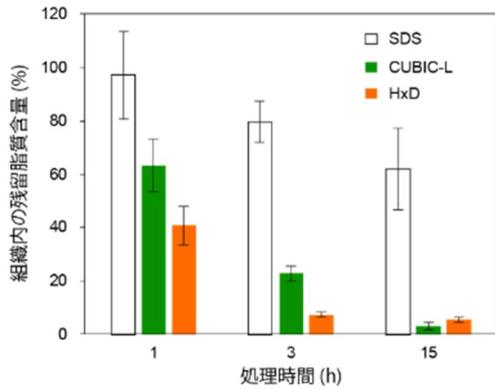
固定組織の脱脂処理後のサンプルは、外来分子の組織透過性が高まっている。そこで、脱脂後に血管に関連する因子( $\alpha$ -SMA, Laminin, Neurofilament, GFAP, Iba1)に対するホールマウント免疫染色プロトコールの開発に取り組んだ。更に、連携研究者の柿田と共に、皮質下梗塞と白質脳症を伴う常染色体優性脳動脈症 (Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarct and Leukoencephalopathy: CADASIL) などの病理サンプルを用いた3D解析を実施した。

### 4. 研究成果

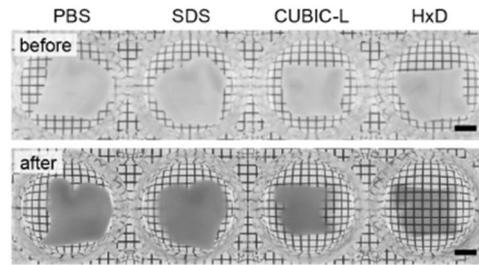
#### 1) 1 cm ブロックのヒト剖検脳サンプルの透明化・3Dイメージング技術の開発

水溶性透明化試薬の網羅的なケミカルプロファイリングを行った結果(Tainaka et al. Cell Rep., 2018)、典型的に用いられている Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) のような界面活性剤よりも遥かに脱脂速度が速い1,2-Hexanediol (HxD) を発見した(Inoue et al. Bioorg. Med. Chem. Lett., 2019)。2  $\text{mm}^3$  ヒト脳白質ブロックに対して4% SDS, CUBIC-L, 10% HxD (処理温度は45°C) で処理した後に組織内に残留する脂質含量を定量した結果を図1(a)に示した。その結果、HxDはSDSだけでなくCUBIC-Lよりも脱脂速度が速いことが示された。更に白質を含む2 mm ヒト脳スライスを5時間脱脂し、CUBIC-Rにより透明化したサンプルの透過像を図1(b)に示した。その結果、PBS, SDS, CUBIC-L 処理サンプルでは背景の脳の白質領域のグリッドが不透明であるのに対して、HxD 処理サンプルではサンプルの全領域において背景のグリッドが確認できた。従って、HxDでは5時間の脱脂処理(処理温度は45°C)により白質領域の脱脂が完了しており、SDS, CUBIC-Lよりも脱脂速度が極めて速いことが示された。更に、処理温度60°C, 2日間という激しい脱脂処理条件下において、組織の染色性がどの程度保存されているかを確認するために、CUBIC-LもしくはHxDによる脱脂処理後のパラフィン切片を作製し、Klüver-Barrera (KB) 染色およびSMI-31抗体による免疫染色像を比較した(図1(c,d))。その結果、CUBIC-L脱脂ではKB染色性の淡色化およびSMI-31特異的神経細胞の染色性の明らかな劣化が認められたが、HxD脱脂では染色性の劣化は認められなかった。

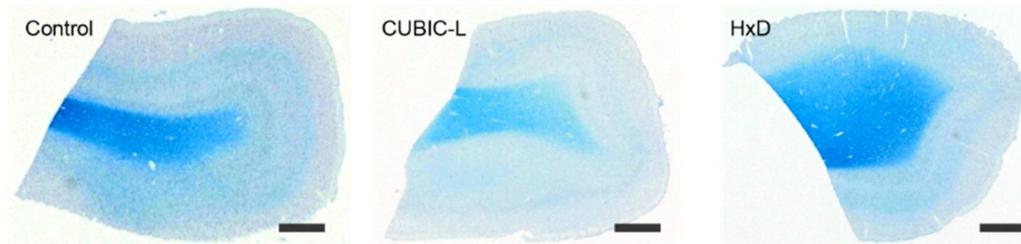
(a) 2 mm<sup>3</sup> ヒト脳白質の脱脂効率の比較



(b) 5 時間脱脂 - 透明化後の 2 mm ヒト脳スライス透過像



(c) 脱脂処理後のパラフィン切片の Klüver-Barrera (KB) 染色像



(d) 脱脂処理後のパラフィン切片の SMI-31 免疫染色像

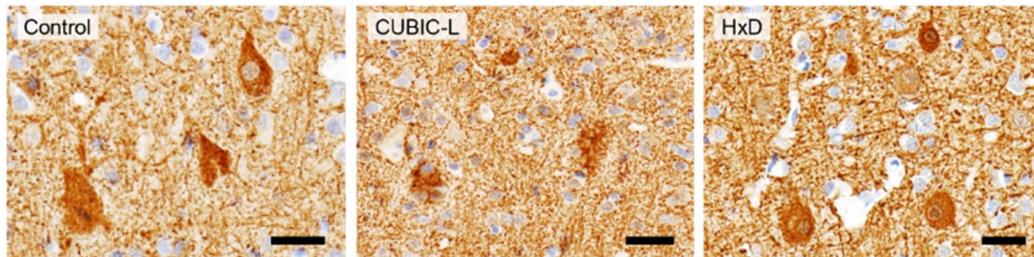


図 1 . ヒト脳サンプルに対する各種脱脂剤による処理の比較検討実験

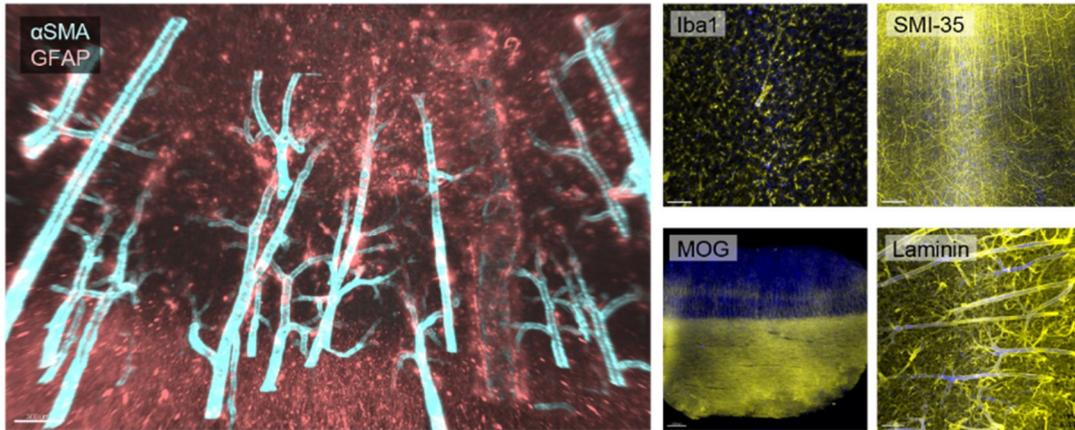
また、透明化後組織の漂白および自家蛍光を抑制する反応剤の検討を行った結果、過酸化水素処理および還元剤やシッフ塩基捕捉剤を含む脱脂試薬を用いることで効率的に褐変・自家蛍光を抑制することができた。この結果より、ヒト脳組織を特異的ケミカルプローブおよび 3D ホールマウント免疫染色法により標識する技術基盤が確立された。

## 2) ホールマウント免疫染色による脳小血管病病理サンプルの 3D 解析

脱脂処理を行ったヒト脳に対するホールマウント免疫染色を確立するためのスキーム構築を行った。まず、脱脂済みのヒト脳サンプルのパラフィン切片を作製する。これらの切片に対して、実際に病理診断で用いられているクローンの抗体に着目し、蛍光標識が導入された抗体を用いて染色性を確認する。この際に染色性が認められた抗体についてはホールマウント免疫染色をテストし、染色性が認められなかった抗体については、別のメーカー・クローンの抗体で同様の評価を実施し、血管に関連する因子( $\alpha$ -SMA, Laminin, Neurofilament, GFAP, Iba1)全てにおいて透明化に応用可能な抗体リストを構築する。それらを用いて、脱脂後のヒト脳サンプルに対して、界面活性剤である Triton X-100 およびブロッキング剤である Casein、腐敗防止のためのアジ化ナトリウムを含む PBS 緩衝液を用いて、通常切片染色時と同程度もしくは倍程度の濃度の抗体量を用いて染色を実施する。染色後は、屈折率調整過程での抗体の解離を防ぐため、簡易に 1% ホルマリンによる追加固定を実施する。その結果、一連の抗体に対する 3D ホールマウント免疫染色画像が得られた(図 2 (a))。

更に、これら免疫染色技術を用いて実際の病理サンプルに対する 3D 解析を実施した。CADASIL に加えて同様の遺伝性脳小血管病である CARASIL (cerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy) の病理サンプルに対する SMA 抗体を用いた 3D イメージングを実施した。その結果、CADASIL においては、皮質平滑筋が途中で途切れているような 3D 画像や CARASIL においては平滑筋の多くが脱落した 3D 画像が得られた(図 2 (b))。

(a) 各種 3D ホールマウント免疫染色画像



(b) 遺伝性脳小血管病の 3D イメージング

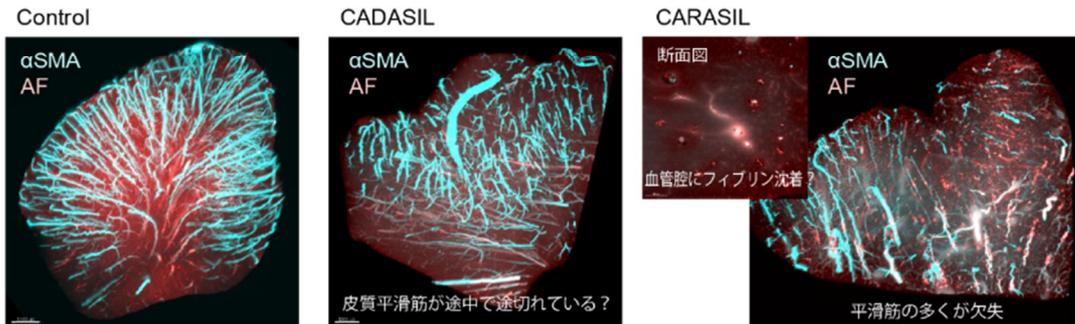


図 2 . ホールマウント免疫染色および脳小血管病病理サンプルの 3D イメージング

定量的には、SMA では  $25\mu\text{m}$  以上，laminin では  $10\mu\text{m}$  以上の立体的血管網が描出された。実質内血管は、その分枝の出し方から皮質内で終わるもの、皮質に枝を出しつつ皮質下に及ぶもの、皮質内に分枝を出さず皮質下へ移行するものに分類された。特に、SMA 抗体による染色像では、脳小血管病の血管の脱落の様子、蛇行が観察された。蛇行は正常組織でも皮質下の血管で観察されるが、脳小血管病で変性が高度のもの (CADASIL) だと、皮質枝に強い蛇行が認められた。Laminin 抗体を用いた染色像では、血管周囲腔を観察することができ、CADASIL では皮質から白質まで連続して血管周囲腔の拡大が観察された。

以上のように、ヒト脳小血管病の病理解析に有用な 3D 病理解析基盤を確立した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

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 -

1. 著者名 Inoue M, Saito R, Kakita A, Tainaka K	4. 巻 29(15)
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 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, Saïdo 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 オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 2件/うち国際学会 2件）

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
連携研究者	柿田 明美  (Kakita Akiyoshi)  (80281012)	新潟大学・脳研究所・教授    (13101)	