

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：22304

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K07241

研究課題名(和文) 高精細3Dイメージング装置の新規開発とノックアウトマウス胚の表現型解析への活用

研究課題名(英文) Development of CoMBI 3D imaging system and its application to phenotype analysis of genetic engineered mice.

研究代表者

多鹿 友喜 (Tajika, Yuki)

群馬県立県民健康科学大学・診療放射線学部・准教授

研究者番号：90400738

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：高精細CoMBI装置の開発した。金属アングル、電動化ハンドル、新しい保冷箱によって、高倍率のマクロレンズで、安定したブロック面撮影ができるようになった。

開発した装置で、VAMP5ノックアウトマウスおよびヘテロ接合子マウスにおいて、VAMP5の発現場所をX-galで可視化し、3D形態解析を行った。VAMP5は骨格筋、心筋、肺、尿管に出現することを予想していたが、それらの器官以外にVAMP5が多く発現することが分かった。VAMP5は、脾臓、腸間膜、咽頭粘膜下組織、脳頭蓋底の結合組織、脊髄腹側の結合組織、腋窩に発現し、これらはリンパ組織の形成初期であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新しいCoMBI装置と手法は、広く生命科学分野で利用されることが期待できる。実際、本研究期間中に、共同研究として、アホロートル、マウス心臓、マウスリンパ節、マウス眼球、ラット脊柱の形態解析に用いられた。脳脊髄液の動態はBulk-flow仮説に基づいた古い記述から、近年の研究成果による全く新しい知見、つまり、脳底部や脊髄周辺のリンパ管が髄液流出路であることに、書き換えられつつある。本研究成果は、VAMP5が形成途中のリンパ組織に発現することを示唆した。髄液の循環が破綻するような疾患のメカニズムを理解することに貢献すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：A high-resolution CoMBI system was successfully developed. Metal angles, motorized handles, and a new chamber allowed stable blockface imaging with a high-magnification macro lens.

Using the developed CoMBI system, we visualized the location of VAMP5 in VAMP5-knockout and heterozygous mice with X-gal. The 3D analysis revealed that although VAMP5 was expected to appear in skeletal muscle, cardiac muscle, lung, and ureter, VAMP5 is highly expressed in other organs. VAMP5 was found in the spleen, mesentery, pharyngeal submucosa, connective tissue of the basal skull, ventral spinal cord, and axilla, which were thought to be early stages of lymphoid tissue.

研究分野：解剖学 イメージング技術

キーワード：CoMBI 3D imaging VAMP5 SNARE proteins membrane traffic

## 1. 研究開始当初の背景

生物標本の形態解析では、標本を薄切片、切片として顕微鏡観察するのが伝統的な手法である。しかし、通常の切片は、由来位置の情報を失っているため、得られる形態情報は平面的であった。そこで、我々が開発したのが、CoMBI (Correlative Microscopy and Block-face Imaging) 法である (Tajika Y, et al, Sci Rep, 2017)。連続ブロック面撮影法をベースとして開発し、ブロック面の連続画像を 3D データとし、同時に凍結切片を顕微鏡解析用に必要枚数だけ採取できる。つまり、同一標本で「3D 形態」と「目的分子の 2D 分布」の両方を解析できるのが特徴である。従来の連続ブロック面撮影法では、削りカスは廃棄するしかなく、切片として顕微鏡解析することはできなかった。CoMBI 法は、3D イメージング法としては、簡便で安価であり、通常のクリオスタットさえあれば、50 万円程度の投資で 3D イメージングを始められる。

これまで、3D イメージングは、様々な手法・装置で行われてきたが、それぞれに一長一短がある。従来型の連続ブロック面撮影法 (Serial block-face imaging) は、光顕および電顕レベルの 3D 形態データを提供できるが、切削カスは廃棄するしかなく、切片として利用できなかった。連続切片法は、光顕レベルでは特別な装置を必要としないが、多大な労力を必要とし、安易に標本数を増やせない。μCT や MRI は、生きたまま 3D 形態情報を得られるのが最大の利点だが、自在に目的分子を検出することは難しい。蛍光標識・透明化技術・光シート蛍光顕微鏡は、分子の 3D 分布を得るために有力な手法であるが、透明化による標本の変形や、標本サイズの限度、描出できる分布パターンの適否などに気を配る必要がある。これらの既存手法で得られるデータは、3D 形態データか、分子の 3D 分布データかのいずれかに特化している。

研究開始当時 (2019 年) において、CoMBI 法の利用は急速に拡大しており、10 件以上の共同研究を行い、そのうちの 3 件で論文発表した (注: 2024 年では 10 報); カプトムシの角原基にあるヒダ構造を 3D データ化し (Matsuda et al., Sci Rep 2017)、膜小胞輸送に関する VAMP5 をノックアウトしたマウスの表現型を解析し (Ikezawa M, Dev Dynam, 2017)、ヒト顔面痙攣の原因部位となる顔面神経根の 3D 微小解剖データを獲得した (Iijima K, World Neurosurgery, 2018)。

## 2. 研究の目的

本申請研究では、より小さな組織にも適用できる μCoMBI (まいくるこんび) を新規に開発する。μCoMBI は、自らが進めている VAMP5 ノックアウトマウスの解析で、発生期に生じる奇形の形態解析に利用する。加えて、共同研究でもっとも多かったニーズ「1~5 mm 程度の小さな標本で 3D イメージングしたい」に応え、共同研究で対象とするマウス、ヒト、両生類、魚類の組織形態解析に利用する。

新規開発する μCoMBI 装置の性能は「1 mm の標本を 1×1×1 μm/voxel の 3D イメージにすること」を目指す。μCoMBI と CoMBI を合わせれば、様々な大きさの生物標本で 3D 形態解析ができる。凍結ブロックを使うため、組織本来のもつ色を 3D 描出に利用できるうえ、別途に色素染色や、In situ ハイブリダイゼーションや抗体染色などの標識も 3D データとして利用できる。そして、μCoMBI・CoMBI の最大の特徴は、3D 形態にくわえて、凍結切片を使って目的分子の 2D 分布情報も得られることである。このことから、μCoMBI・CoMBI は、既存の 3D イメージング手法 (形態解析に特化した手法と、分子の分布解析に特化した手法) の間のギャップを埋める技術となる。

## 3. 研究の方法

スライディングマイクロトームを用いて  $\mu$ CoMBI 装置を開発した。試料台は冷却ユニット（ペルチェ素子）で、ナイフはドライアイスで冷却した。薄切ごとにブロック面画像を得るようにハンドルの赤外線反射センサを設置しカメラシャッターを同期させた。保冷箱はアクリル板を加工して製作した。金属アングルで丈夫なカメラ台を製作し、制振し、高倍率マクロ撮影を実現させた。薄切のハンドル操作をステップモータとマイコンボードで電動化した。氷の微粉末（ドライアイスの白煙）がブロック面を覆う問題に対して、気流を制御できる保冷箱をデザインした。試料ブロックの作成では、包埋材（OCT コンパウンド）に顔料インクを混和させることで不透明化すること、および、試料をタンニン酸で染色することを行い、表面レンダリングと内部構造の視認性を改善した。

開発した高精細型の CoMBI 装置をつかって VAMP5 ノックアウトマウス胚を 3D 解析した。VAMP5 は、細胞内輸送に関わる膜小胞に存在する膜たんぱく質で、膜小胞の繫留と膜融合を制御する SNARE タンパク質の一つである。全身のノックアウトマウスを我々が世界ではじめて樹立し、解析を進めてきた（Ikezawa M, et al, Dev Dynam 2018）。成体の VAMP5 ノックアウトマウスは、嚢胞腎、重複尿管、無気肺を呈し、低い出生率を示した。一方で、胎生期にはメンデル比どおりの個体数が存在したため、マウス胚を CoMBI で 3D 形態解析した。

#### 4. 研究成果

金属アングル、電動化ハンドル、新しい保冷箱によって、高倍率のマクロレンズで、安定したブロック面撮影ができるようになった。ゴルジ染色した神経細胞の 3D 描出に成功し、目標とする性能（1 mm の標本から  $1 \times 1 \times 1 \mu\text{m}/\text{voxel}$  で 3D データ）を示せた（Ishii N, Tajika Y, et al, Sci Rep 2021）。

VAMP5 ノックアウトマウスおよびヘテロ接合子マウスで高解像度の 3D 形態解析を行った。成体のデータから、肺芽、後腎、尿管芽、心臓、骨格筋に注目したものの、これらの形態形成は正常であった。次に、VAMP5 の遺伝子座に挿入された LacZ を利用して、VAMP5 が発現する場所とタイミングを X-gal で可視化した。成体マウスを用いた過去のデータから、VAMP5 は骨格筋、心筋、肺、尿管に出現することを予想していたが、調査した胚発生期ではこれらの器官のうちでは心筋にしか検出しなかった。むしろ、予想した器官以外に VAMP5 が多く発現することが分かった。VAMP5 は、12 および 14 日目胚において、脾臓、腸間膜、咽頭粘膜下組織、脳頭蓋底の結合組織、脊髄腹側の結合組織、腋窩に、VAMP5 が発現していた。3D 解析した胚標本で、切片の顕微鏡観察も行ったところ、粘膜下組織や結合組織の細胞群は組織を形成していない段階であった。脾臓のような器官の同定はできなかったものの、これらの分布パターンは成体のリンパ管やリンパ節といったリンパ組織の分布と完全に一致するため、VAMP5 がリンパ組織の形成初期に発現すると考えられた（Tajika Y et al, Anat Sci Int, 2023）。これらの器官形成における VAMP5 の機能解析は今後の課題である。

CoMBI 装置をつかった共同研究を行い、アホロートルの顎再生（Makanae A et al, Sci Rep 2020）、骨化形成ラットの解析（Ishiwata S et al, Mol Cell Biochem. 2020）、マウス眼球や周辺組織の解析（Saito K et al, J Mol Endocrinol, 2022、Mukai R, et al, Sci Rep, 2023、ただし、これらは CoMBI の 3D 解析は研究初期のスクリーニングに利用）、マウス心臓で in situ hybridization シグナル分布を 3D 解析（Sutrisno AA, et al, Dev Growth Differ, 2023）、マウス心臓発生過程の 3D 解析（Katano W, et al, Development, 2023）など、多くの論文発表に寄与した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 1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 Tajika Yuki, Ishii Nobukazu, Morimura Yoshihiro, Fukuda Kyosuke, Shikada Mitsuaki, Murakami Tohru, Ichinose Sotaro, Yoshimoto Yuhei, Iwasaki Hirohide	4. 巻 -
2. 論文標題 Correlative microscopy and block-face imaging (CoMBI): a 3D imaging method with wide applicability in the field of biological science	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Anatomical Science International	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12565-023-00705-x	査読の有無 無
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 Iwasaki Hirohide, Ichinose Sotaro, Tajika Yuki, Murakami Tohru	4. 巻 16
2. 論文標題 Recent technological advances in correlative light and electron microscopy for the comprehensive analysis of neural circuits	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroanatomy	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnana.2022.1061078	査読の有無 無
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 Sutrisno Aldy Anindyawan, Katano Wataru, Kawamura Hayata, Tajika Yuki, Koshiba Takeuchi Kazuko	4. 巻 65
2. 論文標題 Combined method of whole mount and block face imaging: Acquisition of data of gene expression pattern from conventional in situ hybridization	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 56 ~ 64
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/dgd.12827	査読の有無 無
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 Saito Kazuma, Horiguchi Kazuhiko, Yamada Sayaka, Buyandalai Battsetseg, Ishida Emi, Matsumoto Shunichi, Yoshino Satoshi, Nakajima Yasuyo, Yamada Eijiro, Saito Tsugumichi, Ozawa Atsushi, Tajika Yuki, Akiyama Hideo, Yamada Masanobu	4. 巻 69
2. 論文標題 Maternal hypothyroidism is associated with M-opsin developmental delay	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Molecular Endocrinology	6. 最初と最後の頁 391 ~ 399
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1530/JME-22-0114	査読の有無 無
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 Ishii Nobukazu, Tajika Yuki, Murakami Tohru, Galipon Josephine, Shirahata Hiroyoshi, Mukai Ryo, Uehara Daisuke, Kaneko Ryosuke, Yamazaki Yuichi, Yoshimoto Yuhei, Iwasaki Hirohide	4. 巻 11
2. 論文標題 Correlative microscopy and block-face imaging (CoMBI) method for both paraffin-embedded and frozen specimens	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13108
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-92485-5	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 -

1. 著者名 Ishiwata Sho, Iizuka Haku, Sonoda Hiroyuki, Tsunoda Daisuke, Tajika Yuki, Chikuda Hirotaka, Koibuchi Noriyuki, Shimokawa Noriaki	4. 巻 475
2. 論文標題 Upregulated miR-224-5p suppresses osteoblast differentiation by increasing the expression of Pai-1 in the lumbar spine of a rat model of congenital kyphoscoliosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Biochemistry	6. 最初と最後の頁 53 ~ 62
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11010-020-03859-8	査読の有無 無
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 Makanae Aki, Tajika Yuki, Nishimura Koki, Saito Nanami, Tanaka Jun-ichi, Satoh Akira	4. 巻 10
2. 論文標題 Neural regulation in tooth regeneration of Ambystoma mexicanum	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 9323
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-66142-2	査読の有無 無
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 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 多鹿友喜
2. 発表標題 ますます気軽に3Dイメージング
3. 学会等名 第45回 日本分子生物学会 千葉・幕張メッセ
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 多鹿友喜
2. 発表標題 CoMBI: ミクロトームで気軽に 3D イメージングをはじめよう
3. 学会等名 第7回 ユニーク会 名古屋大学
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 多鹿友喜
2. 発表標題 もっと気軽に3Dイメージング
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuki Tajika
2. 発表標題 CoMBI imaging method, its development and spread at the current situation in 2021
3. 学会等名 第125回 日本解剖学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 多鹿友喜
2. 発表標題 The Expanding Universe of CoMBI 2020
3. 学会等名 日本解剖学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

「Manual of CoMBI」  
<https://combi-3d.github.io/manual/>  
日本動物学会、大阪大会、出展者、2019年9月12日から14日まで

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
研究 分 担 者	高橋 麻衣子 (池澤麻衣子)  (Ikezawa-Takahashi Maiko)  (50701322)	群馬大学・大学院保健学研究科・助教    (12301)	

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
---------	---------