

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K12258

研究課題名（和文）ホールマウント多重染色標本を用いた組織構築の定量的解析

研究課題名（英文）Application of RAP tissue clearing protocol for immunofluorescent multiplex staining of whole mount specimen

研究代表者

坂田 ひろみ（SAKATA-HAGA, Hiromi）

金沢医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50294666

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：我々が開発した迅速骨染色法（RAP-B）は、迅速かつ非破壊的な組織清拭システム（RAP）に基づいている。RAPの特筆すべき利点の一つは、組織透明化処理後のホールマウント標本であっても組織学的構造が保存されることである。本研究ではこのRAPの特性に着目し、マウスの胎児のホールマウント標本や成獣マウスの各種臓器の厚切り組織切片を用いた免疫組織化学的解析やin situハイブリダイゼーションへのRAP応用を検討した。また、チラミドシグナル増幅法（TSA）を用いた蛍光多重免疫組織化学染色へのRAPの適用についても検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、組織透明化技術は、神経組織内部のネットワークの解析や、病理組織標本の解析などに広く使用され、無くてはならない技術となっている。我々の考案したRAPはアルカリ溶液であるにも関わらず、加温や長時間の反応を行っても軟部組織の崩壊が起こらず、標本の形態や骨格の原位置が保たれるという優れた特徴を持つ。他の組織透明化法で使われる試薬より安価、簡便、迅速などの点で優位であることが特徴である。また、研究は免疫染色等を行った後の標本を透徹する高屈折率マウント液は蛍光標識した標本にも使用可能であるうえ、安価な試薬の組み合わせで調整が可能であるうえ、水溶性であり、大変扱いやすい溶液となっており汎用性が高い。

研究成果の概要（英文）：We have previously reported a rapid bone staining procedure (RAP-B) which based on a rapid and non-destructive tissue clearing system (RAP). One of the notable advantages of RAP is that histological structure is preserved even after the tissue is highly transparent in whole-body bone-stained specimens of larger specimens than ever before. To take advantage of this feature, we have applied it for immunohistochemical analysis (RAP-IHC) and in situ hybridization (RAP-WISH) in whole-mount specimens of mouse fetuses and thick-sliced tissue sections of various organs derived from adult rodents. In the present study, we examined the application of RAP tissue clearing protocol for fluorescence multiplex immunohistochemical staining using tyramide signal amplification (TSA) in whole-mount specimens of mouse

研究分野：先天異常学 発生毒性学

キーワード：組織透明化 免疫染色 マウス 多重染色

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々は小型魚類とアフリカツメガエルで従来法より迅速・簡便な骨染色法(A rapid and nondestructive tissue clearing system optimized for whole-mount bone staining; RAP-B, Sakata-Haga, et al., 2018, 参考文献参照)を開発した(図1)。その特徴の1つは試料を最初に浸漬する「透明化固定液(RAP-FIX)」である(表1)。RAP-FIXは、試料の固定、脱色、透明化を同時に行い、小型魚類であれば内臓、皮膚、筋肉を除去することなく、極めて透明度の高い骨格標本を短時間で作製することを可能にした。さらに、同様の手順でマウス・ラットのホールマウント骨染色標本が作製できること、除毛処理と組み合わせることで体毛のある成獣マウスにおいても剥皮せずにホールマウント骨染色標本が作製できることも示してきた。さらにRAP-Bで作製した全身骨格標本が共焦点レーザー顕微鏡を用いた深部観察も可能であることを明らかにした。

RAPによる組織透明化は、組織破壊を伴わずに軟部組織を透明度の高い状態にすることができるため、共焦点レーザー顕微鏡や蛍光ズーム顕微鏡を用いた深部観察や、核染色や抗体を用いた免疫染色を施して組織学的解析を行うことも可能である。さらに、RAP法による組織透明化処理は、抗体等の浸透性を向上させ、免疫染色の染色性を改善する効果も有することは特筆に値する。よってRAPによる組織透明化は、Whole mount 標本や厚切りスライス標本での3次元構造の描出や定量的解析において有用な手法に成り得ることが期待される。

2. 研究の目的

本研究は、近年我々の研究グループが開発した迅速組織透明化法(RAP)を用い、発生毒性試験に応用可能な組織構築の定量的解析法を確立することを目的としている。RAPによる組織透明化を、全身骨染色標本の作製のためだけではなくマウス胎児のWhole Mount 標本や、成獣マウスの各臓器のWhole Mount 標本や厚切りスライス標本を用いて行うことができる各種染色法に応用することで、これらの標本での多重染色や定量的解析に利用できるよう手法の検討を実施する。

RAPによる組織透明化を、全身骨染色標本の作製のためだけではなくマウス胎児のWhole Mount 標本や、成獣マウスの各臓器のWhole Mount 標本や厚切りスライス標本を用いて行うことができる各種染色法に応用することで、これらの標本での多重染色や定量的解析に利用できるよう手法の検討を実施する。

3. 研究の方法

妊娠ICRマウス(妊娠9, 10, 又は11日目, 日本SLC)を深麻酔して開腹し、胎児を採取した。採取した胎児は4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液(PFA)中で浸漬固定した後、メタノールのシリーズで脱水し、100%メタノールに浸漬して-30℃で保存した。一部の胎児はPFA固定後にRAP-FIXに浸漬して4時間、0/N脱色・透明化を行った後、6%過酸化水素/メタノール溶液で内因性ペルオキシダーゼの不活化を行い、メタノールのシリーズで脱水し、100%メタノールに浸漬して-30℃で保存した。また、成獣ICRマウス雌(8週齢以降, 日本SLC)を深麻酔下で4%PFAにて灌流固定し、脳を採取した。採取した脳は4%PFA中で4時間一晩追固定した後、マイクロサイザーで100~500µm厚の前頭凍結切片を作製した。切片はRAP-FIXに浸漬して脱色・透明化を行った後、6%過酸化水素/メタノール溶液で内因性ペルオキシダーゼの不活化を行い、メタノールのシリーズで脱水し、100%メタノールに浸漬して-30℃で保存した。

マウス胎児標本では抗ニューロフィラメント抗体(2H3, mouse monoclonal antibody, DSH)などを一次抗体としたwhole mount免疫染色を行った。また、成獣マウス脳スライス標本では抗glial fibrillary acidic protein (GFAP)抗体(rabbit polyclonal, DAKO)および抗parvalbumin抗体(mouse monoclonal, Sigma, またはrabbit polyclonal, Abcam)を用いた免疫染色を行った。二次抗体はAlexa Fluor 594 goat anti-mouse IgG, Alexa Fluor 594 goat anti-rabbit IgG, Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG, Alexa Fluor 594 goat anti-rabbit IgG (Molecular Probes)を用い、Hoechst 33342 (Invitrogen)またはEZ Fluoro Stain DNA (ATTO)で核染色した。さらにチラミッドシグナル増幅(TSA)法を用いた免疫組織化学への応用を試みた。HRP標識したanti-mouse IgG抗体またはanti-rabbit IgG抗体を二次抗体として用い、OPAL 520溶液に浸漬して免疫陽性反応を蛍光ラベリングした。

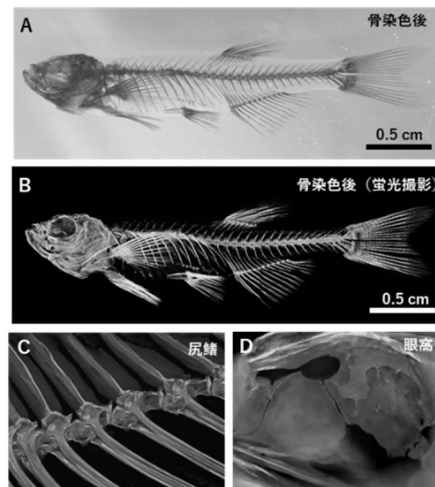


図1. RAP-Bによるゼブラフィッシュ全身骨染色標本

RAP-Bでは軟部組織の透明度が高い全身骨格標本が得られる(A)。骨染色に用いた色素(Alizarin red S)は蛍光観察することも可能である(B)。蛍光ズーム顕微鏡でZ軸撮影をして得た複数の画像にMIP処理を施すことで、より細部の構造が明瞭に描出され、骨格の詳細な観察が可能である(C, D)。これらの標本は、鱗のみを除去し、内臓、皮膚、筋肉、および眼球は除去しない状態であるにもかかわらず、それらがまるで存在していなかのような骨格画像が描出できることがRAP-Bの最大の特徴である。一方で、軟部組織はほぼ完全に透明化しているにもかかわらず、組織は破壊されておらず、強度も保たれている。

表1. RAPで使用する各種溶液の組成 (特許 PCT/JP2013/079388)

溶液	組成
RAP-FIX (透明化固定液)	2% PFA-りん酸緩衝液 / 5% Triton X-100 / 1% KOH
RAP-ENH (透明化固定液)	20% エチレングリコール / 5% Triton X-100 / 1% KOH

また、脳における細胞増殖を定量するため、成獣マウスに EdU を投与し、2 時間後に深麻醉下で 4% PFA にて灌流固定した。脳を採取し、矢状断凍結切片を作製した。切片を RAP 固定液に浸漬して透明化を行った後、EdU 標識を Click 反応により可視化し、シグナルの検出と定量解析を行った。

さらに RAP による組織透明化の *in situ* はハイブリダイゼーションへの応用を検討するため、-30℃ で保存した胚子をメタノールシリーズで再親水化した後、Whole mount *in situ* hybridization を行った。プローブは Digoxigenin 標識した Dbx 遺伝子 anti-sense RAN プローブを用い、アルカリフォスファターゼ標識抗 DIG 抗体によりプローブ結合部位検出し、NBIX で可視化した。

染色後の標本は高屈折率マウント剤で透徹し、アガロース/ゼラチンゲルに包埋した後、蛍光ズーム顕微鏡 (AXIO Zoom V16, Zeiss), 共焦点レーザー顕微鏡 (LSM710, Zeiss), およびハイスループット細胞機能探索システム (CV7000, 横河電機) で撮像した。Z-stack 撮影した画像の一部は Imaris (BITPLAN) または ImageJ を用いて 3 次元像を再構築した。

4. 研究成果

RAP-B による骨染色の場合は、初めに標本を透明化固定液 RAP-FIX に浸漬したが、胎生 10 日齢や 11 日齢のマウスでは、先に透明化固定液に浸漬すると組織の強度が低下し、染色操作中に組織が破壊されてしまうことがあったため、4%PFA で固定した後に RAP-FIX に浸漬したところ、組織の保持が良好であった。その後、6%過酸化水素/メタノール溶液で脱色と内因性ペルオキシダーゼの不活性化を行い、メタノールに浸漬し、-30℃ で保存する手順で染色前の処理を実施すことにした。

染色後のマウス胎児は、高屈折率溶媒で透徹して免疫陽性反応をハイスループット細胞機能探索システム CV7000 (横河電機) にて観察・撮像した。10 マイクロメートル毎に合計 2 mm の深部スキャンを行って取得した。胎児の矢状断面 Z スキャンでは、三叉神経、動眼神経等の脳神経が、両側とも明瞭に検出されており、胎児全体 (2 mm 厚程度) の Z スキャンが可能であることが示された。神経線維の走行が明瞭に検出され、神経線維の 3 次元ネットワーク解析への応用が期待できる。また、TSA により蛍光標識したマウス胎児および成獣マウススライス標本では、標本の全層に渡って蛍光シグナルが検出できた。また、取得した Z-stack 画像セットを用いて多重シグナルの 3D 像の再構築が可能であった。同一動物種由来の一次抗体での多重染色が可能な TSA 法と標本の深部観察を可能にする RAP 組織透明化の組み合わせは有用性が高い手法と思われる。

また、EdU を投与 2 時間後に採取した成獣脳スライス標本では、切片を RAP 固定液に浸漬して透明化を行った後、EdU 標識を Click 反応により可視化し、シグナルの検出と定量解析を行ったが、その結果、脳組織中の EdU 標識は、RAP 固定液で透明化処理を行った後でも Click 反応による検出が可能であり、RAP 組織透明化法が脳におけるニューロン新生の解析に応用できることが明らかとなった。さらに、digoxigenin 標識 cRNA プローブ-アルカリフォスファターゼ発色系を用いた whole-mount *in situ* hybridization において、発色後に RAP-FIX と新たに開発した高屈折率溶媒による透明化処理を行うことで組織が高度に透明化され、組織内における遺伝子発現パターンの 3 次元描出への応用が可能であることを確認した。

高速共焦点画像取得が可能なハイスループット細胞機能探索システムを用いた画像取得について検討するため、組織透明化を施した厚切りスライス標本やホールマウント標本で各種染色を行った後、標本をゲル包埋し、本研究にて開発した高屈折率溶媒で透徹し、ハイスループット細胞機能探索システム CV7000 (横河電機) で画像取得を行ったところ、高速で深部スキャンが可能であり、広視野で撮影した Z スタック画像セットを用いることで標識構造物の 3 次元像を標本全体で再構築することが可能であった。本研究で検討した RAP による組織透明化を施した標本での各種染色法と深部イメージング法は、多重染色により標識された構造物の定量化を可能にする手法として有用であると思われる。

<参考文献>

Sakata-Haga H, Uchishiba M, Shimada H, Tsukada T, Mitani M, Arikawa T, Shoji H, Hatta T. A rapid and nondestructive protocol for whole-mount bone staining of small fish and Xenopus. *Sci Rep*, 8:7453, 2018

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 12件）

1. 著者名 Nakamura Yukari, Miwa Takaki, Shiga Hideaki, Sakata Hiromi, Shigeta Daichi, Hatta Toshihisa	4. 巻 51
2. 論文標題 Histological changes in the olfactory bulb and rostral migratory stream due to interruption of olfactory input	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Auris Nasus Larynx	6. 最初と最後の頁 517 ~ 524
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.anl.2024.01.009	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 Kariyama Nobuo, Sakata-Haga Hiromi, Tsukada Tsuyoshi, Shimada Hiroki, Taniguchi Makoto, Hatta Toshihisa	4. 巻 11
2. 論文標題 Rapid bone staining with hair removal (RAP-B/HR): a non-destructive and rapid whole-mount bone staining protocol optimized for adult hairy mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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) 10.1038/s41598-021-81616-7	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9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 八田稔久、坂田ひろみ、茂田大地、友杉充宏、酒井大輔、東海林博樹、松原孝宜
2. 発表標題 迅速かつ非破壊的な組織透明化法RAPを基盤とする新規プロトコルの開発
3. 学会等名 第64回日本組織細胞化学会総会・学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 坂田ひろみ、茂田大地、酒井大輔、東海林博樹、友杉充宏、八田 稔久
2. 発表標題 RAP組織透明化法のin situ hybridizationへの応用
3. 学会等名 第63回日本先天異常学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 坂田ひろみ、茂田大地、友杉充宏、八田稔久
2. 発表標題 迅速組織透明化法を用いた免疫組織化学（RAP-IHC）とハイスループット深部イメージングシステム による組織学的定量解析法の検討
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 坂田ひろみ、八田稔久
2. 発表標題 迅速組織透明化法RAPを応用した深部組織イメージング法
3. 学会等名 第62回日本先天異常学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 坂田ひろみ、友杉充宏、酒井大輔、東海林博樹、八田稔久
2. 発表標題 RAP法の免疫組織化学的手法への応用と最適化
3. 学会等名 第62回日本先天異常学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 坂田ひろみ、菊地慶彦、面美来、丸山太啓、松村聡美、清水彩加、鈴木絢賢、高原怜亜、友杉充宏、八田稔久
2. 発表標題 迅速骨染色法（RAP-B）とその応用
3. 学会等名 第39回分子病理学研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 坂田 ひろみ、増田 浩子、友杉 充宏、八田 稔久
2. 発表標題 深部イメージングにおける迅速組織透明化法(RAP)の有用性
3. 学会等名 第 127 回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 坂田ひろみ、増田浩子、友杉充宏、八田稔久
2. 発表標題 RAP迅速組織透明化法によるマウス各種臓器の深部組織3Dイメージング
3. 学会等名 第61回日本先天異常学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坂田ひろみ、増田浩子、友杉充宏、八田稔久
2. 発表標題 迅速組織透明化法(RAP)を用いた組織3Dイメージング
3. 学会等名 日本解剖学会第81回中部支部会
4. 発表年 2022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
研究分担者	八田 稔久 (HATTA Toshihisa) (20238025)	金沢医科大学・医学部・教授 (33303)	

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