

Tissue clearing technology: three-dimensional visualization of transparent pregnant uterus and ovary

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2019-10-28 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: Kagami, Kyosuke メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24517/00055873

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.



【総説】

組織透明化技術の応用：妊娠子宮・卵巣の透明化と3次元画像構築

Tissue clearing technology: three-dimensional visualization
of transparent pregnant uterus and ovary金沢大学医薬保健研究域医学系産婦人科学
鏡 京 介

はじめに

近年、組織透明化技術がめざましい発展を遂げ、組織解析において有用な技術として注目を集めている。神経科学分野で発展してきた本技術は、厚みを持つ組織ブロック標本などを透明にすることにより、切片を作製することなくその内部を解析することが可能になる画期的な技術である。脳神経領域では神経回路パターンなどの三次元的立体構築の全体像を描出するのに有効であるが、神経科学分野のみならず他分野への応用も期待されている。本稿では、産婦人科領域を中心として組織透明化技術の応用について紹介する。

組織透明化技術の歴史

厚みのある組織ブロック標本を透明化するためには、光の散乱を減少させることが重要と考えられてきた。これまで、光散乱物質である脂質の除去、高屈折率溶媒を用いた屈折率均一化など光散乱を減少させる様々な透明化法が開発されている。

最初の組織透明化法は100年以上前に開発された手法であり、組織に対して脱水処理を行い、その後高屈折率の有機溶剤に浸透させるという方法であった。これに基づき開発されたのがBABB（ベンジルアルコール/安息香酸ベンジル）法である¹⁾。BABB法はエタノール処理によって脱水処理を行い、組織中の脂質成分を取り除いた後、屈折率の高い有機溶媒で置換を行う方法であるが、蛍光タンパク質までも変性してしまうという問題点があった。近年、蛍光タンパク質を用いる現代科学に合わせ、2012年に3DISCO法が開発された²⁾。3DISCO法はテトラヒドロフランによる脱水処理後にジベンジルエーテルを浸透させることで屈折率の均一化を図り、蛍光タンパク質の退色を最小限に抑え脳標本の透明化を実現した。更に2014年には免疫染色に特化した三次元イメージング手法iDISCO法が開発された³⁾。一方、2011年に開発された蛍光タンパク質の退色を抑えた水溶性透明化試薬Scaleは尿素を主成分としており光の散乱の主因である脂質を溶出する⁴⁾。2012年には形態保存性の高い透明化試薬SeeDBが開発され、高濃度のフルクトースで屈折率の均一化を促進することで脳の深部観察を可能に

した⁵⁾。2013年には電気泳動法を用いて脂質を除去するCLARITY法が⁶⁾、2014年にはCLARITYをベースにしたPACT法が開発された⁷⁾。これらの手法はいずれもマウス脳の透明化には成功したが、赤血球に含まれるヘモグロビンや筋肉に含まれるミオグロビンなど内在性の色素を豊富に含む心臓や肝臓といった臓器は、従来の透明化手法では十分な透明度を得ることができなかった。そこで最近開発されたのがCUBIC法である⁸⁾。CUBIC法は水溶性透明化試薬Scaleを一部改良し、Scaleで使用する尿素に加え、アミノアルコールを用いることで生体色素成分の除去を可能にした。CUBIC法の透明化試薬は尿素、糖、そしてアミノアルコール等で構成されており、この試薬は蛍光タンパク質の退色の問題、プロトコルの安全性や簡便さの問題、最終的な透明度の問題を解決している(表1)。

組織透明化の原理とイメージング

組織標本は細胞外マトリックスなどからなるタンパク質性の繊維のほかに、脂肪組織や血液成分、細胞レベルでは細胞膜、細胞内小器官といったさまざまな小構造物を含んでおり、これらが光散乱の原因(散乱体)となる。散乱体と溶媒の屈折率を均一化することで、光散乱を減少させることができ、理論上物体は透明なものとして認識される。したがって、組織を透明にするためには、組織と溶媒の屈折率を均一化すること、つまり光の散乱の原因となる組織中の因子を除去し、高屈折率溶媒に置換することが重要となる(図1)。透明化技術の多くは脳神経分野で発展してきた。細胞体から連続する軸索の空間的分布を解析する上で透明化が有用であるが、脳組織の透明化にはその主要成分である脂質の除去が要であった。一方、他臓器への応用を視野に入れた場合、光散乱の原因となるその他の因子として重要なのが、ヘムを含む生体色素成分である。CUBIC法に含まれるアミノアルコールが血液中のヘムを高効率に溶出する性質を持っていることから⁸⁾、脳以外の臓器の透明化、特に血液を多く含む妊娠子宮の透明化にはCUBIC法が最適な方法と考えられた。

透明化技術によって組織の深部まで解析することが可能になったが、その画像を取得するための顕微鏡技術も

著しく発展している。従来のポイントスキャン型の共焦点レーザー顕微鏡や二光子励起顕微鏡でも組織の深部を観察することは可能であるが、一臓器の画像を取得するには膨大な時間がかかる。また、大規模な画像を取得する場合には電動ステージを用いてスキャンし、最後に大量の二次元画像を貼り合わせることになるが、その際の精度も問題となる。一方、光シート顕微鏡は励起光を薄いシート状に照射することにより、短時間で二次元の蛍光画像を取得することが可能であるため、格段に早く三次元立体画像の取得ができる。また、光シート顕微鏡で取得される画像は高解像度であり、単一細胞レベルでの観察も可能である。こうしたことから、透明化試料の撮影には短時間で大規模に画像取得できる光シート顕微鏡が有用であると考えられる。

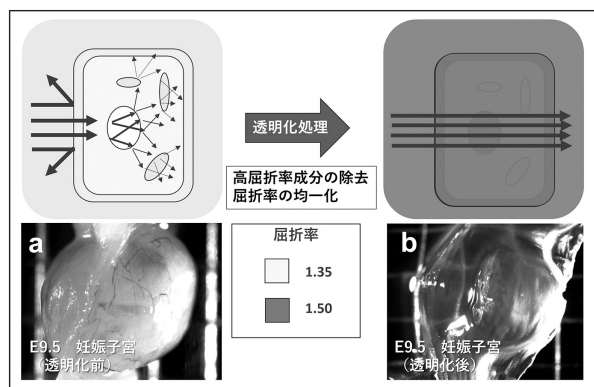


図1. 組織透明化の原理とマウス妊娠子宮への応用
(上段) 組織透明化の原理。組織中の高屈折率成分の除去および屈折率の均一化を行うことにより光の散乱を減少させる。
(下段) マウス妊娠子宮を用いた組織透明化。胎生9.5日の妊娠子宮における透明化処理前 (a) と透明化処理後 (b)。

組織透明化技術の産婦人科への応用

①マウス妊娠子宮の透明化とfeto-maternal interfaceの3次元画像取得

妊娠初期の胎盤形成異常は、子宮内胎児発育不全や妊娠高血圧症候群を引き起こし、少子高齢化が深刻な我が国における周産期医療においては児の健やかな発育にとって大きな問題となっている。胎盤形成異常は特に、子宮の脱落膜における胚由来の栄養膜細胞と母体細胞の相互作用に異常を来たすことが原因とされる。絨毛外栄養膜細胞 (EVT) の浸潤は胎盤形成において重要な過程の一つであり、EVTは母体免疫細胞から攻撃を受けることなく母体の子宮らせん動脈の血管に沿って子宮筋層内まで浸潤する。EVTの浸潤制御機構においては、これまで藤原らにより様々な分子機構が明らかにされてきた⁹⁾。EVTが浸潤能を変化する過程でインテグリン分子の発現が変化することが知られているが、EVTはインテグリン/CD9分子複合体を形成し¹⁰⁾、それらの分子がEVTの浸潤制御に関与し¹¹⁾、さらに、CD9がEVTの浸潤を抑制していることが報告されている¹²⁾。一方で母体血管に浸潤するEVTにケモカイン受容体であるCCR1が発現し、ケモカインがEVTの浸潤を母体血管に誘導すること¹³⁾、さらに母体血管内のEVTに接着した血小板がケモカイン産生してEVTの浸潤を誘導すること¹⁴⁾、また停止するEVTにケモカインを分解するdipeptidyl peptidase-VI (DPP VI)が発現し、EVTの浸潤を制御していることが報告されている¹⁵⁾。

こうした浸潤するEVTとその周囲の細胞や血管組織との関係性を解明する上で、3次元の空間的解析が有用であると考えられる。しかし、三次元画像を得るための従来の方法では、組織標本より多くの切片を複製し、切片より取得した数多くの画像をつなぎ合わせることで元の

表1. さまざまな組織透明化法 (文献19より一部改変し転用)

Aqueous solution-based (simple)				
Method	Main agents	Detergent	Time	Clearing capability
ScaleS	Urea, Sorbitol	TritonX-100	several days	Strong
ScaleA2	Urea, Glycerol	TritonX-100	2 weeks	Medium
CUBIC	Urea, Aminoalcohol	TritonX-100	1-2 weeks	Very strong
CUBIC-perfusion	Urea, Aminoalcohol	TritonX-100	1-2 weeks	Very strong
SeeDB	Fructose	-	several days	Weak
Clear ^{T/T2}	Formamide	-	2-3days	Medium
FocusClear	Diatrizonic acid	Unknown	several days	Strong
Aqueous solution-based (hydrogel embedding)				
CLARITY	SDS, Boric acid	SDS 4%	2-4 weeks	Very strong
PACT	SDS, Histodenz	SDS 8%	2-4 weeks	Very strong
PARS	SDS, Histodenz	SDS 8%	1-2 weeks	Very strong
Organic solvent-based				
BABB	Benzyl alcohol	-	3 days	Strong
3DISCO	Benzyl alcohol	-	3 days	Very strong
iDISCO	Benzyl alcohol	-	3 days	Very strong

立体構造を再構築するという方法がとられてきたが、非常に多くの時間と労力を要する作業であり、さらに切片を作製する際の組織に対するダメージや組織の変形も大きな問題であった。近年、神経科学領域において組織透明化技術を用いることで切片化することなく組織を深部まで観察できるようになってきた。そこで、我々はこの組織透明化技術が産婦人科領域でも有用ではないかと考え、CUBIC法を用いてマウスの妊娠子宮における浸潤する栄養膜細胞の存在する領域feto-maternal interfaceの3次元画像化を試みることにした。

CUBIC法を基本とし条件検討を行った結果、マウス妊娠子宮を透明化することに成功した。このmodified-CUBIC法を用いて透明化した胎生9.5日(E9.5)からE14.5の妊娠子宮組織は、肉眼的に十分な透明度が得られただけでなく、光シート顕微鏡を用いることにより切片化せずとも単一細胞レベルでの解像度で深部まで観察可能であることが分かった。さらに取得した三次元構築画像データをコンピューター処理することにより、任意の方向での断面を描出することも可能であった(図1,2)。注目すべき点は、透明化処理後の妊娠子宮に膨張や変形が見られなかったことである。CUBIC法を脳組織に適用した場合、脳組織の膨張が問題とされているが、羊水を含む妊娠子宮では、羊水腔が保たれるだけでなく、妊娠子宮の全体構造も保持されていることが分かった。また、野生型のメスマウスとCAG-EGFPオスマウス(全身

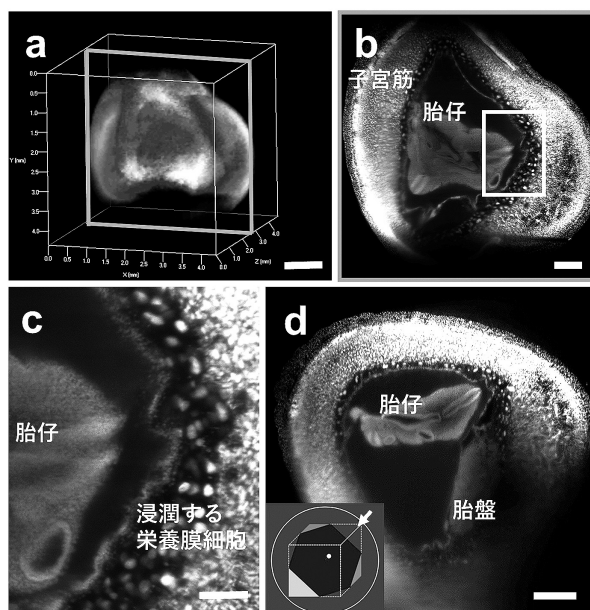


図2. 透明化処理を行ったマウス妊娠子宮の3次元画像データとコンピューター処理により作成した断面画像(文献16より転載)(a)胎生10.5日の妊娠子宮に対して透明化処理後(核染色のみ施行)、光シート顕微鏡で撮影し3次元画像構築を行った。(b)XY平面の断面画像。(c)(b)の四角部分の拡大画像。浸潤する栄養膜細胞を単一細胞レベルの解像度で観察可能。(d)3次元画像データからコンピューター処理により任意断面を描出することができる。任意の角度で胎仔や胎盤を描出できる。スケールバー 1 mm (a), 500 μ m (b, d), 200 μ m (c)。

で緑色蛍光タンパク質EGFPを発現しているマウス)を交配させることによって、胎仔・胎盤のみでEGFPが発現している妊娠マウスが作成できるが、このマウスの妊娠子宮を上記と同様に透明化することにより、これまで2次元像でしか捉えられなかったfeto-maternal interfaceを3次元像として構築することが可能になり、これまで困難であった3次元空間の中での浸潤する栄養膜細胞を単一細胞レベルの解像度で容易に観察することが可能になった(図3)。

②マウス卵巣の透明化と卵巣構造の3次元画像取得

卵巣発育において、卵母細胞や顆粒膜細胞、莢膜細胞との相互作用は重要であると考えられている。原始卵胞のように小型で多数存在する構造は、比較的容易に切片化し観察することができるが、成熟卵胞のように大型の構造体から特定の断面を切片化することは困難である。我々は組織透明化技術を卵巣に応用することができれば、こうした大型の卵胞構造を切片化することなく解析できるメリットがあると考えた。そこで、上記の妊娠子宮透明化と同様の手法を用いて卵巣の透明化を試みた結果、成体マウス卵巣においてもCUBIC法を用いて十分に透明化できることがわかった。Propidium iodide(PI)核染色を用いた検討では、得られた三次元構築画像データをコンピューター上で再構築することで、任意の断面から様々な発育段階の卵胞構造を観察することが可能であった。さらに、より詳細な組織構造を観察するため、全身が緑色に光るCAG-EGFPマウスの卵巣を透明化し観察を行ったところ、単一細胞レベルの解像度でより詳細な卵胞構造を描出することが可能であることがわかった(図4)。CUBIC法では屈折率の均一化のため高濃度スクロール液の置換処理が行われるが、卵胞の構造は保たれ

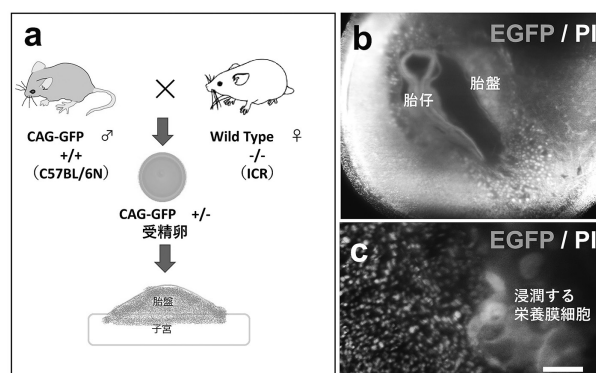


図3. 浸潤する栄養膜細胞の可視化とfeto-maternal interfaceの3次元画像構築(文献16より一部転載)

(a)野生型メスマウスとCAG-EGFPオスマウス(全身で緑色蛍光タンパク質EGFPを発現するマウス)を交配させることにより、胎仔と胎盤のみがEGFP蛍光を持つ妊娠マウスを作成した。(b)このマウスの妊娠子宮に対して透明化処理を行い、光シート顕微鏡で3次元画像を取得したのちに、断面像を作製した。EGFP蛍光を持つ胎仔と胎盤が撮影できている。(c)浸潤する栄養膜細胞を任意の角度で単一細胞レベルの解像度で観察することができる。スケールバー 50 μ m (c)。

ており、萎縮や膨張は見られなかった。さらに興味深いことに、CAG-EGFPマウスでは、全身ほぼ全ての細胞に遺伝子発現を誘導できると考えられているCAGプロモーターによりEGFPを発現させているが、このCAG-EGFPマウスの卵巣では顆粒膜細胞からの蛍光シグナルは認められなかったため、EGFPの蛍光シグナル強度の違いから、卵胞構造内で明瞭なコントラストが生じ、卵母細胞が強調されることが分かった(図4c)。このことから、CAG-EGFPマウスと卵巣の透明化三次元画像構築の組み合わせは、卵母細胞の空間的分布や発達段階の解析に有用であることが示唆された¹⁷⁾。

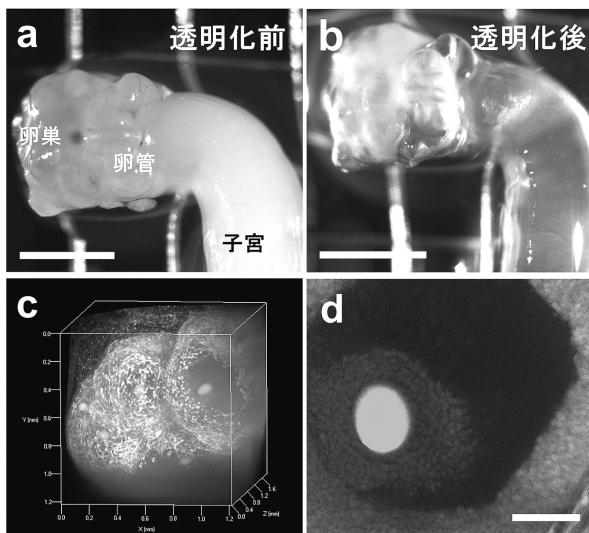


図4. マウス卵巣の透明化と卵胞構造の描出(文献17より一部転載)

還流固定したマウス卵巣の透明化処理前(a)と透明化処理後(b)。(c) CAG-EGFPマウスの卵巣を透明化し光シート顕微鏡で撮影後、3次元画像構築を行った。(d) 3次元画像から再構成した成熟卵胞部分の拡大図。大型の成熟卵胞の任意断面を描出することができる。スケールバー 2 mm (a,b), 100 μ m (d)。

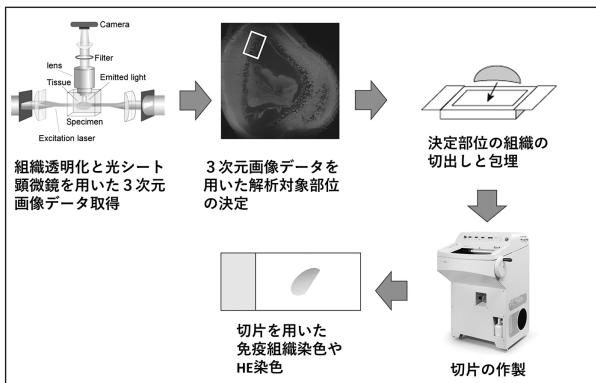


図5. 透明化後の組織学的検討

透明化処理を行った組織を光シート顕微鏡で撮影し、3次元画像データを取得する。続いて、この画像データを用いて、解析対象とする部位を決定する。その部位を切り出し、切片を作製したのちに染色を行うことにより、重要部位に限定した詳細な解析を行うことができることから、解析の迅速化、効率化が期待できる。

透明化技術の臨床応用への可能性

我々は臨床応用を考える上で、まず、組織ブロック標本を透明化し取得した三次元画像を用いてその中の重要部位を同定し、続いて、その重要部位を含む部位のみで切片を作製し組織学的に詳細に解析するができれば、重要部位に限定した詳細な解析を行うことができる。これにより、解析の迅速化、効率化が期待できる。しかし、透明化後の組織の抗原性やヘマトキシリン・エオジン(HE)に対する染色性が保持されているかどうかについては、これまで不明であった。そこで我々は、透明化した組織の中から特定の部位を含む切片を作製し、組織学的解析が可能か検討を行った(図6)。透明化したマウス妊娠子宮の中から光シート顕微鏡によりfeto-maternal interfaceを同定し、同部位を正確に切り出せるよう工夫し凍結を行い、クリオスタットにより切片化した。切片化した組織に対して免疫染色およびHE染色を行ったところ、透明化処理前の染色性と同等の染色性を示すことが分かった。このことから透明化処理後の組織においても、その抗原性、HEの染色パターンは保持されていることが示された¹⁶⁾。

一方、野島らは、CUBIC法をヒトの病理組織検体に応用し報告している。病変を発見するための実際の臨床病理検査におけるスクリーニング系にこの技術を応用し、検査の感度を向上させることを報告している。また、長期保管されているパラフィン包埋された検体にも適応可能であることを示している¹⁸⁾。臨床病理学分野への透明化の導入により診断精度の向上につながる可能性が示唆されており、組織透明化技術への関心が高まっている。

おわりに

組織透明化技術の有益性は、立体的な組織を切片化することなく全体像を描出できる点にある。したがって、血管やリンパ管などの管腔構造や、神経軸索などの連続する構造体の立体構造解析、さらに連続する構造体に関わる細胞の位置、数、距離などの解析に威力を発揮する手法となるであろう。我々の報告は、子宮・胎盤・臍帯・胎児を切片化することなく、妊娠子宮全体を同時に解析することができる可能性を示唆しており、当該方法は、生殖・周産期、発生生物学の進展に寄与しうる技術である。また金沢大学眼科において、組織透明化技術を眼球に応用する研究が進められているなど、脳神経系に端を発した組織透明化技術は、全身の様々な臓器への応用が進められている。さらに悪性腫瘍における浸潤経路、血管分布や免疫細胞の空間分布の解析への応用も考えられるなど、腫瘍学などを含む臨床病理学分野への応用も今後期待される。

謝 辞

本誌執筆にあたりご指導賜りました金沢大学医薬保健研究域医学系産婦人科学 藤原 浩教授と金沢大学医薬保健研究域医学系脳神経医学 河崎 洋志 教授に深謝いたします。また、執筆の機会を与えていただきました金沢大学十全医学会雑誌編集委員長の杉山 和久 教授ならびに関係者の方々に厚く御礼申し上げます。

参 考 文 献

- 1) Dodt, H.U., Leischner, U., Schierloh, A., Jahrling, N., Mauch, C.P., Deininger, K., Deussing, J.M., Eder, M., Zieglgansberger, W., and Becker, K. Ultramicroscopy : three-dimensional visualization of neuronal networks in the whole mouse brain. *Nat Methods* 4: 331-336, 2007
- 2) Erturk A, Becker K, Jahrling N, Mauch CP, Hojer CD, Egen JG, Hellal F, Bradke F, Sheng M, Dodt HU. Three-dimensional imaging of solvent-cleared organs using 3DISCO. *Nat Protoc* 7: 1983-95, 2012
- 3) Renier N, Wu Z, Simon DJ, Yang J, Ariel P, Tessier-Lavigne M. iDISCO: a simple, rapid method to immunolabel large tissue samples for volume imaging. *Cell* 159: 896-910, 2014.
- 4) Hama H, Kurokawa H, Kawano H, Ando R, Shimogori T, Noda H, Fukami K, Sakaue-Sawano A, Miyawaki A. Scale: a chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain. *Nat Neurosci* 14: 1481-88, 2011.
- 5) Ke MT, Fujimoto S, Imai T. SeeDB: a simple and morphology-preserving optical clearing agent for neuronal circuit reconstruction. *Nat Neurosci* 16: 1154-61, 2013.
- 6) Chung K, Wallace J, Kim SY, Kalyanasundaram S, Andalman AS, Davidson TJ, Mirzabekov JJ, Zalocusky KA, Mattis J, Denisin AK, et al. Structural and molecular interrogation of intact biological systems. *Nature* 497: 332-7, 2013.
- 7) Yang, B., Treweek, J.B., Kulkarni, R.P., Deverman, B.E., Chen, C.K., Lubeck, E., Shah, S., Cai, L., and Gradinaru, V. Single-cell phenotyping within transparent intact tissue through wholebody clearing. *Cell* 158: 945-958, 2014.
- 8) Susaki EA, Tainaka K, Perrin D, Kishino F, Tawara T, Watanabe TM, Yokoyama C, Onoe H, Eguchi M, Yamaguchi S, et al. Whole-brain imaging with single-cell resolution using chemical cocktails and computational analysis. *Cell* 157: 726-39, 2014.
- 9) Fujiwara H, Matsumoto H, Sato Y, Horie A, Ono M, Nakamura M, Mizumoto Y, Kagami K, Fujiwara T, Hattori A, Maida Y, Daikoku T, Imakawa K, Araki Y. Factors Regulating Human Extravillous Trophoblast Invasion: Chemokine-peptidase and CD9-integrin Systems. *Curr Pharm Biotechnol* 19: 764-770, 2018.
- 10) Hirano T, Higuchi T, Katsuragawa H, Inoue T, Kataoka N, Park KR, Ueda M, Maeda M, Fujiwara H, Fujii S. CD9 is involved in invasion of human trophoblast-like choriocarcinoma cell line, BeWo cells. *Mol Hum Reprod* 5: 168-74, 1999.
- 11) Hirano T, Higuchi T, Ueda M, Inoue T, Kataoka N, Maeda M, Fujiwara H, Fujii S. CD9 is expressed in extravillous trophoblasts in association with integrin alpha3 and integrin alpha5. *Mol Hum Reprod* 5: 162-7, 1999.
- 12) Matsumoto H, Sato Y, Horie A, Suginami K, Tani H, Hattori A, Araki Y, Kagami K, Konishi I, Fujiwara H. CD9 suppresses human extravillous trophoblast invasion. *Placenta* 47: 105-112, 2016.
- 13) Sato Y, Higuchi T, Yoshioka S, Tatsumi K, Fujiwara H, Fujii S. Trophoblasts acquire a chemokine receptor, CCR1, as they differentiate towards invasive phenotype. *Development* 130: 5519-32, 2003.
- 14) Sato Y, Fujiwara H, Zeng BX, Higuchi T, Yoshioka S, Fujii S. Platelet-derived soluble factors induce human extravillous trophoblast migration and differentiation: platelets are a possible regulator of trophoblast infiltration into maternal spiral arteries. *Blood* 106: 428-35, 2005.
- 15) Sato Y, Fujiwara H, Higuchi T, Yoshioka S, Tatsumi K, Maeda M, Fujii S. Involvement of dipeptidyl peptidase IV in extravillous trophoblast invasion and differentiation. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 4287-96, 2002.
- 16) Kagami K, Shinmyo Y, Ono M, Kawasaki H, Fujiwara H. Three-dimensional visualization of intrauterine conceptus through the uterine wall by tissue clearing method. *Sci Rep* 7: 5964, 2017.
- 17) Kagami K, Shinmyo Y, Ono M, Kawasaki H, Fujiwara H. Three-dimensional evaluation of murine ovarian follicles using a modified CUBIC tissue clearing method. *Reprod Biol Endocrinol* 16: 72, 2018.
- 18) Nojima S, Susaki E, Yoshida K, Takemoto H, Tsujimura N, Iijima S, Takachi K, Nakahara Y, Tahara S, Ohshima K, Kurashige M, Hori Y, Wada N, Ikeda J, Kumanogoh A, Morii E, Ueda HR. CUBIC pathology: three-dimensional imaging for pathological diagnosis. *Sci Rep* 7: 9269, 2017.
- 19) Hama H, Hioki H, Namiki K, Hoshida T, Kurokawa H, Ishidate F, Kaneko T, Akagi T, Saito T, Saido T, Miyawaki A. ScaleS: an optical clearing palette for biological imaging. *Nat Neurosci* 18:1518-29, 2015.