

全脳血管ネットワーク可視化に成功 機能的 MRI 信号解読への一助

1. 発表者

池谷 裕二（東京大学大学院薬学系研究科 薬学専攻 教授）

宮脇 健行（研究当時：東京大学大学院薬学系研究科 大学院生／現：学振特別研究員 P D）

2. 発表のポイント

- ◆ 血管から漏洩しない蛍光物質を心臓から流し込んだ後、温度依存的に重合反応を開始することによって、ほぼ全ての脳血管を鋳造・染色する手法を開発しました。
- ◆ 胆汁酸塩の一種を使った脂質除去により、血管の結合性と、脳組織の分子的な情報を保存したまま、マウス全脳を透明化できることを示しました。
- ◆ 本手法（SeeNet）は、脳梗塞や脳出血などの脳血管障害の病態解明に貢献するのみならず、機能的 MRI 信号の解読への一助になることが期待されます。

3. 発表概要

東京大学大学院薬学系研究科の宮脇健行大学院生（研究当時）、池谷裕二教授らの研究グループは、マウス全脳血管ネットワークの構造と機能を可視化する手法を開発しました。

脳血管は多様な細胞から構成される 3 次元ネットワークです。脳血管ネットワークの構造と機能を明らかにすることは、脳の栄養供給様式を理解に資することが期待されます。本研究グループは、この目的を実現するため、独自の蛍光モノマー（注 1）を用いた血管鋳造法と、それに最適化された組織透明化手法を開発しました。本手法 SeeNet は、ほぼ全ての脳血管を明瞭に可視化しつつ、周囲の組織中に存在するタンパク質の抗原性や、緑色蛍光タンパク質（GFP）等がもつ蛍光を保存していました。更に、本手法の応用例として、動脈と静脈を区別した全脳血管のイメージングにより、これまで未知だった、皮質と海馬の細動脈/細静脈を繋ぐ微小血管を報告しました。SeeNet は、発現分子が紐づけられた脳血管の 3 次元トレーシングや、血管の構造・機能と周囲の細胞との関係を調べるのに有用なツールとなり、脳梗塞や脳出血などの脳血管障害の病態解明に貢献するのみならず、機能的 MRI 信号の解読への一助になることが期待されます。

本研究成果は、2020 年 2 月 27 日の *Nature Communications* 誌に掲載されました。

4. 発表内容

研究の背景と経緯

脳は 3 次元上に広がる血管ネットワークによって栄養供給を受けています。また、血管と組織中の物質交換は、多様な細胞からなる血液脳関門（注 2）によって制御されています。そのため、血管ネットワークの構造と機能、それらの周囲組織との関係を記述することは、脳の栄養供給様式を理解に重要であることが推察されます。

しかし、このような研究は技術的な問題からこれまで進んできませんでした。例えば、薄層切片を用いた古典的な組織学では血管は切断されるため、その接続関係の情報は失われて

しまいます。接続関係を調べるためには標本を 3D で観察する必要がありますが、血管の 3D 観察に古くから用いられている血管腐食鑄造法（注 3）は、微小血管の可視化に優れたのに加え、周囲の分子情報を保存できない、という問題を抱えています。その点、組織透明化法（注 4）は、標本を 3D 観察できるのみならず、血管周囲の分子情報を保存できるので、前述の問題を解決することが期待されます。ただし、透明化手法は既存の血管染色手法とは相性が悪く、周囲分子を保存したまま全脳血管の構造を捉えることは困難でした。

研究方法と発見の内容

本研究グループは、新たな血管鑄造法を開発し、それに最適化された透明化手法を開発することによって、全脳血管を、血管の結合性や周囲分子を保存したままイメージングできることを示しました。更に、本手法、SeeNet により明らかになる新知見のデモンストレーションとして、未知の血管走行経路を報告しました。

1) 新規蛍光モノマーの灌流と温度依存的な重合制御による脳血管の可視化

まず研究グループは、血管鑄造法の改良に取り組みました。従来の血管鑄造法では、重合途中のポリマーを心臓から流し込んでいたため、大きくなっていくポリマーが微小血管で梗塞を起こし、全ての血管を可視化することはできませんでした。そこで発表者らは、未重合のモノマーを全血管に行きわたらせた後に重合を開始すれば、全ての血管が鑄造できるのではないかと考えました。

これを実現するためには、二つの条件が必要です。一つは、重合の開始を任意のタイミングで制御することです。これは、市販されている温度依存的な重合開始剤を用いれば行うことができます。もう一つの条件として、蛍光を持つモノマーが、重合されていない状態でも、血管から漏れ出さない必要があります。しかし、市販されている蛍光モノマーではこの条件を満たすことはできません。よって、このような条件を満たす蛍光モノマー、RITC-Dex-GMA（注 5）を独自に合成しました（図 1a）。

次に、RITC-Dex-GMA と、同じくモノマーとなるアクリルアミド、温度依存的な重合開始剤である VA-044（注 6）を低温で心臓から流し込んで全血管に行きわたらせました。そして、灌流したマウスを 37°C で 3 時間温めることによって重合反応を行い、血管を鑄造しました（図 1b）。

実際にどの程度の血管が染色されているのかを調べるため、標本の切片を作成し、血管内皮細胞マーカーである CD31 で免疫染色を行いました（図 1c,d）。結果、RITC-Dex-GMA のシグナルは CD31 のシグナルと 98.1% という高い共局在率を示し、これは一般的な染色剤であるレクチンによる染色よりも有意に高いことが分かりました。また、本手法によって得られるシグナルは既存のどの手法よりも有意に強いシグナルでした。このように、新規の蛍光モノマーと重合法により、細い血管まで高い SN 比で染色できる新規の血管鑄造法を確立しました。

2) 胆汁酸塩による、血管の結合性および分子的情報を保存した全脳透明化

次に、この血管鑄造法に最適化された透明化手法を作成しました。まず、既存の透明化手法でも用いられている界面活性剤、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を用いましたが、SDS による脱脂では7日間では脳深部の白質までは透明にならず、また組織の顕著な膨潤が起こり、組織の機械的な強度が失われました (図 2a)。そこで、より迅速に透明化が可能であり、組織の膨潤や機械的強度の消失を避けるために、新たな界面活性剤を模索しました。結果、胆汁酸塩の一つであるデオキシコール酸ナトリウム (SDC) を用いたところ、同じ7日間の脱脂で、白質まで均一に透明になることがわかりました (図 2b)。また、SDC 処理したサンプルでも 10%程度の膨潤が見られるものの、その度合いは SDS で見られた 40%程度の膨潤よりも有意に低いものであることがわかりました。

この緩やかな膨潤、というのは、血管を観察するにあたって重要な性質となります。今回開発した血管鑄造法を用いたサンプルを SDS で透明化したところ、断裂した血管像が多く得られることがわかりました (図 2c)。これは、組織が膨潤したことによって、鑄造されたポリマーが限界以上に引き延ばされてしまったことが原因であると考えられます。一方で、SDC で透明化した群ではそのような断裂は殆ど見られませんでした (図 2d)。貫入血管の本数を用いて断裂の程度について定量したところ、SDS の群では約 80%の血管が断裂していたのに対し、SDC の群では 1%未満しか断裂していませんでした。このことから、SDC による透明化は、迅速に透明化ができるというだけでなく、血管の繋がり方を保存するという点においても優れていることが示されました。

次に、本手法が血管周囲組織のタンパク質発現等の情報を保持しているかを検討するため、SeeNet によって調製したサンプルについて、核酸の染色剤 (Propidium Iodide)、あるいは、マイクログリア、アストロサイト、ニューロンに対する抗体 (anti-Iba1, anti-GFAP, anti-NeuN) を適用しました。結果、それぞれのシグナルは観察可能であることがわかりました。更に、GFP や mCherry、Venus 等の蛍光タンパク質を発現するマウスに対して SeeNet を適用したところ、これらの蛍光タンパク質の蛍光は保存されていることがわかりました。このことから、SeeNet は、血管ネットワークの構造のみならず、それぞれの血管が持つ機能的特徴や、その周囲組織との関係を調べるのに有用であることが示唆されました。

更に、本手法の高い SN 比で全脳血管を捉えることが可能か検討するために、ライトシート顕微鏡 (注7) を用いて脳の撮影を行いました。結果、脳深部の白質においても血管のシグナルが捉えられており、脳の最も深い部分においてもシグナルが消失することはありませんでした。このことから、本手法の高い SN 比は、全脳の血管を捉えるために十分であることが示されました。

3) 発現分子が紐づけられた脳血管の3次元解析による未知の脳血管経路の発見

本手法の応用例として、研究グループは皮質と海馬を繋ぐ新たな血管経路を発見しました。

皮質の血管は、脳表の動脈から貫入動脈を介して皮質の中に入っていく、微小血管を通じて貫入静脈に通じ、脳表の静脈へと繋がります。なお、皮質の貫入血管が潜る深さは皮質の中までにとどまっており、その下にある海馬までは伸びていきません。また、海馬の血管は脳の下部にある動脈から貫入してきた血管から櫛のように分岐し、類似した経路を通じて回

収されると考えられています。このように、細動脈/細静脈の解像度で見ると、皮質と海馬の2つのネットワークはある程度独立しているように見受けられます。しかし、この2つのネットワークが微小血管で繋がっているのかは、これまで検討されてきませんでした。

そこで、SeeNetを適用したマウス脳血管の3Dトレーシングを行いました。結果、皮質と海馬の血管ネットワークが、実際には微小血管で結合していることを発見しました。更に、このような微小血管の特徴をより精細に調べるために、同様のトレーシングを、動脈を免疫染色によって判別することによって行いました(図2e, f)。結果、皮質と海馬の細動脈と細静脈を繋げるような微小血管だけでなく、細動脈と細動脈、あるいは細静脈と細静脈同士を繋げるような微小血管も存在することがわかりました(図2g, h)。このような血管は、皮質か海馬の一方の細動脈/細静脈で梗塞が起こった際、血流のバイパス経路として働いている可能性が考えられます。

今後の展開

本手法は、血管の構造と周囲の発現分子を3Dで大規模に調べることを、どのようなラボでも遂行できるルーチンワークとします。そのため、これまでは手法的な限界からほとんど開拓されてこなかった、『脳血管のネットワーク科学』の発展に貢献することが期待されます。例えば、「脳血管は効率の良い栄養供給に適したネットワーク構造を有しているのか?」、「脳血管の分岐パターンや血液脳関門の多様性はどのようなルールに基づいて制御されているのか?」、「病態モデルマウスにおいてそれらに変化はあるのか?」、といった問いが、今後さまざまなグループで検討可能になると考えられます。このような研究がもたらす知見は、血管から得られる信号を神経活動に相関する指標として用いる、機能的MRI(注8)のデータ解釈への応用も予想されるため、基礎的な研究だけでなく、臨床的な研究にも役立つ可能性が考えられます。

<本研究の主な助成事業>

戦略的創造研究推進事業(ERATO)、科学研究費補助金、国際ヒューマン・フロンティア・サイエンス・プログラム(HFSP)

<本研究の共同研究機関>

本研究では東京大学医学部・オリンパスで共同開発された顕微鏡と、岐阜大学医学部から供与された実験材料を一部に用いています。

5. 発表雑誌

雑誌: *Nature Communications* (2月27日オンライン版)

題目: Visualization and molecular characterization of vascular network with capillary resolution

著者: Miyawaki, T., Morikawa, S., Susaki, E. A., Nakashima, A., Takeuchi, H., Yamaguchi, S., Ueda, H. R., Ikegaya, Y. (宮脇 健行、森川 勝太、洲崎 悦生、

中嶋 藍、竹内 春樹、山口 瞬、上田 泰己、池谷 裕二)

DOI 番号 : 10.1038/s41467-020-14786-z

論文原稿 URL : <http://ikegaya.jp/miyawaki.pdf>

6. 問い合わせ先

東京大学大学院薬学系研究科 薬品作用学教室

教授 池谷 裕二 (イケガヤ ユウジ)

〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1

Tel : 03-5841-4780 Fax : 03-5841-4786

E-mail : yuji@ikegaya.jp

日本学術振興会

特別研究員 PD 宮脇 健行 (ミヤワキ タケユキ)

E-mail : takeyuki.miyawaki@gmail.com

7. 用語解説

注1 モノマー :

同一、あるいは類似した分子同士で結合を繰り返すことにより (重合反応)、高分子の化合物、ポリマーを構成する物質のこと。

注2 血液脳関門 :

血液と、中枢神経系の組織液との物質交換を制御する機構のこと。血管内皮細胞や、さまざまな種類のグリア細胞、基底膜等からなる。

注3 血管腐食鑄造法 :

重合途中のポリマーを心臓から流し込んだ後、周囲の組織を溶かすことによって血管を可視化する手法。

注4 組織透明化法 :

組織について、脂質を除去した後、残ったタンパク質や核酸等と同等の屈折率を持つ水溶液や有機溶媒に浸すことで、組織の構成要素の屈折率を均一化し、光の散乱を抑えること。脂質の除去には SDS や Triton-X などの界面活性剤を用いるのが一般的。

注5 RITC-Dex-GMA :

本研究で作製された、血管から漏洩しない蛍光モノマー。まず、血管から漏れ出さない程度の分子量を持つデキストランに対し、グリシジルメタクリレート、GMAを反応させ、デキストランの側鎖にメタクリレート基を導入（ラジカル型の重合開始剤を用いれば、デキストラン-GMAはアクリル基を持つ化合物と重合可能になる）。更に、この化合物に赤色の蛍光色素 Rhodamine B Isothiocyanate、RITCを導入。

注6 VA-044 :

水溶性の熱重合開始剤。低温では安定だが、加熱によってラジカルを生じ、重合を開始する。

注7 ライトシート顕微鏡 :

シート状にした光を標本の側面から照射し、それと垂直な軸から撮像をすることにより、特定の平面だけをイメージングできる顕微鏡。透明標本の高速撮影に多く用いられる。

注8 機能的MRI :

磁気共鳴機能画像法。磁場を当てた際、酸化ヘモグロビンと脱酸化ヘモグロビンで返すシグナルが異なること、そして、神経活動に応じて血液量や酸化/脱酸化ヘモグロビン量比が変化することを利用し、脳活動を測定する手法のこと。ヒトの脳活動を非侵襲的に調べるために多く用いられる。

8. 添付資料：

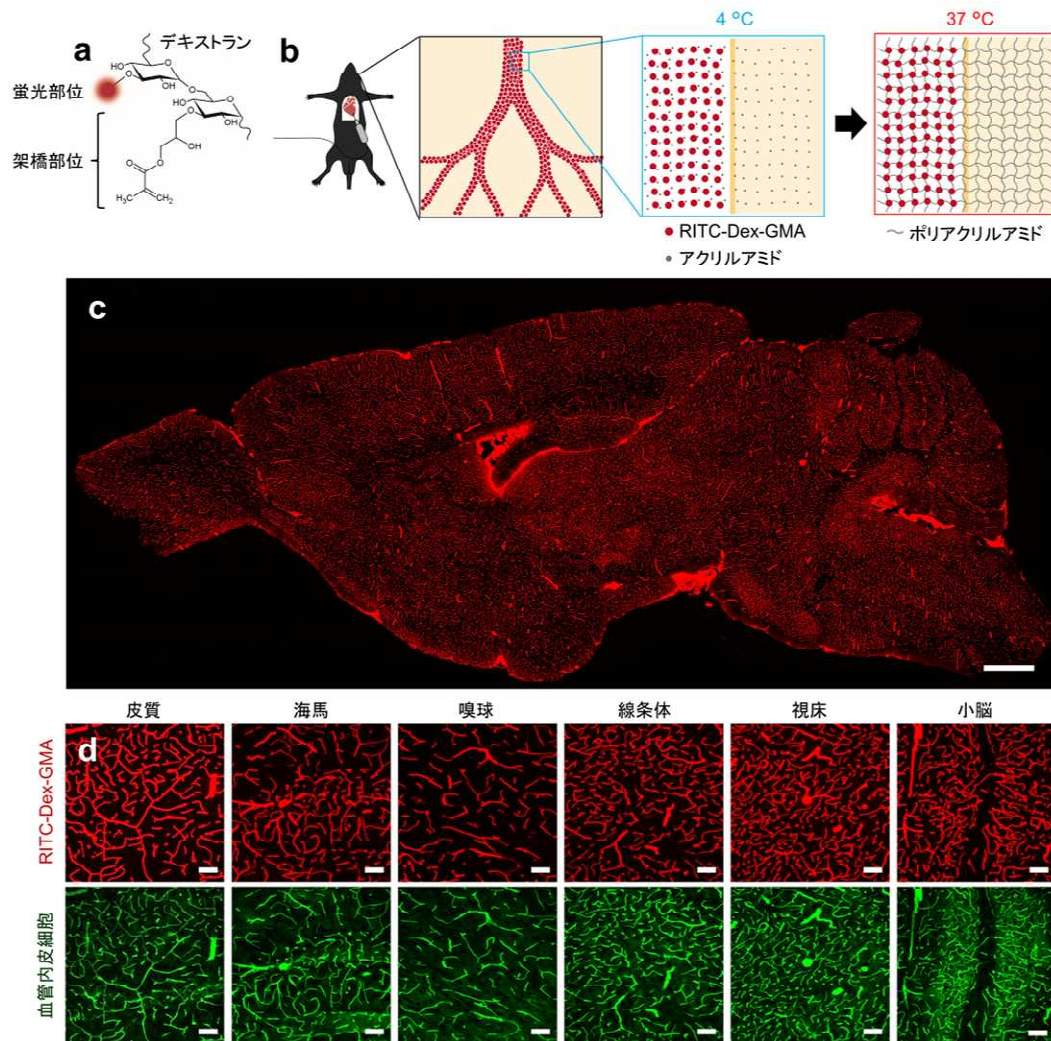


図1 蛍光モノマーの温度依存的な重合反応を用いた血管鑄造法

- (a). 作製した蛍光モノマー、RITC-Dex-GMA の概要。血管から漏れ出さない程度の分子量を持つデキストラン(Dex)に、蛍光部位(RITC)と、架橋可能部位(GMA)が結合している。
- (b). 血管鑄造のスキーム。モノマーを全血管に行き渡らせた後、温度を上昇させることで重合反応を開始する。
- (c). 鑄造された脳血管。スケールバー:1 mm.
- (d). 鑄造された血管の拡大図（上段）と、同視野における血管内皮細胞マーカーCD31 の染色画像（下段）。スケールバー:100 μm .

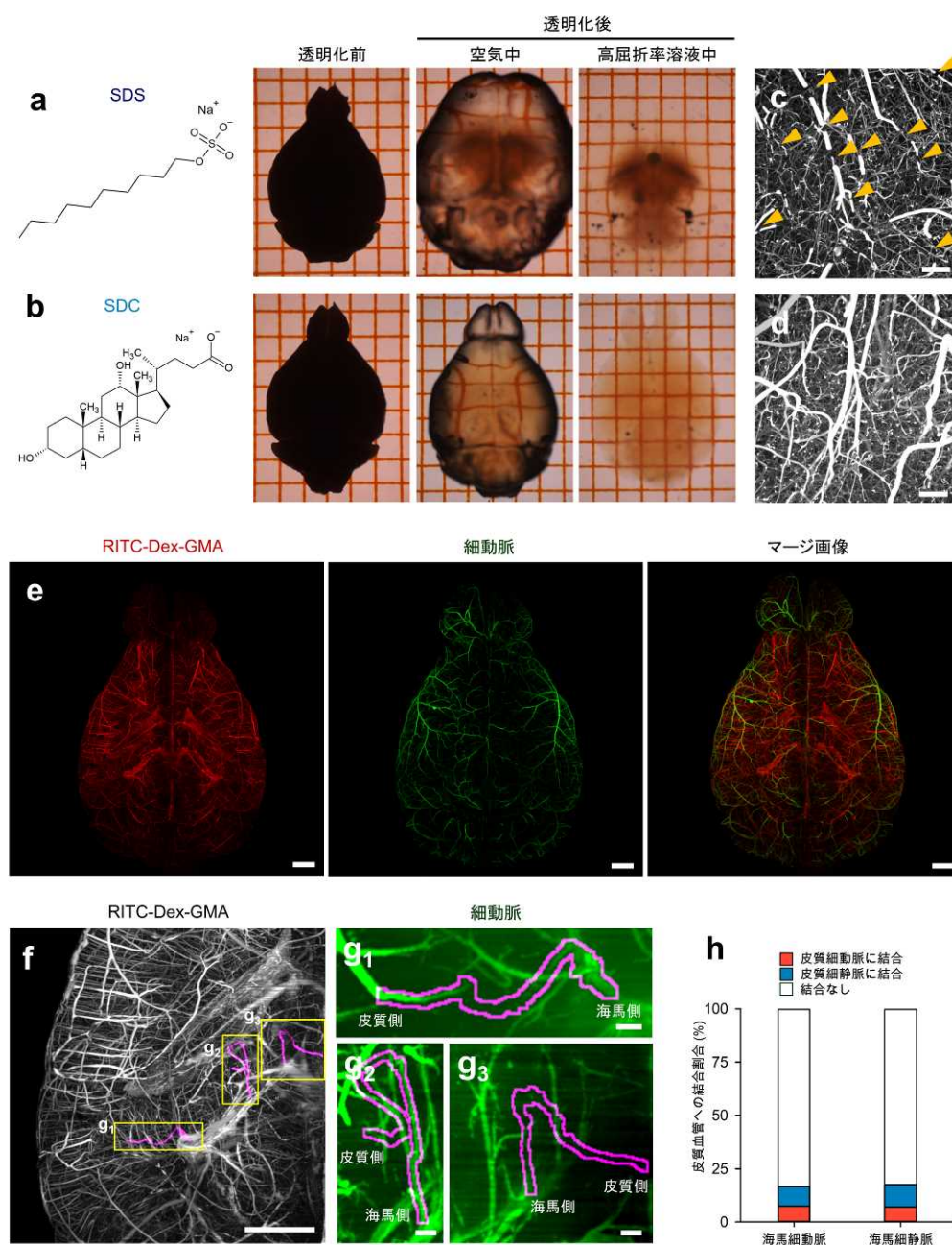


図2 胆汁酸塩を用いた組織透明化とその応用例

- (a). 従来から用いられている、SDSによる透明化。アクリルアミド固定した脳を、SDSによって一週間脱脂した後、高屈折率溶液 (ScaleCUBIC-2) に漬浸し、空気中、または高屈折率溶液中で写真撮影をした。標本の顕著な膨張が起こっていること、白質まで完全に透明になっていないことがわかる。格子は2 mm 間隔。
- (b). 今回開発した、SDCによる透明化。SDSによる透明化に比較すると、膨潤が抑制されており、脳の深部構造 (白質) まで透明になっている。
- (c). 血管鑄造後、SDSを用いて透明化した標本の皮質を撮影した画像。矢じりの箇所で血管の断裂が起こっている。スケールバー: 100 μm 。
- (d). 同じく、SDCを用いて透明化したサンプルの皮質。断裂はほとんど起こっていない。

- (e). SeeNet (左、RITC-Dex-GMA) を適用したサンプルについて、細動脈 (中央、 α SMA-FITC) を免疫染色し、ライトシート顕微鏡によって全脳イメージングした画像。2チャンネルのマージ画像を右に示す。スケールバー:1 mm.
- (f). (e). 左半球後部の RITC-Dex-GMA シグナル。本視野で観察された、皮質と海馬の血管をつなぐ微小血管を枠内に示している。スケールバー:1 mm.
- (g). (f).中に示された各領域の細動脈シグナルと、発見された血管経路の輪郭。この例では、細動脈と細動脈を結ぶ経路 (g_1)、細静脈と細動脈を結ぶ経路 (g_2)、細静脈と細静脈を結ぶ経路 (g_3) が観察された。スケールバー:100 μ m.
- (h). (g). の定量結果。