

博士論文（要約）

多光子励起レーザー顕微鏡を用いた  
心血管疾患の三次元病理病態解析

藤原 隆行

## 論文の内容の要旨

論文題目 多光子励起レーザー顕微鏡を用いた心血管疾患の三次元病理病態解析

氏名 藤原 隆行

### [序文]

生物学において分子生物学的手法が発達した今日において、病態研究は組織切片を用いた病理学的検討を中心に行われており、その重要性は益々高まっている。しかしながらその観察対象が平面（二次元情報）であるために、遺伝子や分子動態の変化を検証・追求できない局面も多い。特に血管・神経網のような三次元空間で複雑な形態・機能を呈する細長い形状の細胞群の観察は特に困難であった。それらの問題を解決すべく、三次元画像構築が可能な顕微鏡、電子顕微鏡・共焦点レーザー顕微鏡・多光子励起レーザー顕微鏡などが開発されてきた。しかしその観察深度は透明度の高い脳のような組織においては1mm程度、透明度の低い肝臓や心臓においては100 $\mu$ m程度が限界であった。

近年発展目覚ましい臓器透明化技術は、光散乱の影響を低減させることにより観察深度をより改善し、臓器全体・全層での観察を可能にした。心血管疾患において、血管形態・線維化・炎症細胞浸潤等が複雑に絡み合う「組織リモデリング」および「慢性炎症」が重要であることは以前より示唆されているが、従来の二次元病理標本ではその実態が描出困難なため不明点も数多く残されたままであった。本研究では最新の臓器透明化技術で、臓器透明性の高さおよび蛍光タンパクの褪色が少ないという特徴を持つ CUBIC (Clear, Unobstructed, Bratin Imaging Cocktails and Computational Analysis, Cell, 2014) と多光子励起レーザー顕微鏡を組み合わせることにより、心血管臓器三次元イメージングの確立および新規の病態概念の探索およびその制御法の検討を目指すこととした。

## [方法]

尿素・アミノアルコール・TritonX-100 より成る CUBIC1 液によるマウス心および肺の透明化を試みた。4%パラホルムアルデヒド (PFA) で1晩固定後に CUBIC1 液に浸漬する CUBIC 法および、150ml の 4%PFA で還流固定ののち 50% CUBIC1 液で全身還流、そして CUBIC1 液に浸漬する CUBIC-perfusion 法を実践したところ、CUBIC-perfusion 法のほうが心臓・肺において、より透明度が高い検体を作成可能であることを確認した。免疫染色を行う場合、CUBIC-perfusion 法では、CUBIC1 液に 5-7 日浸漬したのちに 2% Triton-X100 含有リン酸緩衝生理食塩水 (PBS-T) に溶解した抗体で染色を行い、その後 CUBIC2 液に 4-15 時間程度浸漬した。CUBIC1 液で一度透明化を行ったのちも、PBS-T 浸漬後の検体は白濁し、透明性が低下するため CUBIC2 液による再透明化が必要であった。

Tainaka らによる染色法 (Cell, 2014) を用い、Cy3-anti- $\alpha$ SMA 抗体による平滑筋細胞染色は可能であり、臓器全層での三次元画像構築も容易であった。しかし FITC-isolectinB4 (IB4) を用いた血管内皮細胞染色は、Tainaka らによる染色法では鮮明な画像を得られなかった。

条件検討の結果、FITC-IB4/PBS-T 溶液に浸漬後、CUBIC2 液に浸漬前の検体では血管内皮細胞・微小血管は鮮明に描出されており、CUBIC2 液が像不鮮明化の原因と考えられた。しかし CUBIC2 液に浸漬前の検体では、その観察深度は 200 $\mu$ m 程度であり、臓器全層の観察のためには再透明化処置が必要であった。

そこでアミノアルコールを除いた改変 CUBIC2 液を用いて、改変 CUBIC2 液への浸漬時間を 1-2 分と極端に短くし、その後静置することとしたところ、再透明化および血管内皮細胞の鮮明な描出を両立することが可能であった。またこの方法を用いた Cy3-anti- $\alpha$ SMA 抗体による平滑筋細胞染色も問題ないことを確認し、臓器全体・全層の三次元病理画像構築を確立した。

上記で確立した方法を用いて、心血管疾患モデルマウスにおける血管リモデリングの評価を行った。心臓において、Transverse aortic constriction (TAC) を用いた圧負荷心筋症モデルおよびドキシソルビシン心筋症モデルの 2 つの非虚血性心筋症モデルにおける心筋内微小血管リモデリングの評価を行った。

また肺においては、肺高血圧症モデルのうち、低酸素負荷・低酸素負荷+血管内皮細胞増殖因子 (Vascular endothelial growth factor: VEGF) 受容体阻害薬投与・*Alk1* ヘテロノックアウトマウスに加え、新規の肺高血圧症モデルを目指した低酸素負荷+肺葉切除の各モデルにおける血管平滑筋形態の評価を行った。また従来からの組織切片を用いた血管平滑筋形態評価も同時に行った。血管平滑筋増殖の背景にある遺伝子発現の評価を定量 PCR で行った。

肺高血圧症の治療薬として用いられている、エンドセリン拮抗薬の一種であるボセンタンを低酸素負荷モデルに投与することによる血管平滑筋形態への影響、また遺伝子発現についても評価を行った。

## [結果]

心臓において、非虚血性心筋症モデルの心筋内微小血管リモデリングの評価を行った。TAC 群では対照群と比較して、心筋深層での微小血管同士の吻合および網目状変化が顕著であった。またこの形態変化は圧負荷開始 1 週後で最も顕著であるが、その後の経過では正常像に近づいていき、時間経過とともにリバースリモデリングを呈するという事実が判明した。ドキシソルビシン心筋症群においては、血管形態は対照群と比較して大きな変化は認めなかったが、やや血管間が密であった。

肺においては、種々の肺高血圧症モデルにおける血管平滑筋形態評価を行った。低酸素負荷群・低酸素負荷+肺葉切除群・*Alk1* ヘテロノックアウト群では、対照群と比較して末梢方向への血管平滑筋の伸長を認めたが、低酸素負荷+VEGF 受容体阻害薬(SU5416)投与群ではその所見は認めなかった。従来の組織切片による血管平滑筋評価では、すべての群で対照群と比較して、25-75 $\mu$ m の細動脈での平滑筋肥厚を認め、特に *Alk1* ヘテロノックアウト群・低酸素負荷+SU5416 投与群では顕著であった。遺伝子発現では、**Endothelin** およびその受容体では、*Edn1* はすべての群で、未介入群と比較すると有意差を持って上昇していたが、*Ednra* は低酸素負荷+SU5416 投与群では未介入群と比較して有意差は認めないのに対して、その他の群では有意差をもって上昇していた。**VEGF** およびその受容体については、*Vegfa* は低酸素負荷+SU5416 投与群では未介入群と比較して有意差はないのに対し、その他の群では有意差を持って上昇していた。また *Vegfr1*、*Vegfr2* については全ての群で上昇していた。**Endothelin** シグナルおよび **VEGF** シグナルの上流に位置する **HIF** については、*Hif1a* は低酸素負荷+肺葉切除群のみで有意に上昇、*Hif2a* は全ての群で有意に上昇していた。

ボセンタン投与低酸素負荷群では、肺末梢への血管平滑筋伸長は低酸素負荷群と比較してより顕著なものとなっていた。組織切片による評価では、低酸素負荷群と比較して、血管平滑筋肥厚は改善傾向であった。また遺伝子発現については、**Endothelin** およびその受容体、**VEGF** およびその受容体、**HIF $\alpha$**  のいずれにおいても有意差をもって上昇していた。

## [考察]

今回の検討において、心臓・肺における臓器透明化ならびに平滑筋細胞染色・血管内皮細胞染色とその三次元病理画像構築法を実践、確立した。臓器透明化技術を用いることにより、臓器全体・全層三次元病理画像構築が可能となったが、免疫染色可能な抗体や、褪色が少なく評価可能な蛍光タンパクは未だ限られている。今回施行した FITC-IB4 による血管内皮細胞染色は CUBIC 法では初の試みであり、心臓全層における血管内皮細胞の三次元病理画像構築は初の報告例となったが、独自の改変を要した。このように臓器透明化技術は未だ発展途上であり、使用可能な抗体・蛍光タンパクの探索および条件の最適化が今後必要である。

確立した臓器全体・全層三次元病理画像構築を用いて、心血管疾患における血管リモデ

リングの評価を行った。非虚血性心筋症モデルの微小血管形態評価では、圧負荷心筋症モデルでは、血管同士の吻合および網目状変化といった劇的な形態変化を認め、また時間経過とともにリバースリモデリングしていく様子が捉えられた。

各種肺高血圧症モデルにおける血管平滑筋形態変化評価では、現在頻用されている低酸素負荷+SU5416 投与群とそのほかの肺高血圧症モデルでは肺末梢方向へ血管平滑筋形態が異なることが示された。その背景にはエンドセリンによる平滑筋増殖・肥厚だけでなく、VEGF や HIF といった因子および血管新生の要素の関与も示唆され、混沌とした状況であり、今後引き続き検討が必要である。

以上のように臓器透明化技術を用いた臓器全体・全層三次元病理解析により、新規の知見を得ることが可能であった。今後もこの手法を用いて、新たな病態解明・薬効評価につなげていきたいと考えている。