

博士論文

論文題目 血管鑄造および組織透明化による脳血管網の観察

氏 名 宮脇 健行

目次

血管鑄造および組織透明化による脳血管網の観察

【要旨】	3
【背景】	5
【方法】	7
【結果】	12
【考察】	19
【参考文献】	37
【謝辞】	42

【要旨】

脳血管は3次元状に広がる栄養源の供給網である。この供給網が、どのような脳領域で、どのように張り巡らされているかを知ることが、脳の栄養供給様式を理解するための基礎となりうる (Blinder et al., 2013)。このような知見は、脳表の血管や貫入血管など、比較的太い (直径 10-50 μm) 血管については古くから積み重なっている一方、直径数 μm しかない微小血管については、殆ど存在しない (Paxinos, 1994)。これは、一般的に組織観察に用いられる薄層切片では血管の結合関係を捉えられないこと、また3次元で血管を観察するための既存手法は、擬陰性率、S/N 比、標本調製の所要時間、周囲分子の保存、コスト等において問題を抱えていることが原因である (Verli et al., 2007; Tsai et al., 2009; Chung et al., 2013)。

そこで本研究では、これらの問題を克服する一連の新規手法を開発した。本手法の特色は以下の3つである。

1. **BBB-impermeable fluorescent crosslinker** | 既存の合成法を組み合わせ、血液脳関門を通過せず、蛍光を持ち、架橋剤としての役割を果たす新規化合物を合成した。
2. **Post-hoc polymerization of perfused monomers** | 上記化合物・アクリルアミド・温度依存的な重合開始剤を低温で心臓から灌流して全身の血管に行き渡らせた後、温度を上昇させて重合を開始することにより、細い血管でも詰まらず、かつ周囲の分子を架橋することを目的とした血管鑄造法を開発した。
3. **Bile salt mediated tissue clearing** | 胆汁酸塩であるデオキシコール酸ナトリウムを、動物組織を透明化するための界面活性剤として初めて用いた。

今回新規に開発した色素と血管鑄造法によって、ほぼ全ての脳血管が高い S/N 比で染色された。また、胆汁酸塩を用いた透明化手法は、10 日という速さにも関わらず、標本の機械的強度を保ちながら、組織の屈折率を均一化することがわかった。そして、これらを組み合わせれば、成体マウス脳血管を3次元で大規模に捉えることが可能な標本が、周囲のタンパク質・核酸を保ったまま作成できた。更に本研究では、開発した手法を用いてマウス脳血管を 3D 観察することにより、新規の血管走行経路を発見した。

本手法は、安価かつ簡便に導入ができ、通常の顕微鏡でも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可能とする。これにより、血管網のつながり方を研究する分野の発展に貢献することが期待される。

【背景】

ニューロンの活動にはエネルギーの供給が必須となる。そして、エネルギー源となる酸素やグルコース等は脳血管から供給される (Andreone et al., 2015)。そのため、脳血管というエネルギー源の供給網がどのように張り巡らされているかを知ることが、脳の栄養供給様式を理解するための基礎となりうる。

脳への動脈は頸動脈 2 本、椎骨動脈 2 本の系 4 本である。これらの動脈は脳底で合流し、ウィリス動脈輪という輪状の構造を形成する。ウィリス動脈輪からは数本の太い動脈（直径 10-50 μm ）が分岐し、脳の表面に行きわたる。この脳表動脈からは、脳表に対してほぼ垂直に分岐する、貫入動脈がいくつも伸びている。そして、貫入動脈からは直径数 μm 程度の微小血管が分岐する。微小血管は更に何度も分岐することによって組織内を網羅し、栄養供給を行う。そして、供給を終えた血液は微小血管から貫入静脈に入り、脳表の静脈/静脈洞へと回収されていく。これらの脳血管のうち、脳表血管や貫入血管の走行経路は古くから研究がなされており、どの脳領域にどのような血管が伸びているかはある程度明らかになっている (Paxinos, 1994)。しかしながら、微小血管の走行様式については殆ど明らかになっていない。

これは、一般的な免疫染色に用いられる組織切片では血管は切られてしまい、形態的特徴が失われてしまうのが原因である (Wälchli et al., 2015)。よって、血管の形態的特徴を知るためには、組織を 3D で観察する必要がある。ただし、3D で血管を観察するための既存手法は、偽陰性率、周囲分子の保存、S/N 比、スループット等において問題を抱えている。

3D で血管を観察するための既存手法は、血管鑄造法と組織透明化の 2 つに分けられる。

血管鑄造法は、重合途中の高分子ポリマーを心臓から血管に流し込み、ポリマーが十分に固まった後に周りの組織を強アルカリで溶かすことによって血管構造を可視化する (Verli et al., 2007)。この方法は、S/N 比よく血管を染色するが、細い血管でポリマーが詰まってしまうため、全ての血管は染色されない。加えて、周囲の組織を溶かしてしまうため、血管周囲の分子的な情報が失われてしまう。脳血管を構成する細胞は場所によって異なり、それらの

細胞が発現する分子によって血液中の分子の透過性も異なる (Macdonald et al., 2010)。また、周囲組織の状態と血管の対応関係を知るためには、周囲組織の分子を残しておく必要がある。そのため、脳血管による栄養供給様式を詳細に理解するためには、血管の構造だけでなく血管周囲の分子も保存しておけることが望ましい。

もう一つの手法、組織透明化は、血管周囲の分子を保存しておくことができる。透明化手法では、タンパク質等は組織に残しておきつつ、脂質だけを取り除くことによって組織の光透過性を高める。よって、蛍光標識したレクチン（血管内皮細胞に結合）を静注した後に透明化を行えば、周囲の分子を保存したまま全ての血管を染色可能である。ただし、蛍光レクチンによる染色と透明化の組み合わせでは、低い S/N 比でしか血管を標識できない。例えば、最も蛍光を良く保存する透明化手法、CLARITY (Chung et al., 2013) でも、脳表から 500 μm 程度の深度（マウス脳、皮質の中央部程度に相当）でシグナルがノイズから区別不可能になってしまう。また、CLARITY では標本作成に 6 週間と長い時間を要するため、スループットが低い。

本研究の目的は、脳血管の構造と周囲組織の発現分子を 3D で観察する手法を開発し、脳血管研究に資することである。具体的には、血管を明瞭に、偽陰性なく染色でき、周囲の分子を保存しつつも、高いスループットで標本を調製できることが要件となる。これらの実現のために、新たな血管鑄造法と透明化手法を開発した。

【方法】

実験動物

東京大学大学院薬学系研究科のガイドラインに従い、実験動物への苦痛を最小限に抑える努力の下、生後 3-5 カ月令の Arc-dVenus トランスジェニックマウス（以下 Arc-dVenus マウス）および C57BL/6J マウスを実験に用いた。これらのマウスは、自由摂食・摂水下、午前 7 時から午後 7 時まで点灯の条件で飼育し、実験に用いた。

Arc-dVenus トランスジェニックマウスは岐阜大学大学院医学系研究科、山口瞬先生にご提供いただいた (Eguchi and Yamaguchi, 2009)。このマウスのトランスジェニックコンストラクトは、マウスのゲノム DNA から得られた 7.1 kbp の Arc プロモーター領域と、改変型 YFP である Venus (Nagai et al., 2002) にタンパク質の分解シグナルである CL1 と PEST を含む pGL3 と mRNA の分解シグナルである AU-rich 配列を付加した destabilized Venus を結合させた DNA 配列である。実験には WT との交配によって生まれたヘテロトランスジェニックマウスを用いた。Arc-dVenus マウスは、暗所で 2.5 日間飼育した後に明所に 5 時間置くことで視覚刺激を与えた。

デキストラン-GMA の合成

50 mL コニカルチューブ内で、36 mL の DMSO (Nacalai Tesque Inc., 13406-55, Japan) に 4.0 g の Dextran 40 (Wako Pure Chemical Industries Ltd., 049-22331, Japan) または Dextran 200 (Wako Pure Chemical Industries Ltd., 043-22611, Japan) を溶解した。溶解後、0.8 g の DMAP (Nacalai Tesque Inc., 12922-02, Japan) および 2 mL の GMA (Nacalai Tesque Inc., 17107-55, Japan) を添加し、窒素環境下、37°C で 72 時間振盪した。72 時間後、DMAP と等量の HCl (Nacalai Tesque Inc., Japan) を添加し、反応を終了させた。その後、反応液に 4.0 mL の 3M NaOAc 水溶液 (Wako Pure Chemical Industries Ltd., 192-01075, Japan) と 28 mL のイソプロパノール (Nacalai Tesque Inc., 29113-95, Japan) を加えることによって生成物の沈殿を形成させ、6000G で 30 分遠心分離することによって上清を分離した。結果として得られた沈殿は 5.0

mL の 70 % EtOH (Nacalai Tesque Inc., 14713-95, Japan) で洗浄し、6000G で 15 分間遠心分離することによって再度上清と分離した。

蛍光デキストラン-GMA の合成

40 mL の DMSO に 4.0 g の Dex-GMA を溶解し、数滴の Pyridine (Wako Pure Chemical Industries Ltd., 162-05313, Japan) を加えた。その後、50 mg の Rhodamine B Isothiocyanate (RITC, Sigma Aldrich., R1755, St. Louis, MO) または Fluorescein Isothiocyanate (FITC, Sigma Aldrich., 7250, St. Louis, MO) と 80 mg の Dibutyltin Dilaurate (Tokyo Chemical Industry Co., LTD., D0303, Japan) を添加し、混合物を 98°C で 3 時間攪拌した。その後、反応液に 4.0 mL の 3M NaOAc 水溶液と 28 mL のイソプロパノール溶液を加えることによって生成物の沈殿を形成させ、6000G で 30 分遠心分離することによって上清を分離した。結果として得られた沈殿は 5 mL の 70 % EtOH で洗浄し、6000G で 15 分間遠心分離することによって再度上清と分離した。

温度依存的な重合タイミングの制御による灌流後の血管鑄造

ペントバルビタール 25 mg/kg (Kyoritsu Seiyaku Corporation, SOM04-YO1706, Japan) とキシラジン 10 mg/kg (Wako Pure Chemical Industries Ltd., 593-12891, Japan) を用いて麻酔したマウスの左心室から、ペリスタポンプ (Miniplus 3, Gilson, Middleton, WI) を用いて、50 U/mL の Heparin (Nacalai Tesque Inc., 17513-54, Japan) と 0.2 mg/mL の Verapamil (Wako Pure Chemical Industries Ltd., 222-00783, Japan) を含む 0.1 M PBS 20 mL を灌流して脱血を行った後、4% PFA 20 mL (Nacalai Tesque Inc., 02890-45, Japan) を灌流して固定を行った。続いて、5% RITC-Dex-GMA、5% アクリルアミド (Wako Pure Chemical Industries Ltd., 011-08015, Japan)、0.25% VA-044 (Wako Pure Chemical Industries Ltd., 017-19362, Japan) を含む 0.1 M PBS を 20 mL 灌流した。なお、混合物のうち最初の 10 mL は Dextran 40 を用いて作成した蛍光架橋剤を、続く 10 mL は Dextran 200 を用いて作成した蛍光架橋剤を用いた。全ての溶液は氷上で 30 分以上冷やされた状態であること、フィルター濾過を行って夾雑物を取り除くことが、非鑄造血管

を減らすために重要である。PBS および PFA の濾過には Millex-HV (Merck KGaA, SLHV033RS, Darmstadt, Germany) を、蛍光架橋剤を含む混合物の濾過には Whatman 定量フィルターペーパーグレード 1 (Sigma Aldrich., 1001 125, St. Louis, MO.) を用いた。灌流後、マウスの頭を下にして 50 mL コニカルチューブ内に入れ、窒素置換して 37°C で 3 時間インキュベーションを行い、重合反応を行った。

組織透明化

上記のように調整したマウスの脳を頭蓋と共に取り出し、0.5 M EDTA (pH 8.0, Nacalai Tesque Inc., 15130-95, Japan) 溶液 10 mL 中に移動し、12 時間 37°C で振盪することで脱灰を行った。その後、頭蓋を取り外して得た脳を、10% デオキシコール酸ナトリウム (Wako Pure Chemical Industries Ltd., 194-08311, Japan) または 8% SDS (Nacalai Tesque Inc., 31606-75, Japan) を含むホウ酸バッファー (pH 8.5, Wako Pure Chemical Industries Ltd., 021-02195, Japan) 20 mL 中に移動し、37°C で振盪した。バッファーは 1-2 日毎に取り替え、振盪は 7-10 日間行った。脱脂が終了した脳は 0.1 M PBS 20 mL, 室温で 2 時間 × 3 回洗浄した。洗浄後の脳は ScaleCUBIC-2 溶液 (Susaki et al., 2014) 20mL に移動し、37°C で 2 日間振盪することによって屈折率調節を行った。なお、ScaleCUBIC-2 は 50% スクロース (Nacalai Tesque Inc., 30403-55, Japan)、25% 尿素 (Nacalai Tesque Inc., 35905-35, Japan)、10 % 2,2',2"-nitrilotriethanol (Wako Pure Chemical Industries Ltd., 145-05605, Japan) によって作成した。

2D 免疫組織化学染色

固定後の脳を 15% スクロース溶液 (PBS に溶解) に 1 晩、30% スクロース溶液 (PBS に溶解) に 2 晩浸漬した。その後、ドライアイスによって脳を凍結させ、-80°C で使用時まで保存した。クリオスタット (Thermo Fisher Scientific, HM520, Waltham, MA) により -20°C で厚さ 40 μ m の Sagittal 脳切片を作製した。0.3% Triton-X100 (Nacalai Tesque Inc., 35501-15, Japan)、10% goat serum (GS; Vector Laboratories, Burlingame, CA) を含む PBS を室温にて 30

分間処置し、0.3% Triton-X100、10% GS を含む一次抗体溶液を室温にて 1 晩処置した。PBS で 5 分間の洗浄を 3 回行った後、0.3% Triton-X100、10% GS を含む二次抗体溶液を室温にて 4 時間処置した。PBS で 10 分間の洗浄を 3 回行った後、VECTASHIELD Antifade Mounting Medium (Vector Laboratories, H-1000, Burlingame, CA) を使用し封入した。一次抗体は rat anti-CD31 (1:300; BD Biosciences, 550274, Franklin Lakes, NJ) を使用した。また、二次抗体は Alexa 488-labeled goat anti-rat IgG (1:300; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) を使用した。

3D 免疫組織化学染色および核染色

0.5 % Triton X-100, 0.25 % Casein (Nacalai Tesque Inc., 12922-02, Japan) , 0.05 % アジ化ナトリウム (Nacalai Tesque Inc., 31208-82, Japan) を溶解した PBS に、FITC-conjugated mouse anti- α SMA (1:100, Sigma Aldrich., F3777, St. Louis, MO.) または rabbit anti-Iba1 (1:200, Wako Pure Chemical Industries Ltd., 019-19741, Japan) を溶解した溶液中に脱脂後の標本を移動することによって免疫組織化学を行った。 α SMA の抗体染色は 7-15 日間、Iba1 への抗体反応は 6 日間、37°C で振盪することによって行った。Anti-Iba1 処置した標本については、PBS での洗浄を 2 時間×3 回行った後、更に Alexa 594-labeled goat anti-rabbit IgG (1:300; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) によって染色を行った。反応溶液量は、全脳の染色については 800 μ L, 半脳については 400 μ L を用いた。染色が終了したサンプルは PBS、室温で 2 時間×3 回洗浄し、Iba-1 については 1% PFA で 5 時間再固定を行った後、ScaleCUBIC-2 で屈折率調節を行った。核染色は、0.5 % Triton X-100, 0.05 % アジ化ナトリウムを溶解した PBS に 5 μ g/ml の propidium iodide (PI, Thermo Fisher Scientific, P3566, Waltham, MA) を溶解した溶液に脱脂後の標本を移動し、37°C で 12 日間振盪することによって行った。溶液は 3 日に一回の頻度で交換した。

蛍光レクチンによる血管染色

尾静注：ペントバルビタール 25 mg/kg (Kyoritsu Seiyaku Corporation, SOM04-YO1706, Japan) とキシラジン 10 mg/kg (Wako Pure Chemical Industries Ltd., 593-12891, Japan) を用いて麻酔したマウスの尻尾を 37°C の湯浴で 30 秒間温めた後、Texas Red Lectin (Vector Laboratories, TL-1176, Burlingame, CA) 100 μ L を尾静注することによって行った。5 分間以上待機して全身に行きわたらせた後、灌流固定を行った。灌流：灌流固定の際、PBS 20 mL を流した後、PFA を流す前に、100 μ L の Texas Red Lectin を含む 20 mL の PBS を灌流することによって行った。

顕微鏡

全脳イメージング以外の画像取得は倒立型共焦点顕微鏡 CV1000 を用いて行った ($\times 10$, NA 0.4, WD 2.17mm, Z stack: 10 μ m step)。励起光としては、488 nm, 561 nm を用いた。全脳イメージングは上田研がオリンパスと共同開発したライトシート顕微鏡を用いた ($\times 0.63$, NA 0.15, WD 87 mm, Light sheet thickness 10-15 μ m)。励起光としては 488 nm, 560 nm を用いた。

光の透過度の定量

ヘーズメーター (Spectral Haze Meter SH 7000, Nippon Denshoku Industries) を用いて、380 から 780 nm の光の透過度を 5nm 間隔で定量した。標本をセル (Nippon Denshoku Industries, 2277) の中央に置き、全透過光と、屈折することなく透過してきた光の割合 (%) を計測した。透過度は、(全透過光の割合-屈折することなく透過してきた光の割合) / (100-屈折することなく透過してきた光の割合) の式によって算出した (Tainaka et al., 2014)。

解析は Matlab, ImageJ, R を用いて行った。データはすべて、「平均値 \pm 標準偏差 (SD)」で表記した。

【結果】

デキストランを骨格とした蛍光を持つ架橋剤の合成

一般的な血管鑄造法は、重合途中の高分子ポリマーを心臓から血管に流し込んでいる。しかし、この方法では細い血管でポリマーが詰まってしまうため、全ての血管は染色されない。この問題を解決するためには、蛍光モノマーを全血管に行きわたらせた後に重合を開始する、というアプローチが有効であると考えられる。重合タイミングの任意制御は市販の温度依存的な重合開始剤 VA-044 (4℃程度の低温では開裂せず、37℃程度で開裂してラジカル開始剤として働く) によって実現可能である。しかし、市販の蛍光モノマーは重合していない状態だと血管外に漏れ出してしまうため、血管の形を鑄造するのに用いるのは不可能である。よって、上記のアプローチを取るためには、モノマーの状態でも血管内に留まるような色素を独自に合成する必要がある。

これを実現するために、血管から漏れ出さない大きさを持つデキストランに、アクリル基との重合に必要な官能基グリシジルメタクリレート (GMA) を付加した (Fig. 1A, van Dijk-Wolthuis et al., 1995)。そして、蛍光色素である FITC をデキストランに付加する反応 (de Belder and Granath, 1973) を用いることによって、合成したデキストラン-GMA に蛍光色素 RITC を付加した新規の色素、RITC-Dex-GMA を合成することを狙った (Fig. 1B)。

今回の合成が成功しているかを調べるために、デキストラン-GMA とアクリルアミド、温度依存重合開始剤 VA-044 が形成するゲルの評価を行った。デキストラン-GMA, または GMA を付加していない通常のデキストラン 5%, アクリルアミド 4%, VA-044 0.25% の混合物を準備した。それぞれのバイアルを 4℃ または 37℃ に 3 時間おいたところ、デキストラン-GMA ありかつ 37℃ の群でのみ固いゲルが形成された (Fig. 1C)。このことから、GMA の付加は成功していること、この混合物で温度依存的にゲルの形成を制御できることがわかる。また、このような性質はデキストラン-GMA に RITC を付加した後でも維持されていた (Fig. 1D)。

新規血管鑄造法はほぼ全ての血管を明瞭に可視化する

灌流後に重合を開始する血管鑄造を行うために、麻酔したマウスの左心室から、4°Cで PBS、PFA を灌流した後に、RITC-Dex-GMA 5%, アクリルアミド 4%, VA-044 0.25% の混合物を灌流した。灌流が終了した後に、マウスを 37°C に 3 時間置くことによって重合反応を行った。

本手法でどれだけの血管が染色されているかを定量するため、血管鑄造を施したサンプルの薄層切片を作成し、鑄造血管のシグナルと、血管内皮細胞マーカー CD31 の免疫染色シグナルとのオーバーラップ率を定量した。そして、既存の血管染色手法である、蛍光レクチンの尾静注または灌流サンプルとの比較を行った。

結果、蛍光レクチンの尾静注はほぼ全ての血管を染めているようだがシグナルが比較的弱いこと (Fig. 2A)、蛍光レクチンの灌流は尾静注より強いシグナルを生じるが染色にムラが生じ、また染色されない部位が多いことがわかった (Fig. 2B)。これらに比べ、今回の血管鑄造法は強いシグナルを持っており、ほぼ全ての血管を染色することがわかった (Fig. 2C, $n = 9$ slices from 9 mice, $98.2 \pm 0.76 \%$, Fig. 2D, $n = 10, 6, 9$ slices from 10, 6, 9 mice, $P < 0.001$; Tukey-Kramer test after One-way ANOVA, Fig. 2E, $n = 10, 6, 9$ slices from 10, 6, 9 mice, $P < 0.001$; Tukey-Kramer test after One-way ANOVA)。以上より、微小血管まで高い S/N 比で染色できる新規の血管鑄造法を確立した。

デオキシコール酸による脱脂は組織の膨潤を殆ど起こさず迅速に透明化を実現する

次に、周囲の分子を保存しつつ血管構造を 3 次元で観察するために、組織透明化を試みた。組織が不透明である原因は、組織が水と脂質という屈折率の異なる 2 つの物質からなっているために、入射光が散乱し、透過光が減少することである (Johnsen and Widder, 1999, Tuchin, 2015)。透明化手法では、脂質を取り除くことによって組織を構成する要素の屈折率を均一にし、散乱を抑えている。これを行うために、主に界面活性剤が用いられる。そこでまず、従来の透明化手法のうち、CLARITY (Chung et al., 2013) や PACT (Yang et al., 2014) などを用いられる界面活性剤、SDS を用いた。SDS で 7 日間脱脂を行い、ScaleCUBIC-2 溶液を用

いて屈折率調節を行ったところ、灰白質は透明になるものの、白質まで完全に透明にはできなかった (Fig. 3A)。また、透明化の過程で標本の顕著な膨潤が生じ、機械的な強度が失われていた。透明化期間の長期化はスループットの低下に繋がり、組織の機械的強度の消失は本来の形態の観察を困難にする。そこで、これらの問題を解決するために、新たな界面活性剤を模索した。

結果、胆汁酸塩であるデオキシコール酸ナトリウム (SDC) による脱脂がこれらの問題を解決することを見出した。SDC で 7 日間脱脂を行い、ScaleCUBIC-2 溶液を用いて屈折率調節を行ったところ、有色ではあるものの白質まで透明化していることがわかった (Fig. 3B)。なお、7 日間の脱脂によって組織を透明にできるのは、単純な浸透を用いた透明化手法としては比較的速い部類に入る (CALRITY 6 週間 (Chung et al., 2013)、PACT 2 週間 (Yang et al., 2014)、CUBIC-L/R 5 日間 (Kubota et al., 2017)、uDISCO 4 日間 (Pan et al., 2016)、他の透明化手法はそもそも脳を透明にできていない (Hama et al., 2011, 2015, Ke et al., 2013)、または蛍光の消失が生じる (Dodt et al., 2007, Becker et al., 2012, Renier et al., 2014))。標本の光透過率を定量したところ、予想に反し、SDC で透明化したサンプルよりも SDS で透明化したサンプルの方が高いことがわかった (fig. 3C, $n = 8$ mice each, $P < 0.001$; Two-way ANOVA)。これは、灰白質の透明度だけで言えば SDS の方が高いことや、SDC のサンプルが有色であることを反映していると考えられる。ただし、透明化処理後に残る不透明領域の割合は、SDC の方が SDS よりも小さかった (fig. 3D, $n = 8$ mice each, $P < 0.001$; Tukey's test after One-way ANOVA)。また、脱脂に伴うサンプルの膨潤を定量したところ、SDC による脱脂でも膨潤は起こるものの、SDS による膨潤よりは緩やかであることがわかった (Fig. 3E, $n = 8$ mice each, $P < 0.001$; Tukey's test after One-way ANOVA)。

SDS を用いた透明化では鑄造血管の断裂が生じるが、デオキシコール酸ナトリウムの場合には殆ど生じない

血管鑄造を行ったサンプルを SDS または SDC で透明化し、3D で撮影した皮質の最大値

投影画像を観察したところ、SDS で透明化したサンプルでは、血管の断裂が生じることがわかった (Fig. 4A)。これは、組織が膨張したことによって、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る。一方で、SDC で透明化した群ではこのような断裂は殆ど見られなかった (Fig. 4B)。

断裂の程度を定量するために、断裂した皮質の貫入血管の割合を求めた (皮質の貫入血管は、直径が太く伸びている方向が一定であるため、例え断裂していても、もともと一本の血管だったのか、そうでなかったのかを推定することが容易であるため)。結果、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なかった (Fig. 4C, $n = 6, 9$ mice. $P < 0.001$; Student's t-test)。このことから、SDC による透明化は、迅速に透明化ができ、標本の機械的な強度を保存す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た。

本血管鑄造法・透明化手法を組み合わせることによって通常の顕微鏡でも深部の血管構造を捉えることができる

今回開発した透明化手法と上述の血管鑄造法を組み合わせ、血管の 3 次元構造の観察を試みた (Fig. 5A)。そして、このシグナルの強さを既存手法 (蛍光レクチン尾静注と PACT による透明化の組み合わせ) と比較した。結果、本手法でも深度依存的にシグナルノイズ比の減弱は見られるものの、通常の共焦点顕微鏡 (CV1000) で少なくとも脳表から 1000 μm の深さまで明瞭に血管のシグナルを捉えることが可能であり、既存手法よりも有意に高い S/N 比を持っていることが明らかとなった (Fig. 5B, $n = 7, 9$ mice, $P < 0.001$; Two-way ANOVA)。なお、蛍光レクチンのシグナルは薄層切片で観察した時のものより更に弱くなっているが、これは脱脂の過程で蛍光レクチンが失われていることが原因であると考えられる。

ライトシート顕微鏡を用いれば全脳の血管構造を捉えることができる

共焦点顕微鏡はレーザーを観察面に対して垂直に当てているため、特定の面のシグナルを

捉えられるとはいっても、他の面からの蛍光が干渉してしまい、深部に行くほど S/N 比が落ちていく。そこで、観察面に水平な方向から、観察面にだけシート状の光を照射する、ライトシート顕微鏡 (Susaki et al., 2014) を用いて本手法で調製したサンプルの撮影を行った。

結果、全脳に渡って血管のシグナルを捉えられることがわかった (Fig. 6A-C)。なお、白質は脂質が多く透明化が難しい上に深い部分に存在するため、この部分のシグナルを捉えられているのは珍しいことである (Fig. 6C)。

本血管鑄造法・透明化手法は組織の核酸およびタンパク質を均一に保存している

組織透明化の強みは、血管構造だけでなく周囲の分子も保存できることである。しかし、一部の透明化手法では周囲分子が流出する、あるいは蛍光タンパク質が消光するといった問題が生じる (Dodt et al., 2007, Becker et al., 2012)。そこで、今回の条件で組織の周囲分子が保存されているかを調べるために、まず核酸を染色した。

FITC-Dex-GMA を用いて血管鑄造したサンプルを SDC で脱脂後、PI で核を染色して ScaleCUBIC-2 で屈折率調節を行った。結果、血管に隣接していない部分でも PI のシグナルが強く残っていた (Fig. 7B)。ただし、本手法では後固定などを行っていないため、血管から遠い部分の分子は十分に架橋されていない可能性が考えられる。そこで、ポジの部分の蛍光輝度について、血管からの距離依存的な減弱があるかを検討した。結果、減弱は殆ど見られなかった (Fig. 7C)。このことから、本手法では後固定などをしていないにも関わらず、組織の核酸を均一に保存できていることが示唆される。ちなみに、PI の染色によって透明化した脳ではバレル構造を簡便に捉えることが可能である (Fig. 7D)。先行研究では特殊な断層顕微鏡と大量の蛍光色素を用いてバレルを通る血管構造を見ていたが (Blinder et al., 2013)、本手法によって通常の顕微鏡でもどのバレルをどのような血管が走っているかを捉えることができる (Fig. 7E)。

次に、タンパク質が保存されているか調べるため、免疫染色を試みた。FITC-Dex-GMA を用いて血管鑄造したサンプルを SDC で脱脂後、Iba1 抗体を用いてマクログリアを染色し

た。ここでも同様、血管に隣接していない部位でもシグナルが見られ (Fig. 7F, G)、血管からの距離依存的なシグナル減弱も見られなかった (Fig. 7H)。

更に、蛍光タンパク質の消光可能性を検討するために、活動した神経細胞に蛍光タンパク質を発現する、Arc-dVenus マウス (Eguchi and Yamaguchi, 2009) に本手法を適用した。2.5 日間暗所で飼育した Arc-dVenus マウスを 5 時間明るい環境に暴露することによって視覚皮質および関連領域を標識し、本手法を適用して血管鑄造と脳の透明化を行った。結果、dVenus の蛍光が視覚皮質、海馬、Cingulate Cortex 付近で見られた。このことから、本手法では蛍光タンパク質の消光は起こらない可能性が高いと考えられる (Fig. 7I)。更に、視覚皮質の深層で dVenus 陽性細胞が大量に見られることを利用し、これまでの解析と同じことを行った。結果、ここでも血管からの距離依存的なシグナル減弱は見られなかった (Fig. 7J, K)。以上より、今回の固定方法とデオキシコール酸ナトリウムを用いた脱脂では、血管周囲組織の核酸・タンパク質をほぼ均一で保存できており、蛍光タンパク質の消光も生じないことが示唆された。

Semi-intact マウス脳血管の 3D トレーシングによる新規血管走行経路の発見

最後に、これらの手法の応用例を示すため、未知の血管走行経路の探索を行った。皮質の血液は、脳表の血管から貫入動脈を介して皮質に入り、貫入静脈を介して脳表に戻ると考えられている (Paxinos, 1994)。また、海馬の血液は、脳底動脈または後大脳動脈から分岐した血管 (Longitudinal Artery) を通じて海馬に入り、似たような経路を通る静脈を通じて回収される (Coyle, 1976)。このように、皮質と海馬のネットワークは細動脈の解像度で見ると独立したものであることは知られていたが、微小血管の解像度で見た時でも独立したものなのか、そうでないのかは明らかではなかった。

そこで、今回開発した手法を用いてマウス脳血管をトレーシングしたところ、皮質の貫入血管が、細い血管を介して海馬の血管と結合していることを発見した。これが海馬から皮質に流れているのか、それとも皮質から海馬に流れているのかに興味を持ち、平滑筋を染める

抗体 α SMA-FITC を用いて動脈と静脈を同定した上で脳血管の 3D 構造を観察した (Fig. 8A)。本サンプルでも皮質の貫入血管と海馬の血管を観察することができ、この構造は保存された構造であることが示唆される (Fig. 8B, C, F)。これを α SMA のシグナルと比較したところ、結合している血管は、皮質も海馬も動脈であることがわかった (Fig. 8D, E)。

動脈の吻合は脳表の血管でよく見られる (Blinder et al., 2010)。このような構造は、特定の血管が梗塞した場合に、梗塞した血管が栄養供給を行っていた部位に別経路を介して栄養供給を行うために重要であると考えられている。今回発見した構造は、例えば皮質の貫入血管が梗塞してしまった時、梗塞した血管が本来栄養供給をしていた領域に海馬の動脈が栄養供給を行う、等の役に立っているのかもしれない。

このような経路は、3D で細い血管まで見ることができ、領域をまたがるほど大規模な観察ができ、血管の周囲に存在する細胞の分子発現を免疫染色によって同定することによって初めて発見されるものであり、本手法の強みと応用可能性を示していると言えるだろう。

【考察】

本研究では、周囲のタンパク質や核酸などの情報を保存したまま、脳血管を広範囲に渡って微小血管の解像度で3D観察するために、新規の血管鑄造法と組織透明化手法を開発した。新規に開発した色素と血管鑄造法によって、ほぼ全ての脳血管が高い S/N 比で染色された。また、デオキシコール酸ナトリウムを用いた透明化手法は、10 日という速さにも関わらず、標本の顕著な膨潤を生じることなく、機械的な強度を保ち、構成要素の屈折率を均一化することがわかった。そして、これらを組み合わせれば、成体マウス脳血管を3次元で大規模に捉えることが可能な標本が、周囲のタンパク質、核酸を保ったまま作成できた。更に本研究では、開発した手法を用いてマウス脳血管を3D観察することにより、新規の血管走行経路を発見した。

灌流後に重合開始する血管鑄造

今回の血管鑄造法は従来の手法と異なり灌流を行った後に重合を開始しているため、殆ど詰まることが無い。これを実現するために、温度依存的な重合開始剤 VA-044 を使用し、モノマーの状態でも血管から漏れ出さない蛍光色素を合成した。Non-specific な重合をより抑えるために、VA-044 よりも高い温度で開裂を開始するような温度依存重合開始剤を用いるということも考えられるが、高すぎる温度はタンパク質の変性・抗原性の変化を生じる可能性があるため、今回のように37℃程度で反応が進むことが望ましいだろう。

似たような発想で血管鑄造を行った先行研究としては、温かいゼラチンと FITC-BSA の混合物を流すというものがある (Tsai et al., 2009, Blinder et al., 2010, 2013)。この研究では観察した視野で100%の血管染色ができていると主張しているが、2例でしか確認をしていないこと、視野の選択が恣意的であること、ground truth の血管としているものが、一部の内皮細胞でしかないこと (Tsai et al., 2003) から、実際に100%であるかは疑わしい。ゼラチンは室温でも素早く固化することが知られており、別の研究では全脳血管の染色が難しいということも報告されている (Xue et al., 2014)。また、この手法では高価な蛍光タンパク質を大量に

用いる必要があるため、1 サンプルの調整に 4 万円以上が費やされる。このように、本当に全ての血管が染まっているかの不確かさ、再現の難しさ、コストの高さから、従来手法はルーチン実験には適さない。一方で、今回の手法は再現性良くほぼ全ての血管が染色できる。また、デキストラン、GMA、RITC は全て安価であるために、1 サンプルにかかるコストは 1000 円程度、FITC を用いた場合は 500 円程度となっている。そのために、本手法は血管をルーチンで観察するための手法としてより優れていると考えられる。

血管の観察のためにはトランスジェニックマウスを用いるという手段も考えられる。しかし、血管内皮細胞をラベルするようなプロモーターは発達の段階で一過的に動くようなものしか見つかっていないために、全ての内皮細胞をラベルするためには二重トランスジェニックマウスを用いる必要がある (Kisanuki et al., 2001)。そのため、サンプルの供給ペースが実験の律速段階となり、特に KO マウスの表現系の解析は 4 重遺伝子改変マウスを用いる必要が出てきてしまうため、事実上実現が困難となる。また、他の conditional な遺伝子改変動物との併用も、一般に用いられる組み換え酵素 cre は血管のラベリングのために使ってしまうため、flp など別の組み換え酵素を組み合わせなければ不可能になる。今回の手法は任意のタイミングで任意の動物について行えるために、KO マウスの血管の表現型を立体的に観察したり、他の細胞種と血管の相互作用を見るために適した手法であると言えるだろう。

デオキシコール酸ナトリウムによる透明化

デオキシコール酸ナトリウムは植物の透明化には既に用いられている (Kurihara et al., 2015)。過去に動物組織の透明化でも用いられたことが 2 度あるが、それらの知見では他の界面活性剤に劣るものとされてきた (Susaki et al., 2014, Yang et al., 2014)。

その理由として、Susaki, Ueda らのグループでは SDC とアミノアルコールを混合して用いていたことが挙げられる。筆者も SDC での成功体験の後、アミノアルコールとの混合で透明化の改善を試みたものの、これらの効果は加算的に表れるものではなく、むしろ効果を打ち消すものとなってしまった。詳しい原因は明らかではないが、SDC とアミノアルコール

が相互作用してしまうことによって、SDC と組織の脂質が相互作用しにくくなっている可能性が考えられる。また、Yang, Gradinaru らのグループでは、架橋の度合いが異なっていることが原因として考えられる。今回の条件では灌流後すぐに重合を開始したが、先行研究ではその後さらにアクリルアミドと VA-044 の混合溶液に浸すという過程を経ている。そのために、先行研究の方がより密なゲルを形成しており、脱脂のスピードを落としている可能性が考えられる。

さて、なぜデオキシコール酸ナトリウムでは組織の膨潤が抑えられるのだろうか？そもそも SDS で組織が膨潤していた原因として、SDS が界面活性剤であるのみならず、タンパク質変性剤として働いていることが挙げられる。脱脂が行われた後の組織はアクリルアミド、PFA、タンパク質からなる一種のゲルである。そのため、タンパク質が変性し、フォールディングが解かれると、ゲルが拡張しやすくなる (Chen et al., 2015)。SDC は SDS に比較するとタンパク質変性能は低いため、組織の膨張が比較的緩やかなのだと考えられる。

手法の限界と今後の開発の方向性

今回の手法の注意点として、静脈洞の構造を完全には保存していないということが挙げられる。脳表の静脈は最終的には脳の正中に存在する静脈洞に回収されるが、これは硬膜と癒着した構造である (Paxinos, 1994)。そのため、脳を頭蓋から取り外す際、静脈洞を鑄造したゲルは頭蓋骨の方に一部取られてしまう。このような問題を解決するためには、頭蓋骨ごと透明にすることによって観察する、といったようなアプローチが必要になってくるかもしれない (Trewel et al., 2015)。ただし、静脈洞の走行経路は過去の研究から明らかになっているため、予測して補うといったことも可能である。

また、デオキシコール酸ナトリウムによる透明化は、白質まで均一に透明化はできるものの、完全に透明ではない。若干不透明である可能性と、黄色が残ってしまっているという欠点が挙げられる。

若干不透明である件については、脂質が完全に除かれていないケースと、除けているが結

果として残るゲルの屈折率調節がうまく行っていないケースが考えられる。デオキシコール酸ナトリウムだけでは取り除けないような脂質があるのであれば、他の界面活性剤を併用するといったことが解決策として考えられる。一方で、脂質が完全に取り除かれているのであれば、今後屈折率調節を行う試薬を調整することによって解決できるかもしれない。

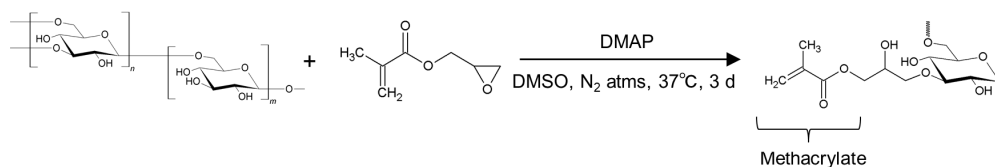
黄色の原因としては、ヘム、メイラード反応による生成物などが挙げられる。ヘムならばアミノアルコールによって脱色が可能である (Tainaka et al., 2014) が、SDC とアミノアルコールの併用は脱脂能を下げてしまうため、今回はこれ以上の検討を行っていない。メイラード反応が原因である場合は、透明化過程の終始にわたって、メイラード反応を抑える Sodium Sulfate などを加えることが有効である可能性も考えられる (Ke et al., 2013, Murray et al., 2015)。

本手法の応用可能性

今回本手法を用いて太い血管では繋がっていないことが知られていた海馬と皮質が微小血管では繋がっていること、その結合が動脈と動脈同士の結合でありうることを明らかにした。しかし、これは微小血管の結合関係が立体的に捉えられるようになることによって見つかる知見の一例に過ぎない。今後例えば、脳血管は効率の良い栄養供給のために都合の良いネットワーク構造を有しているのか、あったとして、それらは各脳領域で共通して存在するものなのか、脳血管の分岐パターンはどのようなルールに基づいて制御されており、それらに関わるような分子を操作した際にどのようなパターン変化が観察されるか、といった研究が可能になると考えられる。また、特定の摂動に対して生じる血管の応答という 이슈 に対しても、これまでは血管の密度変化や発現分子の変化という観点からしか評価ができなかったが (Lacoste et al., 2014, Whiteus et al., 2014)、本手法を適用することによって、新たな側面が見えてくる可能性も考えられる。

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できるルーチンワークとする。よって、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、血管網のつながり方を研究する分野の発展に貢献することが期待される。

A Step 1: Addition of methacrylate group to BBB-impermeable macromolecule



B Step 2: Fluorescent Labelling of Dex-GMA by RITC (or FITC)

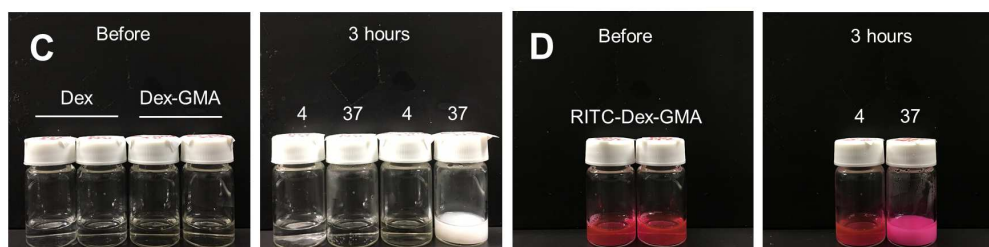
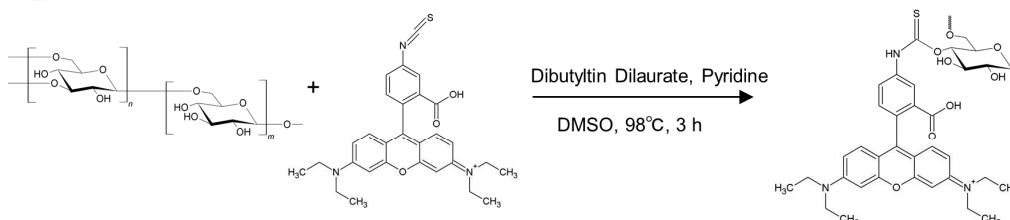


Figure 1. 蛍光架橋剤の合成

- (A) (左) デキストランの構造。 $\alpha 1,3$ および $1,6$ 結合または $\alpha 1,6$ 結合のみを持つグルコースからなる。まず、デキストランに GMA を付加する。これにより、ラジカル型の重合開始剤があれば、アクリルアミドと重合できる。
- (B) A. で作成したデキストラン-GMA に蛍光色素 RITC を付加する。
- (C) デキストラン-GMA とアクリルアミド、温度依存重合開始剤 VA-044 が形成するゲルの評価。デキストラン-GMA, または GMA を付加していない通常のデキストラン 5%, アクリルアミド 4%, VA-044 0.25% の混合物を準備した。それぞれのバイアルを 4°C または 37°C に 3 時間おいたところ、デキストラン-GMA 有り、且つ 37°C の群でのみ固いゲルが形成された。
- (D) C. で見られた架橋剤としての性質は RITC を付加した後も維持されていた。

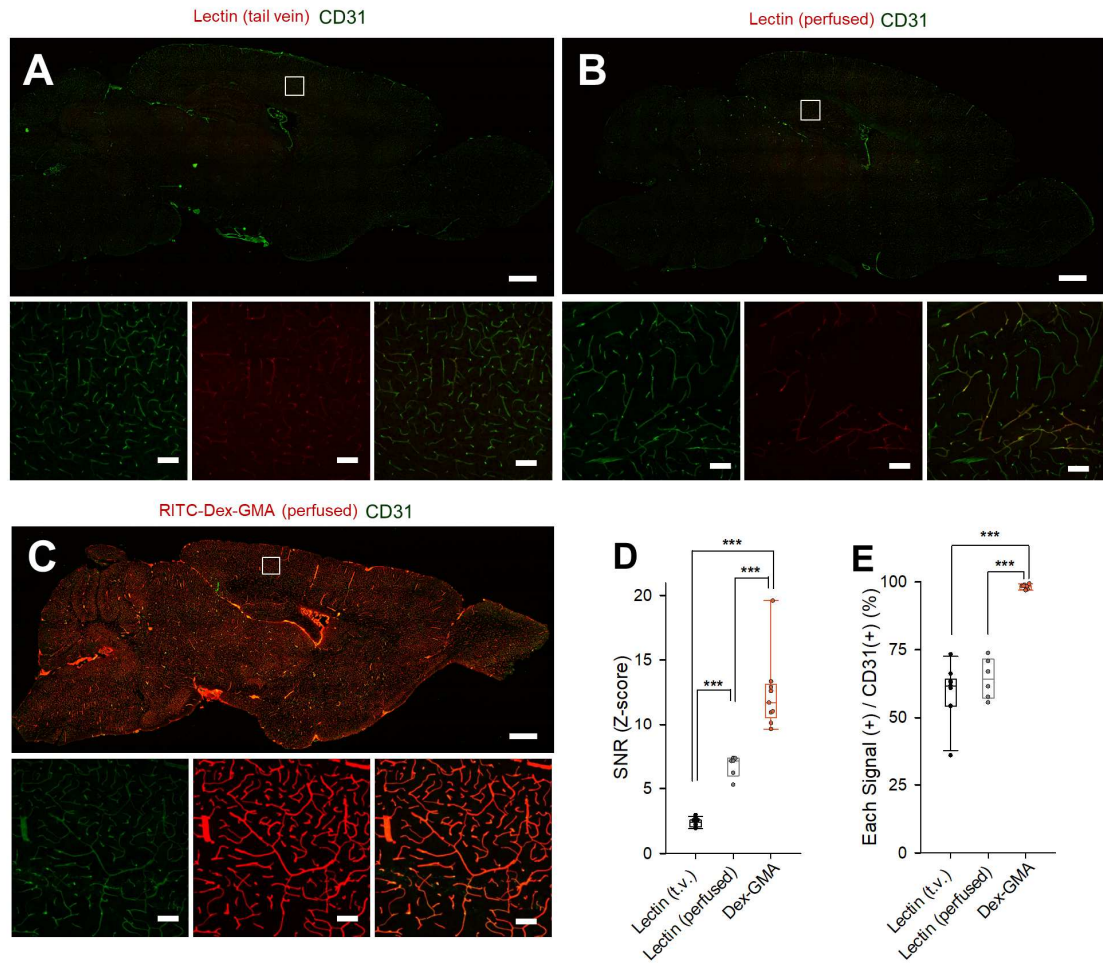


Figure 2. RITC-Dex-GMA、アクリルアミド、VA-044 を用いた血管鑄造法はほぼ全ての脳血管を明瞭に可視化する

(A) 3-5 ヶ月令のマウスに対して様々な条件で血管染色を行った (赤)。その後、薄層切片を作成して血管を血管内皮細胞特異的な抗体 CD31 (緑) で免疫染色し、シグナルの重複度合いを定量した。なお、定量は自動で二値化された CD31 の画像と Texas Red Lectin または RITC-Dex-GMA の画像を用いて行った。A-C について、上半分には sagittal 切片を、左下には上画像白枠内の CD31 シグナル、中央下は RITC シグナル、右下はマージ画像を示す。上の Scale Bar は全て 1000 μm , 下は 100 μm 。Texas Red Lectin の尾静脈によって血管を染色した。全ての血管が染色されているようだが、Texas Red Lectin の蛍光が非常に弱い (n = 10 mice)。

(B) Texas Red Lectin を灌流することによって血管染色を行った。この方法は、しばしば脳血

管を染色する方法として用いられているが、Robertson らによれば一部の血管しか染色されないことが報告されている (Robertson et al., 2015)。今回脳血管について CD31 とのオーバーラップを見たところ、尾静注より強いシグナルで血管が染色されているが、先行研究と同様、一部の血管しか染色されていないことがわかった ($n = 6$ mice)。

- (C) ヘパリン、ベラパミルを含んだ PBS を用いて脱血し、PFA を灌流後、10mL の RITC-Dex40-GMA, アクリルアミド, VA-044 を灌流後、10mL の RITC-Dex200-GMA, アクリルアミド, VA-044 を灌流した。ほぼ全ての血管が明瞭に染色されていた ($n = 9$ mice, $98.2 \pm 0.76\%$)。
- (D) 各条件におけるシグナルノイズ比。シグナルと判定されたピクセルの輝度の平均値を、スライス上のシグナルでない部分のピクセルの輝度データを用いて Z-Score 化した ($n = 10, 6, 9$ mice, $***P < 0.001$; Tukey-Kramer's test after one-way ANOVA)。
- (E) 各条件におけるオーバーラップ率。二値化された画像を用いて定量した。二値化は、RITC-Dex-GMA については通常の二値化方法を当てはめた (それだけで見た印象とほぼ一致する判定が可能だったため)。他のデータについては、ただ自動で二値化するだけではノイズを非常に多く拾ってしまうため、背景処理をして stitch に伴って生じる格子を消去した後 bandpass フィルターをかけ線分成分を強調後、二値化を行った。尾静注のシグナルは文献的にはほぼ全ての血管を染色するはずであるが、シグナルが弱く検出されづらい影響で、灌流したシグナルとほぼ同程度のオーバーラップ率になっている ($n = 10, 6, 9$ mice, $***P < 0.001$; Tukey-Kramer test after one-way ANOVA)。

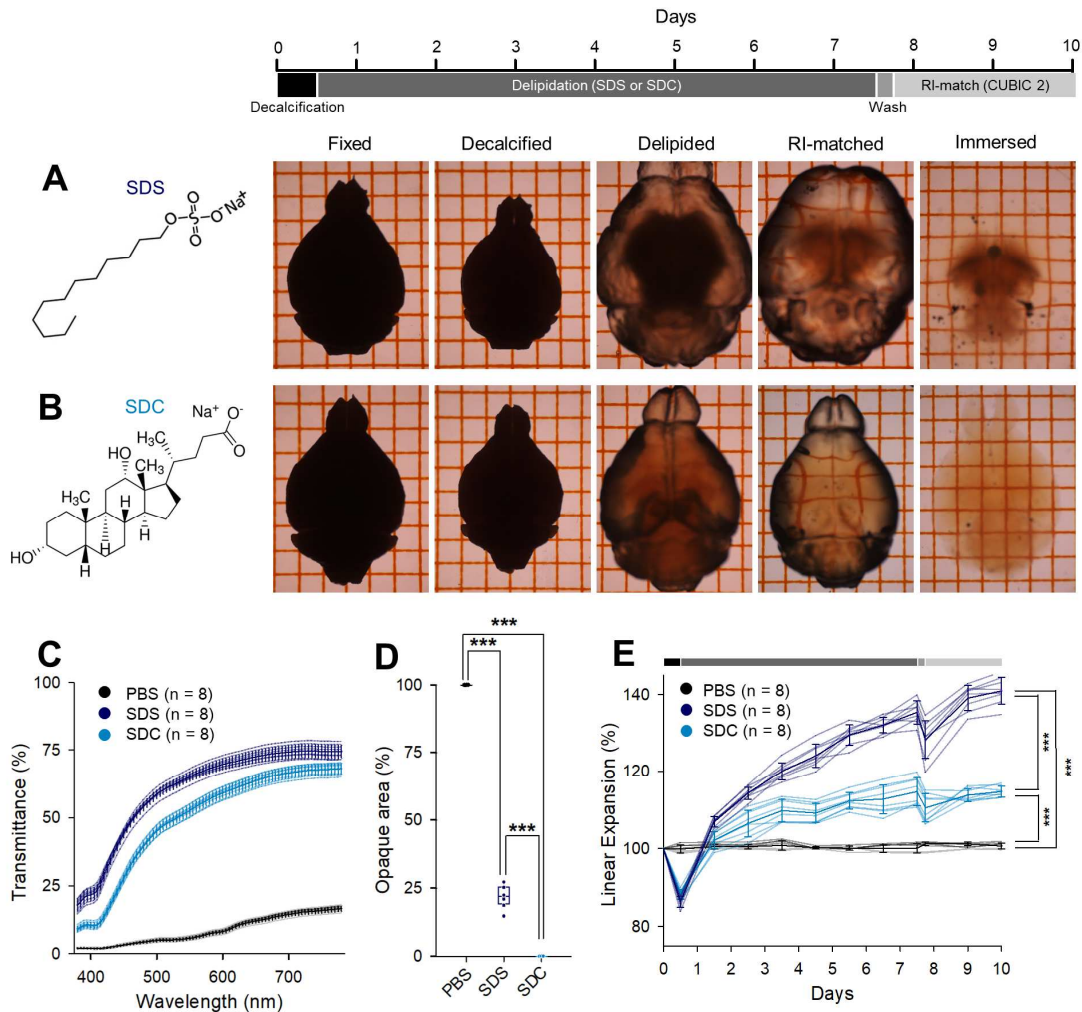


Figure 3. デオキシコール酸ナトリウムによる脱脂は、標本の膨潤を抑えつつ、白質まで迅速に透明にする

(A) デキストラン-GMA、アクリルアミド、VA-044 を用いて架橋した全脳サンプルを、半日 EDTA で脱灰後、1 週間 SDS 溶液で脱脂し、PBS で洗浄後、2 日間 ScaleCUBIC-2 を用いて屈折率を調整した画像。灰白質は透明になっているが、白質は透明になっておらず、脳の奥にある格子はみえていない。また、サンプルは機械的強度を失っており、嗅球等の構造は失われ、表面は脆くなっている。格子は 2 mm 間隔。なお、EDTA による脱灰は本来頭蓋骨ごと行う（組織の縮小と頭蓋骨の脱灰によって、脳表血管がより保存された状態で標本調製することが可能になるため）。

(B) 同様の脳サンプルを 1 週間デオキシコール酸ナトリウムで脱脂し、ScaleCUBIC-2 で屈

折率を調節した画像。淡黄色を有するが白質まで透明になっており、脳の奥にある格子構造が見えることがわかる。なお、本サンプルはこの状態でも十分な機械的強度を有している。

- (C) 各波長における組織の光の透過率を測定した。SDS で脱脂した標本（紺）の方が SDC で脱脂した標本（水色）よりも透過度が高い（ $n = 8$ brains each, $***P < 0.001$; Two-way ANOVA）。
- (D) 脳の不透明領域の面積の、全脳の面積に対する割合を定量した結果（ $n = 8$ brains each, $***P < 0.001$; Tukey-Kramer's test after one- way ANOVA）。
- (E) 組織の膨潤度合の定量結果。Day 10 の数値を用いて検定を行った（ $n = 8$ brains each, $***P < 0.001$; Tukey-Kramer's test after one- way ANOVA）。

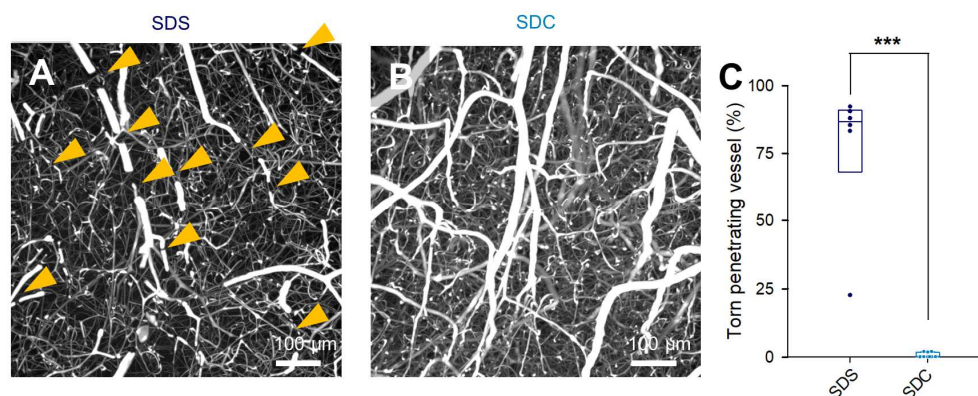


Figure 4. SDS による透明化では鑄造血管の断裂が生じるが、SDC では殆ど生じない

(A) 血管鑄造を行った後、SDS で脱脂を行い、ScaleCUBIC-2 で屈折率を調節して透明化を行った標本。皮質の最大値投影画像。矢じりの箇所で血管の断裂が起こっている。

(B) 血管鑄造を行った後、SDC で脱脂を行い、ScaleCUBIC-2 で屈折率を調節して透明化を行った標本。皮質の最大値投影画像。SDS で脱脂を行った際に見られたような断裂は見られない。

(C) 皮質の貫入血管のうち、断裂が生じていたものの割合を定量した結果 (n = 6 and 9 brains, ***P < 0.001; Student's t-test)。

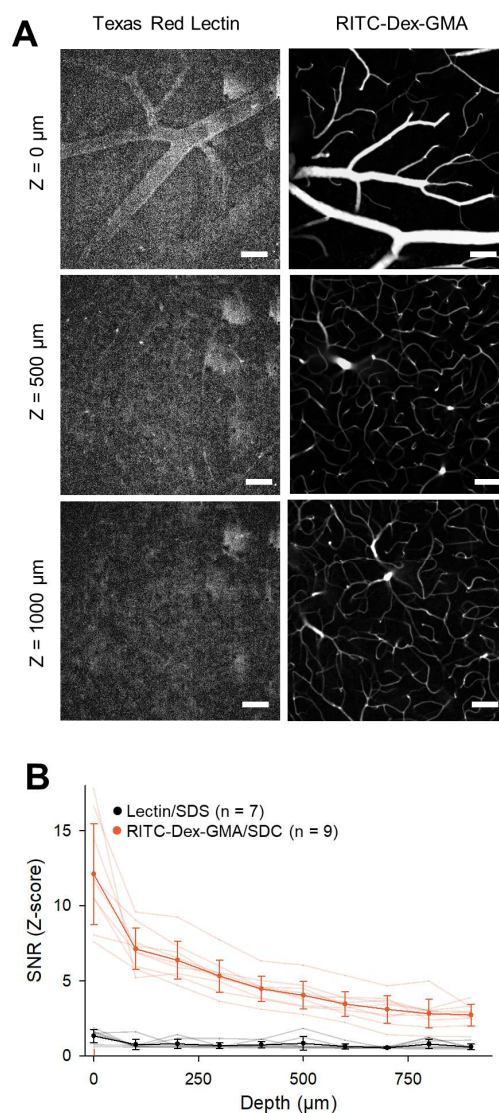


Figure 5. 今回開発した血管鑄造および透明化手法の組み合わせによって、通常の共焦点顕微鏡を用いても血管を3次元に渡って深部まで観察できる

(A) (左) Texas Red Lectin の尾静注によって血管を染色した半脳サンプルを SDS によって4日間処置し、ScaleCUBIC-2 で屈折率を調節した後、共焦点顕微鏡 ($\times 10$, $NA = 0.4$, $WD = 2.17$ mm) を用いて撮影した。様々な深度 (Z) についての画像を示す。(右) RITC-Dex-GMA を用いて血管鑄造した半脳サンプルを4日間デオキシコール酸ナトリウムで脱脂し、ScaleCUBIC-2 で屈折率を調節した後、共焦点顕微鏡で撮影した画像。Scale Bar = 100 μm 。

(B) A.のシグナル減弱の定量結果。既存手法 (黒) ではほとんどシグナルが取れない一方、

今回の手法（オレンジ）では高いシグナルノイズ比があることがわかる。今回の手法でも、血管のシグナルは深度依存的に徐々に減弱していくものの、一般的な共焦点顕微鏡でも少なくとも脳表から 1000 μm の深度まではシグナルが拾えている（ $n = 7$ and 9 mice, *** $P < 0.001$; Two-way ANOVA）。

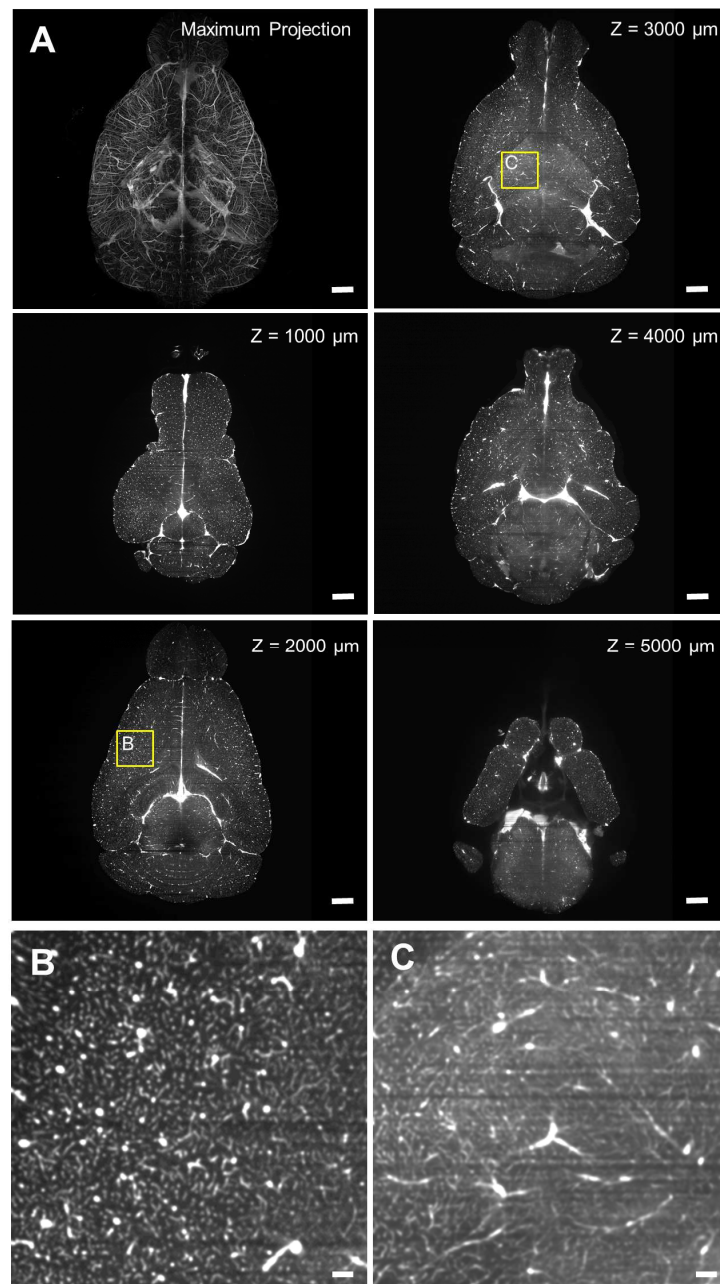


Figure 6. ライトシート顕微鏡を用いた全脳イメージングによって白質の血管シグナルを捉える事が可能になる

(A) 本手法を用いて調製した標本をライトシート顕微鏡 ($\times 0.63$, $NA = 0.15$, $WD = 87$ mm) を用いて撮影した。取得された画像の最大値投影画像 (左上) および各深度における画像の様子。全ての深度に渡ってシグナルが取れていることがわかる。Scale Bar = 1000 μ m

(B) A の $Z = 2000 \mu\text{m}$ の黄色枠内の画像。微小血管まで明瞭に可視化されていることがわかる。 $100 \mu\text{m}$.

(C) A の $Z = 3000 \mu\text{m}$ の黄色枠内の画像。B には劣るが微小血管まで可視化されていることがわかる。 Scale Bar = $100 \mu\text{m}$.

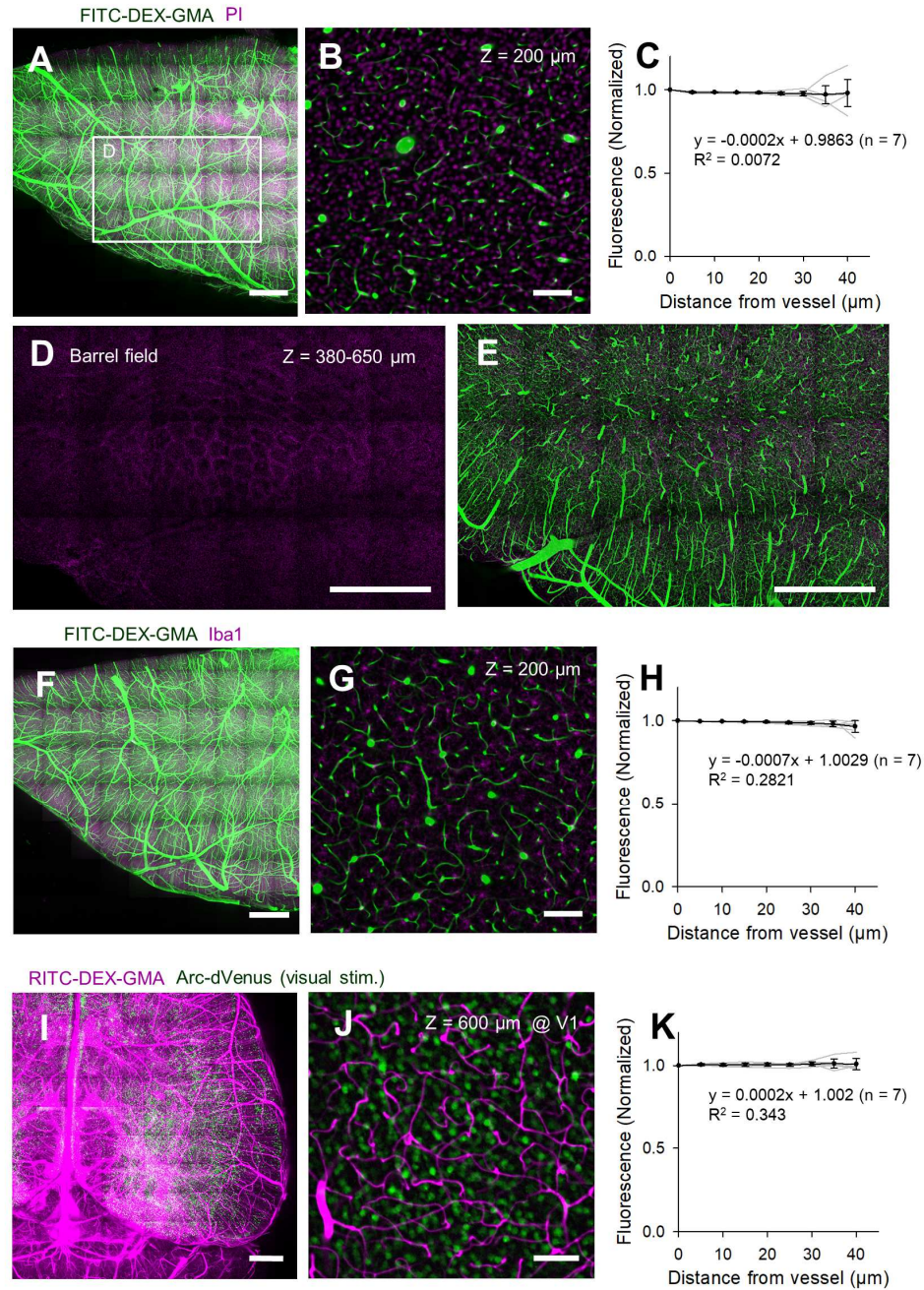


Figure 7. 本手法は透明化後も組織の核酸・タンパク質を均一に保存する

(A) 核酸の保存を見るため、FITC-Dex-GMA を用いて血管鑄造したサンプルを SDC で脱脂後、PI で核染色して ScaleCUBIC-2 で屈折率調節を行った。半脳を dorsolateral から撮影した様子。Scale Bar = 1000 μm .

(B) $Z = 200 \mu\text{m}$ における拡大画像。血管に隣接していない部分でも PI のシグナルが強く残

っていることがわかる。Scale Bar = 100 μm .

- (C) B.の定量結果。PI のシグナルと判定された部位のピクセル輝度について、血管からの距離毎に中央値を取った。傾きはほぼ 1 であった。
- (D) A.の四角で囲んだ部位の $Z = 360 - 650 \mu\text{m}$ にかけての PI シグナルの最大値投影画像。バレル構造が観察できることがわかる。Scale Bar = 1000 μm .
- (E) 血管のシグナルとのオーバーラップ画像。これにより、各バレルに対してどのように血管が栄養供給をしているかを特殊な顕微鏡を用いずとも観察可能になる
- (F) FITC-Dex-GMA を用いて血管鑄造したサンプルを SDC で脱脂後、Iba1 抗体を用いてマクログリアを染色した。
- (G) $Z = 200 \mu\text{m}$ における拡大画像。血管に隣接していない部分でも Iba1 のシグナルが残っていることがわかる。
- (H) G.の定量結果。
- (I) 2.5 日間暗所で飼育した Arc-dVenus マウスを 5 時間明るい環境に暴露し、今回開発した手法を用いて脳血管を染色・透明化した。
- (J) 一次視覚皮質 (V1) の $Z = 600 \mu\text{m}$ における拡大画像。
- (K) J.の定量結果。

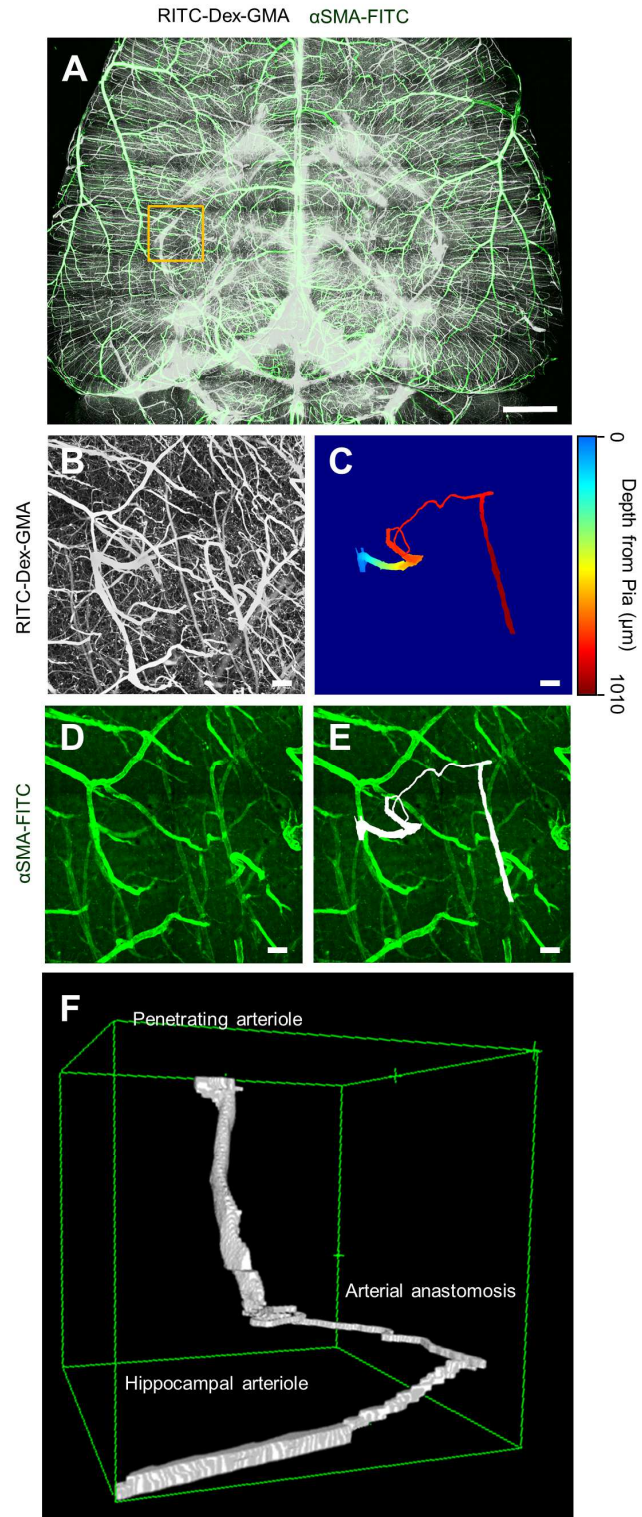


Figure 8. Semi-intact マウス脳血管の 3D トレーシングによって未知の血管走行経路が観察可能になる

(A) 血管鑄造したサンプルを SDC で脱脂後、anti- α SMA-FITC を用いて免疫染色することに

より平滑筋を染色した。これにより、動脈と静脈を区別して捉えることが可能である。
その後、ScaleCUBIC-2 で屈折率調節を行った。全脳を背側から撮影した様子。Scale Bar
= 1000 μm .

(B) A. の黄色枠内の拡大画像。RITC のシグナルについて。最大値投影画像。Scale Bar = 100
 μm .

(C) B. の部位の血管をトレースしていたところ、貫入血管から海馬の血管につながる経路
を発見した。該当血管を示す。水色ほど脳表に近く、赤ほど深い。貫入血管から分岐し
た微小血管が横に伸び、海馬の血管に繋がっている。

(D) A. の黄色枠内の FITC (αSMA) のシグナルについての最大値投影画像。

(E) 発見した経路とのオーバーラップ画像。皮質の血管も海馬の血管も緑色のチャンネルで捉
えられたシグナルと重なっていることから、観察された血管は動脈-動脈の吻合である
ことが示唆される。

(F) 発見した経路を 3D で観察した際の画像。

【参考文献】

1. Andreone, B. J., Lacoste, B., and Gu, C. (2015). Neuronal and vascular interactions. *Annual review of neuroscience*, 38(March), 25–46. doi:10.1146/annurev-neuro-071714-033835
2. Becker, K., Jahrling, N., Saghafi, S., Weiler, R., and Dodt, H.U. (2012). Chemical clearing and dehydration of GFP expressing mouse brains. *PLoS One* 7, e33916.
3. Blinder, P., Shih, A. Y., Ra, C., & Kleinfeld, D. (2010). Topological basis for the robust distribution of blood to rodent neocortex. doi:10.1073/pnas.1007239107/-
/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1007239107
4. Blinder, P., Tsai, P. S., Kaufhold, J. P., Knutsen, P. M., Suhl, H., & Kleinfeld, D. (2013). The cortical angiome: an interconnected vascular network with noncolumnar patterns of blood flow. *Nature neuroscience*, 16(7), 889–97. doi:10.1038/nn.3426
5. Chen, F., Tillberg, P. W., and Boyden E. S., (2015) Expansion microscopy. *Science* 347:543–48
6. Chung, K., Wallace, J., Kim, S.Y., Kalyanasundaram, S., Andalman, A.S., Davidson, T.J., Mirzabekov, J.J., Zalocusky, K.A., Mattis, J., Denisin, A.K., Sally Pak, Hannah Bernstein, Charu Ramakrishnan, Logan Grosenick, Viviana Gradinaru, and Karl Deisseroth (2013). Structural and molecular interrogation of intact biological systems. *Nature* 497, 332–337.
7. Coyle P., (1976) Vascular patterns of the rat hippocampal formation., *Exp Neurol.*, 52(3):447-58.
8. de Belder, A.N. and Granath, K., (1973) Preparation and properties of fluorescein-labelled dextrans, *Carbohydrate Research*, 30(2), 375-378, [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)81824-8](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)81824-8)

9. Dodt, H.U., Leischner, U., Schierloh, A., Jahrling, N., Mauch, C.P., Deininger, K., Deussing, J.M., Eder, M., Zieglgansberger, W., and Becker, K. (2007). Ultramicroscopy: three-dimensional visualization of neuronal networks in the whole mouse brain. *Nat. Methods* 4, 331–336.
10. Eguchi, M. and Yamaguchi, S., (2009), In vivo and in vitro visualization of gene expression dynamics over extensive areas of the brain. *Neuroimage*. 44(4):1274-83. doi: 10.1016/j.neuroimage.2008.10.046.
11. Hama, H., Hioki, H., Namiki, K., Hoshida, T., Kurokawa, H., Ishidate, F., Kaneko, T., Akagi, T., Saito, T., Saido, T., Miyawaki, A., (2015). ScaleS: an optical clearing palette for biological imaging. *Nat. Neurosci.* 18, 1518–1529..
12. Hama, H., Kurokawa, H., Kawano, H., Ando, R., Shimogori, T., Noda, H., Fukami, K., Sakaue-Sawano, A., and Miyawaki, A. (2011). Scale: a chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain. *Nat. Neurosci.* 14, 1481–1488.
13. Johnsen, S., and Widder, E.A. (1999). The physical basis of transparency in biological tissue: ultrastructure and the minimization of light scattering. *J. Theor. Biol.* 199, 181–198.
14. Ke, M.T., Fujimoto, S., and Imai, T. (2013). SeeDB: a simple and morphologypreserving optical clearing agent for neuronal circuit reconstruction. *Nat. Neurosci.* 16, 1154–1161.
15. Kisanuki, Y.Y., Hammer, R.E., Miyazaki, J., Williams, S.C., Richardson, J.A., and Yanagisawa M., (2001), Tie2-Cre transgenic mice: a new model for endothelial cell-lineage analysis in vivo., *Dev Biol.*, 15;230(2):230-42.

16. Kubota, S.I., Takahashi, K., Nishida, J., Morishita, Y., Ehata, S., Tainaka, K., Miyazono, K., and Ueda, H.R., (2017), Whole-Body Profiling of Cancer Metastasis with Single-Cell Resolution., *Cell Reports*, 5;20(1):236-250. doi: 10.1016/j.celrep.2017.06.010.
17. Kurihara, D., Mizuta, Y., Sato, Y., and Higashiyama, T. (2015). ClearSee: a rapid optical clearing reagent for whole-plant fluorescence imaging. *Development* 142, 4168–4179.
18. Lacoste, B., Comin, C. H., Ben-Zvi, A., Kaeser, P. S., Xu, X., Costa, L. D. F., and Gu, C. (2014). Sensory-related neural activity regulates the structure of vascular networks in the cerebral cortex. *Neuron*, 83(5), 1117–30. doi:10.1016/j.neuron.2014.07.034
19. Macdonald, J.A., Murugesan, N., and Pachter, J.S., (2010) Endothelial cell heterogeneity of blood-brain barrier gene expression along the cerebral microvasculature *J Neurosci Res.* 88(7):1457-74. doi: 10.1002/jnr.22316.
20. Murray, E., Cho, J.H., Goodwin, D., Ku, T., Swaney, J., Kim, S.Y., Choi, H., Park, Y.G., Park, J.Y., Hubbert, A., McCue, M., Vassallo, S., Bakh, N., Frosch, M.P., Wedeen, V.J., Seung, H.S., and Chung, K., (2015). Simple, scalable proteomic imaging for highdimensional profiling of intact systems. *Cell* 163:1500–14
21. Pan, C., Cai, R., Quacquarelli, F.P., Ghasemigharagoz, A., Loubopoulos, A., Matryba, P., Plesnila, N., Dichgans, M., Hellal, F., and Ertürk, A., (2016), Shrinkage-mediated imaging of entire organs and organisms using uDISCO, *Nat Methods.* 13(10):859-67
22. Paxinos, G., (1994), *The Rat Nervous System*, 2nd ed, Academic Press
23. Renier, N., Wu, Z., Simon, D.J., Yang, J., Ariel, P., and Tessier-Lavigne, M. (2014). iDISCO: a simple, rapid method to immunolabel large tissue samples for volume imaging. *Cell* 159, 896–910.

24. Robertson, R.T., Levine, S.T., Haynes, S.M., Gutierrez, P., Baratta, J.L., Tan, Z., and Longmuir, K.J., (2015) Use of labeled tomato lectin for imaging vasculature structures. *Histochem Cell Biol.*; 143(2):225-34. doi: 10.1007/s00418-014-1301-3. Epub 2014 Dec 23.
25. Susaki, E.A., Tainaka, K., Perrin, D., Kishino, F., Tawara, T., Watanabe, T.M., Yokoyama, C., Onoe, H., Eguchi, M., Yamaguchi, S., Abe T, Kiyonari H, Shimizu Y, Miyawaki A, Yokota H, Ueda HR. (2014). Whole-brain imaging with single-cell resolution using chemical cocktails and computational analysis. *Cell* 157, 726–739
26. Tainaka, K., Kubota, S.I., Suyama, T.Q., Susaki, E.A., Perrin, D., Ukai-Tadenuma, M., Ukai, H., and Ueda, H.R. (2014). Whole-body imaging with singlecell resolution by tissue decolorization. *Cell* 159, 911–924
27. Treweek, J.B., Chan, K.Y., Flytzanis, N.C., Yang, B., Deverman, B.E., Greenbaum, A., Lignell, A., Xiao, C., Cai, L., Ladinsky, M.S., Bjorkman, P.J., Fowlkes, C.C., and Gradinaru, V., Whole-body tissue stabilization and selective extractions via tissue-hydrogel hybrids for high-resolution intact circuit mapping and phenotyping. (2015) *Nat Protoc.* 10(11):1860-96.
28. Tsai, P.S., Friedman, B., Ifarraguerri, A.I., Thompson, B.D., Lev-Ram, V., Schaffer, C.B., Xiong, Q., Tsien, R.Y., Squier, J.A., and Kleinfeld, D., (2003), All-optical histology using ultrashort laser pulses., *Neuron*, 3;39(1):27-41.
29. Tsai, P. S., Kaufhold, J. P., Blinder, P., Friedman, B., Drew, P. J., Karten, H. J., ... Kleinfeld, D. (2009). Correlations of neuronal and microvascular densities in murine cortex revealed by direct counting and colocalization of nuclei and vessels. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 29(46), 14553–70. doi:10.1523/JNEUROSCI.3287-09.2009

30. Tuchin, V.V. (2015). Tissue optics and photonics: light-tissue interaction. *J. Biomed. Photon. Eng.* 1, 98–134.
31. van Dijk-Wolthuis, W.N.E., Franssen, O., Talsma H., van Steenberghe, M.J., Kettenes-van den Bosch, J.J., and Hennink, W.E., (1995), Synthesis, Characterization, and Polymerization of Glycidyl Methacrylate, *Macromolecules*, 28 (18), pp 6317–6322 DOI: 10.1021/ma00122a044
32. Verli, F.D., Rossi-Schneider, T.R., Schneider, F.L., Yurgel, L.S., and de Souza, M.A., (2007), Vascular corrosion casting technique steps., *Scanning*, 29(3):128-32.
33. Wälchli, T., Mateos, J.M., Weinman, O., Babic, D., Regli, L., Hoerstrup, S.P., Gerhardt, H., Schwab, M.E., and Vogel, J., (2015) Quantitative assessment of angiogenesis, perfused blood vessels and endothelial tip cells in the postnatal mouse brain., *Nature Protocol.*, 10(1):53-74. doi: 10.1038/nprot.2015.002.
34. Whiteus, C., Freitas, C., and Grutzendler, J. (2014). Perturbed neural activity disrupts cerebral angiogenesis during a postnatal critical period. *Nature*, 505(7483), 407–11. doi:10.1038/nature12821
35. Xue, S., Gong, H., Jiang, T., Luo, W., Meng, Y., Liu, Q., Chen, S., and Li, A., (2014), Indian-ink perfusion based method for reconstructing continuous vascular networks in whole mouse brain, *PLOS ONE*, 30;9(1):e88067. doi: 10.1371/journal.pone.0088067
36. Yang, B., Treweek, J.B., Kulkarni, R.P., Deverman, B.E., Chen, C.K., Lubeck, E., Shah, S., Cai, L., and Gradinaru, V. (2014). Single-cell phenotyping within transparent intact tissue through whole-body clearing. *Cell* 158, 945–958.

【謝辞】

本研究を行うにあたり、好き放題挑戦できる環境を提供してくださり、私のデータをポジ、ネガ問わず私以上に面白がり、困難があれば私以上に悩んで解決策と一緒に考えてくださいました、東京大学大学院薬学系研究科薬品作用学教室 池谷裕二 教授に心よりお礼申し上げます。温かく丁寧に指導をして頂きながらも、一人の研究者として尊重して頂けたおかげで、研究をこれ以上ないほど楽しむことができました。先生の下で大学院生活を送れて私は本当に幸せでした。

本研究を行うにあたり、ライトシート顕微鏡を借用させていただきました東京大学大学院医学系研究科システムズ薬理学教室教授 上田泰己 教授に心よりお礼申し上げます。CUBIC の論文が無ければ、私は透明化に興味を持つことはありませんでしたし、この研究は存在し得ませんでした。また、路頭に迷った私を拾ってくださいましたこと、感謝してもしきれません。これからもよろしくお願いします。

本研究を行うにあたり、Arc-dVenus 遺伝子改変マウスの供与を賜りました岐阜大学大学院医学系研究科 高次神経形態学教室 山口瞬 教授に心よりお礼申し上げます。Arc-dVenus マウスは M2 の頃からの付き合いで、本研究とは違うことをやっていた時からずっと私を傍で支えてくれました。このマウスには本当に多くのことを学ばせていただきました。

研究室でのセミナーをはじめとし多くの場において、本研究に対する有益なご助言を賜りました東京大学大学院薬学系研究科薬品作用学教室 小山隆太 准教授に心よりお礼申し上げます。先生から滲み出てくる研究哲学は、要所要所で密かに私の軌道修正に役立っていました。

本研究を行うにあたり、技術的な相談に親身に乗っていただき、ライトシート顕微鏡の具

体的な使い方や、その後の画像処理に至るまで指導をして頂きました、東京大学大学院医学系研究科システムズ薬理学教室教授 洲崎悦生 講師に心よりお礼申し上げます。自分の結果に対して自信半分不安半分だった状況下で、分野のトップランナーに結果を評価して頂けたことは、大いに励みになりました。

研究室でのセミナーやリフレッシュルームでの飲み会をはじめとし多くの場において、本研究に対する有益なご助言を賜りました東京大学大学院薬学系研究科薬品作用学教室 佐々木拓哉 助教に心よりお礼申し上げます。研究のみならず、私生活の面においても親身にサポートして頂きました。某所での寝泊まりを黙認していただけたことは、私の研究を成就させるのに絶対に必要な要素でした。

実験室をはじめとし多くの場において、本研究に対する有益なご助言を賜りました同教室 中嶋藍 助教に心よりお礼申し上げます。先生がストイックに実験する姿は、つい隙あらば怠けようとしてしまう私を常に奮い立たせてくれました。

実験室をはじめとし多くの場において、本研究に対する有益なご助言を賜りました同教室 竹内春樹 薬学部研究員に心よりお礼申し上げます。考えた研究テーマに当たりが出ず、腐りそうになっていた自分を励ましてくださったこと、ヒヨッ子の自分に対しても一人の研究者として対等に向き合ってください、良い研究とは何か、良い研究者とは何かをディスカッションしてくださいましたこと、絶対に忘れません。

同教室 池谷先生グループにおいてお世話になりました卒業生の 乗本裕明、舟山健太 博士に心よりお礼申し上げます。先輩として、実験や解析手法のみならず、研究者としての心構えやデータとの向き合い方など、多くのことを教えていただきました。

博士課程をともに過ごし、同期として切磋琢磨し合った同教室 阿部麗実、石川智愛、笠原由佳 各氏に心より感謝いたします。こんなにも素晴らしい同期に巡り合えたことは、私にとってかけがえのない財産です。

同研究グループとして本研究をあらゆる面からサポートしていただき、また多くの助言を頂きました同教室 南澤玄樹、石川大介、宇治田早紀子、小林千晃、松本信圭、坂口哲也、浅田晶子、渡邊祐亮、岩寄論嗣、大内彩子、岡田真実、岡本和樹、上村成章、牧野健一、高木夕貴、高夢璇、野口朝子、八幡洋介、佐藤元重、佐藤由宇 各氏に心より感謝申し上げます。

日々のよきディスカッション相手として様々な気付きを与えてくださいました同教室 岡田桜 さんに心より感謝いたします。クリティカルなフィードバックや丁度良いタイミングでの励ましは、常に自分のベストな状態を引き出してくれるものでした。

研究生生活を送る中で、温かいご支援、ご協力をいただきました研究室内の先輩、後輩の皆様は心より感謝いたします。皆さまのおかげで、5年間充実した研究生生活を送ることができました。本当にありがとうございました。

進路の決定や日々の生活において、常に私の意思を尊重し、様々な面において惜しみなく支えてくれました、父、母、祖父、祖母、そして家族の皆に心よりお礼申し上げます。

何も持たない私が博士課程での研究を何とか形にできたのは、ひとえに皆さまのご協力を頂いたおかげです。最後に今一度、お力添えを頂きました全ての方へ深く感謝申し上げます。本論文の結びと致します。