

[別紙 2]

審査の結果の要旨

氏名 宮脇 健行

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は、脳の栄養供給様式を理解するための基礎となりうる。ただし、このような知見は細動脈/細静脈（直径 10-50 μm ）については豊富に存在するものの、微小血管（直径 2 μm 程度）の解像度では殆ど存在しない。これは、一般的な薄層切片では血管の結合関係を捉えられない一方で、3次元で血管を観察するための既存手法は、偽陰性率、SN 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。本研究は、上記の問題を克服する新規手法の開発を目的としている。

1. デキストラン骨格の蛍光架橋剤の合成とモノマー灌流後の重合開始による血管鑄造

まず、3次元で血管を観察するための既存手法の一つ、血管鑄造法の改良に取り組んだ。血管鑄造法は、重合途中の高分子ポリマーを心臓から流し込み、十分に固まった後に周りの組織を溶かすことによって血管系を可視化する。この方法は高い SN 比が特長だが、微小血管でポリマーが詰まってしまうため偽陰性率が高くなる。この欠点を克服するため、モノマーの状態でも血管から漏れ出さない色素を全血管に行きわたらせた後に重合を開始させることを狙った。そのために、蛍光架橋剤、RITC-Dex-GMA を新たに合成した。これは、血管から漏れ出さない大きさを持つ分子デキストランに、アクリルアミドとの重合に必要な官能基グリシジルメタクリレート（GMA）と赤色蛍光色素 RITC が付加された分子である。

そして、この蛍光架橋剤、共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 VA-044 の混合溶液を 4 $^{\circ}\text{C}$ で灌流後、標本の温度を 37 $^{\circ}\text{C}$ へ上昇させることで重合を開始した。実際に全ての血管が染色されているかを検証するため、標本の切片を血管内皮マーカー CD31 で免疫染色した。結果、本手法で鑄造されたポリマーは、微小血管も含めたほぼ全ての血管を染色することがわかった。また、ポリマーのシグナルは、一般的に全血管の染色に用いられる蛍光レクチンに比較して、有意に高い SN 比を持っていた。以上より、高い SN 比を持つという特長を残したまま、細い血管で詰まるという従来の欠点を克服した、新たな血管鑄造法を確立した。

2. デオキシコール酸ナトリウムによる組織透明化

次に、透明化手法の改良に取り組んだ。従来の透明化手法の一つ、CLARITY では、組織

のタンパク質と核酸を PFA、アクリルアミド、ビスアクリルアミドで強固に架橋した後、脂質を除いて標本の屈折率を均一にするために界面活性剤 SDS を処置していた。しかし、この条件では組織の透明化に6週間と長い時間を要していた。ビスアクリルアミドを抜いた比較的緩い条件での架橋ならば透明化は加速されたものの、この架橋条件で SDS による脱脂を行うと、標本は機械的強度を失い、顕著な膨潤を生じた。そして、組織の膨潤は、血管の鑄造に用いていたポリマーを限界以上に引き延ばすため、鑄造した血管が断裂してしまうという問題が生じてしまった。そのため、緩い架橋条件でも標本の膨潤が穏やかで、機械的強度を保ったまま透明化できる界面活性剤を探索した。

結果、胆汁酸塩の一種、デオキシコール酸ナトリウム (SDC) を用いれば上記の条件を満たす透明化が可能となった。SDC を用いた透明化でも若干の膨潤は見られたが、鑄造したポリマーの断裂は殆ど見られなかった。なお、SDC は脂質が豊富で透明になりづらい脳の白質をも10日間で透明にした。

3. 血管の3次元構造観察

次に、開発した血管鑄造法と透明化手法を組み合わせ、3Dでの血管観察を試みた。結果、通常の共焦点顕微鏡でも、少なくとも1000 μmもの深さまで明瞭に血管のシグナルを追うことが可能だった。更に、透明組織の深部イメージングに最適な光シート顕微鏡を用いたところ、全脳の血管が撮像できた。このことから、今回開発した手法を用いれば、脳血管を3Dで大規模に観察するための標本が簡便に作成できることが示された。

また、本手法では、血管から漏れ出る PFA とアクリルアミドによって標本中のアミンが架橋されるため、透明化後も血管周囲の核酸およびタンパク質が保存されていることが期待できる。これを検証するため、今回の手法で調製した標本に対して、核酸を染色する色素であるヨウ化プロピジウム (PI)、またはマイクログリアが発現するタンパク質 Iba1 に対する抗体染色を適用した。なお、PI は赤色蛍光を持つため、本実験の血管鑄造は緑色の蛍光を持つ FITC-Dex-GMA で行った。結果、どちらの染色条件でも血管周囲でシグナルが観察された。加えて、これらのシグナル強度は血管からの距離に依存せず一定であった。このことから、本手法で調製された標本は、単純な血管構造の観察だけに留まらず、それぞれの血管がどのような分子を発現しているのか、またどのような周囲環境で張り巡らされているのかといったことを調べることに適していることが示唆された。なお、一部の透明化手法は蛍光タンパク質を消光させることが知られている。そこで、活動した神経細胞が蛍光タンパク質 dVenus を発現する Arc-dVenus 遺伝子改変マウスに視覚刺激を与え、本手法で血管を染色・透明化した後、一次視覚皮質を観察した。結果、dVenus の蛍光は保存されており、その強度は血管からの距離に依存しなかった。このことから、今回開発した手法では消光も起こらないことが示された。

4. Semi-intact 脳の3D血管トレーシングによる未知の血管走行経路の発見

最後に、今回開発した手法を用いて **semi-intact** 脳の 3D 血管トレーシングを行った。結果、これまで独立しているか否か明らかでなかった皮質の血管系と海馬の血管系が、微小血管で連結していることがわかった。α平滑筋アクチンを抗体染色して動静脈を区別したところ、この血管は、皮質と海馬の細動脈を結合していることが明らかになった。このような動脈吻合は脳表の血管には存在することが既に知られており、一方の血管が梗塞した場合に、その血管が本来栄養供給を行っていた領域に別の血管から栄養供給を行うのに役立つことが示されている。よって、今回観察された血管も、そのような機能を担っている可能性が考えられる。

本研究では、血管の 3次元構造と周囲分子の観察を可能にするために、新規の血管鑄造法と透明化手法を開発した。そして、これらを組み合わせれば脳血管の大規模 3D 観察が周囲分子を保存したまま行えることを示し、その応用例としてこれまで知られていなかった皮質-海馬間の動脈吻合の存在を報告した。

本手法は、低偽陰性率、高 SN 比、周囲分子保存という優れた特性を持つにも関わらず、標本調製の所要時間は 10 日間と比較的短く、低コストで導入が可能である。これらの特徴より、今後本手法が脳血管網の繋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。よって本論文は博士（薬科学）の学位請求論文として合格と認められる。