

マウスを透明にして血管・リンパ管を3次元・高解像度で可視化 ——位相的データ解析による新たな脈管構造評価法の確立——

1. 発表者:

高橋 恵生 (東京大学大学院医学系研究科 病因・病理学専攻 分子病理学/東京大学
医学部 MD 研究者育成プログラム 助教(研究当時))

宮園 浩平 (東京大学大学院医学系研究科 病因・病理学専攻 応用病理学 卓越教授)

島村 徹平 (名古屋大学大学院医学系研究科 先端応用医学 システム生物学 教授)

2. 発表のポイント:

- ◆組織透明化手法 CUBIC によりマウス血管・リンパ管を臓器のまま3次元かつ高解像度で可視化することに成功しました。
- ◆位相的データ解析と呼ばれる数理学的手法を取り入れ、臓器レベルでの3次元の脈管構造を総合的に評価する系を立ち上げました。
- ◆本手法は新たな脈管構造解析のパイプラインとして、今後広く活用されることが期待されます。

3. 発表概要:

近年、血管やリンパ管など脈管構造の解析に3次元画像が用いられることが増えています。しかしながら、1細胞レベルの詳細な解析には未だ免疫組織学的手法を用いた2次元の画像解析が一般的です。また、取得された画像の評価には脈管の分岐点や長さ、幅といったパラメータが利用されており、脈管構造を「形」から総合的に評価する手法はこれまで確立されていませんでした。今回、東京大学大学院医学系研究科の宮園浩平卓越教授、高橋恵生助教(研究当時)らの研究グループは同研究科並びに理化学研究所の上田泰己教授との共同研究により組織透明化手法 CUBIC によりマウスのさまざまな臓器を透明化し、血管・リンパ管を臓器のまま3次元かつ高解像度にて可視化することに成功しました。さらに、名古屋大学大学院医学系研究科の島村徹平教授らのグループとの共同研究により、それら取得した画像を位相的データ解析などの数理学的手法を取り入れて解析することで、3次元の脈管の構造を総合的に評価する方法を新たに確立しました。また、本研究ではこれら新たな脈管構造評価法を用いて、マウス肺線維症モデルやがんの肺転移モデルなどの病態モデルでリンパ管の構造が変化することを数理的に示しました。本手法はこれまでのように脈管の分岐点や長さといったある特定のパラメータに依存するのではなく、データの「形」から全体の構造の違いを推測できます。そのため、これまでは見逃していた脈管構造の違いをも捉えることも可能となります。今後、本手法は新たな脈管構造解析のパイプラインとして広く活用されることが期待されます。

本研究は日本学術振興会 (JSPS) 科学研究費助成事業、文部科学省 科学研究費補助金新学術領域研究「細胞社会ダイバーシティの統合的解明と制御」、国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED) などの支援を受けて行われました。本研究成果は「Nature Communications」オンライン版に掲載されました。

4. 発表内容:

<研究の背景>

組織透明化(注1)は神経科学分野で広く用いられてきた手法ですが、近年がん研究でも応用されるようになってきました。東京大学大学院医学系研究科の宮園浩平卓越教授、高橋恵生助教(研究当時)、久保田晋平研究員(研究当時)のグループは同研究科ならびに理化学研究所の上田泰己教授のグループとともに組織透明化手法 CUBIC(注2)を用いてマウスの個体・臓器のまま、がん転移を3次元かつ1細胞レベルで観察できることを2017年に報告しました。がん転移のメカニズム解析にはがん細胞のみでなく、がん細胞を取り囲む「がん微小環境」の理解も重要となってきます。がん微小環境にはがん細胞に加え、免疫細胞や脈管をはじめとするさまざまな細胞が存在し、それらが複雑に相互作用しています。このような微小環境に存在する多種多様な細胞の中でも、脈管構造の可視化には3次元かつ高解像度の画像取得ができる CUBIC の利点を活かせるのではないかと考えました。

近年、コンピュータ断層撮影(CT)や核磁気共鳴画像法(MRI)といったさまざまなイメージング手法により、血管やリンパ管を3次元で捉えられるようになってきました。しかしながら、1細胞レベルの詳細な解析には2次元画像による免疫組織学的手法を用いることが多いのが現状です。また、それら画像の解析には脈管の分岐点や長さなど、特定のパラメータが評価基準として活用されています。3次元画像の解析でも同様のパラメータが用いられており、「形」に着目した臓器ごとの脈管構造の総合的な評価法は未だ十分に確立されていませんでした。そこで新たな評価法としてパーシステントホモロジーに着目しました。パーシステントホモロジーは位相的データ解析の代表的な手法でデータ点の位相的特徴を抽出することが可能です。

本研究グループではマウスの血管、リンパ管を組織透明化手法 CUBIC により3次元かつ高解像度で可視化、およびパーシステントホモロジーによる新たな脈管構造評価法の樹立を試みました。

<研究手法と成果>

組織透明化手法 CUBIC により、マウスのさまざまな臓器を高度に透明化した後、ライトシート顕微鏡(注3)によって撮影することで1細胞レベルの解像度を有して3次元の観察が可能となります(図1)。本研究では抗体による免疫組織染色法に加え、VE カドヘリン(注4)陽性の血管内皮細胞特異的に赤色蛍光タンパク質 tdTomato を発現するマウス(VE カドヘリン-tTomato マウス)、リンパ管内皮細胞に発現する転写因子 Prox1(注5)プロモータ下流に緑

色蛍光タンパク質 GFP を発現するマウス (Prox1-GFP マウス) を用いました。これら遺伝子組み換えマウスと CUBIC を組み合わせることで、さまざまな臓器での血管やリンパ管を3次元かつ高解像度に観察することに成功しました (図2a)。自家蛍光の高い画像やシグナルが弱い画像であっても、目的とするシグナルを抽出することができるように機械学習を取り入れ、脈管と考えられるシグナルを抽出しました (図1、2b)。次に、これら観察された画像から脈管の「形」の違いを解析するために、位相的データ解析 (注6) の1つであるパーシステントホモロジーにより評価しました (図3a)。脳血管をパーシステントホモロジーにて評価したところ、脳領域の中でも特に大脳新皮質の血管構造が特徴的であることが示されました (図3b)。また、パーシステントホモロジーに加え、非定常ポアソン過程 (NHPP) (注7) により脳血管の広がり、方向性の評価も行えることを示しました。

次にパーシステントホモロジーを病態モデルにも応用しました。ブレオマイシンによる肺線維症 (注8) モデルではリンパ管が損傷し、対照群や生理食塩水投与群とは大きく異なるリンパ管構造を示すことがわかりました (図4a)。これらの構造の違いはパーシステントホモロジーで明らかに区別されました (図4b)。また、マウス黒色腫細胞 B16F10 の尾静脈注射による肺転移モデルでのがん転移とリンパ管の CUBIC による可視化も行いました (図5a)。がん転移とリンパ管の3次元の距離を解析し、がん細胞移植から10日後ではリンパ管が多くの転移したがん細胞と接するようになっていることがわかりました (図5b)。さらにパーシステントホモロジーによりがん転移後の肺のリンパ管を解析したところ、転移したがん細胞とリンパ管が接するよう見える数日前に一時的に構造が変化している可能性が示唆されました (図5c)。

これらの脈管解析の新たなパイプラインは今後さまざまな病態モデルでの活用が期待されます。

5. 発表雑誌:

雑誌名: 「Nature Communications」 2022 年 9 月 12 日

論文タイトル: An analysis modality for vascular structures combining tissue-clearing technology and topological data analysis

著者: Kei Takahashi, Ko Abe*, Shimpei I. Kubota*, Noriaki Fukatsu*, Yasuyuki Morishita, Yasuhiro Yoshimatsu, Satoshi Hirakawa, Yoshiaki Kubota, Tetsuro Watabe, Shogo Ehata, Hiroki R. Ueda, Teppei Shimamura#, Kohei Miyazono# (#責任著者、*第2著者)

DOI 番号: 10.1038/s41467-022-32848-2

アブストラクト URL: <https://www.nature.com/articles/s41467-022-32848-2>

6. 問い合わせ先:

<研究に関すること>

東京大学大学院医学系研究科 病因・病理学専攻 応用病理学 卓越教授
宮園 浩平 (みやその こうへい)

〒113-0033 東京都文京区本郷7-3-1

TEL: 03-5841-1817

FAX: 03-5841-3354

E-mail: miyazono@m.u-tokyo.ac.jp

名古屋大学大学院医学系研究科 システム生物学 教授

島村 徹平 (しまむら てっぺい)

〒466-8550 愛知県名古屋市昭和区鶴舞町65

TEL: 052-744-1980

FAX: 052-744-2029

E-mail: shimamura@med.nagoya-u.ac.jp

<広報に関すること>

東京大学医学部・医学系研究科 総務チーム

〒113-0033 東京都文京区本郷7-3-1

TEL: 03-5841-3304

FAX: 03-5841-8585

E-mail: ishomu@m.u-tokyo.ac.jp

名古屋大学医学部・医学系研究科 総務課総務係

〒466-8560 愛知県名古屋市昭和区鶴舞町65

TEL: 052-744-2804

FAX: 052-744-2785

E-mail: iga-sous@adm.nagoya-u.ac.jp

7. 用語解説

(注1)組織透明化

生体内にはさまざまな屈折率の異なる物質が存在し、光の散乱・吸収が起こる。生体内の脂質や水、色素を除去・置換し光の散乱・吸収を調整することで、マウスをはじめとした動物の組織を透明にすることが実現される。

(注2)CUBIC

Clear, unobstructed brain/body imaging cocktails and computational analysis の略。理化学研究所の上田泰己博士らのグループにより、理化学研究所の宮脇敦史博士らのグループによって開発された透明化手法 *Scale* をもとに 2014 年に開発された手法である。2018 年には同研究グループから 1600 種類以上の化合物スクリーニングが行われ、さらに発展した CUBIC 試

葉が報告された。

(注3)ライトシート顕微鏡

サンプルの左右から、シート状のレーザーを照射し、サンプル上部のレンズにてシグナルを検出する。組織透明化にて汎用される顕微鏡で、光学セクションングにより3次元画像の取得を可能とする。

(注4)VE カドヘリン

血管内皮細胞特異的に発現する接着分子であり、血管の透過性や機能を制御している。

(注5)Prox1

リンパ管の発達に重要な役割を果たしている転写因子。リンパ管内皮細胞に発現している。

(注6) 位相的データ解析

位相的データ解析はトポロジー解析とも呼ばれ、広義にデータに含まれる幾何構造情報を基に解析する数理学的手法のことを指す。本研究で使用しているパーシステントホモロジーはその一手法であり、データ点を中心とした円を考え、その半径を変化させ、それら円をつなげて新たに発生する穴の発生と消失を新たなパラメータとして評価する方法である(図3a)。これらの発生と消失のパラメータにより位相的特徴を抽出することが可能となる。

(注7) 非定常ポアソン過程(NHPP)

Non-homogeneous Poisson process の略。点の強度関数によって特徴づけられる手法であり、本研究ではシグナル密度により脈管の広がり、方向性を評価した。

(注8) 肺線維症

強い炎症により肺の線維化が進む病気。マウスでは抗がん性抗生物質ブレオマイシンの吸入により誘導されるモデルが使用される。

8. 添付資料

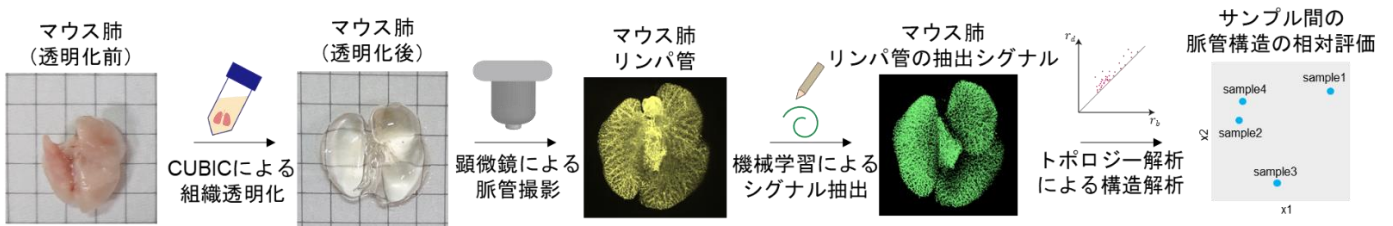


図1. 組織透明化から数理学解析までの流れ

マウス肺の画像を示す。CUBIC 試薬によりマウス肺を透明にし、ライトシート顕微鏡により脈管の画像を取得する。その後、機械学習により脈管と思われるシグナルを抽出する。それら抽出したシグナルを数理学的手法により解析し、サンプル間もしくは領域間の構造の違いを「形」から評価する。

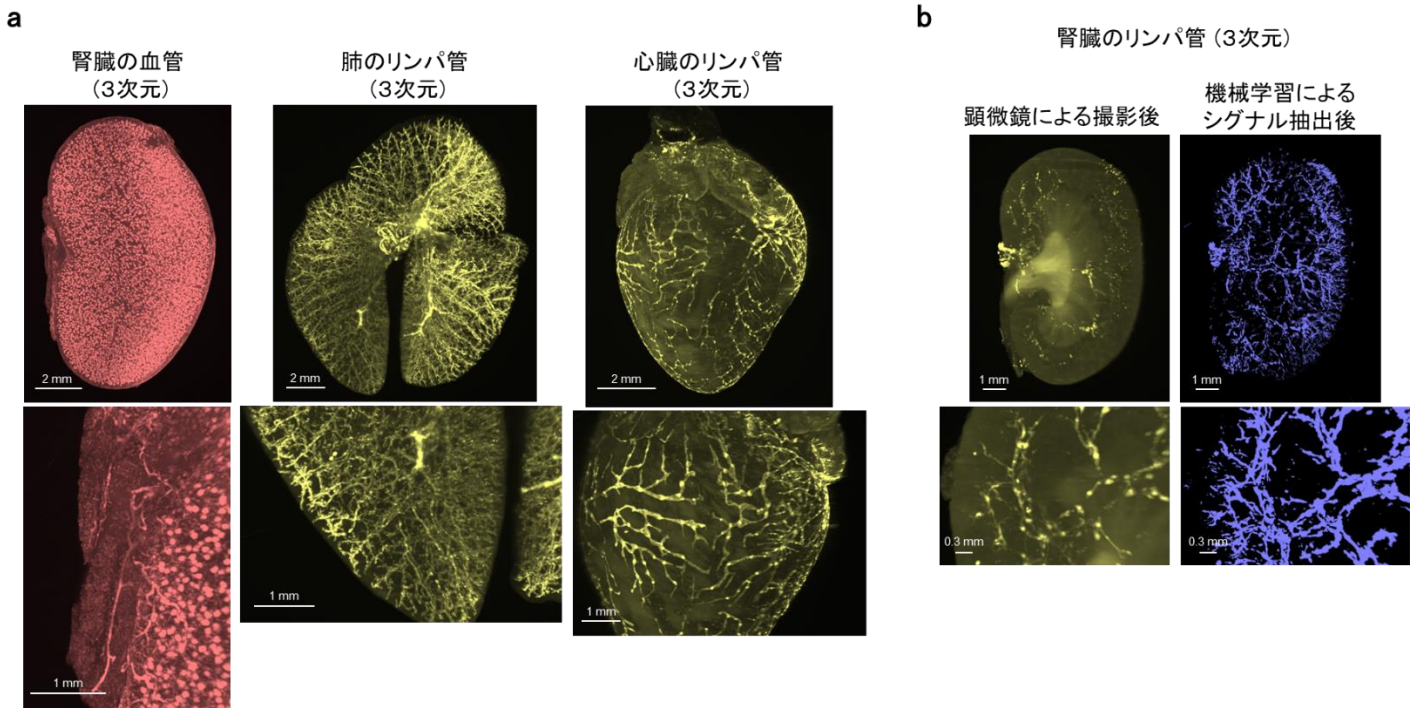


図2. マウス臓器の脈管の可視化および機械学習によるシグナル抽出

- a. VE カドヘリン-tdTomato マウスの腎臓の血管、Prox1-GFP マウスの肺および心臓のリンパ管の3次元画像を示す。下段は拡大図である。
- b. Prox1-GFP マウスの腎臓のリンパ管の画像を示す。左はライトシート顕微鏡により撮影した画像、右は機械学習によりシグナルを抽出した後の画像を示す。下段は拡大図である。

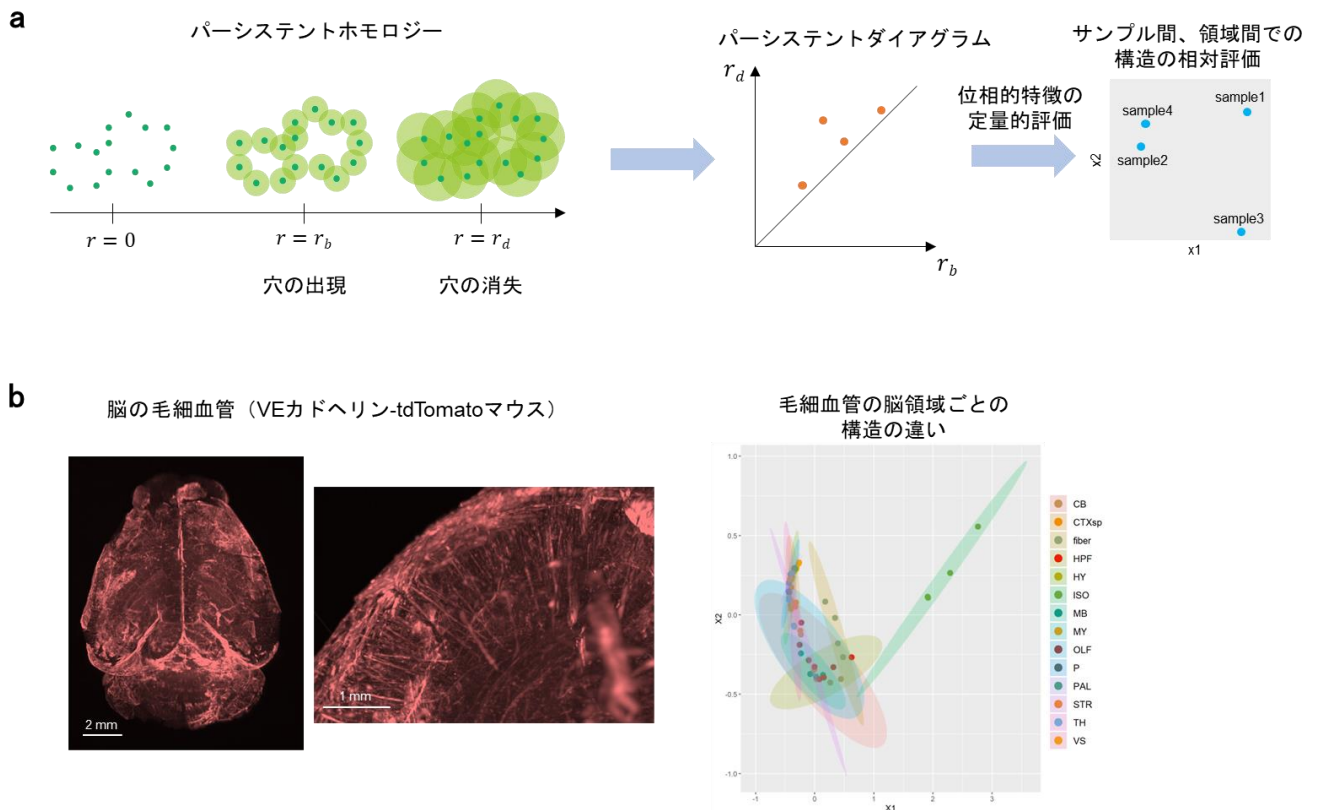


図3. パーシステントホモロジーによる脳領域ごとの血管構造評価

a. 位相的データ解析の1つであるパーシステントホモロジーの概念。データ点を中心とした半径 r の円を考え、その半径 r を変化させ、それら円をつなげて新たに発生する穴の発生と消失する際の半径 (r_b と r_d) をパラメータとし、パーシステントダイアグラムを作成する。次にこれらの特徴量を定量的に計算し、サンプル間の相対的な構造の関係性や類似性を多次元尺度法 (multidimensional scaling; MDS) により2次元上の点と点の距離に置き換えて示す。

b. VE カドヘリン-tdTomato マウスの脳の毛細血管の図。これら画像の抽出シグナルをパーシステントホモロジーにより脳領域ごとの構造評価を行った。右にその結果を示す。各脳領域は以下の通りである (CB: 小脳、CTXsp: 皮質サブプレート、fiber: 線維路、HPF: 海馬体、HY: 視床下部、ISO: 大脳新皮質、MB: 中脳、MY: 延髄、OLF: 嗅覚野、P: 橋、PAL: 淡蒼球、STR: 線条体、TH: 視床、and VS: 脳室)。大脳新皮質のパターンが他の脳領域と大きく異なることがわかる。

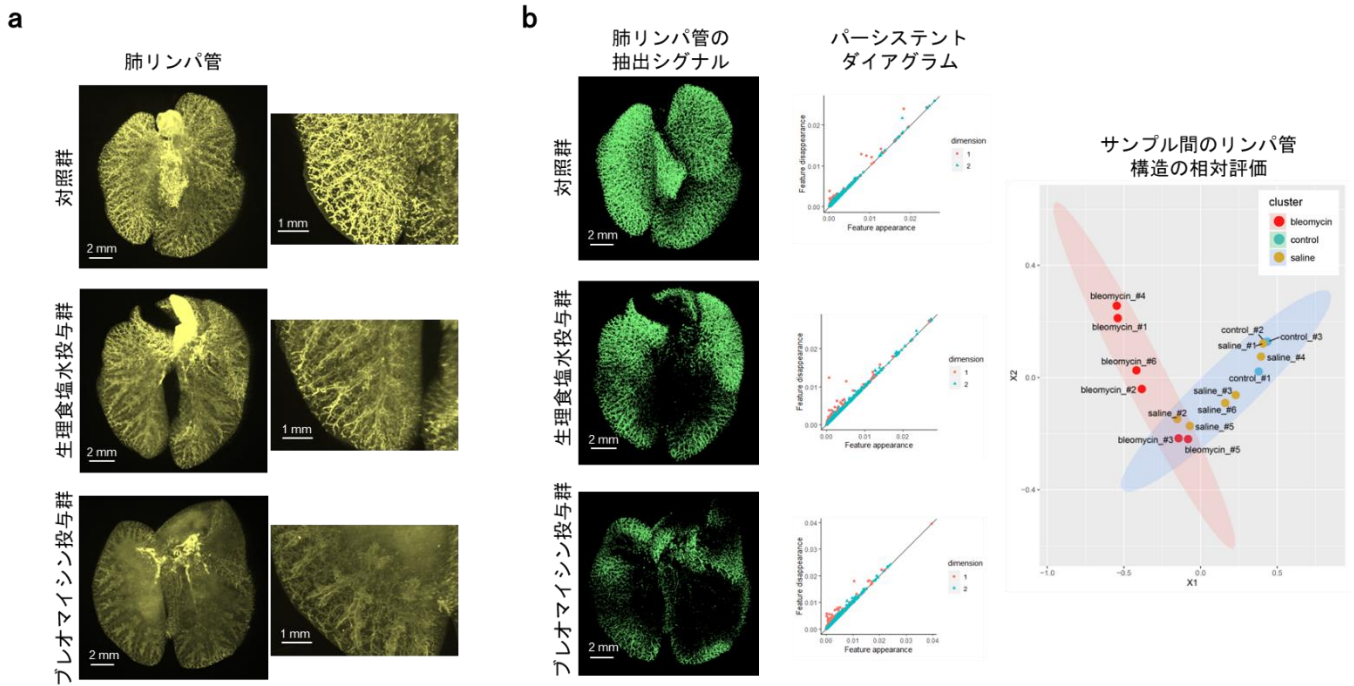


図4. 肺線維症モデルでのリンパ管構造の変化

ブレオマイシン投与により肺線維症を誘導した Prox1-GFP マウスでのリンパ管構造の観察を行った。

a. 対照群、生理食塩水投与群、ブレオマイシン投与群の肺リンパ管の様子。右には拡大図を示す。

b. a の画像から機械学習によりシグナルを抽出した画像を左に示す。さらにそれらをパーシステントホモロジーにより解析した結果(パーシステントダイアグラム、サンプル間での構造の相対評価)を中央、左に示す。対照群(control)、生理食塩水投与群(saline)に比べて、ブレオマイシン投与群(bleomycin)の脈管構造パターンが大きく異なることがわかる。

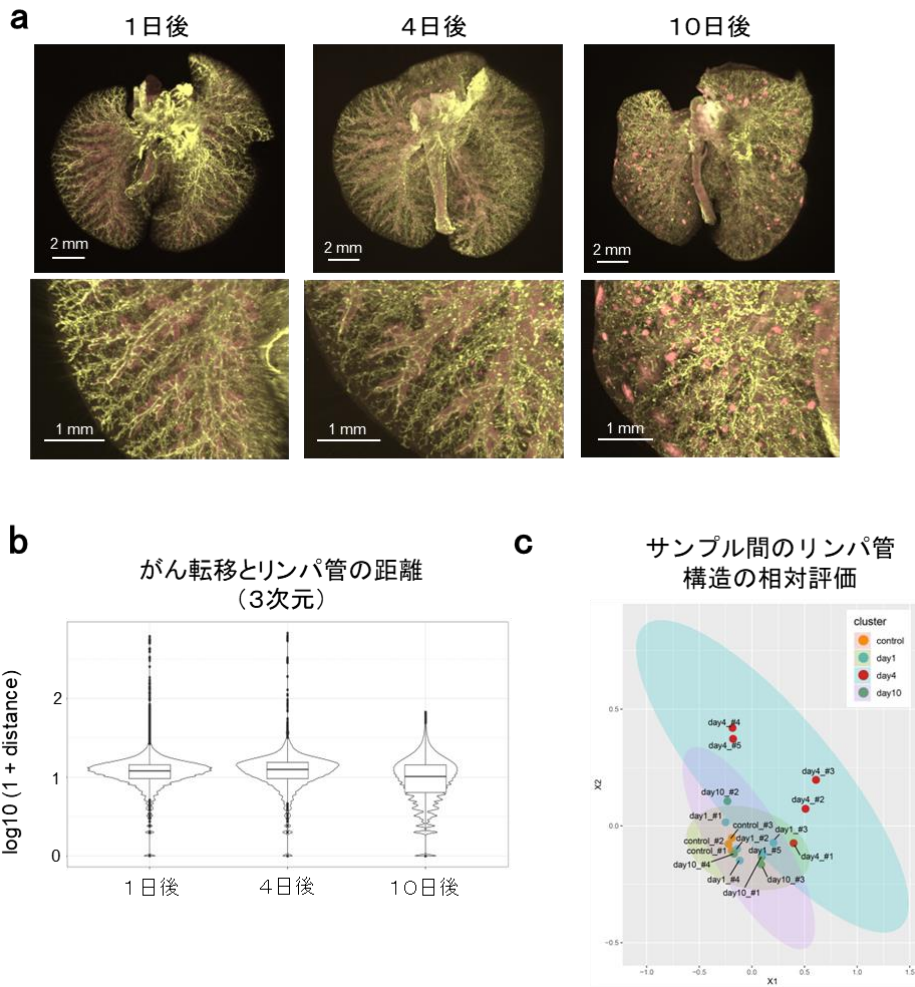


図5. 肺転移モデルでのがん転移およびリンパ管の可視化

赤色タンパク質 mCherry が発現したマウス黒色腫細胞 B16F10 を Prox1-GFP マウスの尾静脈から注射し、肺転移を誘導した。

a. B16F10 細胞の移植から1日後、4日後、10日後の肺リンパ管(黄色)および B16F10 の転移(赤色)を示す。下段は拡大図である。

b. B16F10 細胞のがん転移とリンパ管との距離を3次元で測定した結果を示す。

c. B16F10 細胞の移植から1日後(day1)、4日後(day4)、10日後(day10)および対照群(control)の肺リンパ管についてパーシステントホモロジーで解析した結果を示す。移植から4日後、すなわちがん細胞とリンパ管の距離が近くなる数日前に、肺リンパ管のパターンの変化が起こることを示唆している。