HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	新規透明化法を用いたマウス脳における新生ニューロンの分布に関する研究［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	青柳, 佑佳
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(情報科学)
Dissertation Number	甲第13518号
Issue Date	2019-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/74207
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Yuka_Aoyagi_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称　博士（情報科学）　氏名　青柳佑佳

学 位 論 文 題 名

新規透明化法を用いたマウス脳における新生ニューロンの分布に関する研究

（Study on distribution of immature neurons in mouse brain using novel optical clearing protocol）

ヒトを含む哺乳類の脳において、生後も脳室下帯と海馬歯状回の 2 か所の領域で神経幹細胞から分化した未成熟なニューロン (以下、新生ニューロン) は新しく生まれ続ける。特に脳室下帯で産生された新生ニューロンは、rostral migratory stream (以下、RMS) と呼ばれる長い経路を通って嗅球まで移動し、既存の回路に組み込まれる。脳室下帯由来の新生ニューロンの詳細を記述するためには、新生ニューロンの移動経路である RMS を含む広範囲を 3 次元的かつ高精細に観察する必要がある。しかし、従来は観察標本として薄くスライスした脳標本を使用していたため、RMS の全体像を 3 次元的に捉えることは困難であった。

一方で近年、複雑な神経回路構造の包括的な理解に向けて、神経回路を単一細胞レベルで 3 次元的に捉えるための様々な顕微鏡観察技術の開発が急速に進んでいる。例えば、低い侵襲性と優れた深部到達性を有する 2 光子励起顕微鏡法は、様々な生体組織の深部をイメージングするために使用されている。また、ホルムアルデヒド溶液等で化学固定した脳組織を透明にする手法も非常に注目されている。国内外において複数の透明化手法が提案されているものの、各々の手法には、処理に要する時間や手順の複雑さ等の面において一長一短が存在する。

本論文では、広範囲に渡りマウスの脳内の神経細胞を 3 次元的かつ高精細に観察するための新たな手法を確立し、その手法を新生ニューロンの観察に応用することを目指した。まず、厚い標本の深部における神経細胞を 3 次元的に観察する手法を確立するため、透明化試薬の候補としてグリコール誘導体の一つである 2,2’- thiodiethanol (以下、TDE) に着目した。TDE は水と任意の割合で混ざることができ、TDE の濃度依存的に溶液の屈折率は変化する。そこで、脳組織に対する TDE の濃度効果を検討するため、異なる濃度の TDE 溶液 (30% TDE、60% TDE、97% TDE) を調整した。ホルムアルデヒド溶液で化学固定した脳標本を、各種 TDE 溶液に浸漬したところ、厚い標本全体が迅速に透明になった。そこで、分光光度計を用いて各標本の透過率を計測した結果、TDE の濃度依存的に標本の透過率が上昇することを明らかにした。次に、一部の神経細胞に蛍光タンパク質 EYFP を発現するマウスの脳を用いて、蛍光顕微鏡観察における深部到達性の変化を調べた。共焦点レーザー顕微鏡や 2 光子励起顕微鏡を用いて各種 TDE 溶液浸漬後の固定脳スライス標本を観察したところ、97% TDE に浸漬した場合は、観察した全ての深さにおいて蛍光シグナルをほとんど取得することができなかった。これに対し、30% TDE および 60% TDE に浸漬した場合は、高い蛍光シグナルを取得することができ、また深部到達性も向上していた。さらに、60% TDE に浸漬した全脳を 2 光子励起顕微鏡により観察したところ、脳の表面から深さ 2 mm に渡る全ての深さにおいて、単一の細胞レベルで神経細胞を観察することに成功した。これらのことから、蛍光タン

パク質で標識した特定の細胞を 3 次元的かつ高精細に観察する目的において、TDE 溶液を用いた透明化手法は非常に有用であると考える。

さらに本論文では、TDE 溶液を用いた透明化手法を新生ニューロンの観察に応用することで、脳内における新生ニューロンの分布や形態を 3 次元的に可視化および解析することも行った。特に、本研究では若齢マウスにおける RMS 周囲の EGFP 陽性細胞に着目して研究を実施した。まず、新生ニューロンに蛍光タンパク質 EGFP を発現するマウスから固定脳ブロック標本を作製し、TDE 溶液に浸漬することで透明にした。そして、2 光子励起顕微鏡により観察し、取得した画像を結合したところ、脳室下帯から嗅球に至るまでの RMS の全体を 3 次元再構築することに成功した。次に、取得した大規模画像を用いて、RMS 周囲における EGFP 陽性細胞の分布を定量的かつ網羅的に解析することを目指した。RMS の周囲には非常に多くの EGFP 陽性細胞が存在するため、それらを自動で解析する必要がある。そこで、個々の EGFP 陽性細胞の位置や形態を自動で検出するための画像解析手法を確立した。EGFP 陽性細胞の分布を俯瞰的に調べた結果、EGFP 陽性細胞は RMS の周囲に偏って存在していることが明らかになった。最後に、RMS 周囲における EGFP 陽性細胞がどこに向かって移動しているのかを調べるために、個々の細胞の移動方向を推測した。新生ニューロンは先導突起の方向に移動すると考えられていることから、EGFP 陽性細胞の細胞体から見た先導突起の方向を計測した。その結果、RMS 周囲における EGFP 陽性細胞は様々な方向に先導突起を伸ばしており、先導突起の方向を示す分布は領域依存的に変化していることが明らかになった。これらの結果より、RMS 周囲には多数の EGFP 陽性細胞が偏在することが明らかになり、それらは様々な方向に移動していることが示唆された。

本研究で確立した観察手法は、簡便かつ迅速に脳組織を透明にする点で非常に優れた手法と考える。さらに、TDE 溶液に浸漬することで脳以外の臓器や植物も透明になることに加え、透明化手法と免疫組織化学的染色法を組み合わせた観察も可能であることが報告されている。よって、TDE 溶液を用いた透明化手法を蛍光顕微鏡観察に用いることで、神経科学を含む様々な領域において、多くの研究成果を効率良く生み出せるようになると期待する。一方で、本研究では、RMS の周囲に EGFP 陽性細胞が偏在していることを明らかにし、それらは様々な方向に移動している可能性を見いだした。今後は、RMS 周囲における EGFP 陽性細胞の実際の動きを捉えるために、生きたマウスの RMS 周囲を経時的に観察できる顕微鏡技術を確立したいと考える。また、本研究で確立した EGFP 陽性細胞の観察手法および画像解析手法を傷害モデルマウス等に応用することで、新生ニューロンを用いた神経細胞の再生に向けた研究にも貢献できると考える。