

生体組織の新規透明化技術

住友化学株式会社

バイオサイエンス研究所

成 相 哲 朗*

谷 川 潤

市 原 準 二**

川 村 哲 也

宝 来 真 志

大阪府立大学***

大学院工学研究科応用化学分野

児 島 千 恵



はじめに

がんの診断等で行われる病理診断は、厚さ3-4マイクロメートル程度の薄切標本を組織から切り出して顕微鏡で二次元的に観察することにより行われている。しかし、切り出した薄切標本部分に微小ながん組織が含まれず、がんを見落とすリスクがあること、多様な細胞や結合組織が不均一に混在する病変部位の全体像を捉えるのは困難であることなどから、薄切標本の二次元的な観察のみによる病理診断では不十分である。組織全体の三次元的な観察は、数百枚の二次元観察画像を取得し、各画像をコンピューター上で再構成することで可能ではあるが、多大な労力と時間が必要となり病理診断への適用は困難である。

近年、生体組織を透明化する技術が開発され、組織全体の三次元的な観察が可能になりつつある。透明化が比較的容易な小動物の脳組織では、神経や血管のネットワークを、蛍光標識された抗体染色法により可視化した例が報告されている。しかし、不均一な細胞や結合組織が密集する組織（がん組織など）の透明化は既存の技術では困難とされている。

そこで、既存技術による透明化が困難ながん組織を効率良く透明化する手法を検討し、高分子ゲルを用いた新規組織透明化法^{1), 2)}を開発したので紹介する。

この技術をがん診断に展開することで、微小がんの見落とし防止、がんの個別化医療等を可能にする高精度ながん病理診断法の開発につながると考えられる。特に、高額ながん免疫チェックポイント阻害薬^{*1}の効果を事前に予測する診断技術として有用であることが期待される (Fig. 1)。

既存の組織透明化技術

一般に、生体組織は主にタンパク質、脂質、核酸、水などで構成されている。これらはそれぞれ屈折率が異なるため、生体組織内では光の散乱などにより光が透過せず、組織内部を観察することは困難である。そこで、生体組織全体の屈折率をその主要構成成分であるタンパク質のものに近づけ、組織内での光の散乱を抑制し透明化する技術が報告されている³⁾。

組織透明化手法の一つであるCLARITY法では、組織中のタンパク質をポリアクリルアミドゲルに固定化した状態で電気泳動することで、光散乱および屈折率不均一の主因である脂質を能動的に除去する。その後、組織内の成分をタンパク質の屈折率に近いものに置換することにより組織を透明化する⁴⁾。しかしこの方法では、電気泳動による組織破壊が起りやすいこと、透明化の度合いが十分ではないこと、操作が煩雑

* 現所属：技術・研究企画部

** 現所属：一般財団法人 バイオインダストリー協会

*** 現在は大阪公立大学

*1 免疫チェックポイント阻害薬：がん細胞は免疫系からの攻撃を回避し増殖するために免疫チェックポイント分子を利用している。この免疫チェックポイント分子を阻害し自身の免疫細胞によってがん細胞を攻撃する薬剤としてオプジーボ、キイトルーダなどが開発されている。

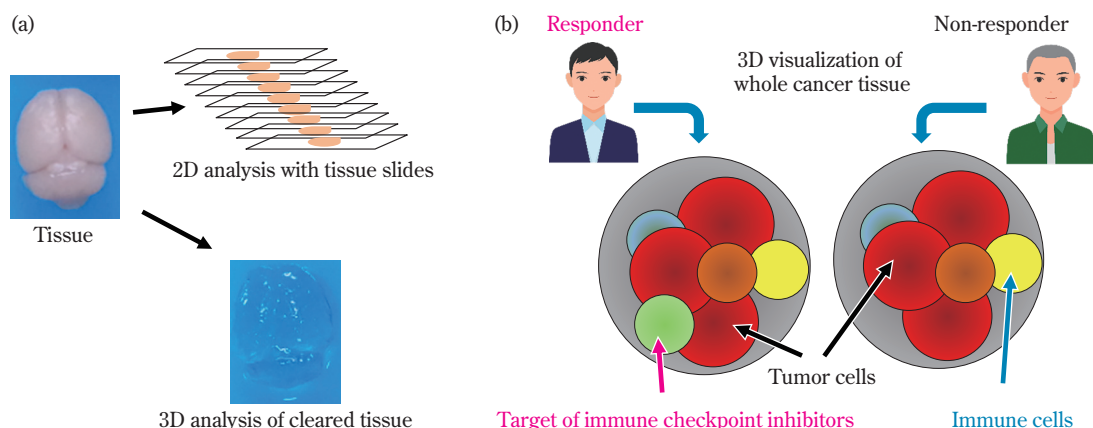


Fig. 1 Cancer diagnosis using tissue clearing technology
 (a) Comparison of tissue specimens and clearing
 (b) Selection of responders to immune checkpoint inhibitors

で再現性が乏しいなどの課題がある。また、組織破壊を低減する目的で電気泳動の代わりに、振盪により受動的に脂質を除去する方法も開発されているが、透明化に2-3週間を要することが課題となっている⁵⁾。また、イオン性解離基を有する水溶性エチレン性不飽和モノマーからヒドロゲルを形成することで透明化に要する時間を短縮する方法も開発されているが、透明化の度合いは必ずしも十分ではない⁶⁾。

新規組織透明化法の検討

既存の組織透明化技術の課題を解決する目的で、高分子ゲルを用いた新規透明化技術を検討した。検討には多くの組織が必要になるため、正常マウスの脳サンプルおよびヒトのがん細胞をマウスに移植して作製した、担がんマウス由来がん組織を使用した。従来のアクリルアミド (AAm) および種々のモノマーを生体組織内に浸透、重合させ振盪による透明化を検討した結果、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン (MPC) を用いることで透明化が促進されることが分かった。MPCは同一分子内にアニオン基とカチオン基を有する双性イオンモノマーである。これが組織内で重合することで組織内部の浸透圧が高まり、疎水性の脂質分子の除去が加速されるものと考えられる (Fig. 2)。

Fig. 3(a)にAAm、およびMPCを用いてマウスの脳組織を透明化した例を示す。既存のAAmと比較してMPCを用いた組織は高い透明度を示すことが分かった。さらに、担がんマウス由来のヒトがん組織でも同様の検討を行った。1日で透明化が進行したマウス脳

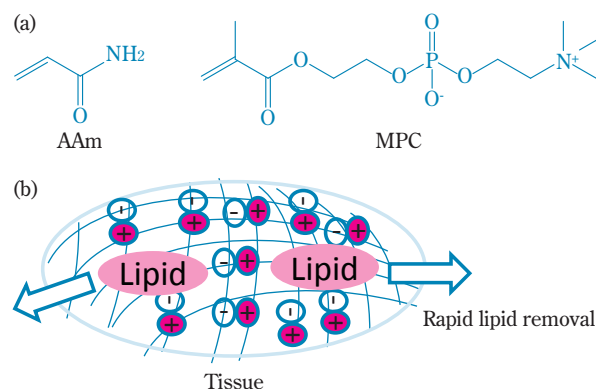


Fig. 2 Optical tissue clearing using MPC hydrogel
 (a) Chemical structures of monomers
 (b) Schematic illustration of lipid removal process

組織よりも長時間 (7日) を要するものの、MPCによる透明化促進作用が確認された (Fig. 3(b))。

電気泳動による透明化促進の検討

がんの病理診断の臨床応用を見据えた際、透明化にかかる時間の短縮は非常に重要である。そこで、電気泳動を行うことにより透明度の向上および所要時間の短縮が可能か検討した。マウスの脳組織にMPCを浸透、重合させた後に専用セル内で電気泳動を行った所、わずか4時間で組織が透明になること、組織にダメージは無いことが分かった (Fig. 4(a))。さらに担がんマウス由来のヒトがん組織でも同様の検討を行い、透明化に要する期間が7日から2日に短縮されること、MPCはAAmよりも高い透明化能を有することが分かった (Fig. 4(b))。

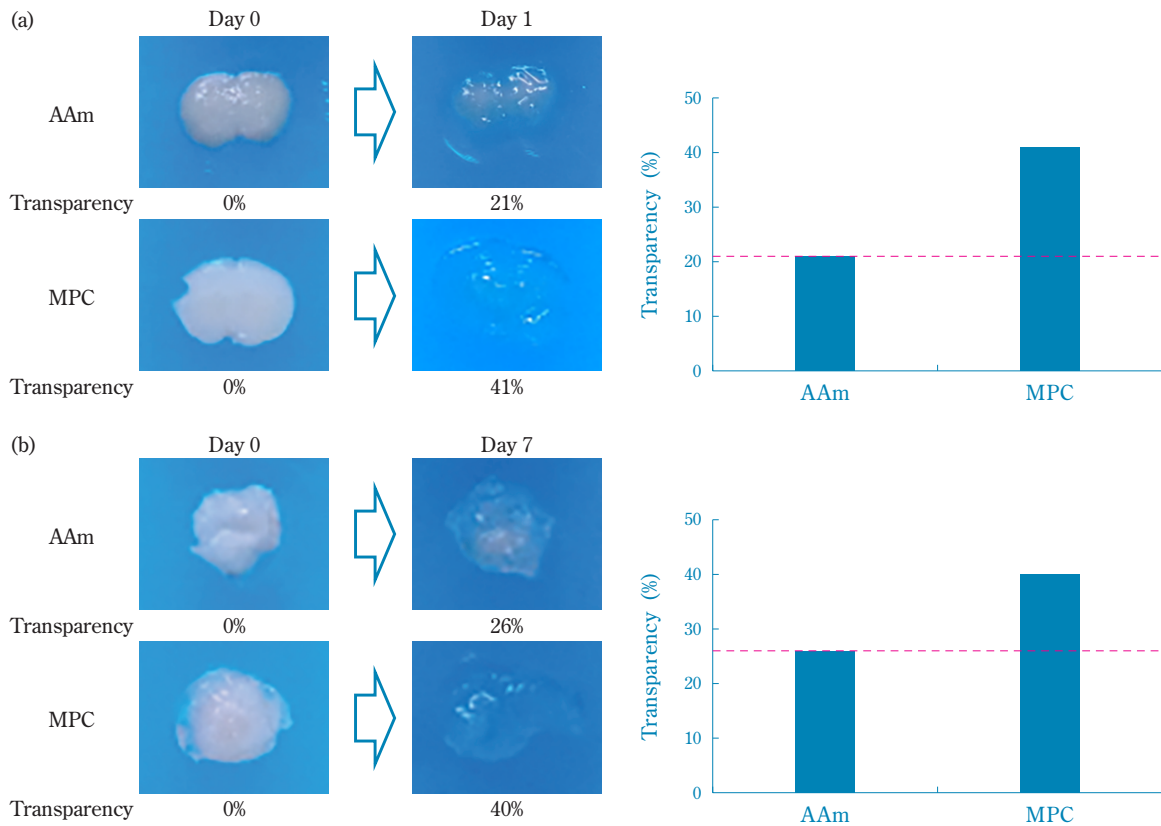


Fig. 3 Tissue clearing by shaking method
 (a) Mouse brain (b) Human cancer (mouse xenograft model)

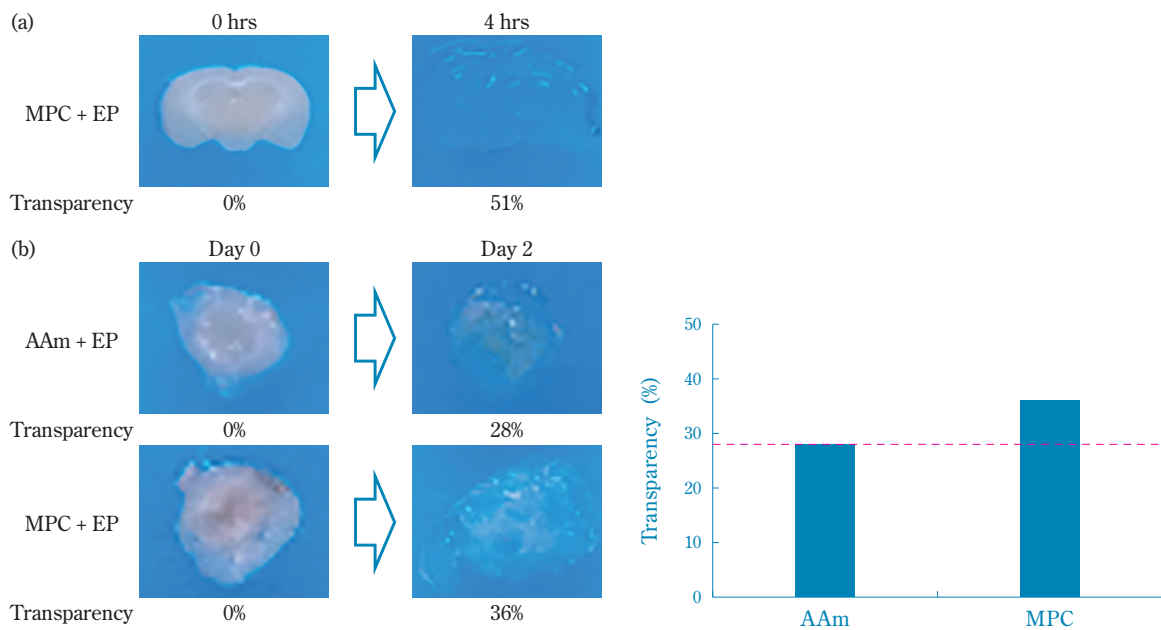


Fig. 4 Tissue clearing by electrophoresis (EP)
 (a) Mouse brain (b) Human cancer (mouse xenograft model)

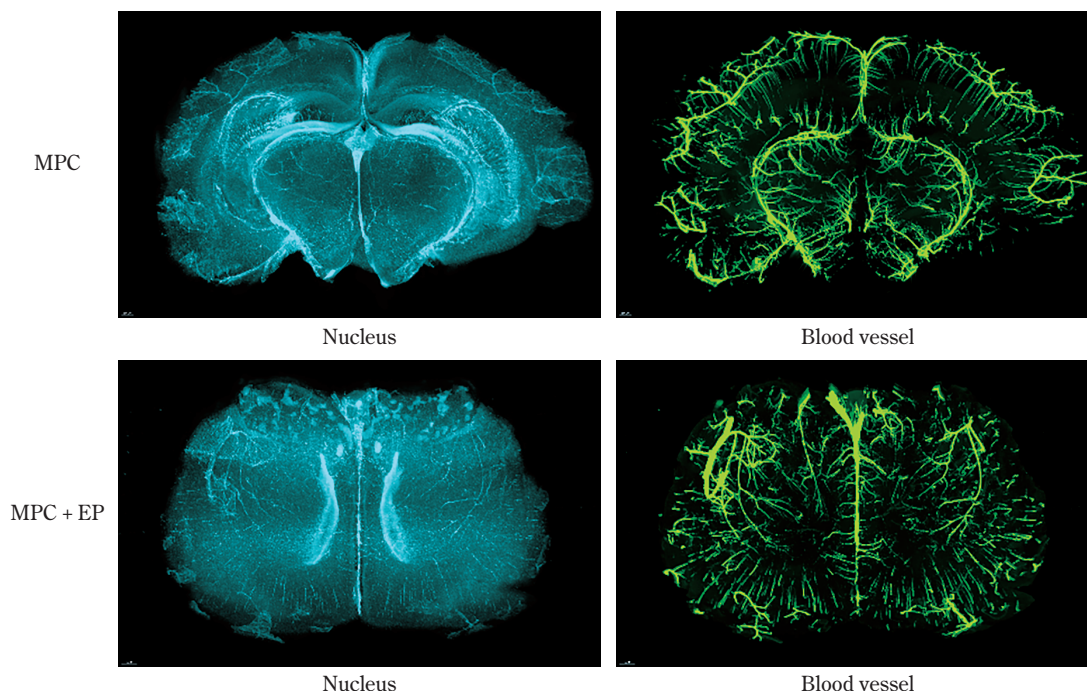


Fig. 5 Fluorescence imaging of mouse brain tissues cleared by MPC gel
 Nucleus: propidium iodide (blue)
 Blood vessel: anti- α -smooth muscle actin antibody (green)

透明化組織の三次元蛍光イメージング

透明化した組織で三次元蛍光イメージングを行うためには、透明化に用いた試薬が抗体染色や顕微鏡観察を行う際に析出しないこと、抗体や蛍光色素による染色を阻害しないこと、生体組織の抗原性を保持できることなどが必要である。

MPCを用いて固定化したマウス脳組織を振盪法および電気泳動法で透明化し、核染色試薬および蛍光標識した血管平滑筋特異的抗体で染色してライトシート顕微鏡*2で観察した (Fig. 5)。他の透明化試薬ではサンプルを撮影用オイルに置換した際に白濁が生じ、組織内部の明瞭な画像が得られないことがあるが、MPCでは白濁は見られず組織の透明性が保持されたまま明瞭な画像が得られた。さらにMPCで固定後に電気泳動により透明化した正常マウスの肺、心臓および乳がん患者由来のがん組織を血管平滑筋

特異的抗体で染色したところ、いずれにおいても組織全体の血管ネットワークを三次元的に可視化できることが分かった (Fig. 6)。これらの結果から、組織内に浸透・重合させたMPCゲルを用いた新規組織透明化手法は、ヒトがん組織や他の生体組織の三次元蛍光イメージングに適用可能であることが分かった。

まとめ

既存技術による透明化が困難ながん組織を効率良く透明化する手法を検討し、高分子ゲルを用いた新規組織透明化法を開発した。この手法を用いることで、がん組織の透明化度が向上するとともに、電気泳動と組み合わせることで透明化に要する時間をさらに短縮可能であることが分かった。さらに、この手法で透明化した組織で明瞭な三次元蛍光イメージング画像を取得できることを確認した。

*2 ライトシート顕微鏡：サンプルの側方からシート状の励起光を照射して蛍光観察を行う顕微鏡。組織透明化技術と組み合わせることで、薄切標本を作製することなく組織全体を詳細かつ迅速に観察することができる。

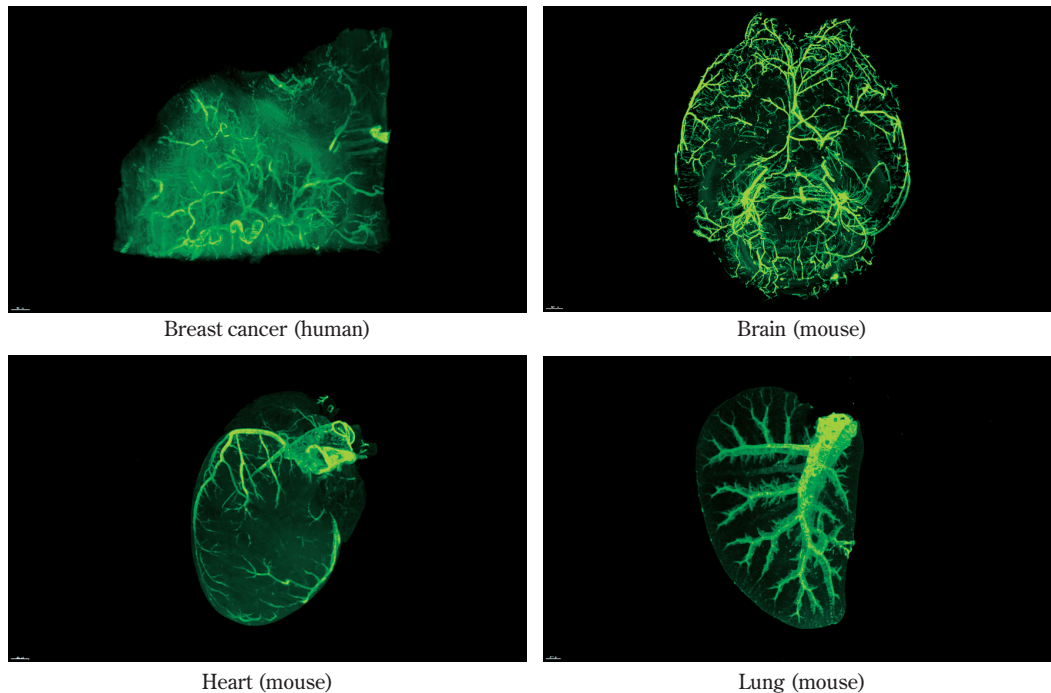


Fig. 6 Fluorescence imaging of human cancer tissue, mouse brain, heart and lung cleared by MPC gel
Blood vessel: anti- α -smooth muscle actin antibody (green)

おわりに

本技術によりがん患者の生検サンプルを丸ごと透明化し解析することが可能になる。実験動物で作製したがん組織サンプルやヒトがん患者から採取した組織サンプルを三次元的に解析し、がん細胞の増殖、局在、転移、腫瘍免疫からの逃避のメカニズムを明らかにすることで、新規がん診断法の開発が可能になると思われる。特に、高額ながん免疫チェックポイント阻害薬の効果を事前に予測する診断技術としても有用であることが期待される。

引用文献

- 1) C. Kojima *et al.*, *Macromol. Biosci.*, 21 (9), 2100170 (2021).
- 2) 大阪府立大学, 住友化学(株), WO2021095718 A1.
- 3) S. Jinyoung *et al.*, *Mol. Cells*, 39 (6), 439 (2016).
- 4) K. Chung *et al.*, *Nature*, 497 (7449), 332 (2013).
- 5) R. Tomer *et al.*, *Nature Protocols*, 9 (7), 1682 (2014).
- 6) 大阪府立大学, WO2019009300 A1.