

Title	Imaging system for the analysis of single cell positions in the whole mouse brain
Author(s)	Schulze, Wiebke
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	<a href="http://hdl.handle.net/11094/34394">http://hdl.handle.net/11094/34394</a>
DOI	
rights	
Note	

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

## 論文内容の要旨

氏 名 (Schulze Wiebke)	
論文題名	Imaging system for the analysis of single cell positions in the whole mouse brain マウス全脳解析を可能にする高速3次元定量的形態計測システムの構築
論文内容の要旨	
<p>精神疾患を含む脳疾患や脳機能の理解には、特定の脳領域や細胞種のみを解析するだけでは不十分であるが、これまでは技術的な問題により、全脳解析はほとんど行われてこなかった。しかし、近年のイメージング技術の進歩、特に核磁気共鳴画像法 (MRI) により、これまで不可能であった全脳解析や、微細な脳形態や機能の解析が可能となってきた。精神疾患患者のMRIを用いた研究に加え、自閉症患者死後脳におけるアストロサイト数の増加やうつ病におけるグリア細胞と海馬神経細胞の減少などが報告され、脳形態学的変化がほとんどないと考えられてきた精神疾患が、器質性疾患である可能性が明らかになりつつある。しかしながら、現在のMRI技術では、細胞単位の解析が不可能であるため、脳疾患の病態を正確に理解するには至っていない。そのため、最近、全脳解析を可能にする様々な技術や手法が開発されているが、アクセスが不可能なヒト脳のモデルとして汎用されるマウスの脳解析でさえ、多くの時間を要し、容易ではないのが現状である。そこで本研究では、全脳レベルで詳細な形態変化を解析可能にする全脳イメージングシステムの構築を目指した。さらに、上述のように神経細胞やアストロサイト数の変化が報告されていることから、細胞種を識別するシステムとして細胞種特異的に異なる蛍光タンパク質を発現するトランスジェニックマウスの作製を試みた。</p> <p>現在、全脳解析を目指したイメージングシステムは、いくつかの技術が報告されているが、各細胞を区別可能な解像度を維持し全脳をイメージングするには、1つのマウス脳に少なくとも8日間以上の時間が必要であると試算されている。そこで、疾患研究に必要な多群間比較を実現可能にするため、高解像度を維持したままマウス全脳のイメージング速度を高速化する新たなシステムの構築を試みた。新たなイメージングシステムは、共焦点顕微鏡と撮影後の脳部位を除去するリニアスライサーを組み合わせて、自動制御により画像取得を反復させ、全脳のイメージングを行う方法を採用した。共焦点顕微鏡には、観察速度を上げるためNipkow disc方式に用いたCSU-W1検出ユニットとpiezoアクチュエータを付けた。また、高解像度を維持し、かつ広視野で画像取得するために1KのEM-CCDカメラと水浸16倍の対物レンズ(NA0.80)を用いた。今回は、3週齢のマウス脳組織を用い表面から深さ100<math>\mu</math>mまでz-stack撮影した後、リニアスライサーにより50 <math>\mu</math>m除去し、次層の撮影に進むことを繰り返した(撮影深度や除去サイズは調節可能)。重なる50 <math>\mu</math>mをのりしろとして<i>in silico</i>で連続したレイヤーの整列化を行い、全脳3D画像を作製した。また、細胞全体を標識すると、特に細胞密度の高い脳領域において各細胞の識別や位置測定が困難となるため、DNA結合色素Hoechst33428を用いた染色により細胞核のみを標識した。イメージング後、球状粒子認識に基づいたソフトウェアにより画像処理を行い、全脳の各細胞を正確に識別し、細胞核から位置データのみを抽出することで、大容量のデータ量を解析可能な容量まで減少させた。</p> <p>全脳解析において、細胞種ごとの位置情報や形態情報を得ることは重要である。新たなイメージングシステムでは細胞核から位置情報を取得する方法をとるため、マウス脳において、細胞種特異的に蛍光タンパク質を細胞核で発現する<i>in vivo</i>マーキング法の作製を目指した。今回、脳機能に深くかかわる神経細胞とアストロサイトの2種の細胞を標識するため、神経細胞特異的なScg10-NRSEまたはhSynプロモーター下でtdTomato (赤色蛍光) を、アストロサイト特異的なGfaABC<sub>1</sub>Dプロモーター下でEGFP (緑色蛍光) を発現するマウスの作製を試みた。また、蛍光タンパク質に核移行性タンパク質であるhiston2Bを融合して、発現する蛍光タンパク質を核内に局在させることにより、細胞核の位置情報に細胞種の情報を付加することにした。まず、作製した遺伝子改変ベクターが正しく発現することを確認するために、神経細胞とアストロサイトを含む初代培養海馬細胞に導入した結果、各蛍光タンパク質は、免疫組織染色により同定される適切な細胞種において、核に局在することが明らかになった。そこで、これらの発現カセットを含むレンチウイルスベクターを作製し、成体マウスの脳の前頭前野に導入した結果、<i>in vivo</i>においても異なる細胞群の核にて強い蛍光が認められ、神経細胞とアストロサイトを<i>in vivo</i>マーキングするための発現系を構築することができた。</p>	

なお、遺伝子改変ベクターの組み合わせをマウス受精卵に注入して発生させたマウスにおいて少なくとも12匹にトランスジーンが確認されている。

全脳から形態学的な変化を網羅的に解析することは、精神疾患を含む様々な脳研究に有用であると考えられる。例えば、マウス個体間、雌雄や左右脳の比較、また、遺伝子改変あるいはストレス誘発性の様々な精神疾患モデルや神経変性疾患の解析に利用できる。今後、本研究で作成した自動高速共焦点顕微鏡観察システムを用いて、細胞種マーカーマウスの脳の3Dイメージングを行うことにより、全脳の全細胞または神経細胞とアストロサイトの割合及び位置を解析することが可能になるものと期待される。顕微鏡システムの設定を改善し、イメージング時間をさらに減少させることで、多数の病態モデルを解析できるハイスループットな方法になると考えられる。画像処理により軽量化されたデータを用いて、複数のモデルの比較も実行可能であるため、従来型の精神疾患研究で明らかにできなかった新たな知見の集積につながることを期待できる。

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 ( Schulze Wiebke )	
	(職) 氏 名
論文審査担当者	主 査 教 授 橋本 均
	副 査 教 授 辻川 和丈
	副 査 教 授 松田 敏夫
	副 査 教 授 藤尾 慈

## 論文審査の結果の要旨

“Imaging system for the analysis of single cell positions in the whole mouse brain” (マウス全脳の細胞局在解析のためのイメージングシステム)と題する学位論文においてSchulzeは、マウス全脳細胞の局在性の解析を可能にする高速3次元定量的形態計測システムの構築に成功した。このシステムは、精神疾患研究を含めて中枢神経系の病態研究に大きく貢献することが期待され、その意味において神経薬理学的にも興味深い研究である。

以下、本学位論文で発表された研究成果とその評価を示す。

近年、精神疾患を含む脳疾患の理解には、特定の脳領域や細胞種のみを解析するだけでは不十分であり、細胞種の情報を含む全脳解析が必要と考えられている。しかし、細胞単位で解析可能な既存の技術では、1つのマウス脳の画像取得に、少なくとも数日間かかることや、取得されたデータ量が膨大であり、多群比較解析を行うことは非常に難しかった。そこでSchulzeは、ハイスループットに細胞種の特定制と全脳解析を可能にする測定システムを構築することを目的として、以下の2つのシステムの構築を行った。

- ① 全脳レベルで詳細な形態変化の解析を可能にする全脳イメージングシステムの構築においては、共焦点顕微鏡と撮影後の脳部位を除去するリニアスラサーを組み合わせ、自動制御により画像取得を反復させ、全脳のイメージングを行うシステムを構築した。また、全脳の各細胞を正確に識別し、細胞核から位置データのみを抽出することで、大容量のデータを解析可能な容量まで減少させることに成功した。
- ② レンチウイルスを用いて核に局在する蛍光タンパク質を発現させることにより、*in vivo*において、神経細胞とアストロサイトを異なる色で標識する発現系を作製した。

本研究により開発された形態計測システムは、現時点で、最も迅速に全脳全細胞の空間情報などを比較解析できる測定系であり、脳疾患研究にとどまらず、様々な臓器の組織学的研究にも有用であると考えられる。また、画像処理により軽量化されたデータを用いて、多群間比較が可能になるため、脳研究においては、全脳の細胞の種類や位置の同定にとどまらず、様々な精神疾患や神経変性疾患モデルの比較解析に有用である。また、これまで未解明の脳領域での病態変化の検出など、従来の精神疾患研究で明らかにできなかった新たな知見の集積につながることを期待できる。これらのことから、脳研究の基盤的で革新技術を創出した研究であるといえる。

以上の通り、本研究の成果は、博士（薬学）の授与に値するものであると判断する。