

腎臓を視る——組織透明化による腎臓病の3次元病態解析——

長谷川 頌¹, 洲崎 悦生^{2,3}, 上田 泰己^{2,3}, 南学 正臣¹

1. はじめに

生物はさまざまな機能を持つ細胞が複雑に絡み合って構成されており、そのネットワークを包括的に捉えることは生命科学における大きな課題である。特に、病態や薬剤投与によって臓器内部で引き起こされる変化を包括的に理解することは医学研究において重要であり、そのためには細胞どうしの位置関係や相互作用を3次元で解析する技術が求められる。

臓器全体での3次元構造を把握する手段としてコンピュータ断層撮影 (CT)・磁気共鳴映像法 (MRI)・ポジトロン断層法 (PET) などがあるが、特定の機能を持った細胞を標識して細胞レベルで観察することは困難である。一方、従来の病理組織学的解析では臓器を薄切してスライドガラスに載せることで特定の細胞を標識することはできるものの、臓器全体を観察するためには膨大な数の切片を作製して3次元再構成する必要がある、再現性の面で大きな問題がある。

これらの課題を解決するため、上田・洲崎らは組織透明化技術とライトシート顕微鏡による高速3次元撮影を組み合わせて臓器さらには個体全体を細胞レベルで包括的に解析するパイプライン (clear, unobstructed brain/body imaging cocktails and computational analysis: CUBIC) を開発し、発展させてきた¹⁾。その流れの中で、南学・長谷川

らは腎臓内科医の視点からCUBICを用いた腎臓病の病態解析 (CUBIC-kidney) に取り組み、従来の手法では観察が難しかった現象を捉えることに成功している^{2,3)}。本稿では、最新の技術的発展に関する知見を盛り込みながら、主に腎臓の3次元病態解析について概説する。

2. 組織透明化の原理

「組織が透明でないこと」は光の散乱および吸収という二つの物理的な要素によって生じる。生体の組織は脂質・水・タンパク質など屈折率の異なる物質から構成されており、光が組織の中を通る際に散乱のため真っすぐ進んでいかない。そのため、組織透明化の基本的な原理は「観察したい対象 (≡タンパク質) に屈折率を合わせる」ことであり、脂質などの生体内光散乱物質の除去 (脱脂)・高屈折率溶媒の浸透 (屈折率調整) という二つの過程によって透明化を実現してきた (図1a)。さらに、ヘモグロビンなど生体内色素の除去 (脱色)・組織の膨潤による平均屈折率の低減 (膨潤) も透明化に関与しており、特に骨の透明化ではリン酸カルシウムの溶出 (脱灰) も重要な要素となる。

この組織透明化研究の歴史は古く、1911年にドイツの解剖学者であるWerner Spalteholzが石油会社との共同研究で有機溶媒を用いた方法を報告したことが知られている。これは今日ではBABB・3DISCO⁴⁾といった手法へと発展しており、高度な透明化を実現するに至っている。これら有機溶媒を用いた方法は短時間の処理で透明化を行うことができるが、一方でサンプルが収縮してしまう欠点があり、また試薬が実験者や顕微鏡などの機器にとって安全でなく、蛍光タンパク質が退色しやすいという問題もある。

そのため、有機溶媒ではなく、生体親和性が高く蛍光タンパク質の保存性の面で優れている水溶性化合物を用いて組織透明化を行う手法の開発も試みられてきた。2011年に報告されたScale⁵⁾は水溶性化合物において透明化と3次元蛍光イメージングを両立させた点でブレイクスルーとなり、それ以降SeeDB⁶⁾・CUBIC¹⁾など本邦を中心にさまざまな手法が開発されてきた。また、CLARITY⁷⁾のようにアクリルアミドゲルによって組織のタンパク質・核酸を空間的に固定することで強力な脱脂を行う戦略も報告されている。さらに、最近報告されたSHANEL⁸⁾では水溶性膜タ

¹ 東京大学大学院医学系研究科・腎臓内科学 (〒113-8655 東京都文京区本郷7-3-1)

² 東京大学大学院医学系研究科・システムズ薬理学 (〒113-8655 東京都文京区本郷7-3-1)

³ 理化学研究所生命機能科学研究センター合成生物学研究チーム (〒565-0871 大阪府吹田市山田丘1-3)

Tissue clearing-based three-dimensional analysis of kidney disease pathophysiology

Sho Hasegawa¹, Etsuo A. Susaki^{2,3}, Hiroki R. Ueda^{2,3} and Masaoami Nangaku¹ (¹Division of Nephrology and Endocrinology, The University of Tokyo Graduate School of Medicine, 7-3-1 Bunkyo-ku, Hongo, Tokyo, 113-8655, ²Department of Systems Pharmacology, The University of Tokyo Graduate School of Medicine, 7-3-1 Bunkyo-ku, Hongo, Tokyo, 113-8655, ³Laboratory for Synthetic Biology, RIKEN Center for Biosystems Dynamics Research, 1-3, Yamadaoka, Suita, Osaka, 565-0871)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2020.920838

© 2020 公益社団法人日本生化学会

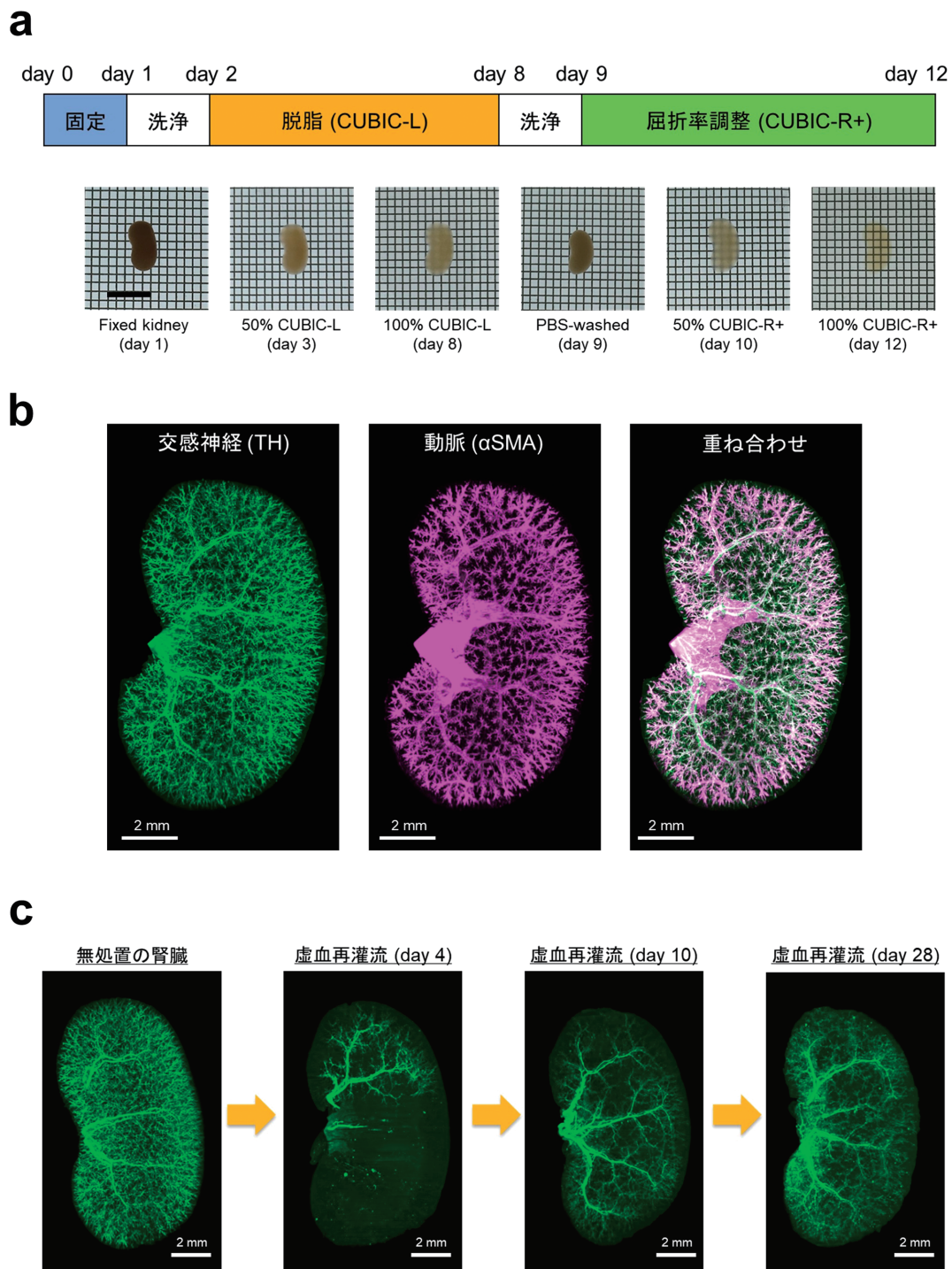


図1 CUBICによる腎交感神経の3次元解析

(a)CUBICによる透明化は、CUBIC-L液による脱脂・CUBIC-R+液による屈折率調整の二つの工程（それぞれ50%、100%液で2段階処理）からなる（Scale bar = 10mm）。3次元免疫染色は脱脂の後に行う。（b）腎臓全体の交感神経・動脈の3次元構造を示す。交感神経はtyrosine hydroxylase（TH）抗体、動脈は α -smooth muscle actin（ α SMA）抗体を用いて標識し、ライトシート顕微鏡で撮影した画像を3次元再構成した。（c）虚血再灌流障害後に腎交感神経の異常が生じており、徐々に回復するものの、28日後まで遷延していることがわかる。（文献2から一部改変して作成）

ンパク質可溶化剤であるCHAPSを有機溶媒と併用することでより高度な透明化を実現している。

このように現在ではさまざまな透明化技術が存在し、そ

れぞれに長所・短所があるが、一般的に「高度な透明化」は強力な脱脂を必要とすることから「微細構造の保持」とトレードオフの関係にあり、用途に応じて使い分けるのが

大切である。その中で、2014年に我々が発表したCUBIC¹⁾は高度な透明化・蛍光タンパク質の保持・プロトコルの再現性の点において優れている。さらに、先述した透明化に重要なパラメータの評価に基づいて1600種類以上の化合物スクリーニングを経ることでプロトコルを改訂し⁹⁾、より高い透明度を達成していることから臓器全体の3次元観察を目的とした場合には第一選択となりうる手法である。

3. ライトシート顕微鏡による透明化臓器の3次元観察

透明化した臓器全体を観察する際に力を発揮するのがライトシート顕微鏡である。多くの顕微鏡は光を照射してその蛍光もしくは透過をみる構造をとっており、光の照射方向と観察する方向が平行になっている。一方、ライトシート顕微鏡はシート状のレーザーを左右から照射し、サンプル内の蛍光シグナルを上部に設置されているレンズで検出する構造をとっており、光の照射方向と観察する方向が垂直となる。ライトシート顕微鏡は古くから存在していたが、不透明な構造物だと表面にしか光が届かないため長年あまり有効な使い道に恵まれなかった。しかしながら、透明化した臓器を観察する際には一度のレーザー照射で断面をすべて撮影でき、垂直方向に断面を少しずつずらすこと（光学的セクショニング）によって、臓器全体の3次元データを高速に取得することができるため、大きな力を発揮する。さらに撮影している断面にしかレーザーが当たらないため、共焦点顕微鏡や二光子顕微鏡と比較すると観察時の蛍光の退色がはるかに少ない点も有利となる。このように、ライトシート顕微鏡は透明化技術ときわめて相性のよい顕微鏡であり、CUBICを含めたさまざまな透明化技術と組み合わせた適応例が多数報告されている。

4. 腎臓における交感神経系の3次元解析

腎臓の複雑な働きを制御するために交感神経系は重要な働きを担っていると考えられてきたが、腎臓内での分布については解明されていなかった。我々はCUBICで透明化した腎臓（図1a）に対して、交感神経をtyrosine hydroxylase (TH)、動脈を α -smooth muscle actin (α SMA)の抗体を用いて標識し、腎臓内の3次元構造を解析した²⁾。その結果、腎臓内の交感神経は動脈の周囲を取り巻くように走行していることが明らかとなり、交感神経が動脈の収縮を制御していることが裏づけられた（図1b）。

次に病的状態にある腎臓では交感神経のネットワークにどのような変化が生じているのかに興味を抱き、マウスに虚血再灌流障害（腎臓の血流が一時的に急激に低下することによる障害；急性腎障害）を起こし、10日後の腎臓を同様の手法で観察した。その結果、交感神経マーカーで標

識される領域が健康な腎臓と比べて著明に減少し、交感神経が脱落していることが示唆された。障害後の腎臓組織内では交感神経から分泌される神経伝達物質であるノルアドレナリンの量も著明に低下していたことから、交感神経の異常が生じていることが裏づけられた。さらに、経時的な変化を観察したところ、交感神経マーカーで標識される領域は障害直後に最も減少し、時間とともに徐々に回復するものの、28日後でも完全には回復しておらず、交感神経の異常が長期間にわたって遷延していることがわかった²⁾（図1c）。このように、血管や神経など臓器全体で複雑なネットワークを作る構造の解析において組織透明化は特に強力な手段となりうる。

5. 腎臓における糸球体の3次元解析

腎臓の構成単位はネフロンと呼ばれ、糸球体とそれに続く尿細管・集合管からなっている。糸球体で血液を濾過して大量の原尿を作り、その後長く続く近位尿細管・遠位尿細管・集合管で水や必要な物質の再吸収を行うことで、排出する尿の成分を細かく調節して体内環境を一定に保つ働きをしている。

組織透明化を用いた糸球体の病態解析については複数の報告がなされている。我々は、糸球体全体に分布して血液濾過に中心的な役割を果たす足細胞のマーカーであるPodocinを3次元免疫染色することによってCUBICで透明化した腎臓全体の糸球体を可視化することに成功した²⁾。これを用いて糖尿病性腎臓病の糸球体のサイズを解析することで、糖尿病によって引き起こされた糸球体肥大がエネルギー代謝に影響を与える薬剤の投与で改善していることを可視化して報告した³⁾（図2a）。なお、血管内皮を染色するために用いられるレクチン灌流はCUBICも含めて透明化技術との相性が悪く、透明化後の臓器を観察すると毛細血管の染色が保たれないことがわかっているが（そのため透明化に適した血管ラベリングを確立する試み¹⁰⁾も報告されている）、蛍光レクチン灌流を行った後の腎臓をCUBICで透明化してみると、すべての血管の描出は完全ではないものの結果的に血管密度の高い糸球体のみが描出されていた²⁾（図2b）。ØstergaardらはiDISCO¹¹⁾（免疫染色面での性能を高めた3DISCOの改良版）においてもレクチン灌流と組み合わせて糸球体をラベリングできることを報告し¹²⁾、我々と同じような糖尿病による糸球体肥大の解析を行っている。

これらの報告は糸球体全体を一つの塊と捉えてマクロな視点から腎臓全体の解析を行ったものであるが、PuellesらはCUBICを含めた複数の透明化手法を用いて急速進行性糸球体腎炎モデルにおける足細胞脱落・半月体形成といった病理像をミクロな視点から3次元で解析することに成功

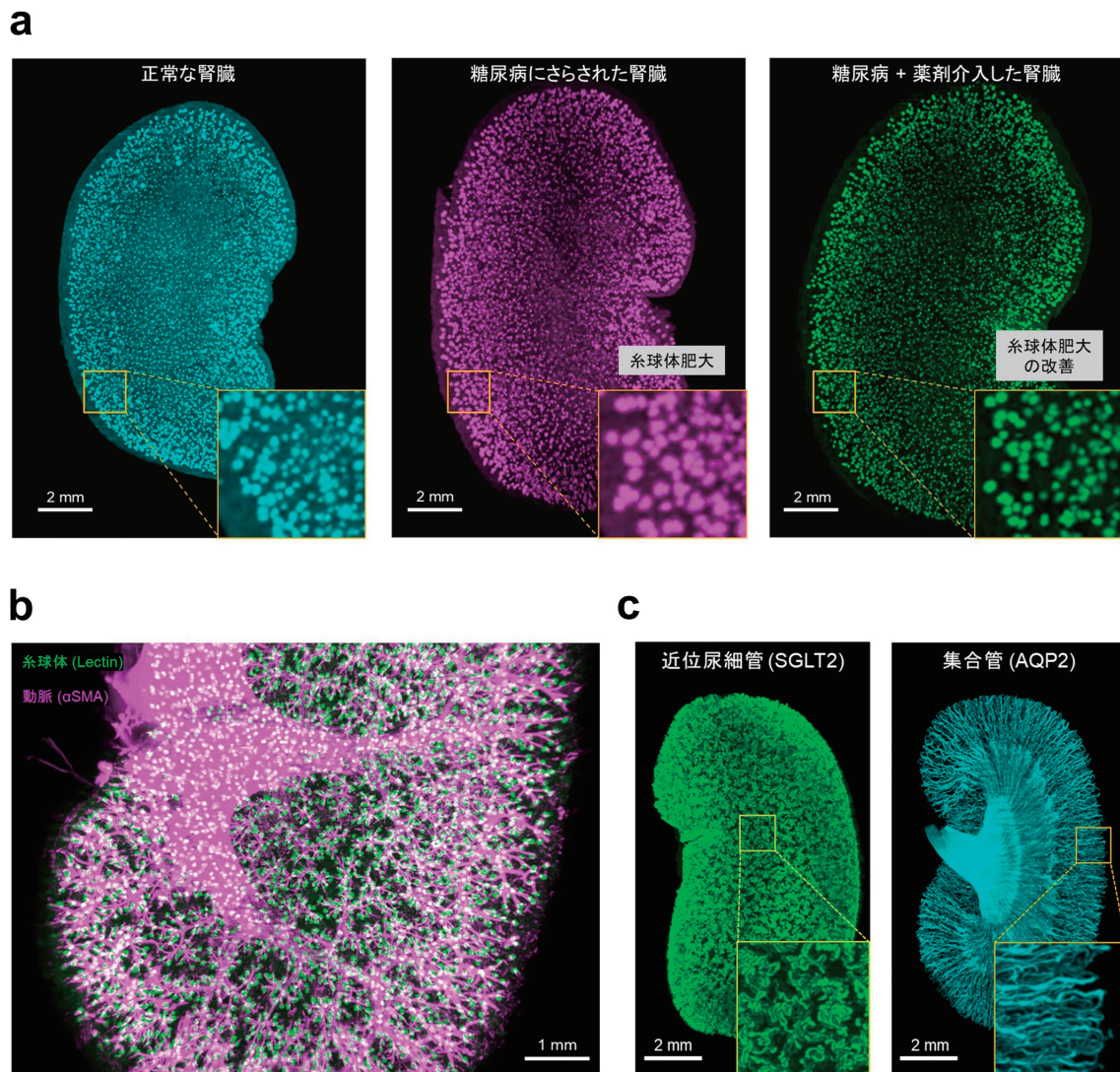


図2 CUBIC-kidneyの応用例

(a) Podocin抗体を用いて腎臓全体の糸球体を標識してサイズを解析した。糖尿病にさらされた腎臓で生じる糸球体肥大が薬剤介入によって改善していることがわかる。(b) 蛍光レクチン灌流による微小血管の染色は不完全だが、結果として血管密度の高い糸球体のみが描出される。動脈(α SMA)との二重染色を示す。(c) 近位尿細管S1/S2セグメント(sodium-glucose cotransporter 2: SGLT2), 集合管(aquaporin 2: AQP2)の3次元構造を可視化した。(文献2, 3から一部改変して作成)

している¹³⁾。このように透明化手法を用いることで、マクロな視点・ミクロな視点の双方から糸球体障害の解析を行うことが可能となりつつある。

6. 腎臓における尿細管・集合管の3次元解析

糸球体に続く尿細管・集合管は複雑に蛇行した構造をとることから、3次元で構造解析を行う意義は大きい。我々はsodium-glucose cotransporter 2 (SGLT2) 抗体を用いて近位尿細管のS1/S2セグメント(糸球体に最も近い部位), aquaporin 2 (AQP2) 抗体を用いて集合管をそれぞれ標識し、腎臓全体の3次元構造を可視化することに成功した²⁾

(図2c)。集合管についてはiDISCOでも同様の可視化が行われている¹¹⁾。

尿細管はそれぞれの部位で異なる再吸収機能を有していることがわかっているが、その複雑な構造ゆえに解剖と機能を結びつけて解析することが難しい。Schuhらは、CLARITYによる透明化を応用して蛍光標識したタンパク質やデキストランの腎臓での集積を解析することで近位尿細管の再吸収機能に関するセグメント間(S1とS2)の違いを示した¹⁴⁾。さらに近位尿細管の中で特定の物質を再吸収する部位の長さはネフロンによって大幅に異なり、一つの腎臓内でも不均一性が存在することが示唆される結果であった。このような不均一性の解析は昨今発展の目覚ま

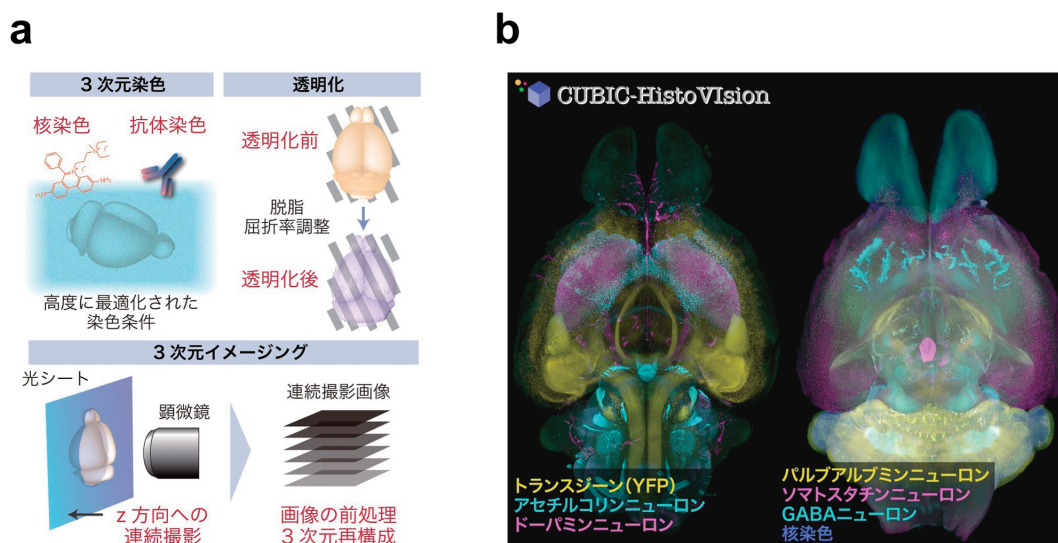


図3 透明化処理を行った臓器における3次元組織染色の発展
(a) 新たな3次元組織染色技術「CUBIC-HistoVision (CUBIC-HV)」の概略。(b) CUBIC-HVを用いたマウス全脳のマルチカラーイメージングの例を示す。(文献15から一部改変して作成)

しいシングルセル生物学の得意とするところであるが、透明化技術は空間的な情報を提供することでこの分野に貢献できる可能性がある。

7. 透明化組織における免疫染色手法の発展

ここまで組織透明化を用いた腎臓研究について紹介してきたが、研究を進めるにあたって一つのハードルとなるのが3次元免疫染色の困難さである。先述した交感神経・動脈・糸球体・近位尿細管・集合管の染色は経験則に基づいた染色プロトコルで行ったが、抗体によっては深部まで浸透せずに表面にとどまってしまう現象が生じることから、より洗練された3次元免疫染色プロトコルが求められていた。我々は透明化した組織が電解質ゲルの性質を持つことを発見し、それを基に3次元免疫染色に必要な条件を探索するスクリーニング系を構築することで、理想的な3次元染色プロトコルであるCUBIC-HistoVision (CUBIC-HV) をボトムアップにデザインすることに成功した¹⁵⁾ (図3)。本手法を用いることで、さらに多種類の抗体を用いて透明化臓器の3次元免疫染色を行うことが可能となり、研究の幅が大きく広がると考えられる。

8. おわりに

本稿では、我々が行ったCUBICによる腎臓病の病態解析 (CUBIC-kidney) を中心に組織透明化を用いたさまざまな腎臓研究を概説し、最新の技術的発展についても紹介した。臓器全体の3次元解析に関する技術基盤は整いつつ

あり、腎臓研究においても従来捉えられなかった細胞ネットワークの解明につながる事が期待される。

謝辞

本稿で紹介した腎臓病に関する研究は、東京大学腎臓内科学の田中哲洋先生、東海大学腎内分泌代謝内科の深川雅史先生、和田健彦先生、駒場大峰先生のご指導・ご協力の下で、JSPS科学研究費補助金 (19J11928) の支援により実施されたものであり、深く御礼申し上げる。

文 献

- 1) Susaki, E.A., Tainaka, K., Perrin, D., Kishino, F., Tawara, T., Watanabe, T.M., Yokoyama, C., Onoe, H., Eguchi, M., Yamaguchi, S., et al. (2014) Whole-brain imaging with single-cell resolution using chemical cocktails and computational analysis. *Cell*, **157**, 726–739.
- 2) Hasegawa, S., Susaki, E.A., Tanaka, T., Komaba, H., Wada, T., Fukagawa, M., Ueda, H.R., & Nangaku, M. (2019) Comprehensive three-dimensional analysis (CUBIC-kidney) visualizes abnormal renal sympathetic nerves after ischemia/reperfusion injury. *Kidney Int.*, **96**, 129–138.
- 3) Hasegawa, S., Tanaka, T., Saito, T., Fukui, K., Wakashima, T., Susaki, E.A., Ueda, H.R., & Nangaku, M. (2020) The oral hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase inhibitor enarodustat counteracts alterations in renal energy metabolism in the early stages of diabetic kidney disease. *Kidney Int.*, **97**, 934–950.
- 4) Erturk, A., Becker, K., Jahrling, N., Mauch, C.P., Hojer, C.D., Egen, J.G., Hellal, F., Bradke, F., Sheng, M., & Dodt, H.U. (2012) Three-dimensional imaging of solvent-cleared organs using 3DISCO. *Nat. Protoc.*, **7**, 1983–1995.
- 5) Hama, H., Kurokawa, H., Kawano, H., Ando, R., Shimogori, T., Noda, H., Fukami, K., Sakaue-Sawano, A., & Miyawaki, A.

- (2011) Scale: a chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain. *Nat. Neurosci.*, **14**, 1481–1488.
- 6) Ke, M.T., Fujimoto, S., & Imai, T. (2013) SeeDB: a simple and morphology-preserving optical clearing agent for neuronal circuit reconstruction. *Nat. Neurosci.*, **16**, 1154–1161.
 - 7) Chung, K., Wallace, J., Kim, S.Y., Kalyanasundaram, S., Andalman, A.S., Davidson, T.J., Mirzabekov, J.J., Zalocusky, K.A., Mattis, J., Denisin, A.K., et al. (2013) Structural and molecular interrogation of intact biological systems. *Nature*, **497**, 332–337.
 - 8) Zhao, S., Todorov, M.I., Cai, R., Maskari, R.A., Steinke, H., Kemter, E., Mai, H., Rong, Z., Warmer, M., Stanic, K., et al. (2020) Cellular and Molecular Probing of Intact Human Organs. *Cell*, **180**, 796–812.
 - 9) Tainaka, K., Murakami, T.C., Susaki, E.A., Shimizu, C., Saito, R., Takahashi, K., Hayashi-Takagi, A., Sekiya, H., Arima, Y., Nojima, S., et al. (2018) Chemical Landscape for Tissue Clearing Based on Hydrophilic Reagents. *Cell Rep.*, **24**, 2196–2210.
 - 10) Miyawaki, T., Morikawa, S., Susaki, E.A., Nakashima, A., Takeuchi, H., Yamaguchi, S., Ueda, H.R., & Ikegaya, Y. (2020) Visualization and molecular characterization of whole-brain vascular networks with capillary resolution. *Nat. Commun.*, **11**, 1104.
 - 11) Renier, N., Wu, Z., Simon, D.J., Yang, J., Ariel, P., & Tessier-Lavigne, M. (2014) iDISCO: a simple, rapid method to immunolabel large tissue samples for volume imaging. *Cell*, **159**, 896–910.
 - 12) Østergaard, M., Sembach, F., Skytte, J., Roostalu, U., Secher, T., Overgaard, A., Fink, L., Vrang, N., Jelsing, J., & Hecksher-Sørensen, J. (2020) Automated Image Analyses of Glomerular Hypertrophy in a Mouse Model of Diabetic Nephropathy. *Kidney360*, **1**, 469–479.
 - 13) Puelles, V.G., Fleck, D., Ortiz, L., Papadouris, S., Strieder, T., Bohner, A.M.C., van der Wolde, J.W., Vogt, M., Saritas, T., Kuppe, C., et al. (2019) Novel 3D analysis using optical tissue clearing documents the evolution of murine rapidly progressive glomerulonephritis. *Kidney Int.*, **96**, 505–516.
 - 14) Schuh, C.D., Polesel, M., Platonova, E., Haenni, D., Gassama, A., Tokonami, N., Ghazi, S., Bugarski, M., Devuyt, O., Ziegler, U., et al. (2018) Combined Structural and Functional Imaging of the Kidney Reveals Major Axial Differences in Proximal Tubule Endocytosis. *J. Am. Soc. Nephrol.*, **29**, 2696–2712.
 - 15) Susaki, E.A., Shimizu, C., Kuno, A., Tainaka, K., Li, X., Nishi, K., Morishima, K., Ono, H., Ode, K.L., Saeki, Y., et al. (2020) Versatile whole-organ/body staining and imaging based on electrolyte-gel properties of biological tissues. *Nat. Commun.*, **11**, 1982.

著者寸描

●長谷川 頌 (はせがわ しょう)



東京大学大学院医学系研究科腎臓内科学
学振特別研究員 (PD)。医学博士。

■略歴 1987年大阪府生まれ。兵庫県出身。2012年東京大学医学部医学科卒業。同年より国立国際医療研究センターで内科医として勤務。16年東京大学大学院博士課程進学。19年学振特別研究員 (DC2)。20年大学院卒業・博士号取得。同年より現職。

■研究テーマと抱負 慢性腎臓病の病態メカニズム解明・本質的な治療標的の同定。

■ウェブサイト <https://researchmap.jp/hasesho>

■趣味 野球観戦。