

Expansion microscopyを応用した、高速、深部、高解像度の多光子イメージング

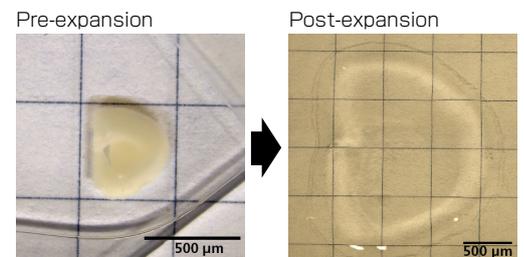
ミクログリアは多数の枝分かれした突起をもつ脳の免疫細胞であり、その形態を絶えず変化させることで周囲環境の監視や神経回路の形成・維持に寄与すると考えられる。近年の観察研究から、ミクログリア突起にはフィロポディアが存在し、太い突起とは異なる動態で周囲をセンシングすることが報告された (Bernier et al., 2019)。また、ミクログリアの遺伝子発現、密度、形態は脳領域ごとに異なることが複数の研究から報告されており、その多様性についてより関心が高まっている (Masuda et al., 2020)。このようなミクログリアの特徴的な形態と多様性を理解するためには、ミクログリアの形態学的な特徴を広範囲にわたり観察する技術が求められる。本アプリケーションノートでは、近年開発された超解像顕微鏡法であるExpansion microscopyと、高速マルチフォトンシステムを組み合わせ、広域におけるミクログリアの効率的なイメージング手法を紹介する。

キーワード：Expansion microscopy、ミクログリア

Methods

Expansion microscopy (ExM) は、固定標本の細胞構造を物理的に拡大することで、従来の光学顕微鏡を用いてナノスケールでのイメージングを実現する方法である (Chen et al., 2015)。ExMでは、標本に含まれるタンパク質のアミン基を架橋剤 (Acryloyl-X, SEなど) で処理後、ポリアクリルアミドと吸水性ポリマーをベースにしたハイドロゲルで標本をゲル化する。ゲル化した標本は酵素消化または熱変性で物理的に均一化し、水を加えることで膨張する。ExMでは約4.5倍まで標本を拡大できるため、従来の光学顕微鏡の分解能を超えた解像度を得ることができる。また、拡大後の標本の組成は約99%が水となるため、長作動距離の水浸対物レンズを用いることで、深層部まで広域にわたって高解像度イメージングが可能である。

本研究では、ミクログリア特異的にEGFPを発現する遺伝子改変マウス (CX3CR1-EGFPマウス) を4%PFAで灌流固定後、大脳皮質を含む300 μm 厚の脳切片をピブラトームで作製した。脳切片に膜透過処理を行い、GFPに対する抗体と蛍光色素 (Alexa 488) で標識された二次抗体で免疫染色を行った。組織の膨張後、20倍の水浸対物レンズを搭載した高速多光子共焦点レーザー顕微鏡システムAX R MPでZスタック画像を取得した。



実体顕微鏡画像 (SHR Plan Apo 1x, zoom 0.63x)

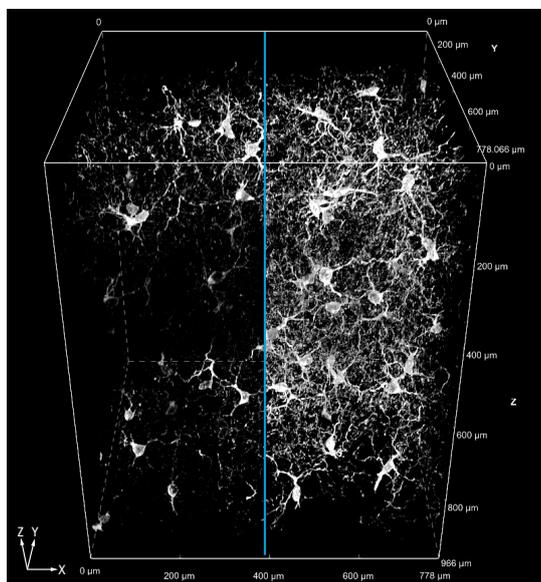


図1. Z-intensity correctionの効果

AX R MPによる2光子励起顕微鏡像 (励起波長: 860 nm, 検出波長: 500-550 nm)
 左: Z-stackの深さ毎による輝度調整なし、右: 調整あり
 色素結合二次抗体の浸透が不十分であると、大型組織標本では均一な染色が困難である。顕微鏡システムからNon-linearに励起レーザーの輝度調整を行うことにより、深度ごとの輝度の不均一を大幅に改善できる。

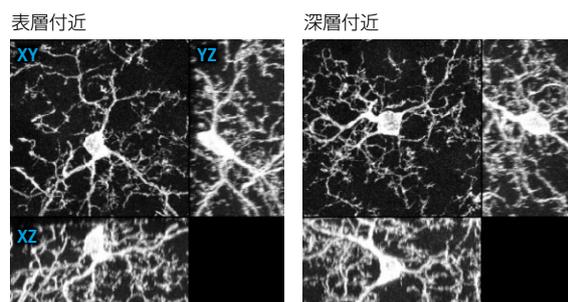


図2. Water dipping対物レンズの効果

ExMではサンプルの屈折率が水とほぼ同じ1.33となるため、屈折率の不一致が解消され、球面収差に起因する、深部領域での共焦点ボリュームの広がりを低減できる。

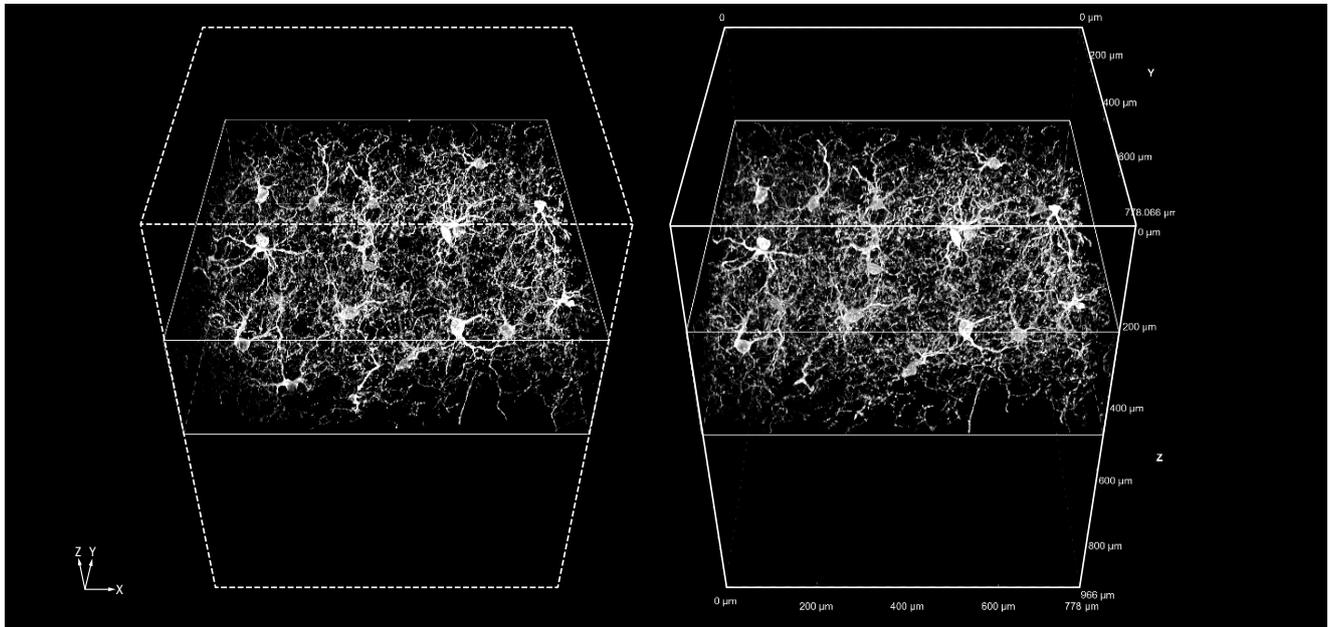
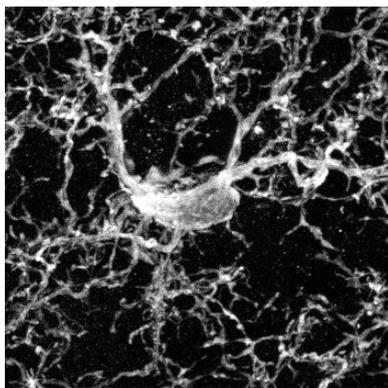


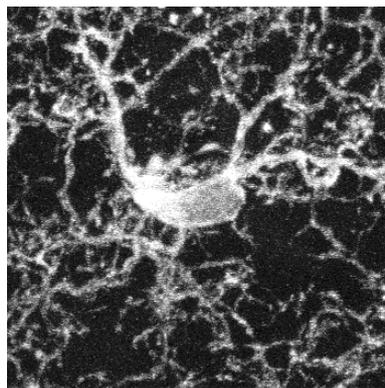
図3. レゾナントスキャナーによる高スループット画像取得

左：ガルバノスキャナーによるZ-stack/3D画像。251枚のZ-stack画像を1 μm のピッチで取得するのに約55分を要した。

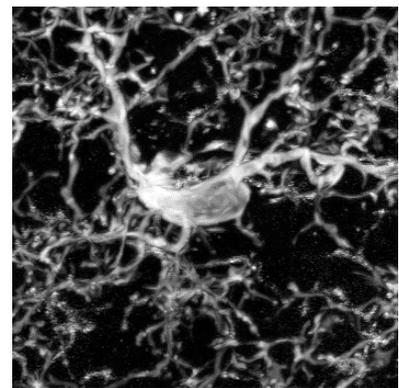
右：レゾナントスキャナーによる、同じ1 μm のピッチで取得した表層から深層部位までのZ-stack/3D画像から、一部を比較のために抽出した。実際には966枚のZ-stack画像をわずか約20分で取得でき、同じ深度領域内で取得したガルバノスキャナーによる画像（左図）と比較しても、ミクログリアの細胞レベルの観察においては画質に遜色がないことがわかる。



ガルバノスキャナー



レゾナントスキャナー (Z-intensity correction)



レゾナントスキャナー (Z-intensity correction+Denoise.ai)

図4. Denoise.aiの効果

レゾナントスキャナーは、Pixel dwell time (Point scanでpixelあたりに照射されるレーザーの時間) が圧倒的に短いため、ミクログリアの突起やフィロポディアなどの細かな構造に注目する場合には、画像のS/Nの劣化が障害となりうる。この場合には、Denoise.ai機能（取得画像に対する画像処理）を用いることで、PixelごとのS/Nを自動計算してノイズを低減することができる。

まとめ

脳内で広範囲に分布するミクログリアをマクロ的・ミクロ的に画像化・解析する方法として、Expansion microscopyは非常に有効である。有意義な画像を得るためのシステム側の提案として、高速マルチフォトンシステムAX R MPIは、深度によらず均一な励起を実現するZ-intensity correction機能、低倍・高NA・長作動距離の水浸対物レンズ、高速画像取得の可能なレゾナントスキャナー、ショットノイズによる画像劣化を解消するDenoise機能を搭載。AX R MPIにより、Expansion microscopyによる、より多面的な観察や解析の可能性が広がった。

製品情報

CFI75 アポクロマート LWD 20XC W

視野数22の広視野観察に対応。低倍広視野でありながら視野周辺部まで明るい画像が得られます。高NA (1.00) と長作動距離 (2.8 mm) を両立し、サンプルの深部を鮮明に取得できます。



謝辞

Expansion sampleの作製、提供、イメージングに全面的にご協力いただきました東京大学大学院・医学系研究科・神経細胞生物学教室の遠藤雅瑛大学院生、丸岡久人助教、岡部繁男教授に深謝いたします。

参考文献

Bernier LP, Bohlen CJ, York EM, Choi HB, Kamyabi A, Dissing-Olesen L, Hefendehl JK, Collins HY, Stevens B, Barres BA, MacVicar BA. Nanoscale Surveillance of the Brain by Microglia via cAMP-Regulated Filopodia. *Cell Rep.* 2019 Jun 4;27(10):2895-2908.e4.

Chen F, Tillberg PW, Boyden ES. Optical imaging. Expansion microscopy. *Science.* 2015 Jan 30;347(6221):543-8.

Masuda T, Sankowski R, Staszewski O, Prinz M. Microglia Heterogeneity in the Single-Cell Era. *Cell Rep.* 2020 Feb 4;30(5):1271-1281.