

フジテレビジョン賞

組織透明化による全身一細胞解析技術の開発

東京大学大学院 医学系研究科 機能生物学専攻
博士課程4年

久保田 晋平

1. 緒言

細胞は生命の基本構成単位であり、生命は細胞が織り成す複雑なシステムとして考えられている。Robert Hooke 博士が生物の最も基本的な構成単位である“cell”を発見したのは約350年前のことであるが、依然として細胞・組織・臓器・個体といった複数の階層を繋ぎ合わせ個体の表現型として現れる生命現象を包括的・定量的に解析することは非常に困難であり続けている。申請者らは、本研究において、臓器の脱色に注目することによってマウス全身透明化を達成し、世界で初めてマウス全身の全細胞を一細胞解像度で網羅的に解析することに成功した[1]。この基盤技術 CUBIC (clear, unobstructed brain/body imaging cocktails and computational analysis) は、1) 脱色作用を持つ水溶性透明化試薬を用いた個体・臓器の高効率かつ再現性のよい透明化 (図1A)、2) マウス全身、マウス全臓器などのサンプルに対する高速な1細胞解像度3D イメージング (図1B)、3) 画像解析による情報抽出、の3つのステップにより構成される、全身全細胞解析プラットフォームである。CUBIC は核染色剤や抗体を用いた組織化学的アッセイとの親和性が高いため、核染色剤によるマウス全身染色、抗体によるマウス臓器染色を行うことが可能である。これらのサンプルから取得した三次元イメージを用いた解剖学的・病理学的な情報抽出に成功している (図1C)。申請者らは本技術を開発することにより臓器・個体内の細胞の位置情報と機能情報を保持した状態で細胞の網羅的解析を行う基盤技術を確立した (図1)。

2. 全身一細胞解析への課題

医学・生物学の分野において、哺乳類動物における個体、臓器の階層において張り巡らされた複雑な細胞ネットワークを解き明かす事は未だに大きな課題である。これまでに、個体を包括的に観察するためコンピュータトモグラフィ (CT) や磁気共鳴イメージング (MRI)、Positron Emission Tomography (PET) など様々な手法が開発されてきたが、生体観察が可能であるといった長所はあるものの、一細胞解像度での撮像が原理的に困難であり、特定の細胞を標識する技術が不足している。また二光子励起顕微鏡といった手法は十分な解像度を持っているが、1mm 以上の厚みがある対象の観察は困難である。臓器をスライス切片にし、観察後に三次元再構築を行う手法であれば臓器を一細胞解像度で包括的に観察することができる。しかしこの手法は多大な時間と手間を必要とするため、複数のサンプルを比較検討する事は難しい。このように複雑なネットワークを形成している分子・細胞の動きを個体・臓器の中で包括的かつハイスループットに解析する技術基盤は未だに確立されていない。

申請者らは、個体・臓器全体における分子・細胞の動きの検出系としてライトシート顕微鏡に着目した[2]。ライトシート顕微鏡はレーザー光をシート状にしてサンプルの横から照射することで、XY 平面を同時励起させて垂直方向から XY 画像を取得する顕微鏡であり、Z 軸スキャンを行うことで三次元画像の高速な取得が可能である (図1B)。一方で、ライトシート顕微鏡を用いた光学セクショニングを行うためにはサンプルが高度に透明である必要があり、不透明である哺乳類に適応するためには高度な組織透明化手法の開発が必要とされていた。

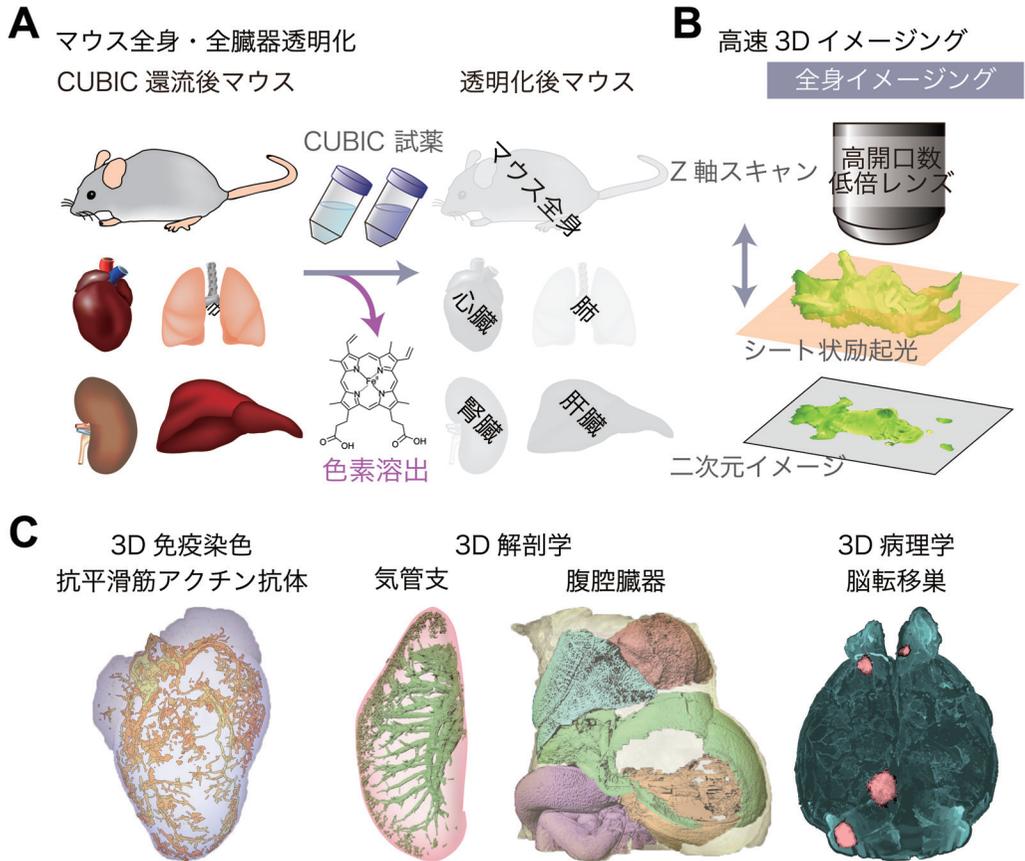


図1. 組織透明化による三次元解析基盤技術 (A) 開発した CUBIC プロトコルでマウス全身・全臓器透明化を行う。(B) ライトシート顕微鏡を用いることで透明化組織の高速三次元撮影を行う。(C) 透明化組織に対して核染色および免疫染色を行うことにより個体の包括的な定量解析が可能となる。

3. 透明化手法

生体組織を透明化する試みは100年以上前から取り組まれており、組織透明化にあたり光の散乱と吸収を抑制することが課題であると考えられていた。特に散乱の抑制は重要視されており、光散乱物質である脂質の除去、高屈折率溶媒を用いた屈折率均一化など光散乱を抑制する様々な透明化手法が開発されている。最初の組織透明化手法は約一世紀前に Spalteholz 博士によって開発された手法であり、臓器に対して脱水処理を行い、その後高屈折率の有機溶剤に浸透させるという手法である [3]。この方針に基づき開発された BABB(ベンジルアルコール/安息香酸ベンジル) 試薬による透明化が主流であったが [2]、2012年にテトラヒドロフランによる脱水処理後にジベンジルエーテルを浸透させる THF-DBE [4]、THF-DBE を用いた三次元イメージング手法 3DISCO [5]、2014年に免疫染色に特化した三次元イメー

ジング手法 iDISCO [6] が開発された。これらの透明化手法は速やかに十分な透明度が得られるが、脱水処理および高屈折率の有機溶剤に浸透させる過程において蛍光タンパク質が退色するという問題を抱えていた。一方、2011年に理化学研究所・脳科学総合研究センターの宮脇グループによって開発された蛍光タンパク質の退色を引き起こさない水溶性透明化試薬 Scale は尿素を主成分としており光の散乱の主因である脂質を溶出する [7]。2012年には理化学研究所・多細胞システム形成センターの今井グループが開発した形態保存性の良い透明化試薬 SeeDB は高濃度のフルクトースで構成されており、屈折率の均一化を促進する事で脳の深部観察を可能にした [8]。2013年には電気泳動法を用いて脂質を除去する CLARITY が [9]、2014年には CLARITY をベースにした透明化手法 PACT-PARS が開発された [10]。これらの透明化試薬、透明化手法は主に屈折率の均一化、散乱の主因である脂質の除去に着目し開発されており、成体マウス脳を始めとして複数臓器の三次元イメージングに成功した。しかし蛍光タンパク質の退色問題、試薬・プロトコールの安全性や簡便さの問題、最終的な透明度の問題等を全て解決する透明化手法は存在しなかった。また、赤血球に含まれるヘモグロビンや筋肉に含まれるミオグロビンなど内在性の色素が豊富である心臓や肝臓といった臓器は屈折率の均一化、脂質の除去に主眼をおいた従来の透明化手法ではライトシート顕微鏡を用いて観察するために十分な透明度を得る事ができなかった。これら色素を豊富に含む臓器を一細胞解像度で包括的に観察するためには光を吸収する生体色素を効率的に除去する透明化試薬を開発する必要がある [11]。

申請者らは理化学研究所・宮脇博士らが2011年に開発した水溶性透明化試薬 Scale の改良に取り組み、脳懸濁液を用いて40種類の化合物の透明化活性をハイスループットに定量した。その結果、Scale で報告された尿素に加え、アミノアルコールが脳に対して高い透明化活性を持つことを見出した。このスクリーニング結果に理化学研究所・今井博士らが2013年に報告した高濃度糖溶液を用いた屈折率均一化手法を組み合わせることによって、水溶性透明化試薬を用いた成体マウス全脳透明化に成功した。申請者らが以前に開発した CUBIC の透明化試薬は尿素、糖、そしてアミノアルコール等で構成されており、この試薬は蛍光シグナルの保存性の問題、試薬・手法の安全性・簡便さの問題、ライトシート顕微鏡で脳を観察するために必要な透明度の問題を解決することができた [12]。

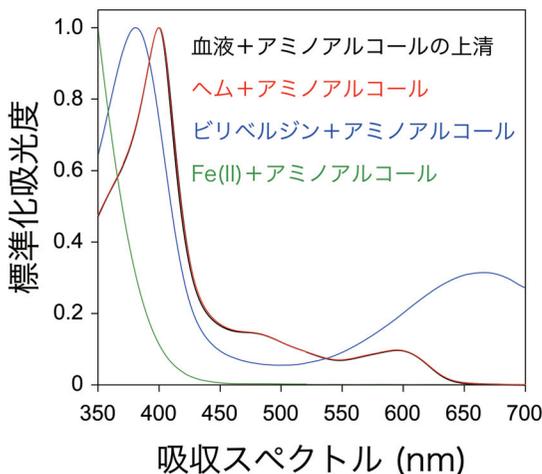


図2. アミノアルコールによる血液中のヘムの溶出 血液とアミノアルコールを混合すると黒緑色を呈する。血液+アミノアルコールの上清の吸収スペクトル(黒色)はヘム+アミノアルコールの吸収スペクトル(赤線)と完全に一致した。一方で、ヘムの代謝物であるビリベルジン(青線)や二価鉄とアミノアルコール(緑線)の吸収スペクトルとは全く異なっていた。このことから、アミノアルコールが血液中のヘムを溶出していることが分かる。

さらに申請者らは全脳イメージングのために開発した透明化試薬が、血液を効率的に脱色することを発見した。脳懸濁液に対する透明化活性のスクリーニングで選別された化合物がどのようにして血液を脱色しているのか探索したところ、透明化試薬中に含まれるアミノアルコールが血液中のヘムを高効率に溶出する性質を持っていることを明らかにした(図2)。

そしてこのアミノアルコールが持つ脱色活性に着目することで、マウス臓器透明化を10日間で、マウス個体全身透明化を14日間で可能にする“CUBIC 還流プロトコール”を開発した。このプロトコールはマウスを4%パラホルムアルデヒド(PFA)水溶液の大量還流によって固定した後に血液の脱色作用をもつCUBIC 試薬を経心臓的に循環させる。ヘムを含有している脾臓および腎臓は希釈したCUBIC 試薬を全身還流した直後から脱色が確認される(図3A)。その後、臓器(心臓・肺・腎臓・肝臓)をCUBIC 試薬に10日間震盪することで臓器丸ごと透明化、また、皮膚を剥離したマウス個体を2週間震盪することで個体全身丸ごと透明化を行った(図3B)。この手法は血管系を介して臓器の内側から透明化を、CUBIC 試薬中で震盪させることで臓器の外側から透明化を進めるため、今まで困難であった10cm オーダーの大きさを持つサンプルの透明化が可能となった。

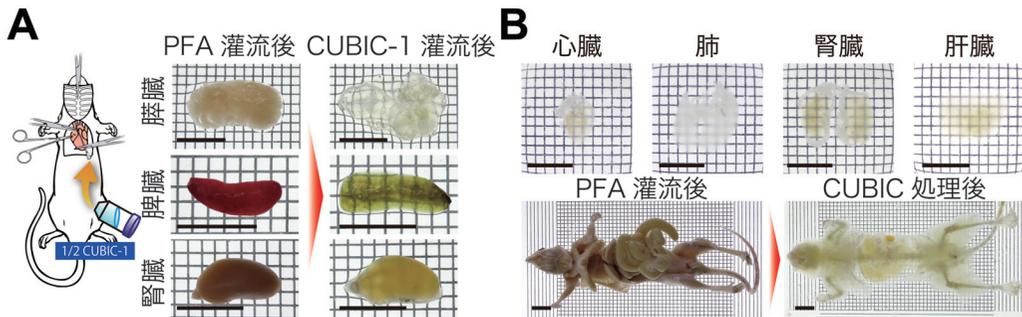


図3. CUBIC 還流法による全身・全臓器透明化 (A) CUBIC 液の全身還流により組織内部からの透明化を行った。ヘムを含有している臓器は CUBIC 液の還流直後から脱色が始まる。(B) CUBIC 灌流後の全身・臓器を CUBIC 液中で振盪することにより組織外部からの透明化を行った。上は成体マウスの透明化後心臓、肺、腎臓、肝臓で、下は透明化前の成体マウス、透明化後の生体マウスである。(スケールバー：1cm)

4. 臓器丸ごと・個体丸ごと高速一細胞解像度イメージング

透明化手法の開発において蛍光タンパク質の退色は非常に重要な課題であるが、CUBIC 試薬は蛍光タンパク質の退色をほとんど引き起こさないため、これまでに作製されてきた様々なレポーターマウスに適応可能である。申請者らは EGFP、YFP、mKate2、mCherry といった蛍光タンパク質を内在性に発現しているレポーターマウスに対して SYTO16、Propidium iodide といった蛍光色素を用いて核染色を行う事により臓器丸ごと・個体丸ごとイメージングを行った。ライトシート顕微鏡は点操作ではなく面撮影を行うため1細胞解像度の三次元イメージングデータを1時間程で取得することが可能であり、一個体からサンプリングした全臓器のイメージングは一日以内に完了する。筆者らが使用しているライトシート顕微鏡では縦3cm、横2cm 程度のサンプルを撮像できる。そこで、b-actin-nuc-3×

mKate2ノックインマウスの心臓を透明化の際に SYTO16で核染色し、心臓まるごとイメージングを行った。拡大断面図ではそれぞれの細胞の核が紫色のドットで観察される(図4A)。また生後一日の CAG-EGFP トランスジェニックマウス個体全身を透明化の際に Propidium Iodide で核染色し、個体丸ごとイメージングを行った(図4B)。

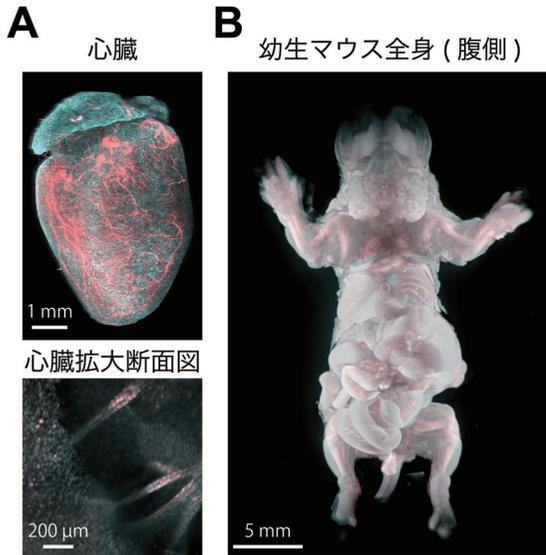


図4. 全身・全臓器一細胞解像度イメージング (A) 細胞に蛍光タンパク質(赤色:mKate)が発現している b-actin-nuc-3×mKate2ノックインマウスの心臓を、核染色剤(青色:SYTO16)で染色し、心臓イメージングを行った。(B) 細胞に蛍光タンパク質(赤色:EGFP)が発現している生後一日の幼若マウス個体全身を、透明化の際に核染色剤(青色:Propidium Iodide)で染色し、個体丸ごとイメージングを行った。

5. 個体レベルのシステム生物学

申請者らの開発した透明化手法を用いて簡便に一細胞解像度の高速三次元イメージングを臓器レベルで観察することができた。この技術を免疫組織化学、解剖学、病理学に応用することで、臓器の生理現象を一細胞解像度で包括的に描出することが可能となりつつある。

a. 一細胞解像度三次元免疫組織化学

透明化技術をヒトの組織の解剖学・病理学解析等に適用するためには、免疫染色法への応用が必須である。申請者らは透明化処理を行った臓器に対して免疫染色を行い、胃の平滑筋などを染色する事に成功した(図5A)。これまでの生物学・医学で積み重ねられてきた生体分子を観察する技術を用いることができるだけでなく、病理診断と言った医療への応用が期待できる。

b. 一細胞解像度三次元解剖学

レポーターマウスの臓器に対して核染色を行うことにより臓器の三次元イメージを得ることが出来る。これらの三次元イメージを IMARIS、ImageJ、そして AutoQuant などのソフトを用いて画像解析を行うことにより、解剖学的部位により異なる細胞核の密度分布そしてレポーターマウスの種類により異なる蛍光タンパク質の発現パターンを抽出することができる。これらの画像解析により、心臓では冠動脈を始めとして心室・心房また弁構造を、肺では気管支を抽出した(図5B)。これは従来解剖学で扱われてきた臓器に対して、組織学で達

成されてきた細胞レベルの観察が可能になったことを意味する。

c. 一細胞解像度三次元病理学

臓器の一細胞解像度の高速イメージングが病理学的解析に用いることができるかを調べるためにストレプトゾトシン誘導糖尿病モデルマウスを作製し三次元病理解析を試みた。ストレプトゾトシンは膵臓の β 細胞を特異的に破壊するためストレプトゾトシンをマウスに大量投与することにより糖尿病を誘導することができる。また膵臓においてランゲルハンス島は非常に高い細胞密度を持つ事を利用してランゲルハンス島の体積・個数を統計解析する手法を構築し、糖尿病モデルマウスのランゲルハンス島の体積分布の定量的評価を行った(図5C)。この解析により糖尿病モデルマウスにおいて膵島の体積・個数が減少していること、また膵管近位部に存在する $1.0 \times 10^7 \mu\text{m}^3$ より大きいランゲルハンス島が特に減少していることが確認された。

6. おわりに

包括的に哺乳類個体の細胞ネットワークを観察する技術を開発することにより「個体レベルのシステム生物学」が可能となった。申請者らの開発した透明化手法は臓器を均一に染色することのできる免疫組織化学染色法と組み合わせる事によって分子から細胞そして個体という多階層にわたる複雑な生命現象の解明に更なる力を発揮すると期待できる。本技術は基礎医学・生物学への貢献のみならず、病理学・再生医学など医療応用が可能である。既に申請者は全身病態の理解を目指し、癌転移の時系列的変遷、薬剤による癌微小環境変化といった全身性疾患の病態可視化に取り組んでいる。また申請者らが開発した全身全細胞解析プラットフォームは創薬において重要な役割を持つ。CUBICを用いることにより、医薬品が作用する細胞種の特定および、医薬品の予期せぬ体内局在などを明らかにすることが可能となる。全細胞解析プラットフォームは治療効果の定量的評価を行うための革新的な基盤技術となることが予想される。

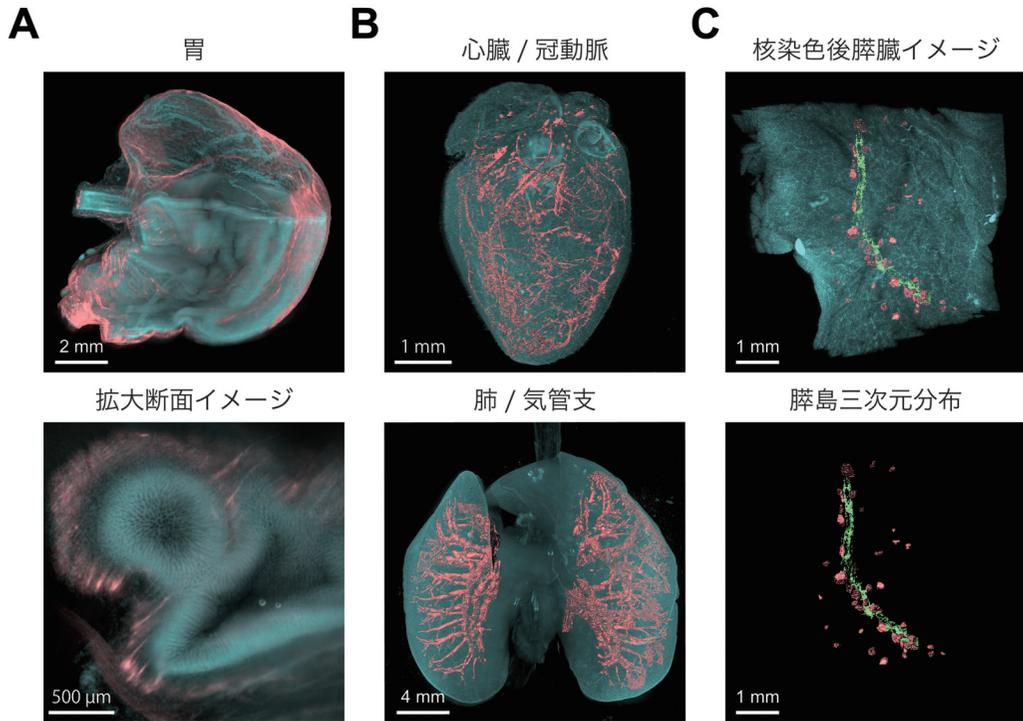


図5. 個体レベルのシステム生物学 (A)核染色剤(青色:SYTO16)により染色した胃を、平滑筋アクチンに対する蛍光標識抗体で免疫染色(赤色: α -SMA Cy3)し、ライトシート顕微鏡を用いて撮影した。CUBICと免疫染色を組み合わせることで、臓器丸ごとの三次元イメージングに成功した。(B)細胞核の密度の違いや蛍光タンパク質の発現パターンの違いから、画像解析により臓器の特徴的な構造を抽出できる。心臓の冠動脈(赤色)、肺の気管支(赤色)などを一細胞解像度で抽出できた。(C)糖尿病を発症したマウス、および健常マウス由来の膵臓を透明化するとともに核染色剤(青色:Propidium Iodide)で染色して、膵臓の三次元イメージングを行った。画像解析により細胞核が密集したランゲルハンス島(赤色)や膵管(緑色)の構造の三次元分布を抽出することにより三次元病理解析を行った。

7. 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、ご指導をいただいた東京大学医学系研究科上田泰己教授、洲崎悦生講師、新潟大学脳研究所田井中一貴特任教授に深く感謝致します。また本論文の一部は下記雑誌に報告しております。

久保田晋平、田井中一貴、上田泰己、1細胞解像度個体全身三次元イメージング、細胞工学、Vol.34 No.3(2015)

Tainaka, K., **Kubota, S.I.**, Suyama, T.Q., Susaki, E.A., Perrin, D., Ukai-Tadenuma, M., Ukai, H., and Ueda, H.R. (2014). Whole-body imaging with single-cell resolution by tissue decolorization. *Cell* 159, 911-924.

Tainaka, K., Kuno, A., **Kubota, S.I.**, Murakami, T., and Ueda, H.R. (2016). Chemical principles in

tissue clearing and staining protocols for whole-body cell profiling. *Annu Rev Cell Dev Biol* 32, 713-741.

8. 参考文献

- 1) Tainaka, K., **Kubota, S.I.**, Suyama, T.Q., Susaki, E.A., Perrin, D., Ukai-Tadenuma, M., Ukai, H., and Ueda, H.R. (2014). Whole-body imaging with single-cell resolution by tissue decolorization. *Cell* 159, 911-924.
- 2) Dodt, H.U., Leischner, U., Schierloh, A., Jahrling, N., Mauch, C.P., Deininger, K., Deussing, J.M., Eder, M., Zieglgansberger, W., and Becker, K. (2007). Ultramicroscopy : three-dimensional visualization of neuronal networks in the whole mouse brain. *Nat Methods* 4, 331-336.
- 3) Spalteholz, W. (1914). U"ber das Durchsichtigmachen von menschlichen und tierischen Pra"paraten. Leipzig : S Hierzel.
- 4) Becker, K., Jahrling, N., Saghafi, S., Weiler, R., and Dodt, H.U. (2012). Chemical clearing and dehydration of GFP expressing mouse brains. *PLoS One* 7, e33916.
- 5) Erturk, A., Becker, K., Jahrling, N., Mauch, C.P., Hojer, C.D., Egen, J.G., Hellal, F., Bradke, F., Sheng, M., and Dodt, H.U. (2012). Three-dimensional imaging of solvent-cleared organs using 3DISCO. *Nat Protoc* 7, 1983-1995.
- 6) Renier, N., Wu, Z., Simon, D.J., Yang, J., Ariel, P., and Tessier-Lavigne, M. (2014). iDISCO : a simple, rapid method to immunolabel large tissue samples for volume imaging. *Cell* 159, 896-910.
- 7) Hama, H., Kurokawa, H., Kawano, H., Ando, R., Shimogori, T., Noda, H., Fukami, K., Sakaue-Sawano, A., and Miyawaki, A. (2011). Scale : a chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain. *Nat Neurosci* 14, 1481-1488.
- 8) Ke, M.T., Fujimoto, S., and Imai, T. (2013). SeeDB : a simple and morphology-preserving optical clearing agent for neuronal circuit reconstruction. *Nat Neurosci* 16, 1154-1161.
- 9) 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.
- 10) Yang, B., Treweek, J.B., Kulkarni, R.P., Deverman, B.E., Chen, C.K., Lubeck, E., Shah, S., Cai, L., and Gradinaru, V. (2014). Single-cell phenotyping within transparent intact tissue through whole-body clearing. *Cell* 158, 945-958.
- 11) Tainaka, K., Kuno, A., **Kubota, S.I.**, Murakami, T., and Ueda, H.R. (2016). Chemical principles in tissue clearing and staining protocols for whole-body cell profiling. *Annu Rev Cell Dev Biol* 32, 713-741.
- 12) 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, 726-739.3

