

研 究 報 告 書

「組織 3D 染色による細胞の網羅的解析技術の開発」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2015(H27)年 10 月～2019(H31)年 3 月

研 究 者: 洲崎 悦生

1. 研究のねらい

本研究課題では、研究代表者が構築を進めていた臓器全体・全身の組織を光学的に透明化する新技術「CUBIC (Clear, Unobstructed Brain/Body imaging Cocktails and Computational analysis)」技術を活用・拡張し、3次元的に全ての細胞を1細胞解像度で観察するためのパイプライン「セルオミクスパイプライン」を構築すること、および組織学的染色技術を中心としたさまざまな細胞ラベリング系と組み合わせて医学生物学的課題への適応を進めることを主要課題とした。具体的に以下のサブテーマを設定し研究を推進した。

サブテーマ1: 臓器スケール・細胞解像度の3次元観察・解析パイプラインの構築

セルオミクスの実現に必須である、臓器全体を細胞解像度で高速に観察する技術の確立のため、世界最高性能の観察用顕微鏡システム、及び基本的な画像処理システムの構築を目指した。

サブテーマ2: CUBICの医学生物学的应用を目指す実証例の蓄積

CUBICによる3次元観察技術を具体的な医学生物学的課題に適応し社会実装を進めるため、臓器全体の網羅的イメージングを用いた研究プロジェクトの実施を目指した。ヒト病理組織を用いた検証実験を計画し、「3次元病理学」実現への可能性を検討した。

サブテーマ3: 染色剤・抗体の3次元組織内への浸透原理解明と高効率3次元染色プロトコル構築

3次元染色技術との組み合わせによるセルオミクス確立のため、マウス全脳やヒト組織ブロック等 (cmオーダー) の染色理論の確立と染色プロトコル構築を目指した。さらに、構築したプロトコルを用いて実際に臓器スケールの定量的1細胞解析を実証することを目指した。

以上の項目を強力に推進すると同時に、CUBIC 技術を含む光学的 3 次元観察技術の普及・発展のためのさまざまな活動を行うことも主要な実施項目とした。

2. 研究成果

(1) 概要

サブテーマ 1: 臓器スケール・細胞解像度の 3 次元観察・解析パイプラインの構築

セルオミクスの実現に必須である、臓器全体を細胞解像度で高速に観察する技術の確立を目指し、我々はマウス全脳の細胞解像度イメージを最速 10 分強で取得可能な世界最高性能のライトシート顕微鏡システム「GEMINI」の構築および運用体制の確立に成功した。さらに、取得した画像の基本的な前処理や検出された細胞をコンピューター上で検出し位置情報とするための一連の解析プログラムを整備した。

サブテーマ 2: CUBIC の医学生物学的应用を目指す実証例の蓄積

CUBIC による 3 次元観察技術を用いた具体的な医学生物学的課題に適応し社会実装を進めるため、睡眠研究へ応用しマウス全脳の活動状態遷移のモニタリング例を示した。また、マウス脾臓、トリ胚、マーマセット全脳などを用いた共同研究プロジェクトへ貢献した。さらに、我々はヒト病理組織を用いた検証実験を大阪大学病理学教室との共同研究で推進し、「3 次元病理学」の実証例を論文化して発表した。

サブテーマ 3: 染色剤・抗体の 3 次元組織内への浸透原理解明と高効率 3 次元染色プロトコル構築

3 次元染色技術との組み合わせによるセルオミクス確立のため、マウス全脳やヒト組織ブロック等 (cm オーダー) の染色理論の確立と染色プロトコル構築を目指した。大型 3 次元組織への抗体や染色剤の浸透原理が不明であったため、我々はマテリアル化学の手法に基づく一連の実験を施行し、組織の化学的性質を明らかにし浸透条件を原理的に探索してプロトコルを構築した。本プロトコルを用いて、さまざまな抗体や染色剤で臓器スケールの染色および細胞解像度での観察が可能であることを実証した。

以上の実施項目に加え、CUBIC 技術を含む光学的 3 次元観察技術の普及・発展のための英文総説、日本語総説、日本語書籍等の執筆、国内外の学会やトレーニングコースでの講演及び講師、一般向けの啓蒙活動を多数行った。また、具体的な生物学的課題への適用を希望する研究者らと共同研究を進めた。

(2) 詳細

本研究課題では、臓器全体・全身の組織を光学的に透明化する新技術「CUBIC (Clear, Unobstructed Brain/Body imaging Cocktails and Computational analysis)」技術を活用・拡張し、3 次元的に全ての細胞を 1 細胞解像度で観察するためのパイプライン「セルオミクスパイプライン (図 1)」を構築すること、および組織学的染色技術を中心としたさまざまな細胞ラベリング系と組み合わせて医学生物学的課題への適応を進めることを目指す研究開発を推進した。

サブテーマ 1: 臓器スケール・細胞解像度の 3 次元観察・解析パイプラインの構築

セルオミクスの実現に必須である、臓器全体を細胞解像度で高速に観察する技術の確立を目指し、我々はマウス全脳の細胞解像度イメージを最速 10 分強で取得可能な世界最高性能のライトシート顕微鏡システム「GEMINI」の構築および運用体制の確立に成功した (図 2A)。「GEMINI」は前後 2 軸のマクロズーム顕微鏡による観察系と左右 2 軸からのライトシート照明系を組み合わせた 2 x 2 軸マクロライトシート顕微鏡であり、照明面・観察面の深部を補完しながら撮影することが可能である。サンプル全体をライトシート最薄部でカバーするため、照明光はフォーカス位置を任意の幅で移動させながら撮影することが可能である。さらに、サンプルを上部から吊るす機構を採用し、高速なステージと組み合わせることで、最大 2.5 fps (6.7 分 / 1000 枚) の高速画像取得を実現した。以上の機構を実装することで、マウス全脳のラフスキ

ヤンを最速 13 分程度、約 9 x 9 x 9 um voxel サイズの精細な細胞解像度画像を 45 分程度で撮影することが可能となった。

さらに、取得した画像の基本的な前処理や検出された細胞をコンピューター上で検出し位置情報とするための一連の解析プログラムを整備した。本顕微鏡では細胞解像度の等方的画像(xyz の幅がほぼ同じで、正立方体の voxel となっている画像)を撮像することが可能であり、比較的シンプルな細胞検出アルゴリズムを適応することでラベルされた細胞を良い精度で検出できることがわかった。本研究成果は現在投稿論文として発表準備中である。

サブテーマ 2: CUBIC の医学生物学的应用を目指す実証例の蓄積

CUBIC による 3 次元観察技術を具体的な医学生物学的課題に適応し社会実装を進めることを目指し、CUBIC と post in situ hybridization による検証系を睡眠研究へ応用した。神経活動を遺伝学的にラベルすることができる Arc-dVenus トランスジェニックマウスを用い、NMDA レセプター受容体阻害剤投与下におけるマウス全脳の活動状態モニタリングを CUBIC を使って行うとともに、活動神経細胞の細胞種を同定するために高感度な in situ hybridization 系を導入し CUBIC により得られたデータの検証を行うプロジェクトを推進した。本成果は CUBIC による大規模な細胞ネットワーク解析例として論文発表した(Tatsuki et al. Neuron 2016, 本研究者 co-first)。また、実際の生物学的課題に対する適応のための共同研究プロジェクトを推進し、マウス脾臓、トリ胚、マーモセット全脳などを用いた CUBIC の実証例を発表した(Yamamoto et al. Nature communications 2017; Watanabe et al. Developmental Biology 2018; Tainaka et al. Cell Reports 2018)。さらに、我々はヒト病理組織を用いた検証実験を大阪大学病理学教室との共同研究で推進した。本プロジェクトでは実際のヒト固定組織を用いた透明化の検証を行うとともにパラフィン包埋法によりアーカイブされた臨床病理検体にも透明化および 3 次元観察法を適応し、CUBIC が従来の病理検査手法とコンパチブルであることを示した。また、3 次元観察によりリンパ節内の微小ながん転移を 100%の感度で検出できることを示した。本研究成果は「3 次元病理学」の実証例として論文化し発表した(Nojima et al. Scientific Reports 2017)。

サブテーマ 3: 染色剤・抗体の 3 次元組織内への浸透原理解明と高効率 3 次元染色プロトコル構築

3 次元染色技術との組み合わせによるセルオミクス確立のため、これまで極めて困難と考えられてきたマウス全脳やヒト組織ブロック等 (cm オーダー) を抗体や染色剤で組織学的に染色するための理論の確立と染色プロトコルの構築を目指した。大型 3 次元組織への抗体や染色剤の浸透原理が不明であったため、我々はまず東京大学物性研究所の柴山充弘教授の研究グループと共同でマテリアル化学の手法に基づく一連の実験を施行し、組織の化学的性質を詳細に明らかにした。解明された組織のマテリアルとしての性質をもとに、染色剤や抗体の高浸透条件を原理的に探索してプロトコルを構築した。本プロトコルを用いて、神経・グリア等の各細胞種マーカー、神経突起や血管などの構造マーカー、c-Fos や Arc などの神経活動マーカーなどの多種類の抗体を用いた成体マウス全脳の染色に成功した。本研究成果は現在論文発表準備中である。

以上のサブテーマ実施に加え、CUBIC 技術を含む光学的 3 次元観察技術の普及・発展のための英文総説(Susaki and Ueda, Cell Chemical Biology 2016; Tsujino et al. J Physiological Sciences 2015)、日本語総説(計 11 報)、日本語書籍等の執筆、国内外の学会やトレーニングコースでの講演及び講師(オーストラリア light sheet microscopy workshop 2017, ドイツ EMBO light sheet practical course 2018 など)、一般向けの啓蒙活動を多数行った。また、領域内の共同研究のほか、神経科学分野での適用を目指すため、東京大学東原研究室(宮道和成博士)やシンガポール AStar(Dr. Yu Fu)との共同研究を進めた。



図1:セルオミクスパイプラインの概略図

臓器全体や全身の細胞を様々なラベリング法で可視化し、高度な組織透明化・3 次元光学イメージング・画像解析による生物学的情報取得をつないだ一連のフローにより、臓器全体や全身の網羅的細胞観察・解析技術が実現できると考えた。Susaki and Ueda, Cell Chemical Biology (Review article) 2016 より改変。

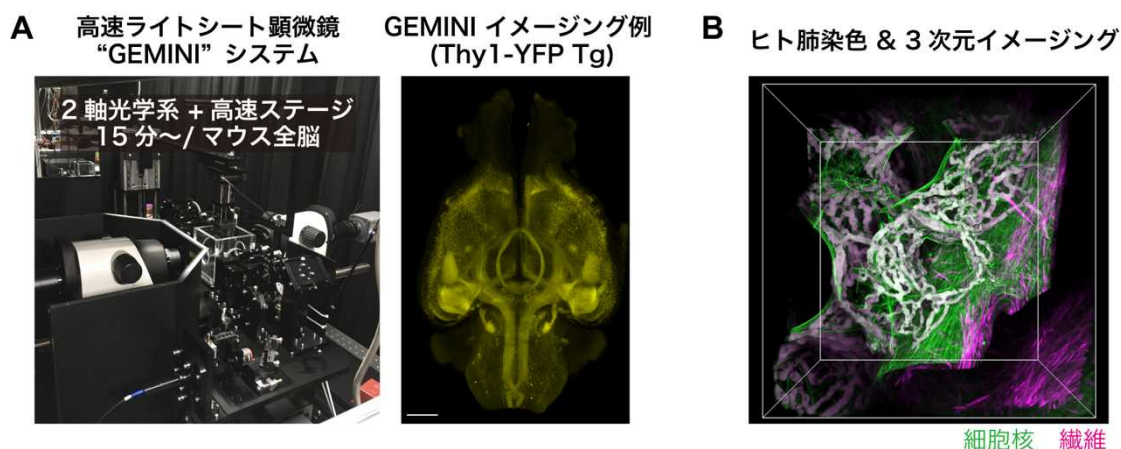


図2:(A)世界最高性能をもつ高速 3 次元透明化組織画像取得システム GEMINI(2 軸光学系 x2 軸照明系マクロライトシート顕微鏡)。(B) 3D 病理学的応用の例。ヒト肺の 3 次元染色・観

察例。Nojima et al. Scientific Reports 2017 より抜粋。

3. 今後の展開

本研究課題で取り組んだセルオミクスパイプラインの完成により、全臓器スケールの網羅的細胞解析や細胞回路解析が実現されると見込まれ、神経科学をはじめとする生命科学の手法に大きな変革をもたらすと期待される。また、本研究課題中に示したように、3次元観察技術は臨床病理学への応用にも有用である。このため、今後より客観的で高感度な診断確度を元に、広範な臨床病理学の現場での利用、標準的な診断法としての普及が期待できると考える。

4. 評価

(1) 自己評価

本研究課題では、セルオミクスパイプラインの構築、3次元組織学プロトコルの構築など極めて挑戦的な課題に取り組み、総体として当初の目的を達成できた。また、多数の外部発表や共同研究体制の構築など、予想以上の成果を収めた部分もあった。研究実施においては適切かつ計画に基づいた予算執行に務めた。CUBICをベースとした本技術はすでに透明化試薬の販売など社会実装が進んでおり、今後臨床病理学への適用を始めとして社会的な波及効果をもたらすと期待している。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)

CUBIC法の活用を進めるため、マウス全脳の細胞解像度イメージを最速10分強で取得できる高性能のライトシート顕微鏡システムと、取得した画像から各々の細胞をコンピューター上で検出し位置情報とする解析プログラムを開発し、マウス全脳の活動状態の遷移のモニタリングすることに成功しました。また、ヒト病理組織を用いた「3次元病理学」を大阪大学と推進し、実証例を論文発表しました。さらに、CUBIC法での透明化脳の基本物性をヒドロゲルとして理解し、この観点を活かして、10種類以上の抗体を用いた全脳イメージングに成功し、関連プロトコルを整備しました。成果は、着実に論文化されており、さきがけ内外との共同研究も活発に進めていることを含めて、優れた成果を高く評価をします。

さきがけ領域会議で幅広い知識を背景とした積極的なコメントで、領域内の討論を積極的また刺激的にリードしました。この領域の研究者同士が、積極的に前向きな議論をする風土醸成への貢献に対し、「特別賞」を贈りました。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Tainaka K*, Murakami TC*, Susaki EA, Shimizu C, Saito R, Takahashi K, Hayashi-Takagi A,

<p>Sekiya H, Arima Y, Nojima S, Ikemura M, Ushiku T, Shimizu Y, Murakami M, Tanaka KF, Iino M, Kasai H, Sasaoka T, Kobayashi K, Miyazono K, Morii E, Isa T, Fukayama M, Kakita A, Ueda HR. Chemical Landscape for Tissue Clearing Based on Hydrophilic Reagents. Cell reports 24(8): 2196–2210.e9, 2018. *co-first</p>
<p>2. Nojima S, Susaki EA, Yoshida K, Takemoto H, Tsujimura N, Iijima S, Takachi K, Nakahara Y, Tahara S, Ohshima K, Kurashige M, Hori Y, Wada N, Ikeda JI, Kumanogoh A, Morii E, Ueda HR. CUBIC pathology: three-dimensional imaging for pathological diagnosis. Scientific reports 7(1): 9269, 2017.</p>
<p>3. Tatsuki F,* Sunagawa GA*, Shi S*, Susaki EA*, Yukinaga H*, Perrin D*, Sumiyama K, Ukai-Tadenuma M, Fujishima H, Ohno RI, Tone D, Ode KL, Matsumoto K, Ueda HR. Involvement of Ca²⁺-Dependent Hyperpolarization in Sleep Duration in Mammals. Neuron 90(1): 70–85, 2016. *co-first</p>
<p>4. Susaki EA, Ueda HR. Whole-body and Whole-Organ Clearing and Imaging Techniques with Single-Cell Resolution: Toward Organism-Level Systems Biology in Mammals. Cell Chemical Biology 23(1): 137–157, 2016. (Review article)</p>

(2)特許出願

なし

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

(主要な講演)

1. Tissue clearing and 3D imaging: basics and applications. Etsuo A. Susaki. EMBO practical course on light sheet microscopy, Max Planck Institute of Molecular Biology and Genetics, Aug. 2nd, 2018.
2. CUBIC-HistoVIsion: a pipeline for 3D whole-organ/body staining and imaging with single-cell resolution based on chemical properties of tissue gel. Etsuo A. Susaki. SBIC seminar, A*STAR, Singapore, Jul. 9th, 2018. (Host: Dr. Yu Fu)
3. CUBIC: a whole-organ/body cell-omics pipeline with tissue clearing, 3D imaging and informatics. Etsuo A. Susaki. SIGN Immunology Seminar, A*STAR, Singapore. (Host: Dr. LaiGuan Ng)
4. CUBIC: A Platform for Cell-Omics Analysis Toward the Organism-Level Systems Biology. Etsuo A. Susaki, NUS-JST(PRESTO) joint workshop, Singapore, Dec. 9th, 2016.

(受賞等)

2017年4月 文部科学省 平成29年度科学技術分野の文部科学大臣表彰・若手科学者賞「個体レベルのシステム生物学実現を目指す技術開発の研究」