

令和 5 年 5 月 17 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16498

研究課題名（和文）全脳ニューロンアトラスによる神経変性疾患モデルの一細胞解像度全脳病態解析

研究課題名（英文）Single-cell resolution whole-brain pathological analysis of neurodegenerative disease models using a comprehensive brain neuron atlas.

研究代表者

三谷 智樹 (Tomoki, Mitani)

大阪大学・大学院医学系研究科・招へい教員

研究者番号：90866534

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、成体マウス脳内のすべてのニューロンの位置情報を取得する手法の開発、全ニューロンによる包括的な全細胞アトラス (Neuron atlas) の作製、Neuron atlas を活用した微小神経変性病変を検出する解析法の開発を遂行し、いずれも実現した。神経変性モデルにおいて以前に報告されていなかった時期・場所での神経脱落を同定することが可能となった。このような成果から、大規模な3D細胞画像に基づいた新たなオミクス「セルオミクス」を提案するに至り、現在論文を投稿中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超高齢化社会において、アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患への関心が高まっている。これらの疾患では、治療が難しい神経細胞の喪失が起こる前に、予防的な医療介入が必要である。そのためには、神経細胞の喪失がいつ、どこで、どのように始まるのかを解明する必要がある。本研究では、マウスの脳内のすべての神経細胞の位置情報を特定する方法を開発し、正常時との神経細胞分布の違いを明らかにすることで、個々の細胞レベルで神経細胞の喪失箇所を包括的に同定することに成功した。

研究成果の概要（英文）：In this study, we have developed a method to acquire the spatial information of all neurons in the adult mouse brain, created a whole-brain comprehensive neuron atlas (Neuron atlas), and developed an analytical method utilizing the Neuron atlas to detect subtle neurodegenerative lesions. We have successfully achieved all of these objectives. It is now possible to identify neuronal loss in previously unreported time periods and locations within neurodegenerative models. Based on these achievements, we propose a new omics field called "Cellomics," which relies on large-scale 3D cellular imaging. We are currently in the process of submitting a paper on this topic.

研究分野：病態神経科学

キーワード：組織透明化 画像解析 ライトシート顕微鏡 アトラス 全細胞解析 神経変性疾患 セルオミクス 神経炎症

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会において、アルツハイマー病やパーキンソン病といった神経変性疾患の注目が高まっている。これらの疾患は、治癒が困難な神経脱落病変を含み、疾患を早期に診断・治療といった介入を行う先制医療の対象である。このような先制医療の実現には、疾患の超早期にみられる微小な神経脱落部位の特定と、そこでの疾患特異的な細胞種や因子の解析といった「神経変性ニッチ」の解明を行うことが不可欠である。病変の特定は、がんや炎症性疾患のような細胞数が増加する疾患では検出しやすいが、神経脱落のような細胞数が減少する病変の検出には、健常時の細胞数を基準とする解剖学的情報に沿った比較法を必要とする。2次元上で正確な定量が難しいため、アミロイドなどの沈着タンパク質をマーカーとして利用されているが、実際の神経脱落箇所と一致しない場合も多い。

一方、近年では、組織透明化技術とライトシート顕微鏡技術の進化により、3Dイメージング可能なサンプルの大きさ、解像度、データ取得速度が格段に向上してきている。申請者は、2019年にNature Protocols誌で高速高解像度ライトシート顕微鏡である「MOVIEシステム」を報告しており、マウス臓器内の全細胞の3D画像に基づいた全細胞解析(セルオミクス)を可能としてきた。本研究では、技術的に最先端である全細胞解析技術を用いて、神経変性ニッチの解明に取り組んだ。

## 2. 研究の目的

本研究では、マウス脳内の全神経細胞3D画像情報から個々の神経細胞の位置情報を特定し、健常時と疾患時の分布の差異を単一細胞レベルで明らかにするための技術開発を目的としている。これは、2次元切片を用いる従来の手法と異なり、3次元上での解析により解剖学的な位置をより精緻に一致させることを可能にし、神経変性ニッチの網羅的な検出を可能とする。

## 3. 研究の方法

成体マウス全脳全神経細胞の解析を行うためのパイプラインは、①組織透明化・3D免疫染色(神経細胞マーカー、ミクログリアマーカー、凝集タンパク質マーカー)、②高解像度イメージング、③3D細胞情報をデジタル化、アトラスへ統合し比較、の4段階からなる。

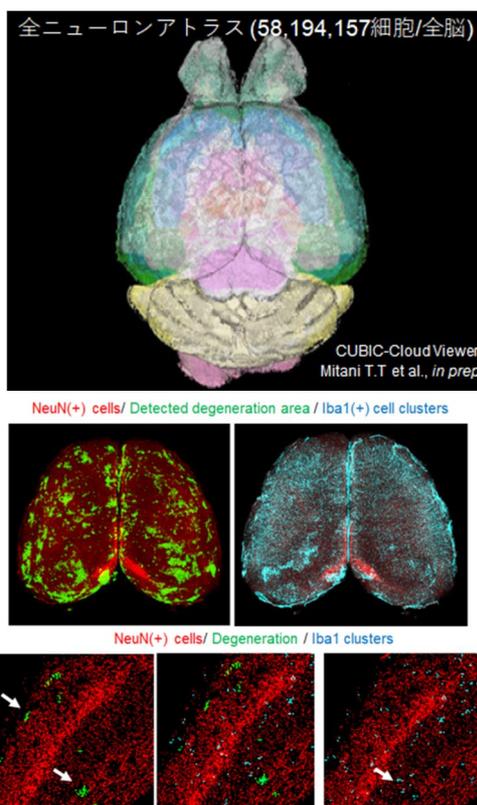
## 4. 研究成果

2019年に報告した全細胞解析法をもとに、より均一な全脳3D免疫染色や顕微鏡の高Z分解能化、細胞体局在シグナルへの検出最適化といった3つの改良を加えることで①~③を実現した。その最初の例として、8週例のマウス脳サンプルを用いて、必要な「ニューロンアトラス」を作製することに成功した。ニューロンアトラスは5,000万個にもものぼる全神経細胞の空間的な位置情報をもった参照地図となった(図上)。

このニューロンアトラスへ統合し解析を行うことにより、アルツハイマー病の無症候期におけるモデルマウス脳において、散在した神経変性病変とそこへのミクログリアの貪食像という新規の病変を見出すことに成功した(図下)。

この技術を複数の神経変性モデルにおいて応用し、疾患特異的な神経脱落病変の分布や、神経変性ニッチの詳細について解析をすることにも成功している。

本研究で提案するセルオミクス技術は、神経変性疾患の病態を理解するのみならず、様々な疾患への応用可能性があり、今後さらなる発展性が期待される。近年普及が爆発的に進んでいるsingle-cell RNA-seqを代表とするシングルセルオミクス



は有力な手法ではありながらも、解析可能な細胞が約数十万細胞、すなわちマウス臓器であれば、全細胞の 1%未満しか解析できないという課題がある。今回提案のセルオミクスは臓器内の細胞の空間情報を提供する強力な手法であり、病変の発生や進展に伴う細胞の時空間的な変動を検出することができ、より多角的な情報を補完することに寄与する。この情報を活用し、プロテオミクスやトランスクリプトームといったほかの分子的なオミクス技術と組み合わせたトランスオミクスのアプローチは、病変の早期段階からの細胞の変化を詳細に捉え、それらの情報を統合した解析を行うことができ、より高次元な生命現象の理解に貢献するものと期待できる。

現在、このようなセルオミクスの提案をした論文を分野内で高いインパクトのある国際学術誌にて revise を進めているところである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Tone, D., Ode, K. L., Zhang, Q., Fujishima, H., Yamada, R. G., Nagashima, Y., Matsumoto, K., Wen, Z., Yoshida, S. Y., Mitani, T. T., Arisato, Y., Ohno, R. I., Ukai-Tadenuma, M., Yoshida Garcon, J., Kaneko, M., Shi, S., Ukai, H., Miyamichi, K., Okada, T., Sumiyama, K., ... Ueda, H. R.	4. 巻 20
2. 論文標題 Distinct phosphorylation states of mammalian CaMKII control the induction and maintenance of sleep	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLoS Biology	6. 最初と最後の頁 オープンアクセスのみで頁無し
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pbio.3001813	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nojima, S., Ishida, S., Terayama, K., Matsumoto, K., Matsui, T., Tahara, S., Ohshima, K., Kiyokawa, H., Kido, K., Ukon, K., Yoshida, S. Y., Mitani, T. T., Doki, Y., Mizushima, T., Okuno, Y., Susaki, E. A., Ueda, H. R., & Morii, E.	4. 巻 14
2. 論文標題 A novel three-dimensional imaging system based on polysaccharide staining for accurate histopathological diagnosis of inflammatory bowel diseases	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cellular and molecular gastroenterology and hepatology	6. 最初と最後の頁 905-924
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jcmgh.2022.07.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tomoki T Mitani, Goichi Beck, Kansuke Kido, Rika Yamashita, Yuki Yonenobu, Takuya Ogawa, Chizu Saeki, Tatsusada Okuno, Seiichi Nagano, Eiichi Morii, Masato Hasegawa, Yuko Saito, Shigeo Murayama, Hideki Mochizuki	4. 巻 41
2. 論文標題 Amyotrophic lateral sclerosis with speech apraxia, predominant upper motor neuron signs, and prominent iron accumulation in the frontal operculum and precentral gyrus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuropathology	6. 最初と最後の頁 324-331
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/neup.12763	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tone, D., Ode, K. L., Zhang, Q., Fujishima, H., Yamada, R. G., Nagashima, Y., Matsumoto, K., Wen, Z., Yoshida, S. Y., Mitani, T. T., Arisato, Y., Ohno, R. I., Ukai-Tadenuma, M., Yoshida Garcon, J., Kaneko, M., Shi, S., Ukai, H., Miyamichi, K., Okada, T., Sumiyama, K., ... Ueda, H. R.	4. 巻 20
2. 論文標題 Distinct phosphorylation states of mammalian CaMKII control the induction and maintenance of sleep	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLoS Biology	6. 最初と最後の頁 オープンアクセスのみで頁無し
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pbio.3001813	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nojima, S., Ishida, S., Terayama, K., Matsumoto, K., Matsui, T., Tahara, S., Ohshima, K., Kiyokawa, H., Kido, K., Ukon, K., Yoshida, S. Y., Mitani, T. T., Doki, Y., Mizushima, T., Okuno, Y., Susaki, E. A., Ueda, H. R., & Morii, E.	4. 巻 14
2. 論文標題 A novel three-dimensional imaging system based on polysaccharide staining for accurate histopathological diagnosis of inflammatory bowel diseases	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cellular and molecular gastroenterology and hepatology	6. 最初と最後の頁 905-924
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jcmgh.2022.07.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 1件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 三谷 智樹
2. 発表標題 Cellomics-neurology by CUBIC, 3D immunostaining and high-speed imaging at whole-brain scale
3. 学会等名 第62回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三谷 智樹, 松本 桂彦, 堀口 修平, 上田 泰己
2. 発表標題 組織透明化技術 CUBIC を用いた全細胞シングルセル定量解析
3. 学会等名 量子生命科学会第2回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三谷 智樹
2. 発表標題 透明化脳で加速するセルオミクス
3. 学会等名 第63回日本神経学会学術学会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tomoki T. Mitani , Katsuhiko Matsumoto , Hiroki R.Ueda
2. 発表標題 Cellomics accelerated by cleared organs with an application for neurology
3. 学会等名 Neuro2022 ( 第45回日本神経科学大会 第65回日本神経化学会大会 第32回日本神経回路学会大会 )
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 T. T. MITANI, S. Y. YOSHIDA, K. YAMAURA, K. MATSUMOTO, E. A. SUSAKI, H. R. UEDA
2. 発表標題 Whole-brain neuron profiling identifies biological alterations in three-dimensional structure and function at a single-neuron level
3. 学会等名 Society for Neuroscience (SFN) Annual Meeting 2023 (Neuroscience 2022) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三谷 智樹, 松本 桂彦, 上田 泰己
2. 発表標題 マウス全脳全神経細胞イメージング
3. 学会等名 第14回「光塾」(光イメージング若手の会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------