

令和 6 年 5 月 8 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19105

研究課題名（和文）時空間・分子統合解析に向けた組織化学

研究課題名（英文）Histochemistry for spatiotemporal and molecular analysis

研究代表者

田井中 一貴（Tainaka, Kazuki）

新潟大学・脳研究所・教授

研究者番号：80506113

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、固定組織透明化・3Dイメージングにより、任意の時間における空間分布を1細胞解像度で解析し、それらの時空間情報を維持したまま標識細胞の遺伝子発現情報を包括的に解析するための組織化学の確立に取り組んだ。脱脂活性・RNAの保存性・GFP蛍光の保存性が良好な1,2-ヘキサジオールを用いた透過処理を発見した。また、GFP蛍光を高度に保存するために、 -30°C の条件下において透明化可能な低融点脱水溶媒・有機溶媒を開発した。更に、光シート照明型顕微鏡による3Dイメージング後のサンプルに対して、非常に簡便な溶液処理によりパラフィン包埋へとシームレスに接続できる化学処理法を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

蛍光タンパク質による細胞標識技術は、ライブイメージング(時間)、3Dイメージング(空間)、オミクス解析(分子)に展開されている。本研究は、これらの独立した解析モダリティを統合するための組織工学的手法であり、一動物から一連の情報を包括的に得ることが可能になる。同一マウス個体に紐づけて一連の多様な情報を抽出することが可能になるため、解析に用いるマウス個体数を大幅に削減できる、つまり動物愛護管理法3R原則のReductionの推進にも大きく貢献できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to establish tissue chemistry for comprehensive analysis of gene expression in labeled cells while maintaining spatiotemporal information using fixed tissue clearing and 3D imaging. Through a series of chemical screenings, we discovered that clearing processing using 1,2-hexanediol exhibited good delipidation activity, RNA preservation, and GFP fluorescence preservation. Additionally, we developed low-melting-point dehydration solvents and organic solvents that can be transparent at -30°C to effectively preserve GFP fluorescence. Furthermore, we established a chemical processing method that seamlessly connects to paraffin embedding through simple solution treatment for samples after 3D imaging using light sheet microscopy.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：組織化学 組織透明化・3Dイメージング 蛍光タンパク質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

蛍光タンパク質やケミカルプローブによる細胞標識技術は医学・生物学における生命現象解明のための基盤技術であり、そのアウトプットとしてライブイメージング(時間) 3D イメージング(空間) オミクス解析(分子)に展開されている。しかしながら、これらの解析手法はそれぞれ独立したモダリティであり、一個体から一連の情報を包括的に得るための簡便かつ汎用的な統合解析プラットフォームはまだ確立されていない。固定組織透明化・3D イメージングによる空間情報の関連づけ技術は、化学発光ライブイメージングとの融合により時空間イメージングを可能にした¹。しかしながら、既存の方法では、依然として蛍光タンパク質のシグナルを長期間保存可能な透明化法が開発されていない。また、1) RNA の保存が困難であること、2) 透明化による組織膨潤・化学処理のためパラフィンブロックとの組織形態差が大きいことにより、遺伝子発現の関連づけ技術への接続が困難であった。

2. 研究の目的

本研究は、標識細胞がいつ(時間) どこで(空間) どのような形質を持っているか(分子カタログ)を同一個体で統合的に解析するためのインフラとなる組織化学の創成を目的とする。そのため、任意の時間における組織中の標識細胞の空間分布を一細胞解像度で包括的に可視化する「固定組織透明化・3D イメージング」を基盤とし、任意の時空間座標上の標識細胞のオミクス解析へと接続する組織化学を確立する。具体的には、蛍光タンパク質のシグナルと共に RNA を高度に保持できる組織透明化手法を開発し、3D 画像から標識細胞の空間座標を特定する。同一サンプルからパラフィン包埋による二次元切片の切り出し、レーザーマイクロディセクション(LMD)法などによる網羅的分子解析への接続が可能な組織化学的手法を開発する。

3. 研究の方法

蛍光タンパク質のシグナルに対して保存性の高い有機溶媒ベースの透明化法の開発

固定組織透明化・3D イメージングから遺伝子発現の関連づけ技術へシームレスに接続するためには、イメージング時とその後のパラフィン包埋工程で大きな組織形態差が生じないことが求められる。この要件を満たすため、有機溶媒ベースの透明化法を開発した。ハイスループットに条件を検討するため、GFP を混入したアガロースゲルを作製し、GFP の蛍光保持能の評価系を構築した。また、有機溶媒中に発生する過酸化物が GFP の消光に関与するとの報告があるため、ヨウ化カリウム試験により過酸化物の発生量をスクリーニングした。スクリーニングで得られた条件を元に、CAG-EGFP マウスを用いて組織内の蛍光シグナル保持能を評価した。

RNA を高度に保持できる組織透明化方法の開発

固定組織透明化技術では、組織透明度を向上させるため、また抗体分子の組織浸透性を高めるために塩基性条件下の界面活性剤による脱脂を行うことが多いが、この条件下では RNA の大半が分解される。そこで、中性条件で脱脂可能な 1,2-ヘキサジオール水溶液²をベースとした、RNA 保持率の高い組織透明化方法を開発した。RNA の保存率は、マウス脳から抽出したトータル RNA と RNA 結合性蛍光色素との混合溶液の蛍光輝度によって評価された。

透明化・3D イメージングから遺伝子発現の関連づけ技術への接続が可能な組織化学の開発

BABB 法を含む有機溶媒で透明化された検体は脱水されているため、パラフィン包埋への置換が期待できる。しかしながら、BABB はパラフィンとは混和しないため、そのままではパラフィン包埋に移行できない。この問題を解決するため、パラフィンと混和可能な有機溶媒を探索し、透明化・3D イメージング後にパラフィン包埋による二次元切片の切り出しが可能な手法を開発した。なお、溶媒の混和性の推定は、ハンセン溶解パラメータを用いて実施した。

4. 研究成果

蛍光タンパク質のシグナルに対して保存性の高い有機溶媒ベースの透明化法の開発

アガロースゲルを用いたケミカルスクリーニングにより、過去に報告されているいずれの手法(BABB 法、DISCO 法、PEGASOS 法)においても、顕著な GFP 蛍光の消光が確認された。脱水過程では、アルコールやエーテルを用いて 30%の水溶液から 100%の有機溶媒に徐々に濃度を上昇させる。特に GFP 蛍光の減少が顕著なのは、100%脱水溶媒に置換する過程であることが判明した。また、この消光は温度依存的であり、低温であるほど GFP 蛍光の保持率が高いことが分かった。そこで、-30 °Cでも凝固しない脱水溶媒を開発し、-30 °Cで脱水を実施したところ、GFP 蛍光が強く保持されることが明らかとなった。また、脱水溶媒から透明化のための包埋溶媒への置換も低温で行う方が望ましいことが示された。この結果、過酸化物の発生が少ない様々な有機溶媒をスクリーニングした後、-30 °Cでも凝固しない透明化溶媒を開発した結果、GFP 蛍光は透明化後も強く保存されることが示された。我々は、この一連の不凍液を用いる新規透明化プロトコルを afDISCO と名付けた。実際に、CAG-EGFP マウス脳を用いて、比較的 GFP 蛍光が保存される CUBIC 法³および GFP 蛍光がほとんど消光しな

い EZ view 法と比較した結果、afDISCO は顕著に GFP 蛍光を保持していることが示された (図 1)。

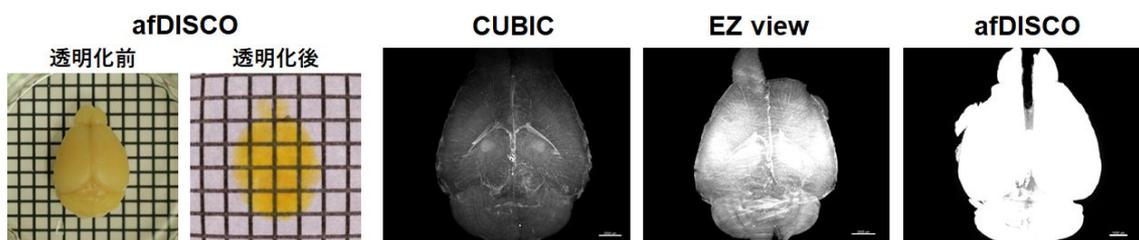
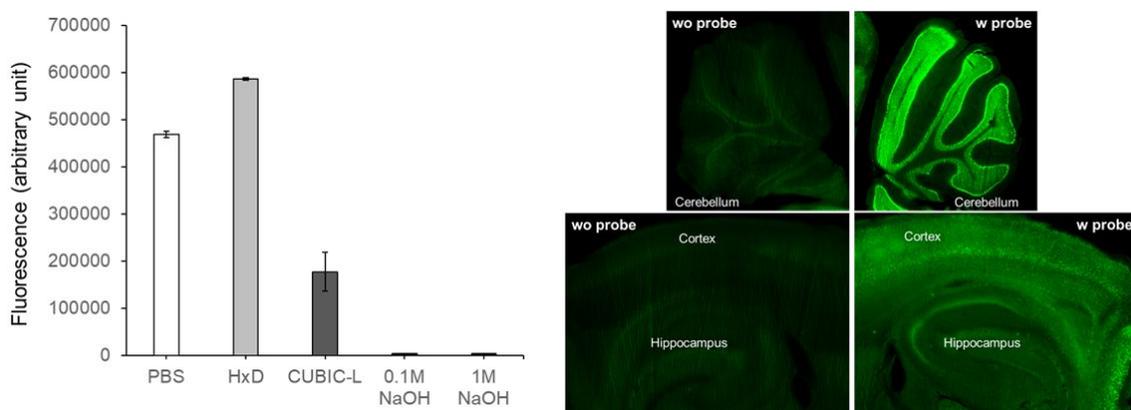


図 1 . afDISCO によるマウス脳の透過像および CAG-EGFP マウス脳の GFP 蛍光強度比較

RNA を高度に保持できる組織透明化方法の開発

1,2-ヘキサジオール水溶液と CUBIC-L、および水酸化ナトリウム水溶液を用いて 37 ℃、2 日間の処理後の RNA 保存率を確認した結果、1,2-ヘキサジオール水溶液が高度に RNA 分子を保存できることが示された (図 2)。また、マウス脳組織の RNA イメージングが可能であることを実証するために、mFISH3D 法⁴をベースに FITC 標識 DNA プロープにより rRNA をホールマウント染色し、3D イメージングが可能であることを示した (図 2)。今後は、特定の mRNA の特異的染色に加えて抗体染色を組み合わせた染色・透明化方法の開発を検討するため、1,2-ヘキサジオール水溶液を用いた透過処理と組み合わせたプロトコールの開発を行う予定である。



透明化・3D イメージングから遺伝子発現の関連づけ技術への接続が可能な組織化学の開発
ハンセン溶解パラメータから、パラフィンと BABB 共に混和可能な溶媒が安息香酸ベンジルであることが推定された。そこで、BABB で透明化された検体に対して、安息香酸ベンジルで洗浄操作を行い、パラフィン包埋に移行可能であるか検証した。その結果、シームレスにパラフィン包埋に移行できることが示された。今後は、ハンセン溶解パラメータによる推定手法を用いて、afDISCO で開発された有機溶媒に対する中間溶媒を開発し、パラフィン包埋への移行を検討する。

【引用文献】

1. Kubota SI et al., Cell Rep, 2017, 20(1), 236-250.
2. Inoue M et al., Bioorg Med Chem Lett, 2019, 29(15), 1886-1890.
3. Tainaka K et al., Cell Rep, 2018, 24(8), 2196-2210.e9.
4. Murakami TC and Heintz N, bioRxiv 2022.11.23.517711, doi: <https://doi.org/10.1101/2022.11.23.517711>

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Kai R, Takahashi K, Tainaka K, Iwakura Y, Namba H, Saito N, Sasaoka T, Yamaguchi S, Nawa H, Horii A.	4. 巻 12
2. 論文標題 Cerebrocortical activation following unilateral labyrinthectomy in mice characterized by whole-brain clearing: implications for sensory reweighting	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 15424
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-19678-4.	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 Hanaoka K, Iwaki S, Yagi K, Myochin T, Ikeno T, Ohno H, Sasaki E, Komatsu T, Ueno T, Uchigashima M, Mikuni T, Tainaka K, Tahara S, Takeuchi S, Tahara T, Uchiyama M, Nagano T, Urano Y.	4. 巻 144
2. 論文標題 General Design Strategy to Precisely Control the Emission of Fluorophores via a Twisted Intramolecular Charge Transfer (TICT) Process	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Am Chem Soc.	6. 最初と最後の頁 19778-19790
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/jacs.2c06397.	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 Funayama K, Tainaka K, Koyama A, Katsuragi-Go R, Nishikawa-Harada N, Higuchi R, Aoyama T, Watanabe H, Takahashi N, Takatsuka H.	4. 巻 12
2. 論文標題 Detection and Morphological Analysis of Micro-Ruptured Cortical Arteries in Subdural Hematoma: Three-Dimensional Visualization Using the Tissue-Clearing Clear, Unobstructed, Brain/Body Imaging Cocktails and Computational Analysis Method	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Diagnostics (Basel).	6. 最初と最後の頁 2875
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/diagnostics12112875.	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 Nakamura Y, Kurabe M, Matsumoto M, Sato T, Miyashita S, Hoshina K, Kamiya Y, Tainaka K, Matsuzawa H, Ohno N, Ueno M.	4. 巻 12
2. 論文標題 Cerebrospinal fluid-contacting neuron tracing reveals structural and functional connectivity for locomotion in the mouse spinal cord	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Elife	6. 最初と最後の頁 e83108
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.83108.	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 田井中一貴
2. 発表標題 マウス全身・ヒト脳組織透明化技術
3. 学会等名 第56回 実験動物技術者協会 総会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田井中一貴
2. 発表標題 組織夾雑系を可視化する特異的ケミカルプローブの開発戦略
3. 学会等名 分子夾雑の生命化学 成果とりまとめシンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kazuki Tainaka
2. 発表標題 Development of 3D neuropathology based on tissue clearing technique
3. 学会等名 Online Mini Symposium - BRI & DANDRITE（国際学会）
4. 発表年 2022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
---------	---------