

令和元年5月31日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H05650

研究課題名(和文) 表現型責任細胞の包括的な同定を目指す次世代型マウス遺伝学の開発

研究課題名(英文) Development of next-generation mouse genetics toward comprehensive identification of phenotype-related cells

研究代表者

洲崎 悦生 (Susaki, Etsuo)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・講師

研究者番号：10444803

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,000,000円

研究成果の概要(和文)：システム生物学を個体レベルの生命現象に応用するため、高速な「交配なし」遺伝学と高速な全脳イメージングを組み合わせ、表現型の表出に関わる責任細胞を同定する技術(個体レベルのシステム要素同定技術)の開発を目指した。その結果、次世代マウス遺伝学の実証実験(Mol Cell 2017)、高速3次元観察・解析系のパイプライン化と応用(Nat Protoc 2015, Neuron 2017他)、組織透明化試薬の次世代化(Cell Rep 2018)に成功した。またこれらの技術を総括した英文総説を発表した(Cell Chem Biol 2016, npj Syst Biol App 2017)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

報告したES細胞由来の第0世代マウスで表現型解析を実現する手法は、CRISPR等の配列特異的DNA切断酵素との組み合わせによりさらなる拡張が見込まれ、ゲノム編集技術の応用や評価、新しい疾患モデル生物の作出など、広く医療分野にインパクトが与えられると期待される。また動物実験の倫理的側面からも、使用動物数の削減などに貢献できる。

同じく報告したCUBIC技術は、3次元組織学や病理学への応用が始まっており、臨床病理における客観性や診断確度の上昇や、新たな疾患メカニズムの発見等への貢献が期待されるため、同じく医療分野に大きなインパクトが与えられると期待される。

研究成果の概要(英文)：To understand the dynamic nature of biological systems at the organ and organism level, we hypothesized that identifying the responsible cells involved in the expression of the phenotype would be crucial. Toward the aim, we applied technologies of "next-generation genetics" and "high-throughput whole-brain imaging (CUBIC)."

We finally reported a demonstration of next-generation mouse genetics (Mol Cell 2017), a rapid three-dimensional observation and analysis pipeline and its applications (Nat Protoc 2015, Neuron 2017 et al.), and next-generation tissue clearing reagent (Cell Rep 2018). We also published review articles related to these two technologies (Cell Chem Biol 2016, npj Syst Biol App 2017).

研究分野：基礎医学、システム生物学

キーワード：システム生物学 遺伝学的ラベリング 組織透明化 3次元イメージング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生体システムの動的な性質の理解を目的とするシステム生物学の方法論を、睡眠・覚醒などの個体レベルの現象解明に応用するため、研究代表者は「個体レベルのシステム生物学」を目指す技術開発を推進していた。中でも、「高速な『交配なし』マウス遺伝学(次世代マウス遺伝学)」技術と、「高速な全脳・全身イメージング」技術の組み合わせは、細胞～組織の階層に実装された生体システムの要素同定を行うための強力な組み合わせになりうると想定された。「高速な『交配なし』マウス遺伝学」は、安定的な「ES マウス(100%キメラマウス)作製技術」[Kiyonari et al. *Genesis* 2010]を応用し、ES 細胞由来の第 0 世代マウスで表現型解析を実現する手法であり[Susaki et al. 研究開始時投稿準備中]、TALEN や CRISPR 等の配列特異的 DNA 切断酵素との組み合わせによりさらなる拡張が見込まれた。また「高速な全脳イメージング (CUBIC) 技術は、高効率な組織透明化+シート照明顕微鏡による高速な全組織イメージング+インフォマティクスによる多サンプルシグナル比較を統合したプラットフォームであり、マウス全脳の 3D イメージを 1 時間程度で取得可能であった。さらに、マウス全身への適応にも成功していた[Susaki et al. *Cell* 2014; Tainaka et al. *Cell* 2014]。

### 2. 研究の目的

生体システムの動的な性質の理解を目指すシステム生物学を行動リズムや睡眠などの個体レベルの生命現象に応用するため、我々が開発した「高速な『交配なし』遺伝学」と「高速な全脳イメージング」を組み合わせ、表現型の表出に関わる責任細胞を同定する技術(個体レベルのシステム要素同定技術)の開発を目指す。本研究課題では、遺伝学的ツールを多様な時間的・空間的発現パターンで発現する多種類のマウス系統を高速・並列に作出する技術の確立を目指し、さらに遺伝学的ツールの臓器スケールでの発現を網羅的に取得する技術開発も課題とする。

### 3. 研究の方法

高速な「交配なしマウス遺伝学(次世代マウス遺伝学)」と「全脳・全身イメージング(CUBIC)」技術を組み合わせ、表現型の表出に関わる責任細胞を同定する技術(個体レベルのシステム要素同定技術)の開発を目指した。この目的のため、遺伝学的ツールの時間的または空間的発現パターンの確保のための戦略的検討とフィージビリティテスト、および ES 細胞の安定的培養法と ES 細胞からの多系統 ES マウス作製等を具体的な技術課題として取り上げ、本研究課題にて取り組んだ。さらに、「高速な全脳・全身イメージング」(CUBIC)技術の開発を並行し、汎用化と改良による表現型責任細胞の同定技術の確立に取り組んだ。

### 4. 研究成果

#### (1) 交配なしマウス遺伝学(次世代マウス遺伝学)の確立と応用

所属先及び理化学研究所の共同研究者らとともに稼働させた ES マウス作製系を利用し、次世代マウス遺伝学の実証実験を完了させ報告した(Ode, Ukai, Susaki et al. *Mol Cell* 2017, co-first)。本論文では、24 時間の行動リズムが消失する表現型を示す概日時計遺伝子 *Cry1* 及び *Cry2* のダブルノットマウスに *Cry1* のレスキューカセットをノックインし、行動リズム表現型の回復を個体の行動レベルで観察する系を開発した。最終的に、転写制御領域や *Cry1* タンパク質中の変異体を含む合計 20 種類のレスキューカセットを準備して、*Cry1/Cry2* ダブルノックアウトバックグラウンドにノックインし、交配なしに解析個体を作製して行動解析を行うことに成功した。このようなマウスの多重ゲノム改変体を F0 世代で多数構築し比較解析した例はこれまでになく、本研究スキームの有効性を実証する結果となった。合わせて、本研究計画の集大成の一つとして、「次世代マウス遺伝学」を実現するスキームをまとめた英文総説を公表した(Susaki et al. *npj Syst. Biol. App* 2017)。

その他、ES マウス作製系の導入のため、ES 細胞の培養系の導入と改良、ES 細胞インジェクションのためのインジェクターとレーザー穿孔装置の導入を行った。さらに、ES マウス作製系の代替・補完的技術と位置付けているアデノ随伴ウイルスを用いた細胞ラベリング系について、ウイルスインジェクションシステムを所属先に初めて導入し稼働させた。

#### (2) 全脳・全身イメージング(CUBIC)の確立と応用

研究代表者らが 2014 年に発表した CUBIC 技術の初期の報告をベースに、組織透明化・イメージング・画像解析のプロトコル化とリソース化を進めた(Susaki et al. *Nature Protocols* 2015)。また、上記のパイプラインを中心とした関連手法を取りまとめ、英文総説として発表した(Susaki and Ueda, *Cell Chemical Biology* 2016)。さらに、CUBIC を応用した投薬下マウスの脳神経活動の全脳モニタリングと *in situ hybridization* を用いた validation study を行った(Tatsuki et al. *Neuron* 2016)。より発展的な課題として、CUBIC 技術のヒト病理学への応用を目指した研究を進め、論文発表した(大阪大学大学院医学系研究科病態病理学講座との共同研究)(Nojima et al. *Sci Rep.* 2017)。同様に、CUBIC 技術を共同研究ベースで活用し、マウス腎臓や膵臓、トリ胚などへの適用例を共同研究ベースで報告した(Yamamoto et al. *Nat*

Commun. 2017; Watanabe et al. Dev Biol. 2018; Puelles et al. Kidney intl. 2019; Hasegawa et al. Kidney intl. 2019).

これらの研究開発過程で明らかとなってきた組織透明化試薬やイメージング方法の限界を克服しさらに適用を広げるため、1600以上のケミカルライブラリをスクリーニングし、得られた化合物を用いて第二世代 CUBIC 試薬の開発に成功し、マーマセット全脳など従来は透明化が困難だった大型臓器の透明化と3次元観察に成功した (Tainaka et al. Cell Rep. 2018)。さらに、撮影用顕微鏡をアップデートし、イメージングの高速化に向けた画像取得シーケンスや、取得画像から必要な前処理やセグメンテーションを行うための解析パイプラインの構築を進めた。この中で、マウス全脳を例とした場合1データセットあたり100GB近いサイズとなり、PCのスペックが極めて重要であることが判明したため、ハイスペックなワークステーションを導入し、画像の前処理から基本的な解析までを運用する体制を整えた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計26件) 1-12は全て査読あり、13-26は全て査読なし

1. Comprehensive three-dimensional analysis (CUBIC-kidney) visualizes abnormal renal sympathetic nerves after ischemia/reperfusion injury.  
Hasegawa S, Susaki EA, Tanaka T, Komaba H, Wada T, Fukagawa M, Ueda HR, Nangaku M  
Kidney international AOP 2019年4月
2. Novel 3D analysis using optical tissue clearing documents the evolution of murine rapidly progressive glomerulonephritis.  
Puelles VG, Fleck D, Ortiz L, Papadouri S, Thiago T, Boehner A, van der Wolde JW, Vogt M, Saritas T, Kuppe C, Fuss A, Menzel S, Klinkhammer BM, Müller-Newen G, Heymann F, Decker L, Braun F, Kretz O, Huber TB, Susaki EA, Ueda HR, Boor P, Floege J, Kramann R, Kurts C, Bertram JF, Spehr M, Nikolic-Paterson DJ, Moeller MJ  
Kidney international AOP 2019年3月
3. Chemical Landscape for Tissue Clearing Based on Hydrophilic Reagents.  
Tainaka K\*, Murakami TC\*, Susaki EA, Shimizu C, Saito R, Takahashi K, Hayashi-Takagi A, 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.\*co-first  
Cell reports 24(8) 2196-2210.e9 2018年8月
4. Comparison of the 3-D patterns of the parasympathetic nervous system in the lung at late developmental stages between mouse and chicken.  
Watanabe T, Nakamura R, Takase Y, Susaki EA, Ueda HR, Tadokoro R, Takahashi Y  
Developmental biology 444(Suppl 1) S325-S336 2018年12月
5. Neuronal signals regulate obesity induced  $\beta$ -cell proliferation by FoxM1 dependent mechanism.  
Yamamoto J, Imai J, Izumi T, Takahashi H, Kawana Y, Takahashi K, Kodama S, Kaneko K, Gao J, Uno K, Sawada S, Asano T, Kalinichenko VV, Susaki EA, Kanzaki M, Ueda HR, Ishigaki Y, Yamada T, Katagiri H  
Nature communications 8(1) 1930 2017年12月
6. CUBIC pathology: three-dimensional imaging for pathological diagnosis.  
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  
Scientific reports 7(1) 9269 2017年8月
7. Next-generation mammalian genetics toward organism-level systems biology  
Susaki EA, Ukai H, Ueda HR  
npj Systems Biology and Applications 3 15 2017年6月
8. Knockout-Rescue Embryonic Stem Cell-Derived Mouse Reveals Circadian-Period Control by Quality and Quantity of CRY1.  
Ode KL\*, Ukai H\*, Susaki EA\*, Narumi R, Matsumoto K, Hara J, Koide N, Abe T,

Kanemaki MT, Kiyonari H, Ueda HR. \*co-first  
Molecular Cell 65(1) 176-190 2017 年 1 月

9. Involvement of Ca<sup>2+</sup>-Dependent Hyperpolarization in Sleep Duration in Mammals.  
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.  
\*co-first  
Neuron 90(1) 70-85 2016 年 4 月
10. Whole-body and Whole-Organ Clearing and Imaging Techniques with Single-Cell  
Resolution: Toward Organism-Level Systems Biology in Mammals.  
Susaki EA, Ueda HR  
Cell Chemical Biology 23(1) 137-157 2016 年 1 月
11. Sleep as a biological problem: an overview of frontiers in sleep research.  
Kanda T, Tsujino N, Kuramoto E, Koyama Y, Susaki EA, Chikahisa S, Funato H  
The journal of physiological sciences : JPS 66(1) 1-13 2015 年 11 月
12. Advanced CUBIC protocols for whole-brain and whole-body clearing and imaging.  
Susaki EA\*, Tainaka K\*, Perrin D\*, Yukinaga H, Kuno A, Ueda HR. \*co-first  
Nature Protocols 10(11) 1709-1727 2015 年 11 月
13. 見る脂質のページ 透明化による全細胞解析 ヒト組織透明化 ~ヒト病理組織を中心に~  
野島聡、森井英一、洲崎悦生、上田泰己  
Lipid 29(4) 340-345 2018 年 10 月
14. 快人快説 最先端の研究テクノロジー紹介 臓器の透明化技術とその臨床応用  
野島聡、洲崎悦生、森井英一、上田泰己  
LiSA 25(7) 789-797 2018 年 7 月
15. 見る脂質のページ 脂質代謝異常 脱脂による高度な全脳透明化と三次元イメージング  
洲崎悦生  
Lipid 29(2) 128 134 2018 年 4 月
16. 全組織レベルの高速な遺伝子発現解析を目指す組織透明化技術の開発  
洲崎悦生  
日本応用酵素協会誌 (52) 72 2018 年 3 月
17. 細胞多様性解明に資する光技術 見て、動かす I.見る,観る,視る 透明化技術とシステム  
バイオロジー  
小野宏晃, 洲崎悦生, 上田泰己  
生体の科学 68(5) 414 415 2017 年 10 月
18. 【テクニカルノート】組織透明化による 3 次元臓器サンプルの全細胞解析  
茂田 大地, 洲崎悦生, 上田 泰己  
比較内分泌学 43(161) 73-75 2017 年 5 月
19. 全組織レベルの高速な遺伝子発現解析を目指す組織透明化技術の開発  
洲崎悦生  
日本応用酵素協会誌 (51) 73 74 2017 年 3 月
20. 全身および全臓器透明化による全細胞解析  
金子みずほ, 茂田大地, 洲崎悦生, 上田泰己  
感染・炎症・免疫 46(4) 299 307 2017 年 1 月
21. 新しい医療技術 組織透明化による 1 細胞レベルの三次元イメージング  
小野 宏晃, 洲崎悦生, 上田 泰己  
整形・災害外科 59(9) 1235-1240 2016 年 8 月
22. 三次元組織における網羅的な一細胞解析のためのオミクス的アプローチ (AYUMI 一細胞  
遺伝子解析)  
茂田 大地, 金子 みずほ, 洲崎悦生, 上田 泰己  
医学のあゆみ 258(4) 311-316 2016 年 7 月

23. 生体透明化イメージングの現状と展望  
勝俣 敬寛, 洲崎 悦生, 上田 泰己  
内分泌・糖尿病・代謝内科 42(5) 362-368 2016年5月
24. 最新基礎科学 知っておきたい 個体レベルのシステム生物学  
張 千恵, 洲崎 悦生, 上田 泰己  
臨床整形外科 51(2) 180-183 2016年2月
25. マウス全脳・全身を透明化し1細胞解像度で観察する新技術を開発  
久野 朗広, 洲崎 悦生, 田井中 一貴, 上田 泰己  
化学と生物 53(11) 737-740 2015年11月
26. 脳の見える化 構造編 細胞を見る 脳の透明化と構造情報処理  
史 蕭逸, 洲崎 悦生, 上田 泰己  
Clin Neurosci 33(6) 639-642 2015年6月

〔学会発表〕(計62件)

1. CUBIC-HistoVIsion: A pipeline for three-dimensional whole-organ staining and imaging with single-cell resolution based on chemical properties of tissue  
洲崎悦生  
RIKEN BDR seminar at Kobe (host: Dr. Kazunari Miyamichi) 2019年3月18日
2. Whole-organ/body analysis of multicellular systems by CUBIC platform  
洲崎悦生  
Single cell biology meets diagnostics: 12th International workshop on approaches to single cell analysis, Uppsala University, Sweden 2019年3月4日
3. CUBIC-HistoVIsion: a pipeline for three-dimensional whole-brain/organ staining and imaging with single-cell resolution  
洲崎悦生  
ECRO 2018 2018年9月6日 Würzburg, Germany
4. Tissue clearing and 3D imaging: basics and applications  
洲崎悦生  
EMBO practical course on light sheet microscopy 2018年8月2日 Max Planck Institute of Molecular Biology and Genetics Dresden, Germany
5. CUBIC-HistoVIsion: a pipeline for 3D whole-organ/body staining and imaging with single-cell resolution based on chemical properties of tissue gel  
洲崎悦生  
SBIC seminar, A\*STAR, Singapore 2018年7月9日
6. CUBIC: a whole-organ/body cell-omics pipeline with tissue clearing, 3D imaging and informatics (plenary lecture)  
洲崎悦生  
UNSW Sydney Lightsheet Microscopy Workshop 2017年12月1日 Biomedical Imaging Facility, University of New South Wales, Sydney (Organizer: Dr. Renee Whan)
7. CUBIC: a whole-organ/body cell-omics pipeline with tissue clearing, 3D imaging and informatics  
洲崎悦生  
SigN Immunology Seminar 2017年10月6日 Singapore Immunology Network, A\*StarSingapore Biopolis

他 55 件

〔図書〕(計3件)

1. バイオイノベーションに向けて～バイオテクノロジーの新技術からの新しい視点～ 監修：植田充美  
洲崎悦生  
(株)シーエムシー出版 2019年3月 p230-236

2. 定量生物学-生命現象を定量的に理解するために 小林徹也 / 編  
洲崎悦生  
化学同人 2018年8月 p162-177
3. 実験医学別冊 最強のステップ UP シリーズ 「シングルセル解析プロトコール〜わかる！使える！ 1細胞特有の実験のコツから最新の応用まで」菅野純夫 / 編  
洲崎悦生  
羊土社 2017年9月 p284-294

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

取得状況（計1件）

名称: Composition for preparing biomaterial with excellent light-transmitting property, and use thereof

発明者: Etsuo SUSAKI, Hiroki Ueda, Kazuki Tainaka

権利者: RIKEN

種類: patent

番号: US20160266016A1

取得年: 2019

国内外の別: 国外（米国）

〔その他〕

ホームページ等

臓器透明化（CUBIC）を用いて腎臓全体の交感神経系の3次元構造を可視化し、その機能障害を解析 [http://www.h.u-tokyo.ac.jp/press/press\\_archives/20190409.html](http://www.h.u-tokyo.ac.jp/press/press_archives/20190409.html)

水溶性化合物による組織透明化の化学 - 包括的ケミカルプロファイリングに基づく化学的原理の体系化 - [http://www.riken.jp/pr/press/2018/20180822\\_1/](http://www.riken.jp/pr/press/2018/20180822_1/)

組織透明化技術「CUBIC」をヒト病理組織診断に応用 - 次世代の3次元病理診断法の新たな可能性 - [http://www.riken.jp/pr/press/2017/20170830\\_1/](http://www.riken.jp/pr/press/2017/20170830_1/)

体の一日を刻むタイマー機構を発見 - 遺伝子導入マウス個体高速作成法を用いた概日時計周期長制御の解明-

[http://www.m.u-tokyo.ac.jp/news/admin/release\\_20161223.pdf](http://www.m.u-tokyo.ac.jp/news/admin/release_20161223.pdf)

[http://www.riken.jp/pr/press/2016/20161223\\_1/](http://www.riken.jp/pr/press/2016/20161223_1/)

カルシウムがマウスの睡眠時間を制御

<http://www.u-tokyo.ac.jp/ja/utokyo-research/research-news/calcium-controls-sleep-duration-in-mice.html>

CUBIC resource website <http://cubic.riken.jp>

6. 研究組織

(1)研究分担者（該当なし）

(2)研究協力者

研究協力者氏名：上田 泰己

ローマ字氏名：UEDA, Hiroki

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、研究者個人に帰属されます。