

平成 30 年 4 月 19 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15124

研究課題名(和文)細胞機能の変容により曝露物質の毒性を評価する新規安全性試験技術の開発

研究課題名(英文)Development of novel toxicity evaluation system based on whole-body/organ imaging technique with single cell resolution

研究代表者

田井中 一貴(Tainaka, Kazuki)

新潟大学・脳研究所・特任教授

研究者番号：80506113

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：個体全身の細胞機能の変容に基づく毒性評価系を構築できれば、より高感度かつ包括的な曝露物質の毒性の評価が期待できる。本研究は、組織透明化技術を用いたマウス全身丸ごとイメージングにより、全身・臓器レベルの細胞機能の変容から曝露薬物の毒性を評価する新規安全性試験技術の確立を目的とする。この目的のために、成獣マウスに適用可能な新規透明化プロトコルを開発し、マウス全身に分布する癌細胞を1細胞解像度で観察可能なイメージング解析基盤を確立した。また、組織内に分布する細胞群の空間座標を特定するためのマウス脳アトラスを構築し、覚せい剤投与により惹起されるマウス全脳の神経活動の可視化に成功した。

研究成果の概要(英文)：Current pathology relies on cell-based pathology. Therefore, in order to develop more sensitive and comprehensive toxicity test, it is important to visualize individual cell and detect cellular degeneration in entire body. In this study, we aimed at developing a novel toxicity evaluation system based on whole-body/organ imaging technique with single cell resolution. To this end, we developed further improved whole-body clearing protocol by comprehensive chemical screening for a series of clearing factors. The new CUBIC protocol enables whole-body and whole-organ imaging of cancer metastasis of adult mice at single-cell resolution. The expanded highly-cleared brain enabled us to construct a mouse brain atlas with single-cell annotation. Probabilistic activity mapping of pharmacologically stimulated Arc-dVenus reporter mouse brains onto our atlas revealed the existence of distinct functional structures.

研究分野：医化学

キーワード：組織透明化 全身イメージング 毒性評価システム

### 1. 研究開始当初の背景

これまでの *in vivo* における非臨床安全性試験では、剖検による器官・組織の肉眼的観察、病理組織学的検査や、主要臓器の生理機能変化などの器官レベルの表現型解析、遺伝毒性・免疫毒性・がん原性などにより、個々の薬物の毒性が評価されてきた。生物は、毒性のある薬物に対して、迅速かつ高感度に細胞機能の変化として応答し、持続的な曝露、もしくは閾値以上の曝露の結果、臓器-個体レベルの重篤な表現型変化として表出する。従って、個体全身の細胞機能の変容に基づく毒性評価系を構築できれば、より高感度かつ包括的に曝露物質の毒性を評価できるだけでなく、表出しうる副作用の予測も期待できる。

### 2. 研究の目的

これまでに我々は、幼若マウス個体全身を高度に透明化して、高速かつ1細胞解像度で3Dイメージングを行い、シグナル比較を行うための情報科学的解析手法や、3D免疫染色、3D解剖学・病理学を通じた解析パイプラインからなる CUBIC (Clear, Unobstructed Brain/Body Imaging Cocktails and Computational analysis) の開発に成功した (Susaki et al. *Cell* 2014; Tainaka et al. *Cell* 2014)。CUBIC により、I 型糖尿病を発症したマウスと正常マウスの膵臓におけるランゲルハンス島の 3D 包括的統計解析を実現し、細胞集団の定量的解析から病態を評価することに成功している。近年、炎症・免疫応答や小胞体ストレス、神経活動などの細胞機能を可視化できる様々なレポーターマウスが作出されてきた。本研究では、これらのレポーターマウスを用いて、全身・臓器の細胞そのものを『超高感度なセンサー』として位置付け、CUBIC を用いて全身・臓器レベルの細胞機能の変容から曝露薬物の毒性を評価する新規安全性試験技術の確立を目指す。

### 3. 研究の方法

これまでに開発した旧来の CUBIC プロトコールでは、大きな組織サンプルの透明化が困難であり、骨組織を透明化することができないことから、成獣マウスに適用することが困難である。そこで、各種レポーターマウスに適用可能な骨組織を含む成獣マウス個体の新規透明化プロトコールの開発に取り組んだ。過去の透明化試薬は、個々のケミカルで処理した生体組織の透明度を定性的に評価することで開発されてきた。しかしながら、経験論的な従来の戦略では、観察対象のタンパク質を保持したまま骨を含む組織の透明化や生体色素の脱色を同時に達成することは困難である。本研究では、透明化の原理に基づいて、透明化に必要なパラメータを細分化し、パラメータ毎に個々の化合物の能力を評価することで、高度な全身丸ごと透明化を実現する新しいアプローチを採用した。

新規透明化プロトコールを用いて、1) 全身に転移した癌細胞の検出系、2) 組織内に分布する細胞群の空間座標を特定するためのマウス脳アトラス、3) 薬物投与時に変化が生じる細胞種の臓器全域にわたる網羅的検出系、を構築し、1細胞解像度の個体・臓器丸ごと細胞動態解析により曝露物質の毒性を評価する新規安全性試験技術の開発に取り組んだ。

### 4. 研究成果

透明化において、1) 脂質除去効率、2) 骨可溶性効率、3) ヘム遊離 (脱色) 能力、4) 屈折率、が重要な因子であることが確認されている。これらに5) 蛍光タンパク質消光効率、及び6) pHを加えた6つの要素について、それぞれハイスループットかつ定量的に評価可能な実験系を構築した。1600種類の水溶性化合物ライブラリから網羅的スクリーニングを実施し、得られたデータを基にケミカルプロファイリングを行った。各パラメータに対して最適な化学構造を同定することで、組織透明化に寄与する化合物を体系化し、最適なケミカルの組み合わせによる透明化プロトコールを確立した。これにより、迅速かつ組織へのダメージを最小限に抑えた骨組織を含む成熟マウス全身透明化を実現した。

上記の透明化プロトコールを用いて、がんの骨転移モデルマウスのイメージングを実施したところ、骨内部に転移したがん細胞を高感度に検出することに成功した。更に、レポーターマウスの蛍光シグナルの解剖学的座標を特定するために、成獣マウスの全身レベルでの対比染色技術を確立した。この手法を用いることで、全身に分布するがん細胞を1細胞解像度でスキャン可能なイメージング解析基盤の確立に成功した (次ページ図1; Kubota et al., *Cell Rep.*, 2017, 20, 236-250)。

上記のケミカルプロファイリングから、マウス脳の立体構造をそのまま体積比にして10倍に膨潤させ、かつ高度に透明化するプロトコールを開発した。核染色したマウス脳を用いて、高解像度観察用シート照明型蛍光顕微鏡・高精度細胞検出アルゴリズムと組み合わせで解析することで、マウス脳組織に含まれる全ての細胞の検出に成功した。これにより領域ごとの損傷度合いを定量的かつ包括的に解析可能な1細胞解像度全脳アトラスの作製に成功した (Murakami et al., *Nat. Neurosci.*, 2018, 21, 625-637)。また、本手法は、レポーターマウス由来の脳にも適用可能であり、高解像度のイメージング画像が取得できる。

これまでに、神経活動の亢進により蛍光タンパク質の発現が上昇する Arc-dVenus マウスを用いることで、マウス全脳の神経活動の履歴を包括的に観察できることが分かっている。そこで、Arc-dVenus マウスを用いて、

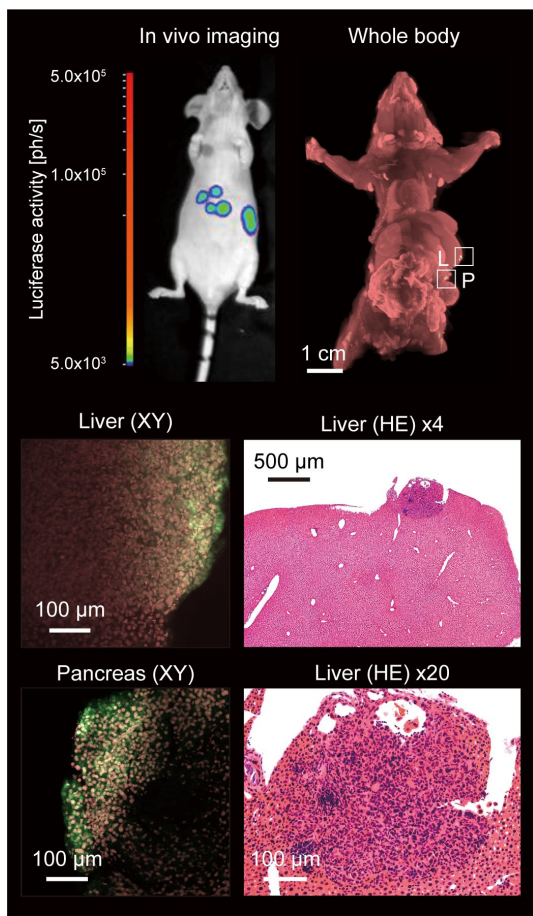


図1．組織透明化技術によるマウス全身転位癌イメージング

新たに作製したマウス脳アトラスを元に、覚せい剤であるメタンフェタミンおよび向精神薬であるハロペリドールを投与した際の神経活動の履歴を解析した。クラスター解析の結果、時間依存的にメタンフェタミンによって活性化されるグループや、メタンフェタミンとハロペリドールの同時投与によって活性化されるグループなどの脳領域が分類された。CT4, CT22 において、体性感覚野や海馬台、前障、尾状核被殻などの領域では、メタンフェタミン投与により活性化される一方で、ハロペリドール投与により不活性化される傾向が観測された。また、CT4, CT22 において、メタンフェタミンとハロペリドールの同時投与により、体性感覚野や視覚野、側頭連合野、扁桃体基底外側部などの領域が活性化されていた。以上により、覚せい剤によって惹起される神経毒性の潜在領域、並びに覚せい剤に拮抗しうる治療薬投与時の神経活動状態を網羅的に可視化する解析基盤が確立された。

##### 5．主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計4件)

Murakami TC, Mano T, Saikawa S, Horiguchi SA, Shigeta D, Baba K, Sekiya H,

Shimizu Y, Tanaka KF, Kiyonari H, Iino M, Mochizuki H, Tainaka K, Ueda HR.

A three-dimensional single-cell-resolution whole-brain atlas using CUBIC-X expansion microscopy and tissue clearing.

*Nature Neuroscience*, 21, 625-637 (2018)

doi: 10.1038/s41593-018-0109-1.

査読有

Shinohara Y, Koyama YM, Ukai-Tadenuma M, Hirokawa T, Kikuchi M, Yamada RG, Ukai H, Fujishima H, Umehara T, Tainaka K, Ueda HR.

Temperature-Sensitive Substrate and Product Binding Underlie Temperature-Compensated Phosphorylation in the Clock.

*Molecular Cell*, 67, 783-798.e20 (2017)

doi: 10.1016/j.molcel.2017.08.009.

査読有

Kubota SI, Takahashi K, Nishida J, Morishita Y, Ehata S, Tainaka K, Miyazono K, Ueda HR.

Whole-Body Profiling of Cancer Metastasis with Single-Cell Resolution.

*Cell Reports*, 20, 236-250 (2017)

doi: 10.1016/j.celrep.2017.06.010.

査読有

Tainaka K, Kuno A, Kubota SI, Murakami T, Ueda HR.

Chemical Principles in Tissue Clearing and Staining Protocols for Whole-Body Cell Profiling.

*Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 32, 713-741 (2016)

査読有

〔学会発表〕(計13件)

田井中 一貴、生体組織透明化技術 CUBIC による 3次元神経病理学の開発、第7回新潟脳研 - 霊長研 - 生理研合同シンポジウム、2018.3.6、生理学研究所(愛知県)

田井中 一貴、組織透明化技術と包括的 3D イメージング、イメージング技術の融合による医学・生命科学の新たな地平の開拓、2018.2.9、神戸大学(兵庫県)

Kazuki Tainaka、CUBIC: Whole-organ, whole-body imaging with single-cell resolution using chemical cocktails, Brain Protein Aging and Dementia Control 2nd International Symposium, 2017.11.3、ミッドランドホール(愛知県)

田井中 一貴、生体組織透明化技術 CUBIC、第15回新潟内耳疾患研究会、2017.7.29、

ホテルオークラ新潟（新潟県）

田井中 一貴、組織透明化技術と脳コネク  
トーム、第 47 回新潟神経学夏期セミナー、  
2017.7.28、新潟大学脳研究所（新潟県）

田井中 一貴、CUBIC:生体組織透明化によ  
る包括的 3D イメージング技術、北海道大学  
遺伝子病制御研究所セミナー、2017.6.8、北  
海道大学（北海道）

田井中 一貴、生体組織透明化による包括  
的 3次元イメージング技術 CUBIC、日本ケミ  
カルバイオロジー学会 第 12 回年会、  
2017.6.8、北海道大学クラーク会館（北海道）

田井中 一貴、CUBIC: Whole-organ,  
whole-body imaging at single-cell  
resolution using aminoalcohol-based  
chemical cocktails、第 58 回日本神経病理  
学会総会学術研究会、2017.6.2、東京学術総  
合センター（東京都）

田井中 一貴、生体組織透明化技術 CUBIC  
による 3D 神経病理学の開発、第 58 回日本神  
経病理学会総会学術研究会、2017.6.2、東京  
学術総合センター（東京都）

田井中 一貴、生体組織透明化による全身  
丸ごとイメージング技術 CUBIC、第 35 回日本  
糖質学会年会、2016.9.1、高知市文化プラザ  
かるぽーと（高知県）

〔産業財産権〕

出願状況（計 2 件）

名称：光透過性に優れた生物材料を調製する  
ための組成物およびその利用

発明者：上田 泰己、田井中 一貴、村上 達  
哉

権利者：国立研究開発法人理化学研究所

種類：特許

番号：特願 2016-092025

出願年月日：2016 年 4 月 28 日

国内外の別：国内

名称：光透過性に優れた生物材料を調製する  
ための組成物およびその利用

発明者：上田 泰己、田井中 一貴、村上 達  
哉

権利者：国立研究開発法人理化学研究所

種類：特許

番号：W02017188264A1

出願年月日：2017 年 11 月 2 日

国内外の別：国外

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田井中 一貴（TAINAKA, Kazuki）

新潟大学・脳研究所・特任教授  
研究者番号：80506113