

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19276

研究課題名（和文）遺伝子発現・軟骨再生を画像化するX線イメージング法の開発

研究課題名（英文）Development of the new imaging method to visualize the gene expression patterns and cartilage using the X-ray CT

研究代表者

田村 勝（TAMURA, MASARU）

国立研究開発法人理化学研究所・バイオリソース研究センター・チームリーダー

研究者番号：50370119

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：X線CTは非破壊的に内部構造を観察できることから医療や工業製品検査現場において大いに使用されている。ライフサイエンス分野においてもこれまでは主に骨解析に用いられてきたが、近年、マウス胎児などの軟組織を造影する造影剤が開発され、高解像度3次元CTイメージング解析法が大きな成果を上げるようになってきた。一方で、切望されながらこの手法では画像化できない領域がある。それが軟骨と遺伝子発現である。本研究課題では、この問題を解決するために軟骨画像化可能な新規造影剤と遺伝子発現をモニターできるレポーターの開発を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝子機能解析や疾患モデル解析においては、ゲノム編集技術の発展により表現型解析がボトルネックとなりつつある。このような状況において高解像度イメージング解析はその問題を解決する強力な方法として注目されている。今回開発した軟骨造影剤、遺伝子発現モニター法もその高解像度イメージング解析であり、学術的な意味がある。また軟骨造影剤はこれまで開発に誰も成功しておらず、その成功は50歳以上の日本人1000万人がそれに伴う膝痛を経験する変形性膝関節症研究に生かされることが期待でき、社会的にも意義がある。

研究成果の概要（英文）：In medical fields, multi-detector row computed tomography (MDCT) is now commonly used for diagnosis, and becoming a powerful tool for detection and classification of human symptomatic state. X-ray micro-computed tomography (micro-CT) for model animals is identical in its basic principles to MDCT. In the life science fields, micro-CT also has been used to analyze the phenotype of model animals. It provides excellent images of bone and adipose tissues, because these samples have high contrast Hounsfield unit. Recently, it was reported an improved method to obtain high resolution of 2D images of soft tissues using the micro-CT with a contrast reagent. This technique easily generates 2D slice images at any position and angle from single sample, and thereby reconstructs 3D image. However, it has not provided good images of the gene expression patterns and cartilage. To overcome this issue, we have been developed the new contrast reagents and reporter.

研究分野：発生遺伝学

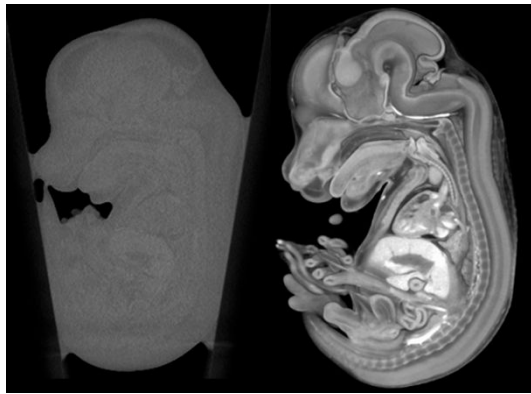
キーワード：形態イメージング 疾患モデル 軟骨 遺伝子発現 マウス X線 CT

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

1895年にレントゲンよりX線が発見され、1917年には数学者であるラドンにより画像再構成法の理論が発表された。その後約50年後の1963年にコーマックにより画像再構成法の数学的な原理の定式化がなされ、1973年にハンスフィールドにより商業用X線CTが開発されることとなった。X線CT装置は、今日では医療分野において患者の症状把握に無くてはならない診断機器となっているとともに、工業製品生産分野においても電子部品基盤や製品の品質管理に大きな威力を発揮している。ライフサイエンス分野でも小動物用CTが開発され、主に硬骨の解析に用いられてきた。X線CTの利点としてはその解像度を上げることができる。その物理的解像度はmicro-CTで $5\mu\text{m}/\text{pixel}$ とMIRの物理的解像度と比較して約10倍の高精細度をもつ。一方で濃度解像度は低く、それ故軟組織の解析には殆ど使用されてこなかった。

2006年にJohnsonらによりオスミウム酸を造影剤として用いたマウス胎児のイメージング法が報告された (Johnson et al., 2006) さらに2009年にはMetscherらによりヨウ素やリントングステン酸を造影剤として用いた手法が報告された (Metscher, 2009a; 2009b)。



我々も独自に、micro-CTを用いた高解像度軟組織イメージング法の開発に成功し (Tamura et al., 2013) その技術を用いて国際マウス表現型解析コンソーシアム (IMPC) の胎齡致死表現型解析に参加、多くの発現必須遺伝子の解析を行なった (Dickinson et al., 2016)。

Fig1

我々独自に開発した高解像度軟組織イメージング法。左：未造影CT。右：造影CT

X線CTと造影剤を用いた軟組織イメージング解析法は、一度データを取得すれば3D画像は勿論、2次元の2D画像も任意の位置、任意の角度で再構築可能で極めて強力であり、大きな注目を集めていた。一方で、大きな期待を寄せられつつ画像化困難な領域が存在していた。それが軟骨と遺伝子発現イメージングである。



図2

軟骨イメージング。左：脛骨単純CT像。単純CTでは硬骨は画像化できるが軟骨(赤矢印)はイメージングできず、抜けているように見える。右：ヨウ素を造影剤に用いた脛骨造影CT像。硬骨周辺の筋肉や骨内骨髓領域はコントラストがついているが、軟骨は全く見えない。

2. 研究の目的

本研究課題では、これまで誰も成功していないこの2つのイメージング、軟骨と組織深々部遺伝子発現の画像化に挑戦した。この2つの領域が画像化できれば、元来CT解析が得意とする形態や面積等の定量性解析に加え、蛍光や抗体が届かない領域での解析が可能となり、疾患モデル、ヒト病態モデル動物解析に大きく貢献できる。更に昨今のゲノム編集技術の発達により表現型解析が疾患研究、遺伝子機能解析のボトルネックとなりつつある現状において、この開発技術が研究の迅速化に大きく貢献することが期待できる。

3. 研究の方法

本研究は、新規軟骨染色用造影剤とX線で検出可能なレポーターを開発し、それぞれ軟骨と遺伝子発現のイメージングに使用、その画像化の実現化を目指した。

1) 新規軟骨染色用造影剤の開発

X線CTは骨(硬骨)の解析においては古くから高精細形態観察や骨密度、骨塩量解析等に用いられてきた。しかしながら軟骨はX線ではイメージングできないのが常識であった。軟骨解析の

組織学的解析に大きな力を発揮し、当該分野のゴールドスタンダードとなっていたのがアルシアンブルー染色法である。このアルシアンブルーは、銅フタロシアニンにイソチオウロニウム基が結合した構造を持つ(図3)。実際にはイソチオウロニウムが軟骨中のヘパラン硫酸やコンドロイチン硫酸と結合、機能的色素である銅フタロシアニンにより軟骨が青く染色される。興味深い事にフタロシアニンは中心金属を銅以外の金属に置き換えて合成することができる。即ち、X線吸収率の高い金属、例えば造影剤として一般に使用されているヨウ素や更にX線吸収率の高い白金(Pt)などを中心金属として合成することにより、軟骨特異的造影剤となることが期待できる。合成した化合物は、マウス胎児、及び理研バイオリソースセンター設置のmicro-CT装置をもちいて軟骨イメージング手法を開発した。

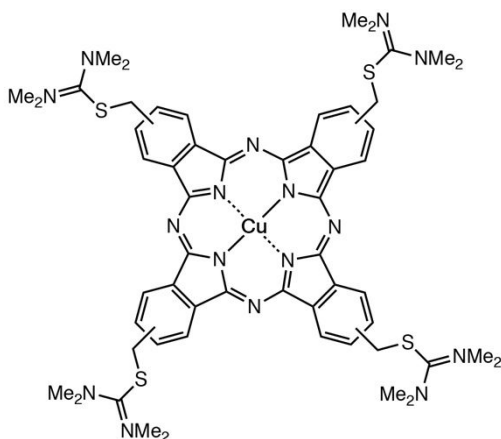


図3: アルシアンブルーの構造式

アルシアンブルーは、銅フタロシアニンに官能基としてイソチオウロニウム基が結合した構造を持つ。本研究課題では中心のCuをX線吸収率の高いPtに置き換えたプラチナフタロシアニンを合成した。

2) X線CTによる3次元遺伝子・タンパク質発現定量イメージング法の開発

これまで、遺伝子・タンパク質発現を3次元的に解析するには、Whole mount *in situ* hybridization (WISH)法によるmRNA検出やGFPなどの蛍光レポーターを用いた検出系が主に用いられてきた。しかし、抗体の浸透性や光の透過性の問題から深々部の解析は困難である。また光透過性を向上させる為の透明化試薬を使用した場合には、サンプルの変形(膨張)を伴う為に定量解析には適さない。そこで組織透過性が優れ、かつ定量解析に適したX線CTを用いて、遺伝子・タンパク質発現を3次元的に解析可能な実験系を開発する。実験系として、X線で検出可能なレポーターとGFPと融合タンパク質を作らせた形でトランスジェニックマウス(Tg)を作製した。プロモーターにはヒートショックプロモーター(*hsp*)を用い、そこに組織特異的エンハンサーを用いてモデル系とした。得られたTgマウスは、融合タンパク質にX線吸収率とサンプル浸透性に優れた金属イオンを作用・結合させる事により、X線で検出できるように工夫した。これらの物を用いて遺伝子発現検出の研究開発を行なった。

4. 研究成果

研究開発期間の2年間でほぼ全ての計画を実施できた。軟骨イメージングは研究開発1年目のプラチナフタロシアニンの合成には難航したが、最終的には満足できる結果を得ることができた。遺伝子発現イメージングに関しては今回の研究開発でいくつかの問題点が見つかった。これらの問題点を改善することにより最終的な技術開発が完成すると考えられる。本課題で得られた成果は現在特許出願の準備を進めている。特許申請が終了したのちに詳細な研究成果報告書と差し替えたい。

参考文献

1. Johnson JT, Hansen MS, Wu I, Healy LJ, Johnson CR, Jones GM, Capecchi MR, Keller C. Virtual histology of transgenic mouse embryos for high-throughput phenotyping. *PLoS Genet.* 2006; 2: e61.
2. Metscher BD. MicroCT for developmental biology: a versatile tool for high-contrast 3D imaging at histological resolutions. *Dev Dyn.* 2009a; 238: 632-640.
3. Metscher BD. MicroCT for comparative morphology: simple staining methods allow high-contrast 3D imaging of diverse non-mineralized animal tissues. *BMC Physiol.* 2009; 9: 11.
4. Tamura M, Hosoya M, Fujita M, Iida T, Amano T, Maeno A, Kataoka T, Otsuka T, Tanaka S, Tomizawa S, Shiroishi T. Overdosage of Hand2 causes limb and heart defects in the human chromosomal disorder partial trisomy distal 4q. *Hum Mol Genet.* 2013; 22: 2471-2481.

5. Dickinson ME, Flenniken AM, Ji X, Teboul L, Wong MD, White JK, Meehan TF, Weninger WJ, Westerberg H, Adissu H, Tamura M, et al., High-throughput discovery of novel developmental phenotypes. *Nature*. 2016; 537: 508-514

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 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Takahashi M., Tamura M., Sato S. and Kawakami K	4. 巻 11
2. 論文標題 Mice doubly deficient in Six4 and Six5 show ventral body wall defects reproducing human omphalocele.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Disease Models & Mechanisms	6. 最初と最後の頁 dmm.034611
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/dmm.034611	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 Kishimoto K., Tamura M., Nishita M., Minami Y., Yamaoka A., Abe T., Shigeta M. and Morimoto M.	4. 巻 9
2. 論文標題 Synchronized mesenchymal cell polarization and differentiation shape the formation of the murine trachea and esophagus.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2816
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-018-05189	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 Shibuya H., Watanabe R., Maeno A., Ichimura K., Tamura M., Wakana S., Shiroishi T., Ohba K., Takeda K., Tomita H., Shibahara S. and Yamamoto H.	4. 巻 93
2. 論文標題 Melanocytes contribute to the vasculature of the choroid.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genes & Genetic Systems	6. 最初と最後の頁 51-58
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1266/ggs.17-00058	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 Haselimashadi H., Mason J., Munoz-Fuentes V., Lopez-Gomez F., Babalola K., Acar E., Kuma V., White J., Flenniken A., ... Tamura M. ... et al.,	4. 巻 36
2. 論文標題 Soft Windowing Application to Improve Analysis of High-throughput Phenotyping Data.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioinformatics	6. 最初と最後の頁 1492-1500
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/bioinformatics/btz744	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 該当する

1. 著者名 Matsumura K., Seiriki K., Okada S., Nagase M., Ayabe S., Yamada I., Yamamoto K., Kitagawa K., .. Tamura M.,,and Nakazawa T.	4. 巻 11
2. 論文標題 Pathogenic POGZ mutation causes impaired cortical development and reversible autism-like phenotypes.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 859
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-14697-z.	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12件(うち招待講演 7件/うち国際学会 5件)

1. 発表者名 田村 勝
2. 発表標題 RIKEN BRC・日本マウスクリニックにおける新規表現型解析プラットフォームの整備、および提供計画.
3. 学会等名 第65回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 澁谷 仁寿、小澤 恵代、田村 勝
2. 発表標題 日本マウスクリニックにおける新規形態解析パイプラインの開発： X線CTを用いた高速・高精細軟組織イメージング解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田村 勝
2. 発表標題 X線による軟組織イメージング：マウス胎生致死表現型解析の新展開,
3. 学会等名 理研シンポジウム：画像ビッグデータが切り拓く健康・医学の新時代(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田村 勝
2. 発表標題 X線CT イメージングによる形態表現型解析
3. 学会等名 第16回生命資源研究・支援センターシンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masaru Tamura
2. 発表標題 Visualization of mouse embryos with the X-ray computed tomography (CT)
3. 学会等名 The Seventh Sino-Japan Summer Course of Genetic Mouse Models (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masaru Tamura, Hirotoishi Shibuya, Ikuo Miura, Kyoko Ikeda, Ai Ozaki, Mao Ozaki, Yasuyo Kozawa, Tomoko Kushida, Akiko Shinogi, Ikuko Yamada and Tamio Furuse
2. 発表標題 The current status of phenotyping pipeline in RIKEN BRC
3. 学会等名 2019 Asian Mouse Mutagenesis and Resource Association (AMMRA)/Asia Mouse Phenotyping Consortium (AMPC) Annual Meeting and Workshop on Mouse Model Research (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 澁谷仁寿、小澤恵代、天野孝紀、田村勝
2. 発表標題 X線CTイメージングによる軟組織微細形態の可視化技術の開発
3. 学会等名 第66回 実験動物学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masaru Tamura
2. 発表標題 Visualization of mouse embryos with the X-ray computed tomography (CT)
3. 学会等名 The 8th Japan-Sino-Korea Mouse Resource Workshop (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hirotooshi Shibuya, Taku Gotoh, Ruriko Tanabe, Shintaro Nomura, Masaru Tamura.
2. 発表標題 Development of the imaging methods for phenotyping of knockout mice with the X-ray Computed Tomography
3. 学会等名 The 6th International Symposium on Bioimaging (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ruriko Tanabe, Taku Gotoh, Hirotooshi Shibuya, Masaru Tamura, Shintaro Nomura
2. 発表標題 Titanium Dioxide Nanoparticle is a Brilliant Perfusion Contrast Agent for Visualization and Diagnosis of Small-Animal Microvessel
3. 学会等名 The 6th International Symposium on Bioimaging (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田村 勝
2. 発表標題 X線イメージングによるマウス形態表現型解析の新展開
3. 学会等名 医学研セミナー (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田村 勝
2. 発表標題 高精細造影X線CTによる軟組織病態診断の可能性
3. 学会等名 日本金属学会2020年春期講演大会 (Web開催) (招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 久米 慧嗣, 小林 紀郎, 田村 勝, 村川 泰裕	4. 発行年 2019年
2. 出版社 病理と臨床	5. 総ページ数 7
3. 書名 広域電子線イメージング技術と画像データプラットフォーム	

〔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
研究 分 担 者	綾部 信哉 (AYABE SHINYA) (10633563)	国立研究開発法人理化学研究所・バイオリソース研究センター・専任研究員 (82401)	