

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 5 月 15 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19419

研究課題名(和文)3次元組織中の空間的全細胞核酸解析を目指す基盤技術開発

研究課題名(英文)Development of basic technology for spatial genomics of in three-dimensional tissues

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)・准教授

研究者番号：10444803

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文):組織内全細胞核位置を3次元的に記録後に各細胞のゲノムプロファイルを取得するボスト核酸解析を目指した基盤技術の検討を行った。臓器全体を対象とする高度な透明化手法の開発に成功した。(Cell Rep 2018)。さらに、組織の物理化学的特性を元に染色剤浸透原理を解明し、核染色剤を均一に大型臓器サンプルの深部まで浸透させるプロトコル構築に成功した。また、透明化組織全体を人工ゲルに包埋し、核酸をゲル内にキャプチャーする方法を用いて、ライトシート顕微鏡での臓器全体の観察および細胞核ボクセル位置の取得を行うことに成功した。以上の結果を論文にまとめ投稿した(Nat Commun 投稿中、課題終了後に公開)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果ではこれまで実証例のない空間的ゲノミクス実現に向けた重要な技術課題を克服し、がん、老化、発生等におけるゲノム情報と空間位置情報との関連を紐付けながら組織・臓器の構築や極めて少数の細胞種・細胞状態を同定できる新しい研究スキームの提示が期待できる。また、本研究成果で得られた新しい核染色プロトコルは、これまで解決されていなかった染色剤の浸透原理を解明し、ボトムアップなデザインを実現した。このように組織の物理化学的性質に基づいたプロトコルデザインは、今後の組織学的手法の構築に重要な方向性を示すものになるとともに、3次元病理学の実現による診断確度や客観性向上に大きく貢献するものと期待される。

研究成果の概要(英文):We tried to develop a technology for spatial genomics to obtain the genome profile of each cell after recording all nuclear positions in the three-dimensional tissue. We have successfully developed an advanced tissue clearing method that covers the whole organ. (Cell Rep 2018). In addition, we elucidated the principle of nuclear stain penetration based on the tissue's physicochemical properties. We finally constructed a uniform nuclear staining protocol for large organ samples. Using a developed gel embedding method of cleared samples, we also successfully imaged the whole organ and acquired the cell nucleus voxel's position using light-sheet microscopes. We summarized these results and submitted them in a paper (Nat Commun, submitted; published after the close of the project).

研究分野: システム生物学、薬理学

キーワード: 多階層オミクス 組織透明化 3次元イメージング 核酸解析

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

応募者はこれまで 3 次元組織中の全細胞解析 (セルオミクス) のパイプラインとして機能する「CUBIC」技術の開発を進め、一定の成果をあげてきた (Susaki et al. Cell 2014; Nat Protoc. 2015; Cell Chem Biol. 2016 他)。しかし、生体は多階層からなる複雑な構造のため、究極的には階層をまたぐマルチモダリティな全要素解析、すなわち細胞ネットワークの網羅的観察と、個々の細胞内で機能している分子ネットワークの状態観察を同時に実現しうる統合的なオミクス手法の開発が望まれる。CUBIC による透明化組織内では RNA の保存性に問題があり、遺伝子発現解析、トランスクリプトミクスとの組み合わせには障壁がある。一方、DNA の保存性は良好で、ゲノミクス・エピゲノミクスと組み合わせた統合的なオミクス実現の潜在性がある。そこで、応募者は CUBIC が提供する全細胞 3 次元観察と各細胞内の核酸解析 (特にゲノム DNA 解析) をシームレスに繋げば、階層をまたぐ統合的なオミクス (セルオミクス + 分子階層のオミクス) を同一の検体内で実現できると構想した。そのため、CUBIC パイプラインに統合可能な、核酸解析により適した透明化・サンプル処理法の開発と、その後の核酸解析への応用性の検討が必要であると考えた。

### 2. 研究の目的

細胞ネットワークの網羅的観察と、個々の細胞内で機能している分子ネットワークの状態観察を同時に実現しうる統合的・多階層的なオミクス手法の実現のため、本課題では 3 次元組織中の空間的な核酸観察・解析を実現するための基盤技術開発を目的とした。具体的には、組織内全細胞の 3 次元位置の記録後に各細胞内遺伝子発現プロファイル検出のためのポスト核酸解析を可能とする基盤技術の検討 (核酸固定法、核酸のゲル内キャプチャー法と 3 次元検出、抽出核酸のシーケンス解析に向けたクオリティチェック等) を進めることを目指した。

### 3. 研究の方法

組織透明化と光学顕微鏡観察を組み合わせ、セルオミクスとの統合のため組織内全細胞位置を 3 次元的に記録した後に、各細胞内の遺伝子発現やゲノム状態のプロファイルを検出する (ポスト核酸解析) を可能とするための、以下の基盤技術の検討を行った。

1) 固定・透明化法の改良による核酸保存法の検討: 透明化組織内の核酸の保存性を核酸染色等により評価する。標準的に使用されるパラホルムアルデヒド固定のほか、必要に応じて 1-ethyl-3-(3-dimethyl-aminopropyl) carbodiimide (Sylwestrak et al. Cell 2016) 等の核酸固定方法を検討する。

2) 核酸のゲル内キャプチャー法の検討: 3 次元組織の透明化と核酸の 3 次元保存を両立させ、その後のラベリングや逆転写処理、観察等を容易にするため、組織全体を人工ゲルに包埋し脂質やタンパク質を除去することで、核酸のみを 3 次元的にキャプチャーする方法を検討する。

3) ゲル内キャプチャーされた 3 次元組織の全細胞位置記録手法の検討: ゲル内に包埋された組織を核酸染色剤でラベリングし 3 次元観察することで、全ての細胞位置を 3D 画像として記録する手法を検討する。

4) 3 次元核酸検出・シーケンシングに向けたクオリティの検討: ゲル内に包埋された組織に対し、3 次元的なイメージングやポスト核酸抽出法などの可能性を検討する。

以上の研究計画を、研究代表者及び本研究予算で雇用予定のテクニカルスタッフを中心に、H30-31 年度 (2 年間) で遂行した。H30 年度は応募者が主に各項目の条件検討のための実験系を構築し、H31 年度中にテクニカルスタッフによる条件検討を進めた。

### 4. 研究成果

本研究課題では、1) 透明化組織中の DNA の保存性が良好であること、2) 細胞核はイメージングにより「点」として認識され、細胞単位での解析が容易なこと、3) 1 細胞核解析技術の開発、普及が急速に進んでいること、4) 空間情報と核ゲノム情報を組み合わせる研究スキームはまだほとんど報告されていないこと、などの理由から、主に「空間的ゲノミクス」を実現するための基盤技術開発に重点を置いて研究を進めた。

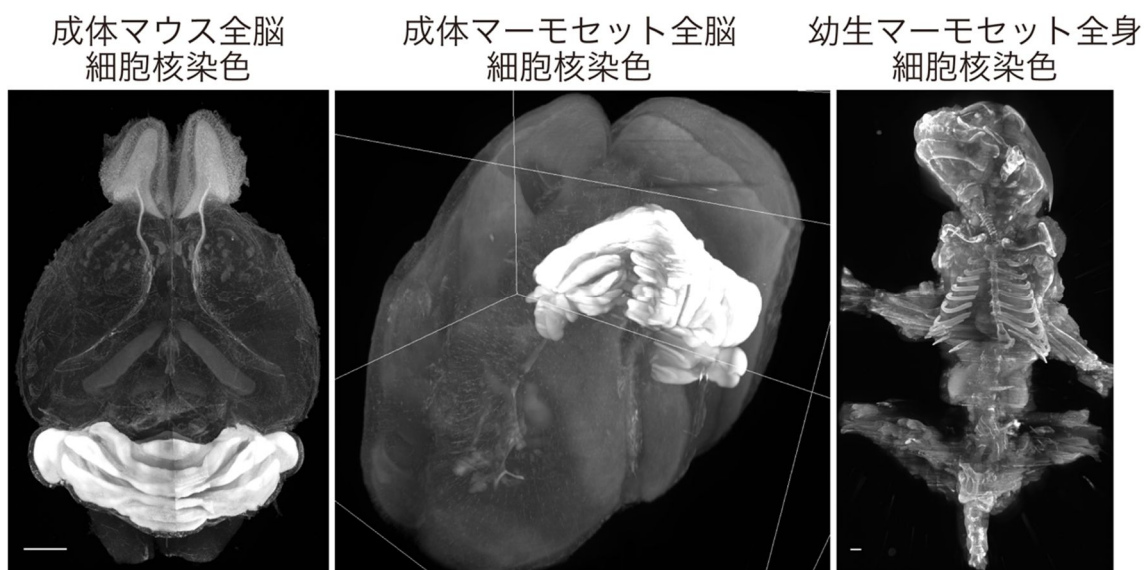
1) 核酸のラベリングと保存性の検討: 透明化組織内の DNA の保存性を核酸染色等により評価し、マウス全脳などの大型臓器中でも良好なシグナルが得られることを確認した。この際、核酸染色剤が深部まで浸透せず、臓器全体の核酸ラベリングが不均一になり保存性が評価できないことが問題となった。そこで、代表者等は組織の物理化学的物性を詳しく検討し、組織が電解質ゲルの 1 種であることを明らかにした。組織と核酸染色剤の間に存在するイオン性相互作用をはじめとする複数の相互作用が核酸染色剤の浸透を阻害していると考え、これらの相互作用をキャンセルする添加剤をテストし、最終的に大型臓器サンプル全体を均一に染色するプロトコルの構築に成功した (成果論文 1)。

2) 核酸のゲル内キャプチャーと全細胞位置記録手法の検討：3次元組織の透明化と核酸の3次元保存を両立させ、その後のラベリングや観察等を容易にするため、組織全体を人工ゲルに包埋し脂質やタンパク質を除去することで、核酸のみを3次元的にキャプチャーする方法を検討した。大型臓器サンプルの3次元イメージング実施のため、組織透明化技術の大幅な向上を目指した試薬の次世代化を行なった。1600以上の化合物ライブラリからスクリーニングを行い、組織透明化に必要な化学的性質を解析するとともに、2014年に報告した透明化化合物よりも圧倒的にパフォーマンスに優れた次世代透明化試薬の開発に成功した(成果論文3)。また、所属研究室で検討されたアガロースゲル中に透明化組織を包埋する手法(Murakami et al. Nat Neurosci 2018)を応用し、上記の次世代透明化試薬と組み合わせて核酸染色を施した透明化組織をゲル中に包埋する手法の開発に成功した。さらに、透明化組織用マクロライトシート顕微鏡システムを用い、マウス脳、マーモセット脳、幼生マーモセット全身の核酸シグナルを3次元的に取得することに成功した(成果論文1, 3)(図)。また、複数のゲル包埋法を検討することで、アクリルアミドゲルベースの組織のゲル包埋法は核酸のほか、血管構造の描出にも有効であることを報告した(成果論文2)。

以上の2項目の検討により、マウス全脳、マーモセット全脳、幼生マーモセット全身の核酸染色および3次元イメージングによるボクセル情報取得に成功し、論文報告した(下図)。

成果文献：

1. Susaki et al., Nat Commun. (2020) 投稿中(研究期間終了直後の2020年4月に公開)
2. Miyawaki, et al. Nat Commun. (2020) 11:1104.
3. Tainaka et al., Cell Rep. (2019) 24:2196-2210.



図：全臓器・全身の均一な核酸染色による、3次元内細胞核位置情報の取得例。成果文献1, 3より抜粋。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12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 Takeyuki Miyawaki, Shota Morikawa, Etsuo A Susaki, Ai Nakashima, Haruki Takeuchi, Shun Yamaguchi, Hiroki R Ueda, Yuji Ikegaya	4. 巻 11
2. 論文標題 Visualization and molecular characterization of whole-brain vascular networks with capillary resolution.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature communications	6. 最初と最後の頁 1104-1104
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-14786-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 -
1. 著者名 Puelles VG, Fleck D, Ortiz L, Papadouri S, Strieder T, Böhner AMC, 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	4. 巻 96
2. 論文標題 Novel 3D analysis using optical tissue clearing documents the evolution of murine rapidly progressive glomerulonephritis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Kidney international	6. 最初と最後の頁 505-516
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.kint.2019.02.034	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 該当する
1. 著者名 Hasegawa S, Susaki EA, Tanaka T, Komaba H, Wada T, Fukagawa M, Ueda HR, Nangaku M	4. 巻 96
2. 論文標題 Comprehensive three-dimensional analysis (CUBIC-kidney) visualizes abnormal renal sympathetic nerves after ischemia/reperfusion injury.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Kidney international	6. 最初と最後の頁 129-138
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.kint.2019.02.011	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 吉田 将太, 松本 桂彦, 洲崎 悦生, 上田 泰己	4. 巻 37
2. 論文標題 【バイオマテリアル研究に役立つ分析技術・評価法】生体組織の透明化とイメージング技術	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 バイオマテリアル-生体材料-	6. 最初と最後の頁 264-269
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 洲崎悦生	4. 巻 87
2. 論文標題 CUBICを用いた組織透明化と3次元観察	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 和光純薬時報	6. 最初と最後の頁 16-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 洲崎悦生	4. 巻 71
2. 論文標題 人工知能と神経科学 病理画像の自動診断技術と3次元病理学の発展	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Brain and Nerve	6. 最初と最後の頁 0723 0732
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 洲崎悦生	4. 巻 45
2. 論文標題 透明イメージングの臨床応用 組織透明化技術と細胞ラベリング技術	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 月刊メディカル・サイエンス・ダイジェスト	6. 最初と最後の頁 390 393
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 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	4. 巻 24
2. 論文標題 Chemical Landscape for Tissue Clearing Based on Hydrophilic Reagents.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell reports	6. 最初と最後の頁 2196-2210
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2018.07.056	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 Watanabe T, Nakamura R, Takase Y, Susaki EA, Ueda HR, Tadokoro R, Takahashi Y	4. 巻 444
2. 論文標題 Comparison of the 3-D patterns of the parasympathetic nervous system in the lung at late developmental stages between mouse and chicken.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Developmental biology	6. 最初と最後の頁 S325-336
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ydbio.2018.05.014	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 野島聡、森井英一、洲崎悦生、上田泰己	4. 巻 29
2. 論文標題 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~	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Lipid	6. 最初と最後の頁 340-345
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 0	査読の有無 無
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 野島聡、洲崎悦生、森井英一、上田泰己	4. 巻 25
2. 論文標題 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	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 LiSA	6. 最初と最後の頁 789-797
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 0	査読の有無 無
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 洲崎悦生	4. 巻 29
2. 論文標題 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	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Lipid	6. 最初と最後の頁 128-134
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 0	査読の有無 無
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19件（うち招待講演 10件 / うち国際学会 9件）

1. 発表者名 洲崎悦生
2. 発表標題 セルオミクスによる多細胞システム解明へのアプローチ
3. 学会等名 岡山大学次世代研究拠点シンポジウム2020「口腔器官の再構築から器官の発生・再生の統一原理の解明」（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 洲崎悦生
2. 発表標題 A versatile three-dimensional whole-organ/body staining and imaging with single-cell resolution based on electrolyte-gel properties of biological tissue
3. 学会等名 The Light Sheet Microscopy Conference 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Susaki EA et al.
2. 発表標題 A versatile protocol for three-dimensional whole-organ/body staining and imaging with single-cell resolution based on electrolyte-gel properties of biological tissue.
3. 学会等名 Society for Neuroscience 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 洲崎悦生
2. 発表標題 組織透明化技術の開発と医学生物学応用（モーニングレクチャー）
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 洲崎悦生
2. 発表標題 全臓器・全身スケールの多階層空間オミクス実現に向けたアプローチ
3. 学会等名 シングルセルゲノミクス研究会2019 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 洲崎悦生
2. 発表標題 全臓器・全身の細胞ダイバーシティー解明を目指す臓器スケール3次元組織学への挑戦
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会・第71回日本細胞生物学会大会 合同年次大会 共催シンポジウム「総力戦でのぞむ細胞社会ダイバーシティー解明への挑戦」(兼オーガナイザー)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 洲崎悦生
2. 発表標題 CUBIC-HistoVIsion: A pipeline for three-dimensional whole-organ staining and imaging with single-cell resolution based on chemical properties of tissue
3. 学会等名 RIKEN BDR seminar at Kobe (host: Dr. Kazunari Miyamichi)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 洲崎悦生
2. 発表標題 組織3D染色による細胞の網羅的解析技術の開発
3. 学会等名 JSTさきがけ・統合1細胞領域 第4回成果報告会 (日本化学会第99回春季年会2019 コラボレーション企画)
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 洲崎悦生
2. 発表標題 CUBIC-HistoVIsion: a pipeline for three-dimensional whole-organ/body staining and imaging with single-cell resolution based on chemical properties of tissue gel
3. 学会等名 Visiting seminar at Oxford University, UK (host: Host: Dr Ana Domingos) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 洲崎悦生
2. 発表標題 CUBIC-HistoVIsion: a pipeline for three-dimensional whole-organ/body staining and imaging with single-cell resolution based on chemical properties of tissue gel
3. 学会等名 Visiting seminar at Science for Life Laboratory (KTH), Sweden (host: Prof. Hans Blom) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 洲崎悦生
2. 発表標題 Whole-organ/body analysis of multicellular systems by CUBIC platform
3. 学会等名 Single cell biology meets diagnostics: 12th International workshop on approaches to single cell analysis, Uppsala University, Sweden (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 洲崎悦生
2. 発表標題 CUBIC-HistoVIsion: a pipeline for three-dimensional whole-organ/body staining and imaging with single-cell resolution based on chemical properties of tissue gel
3. 学会等名 Bioscience seminar (visiting seminar), Uppsala University, Sweden (Host: Prof. Ola S?derberg) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 洲崎悦生
2. 発表標題 多細胞システムの状態定義・分離を目指す技術開発
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 洲崎悦生
2. 発表標題 CUBIC-HistoVIsion: a pipeline for three-dimensional whole-brain/organ staining and imaging with single-cell resolution
3. 学会等名 ECRO 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 洲崎悦生
2. 発表標題 多細胞システムの理解に向けた要素技術開発と展望
3. 学会等名 第58回 生命科学夏の学校 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 洲崎悦生
2. 発表標題 網羅的細胞観察・解析技術による、多細胞システム解明への挑戦
3. 学会等名 第5回包括的緩和医療科学学術研究会/第6回Tokyo疼痛緩和次世代研究会 合同研究会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 洲崎悦生
2. 発表標題 Tissue clearing and 3D imaging: basics and applications
3. 学会等名 EMBO practical course on light sheet microscopy (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 洲崎悦生
2. 発表標題 CUBIC-HistoVision: a pipeline for 3D whole-organ/body staining and imaging with single-cell resolution based on chemical properties of tissue gel
3. 学会等名 SBIC seminar, A*STAR, Singapore (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 洲崎悦生
2. 発表標題 個体レベルのシステム生物学実現を目指す技術開発
3. 学会等名 第91回日本内分泌学会学術総会 中堅・若手の会YEC企画2「生体リズム研究の新展開」(招待講演)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 洲崎悦生 他(分担執筆)	4. 発行年 2019年
2. 出版社 (株)シーエムシー出版	5. 総ページ数 258
3. 書名 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术からの新しい視点～ 監修：植田充美	

1. 著者名 洲崎悦生 他(分担執筆)	4. 発行年 2018年
2. 出版社 化学同人	5. 総ページ数 290
3. 書名 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	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>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  <a href="http://www.h.u-tokyo.ac.jp/press/press_archives/20190409.html">http://www.h.u-tokyo.ac.jp/press/press_archives/20190409.html</a>          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 -  <a href="http://www.riken.jp/pr/press/2018/20180822_1/">http://www.riken.jp/pr/press/2018/20180822_1/</a></p>
--

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
研究協力者	上田 泰己  (Ueda Hiroki)  (20373277)	国立大学法人東京大学・大学院医学系研究科・教授     (12601)	