



2014年11月4日
独立行政法人理化学研究所
独立行政法人科学技術振興機構
国立大学法人東京大学

マウスを丸ごと透明化し1細胞解像度で観察する新技術

—血液色素成分を多く含む臓器なども脱色して全身を透明化—

本研究成果のポイント

- アミノアルコールが血液中ヘムの溶出により組織脱色を促進することを発見
- 1細胞解像度での全身・臓器丸ごとイメージング法を実現
- 臓器を丸ごと立体像として捉える手法を確立、三次元病理解析や解剖学への応用へ

理化学研究所（理研、野依良治理事長）と東京大学（濱田純一総長）は、全脳イメージング・解析技術「CUBIC（キュービック）^[1]」の透明化試薬を用い、マウス個体全身における遺伝子の働きや細胞ネットワーク構造を三次元データとして取得し、病理解析や解剖学に応用するための基盤技術を開発しました。この技術によってマウスの全身および臓器を丸ごと透明化し、細胞一つ一つを識別し、1細胞解像度で観察することができます。これは、理研生命システム研究センター（柳田敏雄センター長）細胞デザインコアの上田泰己コア長、田井中一貴 元研究員（現 東京大学大学院医学系研究科機能生物学専攻薬理学講座システムズ薬理学分野講師）、東京大学大学院医学系研究科機能生物学専攻薬理学講座システムズ薬理学分野の久保田晋平日本学術振興会特別研究員らの共同研究グループの成果です。

マウス個体には約300億個の細胞があり、複雑な細胞ネットワークが構築されています。共同研究グループは、個体全身の遺伝子発現の様子や細胞ネットワークの動きを定量的に取り扱うことで、個体レベルで生命現象を捉え、その現象の仕組みを解明する、新たなイメージング技術の開発を目指しました。

共同研究グループは、CUBICの透明化試薬に含まれるアミノアルコールが、生体組織中の代表的な色素である血液中のヘム^[2]を溶出し、組織の脱色を促進することを発見しました。生体組織による光の散乱だけでなく、光の吸収を抑えることで10日から2週間のうちにマウスの臓器および全身を丸ごと透明化できる新しい透明化プロトコルの開発に成功しました。さらに、シート照明型蛍光顕微鏡^[3]を用いることで、体内の解剖学的構造や遺伝子発現の様子を1細胞解像度で三次元イメージとして高速に取得することが可能となりました。また、膵臓におけるランゲルハンス島^[4]の体積や個数を統計解析する手法を作り、糖尿病モデルマウスのランゲルハンス島の三次元病理解析を可能にしました。さらに、イメージング画像解析から、各臓器において解剖学的に重要な心臓の心房・心室や肺の気管支樹などの構造を抽出することにも成功しました。

この基盤技術は、遺伝学的に組み込んだ蛍光タンパク質を検出するだけでなく、免疫組織化学的な解析にも適用できます。本成果は、一個体の生命現象とその原理を解明できることから、生物学だけでなく、医学分野においても大きな貢献が期待できます。本研究成果は、米国の科学雑誌『Cell』（11月6日号）に掲載されました。

1. 背景

約 350 年前に初めて細胞が発見されて以来、哺乳動物のような不透明な生物の個体全身を 1 細胞解像度で観察することは、生物学や医学において長年の大きな課題の一つでした。マウス個体は約 300 億個の細胞から構成され、全身に複雑な細胞ネットワークが張り巡らされています。一方で、免疫疾患やがんなどは、わずか 1 細胞の変化が、細胞ネットワークを通じて生命システム全体に重大な結果をもたらすことが知られています。個体全身を 1 細胞解像度で解析できる技術が確立されれば、既存の技術では検出困難な病態の初期過程のネットワーク構造を明らかにする上で、有効なアプローチとなります。上田泰己コア長らは、これまで「システム生物学」的アプローチにより生命を理解する研究を進めてきました。近年では、医学・生物学分野へのより広い貢献を視野に、「細胞や組織」内の生命システムを理解し、睡眠・覚醒など個体レベルの生命現象の原理を解明するための技術開発を進めています。

共同研究グループは、個体全身を一つのシステムとして総合的に解析するために、全身の細胞ネットワークや遺伝子の働きを 1 細胞解像度で三次元画像として取得するためのイメージング技術の開発に取り組んできました。例えば、脂質が主成分となる脳組織では、光の散乱の原因となる脂質の除去と組織内の屈折率の均一化により、透明度の高い脳サンプルを得ることができました^{注)}。しかし、血液などの生体色素を多く含む心臓や肝臓などの臓器を透明化するためには、光を吸収する生体色素を除去する効果的な手法が必要です。

これまで数多くの生体組織透明化技術が開発されてきましたが、いずれも脂質の除去と屈折率の均一化に焦点が当てられており、血液などの生体色素を含む組織を効果的に脱色できる透明化手法はありませんでした。

注) 2014 年 4 月 18 日プレスリリース

「成体の脳を透明化し 1 細胞解像度で観察する新技術を開発」

http://www.riken.jp/pr/press/2014/20140418_1/

2. 研究手法と成果

マウスの個体全身を丸ごと透明化するためには、脂質の除去、並びに屈折率の均一化だけでなく、血液中の赤色色素「ヘム」に代表される生体色素の脱色が重要になります。共同研究グループは、同グループが全脳イメージング・解析技術として開発した CUBIC で用いた透明化試薬 (ScaleCUBIC 試薬、以下 CUBIC 試薬) が、血液を効率的に脱色することを発見しました。CUBIC 試薬の構成要素の一つであるアミノアルコールが、血液中のヘムを効率良く溶出し、血液を脱色するメカニズムを明らかにしました (図 1)。

また、CUBIC 試薬の脱色活性に着目し、透明度の高いサンプルを取得する新しい「灌流 (CB-Perfusion) プロトコール」を開発しました。まず、マウス個体を 4% パラホルムアルデヒド水溶液で灌流 (かんりゅう) 固定^固します。続いて、1/2 に希釈した CUBIC 試薬を、血管系を介して全身に循環させます。その後、臓器 (心臓・肺・腎臓・肝臓・膵臓・脾臓・筋肉・胃・腸管・皮膚) を CUBIC 試薬に 10 日間浸すこと

で臓器丸ごとを、また、皮膚を剥離したマウス個体を2週間浸すことで個体全身丸ごとを透明化できます(図2)。

さらに、透明化した臓器や個体サンプルをシート照明型蛍光顕微鏡で観察することで、臓器丸ごと・個体丸ごとにおける1細胞解像度の三次元イメージングデータを1時間程で取得できました(図3)。これは、遺伝学的に組み込んだ蛍光タンパク質だけでなく、臓器や個体の解剖学的な構造を取得するための核染色剤も可視化できることを示します。

共同研究グループは、CUBICの三次元病理解析への応用の一例として、膵臓に島状に散在する内分泌機能を有する細胞群「ランゲルハンス島」の体積と総数を統計解析する手法を作り、健常マウスと糖尿病モデルマウスで比較しました(図4)。その結果、予想通り、糖尿病モデルマウスにおいてランゲルハンス島の総数が大きく減少し、特に体積の大きなランゲルハンス島が減少していることを確認しました。

また、三次元解剖学への応用例として、イメージングデータの画像解析により、各臓器の解剖学的に重要な構造を抽出することに成功しました(図5)。例えば、心臓における心室や心房、肺における気管支樹、腎臓における皮質・髓質・腎盂(じんう)、肝臓における脈管構造などを可視化しました。さらに、CUBICと免疫染色法⁶⁾とを組み合わせた臓器丸ごと免疫染色法を確立し、免疫組織化学的な解析にも適用できることを示しました(図6)。

3. 今後の期待

CUBICは、全身の細胞の働きを1細胞解像度で網羅的に観察できる技術です。本技術により、個体レベルの生命現象とその動作原理を対象とする「個体レベルのシステム生物学」の実現に1歩近づき、生物学のみならず、医学分野においても大きな貢献をもたらすと期待できます。

なお、本研究は、科学技術振興機構(JST)戦略的創造研究推進事業(CREST)、科学研究費補助金 基盤研究S、科学研究費補助金新学術領域研究(研究領域提案型)、島原科学振興会 研究助成、日本学術振興会特別研究員奨励費などの支援を得て行われました。

原論文情報：

Kazuki Tainaka, Shimpei I. Kubota, Takeru Q. Suyama, Etsuo A. Susaki, Dimitri Perrin, Maki Ukai-Tadenuma, Hideki Ukai, and Hiroki R. Ueda. "Whole-body imaging with single-cell resolution by tissue-decolorization" *Cell*, 2014, doi: org/10.1016/j.cell.2014.10.034

<報道担当・問い合わせ先>

(問い合わせ先)

独立行政法人理化学研究所

生命システム研究センター 細胞デザインコア

コア長 上田 泰己 (うえだ ひろき)

TEL : 078-306-3191 FAX : 078-306-3194

E-mail : uedah+tky@umin.ac.jp

生命システム研究センター

広報担当 川野 武弘 (かわの たけひろ)

TEL : 06-6155-0113 FAX : 06-6155-0112

(JST の事業に関すること)

独立行政法人科学技術振興機構 戦略研究推進部

川口 貴史 (かわぐち たかふ

み)

TEL : 03-3512-3524 FAX : 03-3222-2064

(報道担当)

独立行政法人理化学研究所 広報室 報道担当

TEL : 048-467-9272 FAX : 048-462-4715

独立行政法人科学技術振興機構 広報課

TEL : 03-5214-8404 FAX : 03-5214-8432

国立大学法人東京大学 大学院医学系研究科 総務係

TEL : 03-5841-3304 FAX : 03-5841-8585

<補足説明>

[1] CUBIC(キュービック)

Clear, Unobstructed Brain Imaging Cocktails and Computational analysis の略。2014年4月に理研の上田泰己コア長洲崎悦生 元基礎科学特別研究員らが発表した脳透明化と全脳イメージングのための透明化試薬(化合物の混合溶液)とコンピュータ画像解析を合わせた方法。サンプルを試薬に浸すだけの効率的で再現性の良い方法で、複数のサンプルを同等な条件で透明化することが可能。1細胞解像度の全脳蛍光イメージングと、情報科学的解析によるサンプル間のシグナル比較法を実現。

2014年4月18日プレスリリース

「成体の脳を透明化し1細胞解像度で観察する新技術を開発」

http://www.riken.jp/pr/press/2014/20140418_1/

[2] へム

2 価の鉄とポルフィリンからなる金属錯体。赤血球中のヘモグロビンは、ヘムと球状タンパク質グロビンから構成されている。グロビンは透明であるが、ヘムは可視光領域に特徴的な吸収を有しており、グロビンに結合しているヘムに酸素が配位することで、血液の色となる赤色を呈する。

[3] シート照明型蛍光顕微鏡

レーザー光をシート状に広げてサンプルの横から照射し、上から撮影することで、サンプル内のある平面を 1 回で撮影できる顕微鏡。シートまたはサンプルを、Z 方向に動かして平面を重ねることで、高速に三次元画像を取得できる。ただし、サンプルの透明度が低いと使用できない。このため、マウス臓器のようなセンチメートルサイズの大きなサンプルは、これまで撮影が困難だった。

[4] ランゲルハンス島

膵臓に島状に散在する内分泌機能を有する細胞群。血糖値を上昇させるグルカゴンを分泌する α 細胞や、血糖値を下降させるインシュリンを分泌する β 細胞などから構成されている。ランゲルハンス島の β 細胞の大半が破壊されるとインシュリンの分泌量が著しく低下し、血糖値が異常な高値となる 1 型糖尿病を発症する。

[5] 灌流(かんりゅう)固定

組織内の成分をできるだけ生体時に近い状態で保存するために用いられる代表的な固定化法。仮死状態の動物に、血管系を介して 4%パラホルムアルデヒド水溶液などの固定液を注入することで、全身の組織に固定液を行き渡らせることができる。

[6] 免疫染色法

細胞や組織におけるタンパク質を検出するために広く用いられる手法。抗体の持つ特性を利用するため、免疫染色法と呼ばれる。検出したいタンパク質に対する抗体（一次抗体）を作製し、ホルマリンなどで固定した組織や、その切片に抗体を反応させる。すると抗体は、目的タンパク質にのみ結合する。抗体をあらかじめ蛍光色素などで標識しておけば、タンパク質の存在するところだけが蛍光などを発するので、組織の中のどの細胞がそのタンパク質を発現しているか、あるいは細胞の中のどこにタンパク質が局在しているかを知ることができる。より広く用いられる方法としては、抗体を認識する抗体（二次抗体）を蛍光色素などで標識して、一次抗体と反応させ、蛍光を顕微鏡などで検出する。

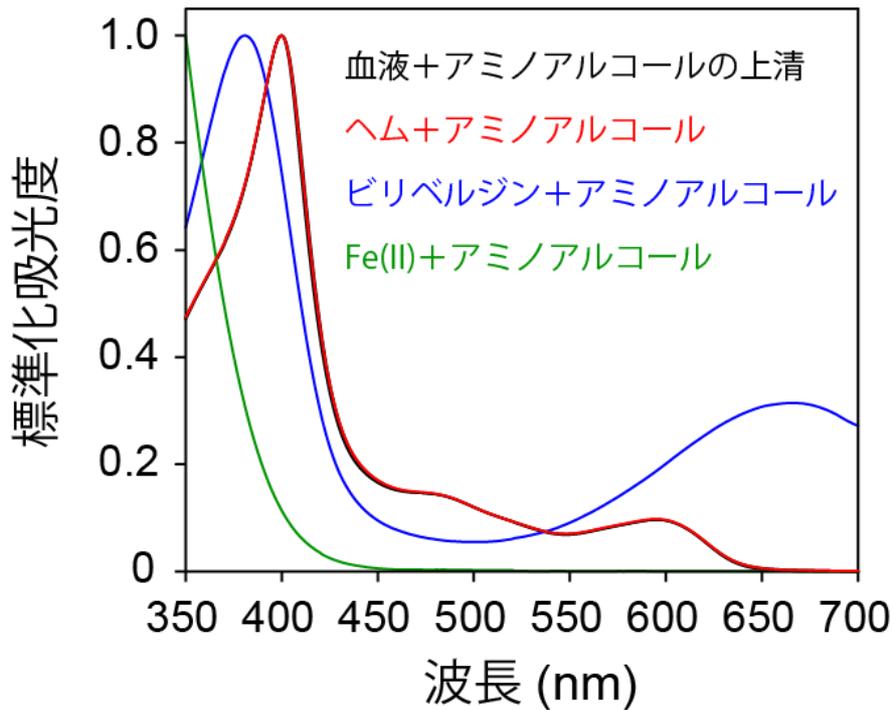


図1 アミノアルコールによる血液中のヘムの溶出

血液とアミノアルコールを混合すると黒緑色を呈する。混合液の上清※の吸収スペクトル（黒線）は、精製ヘム-アミノアルコール溶液（赤線）の吸収スペクトルと完全に一致した（図中の赤線と黒線は重なっている）。一方で、ヘムの代謝物であるビリベルジン（青線）や二価鉄のアミノアルコール溶液（緑線）の吸収スペクトルとは全く異なっていた。このことから、アミノアルコールが血液中のヘムを溶出していることが分かった。

※液体中に分散した微粒子などが遠心力や重力で沈殿した上部の透明な液体の部分



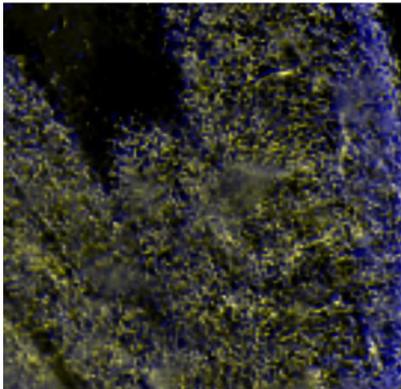
図2 マウス全身の透明化

開発した灌流（CB-Perfusion）プロトコールで、マウスの全身を丸ごと透明化した様子。左は幼児マウス、右は成体マウス。

心臓



心臓拡大断面図



幼生マウス全身



図 3 臓器と個体丸ごとイメージング

細胞に蛍光タンパク質（黄色：心臓－mKate、幼生マウス－EGFP）が発現している成体マウスの心臓と幼生マウス全身を、細胞核が染まる蛍光色素（青色：心臓－SYTO 16、幼生マウス－Propidium Iodide）で染色し、2色の臓器・全身丸ごとイメージングを行った。透明化手法とシート照明型蛍光顕微鏡の併用により、観察したい遺伝子発現と組織の構造を複数の色で高速にイメージングし、臓器・全身丸ごとを1細胞解像度で観察することが可能になった。ここに示したサンプルの例では、1色・1方向あたり30～60分程度でイメージングデータを取得できた。

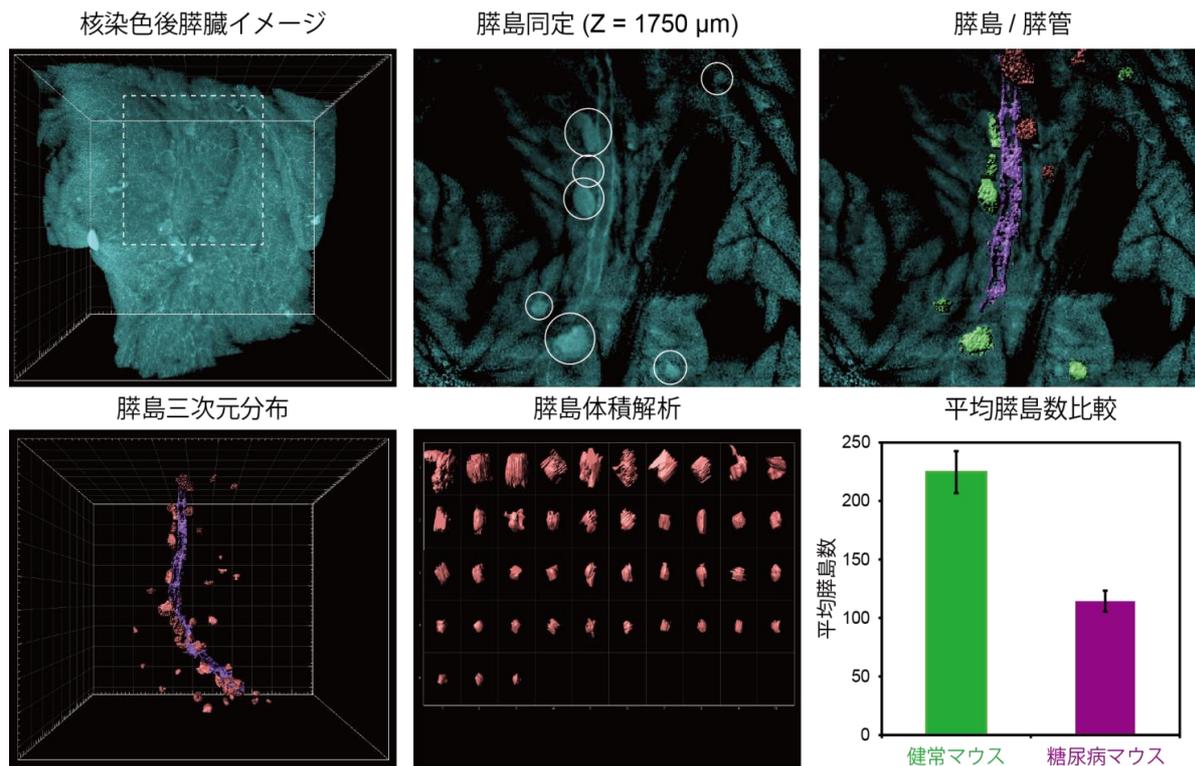
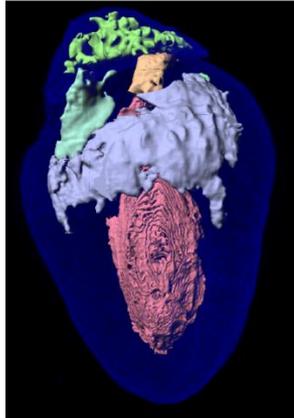


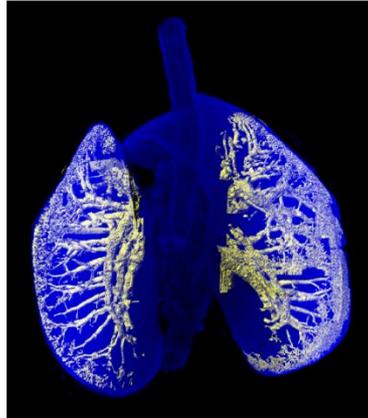
図 4 CUBIC による三次元病理解析

健常マウスと糖尿病モデルマウス由来の膵臓におけるランゲルハンス島の三次元病理解析。糖尿病を発症したマウス、および健常マウス由来の膵臓を透明化試薬により透明化するとともに細胞核が染まる蛍光色素により染色した。蛍光イメージングにより観察すると細胞核が密集したランゲルハンス島や管構造を有する膵管を同定できる。画像解析により、これらの構造を三次元再構成することでランゲルハンス島や膵管の三次元分布を描出できる。また、同定されたランゲルハンス島の体積の統計解析や、健常マウスと糖尿病マウスのランゲルハンス島の平均数の統計解析比較も行うことができた。

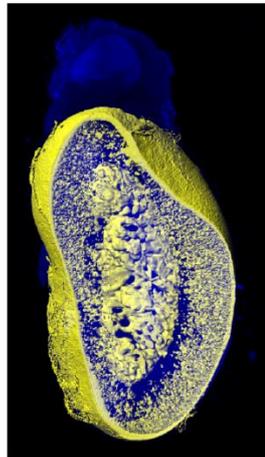
心臓



肺



腎臓



肝臓

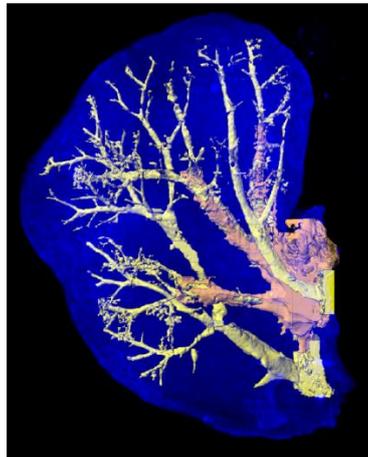


図5 CUBICによる三次元解剖学

臓器を丸ごとイメージングした画像。細胞核の密集度合の違いや蛍光タンパク質の発現パターンの違いから、画像解析により臓器の特徴的な構造を抽出できる。心臓では心室・心房などの内部構造、肺では気管支樹、腎臓では皮質・髄質・腎盂、肝臓では脈管構造などを抽出できた。

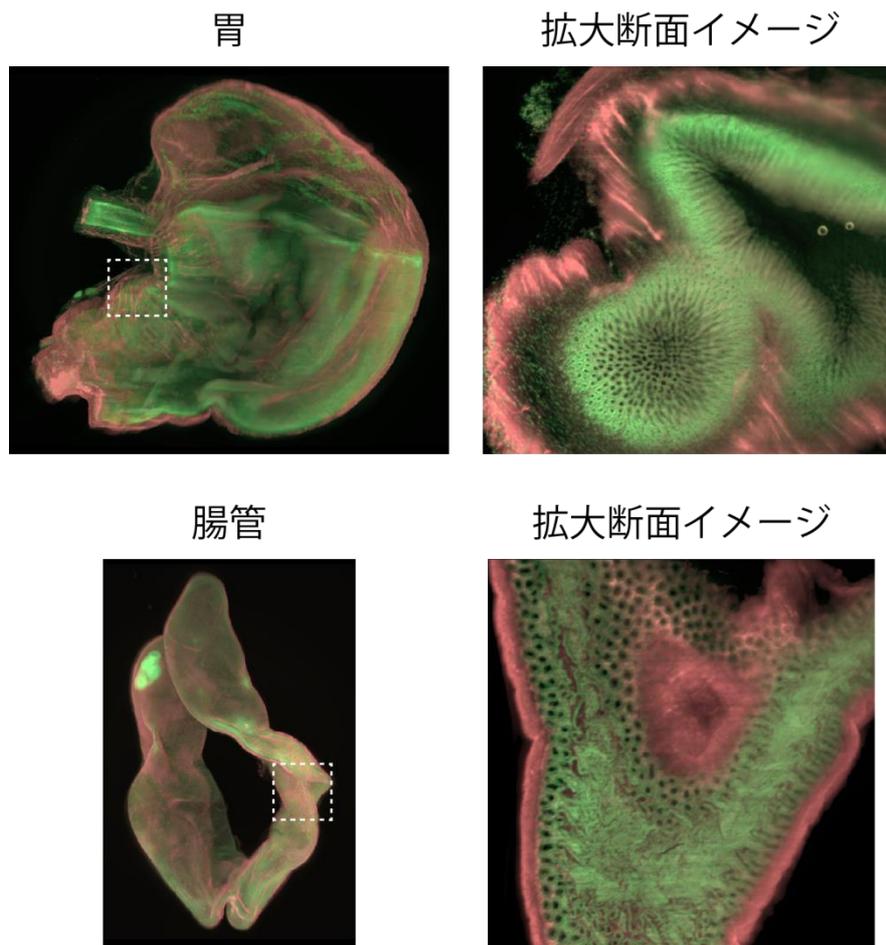


図 6 臓器丸ごと免疫染色

核染色剤（緑：SYTO 16）により染色した胃と腸管を、平滑筋アクチンに対する蛍光標識抗体で免疫染色（赤： α -SMA Cy3）し、シート照明型蛍光顕微鏡を用いて撮影した。CUBICと免疫染色を組み合わせることで、臓器丸ごとの三次元イメージングに成功した。