

日本医療研究開発機構 先端的バイオ創薬等基盤技術開発事業
事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名：（日本語）先端的医療技術に対する全臓器・全身スケールでの評価技術基盤の開発
（英 語）Development of a technological platform for the evaluation of advanced
medical technologies on a whole-organ/whole-body scale

研究開発実施期間：令和 元年 10 月 1 日～令和 6 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名：（日本語）上田 泰己
（英 語）Hiroki R. Ueda

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：
（日本語） 国立大学法人東京大学，大学院医学系研究科・教授
（英 語） Graduate School of Medicine, The University of Tokyo / Professor

II 研究開発の概要

研究開発の成果およびその意義等

バイオ研究、創薬研究などの先端的医薬品等開発や病理診断において従来の切片を染色して観察する方法から、透明化して3Dイメージング、解析を行うことでより多くの領域から3次元的な情報を得ることの要求が高まっている。特に脳や腎臓などのマウス臓器全体のイメージングや、オルガノイドの3次元的な構造情報の取得など、従来の2Dから3Dへの移行が期待されている。また、製薬企業も創薬現場に透明化技術の導入を進めているところが多いとされており、次世代の創薬にも不可欠な技術となりつつある。安全で蛍光タンパク質の蛍光を保持したままセンチメートルサイズの臓器をまるごと透明化可能なCUBIC技術は、基礎研究や創薬研究において他の透明化技術と比べて応用範囲が広い。とくに有機溶媒を用いないために大規模な研究に用いることが可能である点や、免疫染色時に溶液交換の手間が少ないことなど多くのメリットがあるため、CUBICを用いた透明化技術の向上、3D免疫染色技術の開発・改良、データ解析プラットフォームの構築は今後の創薬研究において重要である。先端的医薬品等開発における我が国の国際競争力を確保することに資すると期待されるアカデミア発の技術シーズとして、世界に類を見ない全身全細胞解析パイプラインCUBICをベースに「先端的医療技術に対する全臓器・全身スケールでの医薬品等の局在および生体反応の評価技術基盤」を構築するために1)組織3次元染色技術の高速化・高度化、2)透明化技術のさらなる高速化・高度化、3)1細胞解像度イメージングデータの解析基盤としての臓器1細胞解像度アトラスの構築、4)マウス全脳薬物反応のデータベース構築の4つの技術開発を行い、先端的医療技術創出において革新的な基盤技術の構築を行った。

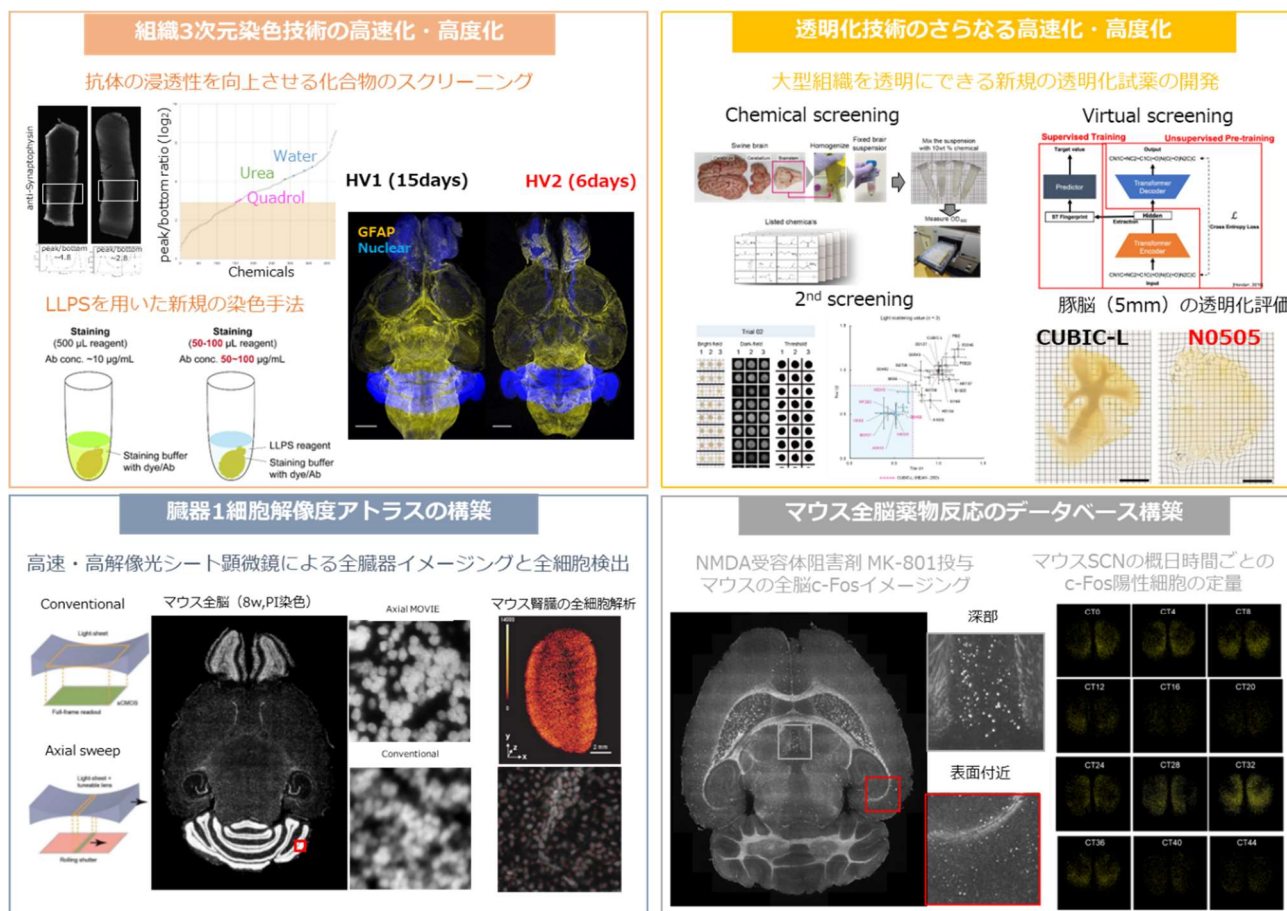


図. 本事業で開発を行った4つの項目の概要

組織 3 次元染色技術の高速化・高度化において、抗体の浸透度を定量的に評価するスクリーニング系の開発を行い、当教室で利用可能な 1600 以上の化合物ライブラリから、蛍光タンパク質のシグナルに影響を与えない化合物（約 500 種類）のライブラリを得た。この中から、抗体の浸透性を向上させる 6 種類の化合物を見つけ

ることに成功した。これらの化合物を1種類または複数種類を添加することで抗体の組織深部への浸透性を向上できる。また、抗体の組織浸透速度は抗体の濃度に強く依存することがシミュレーションの結果から予想されていたため、染色バッファーの量を少なくして抗体濃度を高くする手法の開発を行った。これまではマウス全脳でおおよそ500 μ Lの染色液を使用しており、これより液量を少なくすると染色液が組織全体に行きわたらないという問題があったが、組織と少量の染色液（50~100 μ L程度）を特殊な溶液で包んでゆっくり転倒混和（~1 rpm）させることで、染色液が表面張力によって組織表面を覆いながら循環するLLPS（liquid-liquid phase separation）をベースにした全く新規の染色方法の開発に成功した。この方法により、実際の抗体使用量を増やさずに抗体濃度を高くすることができ、組織への高い抗体の浸透性と高いシグナルノイズ比を実現することに成功した。この新規の抗体浸透性を向上させる化合物とLLPS法を用いた方法をCUBIC-HV2と命名した。CUBIC-HV2は従来のCUBIC-HVに比べて抗体の浸透性が2倍程度早く、さらに核染色も免疫染色と同時にできるため、透明化・染色の時間を大幅に短縮することに成功した。

透明化技術のさらなる高速化・高度化では、透明化が困難なブタ脳白質を用いたケミカルスクリーニング系を構築し、従来の脱脂剤より高い脱脂作用を有する試薬の開発に成功した。また、従来の屈折率調整剤に新たに発見したコラーゲンとの親和性の高い高屈折率の添加剤を加えることで、屈折率調整剤の高機能化にも成功した。この新規の脱脂剤および屈折率調整剤を従来のCUBIC試薬（CUBIC-L, CUBIC-R+）と併用または置き換えることで、これまでは透明化が困難であったブタ脳スラブなどの組織も高い透明度で透明化することが可能となった。

1細胞解像度イメージングデータの解析基盤としての臓器1細胞解像度アトラスの構築においては、大型臓器の全臓器全細胞アトラスの構築のため大型かつ高速・高解像度のライトシート顕微鏡を開発、構築した。これには、油浸の長作動距離の対物レンズ（WD: 32.9, NA: 0.3, 京セラSOC、またはWD: 30, NA: 0.6, オリンパス）を用いた。高いz分解能が必要なため、Axial sweep法（K. M. Dean, Biophysical Journal, 108, 2015）の導入を行い、高解像の光シート顕微鏡を構築した。さらに、高解像で大きな臓器を撮影するためには高速な撮影が必要であるため、我々の開発したMOVIEシステムも導入することで、高速でz分解能も向上させた新規のMOVIE顕微鏡を開発した。これらの顕微鏡を用いて、アトラス作製に必要なマウス腎臓やラット脳の高解像の画像を取得してすべての細胞の座標情報を得た。3D画像では電動ステージのピッチング・ヨーイングの影響や、表面、裏面の僅かな回転角度の違いによって6軸方向へのstitchingが必要になる。1サンプルで数十TB（数百テラバイト）におよぶデータを1細胞以下の精度で3次元的に6軸の変形に対応したstitchingできるソフトウェアはないため、新規のstitchingアルゴリズムの開発もおこなった。これを用いることで、臓器内の全細胞の正確な座標を決定することができ、全臓器全細胞アトラスを構築できるようになった。シスプラチンを投与したマウスの腎臓への副作用の全細胞解析を行った結果、vehicle群はマウス腎臓アトラスと同様のおおよそ8000万細胞であったのに対し、シスプラチン投与マウスの腎臓ではおおよそ6000万個まで減少がみられた。本事業で作成したマウス腎臓の全細胞アトラスを用いてこの詳細な解析を実施した。サンプルをアトラスにマッピングするためには、細胞の密度画像を作成し、ANTsソフトウェアを用いて位置合わせを行った。その結果、皮質部分で顕著に細胞数の減少がみられていた。尿細管の細胞数には影響がなく、腎盂、糸球体でも小さな細胞数の変化が観察された。また、週齢の異なるマウス（1,2,3,5,8週齢）のそれぞれの細胞数の変化を定量したところ、糸球体数に変化はないが、皮質では5週齢まで細胞数が増加し、腎盂では3週齢まで細胞数が増加することがわかった。さらに、皮質でも深部と表面付近では細胞数の増加割合が週齢ごとに異なることがわかった。

マウス全脳薬物反応のデータベース構築では、中枢神経系の創薬研究を加速させるために、マウス全脳における薬物反応データベース作成を行った。神経の活動状況はanti-c-Fos抗体を用いて可視化した。免疫染色にはCUBIC-HV2を用いた。薬剤の効果が投与の時間によって異なるため、はじめにマウス全脳での概日リズムとそれに伴った神経活動の変化のデータベース作成を行った。マウス全脳での概日リズムデータベースの作製に

は2日間のDark-Dark条件下で4時間おきにマウス脳のサンプリングを行った (n=6を2セット)。サンプリング時の音などの影響が次のタイムポイントに影響を与えるため、複数のラックを用いて影響を最小限にとどめる工夫をした。透明化・c-Fos染色、核染色されたマウス全脳を低倍率(10umボクセル)の光シート顕微鏡を用いてイメージングをおこなった。c-Fos陽性細胞の検出には点状のシグナルを検出するアルゴリズムを開発した。その結果、各タイムポイントで100万から300万細胞を検出することができ、CT0付近でc-Fos陽性細胞数が極大をむかえることがわかった。さらに、視交叉上核ではCT4から8付近で極大を示し、マウス脳の642領域中398領域でc-Fos陽性細胞数が振動していることがわかった。振動の位相は領域ごとにことなり、視交叉上核と同位相の領域や逆位相の領域など様々であり、薬剤の影響を解析する上では、その薬剤が作用する領域や投与する時間の影響は正確な薬剤の評価に重要になる可能性が示唆された。これらの結果は多くの研究者が創薬研究などに用いることができるようにウェブ上に公開を予定している。また、マウス全脳薬物反応のデータベース構築においては、カフェイン、クロザピン、リスペリドン、フルボキサミンなど10種類の薬剤を投与し、その全脳のc-Fos陽性細胞のイメージングを実施した。3D画像からc-Fos陽性細胞を検出してvehicle群と薬剤投与群の統計比較をおこなうパイプラインを構築し、解析を実施したところ、カフェイン投与のマウスを例にあげると、大脳皮質と吸球において顕著にc-Fos陽性細胞数が増加していることを確認した。

In advanced drug development and pathological diagnosis, the demand for obtaining three-dimensional information. This shift from traditional staining and observation of tissue sections to clearing and 3D imaging is especially anticipated for imaging entire mouse organs, like the brain and kidneys, and acquiring the 3D structural information of organoids. CUBIC technology which is one of the most famous tissue-clearing method, allows for the safe clearing of centimeter-sized organs while preserving fluorescent protein signals, offering a broader application range in basic and drug discovery research compared to other clearing techniques. Its advantages include suitability for large-scale research without organic solvents and reduced effort for solution exchange during immunostaining. Therefore, enhancing the clearing technology using CUBIC, developing and refining 3D immunostaining techniques, and building data analysis platforms are crucial for future drug discovery research. As a promising academic technology seed, we aim to establish a unique "technology platform for evaluating the localization and biological responses of pharmaceuticals on a whole-organ, whole-body scale." This involves four technological developments: 1) accelerating and enhancing tissue 3D staining technology, 2) further accelerating and enhancing clearing technology, 3) constructing an organ single-cell resolution atlas, and 4) building a database for mouse whole-brain drug responses.

In accelerating and enhancing tissue 3D staining technology, we developed a screening system to evaluate antibody penetration. From a library of over 1600 compounds, we identified approximately 500 that do not affect fluorescent protein signals. Among these, six compounds significantly improved antibody penetration. This allows for higher antibody concentrations without increasing the actual amount used, achieving high penetration and signal-to-noise ratio. This method, named CUBIC-HV2, is twice as fast as the conventional CUBIC-HV and allows for simultaneous nuclear staining, significantly reducing clearing and staining time.

For further enhancement of clearing technology, we developed reagents with higher defatting effects than conventional ones using pig brain white matter. Additionally, we enhanced refractive index matching reagents by adding high-refractive index additives with high collagen affinity. These new reagents enabled high transparency in previously difficult tissues, like pig brain slabs.

In constructing an organ single-cell resolution atlas, we developed a large, high-resolution light sheet microscope. Using this, we obtained high-resolution images of mouse kidneys and rat brains, determining the exact coordinates of all cells and creating a whole-organ, whole-cell atlas. For example, a detailed single-cell analysis of mouse kidneys treated with cisplatin revealed significant cell number reduction in the cortex. We also quantified cell number changes in mice of different ages, discovering varied rates of increase in different regions.

For the mouse whole-brain drug response database, we visualized neural activity using anti-c-Fos antibodies with CUBIC-HV2. We created a circadian rhythm database by sampling mouse brains every four hours under dark-dark condition. This showed significant c-Fos-positive cell oscillations in various brain regions, suggesting the importance of drug administration timing. We also imaged c-Fos-positive cells after administering ten different drugs. For example, caffeine administration significantly increased c-Fos-positive cells in the cerebral cortex and olfactory bulb.