

[課程-2]

## 審査の結果の要旨

氏名 久保田 晋平

個体レベルでの細胞動態そして少数細胞が重要な意味を持つ生命現象、病理現象を捉えるために、CUBIC 試薬が持つ脱色効果に着目しマウス全身・全臓器イメージングを可能にする技術開発を行った。また全身・全臓器透明化手法を用いることで全身・全臓器一細胞解像度イメージング、そして一細胞解像度での解剖学的解析、病理学的解析に取り組み個体・臓器において細胞の位置情報と機能情報を保持した状態での定量的解析基盤を確立した。

### 1. 脱色効果の原理解明および全身・臓器透明化

CUBIC試薬がもつ組織の脱色作用の原理探索を行った。CUBIC試薬の血液脱色能に注目することによって、アミノアルコールがヘモグロビン中のヘムを高効率に溶出する性質を有していることを明らかにした。生体組織において光吸収により光透過性を妨げる代表的な色素であるヘムの溶出作用があるため、CUBIC試薬は高効率な臓器脱色能を保持することが明らかになった。PFA灌流固定時にCUBIC試薬を全身還流し、さらにCUBIC試薬中での震盪を行うことによってマウス全身、全臓器の高度な透明化を達成した。

### 2. 個体・臓器丸ごと高速一細胞解像度イメージング

全身・全臓器といったセンチスケールのサンプルに対して均一に浸透する核染色剤そして染色条件を検討し、蛍光タンパク質を内在性に発現しているレポーターマウスに対して核染色を行った。全身・全臓器一細胞解像度イメージングは一サンプル、一色あたり一時間程で取得できるため多個体・多臓器間の比較が可能となった。また透明化処理を行った臓器では抗原性が保存されるため免疫染色を行うことも可能でありヒト組織の解剖学、病理学解析などに応用することが可能である。

### 3. 一細胞解像度三次元解剖学

レポーターマウスの臓器に対して核染色を行うことにより臓器の三次元イメージを得ることが出来る。取得した全身・全臓器一細胞解像度イメージング像を用いて画像解析に取り組んだ。細胞核の密度分布そしてレポーターマウスの種類によって得られるシグナルパターンが異なるため、特徴的なシグナルを解析することにより肺の気管支そして腎臓の尿細管といった解剖学的部位の抽出が可能となった。このことは従来解剖学で扱われてきた臓器に対して、組織学で達成されてきた一細胞レベルの観察が実現したことを意味する。

### 4. 一細胞解像度三次元病理学

自己免疫疾患や癌転移といった少数細胞が原因となる全身性疾患において、全身・全臓器一

細胞解像度イメージングを用いた定量的解析手法は病態理解、治療法開発の基盤技術となる。最初にストレプトゾトシン (STZ) 誘導 1 型糖尿病モデルマウスを用いて膵島の体積分布を定量的に評価した。膵臓は核染色されており、膵島は核染色をされた細胞群の密な塊として同定することができた。全ての膵島を画像解析により抽出し、体積定量を行うことで、糖尿病モデルマウスでは野生型マウスと比較して膵島の個数および体積分布が小さくなることを明らかにした。次に個体・臓器レベルでの癌微小環境観察系を確立し、癌転移巣の時系列的変遷の検出を行った。さらに免疫染色を行い血管系の描出を行うことにより、癌転移巣と血管系との距離を一細胞解像度で定量化した。

以上、本論文は組織透明化において課題であった光の散乱・光の吸収に着目することによって全身・全臓器透明化を達成した。またこれら透明化手法を用いることで初めて細胞の位置情報と機能情報を保持した状態で個体・臓器の定量的解析基盤を構築しており、病理学を始めとした様々な分野での研究に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。