



全脳・全身透明化の 先に見えてくること

上田泰己

東京大学医学系研究科・理化学研究所

©RIKEN CDB

約300億個の細胞

どのように解読するのか？

©RIKEN CDB

約5億個の細胞

脳

(約0.5g)

透明化 (CUBIC)

Clear, Unobstructed Brain Imaging
Cocktails and Computational analysis

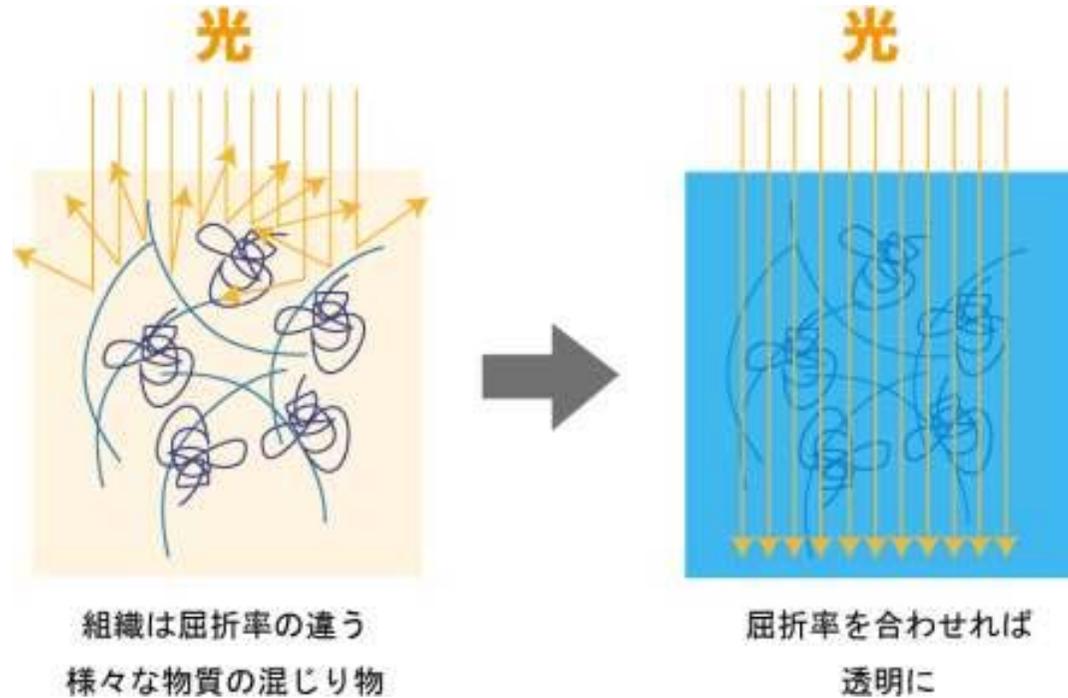


Mechanism of Transparency?



物体の中で光の散乱がないと
光がまっすぐ抜けて
向こう側が見える
＝透明

物体の中で光の散乱が多いと
光がまっすぐ通らずに
物体の向こう側が見えない
＝不透明



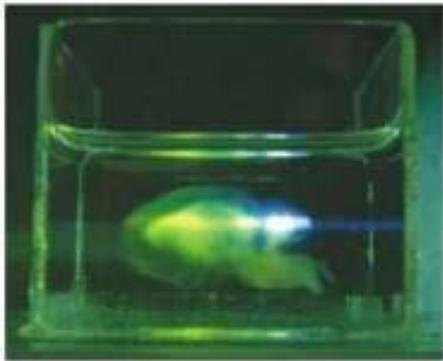
光の散乱は、屈折率が違う2つの
物質の境目で起きる
→屈折率が違う物質が混ざり合っ
ていると、散乱がおきて不透明に

脳の中の屈折率を均一にすれば
透明に！

History of Tissue-clearance

Hydrophobic

(Dodtら、2007年~)



「BABB」「3DISCO」
有機溶剤の混合剤で
屈折率を合わせて透明化

Hydrophilic

(Hamaら、2011年)



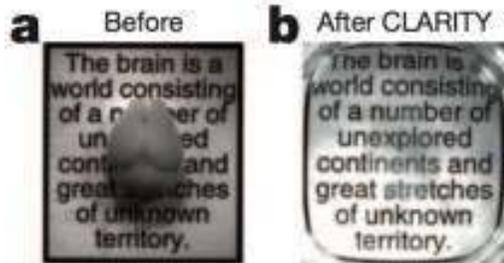
「Scale」
尿素を含む水溶性溶剤が
組織を透明化させることを
発見



宮脇敦史 博士
理研BSI

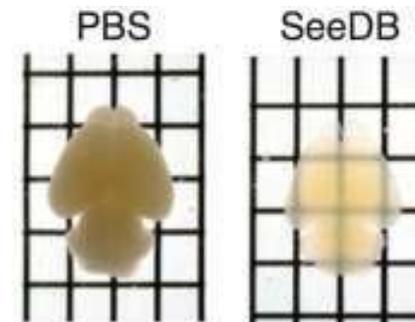
Electrophoresis

(Chungら、2013年)



「CLARITY」
電気泳動により
組織内の散乱物質を
除去して透明化

(Keら、2013年)



「SeeDB」
高濃度のFructose 溶液
により屈折率を合わせて
透明化できる溶剤を
開発



今井猛 博士
理研CDB



洲崎悦生
(医学)



田井中一貴
(化学)



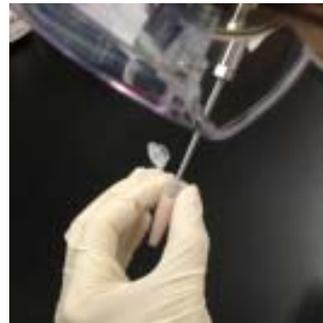
Dimitri Perrin
(情報科学)

New Chemical Screening Method

取り出した脳



バラバラに砕く



固定液を
加える



「脳懸濁液」



化合物を
加える



透明にする活性を
定量的に測定できる



元の透明化試薬

ScaleA2:
10% グリセリン
0.1% トリトン X-100
4M 尿素

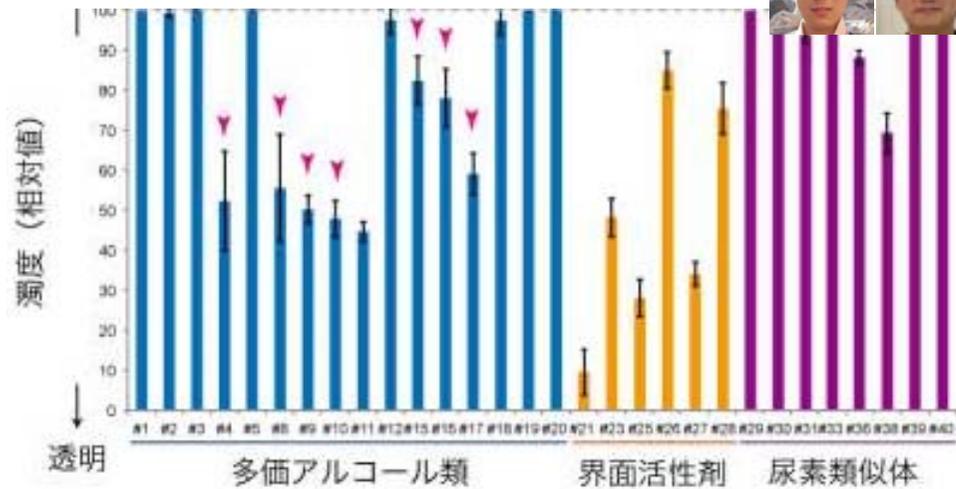


Hama et al. *Nature Neuroscience* 2011

40 種類の化合物



液の濁り具合（濁度）で
透明化活性を測定



F. Kishino
Y. Shimizu

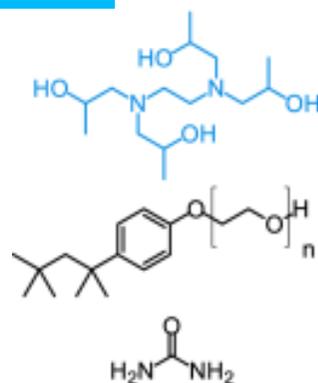
CUBIC protocol

効率的で再現性の良い脳透明化手法

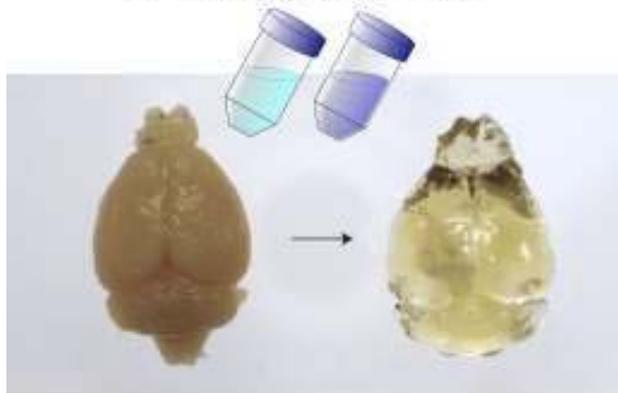
ScaleCUBIC-1 (第1試薬)

屈折率 = 1.43

アミノアルコール#10
(N,N,N',N'-テトラキス
(2-ヒドロキシプロピル)
エチレンジアミン)
トリトンX-100
尿素



透明化試薬処理



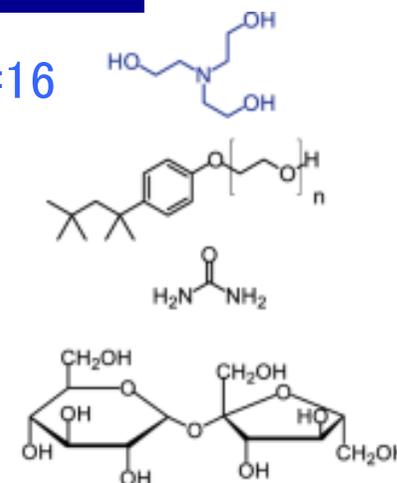
透明化前

透明化後

ScaleCUBIC-2 (第2試薬)

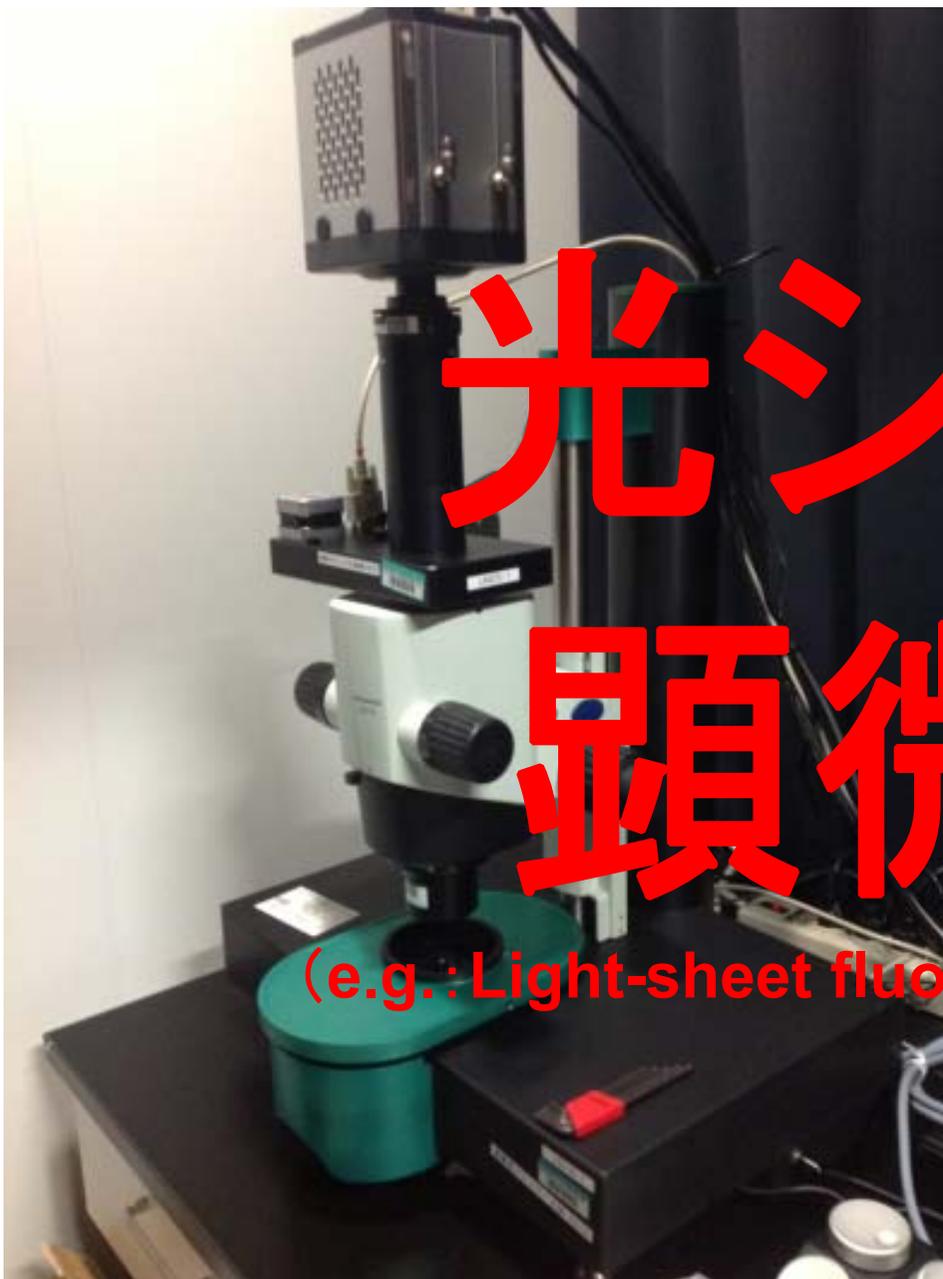
屈折率 = 1.49

アミノアルコール#16
(トリエタノールアミン)
トリトンX-100
尿素
シヨ糖



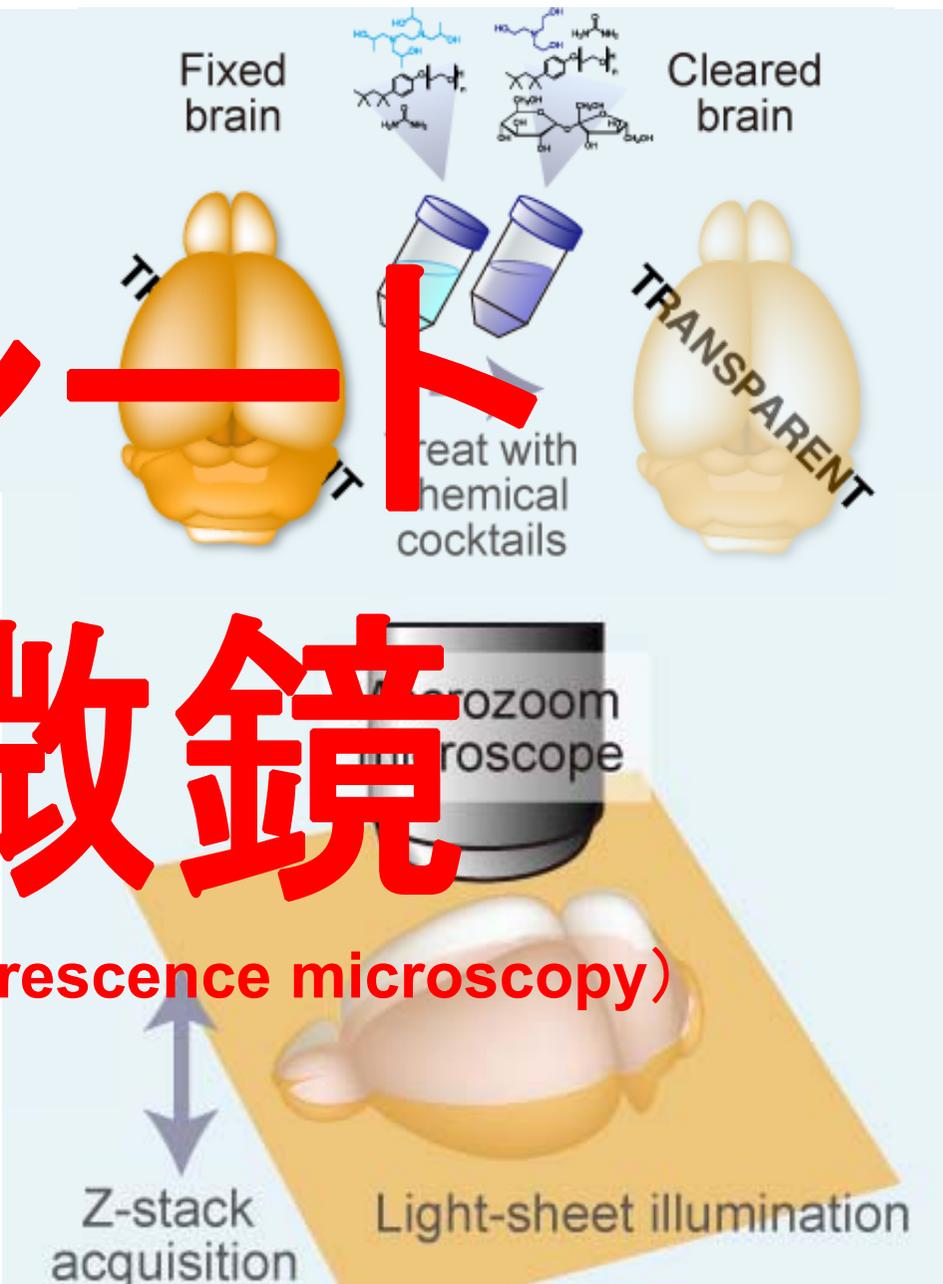
2剤の処理
(約2週間)で
マウス成体の脳を
ほぼ完全に透明化

Light-sheet Fluorescent Microscopy



光シート顕微鏡

(e.g.: Light-sheet fluorescence microscopy)



高速全脳イメージング: 1脳/1時間



YFP
Nuclei

Thy1-YFP(H) Tg, counterstained with propidium iodide
Reconstituted Z-stack image

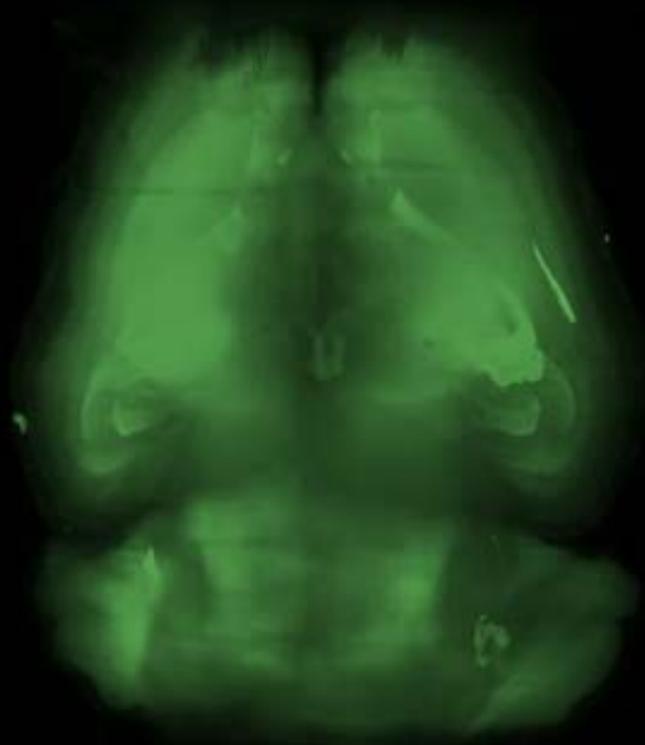


2000 μm

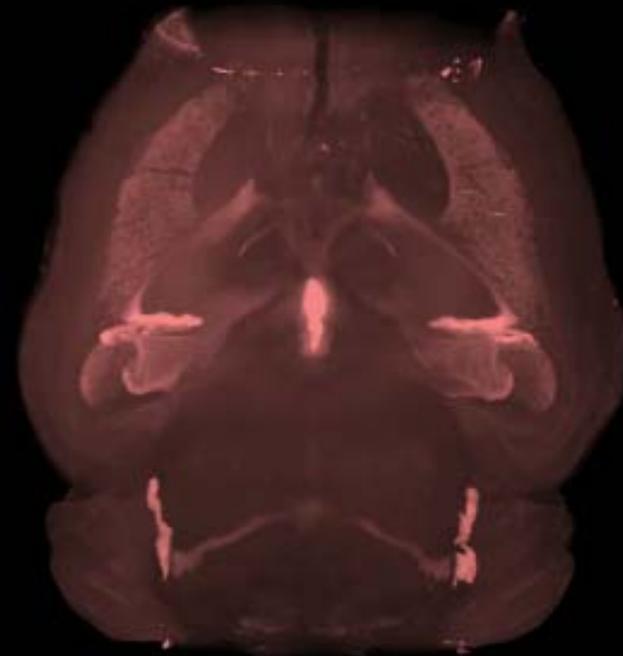
様々な蛍光タンパク質を発現した脳を撮影可能



ROSA26::H2B-EGFP
Reconstituted Z-stack image
(10 μm x 650 planes)

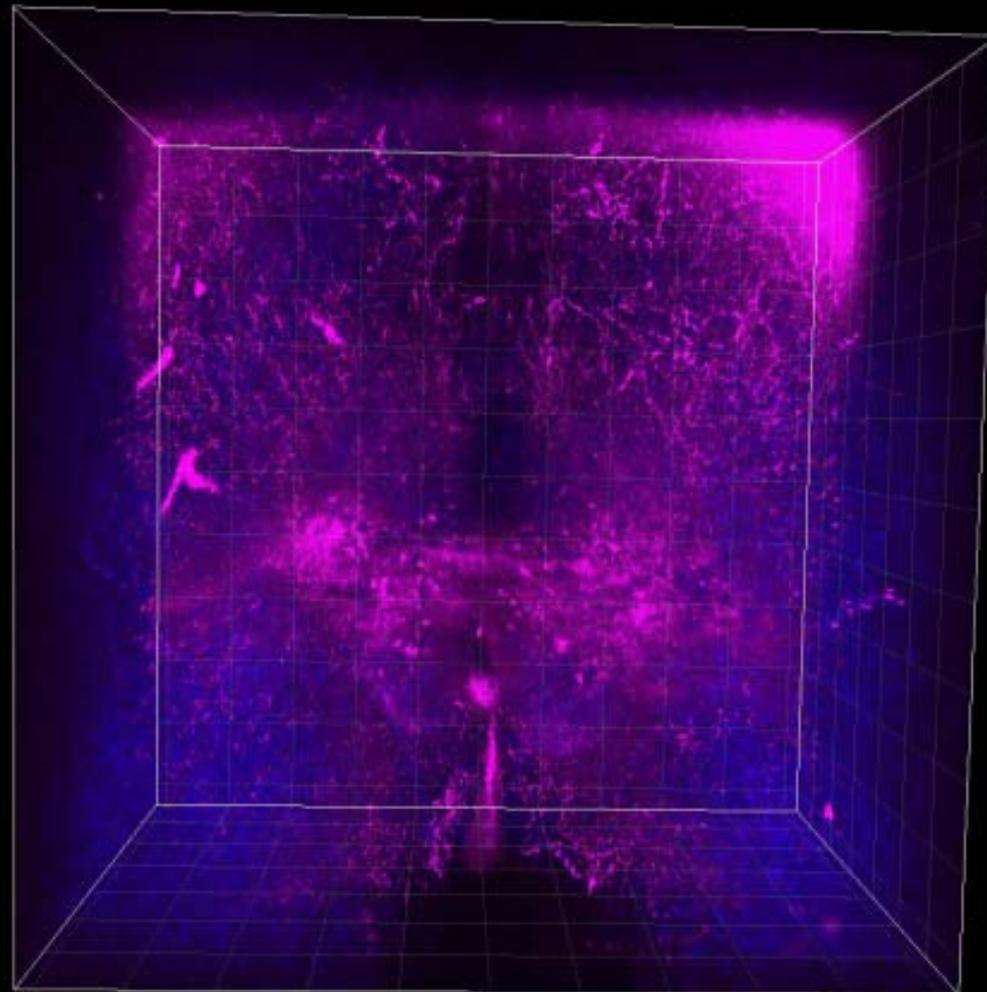


ROSA26::H2B-mCherry
Reconstituted Z-stack image
(11 μm x 665 planes)



ROSA26::H2B-EGFP KI/KI
Immunostaining of SCN neuropeptides
Reconstituted Z-stack image
with Confocal microscope (Leica)
(3 μm x \sim planes = \sim 630 μm)

VIP
AVP(Copeptin)
H2B-EGFP

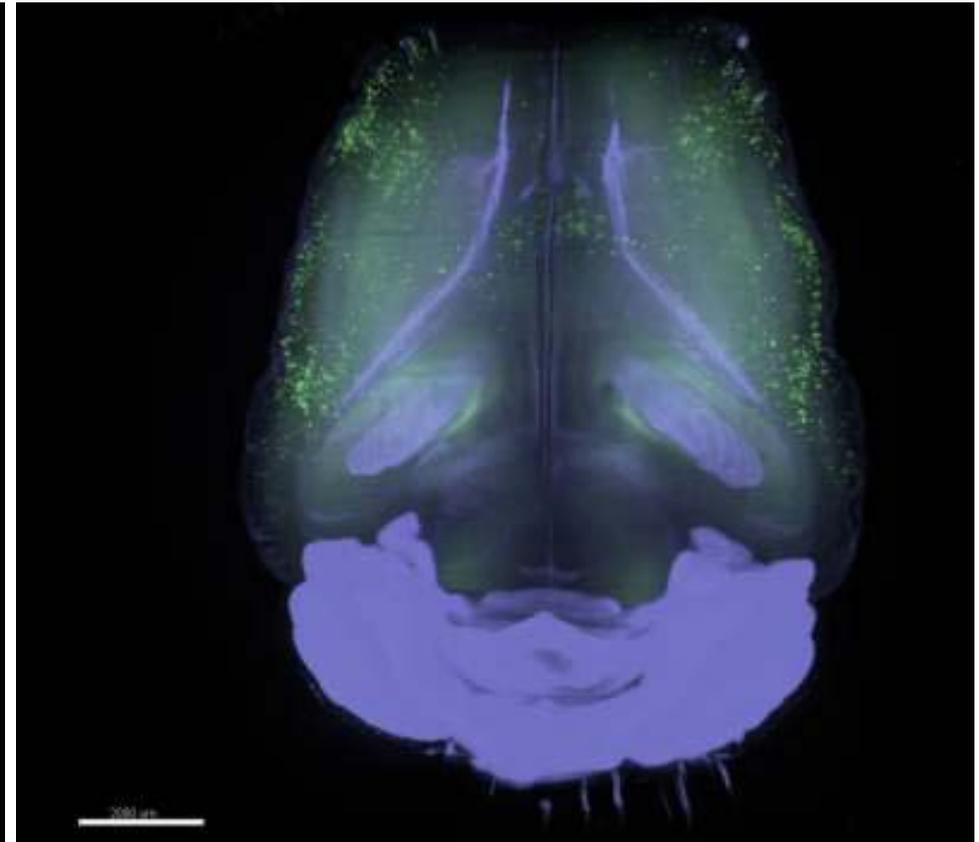
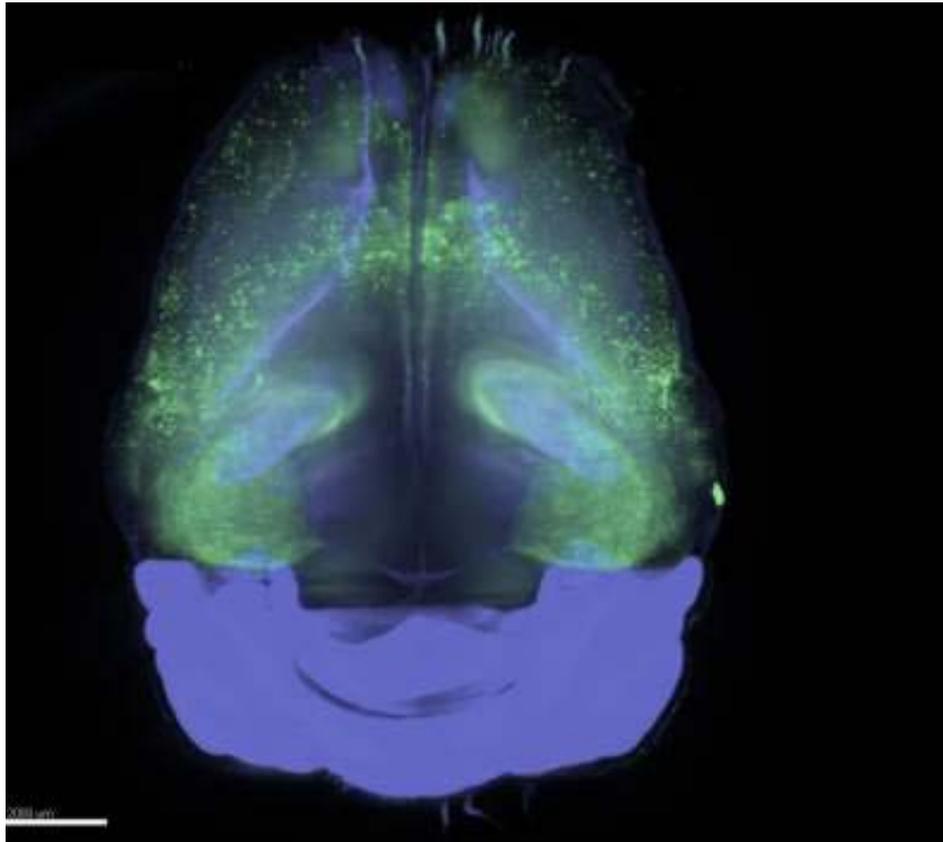


200 μm

マウスに光を当てたときの脳内の反応の可視化

光あり

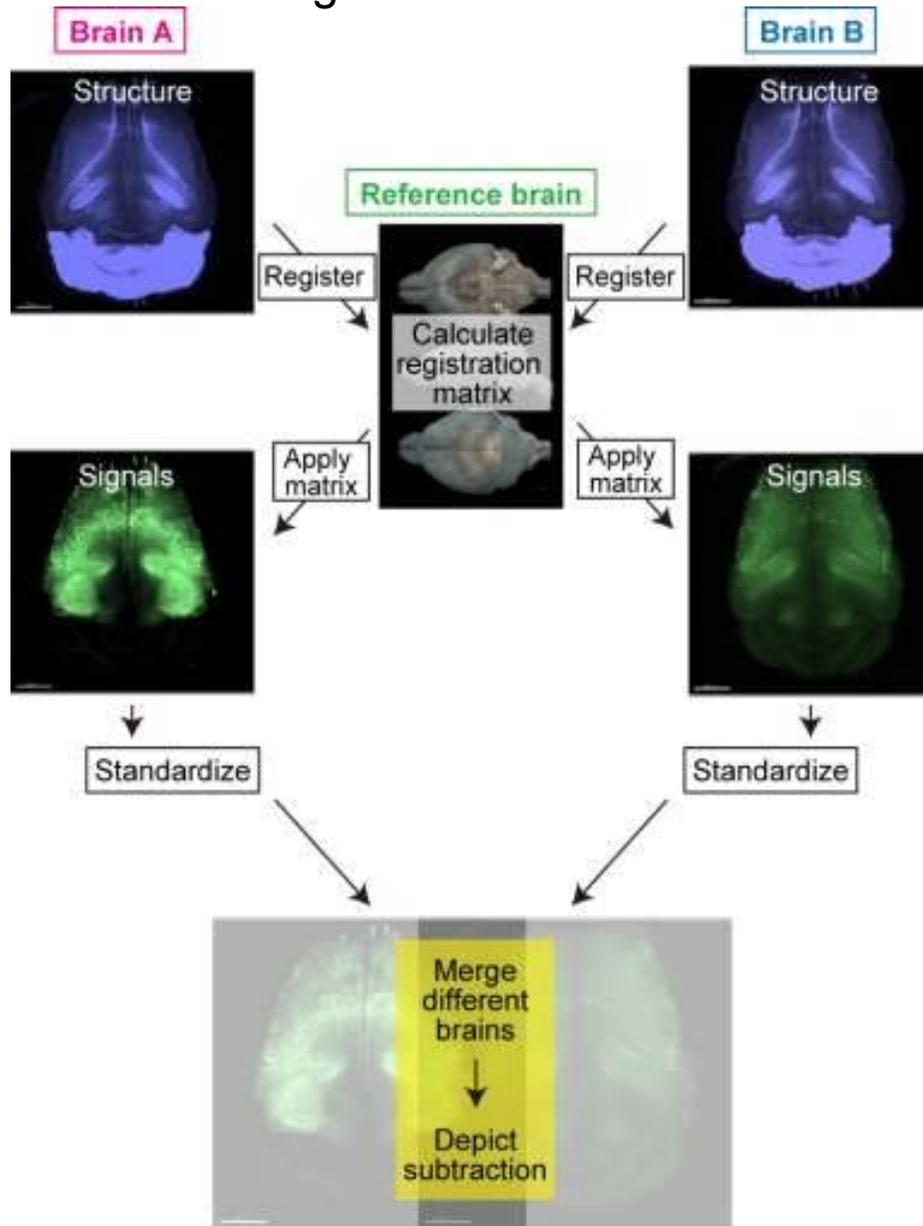
光なし



ITも重要: MRIのような画像解析技術

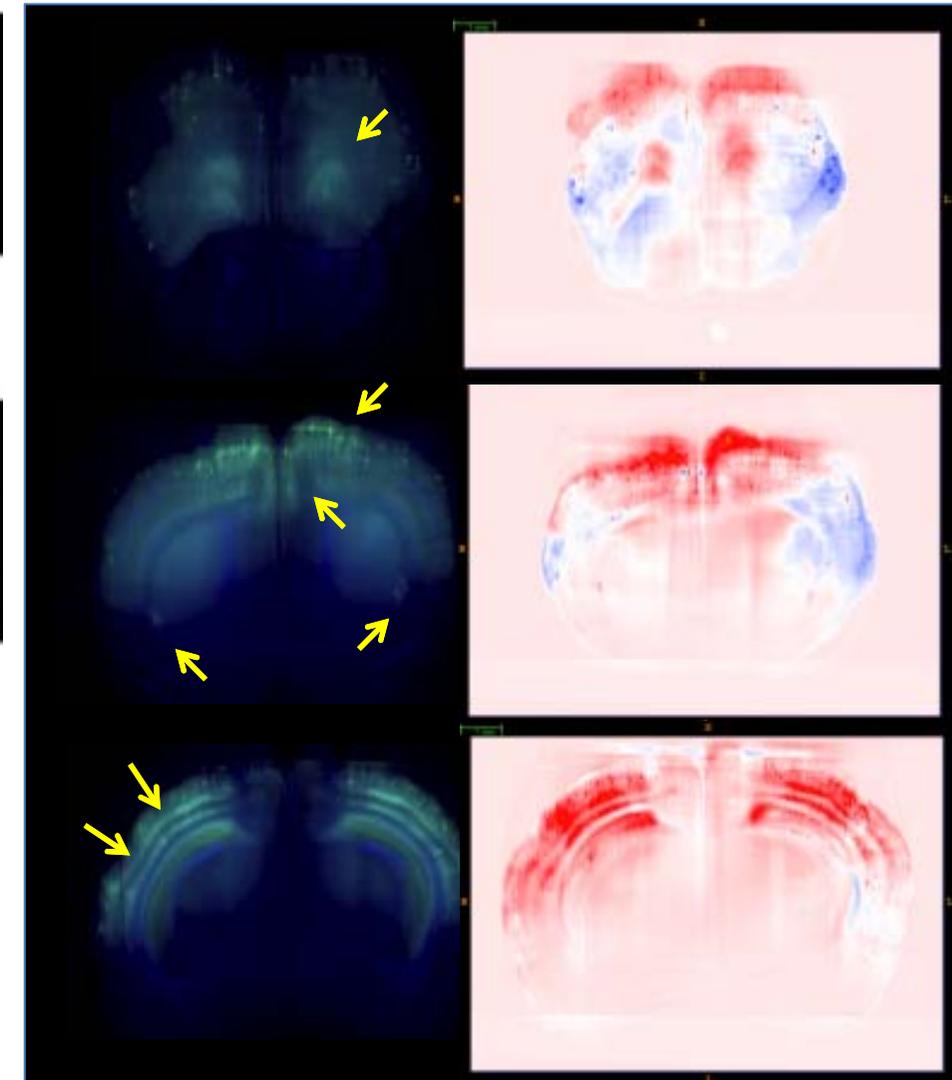


Registration scheme



Original
(Light+)

Subtraction



pArc-driven Venus
Nuclei

Sheet-laser microscope
(Reconstituted section)

Up in Light+
Up in Light-

大きな脳も見える： 新世界猿(マーモセット)



Marmoset Hemisphere
(stained with SYTO16)

Mouse
brain
(Adult)

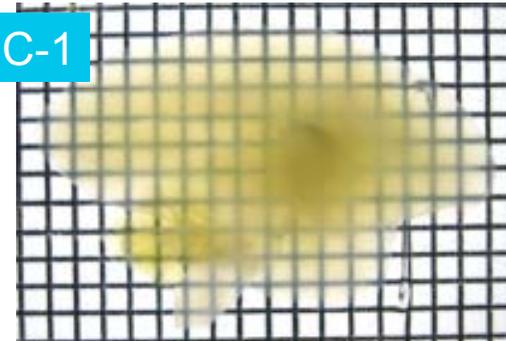
Marmoset
brain
(P3)



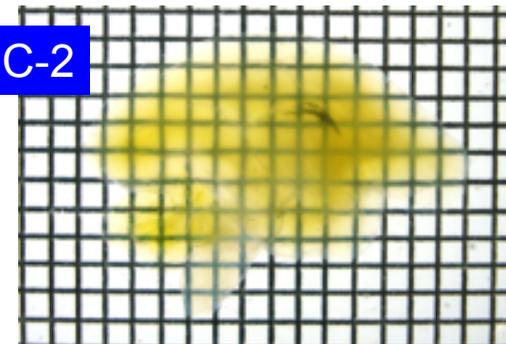
Sucrose/PBS



CUBIC-1

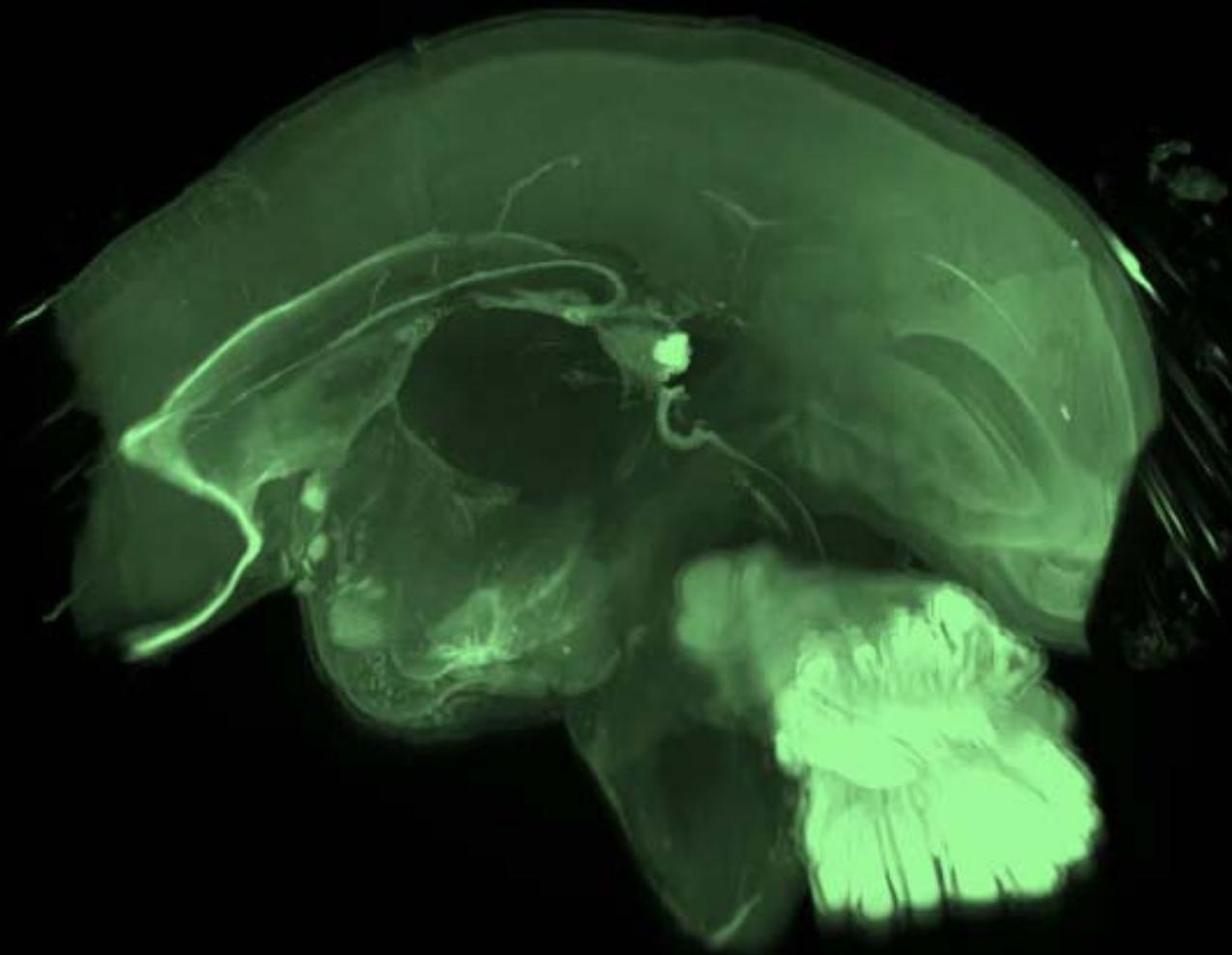


CUBIC-2



H. Onoe C. Yokoyama
(RIKEN CMIS)

新世界猿(マーモセット)の 脳イメージング



3000 μ m

Detailed Structures in CUBE

Thy1-YFP(H) Tg

Axons
in the medulla

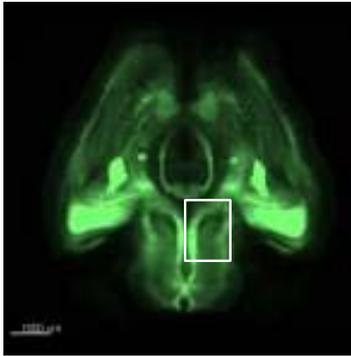


Image acquisition
with Ultramicroscope



Spines
in layer 2-4

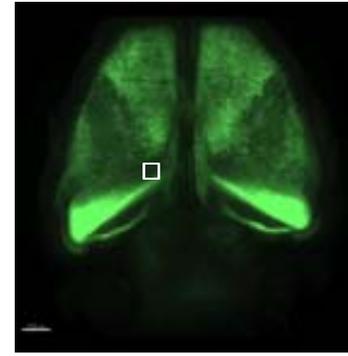
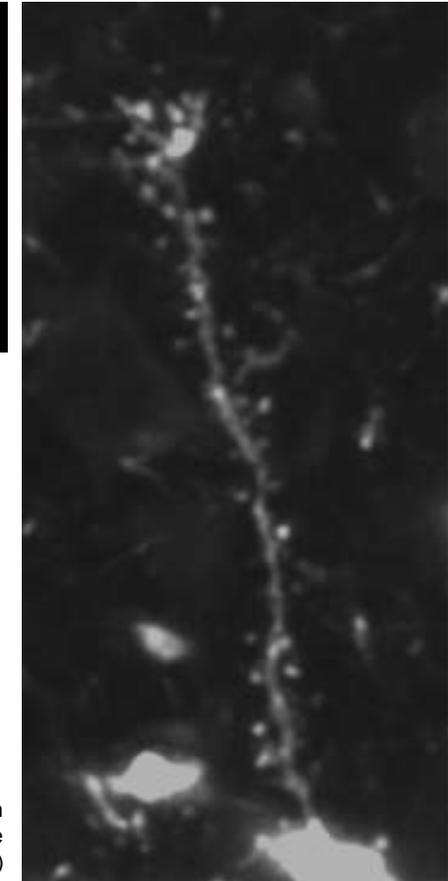


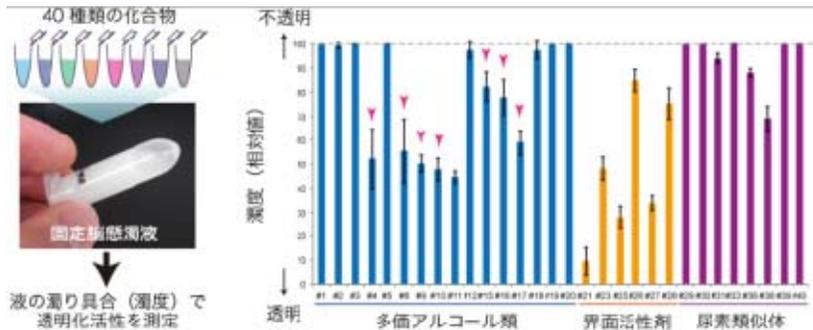
Image acquisition
with 2-photon microscope
(Supported by Dr. Sekiya, UTokyo)



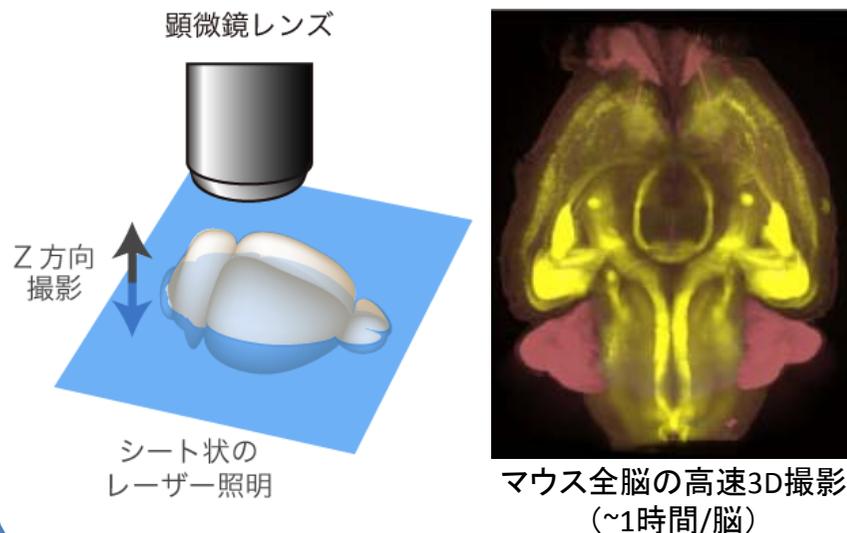
2014年4月にCell誌に発表:「サル脳の透明化」に成功

世界最高性能の透明化試薬の実現

透明化化合物スクリーニング系の開発

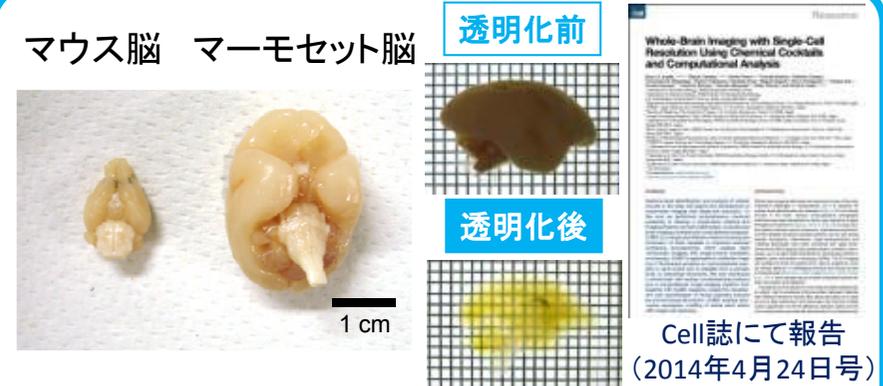


高速3次元イメージングの適応

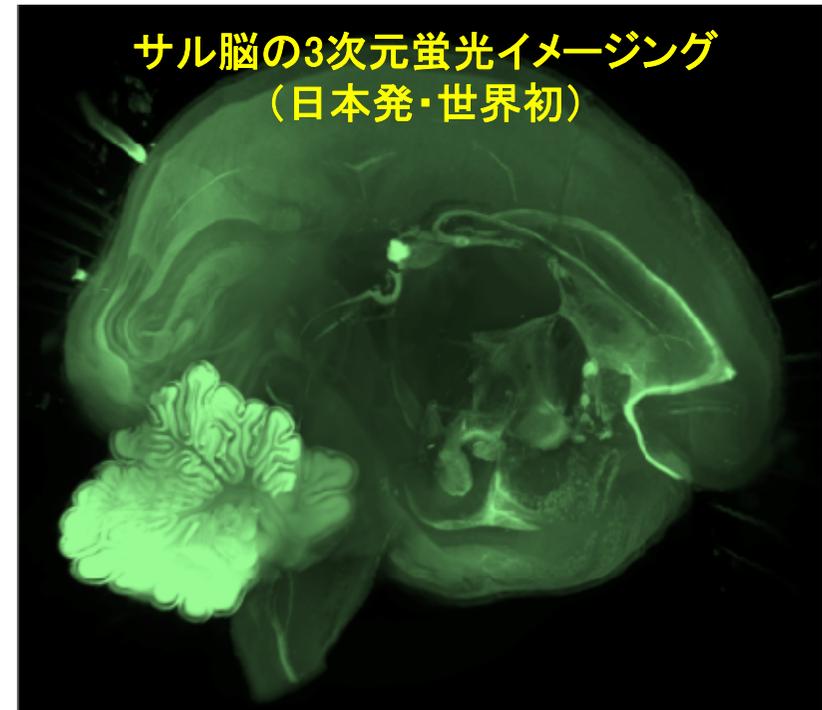


サル脳の透明化に成功

マウス脳 マーモセット脳



サル脳の3次元蛍光イメージング (日本発・世界初)



Genes to Cells

Volume 19, December 2014

Issue
12

透明化試薬にちなんだ
表紙が掲載



「CUBIC」技術が 杉田玄白先生と登場

- ・アミノアルコール
- ・尿素
- ・界面活性剤

約300億個の細胞

全身



©RIKEN CDB

課題:脱色 色素(へム)

透明マウス



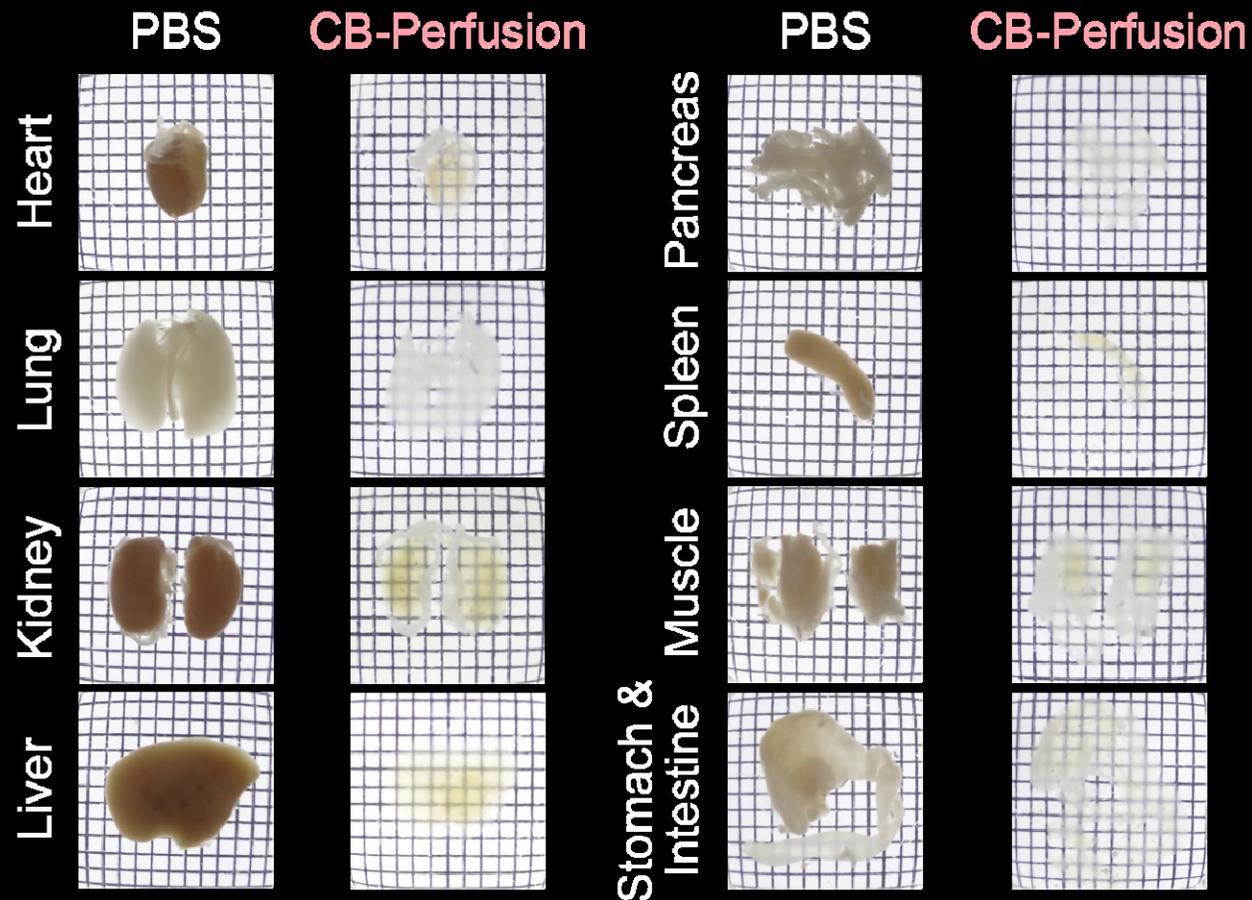
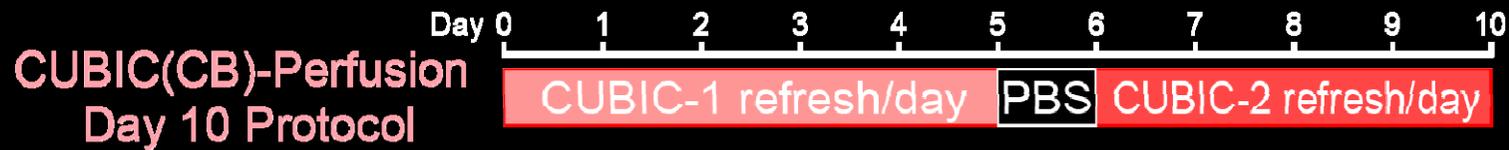


田井中一貴
(化学)



久保田晋平
(医学:大学院生)

CB-perfusion Transparentizes Whole Organs



CB-perfusion Transparentizes Whole Bodies



CB-Perfusion
Day 14 Protocol



WT P1

PBS CB-Perfusion



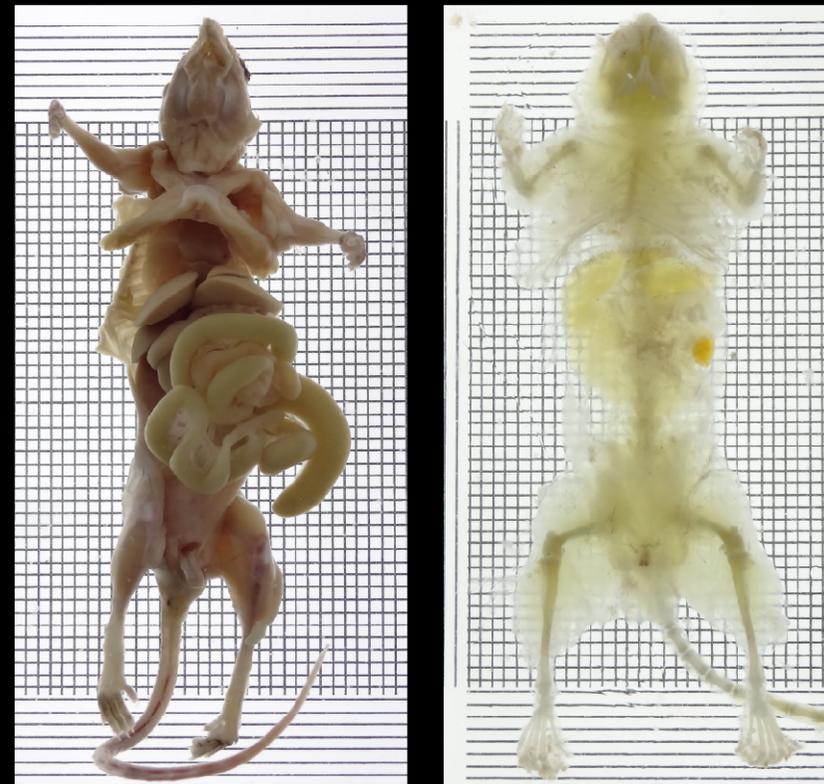
WT P6

PBS CB-Perfusion



WT adult

PBS CB-Perfusion



Heart 3D Reconstitution Images

β -actin-nuc-3xmKate2 KI, counterstained with SYTO 16

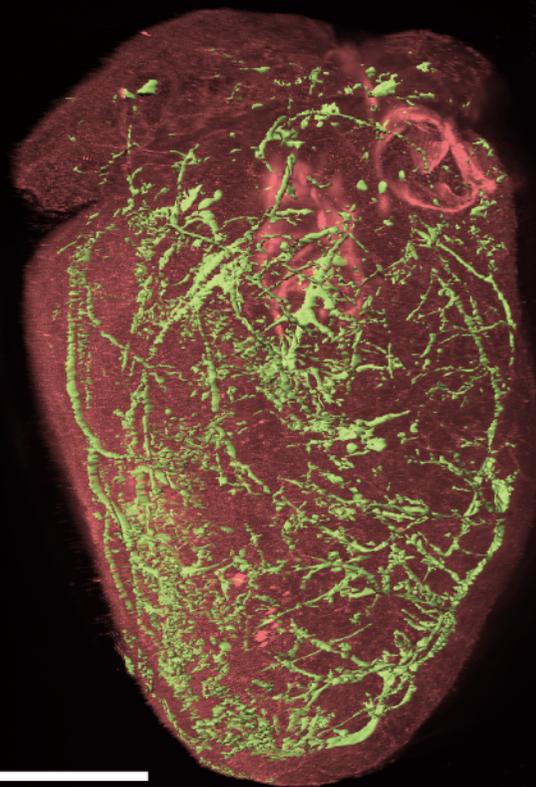


Section Image
depth = 4.0 mm

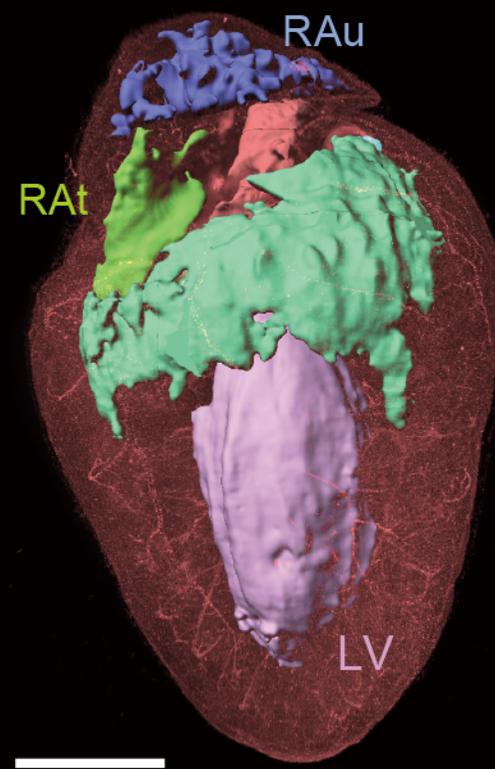


SYTO 16
mKate

Coronary vessel



Heart ventricles



Heart 3D Reconstitution Images

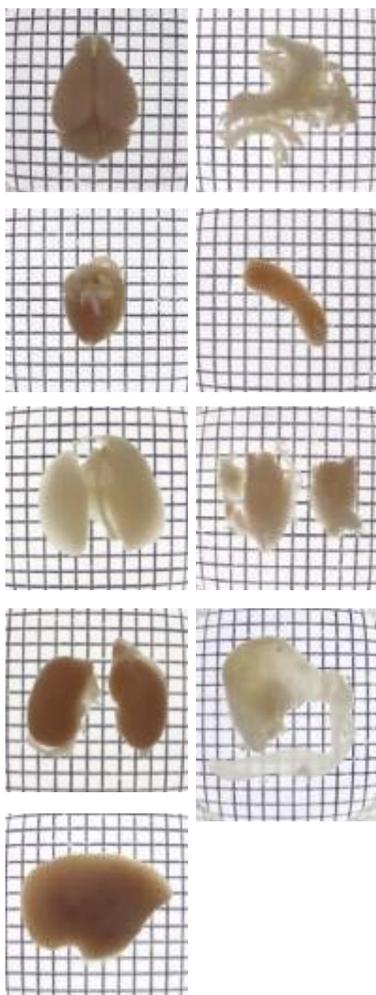


Hiroki R. Ueda, Laboratory for Systems Biology, CDB, RIKEN

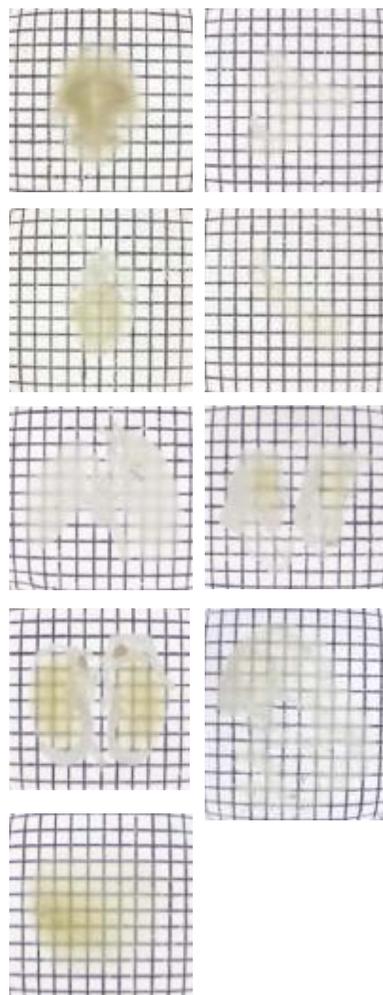
2014年11月にCell誌に発表:「全身透明化」に成功

マウス各臓器(成体)の透明化

透明化 (CUBIC)
未処理



透明化 (CUBIC)
処理



各臓器(成体) & 全身(成体)のイメージングに成功

光シート顕微鏡を用いた3次元1細胞解像度観察



Cell誌にて報告
(2014年11月6日号)



Acknowledgements

Ueda Lab @ RIKEN & UTokyo



Etsuo A. Susaki
Kazuki Tainaka
Fumiaki Kishino

Dimitri Perrin
Shinpei I. Kubota
Takeru Q. Suyama

Maki Ukai-Tadenuma
Hideki Ukai

RIKEN QBIC



Tomonobu Watanabe
Yoshihiro Shimizu

RIKEN RAP



Takehiro Tawara
Hideo Yokota

RIKEN CMIS



Chihiro Yokoyama
Hiroataka Onoe

RIKEN CDB



Takeshi Imai
Hideki Enomoto

**Lab. for Animal Resource and
Genetic Engineering
(H. Kiyonari and T. Abe)
Douglas Sipp and Naoki Namba
(for providing the picture of mouse)**

Gifu University



Shun Yamaguchi
Megumi Eguchi

RIKEN BSI



Atsushi Miyawaki

Olympus and Olympus engineering