

METHODS & TECHNIQUES

ゼブラフィッシュ胚を対象とした汎用性の高い自動ハイスループット薬物スクリーニング・プラットフォーム

Alexandra Lubin¹, Jason Otterstrom², Yvette Hoade¹, Ivana Bjedov³, Eleanor Stead³, Matthew Whelan⁴, Gaia Gestri⁵, Yael Paran² and Elspeth Payne^{1,*}

ABSTRACT

ゼブラフィッシュは、発育が早く透明な胚であるため、顕微鏡を用いた比較的高スループットのスクリーニングが可能であり、生きた動物における薬物スクリーニングのユニークな機会を提供する。しかし、迅速で柔軟なイメージングと解析のプラットフォームが限られているため、ゼブラフィッシュの薬物スクリーニングへの利用も制限されている。我々は、生きたゼブラフィッシュのハイスループットな表現型ベースのスクリーニングに適した、使いやすくカスタマイズ可能な自動スクリーニング手順を開発した。我々は、胚の明視野および蛍光画像を迅速に取得するためにWiScan® Hermes High Content Imaging Systemを利用し、解析のためにWiSoft® Athena Zebrafish Applicationを用いた。このアプリケーションは、明視野画像から魚を自動的に検出し、解剖学的構造を同定し、魚検体を領域に分割し、所望の方向・傾きの魚を測定する人工知能主導のアルゴリズムを利用する。最初の検証では、構造解析と蛍光画像を組み合わせ、胚の尾にあるGFPタグの付いた造血幹細胞や前駆細胞をAIでカウントし、手作業によるカウントと相関させた。さらに、遺伝子変異やX線照射の影響を高含量で評価するために、幅広いアッセイを用いてこのシステムを検証した。さらに、デュアル蛍光色素を用いた複数の細胞タイプの同時解析をハイスループットで行った。さらに我々は、ゼブラフィッシュにおけるハイコンテントスクリーニングのための、幅広く適用可能で迅速にカスタマイズ可能なプラットフォームを実証した。

この論文には、筆頭著者へのインタビューが掲載されている。

KEY WORDS: Drug screening, High-throughput, Zebrafish

はじめに

ゼブラフィッシュはヒト疾患の優れたモデルであり、*in vivo*低分子表現型薬物スクリーニングのユニークな機会を提供する。1つの繁殖ペアが数百個の胚を産むことができ、胚の急速な発育と透明な性質と相まって、通常は細胞培養に限定される顕微鏡ベースのスクリーニングに適している。ほとんどの*in vivo*スクリーニング・プラットフォームとは異なり、数千の動物を比較的高スループットのスクリーニングが可能であり、無傷の生きた動物でスクリーニングできる

という利点もある。

このような*in vivo*スクリーニングの有用性は、同定された化合物の臨床試験への迅速な再利用によって実証されている。これは、*in situ*ハイブリダイゼーションを用いたゼブラフィッシュスクリーンで造血幹細胞を増強することが判明し、臍帯血移植を受ける患者の治療薬として臨床試験に入ったdmPGE2が例証している(Northら、2007; Hagedornら、2014)。さらに、ゼブラフィッシュ胚の有毛細胞のゼブラフィッシュスクリーンで同定されたORC-13661 (Owensら、2008; Chowdhuryら、2018; Kitcherら、2019)は現在、アミノグリコシド抗生物質誘発性脱毛による難聴を予防する薬剤として臨床試験中である。

このような利点があるにもかかわらず、ゼブラフィッシュを高速かつ柔軟なフォーマットでサポートする画像取得、特に解析プラットフォームが限られているため、薬剤スクリーニングにおけるゼブラフィッシュの普及には限界がある。スクリーンは一般的に時間がかかり、多くの場合、手動または特注のイメージングソリューションと手動解析に依存している。例えば、Northら(2007)は、dmPGE2を同定するために、2つのプローブを用いた*in situ*ハイブリダイゼーションの後、手作業による定性的スコアリングを利用した。有毛細胞の修飾因子としてのORC-13661の発見も、染料で処理した後の10,960化合物の蛍光性神経細胞の手作業による検査に依存しており、変化を定量化するためには手作業による計数が必要であった(Owens et al., 2008)。この有毛細胞アッセイは迅速かつシンプルであり、多くの追加スクリーニングで使用されている(Chiu et al., 2008; Vlasits et al., 2012; Esterberg et al., 2013; Pei et al., 2018)が、いずれも依然として個々の魚の手作業によるカウントまたはスコアリングに依存しており、解析スループットにおいて大きなボトルネックとなっている。

ゼブラフィッシュはまた、新規化学療法化合物の薬剤スクリーニングや患者特異的反応の同定のための貴重な患者由来異種移植モデルとして台頭してきており、マウスモデルよりもはるかに迅速な時間スケール、費用対効果、大量に使用できる能力など、いくつかの利点がある(Xiaoら)。

ゼブラフィッシュ異種移植片は、例えば肺がん細胞に対するBPIQの検証(Chiuら、2015年)や腺様嚢胞がんに対するレゴラフェニブの同定(Chenら、2017年)のように、化学療法化合物の同定や検証にうまく利用されてきた。ゼブラフィッシュが異種移植モデル用の有用なハイスループットスクリーニングプラットフォームを提供できることを示す例は数多くあるが(Haneyら、2020年; Zhangら、2014年; Linら、2019年; Fuら、2018年; Somasagaraら、2021年)、これらを大規模に使用することは今のところ限られている。柔軟性が高く、カスタマイズが容易なプラットフォームは、薬剤スクリーニングにおける異種移植モデルの使用を大いに助けるだろう。異なるモデル間のばらつきや複雑さ、腫瘍の大きさ(Zhangら、2014年)や細胞数(Somasagaraら、2021年)など、結果の読み出しが異なるためである。

¹Research Department of Haematology, Cancer Institute, University College London, London WC1E 6DD, UK. ²IDEA Bio-Medical Ltd., Rehovot 76705, Israel. ³Research Department of Cancer Biology, Cancer Institute, University College London, London WC1E 6DD, UK. ⁴Division of Infection and Immunity, University College London, London WC1E 6BT, UK. ⁵Department of Cell and Developmental Biology, University College London, London WC1E 6AR, UK.

*Author for correspondence (e.payne@ucl.ac.uk)

© A.L., 0000-0001-6592-9513; J.O., 0000-0002-0176-9976; I.B., 0000-0001-5894-6016; M.W., 0000-0003-0441-3358; G.G., 0000-0001-8854-1546; Y.P., 0000-0001-9544-6213; E.P., 0000-0001-5841-778X

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium provided that the original work is properly attributed.

最適なゼブラフィッシュ・ハイスループット・スクリーニング・プラットフォームは、様々な多重アッセイや表現型において、画像取得と解析の両方を最小限の人的介入で自動化できるものでなければならない。このプロセスにおける主要な課題のひとつは、胚を手動で操作することなく、イメージングに必要な方向に胚を移動させることである。一つのアプローチとして、VAST Bioimagerのように、胚のイメージングに小さなガラスキャピラリーを使用する方法があり、これによりゼブラフィッシュ胚を選択した向きで自動イメージングできる (Pulak, 2016; Pardo-Martin et al, 2010; Pardo-Martin et al, 2013; Chang et al, 2012; Haney et al, 2020)。ゼブラフィッシュ胚もまた、96ウェルプレート内の標準的な顕微鏡によって半自動化フォーマットで画像化することができる (Romano and Gorelick, 2014) が、手動操作や画像の検査なしに魚の向きを制御することには限界がある。既存の自動画像解析ソリューションはもっと限られており、ほとんどのプラットフォームは特注のソリューションとして開発されている。一般的な手法のひとつは、トランスジェニック・ゼブラフィッシュの蛍光画像や、色素で蛍光標識した魚の蛍光画像を自動的に解析するアルゴリズムを設計することである。このようなスクリーニングの多くは、Molecular Devices社のImageXpress High Content Screening Systemを自動画像取得に適応させている。これには、血管新生血管の数を定量化するアッセイ (Tran et al, 2007)、軸索の長さを分析するアッセイ (Kanungo et al, 2011)、異種移植ゼブラフィッシュの腫瘍サイズを測定するアッセイ (Zhang et al, 2014)、細胞をカウントするアッセイ (Somasagara et al, 2021) などが含まれる。しかし、これらの自動解析には、特注アルゴリズムの開発か、より一般的なソフトウェアのカスタム適応が必要な場合が多い。ゼブラフィッシュ胚の解析用に設計または適応されたオープンソースのアプローチが数多くある。ImageJは、例えば、化学療法化合物を評価するために、異種移植したゼブラフィッシュの蛍光を定量化するために一般的に使用されている (Haney et al, 2020) が、これは自家蛍光の閾値処理に依存しており、魚全体または手動で選択した領域のいずれかを見るためにのみ使用することができる。QuantiFishは、ゼブラフィッシュの蛍光病巣を分析するために開発されたオープンソースのアプリケーションで、胚の細菌感染の分析に使用されている (Stirling et al, 2020)。CellProfilerはより一般的な画像解析プラットフォームで (Kamentsky et al, 2011)、ヘモグロビンを定量化するゼブラフィッシュ胚の解析 (Metelo et al, 2015) など、多くのパイプラインが公開されている。しかし、これらのプラットフォームを新しいアプリケーションに適応させるには、ユーザーが分析をセットアップするために多くの開発が必要であり、専門知識がなければ困難であるため、普及が制限されている。人工知能 (AI) ベースのアプローチは、より広い適用性を持つ自動画像解析の機会を提供することができる。Vogtらは、Definiens Cognition Network Technology (CNT) を用いて、96ウェルプレートに配列されたトランスジェニック蛍光胚を検出・分割し、血管の発達を定量化するアルゴリズムを設計・訓練した (Vogt et al, 2009)。そして、この方法を別のトランスジェニック魚の系統や表現型に適応させることができ、FGFシグナル伝達のケミカルスクリーニングに用いた (Vogt et al, 2010; Saydmohammed et al, 2011)。私たちは、ゼブラフィッシュ胚の造血幹細胞および前駆細胞 (HSPCs) を調べる低分子および遺伝学的スクリーニングを行うためのスクリーニング・プラットフォームを探していた。長期的な目標は、骨髄性悪性腫瘍の標的治療薬のスクリーニングである。血小板細胞とHSPCsを緑色蛍光で標識するTg(itga2b:GFP)トランスジェニック系統 (Lin et al, 2005) は、HSPCsの数と位置を読み取ることができる。HSPCsの半自動スクリーニングは以前に開発されている (Arulmozhivarman et al, 2016) が、このスクリーニングにはカスタム解析プラットフォームと関心領域を定義するためのユーザー入力が必要であった。

我々は、画像取得と定量解析の両方を自動化した、使いやすく、かつ広範囲に適用可能なゼブラフィッシュ胚スクリーニングプラットフォームを開発した。我々はまず、表現型が知られている遺伝学的スクリーニングと放射線スクリーニングを用いて、HSPCsを定義する目的のスクリーニングの表現型検証を行った。次に、mCherryタグの付いた骨髄系細胞を用いて、複数の蛍光出力を組み合わせるようにアッセイを拡張し、さらに毒性スクリーニングに使用するアポトーシス性のアクリジンオレンジを含むようにスクリーンの読み出しを拡張した。また、このプラットフォームの幅広さと簡便さを強調するために、これまで多くの手動スクリーンで使用されてきた有毛細胞マーカーと、眼の大きさの明視野形態学的スクリーンも利用した。我々のカスタマイズ可能なスクリーンは、ゼブラフィッシュの一般的な薬剤スクリーニングのための他の解剖学的部位や表現型の研究に簡単かつ迅速に適用することができ、1日で数千匹の自動画像取得と解析が可能である。

結果

共同開発したWiSoft® Athena画像解析プラットフォームによる多重蛍光イメージングでのゼブラフィッシュ胚と内部解剖の自動検出

効果的なハイコンテンツスクリーニング (HCS) には、ハイスループットを可能にするシンプルで迅速な画像取得が必要である。我々はWiScan® Hermes High Content Imaging System (IDEA Bio-Medical) を利用して、受精後3日 (dpf) の生きたゼブラフィッシュ胚の蛍光および明視野画像を迅速に取得した。ワークフローを図1Aに示す。フェニルチオ尿素で処理した生きた胚を麻酔し、96ウェルのゼブラフィッシュアライメントプレート (橋本社製) に、手動ピペットを用いて1ウェルあたり1個の胚をセットした。Hermesでイメージングする前に、プレートを短時間遠心した (図1A)。胚は4倍の対物レンズを用い、0.2 mmの幅で5スライスのzスタック撮影を行い、正確な画像ステッチと全魚の可視化を可能にするため、各ウェルに沿って4枚の画像を重ねた (図S1)。画像取得は明視野と蛍光チャンネルで行われ、フルプレートあたり3840枚の生画像を得るのに約15分かかり、比較的高いスループットを可能にした。画像の前処理は、付属のバッチ画像処理ソフトウェアパッケージ (IDEA Bio-Medical, 「試料と方法」参照) により約20分で自動的に行われた。我々は、全魚類解析のための画像スティッチングの前に、明視野チャンネルの最良zスライス選択 (最も焦点の合ったz平面) と蛍光チャンネルの最大z軸強度投影を行い (図S1)、画像は付属のソフトウェアでバッチ処理された。蛍光の最大強度は、魚の体積全体を通してすべての蛍光標識細胞を捉えるために、ベストスライス選択よりも選択された。この方法で、追加処理や画像デコンボリューションの必要なく、個々の蛍光標識細胞を可視化することができ、同時に明視野チャンネルの解析のために魚の尾と頭の両方に適切な焦点を合わせることができた。

IDEA Bio-Medical社は、同社のWiSoft® Athenaソフトウェアパッケージ用に、ユーザー入力なしで魚と内部解剖学的構造を識別する新しいゼブラフィッシュ画像解析アプリケーションを開発した。この解析アプリケーションは、独自のディープラーニングAIアルゴリズムを使用し、ゼブラフィッシュの明視野画像を解析する (試料と方法を参照)。アルゴリズムのトレーニングには13のデータセットを使用し、テストにはさらに5つのデータセットを使用して、ナイーブデータの特徴を検出するためのトレーニング済みAIの品質を確保した。このソフトウェアは、ゼブラフィッシュ胚の外形を自動的に検出し、同時に内部の解剖学的構造と領域を識別するために明視野画像を使用するように訓練された (図1B)。現在、検出された内部解剖学的構造には、眼球、心臓、尾びれ、卵黄嚢、脊椎、膀胱、および耳小骨が含まれる (図1B)。また、胚本体は頭部、体幹、尾部に細分化される。

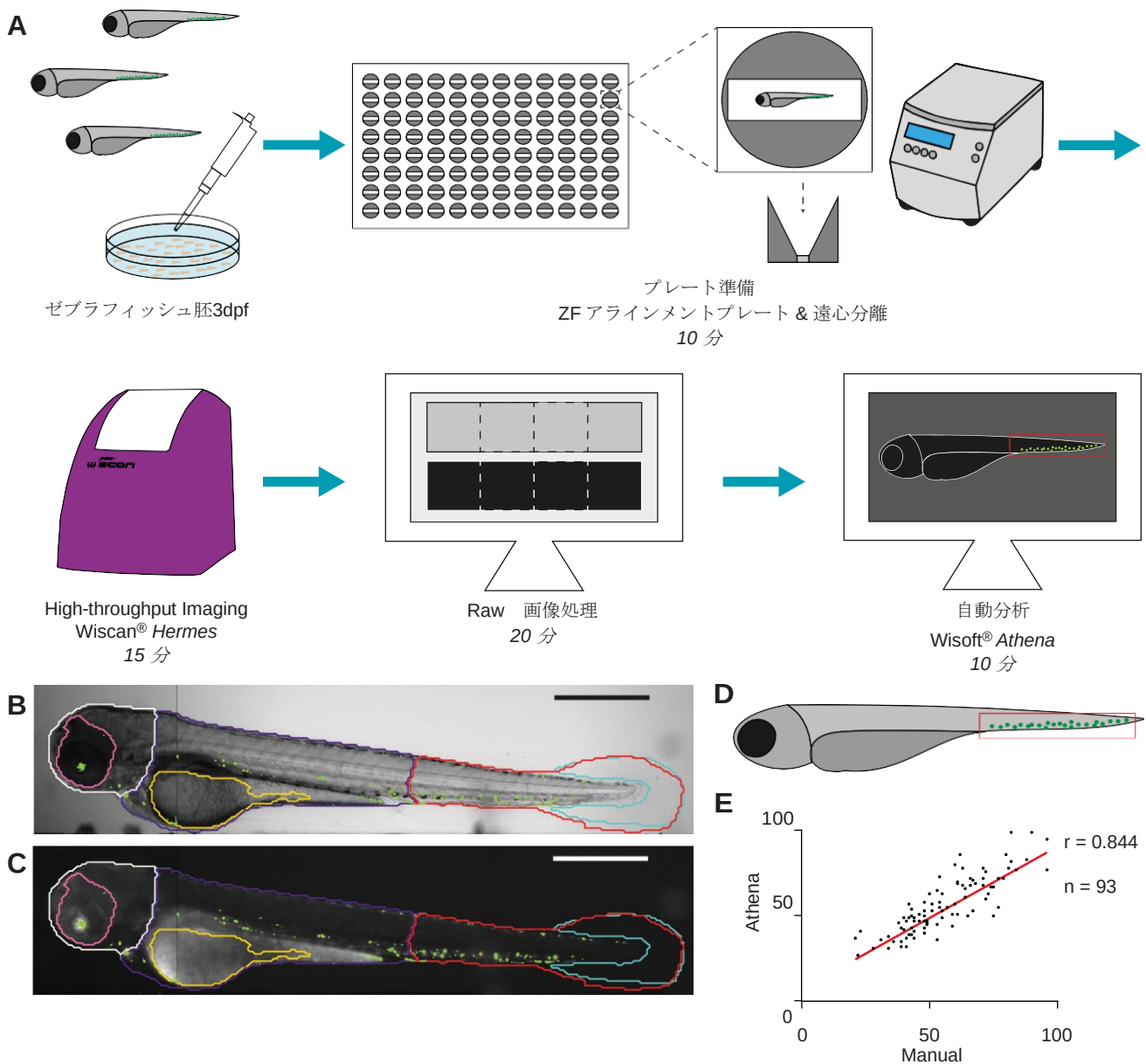


図1. ゼブラフィッシュ胚を検出し、尾の造血幹細胞をカウントするスクリーニングのワークフローと自動画像解析。

(A) プレートの準備、画像取得、ゼブラフィッシュ胚の画像解析含むスクリーニングプラットフォームワークフローの概略図。(B,C) Hermesから取得した3dpfのTg(itga2b:GFP)ゼブラフィッシュの明視野画像(B)と蛍光画像(C)。Athenaで同定された領域の一部(尾(赤)、体幹(紺)、頭部(白)、眼(ピンク)、卵黄(黄)、尾びれ(水色)、蛍光小胞子(緑))を示す。(D) 3 dpfにおける尾部の造血組織(CHT)における造血幹細胞および前駆細胞(HSPC)の位置を示す漫画。(E) Athena Zebrafishアプリケーションを用いた、3 dpfにおけるTg(itga2b:GFP)胚の93個の個別画像におけるHSPC数の相関(マニュアルとAI機械カウント(小胞子)の間)。 $r=0.844$ の単回帰を用いて解析した。スケールバー: 500 μm, nは解析した胚の数。

分割された各領域は、形態(目の大きさなど)や数(目の向きを決定するために1つと2つを数えるなど)などの特徴について分析することができ、強度マトリクスや蛍光細胞や小胞体などの標識構造の同定を含む蛍光定量化と組み合わせられる(図1C)。

この解析アプローチでは、手作業による画像検査なしで、希望する側方 向の魚だけを含むウェルの自動選択も可能である(図1D)。アライメント・プレートの使用により、分析に適した向きの魚の数は改善されるが(図1A,B)、各プレートに含まれる少数の魚は、ウェル内で適切にアライメントされていない[仰向けに寝ている、尾が観察窓から外れているなど(図S2)]。これは通常プレートあたり5%未満である。

横向きの魚は、Athenaソフトウェアによって識別された解剖学的属性、特に目の数と尾の数の両方が1に等しいものを使用して選択され、それによって空のウェルと望ましくない向きの魚を除外した。ソフトウェアで魚と尾の最小面積を定義することで、魚がウェルに部分的にしか入っていないウェルも除外される(材料と方法を参照)。画像を手動で検査することなく、これらのウェルを自動的に除外することは、ハイスループット・アプリケーションにとって重要な機能であり、不正確または偏ったサンプル選択による統計のゆがみを回避する。これらの不適切な向きの魚は、手作業で正しい向きにすることもできるが、必要な手作業時間は、追加の96ウェルプレートの準備、スキャン、処理、分析に必要な時間をはるかに上回り、有用なデータの総量が少なくなる。

迅速な画像取得とバッチ画像処理、および魚とその解剖学的構造の自動検出を組み合わせることで、最小限のユーザー入力でのハイスループット解析が可能になる。検出される特徴の多様性と、アプリケーションの迅速で使いやすいカスタマイズ性により、このプラットフォームは、以下に詳述するように、多くのスクリーニング用途に対応する汎用性の高いツールとなっている。

2-4dpfゼブラフィッシュ胚の尾部におけるHSPCsの正確なカウント

我々のスクリーニングの第一目標は、*Tg(itga2b:GFP)*レポーター株を用いて、HSPCsを正確に数えることであった(図1C)。3dpfでは、HSPCは尾の付け根の尾側造血組織(CHT; 胎児肝臓に類似)に存在し、卵黄嚢の尾側最末端に近接している(図1D)。私たちは、患者のHSPCsで同定された骨髄異形成症候群(MDS)関連の遺伝子変異の影響を分析できるように、この領域だけに存在する細胞数を自動的にカウントできるスクリーニング・プラットフォームの開発を目指した。最終的には、このようなツールによって、変異幹細胞を標的とする大規模な低分子ライブラリースクリーニングが可能になり、変異HSPC集団のみを枯渇させる薬剤を同定することができる。私たちのアッセイを自動化する上での課題のひとつは、3dpfのゼブラフィッシュは、特に頭部と卵黄の周囲にかなりの自家蛍光を持つことである(図1C)。目的のHSPCはGFPI α 細胞であり、GFPI α 細胞は血小板細胞で、一部は循環している(Lin et al, 2005)。このため、画像全体の自動蛍光を閾値処理するだけでは、多数の目的の細胞が誤って除去されたり、我々の質問とは

関係のない蛍光スポットが含まれたりした。Athena Zebrafishアプリケーションは、画像の手動検査やセグメンテーションを行うことなく、魚の選択された領域、我々の場合は尾(図1C、赤で輪郭を描く)の蛍光小胞子の自動カウントを提供することができる。96ウェルプレートの解析には約10分かかる。測定された数を検証するため、3dpfの野生型トランスジェニック・ゼブラフィッシュの96ウェルプレートをAthenaソフトウェアで解析し、同じ画像の手作業による細胞カウントと結果を比較した。この2つの計数方法には強い相関があり、 $r=0.844$ (図1E)であったことから、自動検出でも手動計数と同等の結果が得られることが示された。

幹細胞は約2dpfで初めてCHTに移動し、そこで増殖を始める(Chen and Zon, 2009)。我々はこのプラットフォームを様々な年齢の胚でテストし、CHTにおけるHSPCの蓄積を経時的に観察した(図2A)。私たちの自動HSPC計数アッセイを用いると、2dpfの時点で少数のHSPCがCHTに存在し、その後48時間かけて着実に増加することが確認された(図2A, B)。この実験では、各年齢で異なるバッチの胚を用いた。しかし、胚は生きたまま画像化され、ピペットでプレートから簡単に取り出せるので、必要に応じて同じ胚の縦断的研究が可能である。我々は5dpfの胚の画像化も試みたが、泳動膀胱の膨張のため、望ましい方向に整列する魚はごくわずかであり、解析はもはや望ましいスループットでは行えなかった。胚の形状や卵黄嚢の遠心分離に対する脆弱性から、丸底プレートのような別のプレートを使用する必要があるが、このシステムを若い胚の画像化に使用することは可能である。現在のところ、このソフトウェアは2~6dpfの魚を識別するよう

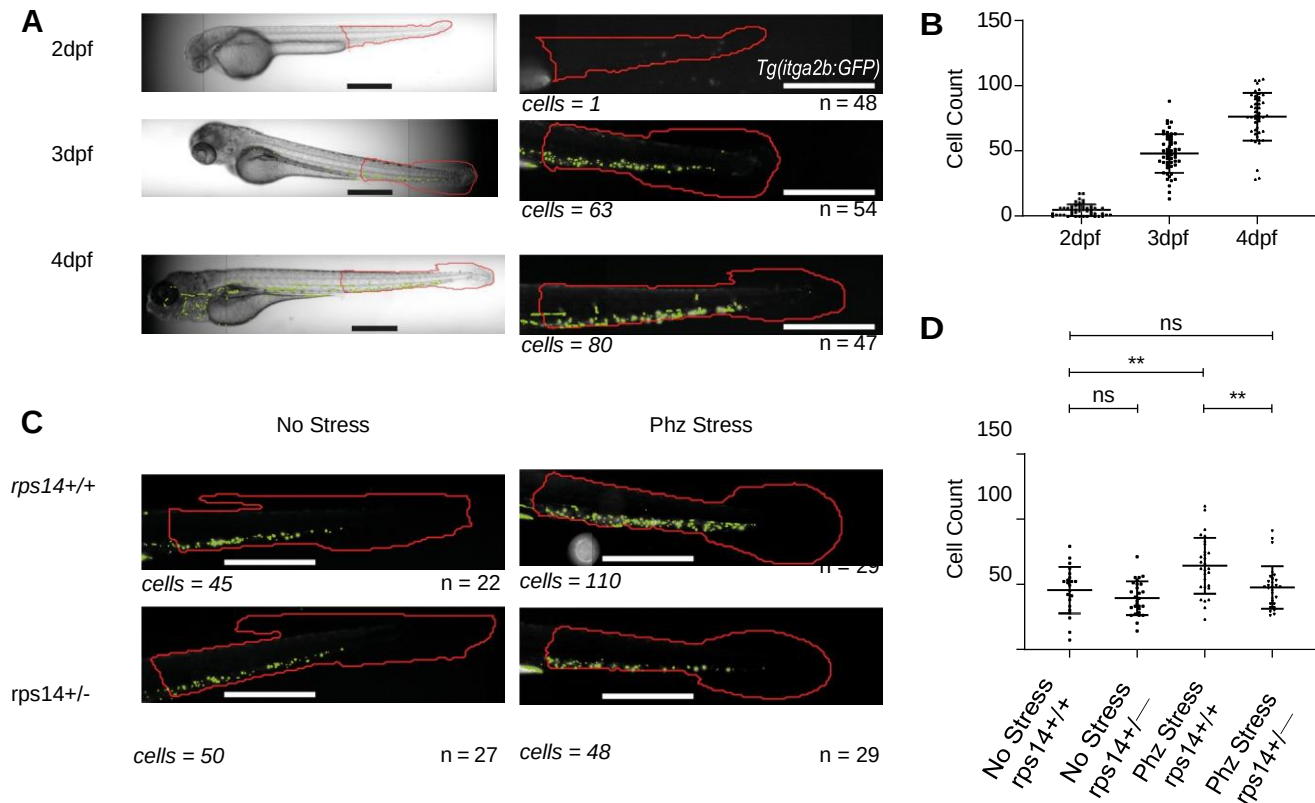


図2. ゼブラフィッシュ胚の年齢や遺伝による幹細胞集団の違いを検出するために、Athena ゼブラフィッシュ アプリケーションを使用し、HSPC 数を検証した。(A) 2~4 dpf の *Tg(itga2b:GFP)* 胚の明視野画像と蛍光画像。尾部領域(赤)の HSPC 数(緑)を分析した。(B) 2 dpf (n=48)、3 dpf (n=54)、4 dpf (n=47) の HSPC 数。時間の経過に伴う HSPC 数の増加を示す。(C) 24時間phz溶血ストレスを与えた後の3日後の*rps14*^{+/+}および*rps14*^{-/-}*Tg(itga2b:GFP)*の尾部の蛍光画像。尾部領域(赤)のHSPC数(緑)を分析したストレスなしのコントロールデータと並べて表示。(D) 異なる条件での HSPC 数。ストレスのない *rps14*^{+/+} (n=27) とストレスのない *rps14*^{+/+} (n=22) 胚の間で HSPC 数に差はないが、phz ストレスを受けた *rps14*^{+/+} 胚 (n=29) では野生型と比較して HSPC 数が増加している。これは、phz ストレスを受けた *rps14*^{-/-} 胚 (n=29) では発生しない。3 回の実験 (Peña et al, 2020 プレプリント) による。統計分析には、無対 t 検定を使用した。エラーバーは、平均 ± 標準偏差 ns、 $P>0.05$ 、 $**P<0.01$ を示す。スケールバー: 500 μ m。n は、各条件で分析された胚の数を指す。細胞数は、示されている例の画像の Athena 細胞数を示す。

にトレーニングされているが、トレーニングデータセットを追加すれば、より若い魚を識別するようにトレーニングすることも可能である。**HSPC と骨髄細胞数の表現型の違いの検出**

我々は、Rps14 変異体ラインを含むゼブラフィッシュの MDS モデルをいくつか開発した (Peña ら, 2020 年プレプリント)。このモデルでは、動物がストレスにさらされていない限り、ヘテロ接合性胚は野生型動物と表現型的に区別がつかない。フェニルヒドラジン (phz) はゼブラフィッシュの溶血ストレスとして使用され、ヘモグロビンの酸化と貧血を引き起こす (Lenard ら, 2016 年, Shafizadeh ら, 2004 年, Ferri-Lagneau ら, 2012 年)。受精後 24~48 時間 (hpf) に phz を 24 時間適用すると、野生型の胚のみが誘発された貧血から回復する (Schneider et al., 2016; Peña et al., 2020 preprint)。HSPC カウントアッセイを使用して、野生型では 3 dpf で phz が貧血に反応して HSPC の増加につながることを示したが、Rps14 変異体ではこの反応は観察されなかった ($P < 0.01$, 図 2C, D (Peña ら 2020 プレプリント))。

プラットフォームの感度をさらに定義するために、さまざまな非致死量の X 線照射が胚の HSPC 数に与える影響が評価された (Traver ら 2004; McAleer ら 2005)。胚は 2 dpf で放射線照射され、その後 3 dpf で画像化された。この結果、40 Gy で幹細胞が大幅に減少し、100 Gy でさらに減少がみられた (図 3A)。このプラットフォームでは、大量の画像

を迅速に分析でき、表現型の違いは高い統計的有意性で簡単に測定が可能となる ($P < 0.001$, 図 3B)。

MDS モデルで HSPC のみを分析するだけでなく、他のゼブラフィッシュトランスジェニックを含む他のアッセイに簡単に拡張して、さまざまな細胞タイプをラベル付けできる汎用スクリーニングプラットフォームの開発を目指した。Tg(itga2b:GFP) と、mCherry タグ付き骨髄細胞 (Buchan ら, 2019) を持つ Tg(lyzC:mCherry) の 2 色トランスジェニックラインを使用して、赤と緑の両方のチャンネルで画像化するために、多重蛍光画像取得を実行した (図 3C)。この魚の系統を X 線照射アッセイに使用し、両方の蛍光チャンネルでイメージングし、2 つの色それぞれに蛍光スポットカウント機能を適用することで、同じ魚の GFP タグ付き HSPC と mCherry タグ付き骨髄細胞の両方を特定した (図 3C)。GFP タグ付き HSPC の減少と同時に、照射後の mCherry タグ付き骨髄細胞の減少も観察された (Aldridge and Radford, 1998 年, Lehnert ら, 1985 年) ($P < 0.0001$, 図 3D, E)。

蛍光出力を使用した拡張アプリケーション - アポトーシス、有毛細胞検出、血管新生

我々は、血液関連のスクリーニングを超えて、ゼブラフィッシュ胚の薬物スクリーニングに一般的に使用される他のアッセイに対するプラットフォームの有用性をさらに評価し、様々なスクリーニングアプリケーションへの幅広い適用性を示したいと考えた。ゼブラフィッシュ

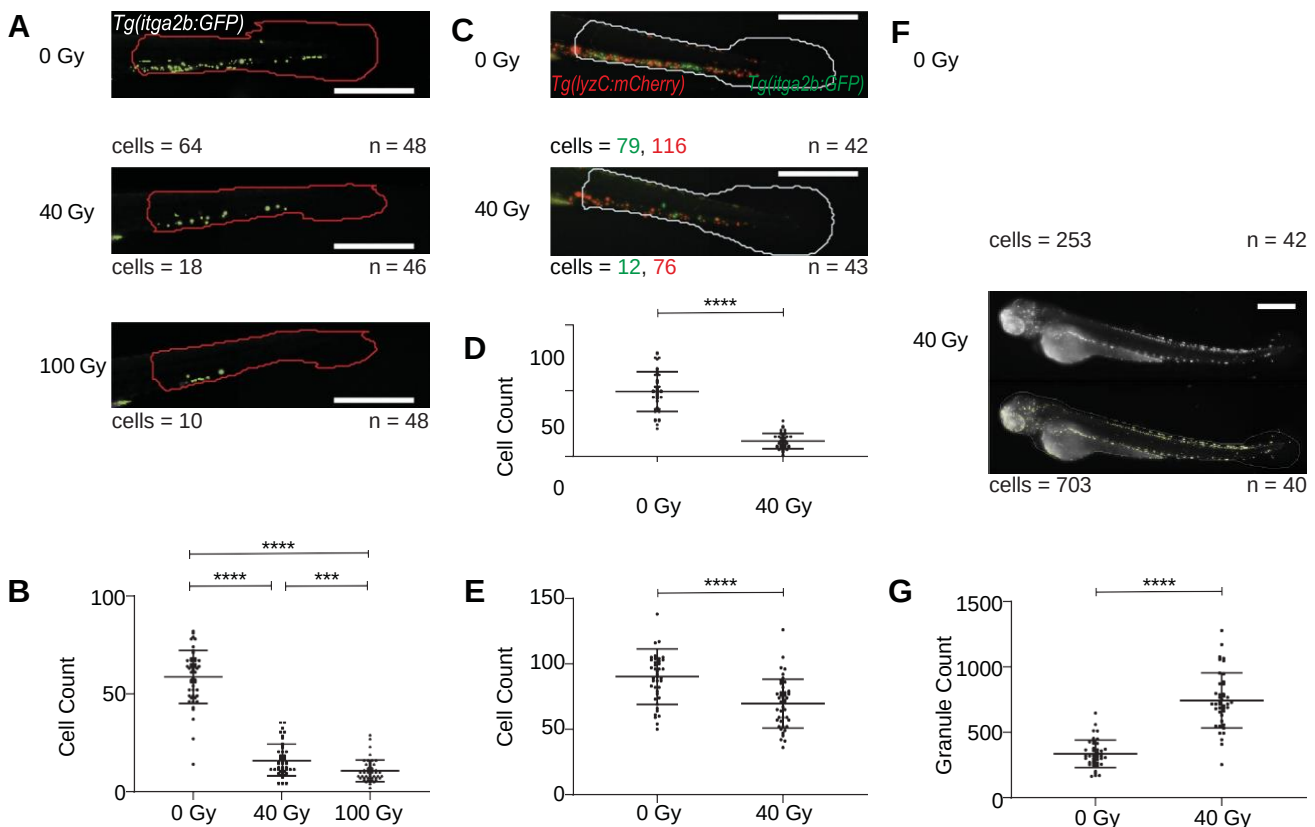


図 3. ゼブラフィッシュ胚における、X 線照射が HSPC 数と骨髄細胞数に及ぼす影響、およびアポトーシスに対する自動解析 (デュアル蛍光体画像)。(A) 受精後 3 日の Tg(itga2b:GFP) 胚の尾部の蛍光画像。受精後 2 日で 0 Gy、40 Gy、または 100 Gy の X 線を照射し、尾部領域 (赤) の HSPC 数 (緑) を解析。(B) 0 Gy (n=48) と比較して、40 Gy (n=46) および 100 Gy (n=48) での HSPC 数の減少を示す。(C) 受精後 3 日目の Tg(itga2b:GFP)(lyzC:mcherry) 二重蛍光体胚の尾部の蛍光画像。受精後 2 日目に 0 Gy または 40 Gy の X 線を照射し、尾部 (白) の HSPC (緑) と骨髄細胞 (赤) を分析。(D、E) 尾部の GFP 陽性細胞の HSPC 数 (D) と mCherry 陽性細胞の骨髄細胞数 (E)。照射なし (n=42) と比較して、照射あり (n=43) では両方の細胞タイプが減少。(F) 受精後 3 日目のアクリジンオレンジ染色胚の蛍光画像。受精後 2 日目に 0 Gy または 40 Gy の X 線を照射し、魚全体の小胞子数 (緑) を分析。(G) 魚全体の小胞子数。照射後 (n=40) は未照射 (n=42) と比較してアポトーシスが増加していることを示す。照射実験は 3 回実施。統計分析には対応のない t 検定を使用。エラーバーは平均 ± 標準偏差を示す。*** $P < 0.001$ 、**** $P < 0.0001$ 。スケールバー: 500 μ m。n は各条件で分析された胚の数を示す。細胞数は、デュアル蛍光体画像の各細胞タイプについて、示されている例の画像の Athena 細胞数を示す。

ユのアポトーシスアッセイは、制御および誘導アポトーシスの分析や毒性評価などの薬物スクリーニングに利用できる (McGrath and Seng, 2013; Parngら 2004)。アクリジンオレンジは蛍光アポトーシスマーカーであり、生きた胚を染色液中でインキュベートし、続いて蛍光イメージングを行うことで、ゼブラフィッシュの細胞死を簡単に視覚化できる (Abramsら, 1993; Furutani-Seikiら1996; Tucker and Lardelli, 2007)。この蛍光の迅速な自動定量化は、薬物スクリーニングや化学スクリーニングの毒性評価に貴重なツールとなる可能性がある。我々のスクリーニングプラットフォームが細胞死の評価に適応できるかどうかをテストするために、3 dpf での分析の前に、2 dpf での X 線照射を使用してゼブラフィッシュ胚でアポトーシスを誘導した。ゼブラフィッシュの胚への放射線照射はアポトーシスを引き起こし、特に脊髄内の細胞に感受性がみられる (Geigerら, 2006)。放射線照射後の死にゆく細胞を超生体染色アクリジンオレンジで標識し、Hermes でハイスループットで画像化した (図 3F)。Athena 分析パイプラインは、小胞子検出のしきい値、スムージング、および面積パラメータを調整して最適化され、魚全体の死にゆく細胞集団を定義する小さな染色小胞子をカウントする。放射線照射による細胞死の増加は容易に観察された ($P < 0.0001$, 図 3G)。

ゼブラフィッシュの側線の有毛細胞を分析するアッセイは、これらの細胞と人間の内耳有毛細胞との類似性により、難聴や耳毒性を媒介する化合物の創薬にも利用されてきた (Whitfield, 2002; Nicolson, 2005; Ton および Parng, 2005)。側線の有毛細胞は、ゼブラフィッシュの頭部と体に沿って神経節に配置されており、蛍光マーカー YO-PRO-1 を使用して染色できる。これは、いくつかの化学的および遺伝学的スクリーニングで利用されている (Chiuら, 2008; Vlasitsら, 2012; Esterbergら, 2013; Peiら, 2018; Owensら, 2008)。現在まで、これらのスクリーニングでは、神経節を数えるか分解をスコアリングするかのいずれかによって手動で評価する必要があった。そこで我々は、自動分析プラットフォームを使用して、これらのスクリーニングの 1 つの結果を再現しようと試みた。Chiuらは、米国食品医薬品局 (FDA) が承認した 1040 種類の化合物の聴器毒性をスクリーニングし、ペンタミジンセチオン酸 (PI) と臭化プロバンテンリン (PB) が 100 μM で有毛細胞の生存をほぼ 50% 減少させることを発見した (Chiuら, 2008)。我々は、YO-PRO-1 で染色し、Hermes でイメージングする前に、4 dpf の胚を 100 μM PI または PB で 1 時間培養を行った。どちらの化合物も有毛細胞の減少をもたらした (図 4A)。魚全体に含まれる蛍光小胞子の Athena 分析を使用して、関心領域 (神経節) を定義し、その蛍光強度と面積を測定して、その中の有毛細胞の劣化を調べた。両化合物は、Chiuら (2008) の結果と一致して、統合蛍光強度と蛍光小胞子サイズの両方で統計的に有意な減少をもたらした (図 4B、C、 $P < 0.0001$)。

血管新生 (既存の血管から新しい血管が形成されること) を分析するアッセイも治療上の関心事であり、固形腫瘍の治療に関心のある抗血管新生化合物の薬物スクリーニングが行われている (Teleanuら, 2019 年; Zirikli および Duyster, 2018 年)。ゼブラフィッシュは、抗血管新生化合物の生体内薬物スクリーニングに有用なツールを提供する (Serbedzijaら, 1999; Chávezら, 2016)。また、トランスジェニックゼブラフィッシュは、以前にもゼブラフィッシュ胚の血管新生の程度を分析するために使用され、血管の発達を低下させる化合物を特定している (Tranら 2007; Mauroら 2019)。我々は、我々のプラットフォームが血管新生の程度の評価に使用できるかどうかを評価しようと試みた。Tg(kdrl:mCherry) フィッシュを使用して、Tranら (2007) によってゼブラフィッシュで抗血管新生として特定されたジメチルスルホキシド (DMSO)、AG1478、または SU4312 のいずれかで、受精後 24 日目胚を 24 時間処理を行った。48 hpf で、胚は Hermes で画像化され、両方の化合物が血管新生の減少につながる事が示された (図 4D)。次に、Athena を使用して蛍光領域を特定し、魚全体の蛍光の総領域を血管形成の程度の代替として使

用した。予想どおり、AG1478 と SU4312 の両方が魚全体の蛍光領域の大幅な減少をもたらした (図 4E、F、 $P < 0.0001$)。後者は、以前に報告された最大阻害濃度 (IC50) の下限と一致し、低濃度でより大幅な減少を引き起こした (Tranら, 2007)。Athena に繊維識別アルゴリズムを導入して、血管新生をより直接的に読み取ることができる。

明視野表現型分析 - 眼のサイズ蛍光アッセイに加えて、プラットフォームを明視野での形態学的スクリーニングに適応できるかどうかを評価した。Mab21l2 は健康な眼の発達に関与しており、ホモ接合型 mab21l2 変異を持つゼブラフィッシュは小眼球症 (眼が小さい症状) を示す (Gath and Gross, 2019; Demlら, 2015; Hartsockら, 2014)。4 dpf で Hermes で明視野で撮影した mab21l2u517 ヘテロ接合型胚 (Wycliffeら, 2020) の交配を用いて、我々はAthena を使用して明視野で眼を特定し、サイズを測定した。以前の研究と一致して、Athena で測定すると、mab21l2u517 ホモ接合型の眼のサイズは小さくなる事が示された (図 4G) ($P < 0.05$, 図 4H)。

考察

ゼブラフィッシュの胚は生体内スクリーニングの優れた機会を提供するが、多くの場合、そのようなスクリーニングは時間のかかる手動アッセイや、開発に時間と専門知識を必要とする特注の自動化ソリューションの開発が必要となる。IDEA Bio-Medical社 の Hermes および Athena HCS プラットフォームを利用すると、多用途で使いやすいゼブラフィッシュ スクリーニングの自動化ソリューションが提供可能となる。

画像取得のためのセットアップは簡単で、簡単なプレートの装填とイメージングのみとなっている。プレートは標準的なピペットを使用して研究室内で装填可能で、アライメントプレートの使用以外に胚の特別な処理は必要ない。イメージングは簡単に実行可能である。プレートを顕微鏡に配置し、ユーザー フレンドリーなソフトウェアを使用してパラメータを選択する。このソフトウェアでは、イメージングの前に変更をインタラクティブに視覚化可能である。イメージングパラメータは保存して読み込むことができるため、いつでも取得した画像間の一貫性を保つことができる。毛細血管内の胚の 360° イメージングを提供する VAST システム (Pulak, 2016 年; Pardo-Martinら, 2010 年; Pardo-Martinら, 2013 年; Changら, 2012 年) とは異なり、Hermes 顕微鏡はプレートの下から魚をイメージングする。これにより、2~4 dpf の魚の側面からの多重画像 (図 2A) を複数の蛍光色で (図 3C) 取得可能となる。多くのアプリケーションではこれで十分であり、我々の方法ではすべての胚がウェル内で完全に整列するわけではないが、意図通り整列していない割合は、プレートあたり約 5% 程度になっており、ソフトウェアパラメータにより、手動で画像を検査することなくこれらのウェルを自動的に除外可能である。

Athena ゼブラフィッシュ アプリケーションを使用すると、取得した画像を簡単に自動分析できる。このシステムの主な利点の 1 つは、さまざまなアッセイへのカスタマイズが簡単に実行できることである。HSPC アッセイのセットアップに続いて、本論文に示されているその後の最適化はそれぞれ 1 回の実験で完了した。このシステムは、ストレスを受けた Rps14 変異体胚とストレスを受けていない Rps14 変異体胚の HSPC 数 (Peñaら, 2020 年プレプリント) (図 2C、D)、薬物処理した胚の有毛細胞の分解 (Chiuら, 2008 年) (図 4A-C)、化学的に誘導された血管新生の減少 (Tranら, 2007 年) (図 4D-F)、および mab21l2 変異体における眼の大きさの減少 (Wycliffeら, 2020 年) (図 4G、H) など、さまざまなアッセイから公開された結果を正確に再現できる事が示された。

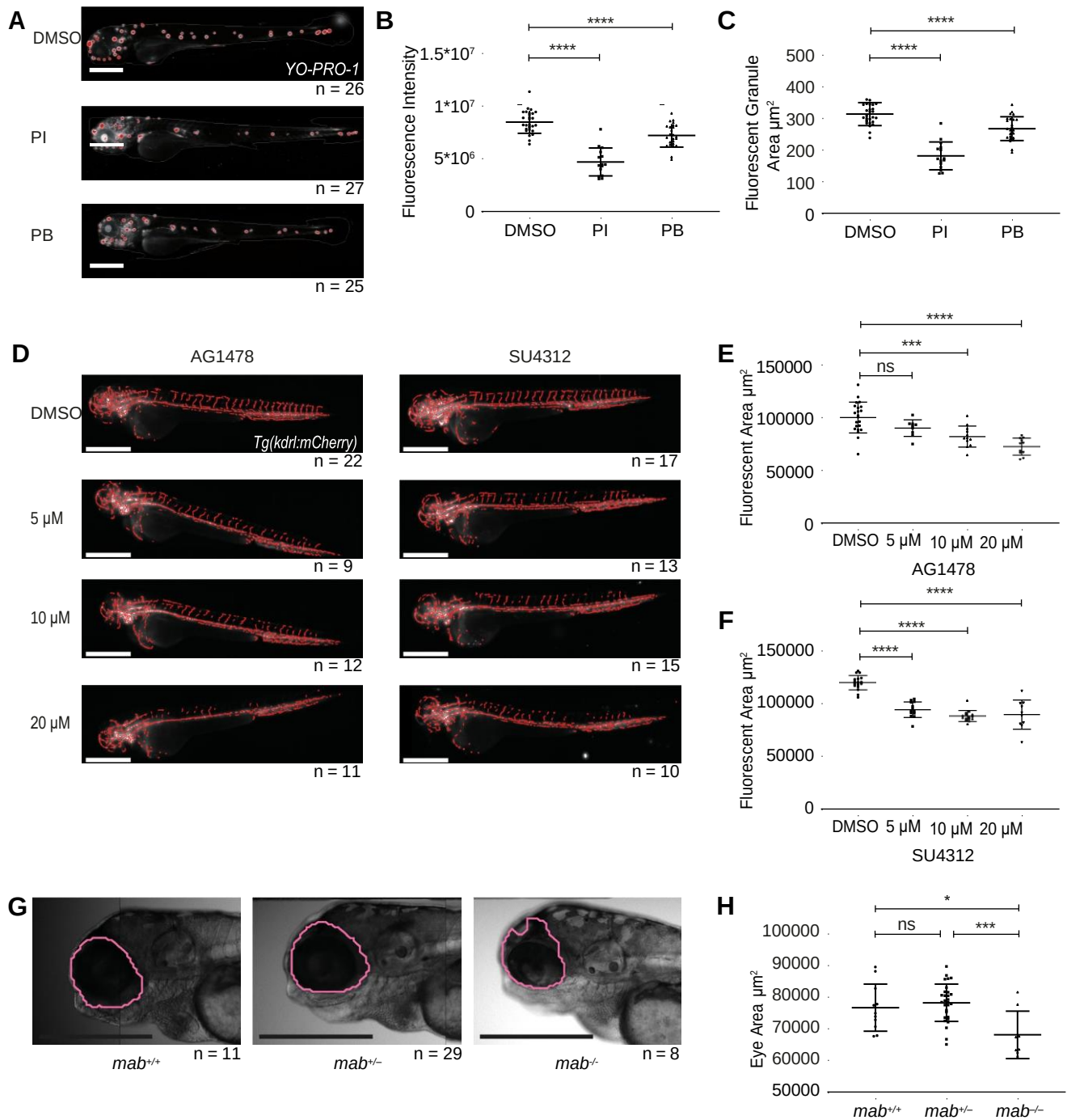


図4 ゼブラフィッシュ胚の有毛細胞の喪失、血管新生、眼の大きさの自動分析を含む、分析プラットフォームの拡張アプリケーション。(A) DMSO、100 μ M ベンタミジンイセチオン酸 (PI)、または 100 μ M プロパンテリン臭化物 (PB) で 1 時間処理後、YO-PRO-1 染色した 4 日齢胚の蛍光画像。魚全体の蛍光小胞子 (赤) を分析。(B、C) 魚全体の総蛍光強度 (B) と蛍光小胞子の平均面積 (C)。以前に説明済みの通り (Chiu ら、2008)、薬物処理による減少を示す。(D) 2 dpf の *Tg(kdrl:mCherry)* 胚の蛍光画像。24 hpf から 24 時間、DMSO、AG1478、または SU 4312 で処理し、魚全体の mCherry 蛍光を分析。(E、F) AG1478 処理後の魚全体の蛍光領域の合計 (E) と SU4312 処理後の魚全体の蛍光領域の合計 (F) 以前に説明済みの通り (Tran ら、2007)、処理した魚では対照群と比較して血管新生が減少していることを示す。(G) 4 dpf の *mab21l2*^{+/+}、*mab21l2*^{+/-}、および *mab21l2*^{-/-} 変異体胚の明視野画像。眼の大きさ (ピンク) を分析。(H) 眼の領域。*mab21l2*^{-/-} 変異体では眼の大きさが小さくなっていることを示す。これらのアッセイのそれぞれについて、単一の実験で、以前の発表と一致する結果が得られた。統計分析には、無対t検定を使用。エラーバーは、平均 $\pm$ 標準偏差ns、P>0.05、*P<0.05、***P<0.001、****P<0.0001を示す。スケールバー：500 μ m。nは、各条件で分析された胚の数を示す。

取得および分析プロトコルはカスタマイズして保存が可能のため、実験間の一貫性が保たれ、数週間または数か月にわたって実行されるハイスループットスクリーニングに役立つ。

プロトコルを保存しておけば、画像の取得と分析はどちらも非常に高速です。96 ウェル プレートの胚の場合、画像の取得には約 15 分、画像処理にはさらに 20 分、画像分析には約 10 分かかる。1 日で多数の胚を高い一貫性でスクリーニングおよび分析でき、

ユーザー入力が限られているため、このプラットフォームは、多数の胚が必要な薬物スクリーニングや遺伝子スクリーニングなどの高スループットアプリケーションに特に役立つ。

このシステムの使用における潜在的な大きな障壁はコストであり、顕微鏡と分析パッケージの両方が一部の研究室では手の届かない可能性があることには留意したい。幅広いアッセイにわたる柔軟性により、本システムは多目的用途で、かつマルチユーザーが仕様可能であり、グループ間で共有できる。Hermes 顕微鏡と Athena パッケージはどちらも、ゼブラフィッシュ以外にも、細胞生物学の多くのアプリケーションに使用でき、複数の研究室や部門で共有して使用したり、コストを共有できる可能性がある。

ゼブラフィッシュは、急速に発達する透明な胚を大量に生産するため、生きた動物全体で薬物スクリーニングを行うユニークな機会を提供する。専門知識やトレーニングなしで迅速なカスタマイズが可能、かつ使いやすい自動スクリーニング プラットフォームを開発することで、このユニークなシステムをより有効に活用できるようになる。本論文で示されているように、このプラットフォームは、幅広い研究トピックにわたる多数の異なるアッセイに適用でき、ユーザー フレンドリーな環境を使用して新しいアッセイを簡単に開発できる。取得と分析の速度により、より大きな化合物ライブラリにアクセス可能である。実験間の一貫性により、複数の実験の結果比較が可能となる。また、使いやすさにより、プラットフォームにすべての人がアクセス可能である。魚と解剖学を識別するために使用されるトレーニングセットは一元管理され、継続的に更新/維持されるため、研究グループ間の再現性と一貫性も確保される。

本プラットフォームにより、ゼブラフィッシュでのハイコンテンツスクリーニングが可能になるだけでなく、統計的検出力を高めるために多数の胚を使用できるため、よりターゲットを絞った実験にも役立つ。本プラットフォームは、使いやすさ、画像化と分析のスピード、異なる時間に取得した画像間の一貫性により、小規模実験と大規模実験の両方に役立つ。現在我々は、このプラットフォームを低分子薬物スクリーニングに使用し、ここで紹介した自動 HSPC カウントを使用して、MDS 関連変異体バックグラウンドで合成致死スクリーニングを実施する予定である。

試料と方法

ゼブラフィッシュの飼育と実験条件

ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) のストックは、英国内務省認定の水槽 (Westerfield, 2007) に示される標準手順に従って維持した。胚は、野生型 AB または AB/TL、緑色蛍光 HSPC を持つトランスジェニック株 Tg(itga2b:GFP) (Linら 2005)、赤色蛍光骨髄細胞を持つ Tg(lyzC:mcherry) (Buchaら2019)、赤色蛍光血管を持つ Tg(kdrl:mCherry) (Choiら 2007)、または変異株 rps14E8fs (Peñaら 2020 プレプリント) および mab21l2u517 (Wycliffeら 2020) から取得した。胚は Kimmel ら(1995) に従ってステージングされ、hpf/dpf で発現した。すべての手順は英国内務省のガイドラインに準拠して実施した。

イメージングのための胚の準備

24 hpf で、胚はブロナーゼを使用して脱絨毛化され、色素形成を防ぐために 0.003% フェニルチオ尿素添加 E3 培地で育てた。2~4 dpf で、胚はトリカインで麻酔され、その後、ワイドオリフィスチップを使用して 75 μ l の E3 培地で 96 ウェルゼブラフィッシュアライメントプレート (Hashimoto ZF プレート、日本、96 ウェル) にロードした。その後、プレートはイメージングの前に 200 g で 20 秒間穏やかに遠心分離を行った。

WiScan® Hermes 画像取得

96 ウェルプレートは、WiScan® Hermes High Content Imaging System (IDEA Bio-Medical社、レホボット、イスラエル) を使用してイメージングを実施した。画像は、明視野と緑および赤の蛍光チャンネルで 4 倍の倍率で撮影され、ウェルのカバレッジは 150%、フィールド密度は 150% であった。これにより、各ウェルに沿って 4 つの重なり合った画像が得られた。明視野は、35% の光強度、40 ms の露出、30% のゲインで撮影を実施した。蛍光チャンネルは、90% の光強度、200 ms の露出、30% のゲインで撮影を実施した。ただし、Tg(kdrl:mCherry) は蛍光チャンネルで 50 ms の露出で撮影を実施した。Z スタックは、5 つの平面で、平面間距離が 50.6 μ m で撮影を実施した。

定量分析の前に、付属の画像前処理ソフトウェア パッケージ (Advanced Data Processing ソフトウェア、IDEA Bio-Medical社、レホボット、イスラエル) を使用して、複数のデータセットの生画像のバッチ処理を行った。本ソフトウェアは、WiScan® Hermes 顕微鏡で取得した 1 つ以上の画像データセットを読み込み、1 つ以上の連続した画像処理操作をバッチで実行する。画像処理操作には、強度投影 (時間または Z スライス経由)、蛍光デコンボリューション、最も鮮明な (最も焦点が合った) Z 平面の選択、および画像モンタージュ (ステッチング) が含まれる。ここでは、明視野チャンネルの各生の視野の最も鮮明な Z スライスを選択し、蛍光チャンネルの各生の視野の最大強度投影を実行した。その後、ウェル内のすべての視野 (最も鮮明な明視野と最大蛍光) がステッチングされ、ウェルごとに 1 つの 2 色チャンネル画像が提供された。

WiSoft® Athena 画像解析

画像の定量化は、WiSoft® Athena ソフトウェア Zebrafish Application (IDEA Bio-Medical, Rehovot, Israel)で行った。このソフトウェアアプリケーションは、明視野と蛍光チャンネルを異なるアルゴリズムで同時に処理することにより、自動的に多重画像解析を行う。ゼブラフィッシュ胚全体の明視野解析では、魚と内部構造を識別するために、新しいディープラーニングベースのAIアルゴリズムを利用した。この方法は「教師あり畳み込みニューラルネットワーク」に基づいており、入力として2~4dpfのゼブラフィッシュ胚の数百の画像を用いて訓練され、それぞれ手動でセグメンテーションされたグランドトゥールズ出力と対になっている。カスタム、マニュアルセグメンテーションのためのオプションもゼブラフィッシュアプリケーションに存在する。得られたアルゴリズムは、魚の外形、内部解剖学的構造、および3つの魚領域 (頭部、体幹、尾部) を自動的に識別する。ユーザーは、最小サイズと最大サイズの制約のみを入力し、識別および分析される解剖学的オブジェクト/領域の適切な範囲を選択する。蛍光チャンネルは、最適化されたアルゴリズム (平滑化、バックグラウンドサブトラクション、強度閾値、領域制約; 表1)を用いた画像解析技術を用いて解析され、蛍光小胞子のような高シグナル対バックグラウンドの対象物を同定する魚、器官、部位の形態学的特徴 (長さ、面積、形状など) は、明視野チャンネルで同定された構造に基づいて定量化される。太字で識別されたオブジェクト (蛍光小胞子など) は、デフォルトから調整されたパラメータを示す。

表1. 異なるアッセイに対する蛍光小胞子のAthena Zebrafish Applicationのパラメーター

	<i>itga2b:GFP</i>	<i>lyzC:mCherry</i>	Acridine Orange	<i>kdrl:mCherry</i>	YO-PRO-1
分析部位	尾部	尾部	魚の体全体	魚の体全体	魚の体全体
蛍光チャンネル	緑	赤	緑	赤	緑
平滑化 (μ m ²)	3	3	3.5	1	3
バックグラウンドサブトラクション (μ m ²)	15	15	20	30	15
強度閾値	1200	1200	1800	1200	4000
最大統合面積 (μ m ²)	20	20	25	500	200
最小面積 (μ m ²)	10	10	10	100	50
最大面積 (μ m ²)	400	400	600	5000	5000

表2 ウェル内の胚検出のためのAthena Zebrafish Applicationパラメーター

検出部位	最小面積 (μm ²)	最大面積(μm ²)
魚の体全体	950,000	1,600,000
頭部	15,000	1,000,000
胴体	25,000	1,300,000
尾部	150,000	1,000,000
目	20,000	250,000
卵黄	100,000	300,000
ひれ	15,000	300,000

蛍光解析のために、小胞子はAthena Zebrafishアプリケーション内で蛍光閾値、小胞子の面積、バックグラウンドサブトラクション、スムージングを定義することにより同定された。パラメータは各アッセイごとにカスタマイズした(表2)。

魚の輪郭に含まれる蛍光チャンネルは定量に含まれ、魚の外側のスポットは無視される。蛍光スポットは、魚全体および解剖学的・局所的構造(尾の小胞子数、脊椎のスポット強度など)内の数と強度を定量化する。

パラメータは、2-4dpfの胚において、検出される魚の許容サイズと内部の特徴を定義するために設定された(表2)。AIアルゴリズムはこれらのオブジェクトを自動的に識別するように訓練されているため、これらのオブジェクトを識別するために追加のパラメータ入力が必要なかった。分析のためのオンサイド・オリエンテッドな魚の集団は、目の数と尾の数が1に等しいものとして定義された。

統計分析

各実験について、希望するデータをAthenaからcsv形式でエクスポートした。例えば、HSPCカウント実験では尾の小胞子数、個々の胚では蛍光面積や目の大きさなどである。統計解析はGraphPad Prism v9.0.2を用いて行った。有意水準は $P < 0.05$ とし、解析には対応のない両側t検定を用いた。データは平均値 $\pm$ s.d.で示した。

変異体の遺伝子型決定

rps14およびmab2112変異体については、画像化後に遺伝子型を決定する必要があった。マルチチャンネルピペットとワイドオリフィスチップを用いて50 μlのヌクレアーゼフリー水で胚を取り出し、1 μlの50×HotSHOTベース溶液(KOH 1.25M, EDTA 10mM)に直接加えた。95°Cで30分間インキュベートした後、1×HotSHOT中和溶液(40mM Tris-HCl)で中和した。rps14およびmab2112変異体の遺伝子型を同定するために、Kompetitive Allele Specific PCR (KASP) genotyping assay (LGC Genomics)を用いた。

X線照射

48 hpfで胚を6ウェルプレートに移して照射した。NDI-321固定陽極X線管(Varian)を装備したAGO HS 320/250 X線装置(AGO X-ray)を用いて、総線量40 Gyまたは100 GyのX線(250 kV, 12.5 mA, 1.0 mm Alフィルター)を照射した。胚は28°Cで24時間飼育した後、上記と同様に3dpfで撮影した。

アポトーシス検出のためのアクリジンオレンジ染色

3 dpfで、6ウェルプレート中の生きた胚をアクリジンオレンジ(Invitrogen)染色液(E3培地中1 μgアクリジンオレンジ)中で暗黒下、穏やかに揺すりながら30分間インキュベートした。トリカインで麻酔をかける前に、胚をE3培地で4回すばやく洗浄し、上記のようにイメージング用のプレートにロードした。プレートはホイルで遮光し、染色後速やかに画像化した。

有毛細胞アッセイ

プロトコールはChiuら(2008)から改変した。4 dpfで、6ウェルプレート中の生きた胚をYO-PRO-1(Invitrogen)染色液(E3培地中2 μM YO-PRO-1)中で暗黒下、穏やかに揺らしながら30分間インキュベートした。胚は速やかにE3培地で4回洗浄した。その後、胚を100 μM PI、100 μM PBまたはDMSOコントロールで1時間処理し、トリケインで麻酔し、上記のようにイメージング用のプレートにロードした。

血管新生障害アッセイ

プロトコールはTranら(2007)を参考にした。24 hpfで、Tg(kdrl:mCherry)胚をプロナーゼで脱色し、6ウェルプレートでAG1478またはSU4312またはDMSOで24時間処理した。

利害関係

J.O.とY.P.は、本研究で使用したWiScan® Hermes High Content Imaging SystemとWiSoft® Athena software Zebrafish Applicationを製造・販売しているイスラエルのIDEA Bio-Medical社に雇用されています。同社は、このスクリーニング・プラットフォームの開発を通して技術的サポートを提供し、原稿の作成に貢献した。M.W.はユニバーシティ・カレッジ・ロンドンに勤務しており、IDEA Bio-Medicalから一部奨学金を得ている。その他の著者には利害関係はない。

著者貢献

構想: A.L., E.P., 方法論: 方法論: A.L., J.O., I.B., E.P.; ソフトウェア: J.O., ソフトウェア: J.O., Y.P.; A.L., 形式分析: A.L., 調査: A.L., Y.H., I.B., E.S., リソース: J.O., G.G., Y.P., 執筆-原案: 執筆-原案: A.L., E.P., 執筆-校閲/編集: J.O., Y.H.; J.O., Y.H., I.B., M.W., Y.P., 視覚化: A.L., M.W., 監督: E.P.; 監修: E.P., プロジェクト管理: E.P.; E.P., 資金獲得: 資金獲得: E.P. Funding

資金提供

本研究は、Cancer Research UK Advanced Clinician Scientist Fellowship [24873] (E.P., A.L., Y.H.), IDEA Bio-Medical (J.O., Y.P.およびM.W.), European Research Council Proof of Concept [842174], Radiation Research Unit at the Cancer Research UK City of London Centre Award [07893/A28990] (I.B.およびE.S.), University College London Hospitals Biomedical Research Centre (M.W.), Medical Research Council Programme Grants [MR/T020164/1] (G.G.)のサポートを受けた。

参考文献

- Abrams, J. M., White, K., Fessler, L. I. and Steller, H. (1993). Programmed cell death during Drosophila embryogenesis. *Development* 117, 29. doi:10.1242/dev.117.1.29
- Aldridge, D. R. and Radford, I. R. (1998). Explaining differences in sensitivity to killing by ionizing radiation between human lymphoid cell lines. *Cancer Res.* 58, 2817.
- Arulmozhivarman, G., Stöter, M., Bickle, M., Kräter, M., Wobus, M., Ehninger, G., Stölzel, F., Brand, M., Bornhäuser, M. and Shayegi, N. (2016). In Vivo chemical screen in Zebrafish embryos identifies regulators of hematopoiesis using a semiautomated imaging assay. *J. Biomol. Screen.* 21, 956-964. doi:10.1177/1087057116644163
- Buchan, K. D., Prajsnar, T. K., Ogryzko, N. V., de Jong, N. W. M., van Gent, M., Kolata, J., Foster, S. J., van Strijp, J. A. G. and Renshaw, S. A. (2019). A transgenic zebrafish line for in vivo visualisation of neutrophil myeloperoxidase. *PLOS ONE* 14, e0215592. doi:10.1371/journal.pone.0215592
- Chang, T.-Y., Pardo-Martin, C., Allalou, A., Wahlby, C. and Yanik, M. F. (2012). Fully automated cellular-resolution vertebrate screening platform with parallel animal processing. *Lab. Chip* 12, 711-716. doi:10.1039/C1LC20849G
- Chávez, M. N., Aedo, G., Fierro, F. A., Allende, M. L. and Egaña J. T. (2016). Zebrafish as an emerging model organism to study angiogenesis in development and regeneration. *Front. Physiol.* 7, 56. doi:10.3389/fphys.2016.00056
- Chen, A. T. and Zoon, L. I. (2009). Zebrafish blood stem cells. *J. Cell. Biochem.* 108, 35-42. doi:10.1002/jcb.22251
- Chen, C., Choudhury, S., Wangsa, D., Lescott, C. J., Wilkins, D. J., Sripadhan, P., Liu, X., Wangsa, D., Ried, T., Moskaluk, C. et al. (2017). A multiplex preclinical model for adenoid cystic carcinoma of the salivary gland identifies regorafenib as a potential therapeutic drug. *Sci. Rep.* 7, 11410. doi:10.1038/s41598-017-11764-2
- Chiu, L. L., Cunningham, L. L., Raible, D. W., Rubel, E. W. and Ou, H. C. (2008). Using the zebrafish lateral line to screen for ototoxicity. *J. Assoc. Res. Otolaryngol.* 9, 178-190. doi:10.1007/s10162-008-0118-y
- Chiu, C.-C., Chou, H.-L., Chen, B.-H., Chang, K.-F., Tseng, C.-H., Fong, Y., Fu, T.-F., Chang, H.-W., Wu, C.-Y., Tsai, E.-M. et al. (2015). BPIQ, a novel synthetic quinoline derivative, inhibits growth and induces mitochondrial apoptosis of lung cancer cells in vitro and in zebrafish xenograft model. *BMC Cancer* 15, 962. doi:10.1186/s12885-015-1970-x
- Choi, J., Dong, L., Ahn, J., Dao, D., Hammerschmidt, M. and Chen, J.-N. (2007). FoxH1 negatively modulates flk1 gene expression and vascular formation in zebrafish. *Dev. Biol.* 304, 735-744. doi:10.1016/j.ydbio.2007.01.023
- Chowdhury, S., Owens, K. N., Herr, R. J., Jiang, Q., Chen, X., Johnson, G., Groppi, V. E., Raible, D. W., Rubel, E. W. and Simon, J. A. (2018). Phenotypic optimization of urea-thiophene carboxamides to yield potent, well tolerated, and

- orally active protective agents against aminoglycoside-induced hearing loss. *J. Med. Chem.* 61, 84-97. doi:10.1021/acs.jmedchem.7b00932
- Deml, B., Kariminejad, A., Borujerdi, R. H. R., Muheisen, S., Reis, L. M. and Semina, E. V. (2015). Mutations in MAB21L2 result in ocular coloboma, microcornea and cataracts. *PLoS Genet.* 11, e1005002. doi:10.1371/journal.pgen.1005002
- Esterberg, R., Coffin, A. B., Ou, H., Simon, J. A., Raible, D. W. and Rubel, E. W. (2013). Fish in a dish: drug discovery for hearing habilitation. *Drug Discovery Today: Disease Models* 10, e23-e29. doi:10.1016/j.ddmod.2012.02.001
- Fazio, M. and Zon, L. I. (2017). Fishing for answers in precision cancer medicine. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 114, 10306. doi:10.1073/pnas.1713769114
- Ferri-Lagneau, K. F., Moshal, K. S., Grimes, M., Zahora, B., Lv, L., Sang, S. and Leung, T. (2012). Ginger stimulates hematopoiesis via bmp pathway in Zebrafish. *PLoS ONE* 7, e39327. doi:10.1371/journal.pone.0039327
- Fior, R., Póvoa, V., Mendes, R. V., Carvalho, T., Gomes, A., Figueiredo, N. and Ferreira, G. G. (2017). Single-cell functional and chemosensitive profiling of combinatorial colorectal therapy in zebrafish xenografts. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 114, E8234. doi:10.1073/pnas.1618389114
- Fu, A., Peh, Y. M., Ngan, W., Wei, N. and Luo, K. Q. (2018). Rapid identification of anticimetastases drugs using integrated model systems with two dimensional monolayer, three dimensional spheroids, and zebrafish xenotransplantation tumors. *Biotechnol. Bioeng.* 115, 2828-2843. doi:10.1002/bit.26816
- Furutani-Seiki, M., Jiang, Y. J., Brand, M., Heisenberg, C. P., Houart, C., Beuchle, D., van Eeden, F. J., Granato, M., Haffter, P., Hammerschmidt, M. et al. (1996). Neural degeneration mutants in the zebrafish, *Danio rerio*. *Development* 123, 229. doi:10.1242/dev.123.1.229
- Gath, N. and Gross, J. M. (2019). Zebrafish mab21l2 mutants possess severe defects in optic cup morphogenesis, lens and cornea development. *Dev. Dyn.* 248, 514-529. doi:10.1002/dvdy.44
- Geiger, G. A., Parker, S. E., Beothy, A. P., Tucker, J. A., Mullins, M. C. and Kao, G. D. (2006). Zebrafish as a "Biosensor"? effects of ionizing radiation and amifostine on embryonic viability and development. *Cancer Res.* 66, 8172. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-0466
- Hagedorn, E. J., Durand, E. M., Fast, E. M. and Zon, L. I. (2014). Getting more for your marrow: boosting hematopoietic stem cell numbers with PGE2. *Exp. Cell Res.* 329, 220-226. doi:10.1016/j.yexcr.2014.07.030
- Haney, M. G., Moore, L. H. and Blackburn, J. S. (2020). Drug screening of primary patient derived tumor xenografts in zebrafish. *J. Vis. Exp.* doi:10.3791/60996
- Hartsock, A., Lee, C., Arnold, V. and Gross, J. M. (2014). In vivo analysis of hyaloid vasculature morphogenesis in zebrafish: A role for the lens in maturation and maintenance of the hyaloid. *Dev. Biol.* 394, 327-339. doi:10.1016/j.ydbio.2014.07.024
- Jung, D.-W., Oh, E.-S., Park, S.-H., Chang, Y.-T., Kim, C.-H., Choi, S.-Y. and Williams, D. R. (2012). A novel zebrafish human tumor xenograft model validated for anti-cancer drug screening. *Mol. Biosyst.* 8, 1930-1939. doi:10.1039/c2mb05501e
- Kamentsky, L., Jones, T. R., Fraser, A., Bray, M.-A., Logan, D. J., Madden, K. L., Ljosa, V., Rueden, C., Eliceiri, K. W. and Carpenter, A. E. (2011). Improved structure, function and compatibility for CellProfiler: modular high-throughput image analysis software. *Bioinformatics* 27, 1179-1180. doi:10.1093/bioinformatics/btr095
- Kanungo, J., Lantz, S. and Paule, M. G. (2011). In vivo imaging and quantitative analysis of changes in axon length using transgenic zebrafish embryos. *Neurotoxicol. Teratol.* 33, 618-623. doi:10.1016/j.ntt.2011.08.013
- Kimmel, C. B., Ballard, William, W., Kimmel, Seth, R., Ullmann, B. and Schilling Thomas, F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* 203, 253-310. doi:10.1002/aja.1002030302
- Kitcher, S. R., Kirkwood, N. K., Camci, E. D., Wu, P., Gibson, R. M., Redila, V. A., Ogelman, R., Simon, J. A., Rubel, E. W., Raible, D. W. et al. (2019). ORC-13661 protects sensory hair cells from aminoglycoside and cisplatin ototoxicity. *JCI Insight* 4, e126764. doi:10.1172/jci.insight.126764
- Lehnert, S., Rybka, W. B., Suissa, S. and Giambattista, D. (1985). Radiation response of haematopoietic cell lines of human origin. *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.* 49, 423-431. doi:10.1080/09553008514552651
- Lenard, A., Alghisi, E., Daff, H., Donzelli, M., McGinnis, C. and Lengerke, C. (2016). Using zebrafish to model erythroid lineage toxicity and regeneration. *Haematologica* 101, e164. doi:10.3324/haematol.2016.142562
- Lin, H.-F., Traver, D., Zhu, H., Dooley, K., Paw, B. H., Zon, L. I. and Handin, R. I. (2005). Analysis of thrombocyte development in CD41-GFP transgenic zebrafish. *Blood* 106, 3803. doi:10.1182/blood-2005-01-0179
- Lin, H. S., Huang, Y. L., Wang, Y. S., Hsiao, E., Hsu, T. A., Shiao, H. Y., Jiaang, W. T., Sampurna, B. P., Lin, K. H., Wu, M. S. et al. (2019). Identification of novel anti-her cancer small molecules with better therapeutic index than sorafenib via zebrafish drug screening platform. *Cancers (Basel)* 11, 739. doi:10.3390/cancers11060739
- Mauro, A., Ng, R., Li, J. Y., Guan, R., Wang, Y., Singh, K. K. and Wen, X.-Y. (2019). Protocol development for discovery of angiogenesis inhibitors via automated methods using zebrafish. *PLoS ONE* 14, e0221796. doi:10.1371/journal.pone.0221796
- McAleer, M. F., Davidson, C., Davidson, W. R., Yentzer, B., Farber, S. A., Rodeck, U. and Dicker, A. P. (2005). Novel use of zebrafish as a vertebrate model to screen radiation protectors and sensitizers. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 61, 10-13. doi:10.1016/j.ijrobp.2004.09.046
- McGrath, P. and Seng, W. L. (2013). Use of zebrafish apoptosis assays for preclinical drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* 8, 1191-1202. doi:10.1517/17460441.2013.825244
- Metelo, A. M., Noonan, H. R., Li, X., Jin, Y., Baker, R., Kamentsky, L., Zhang, Y., van Rooijen, E., Shin, J., Carpenter, A. E. et al. (2015). Pharmacological HIF2α inhibition improves VHL disease-associated phenotypes in zebrafish model. *J. Clin. Invest.* 125, 1987-1997. doi:10.1172/JCI73665
- Nicolson, T. (2005). The genetics of hearing and balance in Zebrafish. *Annu. Rev. Genet.* 39, 9-22. doi:10.1146/annurev.genet.39.073003.105049
- North, T. E., Goessling, W., Walkley, C. R., Lengerke, C., Kopani, K. R., Lord, A. M., Weber, G. J., Bowman, T. V., Jang, I.-H., Grosser, T. et al. (2007). Prostaglandin E2 regulates vertebrate haematopoietic stem cell homeostasis. *Nature* 447, 1007-1011. doi:10.1038/nature05883
- Owens, K. N., Santos, F., Roberts, B., Linbo, T., Coffin, A. B., Knisely, A. J., Simon, J. A., Rubel, E. W. and Raible, D. W. (2008). Identification of genetic and chemical modulators of Zebrafish mechanosensory hair cell death. *PLoS Genet.* 4, e1000020. doi:10.1371/journal.pgen.1000020
- Pardo-Martin, C., Chang, T.-Y., Koo, B. K., Gilleland, C. L., Wasserman, S. C. and Yanik, M. F. (2010). High-throughput in vivo vertebrate screening. *Nat. Methods* 7, 634-636. doi:10.1038/nmeth.1481
- Pardo-Martin, C., Allalou, A., Medina, J., Eimon, P. M., Wahlby, C. and Fatih Yanik, M. (2013). High-throughput hyperdimensional vertebrate phenotyping. *Nat. Commun.* 4, 1467. doi:10.1038/ncomms2475
- Parrig, C., Anderson, N., Ton, C. and McGrath, P. (2004). Zebrafish apoptosis assays for drug discovery. *Methods Cell Biol.* 76, 75-85. doi:10.1016/S0091-679X(04)76005-7
- Pei, W., Xu, L., Huang, S. C., Pettie, K., Idol, J., Rissone, A., Jimenez, E., Sinclair, J. W., Slevin, C., Varshney, G. K. et al. (2018). Guided genetic screen to identify genes essential in the regeneration of hair cells and other tissues. *npj Regenerative Medicine* 3, 11. doi:10.1038/s41536-018-0050-7
- Peña, O. A., Lubin, A., Rowell, J., Hockings, C., Jung, Y., Hoade, Y., Dace, P., Valdivia, L. E., Tuschl, K., Boiers, C. et al. (2020). TLR7 ligation augments haematopoiesis in Rps14 (uS11) deficiency via paradoxical suppression of inflammatory signalling and enhanced differentiation. *bioRxiv* 2020.07.06.175000. doi:10.1101/2020.07.06.175000
- Pulak, R. (2016). Tools for automating the imaging of zebrafish larvae. *Methods* 96, 118-126. doi:10.1016/j.ymeth.2015.11.021
- Romano, S. N. and Gorelick, D. A. (2014). Semi-automated imaging of tissue-specific fluorescence in zebrafish embryos. *J. Vis. Exp.* 51533. doi:10.3791/51533
- Saydmohammed, M., Vollmer, L. L., Onuoha, E. O., Vogt, A. and Tsang, M. (2011). A high-content screening assay in transgenic zebrafish identifies two novel activators of fgf signaling. *Birth Defects Res. C Embryo Today* 93, 281-287. doi:10.1002/bdr.20216
- Schneider, R. K., Schenone, M., Ferreira, M. V., Kramann, R., Joyce, C. E., Hartigan, C., Beier, F., Brümendorf, T. H., Gerding, U., Platzbecker, U. et al. (2016). Rps14 haploinsufficiency causes a block in erythroid differentiation mediated by S100A8 and S100A9. *Nat. Med.* 22, 288. doi:10.1038/nm.4047
- Serbedzija, G. N., Flynn, E. and Willett, C. E. (1999). Zebrafish angiogenesis: a new model for drug screening. *Angiogenesis* 3, 353-359. doi:10.1023/A:1026598300052
- Shafizadeh, E., Peterson, R. T. and Lin, S. (2004). Induction of reversible hemolytic anemia in living zebrafish using a novel small molecule. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 138, 245-249. doi:10.1016/j.cca.2004.05.003
- Somasagara, R. R., Huang, X., Xu, C., Haider, J., Serody, J. S., Armistead, P. M. and Leung, T. (2021). Targeted therapy of human leukemia xenografts in immunodeficient zebrafish. *Sci. Rep.* 11, 5715. doi:10.1038/s41598-021-85141-5
- Stirling, D. R., Suleyman, O., Gil, E., Elks, P. M., Torracca, V., Noursadeghi, M. and Tomlinson, G. S. (2020). Analysis tools to quantify dissemination of pathology in zebrafish larvae. *Sci. Rep.* 10, 3149. doi:10.1038/s41598-020-59932-1
- Teleanu, R. I., Chircov, C., Grumezescu, A. M. and Teleanu, D. M. (2019). Tumor angiogenesis and anti-angiogenic strategies for cancer treatment. *J. Clin. Med.* 9, 84. doi:10.3390/jcm9010084
- Ton, C. and Parrig, C. (2005). The use of zebrafish for assessing ototoxic and otoprotective agents. *Hear. Res.* 208, 79-88. doi:10.1016/j.heares.2005.05.005
- Tonon, F., Zennaro, C., Dapas, B., Carraro, M., Mariotti, M. and Grassi, G. (2016). Rapid and cost-effective xenograft hepatocellular carcinoma model in Zebrafish for drug testing. *Int. J. Pharm.* 515, 583-591. doi:10.1016/j.ijpharm.2016.10.070
- Tran, T. C., Sneed, B., Haider, J., Blavo, D., White, A., Aiyejorun, T., Baranowski, T. C., Rubinstein, A. L., Doan, T. N., Dingledine, R. et al. (2007). Automated, quantitative screening assay for antiangiogenic compounds using transgenic Zebrafish. *Cancer Res.* 67, 11386. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-3126

- Traver, D., Winzeler, A., Stern, H. M., Mayhall, E. A., Langenau, D. M., Kutok, J. L., Look, A. T. and Zon, L. I. (2004). Effects of lethal irradiation in zebrafish and rescue by hematopoietic cell transplantation. *Blood* 104, 1298-1305. doi:10.1182/blood-2004-01-0100
- Tucker, B. and Lardelli, M. (2007). A rapid apoptosis assay measuring relative acridine orange fluorescence in zebrafish embryos. *Zebrafish* 4, 113-116. doi:10.1089/zeb.2007.0508
- Vlasits, A. L., Simon, J. A., Raible, D. W., Rubel, E. W. and Owens, K. N. (2012). Screen of FDA-approved drug library reveals compounds that protect hair cells from aminoglycosides and cisplatin. *Hear. Res.* 294, 153-165. doi:10.1016/j.heares.2012.08.002
- Vogt, A., Cholewinski, A., Shen, X., Nelson, S. G., Lazo, J. S., Tsang, M. and Hukriede, N. A. (2009). Automated image-based phenotypic analysis in zebrafish embryos. *Dev. Dyn.* 238, 656-663. doi:10.1002/dvdy.21892
- Vogt, A., Codore, H., Day, B. W., Hukriede, N. A. and Tsang, M. (2010). Development of automated imaging and analysis for zebrafish chemical screens. *J. Vis. Exp.* e1900. doi:10.3791/1900
- Westerfield, M. (2007). *The Zebrafish Book: a Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio)*, 5th edn, Eugene: University of Oregon Press.
- Whitfield, T. T. (2002). Zebrafish as a model for hearing and deafness. *J. Neurobiol.* 53, 157-171. doi:10.1002/neu.10123
- Wycliffe, R., Julie Plaisancie, J., Sydney Leaman, S., Santis, O., Tucker, L., Cavieres, D., Fernandez, M., Weiss, C., Sobarzo, C., Gestri, G. et al. (2020). Developmental delay during eye morphogenesis underlies optic cup and neurogenic defects in mab21l2^{u517} zebrafish mutants. *IJDB* 65, 289-299. doi:10.1387/ijdb.200173LV
- Xiao, J., Glasgow, E. and Agarwal, S. (2020). Zebrafish xenografts for drug discovery and personalized medicine. *Trends Cancer* 6, 569-579. doi:10.1016/j.trecan.2020.03.012
- Zhang, B., Shimada, Y., Kuroyanagi, J., Umemoto, N., Nishimura, Y. and Tanaka, T. (2014). Quantitative phenotyping-Based In Vivo chemical screening in a Zebrafish model of leukemia stem cell Xenotransplantation. *PLoS ONE* 9, e85439. doi:10.1371/journal.pone.0085439
- Zirlik, K. and Duyster, J. (2018). Anti-angiogenics: current situation and future perspectives. *Oncol. Res. Treat.* 41, 166-171. doi:10.1159/000488087