

2023年9月20日
公立大学法人奈良県立医科大学

組織切片からの高品質な単一細胞トランスクリプトーム解析手法で 明らかになったマウス卵胞の不均一性

【要点】

- 奈良県立医科大学 発生・再生医学講座の栗本一基教授と池田宏輝助教を中心とする研究グループは、組織切片からレーザーキャプチャーマイクロダイセクション(LCM)で採取した細胞に対して適用可能な、高品質な単一細胞トランスクリプトーム解析手法 DRaqL(direct RNA recovery and quenching for LCM)を開発しました。この手法をマウス卵巣に応用して、卵母細胞とその支持細胞である顆粒膜細胞において、組織学的な情報とトランスクリプトームの関係にある不均一性を明らかにしました。

【概要】

奈良県立医科大学、発生・再生医学講座の栗本一基教授と池田宏輝助教を中心とする研究グループは、組織切片からレーザーキャプチャーマイクロダイセクション(LCM)[1]を用いて採取した単一の細胞に対して、これまでにない高い感度でトランスクリプトーム[2]を定量解析できる手法 DRaqL(direct RNA recovery and quenching for LCM)を開発しました。組織切片から採取した単一細胞に対する、DRaqL によるトランスクリプトーム解析の感度は、新鮮な状態で単離した細胞に対する、通常的手法による解析と同程度でした。また、DRaqL は mRNA のエキソン結合部位[3]の定量にも適用できるとわかりました。DRaqL を用いてマウス卵巣における卵胞[4]の成長過程を解析し、卵母細胞の直径からトランスクリプトームを予測するモデルを開発しました。さらに、このモデルから逸脱する細胞が、形態的には成長しているものの遺伝子発現の成熟が遅延していることを発見しました。また、顆粒膜細胞[5]の、卵母細胞との位置関係に相関する遺伝子発現変化も同定しました。卵胞成長過程における単一細胞レベルの遺伝子発現変化を、組織学的な情報に定量的に関係づけた解析は、本研究が世界初になります。本研究は、当大学、京都大学(iPS細胞研究所/ヒト生物学高等研究拠点)、理化学研究所(革新知能統合研究センター)の共同研究により実施されました。本成果は9月18日付けでオンライン科学雑誌「*Life Science Alliance*」に掲載されました。

【研究の背景】

私たち人間を含む多細胞生物は基本的にはただ一つの受精卵から発生します。このため、高品質な卵子を形成することが安定した生命継承の要と言えますが、そのメカニズムは完全には解明されていません。卵子のもととなる卵母細胞は、顆粒膜細胞と呼ばれる支持細胞に取り囲まれ、卵胞という構造の中で成長します。マウスの卵母細胞は卵胞の中で直径 20 μm 未満から 70 μm 以上の大きさに成長します。顆粒膜細胞は卵母細胞に様々な物質を供給し、その成長を支持します。したがって卵母細胞の形成機構を理解するためには、顆粒膜細胞との位置関係や、卵母細胞自身の大きさなどの組織学的情報[6]と、それぞれの細胞の遺伝子発現情報[7]を結び付けて詳細に定量解析する必要があります。

細胞の遺伝子発現を解析する手法はこれまで数多く開発されています。この十数年あまりの間に、一つ一つの細胞の遺伝子発現を、ゲノムワイドに解析可能な単一細胞トランスクリプトーム解析法が数多く開発され、生命現象の詳細な解明に役立てられてきました。一方で、ほとんどの解析手法では、組織を丸ごと溶解するか、細胞を組織からばらばらにして単離する必要がありますが、組織内の形態的な情報が失われてしまいます。

この点を改善するために、最近、組織切片[8]の中の位置情報を維持したまま、切片全体で遺伝子発現解析をおこなう空間トランスクリプトーム解析技術が発展しており、単一細胞レベル、またはそれ以上の高い空間解像度が実現されるようになってきました。一方で、多くの手法では、mRNA の全長情報を取得することが難しい、遺伝子発現の検出感度が高くはない、もしくは全ての遺伝子を偏りなく検出することが難しい(あらかじめ設計したプローブを用いて発現遺伝子を検出するので)など、一つ一つの細胞の遺伝子発現を精密に調べるためには課題が残っています。また、切片を遺伝子発現用の高価なスライドガラスに貼り付ける手法が多いので、組織形態の観察に基づいて遺伝子発現解析すべき切片かどうかを判断するといった、実践的な使い方はしづらくなっています。切片をまるごと同時に解析するアプローチは、多数の組織切片を解析すると費用が高額になってしまう可能性もあります。また遺伝子発現解析した後の切片を再解析したり、ゲノム抽出やタンパク質抽出など、ほかの用途に再利用したりすることも困難です。

その一方で、レーザーキャプチャーマイクロダイセクションなどを用いて、切片から単一細胞レベルの組織片を切り出し、その後に溶解して、遺伝子発現に用いるアプローチも以前から用いられています。このアプローチは、上記の空間トランスクリプトーム解析技術と相補的な特性を持っており、実践的な利便性の高さがあります。また、原理的には、組織切片から回収した細胞を、通常のトランスクリプトームと同様に精密に解析できる可能性があります。LCM の装置は世界中に普及しており、LCM ベースの遺伝子発現解析は広く行われているため、単一細胞解析の感度や精度が向上すれば、様々な医学生命科学研究の進展に寄与すると期待されます。

しかしながら、組織切片を顕微鏡で形態解析するためには切片を染色する必要があり、その際に細胞内容物の溶出を防ぐためにアルコールやホルマリンで固定[9]する必要があります。固定した組織切片から RNA を抽出する効率は、これまでの手法ではかならずしも高くなく、遺伝子発現解析の精度や感度に課題が残る原因になっていました。

【研究の成果】

本研究では、アルコールやホルマリンで固定された組織切片から採取された細胞(片)を効率よく溶解し、溶解液を直接 RNA シーケンシング(RNA-seq)[10]に適用する手法を開発しました。この手法では、まず、固定された組織切片を強弱二種類の界面活性剤[11]で処理することで、変性効果の強い第一の界面活性剤(デオキシコール酸ナトリウム)で効率よく細胞を溶解します。その後に、第二の弱い界面活性剤(トリトン X-100)を大量に加え、第一の界面活性剤の変性効果を弱めます(図1)。この手順で、高い変性作用による細胞溶解と、その後の RNA-seq における酵素反応を効率よく行うことを両立させています。さらにプロテアーゼ処理と組み合わせることで、ホルマリンによって強固に固定された組織切片も効率よく溶解することができるようになりました。この溶解手法を DRaQL(direct RNA recovery and quenching for LCM)と命名しました。DRaQL を複数の cDNA 増幅手法(広く用いられている Smart-seq2, キット販売されている SMART-seq v4, 独自開発の SC3-seq 法)に、シームレスに接続する実験条件も見つけ、切片からの精密な単一細胞 RNA-seq 手法を開発しました。

DRaQL (direct RNA recovery and quenching for laser capture microdissection)

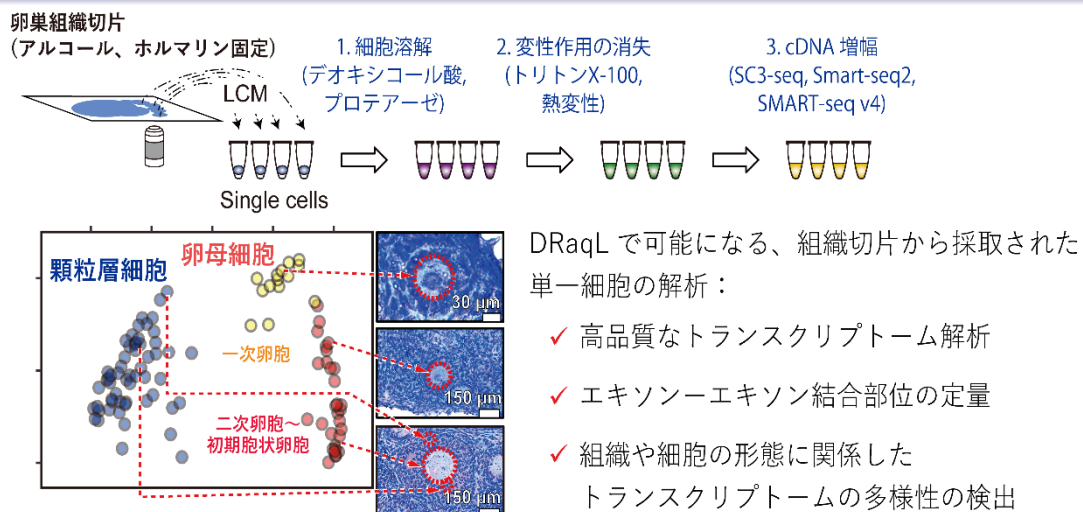


図 1. DRaQL の概念図

DRaQL による遺伝子発現解析の感度を調べるために、実際にマウスの卵巣組織切片や、培養細胞のブロックから作成した切片から LCM を用いて細胞(片)を採取し、RNA-seq を行いました。比較のため、同じ標本(同一個体のもう一つの卵巣や、同じ培養皿で培養した培養細胞)から、新鮮なまま(切片を作らず)、細胞を取り出し、通常の手法で RNA-seq を行いました(図2)。これらのトランスクリプトームを比較すると、切片から採取した細胞の解析を、新鮮な細胞と同等の感度で行うことができ、検出した遺伝子発現パターンも同様であることがわかりました。また、mRNA のエキソン-エキソン結合部位の量も、同様に定量可能であることを確かめました。さらに、ホルマリンで強固に固定した組織も、既存の手法よりも高い感度で解析でき、新鮮な細胞と同様の発現パターンが得られることがわかりました。これらのことから、DRaQL を用いた RNA-seq で、高い感度と精度を持つ高品質なトランスクリプトーム解析が

可能であることがわかりました。

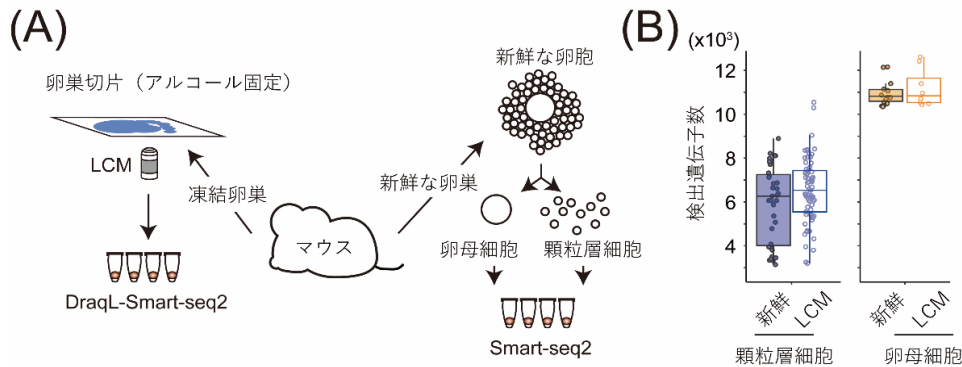


図2. DRaQl を用いた卵巣組織からの単一細胞解析: 卵母細胞と顆粒膜細胞を、新鮮な状態と切片から採取した状態(LCM)で比較。cDNA 増幅法は広く用いられる Smart-seq2 を使用。(A)同一のマウス個体の卵巣から新鮮な細胞と組織切片を作成。(B)新鮮な細胞と切片から採取した細胞における、発現検出された遺伝子の数。

さらに、DRaQl を用いて、マウスの卵巣組織内で成長過程にある卵胞の形態と、卵母細胞や顆粒膜細胞の遺伝子発現の関係を解析しました(図3)。この解析で、成長過程にある卵母細胞の大きさ(直径)とトランスクリプトームの間に連続的な対応関係があり、卵母細胞の大きさからトランスクリプトームを予測するモデルを作ることができました。また、この予測モデルから逸脱する卵母細胞が存在すること、それらの卵母細胞は形態的には成長していてもトランスクリプトームは未熟な状態にあることがわかりました。これは卵胞成長過程で一部の優勢な卵胞だけが選択され、成熟して排卵に至るメカニズム(dominant follicle selection, 優勢卵胞の選択)に関係する可能性があります。

さらに、顆粒膜細胞と卵母細胞の位置関係に注目し、卵母細胞に隣接している顆粒膜細胞と、隣接はしていない顆粒膜細胞を比較して、転写制御因子[12]や細胞増殖に関する因子など、卵母細胞との位置関係によって発現量が異なる遺伝子を新たに同定しました。これらの卵巣内にある卵胞の、形態情報にリンクした定量的な遺伝子発現解析は、組織学的な顕微鏡観察と高感度なトランスクリプトーム解析が両立して始めて可能になるもので、世界初の成果になります。今後、これらの解析をさらに推進することによって、卵胞の品質管理機構に関する因子の同定など、不妊治療や生殖補助医療に資する研究につながることが期待されます。

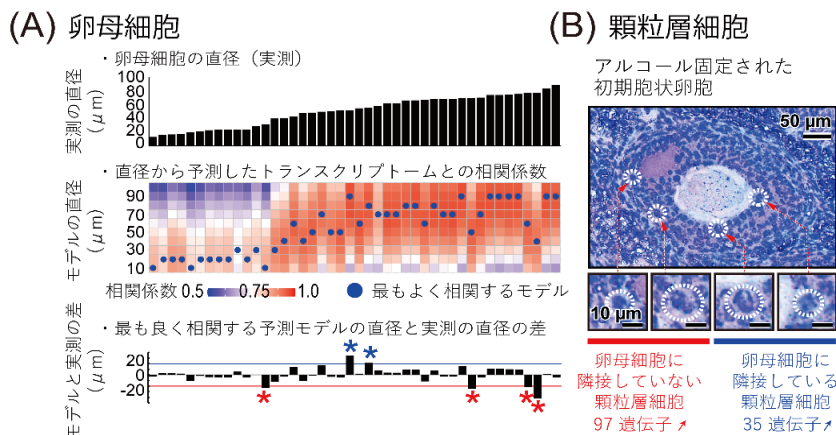


図 3. DRaQl を用いて解析した卵胞の形態と遺伝子発現の関係 (A)卵母細胞の直径(上)。卵母細胞の直径に対して構築したトランスクリプトームモデルと、実際のそれぞれの卵母細胞のトランスクリプトームの間の相関係数(中)。最も高い相関係数を示すモデルの直径と、実際の直径の差(下)。(B)卵母細胞に隣接する顆粒膜細胞と、隣接はしていない顆粒膜細胞の組織像と、それぞれで発現増加している遺伝子の数。

【用語解説】

[1]レーザーキャプチャーマイクロダイセクション レーザーを使用して組織切片の任意の部分を切り取って回収する技術。

[2]トランスクリプトーム 特定の細胞や組織で発現する遺伝子の総体([7]参照)。

[3]エキソン-エキソン結合部位 ゲノム(DNA)にコードされた遺伝子が機能するとき(遺伝子が発現するとき。[7]参照)には、まず DNA のコピーであるメッセンジャーRNA (mRNA)が作られます(転写)。この mRNA にはエキソンとイントロンという部分があり、イントロンが除去されてエキソン同士が連結されて成熟 mRNA となります(この反応はスプライシングと呼ばれます)。成熟 mRNA はリボソームで合成されるタンパク質の鋳型として機能します。成熟 mRNA の中にあるエキソン同士の連結部はエキソン-エキソン結合部位と呼ばれます。一つの遺伝子に対して、複数種類のスプライシングが存在することは珍しくないため、細胞の中でどのような mRNA が実際に作られているのかを知るためにエキソン-エキソン結合部位の情報は重要です。

[4]卵胞 哺乳類の卵子の元となる卵母細胞は、卵巣の中で顆粒膜細胞と呼ばれる支持細胞(卵母細胞の成長を助ける細胞)が取り囲まれています。卵母細胞はこの卵胞の中で成長します。マウスの卵母細胞は、最も幼弱な原始卵胞の中では直径が 20 μ m 未満ですが、最終的に排卵される MII 卵母細胞では 70 μ m 以上になります。

[5]顆粒膜細胞 卵胞の中で卵母細胞の成長を補助する細胞で、少なくとも一部の顆粒膜細胞は卵母細胞とは transzonal projection (TJP)と呼ばれる細胞突起を介して、卵母細胞と直接物質をやり取りしています。最も幼弱な原始卵胞では単層の扁平上皮ですが、卵母細胞の成長とともに、重層化します。

[6]組織学 皮膚や筋肉、卵巣など、細胞や細胞の足場になる結合組織が集まって機能する単位を組織と言います。組織の内部構造を調べるために後述する切片を作成し、固定染色して顕微鏡で観察します。そのようにして行われる組織内部の形態解析は組織学と呼ばれます。

[7]遺伝子発現 ゲノム DNA にコードされる遺伝子が機能を発揮するために mRNA として転写されます。多くの場合、検出の容易さから、細胞の中に存在する mRNA の量が、遺伝子発現量であるとみなされます。

[8]組織切片 組織の内部構造を顕微鏡で観察するために、組織を 10 μ m 程度に薄く切り、光を透過させて観察します。この、組織の薄切片を組織切片と呼びます。

[9]固定 実際の組織はほぼ無色透明です。このため様々な方法で組織切片に色を付けて見やすくします。染色には様々な方法がありますが、細胞の内容物(タンパク質やRNA)に、色素や抗体を反応させることで色を付けます。この過程で、切片の表面に露出した細胞の内容物が流れ出てしまわないようにする必要があり、アルコールによる脱水(タンパク質に結合した水を奪うことでタンパク質を凝集させる)や、ホルマリンによる架橋(タンパク質同士の間にはホルマリンを介した共有結合を形成する)によって、細胞内容物を固定します。

[10]RNA シーケンシング(RNA-seq) 次世代シーケンサーを活用して細胞内に存在する各遺伝子の mRNA 量(どの遺伝子の mRNA が多く、どの遺伝子の mRNA が少ないか)を定量する手法。多くの場合、mRNA の 3' 側に付加されるポリ A 配列を標的にしたプライマーを用いて cDNA(mRNA に相補的な配列を持った DNA)を合成し、3'末端に近い mRNA の配列

を検出するアプローチが用いられます。

[11]界面活性剤 一つの分子の中に、親水性の部位(水によく溶ける部位)と疎水的な部位(水に溶けない部位)の両方を持つ物質で、水に溶けない物質を水に溶解させる仲立ちをします。日常で使用する界面活性剤には洗剤があります。

[12]転写制御因子 遺伝子の mRNA への転写を制御するタンパク質

【発表論文】

掲載名: *Life Science Alliance* (Life Science Alliance LLC が発行するオンライン科学雑誌)

タイトル: High-quality single-cell transcriptomics from ovarian histological sections during folliculogenesis (卵胞形成期の卵巣組織切片からの高品質シングルセル・トランスクリプトーム解析)

著者: Hiroki Ikeda, Shintaro Miyao, So Nagaoka, Tomoya Takashima, Sze-Ming Law, Takuya Yamamoto, and Kazuki Kurimoto

掲載日: 2023 年 9 月 18 日

巻: vol. 6 no. 11 e202301929

DOI: 10.26508/lisa.202301929

URL: <https://www.life-science-alliance.org/content/6/11/e202301929>

【本件に関する問い合わせ先】

<研究に関すること>

栗本 一基(くりもと かずき)

奈良県立医科大学 医学部医学科 発生・再生医学講座 教授

TEL:0744-29-8007 FAX:0744-29-8026

E-mail: kurimoto@naramed-u.ac.jp

<報道に関すること>

奈良県立医科大学 研究推進課 産学連携推進係

TEL:0744-22-3051(内線:2552)

Email: sangaku@naramed-u.ac.jp