

博士論文概要

空間的な遺伝子発現解析に向けた
微小組織採取システムの開発と
その応用

Development of micro-tissue picking system
for analysis of spatial gene expressions and
its applications

申請者

依田	卓也
Takuya	YODA

生命医科学専攻 生命分子工学研究

2017年12月

我々ヒトを含めた多細胞生物は細胞の集合体で、細胞、組織、器官、個体といった階層性を保持して生命活動を行っている。特に細胞は生命の基本単位であり、生命活動の根源は正常な細胞機能および細胞間相互作用から生じる。これらが偶発的に、あるいは周囲の環境に応答して不可逆的な誤作動を起こすと、がんに見られるような異常な細胞状態を誘発し、疾患に至る。個体レベルで確認される疾患などの生理現象は、元をたどれば1つの細胞内での起こる動的な生体分子の諸過程に端を発している。したがって、正常・異常問わず生命現象を理解するためには、生命システムの最小単位とも言える細胞を理解する必要がある。そのためには、その特徴の根拠となる複数の因子を特定する必要がある。細胞を特徴づける因子としては、形状、組織内での位置および他の細胞との関係、生物学的機能、生体分子のプロファイルなどが挙げられる。このような因子を捉えるため、これまでに様々な手法・技術が開発され、生命現象の理解へとアプローチされてきた。

過去数年間における急速な技術進歩によって、DNA、RNA、タンパク質などの生体分子の解析が一つの細胞から網羅的に解析できるようになってきている。特に遺伝子発現解析技術は革新的に発展し、これらの手法の精度やスループット性の改善も進んでおり、数万個の細胞の個々の遺伝子発現情報を一度の実験で網羅的に取得できるレベルに達している。こうした状況で、欧米では2016年に Human Cell Atlas というプロジェクトが始動した。このプロジェクトでは、生体組織に含まれる個々の細胞がどのような機能を持ち、どのように分布しているかを解析し、生体組織の遺伝子発現の3Dマップ構築を目標としている。これによって、長年実現しなかった生命の全体像が細胞という基本単位の解像度で解き明かされることに期待が高まっている。これは医学や生物学、組織学、発生学、生理学、病理学など様々な分野において、生体組織に対する新しい理解をもたらし、究極的には細胞の動向が組織さらには個体にどのような影響を与えるかを予測できるようになるかもしれない。

以上のように、複雑で精巧に制御された生命現象を正しく理解するために、細胞の遺伝子発現状況や形状、位置情報のような細胞を特徴付ける因子を多角的に且つ高分解能で取得する要求が高まっている。しかしながら、既存の技術では、様々な試料への応用性やスループット性に課題がある。そこで、本研究では、この課題を解決することを目的として、生体組織における空間的な解析に向けた試料採取システムを構築した。組織上の標的領域を観察しながら採取することで位置情報や周辺環境の情報を保持し、同一の組織切片から迅速に多地点を採取するシステムを構築に取り組んだ。本研究による採取システムと下流の生体分子解析、特に遺伝子発現解析手法と組み合わせることで、空間情報を付加した遺伝子発現プロファイルを大量に取得することが可能となる。

第 1 章では、緒論としてこれまでの遺伝子発現解析技術と現状の性能について述べ、今後需要が高まることが予想される空間的な細胞・組織解析技術の現状と課題を挙げながら、本研究の目的及び本論文の構成について述べた。

第 2 章では、動物組織を標的とした高速で連続的に多地点を採取することができる微小領域採取システムを開発し、その性能を評価した。本研究では、ステンレス性で中空の微小管の先端を鋭利に加工したものを採取ニードルとして用い、試料を切り取ることで採取することができるシンプルな試料採取システムを構築した。本採取システムによる高速採取を実現するために、自動化装置を開発した。本採取装置における 1 回の採取及び回収にかかる時間は 5 秒未満で、従来の採取技術と比較して迅速に採取できる。また、本システムの回収効率を検証したところ 97.1%であった。さらに、連続的な採取の際に、直前に採取した試料由来の持ち越し mRNA は多くとも 1%程度であり、連続採取における前試料由来の汚染がないことを確認した。以上の検証から、本採取技術は従来の採取技術と比較して、飛躍的に迅速に試料採取ができるシステムであると評価した。

第 3 章では、微小領域採取システムを用いて、接着細胞 HCT116 細胞及びマウス脳凍結組織切片を対象に網羅的な遺伝子発現解析を行い、本採取システムの遺伝子発現解析への応用性を検証した。まず、接着細胞 HCT116 細胞を本システムで採取し遺伝子発現解析を行った。従来の消化酵素での細胞調製法で準備した細胞の遺伝子プロファイルと比較したところ、本手法と非常に高い相関性を示した。その中でも手法間において発現変動を示した一部の遺伝子について詳細に解析したところ、細胞接着やフォールディングに関わる遺伝子の変動が見出された。本採取システムは接着性培養細胞を足場ごと接着したまま短時間で採取することができる。そのため、得られた遺伝子発現情報は、採取時の細胞本来の状態を表していると考えられる。一方で、従来法では遠心分離や懸濁等の 30 分程度を要するプロセスが含まれているため、外部環境の急激な変化に対するストレスが遺伝子発現に反映されたと考えられる。したがって、本採取システムは前処理なしで直接的に回収できるので、接着細胞回収において有効な手法であると評価した。

次に、組織切片への本システムの応用に先駆けて、凍結切片作製後の継時的な RNA の分解動向を評価した。脳及び肝臓から凍結組織切片を作製し、室温で 0、15、30、60 分間静置した後、RNA 抽出及び TapeStation による RINe 測定を行った。脳と肝臓共に時間経過に伴う RNA の分解が確認された。分解の割合は臓器によって異なり、肝臓では 15 分経過した時点で大きな RNA 分解が確認された。一方で脳組織では肝臓と比較して分解の進行具合は緩やかであった。本システムは現状では室温での使用を前提としている。そのため、脳組織凍結切片の場合では

15分以内での採取ならば質の高いRNAを取得できると考えられた。肝臓のようなRNA分解が早い試料についてはアルコール固定など、事前処理が必要となることが示され、今後の課題とした。

最後に、本採取システムを用いてマウス脳凍結組織切片を採取し、遺伝子発現解析を行った。微小組織の採取は脳の各領域にまたがるように連続的に採取した。得られた遺伝子発現情報は組織学的領域を明確に示した。また、大脳皮質の層構造のような微細な組織構造であっても、個々の採取位置から各層を示すマーカー遺伝子の発現を確認することができた。さらに、組織学的領域内における微小領域であっても大きく異なる発現挙動を示す遺伝子も検出された。したがって、本採取システムを用いた組織切片に対する位置特異的な遺伝子発現が可能であることが実証された。以上の検証から、本採取システムを用いた遺伝子発現解析は幅広い試料に対して応用可能であることが証明された。

第4章では、微小領域採取システムの病理試料の遺伝子発現解析への応用として、アルツハイマーモデルマウス(3×Tg)の海馬の細胞体領域の解析を行った。まず、対象領域から微小組織を連続的に採取し、それらの遺伝子発現解析を行った。そして、海馬の組織学的領域を示すマーカー遺伝子の発現の有無を確認したところ、領域特異的な遺伝子発現が確認され、組織学的領域を明確に分類することが可能であった。次に野生型マウス(WT)と比較したところ、発現に差異がある遺伝子(発現変動遺伝子(DEG))が、多数検出され、各領域内での変動も確認された。それらの遺伝子の一部は、アルツハイマー疾患(AD)との関連性が報告されているものが含まれていたが、機能未知の遺伝子が数多くDEGsとして検出された。これらの遺伝子はADにおける新規マーカー遺伝子の候補として期待される。

以上のように本採取システムを用いた遺伝子解析によって、アルツハイマーモデルマウス海馬領域における空間的で病的な違いを捉え、新規マーカー遺伝子の候補を見出すことができた。このことから、空間情報と網羅的な遺伝子発現を統合した研究手法は、今後のアルツハイマー研究における有効な手段となり得ることを示した。

第5章では、研究の総括と今後の展望について述べた。本研究では空間的な遺伝子発現解析に向けたシンプルでハイスループットな自動採取システムを構築し、従来法と比較して、迅速に採取できる優位性を示した。さらに、この手法により、遺伝子発現解析だけでなく、DNAやタンパク質解析に関しても同様な空間的解析が可能であることを展望した。また、様々な採取条件に 대응するため、採取ニードルのサイズ変更、解析阻害をおこさない試料固定法、採取微小組織の単細胞解析手法等の開発に関しても展望が述べられた。

早稲田大学 博士（工学） 学位申請 研究業績書

氏名 依田 卓也 印

(2017年 11月 現在)

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
論文	① Site-specific gene expression analysis using an automated tissue micro-dissection punching system. <i>Scientific Reports</i> , 7(1):4325, 2017 Jun., <u>Takuya Yoda</u> , Masahito Hosokawa, Kiyofumi Takahashi, Chikako Sakanashi, Haruko Takeyama and Hideki Kambara
講演	<ol style="list-style-type: none"> 1. <u>依田卓也</u>、細川正人、高橋清文、坂梨千佳子、神原秀記、竹山春子「微小組織採取システムを用いた生体組織の空間的 RNA-seq」第 69 回日本生物工学会大会、東京、2017 年 9 月 2. <u>依田卓也</u>、細川正人、高橋清文、坂梨千佳子、有川浩司、神原秀記、竹山春子「微小組織採取システムを用いたマウス脳組織の位置特異的遺伝子発現解析」第 11 回バイオ関連化学シンポジウム、東京、2017 年 9 月 3. <u>依田卓也</u>、細川正人、高橋清文、坂梨千佳子、神原秀記、竹山春子「微小組織採取システムによる組織空間トランスクリプトミクス解析」第 5 回 NGS 現場の会、仙台、2017 年 5 月 4. <u>Takuya Yoda</u>, Masahito Hosokawa, Kiyofumi Takahashi, Chikako Sakanashi, Haruko Takeyama and Hideki Kambara. Site-specific gene expression analysis with a rapid automated system for capturing many small dissected tissue fragments from a frozen sample. International Conference on Single Cell Research 2016, Tokyo, Japan, November 2016 5. <u>Takuya Yoda</u>, Masahito Hosokawa, Yuji Haraguchi, Katsuhisa Matsuura, Tatsuya Shimizu, Hideki Kambara and Haruko Takeyama. Single-cell transcriptome analysis of beating cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cell. The 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2015), Honolulu, USA, December 2015 6. <u>依田卓也</u>、田邊麻衣子、石野園子、石野良純、竹山春子、西田洋一「DNA-PCNA 間相互作用が DNA ポリメラーゼ反応に与える影響」第 3 回日本生物工学会東日本支部コロキウム、東京、2015 年 3 月 7. <u>依田卓也</u>、田邊麻衣子、石野園子、石野良純、竹山春子、西田洋一「DNA/PCNA 相互作用の DNA 複製/修正における役割」第 4 回 CSJ 化学フェスタ 2014、東京、2014 年 10 月 8. <u>依田卓也</u>、田邊麻衣子、石野園子、石野良純、竹山春子、西田洋一「DNA-PCNA 間相互作用が DNA ポリメラーゼ反応に与える影響」第 3 回日本生物工学会東日本支部コロキウム、東京、2015 年 3 月 9. <u>依田卓也</u>、田邊麻衣子、石野園子、石野良純、竹山春子、西田洋一「DNA/PCNA 相互作用の DNA 複製/修正における役割の違い」第 8 回バイオ関連化学シンポジウム、岡山、2014 年 9 月

早稲田大学 博士（工学） 学位申請 研究業績書

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
	<p>10. 依田卓也、西田洋一、モリテツシ、神原秀記、竹山春子「蛋白質折り畳みにおける蛋白質とタグ間のリンカー長が及ぼす影響」第3回CSJ化学フェスタ2013、東京、2013年10月</p> <p>11. 依田卓也、西田洋一、モリテツシ、神原秀記、竹山春子「蛋白質とタグ間のリンカー長の蛋白質折り畳みに及ぼす影響」第7回バイオ関連化学シンポジウム、愛知、2013年9月</p>
その他 (特許)	<p>1. 神原秀記、竹山春子、細川正人、<u>依田卓也</u>「試料採取システム」PCT/JP2016/079326、2016年10月</p>
その他 (論文)	<p>1. Exonuclease processivity of archaeal replicative DNA polymerase in association with PCNA is expedited by mismatches in DNA. <i>Scientific Reports</i>, 16;7:44582, 2017 Mar., <u>Takuya Yoda</u>, Maiko Tanabe, Toshiyuki Tsuji, Takao Yoda, Sonoko Ishino, Tsuyoshi Shirai, Yoshizumi Ishino, Haruko Takeyama and Hirokazu Nishida</p> <p>2. Self-oriented immobilization of DNA polymerase sequenced by titanium-binding peptide motif, <i>Langmuir</i>, 31 (2), 2015 Jan., Hirokazu Nishida, Taira Kajisa, Yuuya Miyazawa, Yuki Tabuse, <u>Takuya Yoda</u>, Haruko Takeyama, Hideki Kambara and Toshiya Sakata</p>