

# 博士論文審査報告書

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

2018年2月

## 1. 本論文の概要と構成

生体組織は多様な細胞から構成され、その構造と機能は密接に関わっている。複雑な生命現象を正しく理解するには、組織を構成している様々な細胞の位置情報と遺伝子発現情報を統合的に捉える必要がある。一般的に任意の位置から組織切片を採取する技術として Laser capture microdissection (LCM) が用いられているが、1つの採取に数分間かかるために同一の組織切片上から多くの領域を採取するには適さない。本研究では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取得でき、同一の組織切片から迅速に多地点を採取するシステムの構築に取り組んだ。

第1章は緒論として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、本研究の目的について述べた。

第2章では本研究での主な成果である微小採取システムの開発について述べた。ステンレスで中空の微小管の先端を鋭利に加工したニードルを作製し、それにより試料を採取する試料採取システムを構築した。その採取システムを自動化することで、1回の採取にかかる時間は5秒未満となり、従来の採取技術と比較して迅速に採取できる装置を開発した。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 1%で以下であり、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。

第3章では、本採取システムを用いて、接着性培養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った。その結果、両方の試料から網羅的な遺伝子発現情報を取得できた。組織から得られた遺伝子発現情報は明確に組織学的領域を示した。本技術を用いた遺伝子発現解析が幅広い試料に対して応用可能であることを実証した。

第4章では、本採取システムを用いた病理試料解析への応用として、アルツハイマーモデルマウスの海馬領域における空間的な遺伝子発現解析を行った。海馬領域の微小组織から得られた発現情報から組織学的領域を示すマーカー遺伝子の発現が確認され、組織学的領域を明確に分類することができた。さらに、野生型と比較して発現差異がある発現変動遺伝子 (DEG) の検出を行ったところ、346個の DEGs が検出された。DEG には既知のアルツハイマー病関連遺伝子に加えて、機能未知の遺伝子が数多く含まれており、新規マーカー遺伝子の候補として期待された。

第5章では、本研究の総括と今後の展望について述べた。

## 2. 公聴会審査内容

2017年11月3日に行った予備審査会での質疑応答を踏まえて2018年1月10日公聴会を開催した。公聴会では、申請者から博士論文内容の説明が行われ、質疑応答が行われた。その概要を下記に要約する。

- 1) 緒論部分において、これまでの遺伝子発現解析技術の定量性についても議論を追加することと、公聴会の発表スライドに含まれている図で、博士論文に反映できるものは追加すべきである点が指摘され、そのように修正することとした。
- 2) 細胞調製手法による細胞の遺伝子発現プロファイルを比較した実験において、本技術を用いて細胞を採取した場合、採取する場所による差異（細胞密度や細胞周期など）は検出されたか、という質問がなされた。それに対して、本実験では、細胞周期による影響を小さくするために、10細胞程度を回収したものを1つの試料として実験を行った。また、採取の際には、一回の採取で10細胞程度が回収できような均一な細胞密度領域を採取した。そのため、採取ごとの差異は小さいと考える。実際の発現データを確認したところ、同じ採取条件内において、発現変動を示す遺伝子は見当たらなかったと説明された。
- 3) アルツハイマーモデルマウスの空間的な遺伝子発現解析において、野生型とアルツハイマーモデルマウスをそれぞれ2個体ずつ用いているが、データ処理について質問がなされた。今回の解析では、個体を区別せず、採取した微小組織を組織学的領域ごとに分類し比較した。したがって、病態の差異を顕著に示す遺伝子が検出されたと考えているとの説明がなされた。
- 4) 再現性と個体差についてはどのように考えているか、連続的に切片を作製し微小組織を採取しているので、前後の切片で同様な採取箇所における発現量や、個体差について質問がなされた。連続採取での比較では、CA1領域の一部で特異的に発現する遺伝子群は共通して確認できでおり再現性が高いと考える。個体差は、各個体の遺伝子発現情報から、検出遺伝子数と発現分布の相関を比較することで検討した。各個体での発現遺伝子は約11000個であり、共通して発現する遺伝子は約10000個であり、90%以上の遺伝子が共通していた。また、発現分布として、野生型マウスとアルツハイマーモデルマウスの遺伝子発現プロファイルの相関係数を比較した結果、相関係数は0.93程度で高い相関性を示した。個体差は存在するが、病態や採取位置による差異を示す結果だと説明された。
- 5) 今後の展開として、本研究で確認された発現変動遺伝子の生物学的意義についてはどう考えるのかという質問がなされた。領域特徴的な遺伝子群が見出されているので、さらに解析を進めるつもりであることが説明された。
- 6) 実験で用いたアルツハイマーモデルマウスに導入された3つ原因遺伝子のCA1, CA2, CA3における発現分布や発現変動について質問がなされた。それに対してCA1領域のみで発現が確認されていること、発現変動に関してはデータを確認する旨が説明された。
- 7) 本研究で見出されたアルツハイマー病の新規マーカー遺伝子の候補で、機能未知の遺伝子に関して、アルツハイマー病への関連を調べるためにはどのようなアプローチが考えら

れるかという質問がなされた。配列情報からの機能予測やアルツハイマー病関連因子との相互作用ドメインの探索、ノックアウトマウスによる解析等も考えられるとの回答がなされた。それに対して、既知のヒトでの知見と照合し、比較することも可能なのではないか、というコメントもなされた。

- 8) ニードルの内径はどれほどまで小さくできるか、そのニードルでの同様な解析が可能であるかどうかの質問がなされた。それに対して、現在、50  $\mu\text{m}$  のニードルを作製し実証実験を行っていること、RNA-seq の検証を行っていることが説明された。
- 9) 本技術を用いて、特定の培養細胞を回収し、クローニング等に応用は可能かという質問がなされた。それに対して、可能であると回答された。本論文内で示したように、採取した細胞はその後培養可能で増殖を確認している。特定の 1 細胞のみを回収する場合には、細胞の密度を低くするか、内径の小さい採取ニードルを応用することで可能であることがさらに説明された。

以上の研究内容の報告と質疑応答を通じ、申請者が本研究の意義と結果、また本研究にかかわる関連事項に対して十分な学識を有していると主査および副査が判断した。本研究で開発された技術は、生体を網羅的に解析するサイエンスの展開に大きく寄与するものであり、今後幅広い利活用も期待できる。また、本技術を用いて得られた分子生物学的知見から新規の遺伝子群が見出されており、今後の研究展開が期待できるものである。以上のことから、主査および副査は、指摘に対する論文修正が適切に行われていることも確認し、本論文が博士（工学）の学位論文として相応しいと判断した。

2018 年 2 月

審査員

主査 竹山 春子

早稲田大学教授 博士（工学） 東京農工大学 \_\_\_\_\_

副査 大島 登志男

早稲田大学教授 医学博士 山梨医科大学 \_\_\_\_\_

仙波 憲太郎

早稲田大学教授 理学博士 東京大学 \_\_\_\_\_