

令和 5 年 5 月 8 日現在

機関番号：24601

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2018～2022

課題番号：18H05553

研究課題名(和文)組織学的情報とリンクした単一細胞遺伝子発現プロファイル動態の解明

研究課題名(英文)Development of histology-associated high-quality single-cell RNA-sequencing method in ovarian folliculogenesis

研究代表者

栗本 一基(Kurimoto, Kazuki)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：20415152

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 99,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では凍結組織切片から採取した単一細胞を強弱2種類の界面活性剤で溶解し、新鮮な細胞と同等の感度と定量性でRNA-seqする手法 DraqL (direct RNA recovery and quenching for LCM)を開発した。下流のcDNA増幅法は独自手法(SC3-seq)に加え一般的な手法(Smart-seq2)や市販キット(Takara SMART-seq v4)も適合した。この手法はプロテアーゼ処理と組み合わせてホルマリンで強く固定した切片からも効率よく解析できた。これを用いて卵巣内の卵胞形成過程における組織学的情報にリンクしたトランスクリプトームの多様性を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

組織切片から採取した単一の細胞の遺伝子発現を精密におこなうことができる技術を開発した。これにより高精度な組織学的な解析で細胞の形態的・位置的情報を得た後に、正確な遺伝発現情報を得ることができるようになった。広く行われる組織切片全体にわたる空間トランスクリプトーム解析技術と比較して、多数の切片に渡る形態的に同定可能な細胞に対して高感度な解析が可能であるという相補的な特性を持つ。この手法を用いてマウス卵巣中の卵母細胞のサイズと遺伝子発現の間の関係の多様性を見出した。これは卵母細胞の品質管理機構に関する新しいアプローチを提供すると期待される。

研究成果の概要(英文)：We developed DraqL (direct RNA recovery and quenching for LCM), an experimental approach for efficient lysis of single cells isolated by LCM from alcohol- and formalin-fixed sections without RNA purification. Single-cell RNA-seq combined with DraqL allowed transcriptomic profiling from alcohol-fixed sections with efficiency comparable to freshly dissociated cells, together with exon-exon junction profiling. Combination of DraqL and protease treatment enabled robust analysis from strongly fixed-formalin tissue sections. Applying this method to mouse ovarian sections, we revealed a transcriptomic continuum of growing oocytes quantitatively associated with oocyte size, and detected oocyte-specific splice isoforms. We also identified genes that were differentially expressed in granulosa cells in association with the histological affiliations of granulosa cells to the oocytes, suggesting distinct epigenetic regulations and cell-cycle activities governing the germ-soma relationship.

研究分野：発生生物学

キーワード：シングルセルトランスクリプトーム 組織切片 RNA-seq 空間トランスクリプトーム 生殖細胞 配偶子形成

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は世界に先駆けて定量的な単一細胞遺伝子発現解析技術を開発し、マウス始原生殖細胞形成過程の発現動態を詳細に解明した。その後、セルソーターやマイクロ流路等を用いて多数の単一細胞を一挙に解析する手法や、核と細胞質を分離して遺伝子発現と DNA メチル化を同時に解析する手法等が開発され、単一細胞解析技術は大きく進展した。しかしながら、当時から現在もなお、単一細胞解析技術の主流は、新鮮な組織から細胞を生きたまま単離してアトランダムに解析する必要があるため、組織学的情報の喪失を免れなかった。また、組織切片上での mRNA 検出に特化した手法などにより、単一細胞レベルの解像度を持つ spatial transcriptome 解析も発展しているが、全ゲノムにわたる定量的な遺伝子発現解析は困難であり、生殖細胞のインテグリティの理解に向けた解析には不十分であった。一方、凍結組織切片から、レーザーマイクロダイセクションシステム (LCM) を用いて細胞を採取するアプローチがあり、単一細胞レベルでの遺伝子発現解析やゲノム解析等、さまざまな解析に応用可能である。しかしながら、組織の固定や染色など多数の工程を経るため、核酸抽出効率や RNA の安定性等について問題があり、定量的な遺伝子発現解析には至っていなかった。

2. 研究の目的

本研究計画の目的は、(1) 組織切片から採取された単一細胞に対する、定量的トランスクリプトーム解析技術を開発し、(2) 配偶子産生システムにおける、組織学的情報とリンクした遺伝子発現情報基盤を構築することである。すなわち、研究代表者の独自技術を発展させて上記の技術的限界を越え、組織切片から LCM を用いて採取した細胞に対する定量的単一細胞トランスクリプトーム解析法を確立する。その技術をマウス配偶子産生システムに応用し、遺伝子発現情報を組織学的情報にリンクして解析することである。

3. 研究の方法

本研究では、凍結組織切片からの定量性の高い単一細胞遺伝子発現解析技術の開発を目的としていた。一方、実際の組織中の細胞は、組織中の位置や他の細胞との相互作用、細胞が受け取る力学的作用や液性因子、酸素濃度などにより同一の細胞種であっても遺伝子発現がばらつくと予想されるため、方法論の定量性を評価するには不相当であると考えられた。本研究では、このような困難を回避するため、技術開発の段階では生体の組織を使わず、均一性の高い培養細胞を標準試料として、切片からの細胞の切り出し等の各工程の条件検討を行うことにした (図 1)。「2i+LIF」条件下で培養された ES 細胞集団は、均一性の高い遺伝子発現を示すことが良く知られており、数個の細胞を観察すれば概ね均一な発現データの集合となり、技術開発の出発試料としてもっとも適当である。

研究代表者は、平成 30 年 9 月に、前所属の京都大学医学研究科 (機能微細形態学 斎藤通紀教授) から転出し、奈良県立大学医学部医学科 (発生・再生学講座) に講座主任教授として着任し、所属教員として後述する研究協力者を新たに迎え、講座を新設した。本研究の遂行に必須の機器であるレーザーマイクロダイセクションシステムの選定と導入 (リース契約による) は、当初の予定通り平成 30 年度中に完了した。同年度中に

2i+LIF 条件下でのマウス ES 細胞の培養を再現し、遺伝子発現の均一性を評価した。

4. 研究成果

培養細胞を用いて凍結セルブロックを作出し、マイクロトームで切片を作成した。切片を固定・染色し、レーザーマイクロダイセクションシステム (LCM) をもちいて細単一細胞を切り出して、定量的単一細胞遺伝子発現解析法の検討を行った。さまざまな条件を試行錯誤した結果、強弱二種類の界面活性剤の逐次的適用によって、乾燥・固定・染色を行った凍結切片から切り出した単一細胞の RNA 溶出効率が劇的に改善し、生の細胞 (凍結切片にせず、生きたまま単離・回収した細胞) を用いた場合に近い効率での cDNA 増幅が可能であることが示唆された (図 1)。

この実験条件をゲノムワイドに評価して、新鮮な単一細胞と同等の RNA シーケンス (RNA-seq) を凍結セルブロックから切り出した細胞に対して行うことができることを確認した (図 2)。3'側の配列を数えて発現量を定量するだけでなくエキソン-エキソン結合部位の定量も可能であることを確かめた。この強弱 2 種類の界面活性剤を逐次使用する細胞溶解法を DRaqL (direct RNA recovery and quenching for LCM) と呼ぶことにした。下流の cDNA 増幅法は研究代表者が開発した手法 (SC-3seq; Kurimoto, NAR, 2006; Nakamura, NAR, 2015) を使用した。他の cDNA 増幅法 (Takara SMART-seq v4 kit; Smart-seq2) についても、変性的界面活性剤の濃度や逆転写酵素を適用できる最適条件を確定した。

さらに、切片をホルマリンで強固に固定したサンプル (1%, 24 時間) に対して、プロテアーゼ処理と組み合わせることによって、ゲノムワイドに高い感度、再現性、定量性を発揮した (DRaqL-Protease)。これにより、当初の予定よりも大幅に拡大された条件下で作成した切片から、精密な単一細胞遺伝子発現解析が可能であることを明かにした。

DRaqL-SC3-seq をマウス卵巣に適用することで、新鮮な卵巣から採取した卵母細胞や顆粒層細胞に対する既報の解析データと、同等の感度を持つ解析が、実際の切片においても可能であることを確かめた (図 3)。また、切片から採取した細胞からエキソンジャンクション解析を行い、卵母細胞特異的なスプライスアイソフォームを検出し、有用性を確かめた。さらに同一の卵母細胞の連続切片を解析することで、解析の再現性の程度を定量した。

DRaqL-SC3seq をマウス卵巣中の卵胞形成過程に適用して卵母細胞の直径に対応するトランスクリプトームを解析した。直径とトランスクリプトームに線形な関係があることを見出し、その関係を利用して、卵母細胞の直径からトランスクリプトーム全体を予測する統計モデルを作出した。このモデルは実際のデータによく合致した。これらの解析によって組織学的な細胞形態情報とトランスクリプトームの密接な関係が明らかになった。統計モデルと実際のデータを詳細に比較すると、卵母細胞のサイズとトランスクリプトームの間の平均的な関係から逸脱した細胞が同定された。これらの細胞は、実際のサイズよりも 20 μ m 以上小さな卵母細胞にトランスクリプトームがよく似ており、遺伝子発現の「成熟が遅れた」細胞であることが示唆された。これは、dominant follicle の選別における最初の変化をとらえている可能性がある。

さらに、卵胞内の組織学的情報に紐づいた顆粒層細胞のトランスクリプトーム解析から、卵母細胞に隣接した細胞と隣接しない細胞を区別することが可能であることを明か

にし、発現レベルの異なる遺伝子を同定した (図 4) (Ikeda, BioRxiv, 2022; 査読中)。さらに、上述の、遺伝子発現の「成熟が遅れた」卵母細胞と「通常の」卵母細胞のそれぞれに隣接する顆粒層細胞の遺伝子発現を比較し、予備的ながら、卵母細胞のサイズ-トランスクリプトーム関係の差異に関する発現変化を同定した。これらの結果から、卵母成熟過程における組織学的な細胞形態や細胞位置の情報とトランスクリプトームの関係が示唆された。

図 1

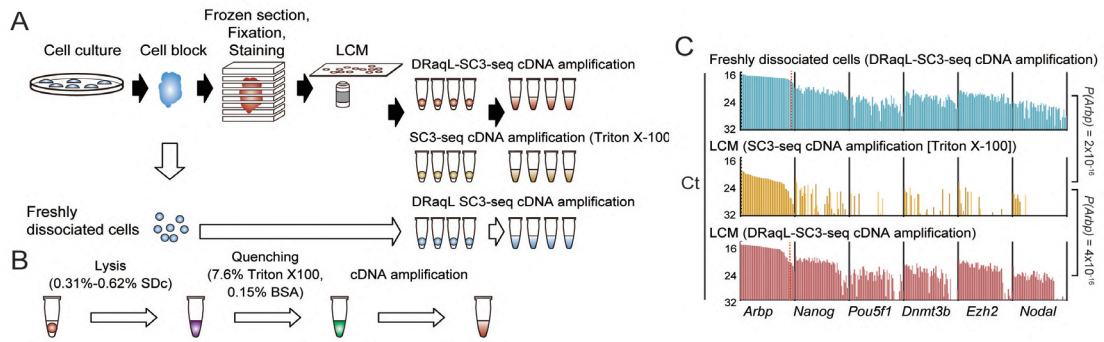


図 2

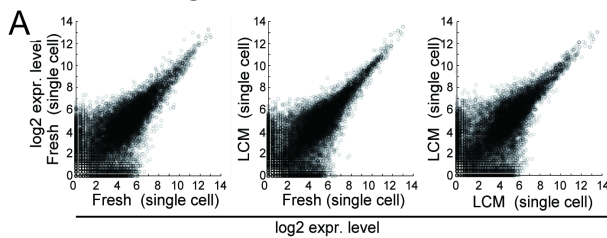


図 3

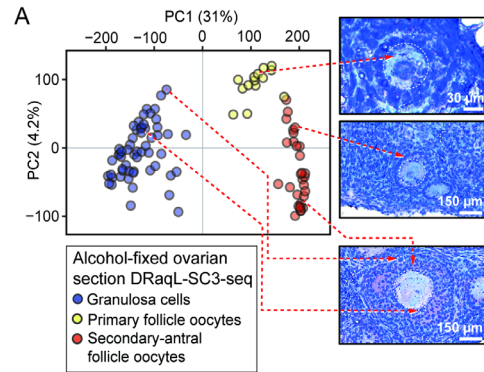
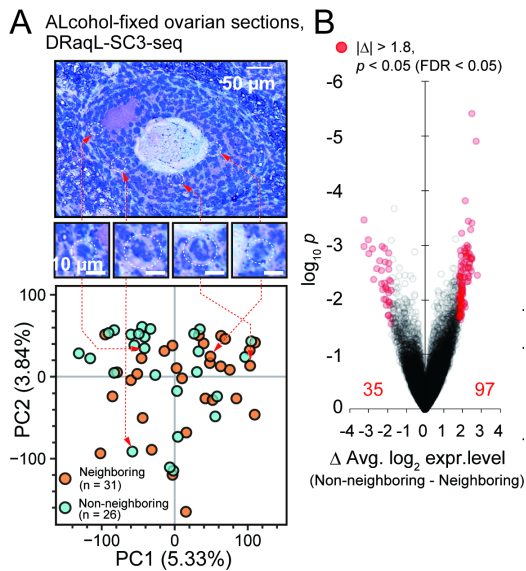


図 4



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Oikawa, M., Kobayashi, H., Sanbo, M., Mizuno, N., Iwatsuki, K., Takashima, T., Yamauchi, K., Yoshida, F., Yamamoto, T., Shinohara, T., Nakauchi, H., Kurimoto, K., Hirabayashi, M., Kobayashi, T.	4. 巻 376
2. 論文標題 Functional primordial germ cell-like cells from pluripotent stem cells in rats.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 176-179
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/science.abl4412	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Generoso, S.F., Neguembor, M.V., Hershberg, E.A., Sadreyev, R.I., Kurimoto, K., Yabuta, Y., Ricci, R., Audergon, P., Bauer, M., Saitou, M., Hochedlinger, K., Beliveau, B.J., Cosma, M.P., Lee, J.T., Payer, B.	4. 巻 120
2. 論文標題 10.1073/pnas.2213810120	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci U S A	6. 最初と最後の頁 e2213810120
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2213810120	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Richard Albert, J., Kobayashi, T., Inoue, A., Monteagudo-Sanchez, A., Kumamoto, S., Takashima, T., Miura, A., Oikawa, M., Miura, F., Takada, S., Hirabayashi, M., Korthauer, K., Kurimoto, K., Greenberg, M.V.C., Lorincz, M., Kobayashi, H.,	4. 巻 24
2. 論文標題 Conservation and divergence of canonical and non-canonical imprinting in murids	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Genome Biol	6. 最初と最後の頁 48
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13059-023-02869-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Hiroki Ikeda, Shintaro Miyao, So Nagaoka, Takuya Yamamoto, Kazuki Kurimoto	4. 巻 -
2. 論文標題 Histology-associated transcriptomic heterogeneity in ovarian folliculogenesis revealed by quantitative single-cell RNA-sequencing for tissue sections with DRAqL	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2022.12.14.520513	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ohta Hiroshi, Yabuta Yukihiro, Kurimoto Kazuki, Nakamura Tomonori, Murase Yusuke, Yamamoto Takuya, Saitou Mitinori	4. 巻 104
2. 論文標題 Cyclosporin A and FGF signaling support the proliferation/survival of mouse primordial germ cell-like cells in vitro†	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biology of Reproduction	6. 最初と最後の頁 344 ~ 360
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/biolre/iaaa195	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nagaoka So I., Saitou Mitinori, Kurimoto Kazuki	4. 巻 18
2. 論文標題 Reconstituting oogenesis in vitro: Recent progress and future prospects	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research	6. 最初と最後の頁 145 ~ 151
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.coemr.2021.03.022	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kurimoto Kazuki, Ikeda Hiroki, Kobayashi Hisato	4. 巻 21
2. 論文標題 Epigenome reprogramming in the male and female germ line	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Epigenetics and Reproductive Health	6. 最初と最後の頁 3 ~ 25
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/B978-0-12-819753-0.00001-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 栗本一基	4. 巻 52
2. 論文標題 始原生殖細胞発生過程におけるDNAメチル化リプログラミング	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 月刊 細胞	6. 最初と最後の頁 508-511
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 長岡 創、栗本一基、斎藤通紀	4. 巻 38
2. 論文標題 マウス卵母細胞運命決定機構の解明	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 1893-1896
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kurimoto Kazuki、Saitou Mitinori	4. 巻 135
2. 論文標題 Germ cell reprogramming	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Current Topics in Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 91 ~ 125
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/bs.ctdb.2019.04.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kobayashi Toshihiro、Kobayashi Hisato、Goto Teppei、Takashima Tomoya、Oikawa Mami、Ikeda Hiroki、Terada Reiko、Yoshida Fumika、Sanbo Makoto、Nakauchi Hiromitsu、Kurimoto Kazuki、Hirabayashi Masumi	4. 巻 147
2. 論文標題 Germline development in rat revealed by visualization and deletion of Prdm14	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 183798-183798
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dev.183798	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nagaoka So I.、Nakaki Fumio、Miyuchi Hidetaka、Nosaka Yoshiaki、Ohta Hiroshi、Yabuta Yukihiro、Kurimoto Kazuki、Hayashi Katsuhiko、Nakamura Tomonori、Yamamoto Takuya、Saitou Mitinori	4. 巻 367
2. 論文標題 ZGLP1 is a determinant for the oogenic fate in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 4115-4115
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/science.aaw4115	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishimura, T., Oyama, T., Hu, H.T., Fujioka, T., et al., Kurimoto, K., Hosokawa, Y., Aoki, J., Takai, Y., Arita, M., Suetsugu, S	4. 巻 56
2. 論文標題 Filopodium-derived vesicles produced by MIM enhance the migration of recipient cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Dev Cell	6. 最初と最後の頁 842-859 e848
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.devcel.2021.02.029	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 栗本一基
2. 発表標題 Quantitative single-cell RNA-sequencing for tissue sections with DRAqL; an efficient RNA recovery and cDNA amplification method for laser capture microdissection
3. 学会等名 The International Symposium "Totipotency and Germ Cell Development (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 栗本一基
2. 発表標題 Single-cell RNA-sequencing for frozen sections with DRAqL; an efficient RNA recovery and cDNA amplification method for laser capture
3. 学会等名 第127回日本解剖学会年会 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 栗本一基
2. 発表標題 始原生殖細胞の発生とエピゲノムリプログラミング
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会・第98回日本生理学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 栗本一基
2. 発表標題 組織学にリンクした定量的な単一細胞遺伝子発現解析法の開発に向けて
3. 学会等名 日本分子生物学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 栗本一基
2. 発表標題 単一細胞遺伝子発現解析の展望
3. 学会等名 「生体5次元情報」を解読する医工計測技術を創出する「知・もの・人」づくり計画キックオフシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 栗本一基	4. 発行年 2022年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 13
3. 書名 疾患原因遺伝子・タンパク質の解析技術と創薬/診断技術への応用	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 細胞の溶解方法	発明者 栗本一基、池田宏輝、宮尾晋太郎	権利者 奈良県立医科大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-200053	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	高島 友弥 (Takashima Tomoya)	奈良県立医科大学・医学部医学科・特別研究員 (24601)	
研究協力者	宮尾 晋太郎 (Miyao Shintaro)		
研究協力者	山本 拓也 (Yamamoto Takuya)		
研究協力者	羅 斯明 (Law Sze-Ming)		
連携研究者	池田 宏輝 (Ikeda Hiroki) (70819911)	奈良県立医科大学・医学部医学科・助教 (24601)	
連携研究者	小林 久人 (Kobayashi Hisato) (70632727)	奈良県立医科大学・医学部医学科・准教授 (24601)	
連携研究者	長岡 創 (Nagaoka So) (20870158)	奈良県立医科大学・医学部医学科・助教 (24601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------