

令和 6 年 6 月 23 日現在

機関番号：35302

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K12724

研究課題名（和文）白血球シングルセル・トランスクリプトーム解析による高精度な疼痛評価系の確立

研究課題名（英文）Establishment of a highly accurate pain assessment system using leukocyte single cell transcriptome analysis

研究代表者

大和田 一雄（Ohwada, Kazuo）

岡山理科大学・獣医学部・特担教授

研究者番号：60101010

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：マウス血液からの白血球分離は、血小板を取り除くための密度勾配分離試薬と溶血試薬を用いる方法によって、血小板がほとんど除去された白血球懸濁液を得ることができた。この条件で調製した白血球懸濁液から良質なシングルセルを得ることができたが、細胞の標識に用いたラベルが試験群間の相互の細胞に結合したことで、白血球を識別して分けることができず、解析することができなかった。単一細胞分離装置の1レーンにサンプルをまとめて解析するには、さらなる検討が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マウスの血液は他の動物種と比較して、赤血球と血小板の数が多いため、このことは血液サンプルを用いたシングルセル・トランスクリプトーム解析やmiRNAシーケンス解析において、白血球をターゲットとした場合に評価を困難なものとする。本研究成果は、全血から赤血球と血小板を取り除くことができ、白血球トランスクリプトーム解析の高精度化に貢献するものである。また本研究の分離法により得られた白血球サンプルは、シングルセル・トランスクリプトーム解析において、オリゴが結合した脂質で標識された細胞を識別して分類するセルマルチプレックスには不適であることを見出した。

研究成果の概要（英文）：Leukocyte separation from mouse blood was accomplished by a method using a density gradient separation reagent to remove platelets and a hemolysis reagent to obtain a leukocyte suspension from which platelets were mostly removed. Although good quality single cells could be obtained from leukocyte suspensions prepared under these conditions, the labels used to label the cells bound to each other's cells between test groups, making it impossible to identify and separate the leukocytes for analysis. Further study is needed to analyze the samples together in one lane of the single cell separation device.

研究分野：実験動物学

キーワード：シングルセル 疼痛

## 1. 研究開始当初の背景

従来の臓器や組織といった細胞集団を対象としたトランスクリプトーム解析では、個々の細胞の情報ではなく、それらが平均化されたデータを抽出している。個々の細胞の性質を見極めるためには、複数種類の細胞からなる細胞集団を個々の種類の細胞に振り分けて解析するシングルセル解析が必須である。この解析を実現するために、細胞集団を個々の細胞に振り分けるためのさまざまな技術や装置が開発・実用化されており、この技術や装置を用いて、免疫学、腫瘍学、遺伝性疾患、微生物学・病原体検出などのさまざまな分野においてシングルセル解析の研究が国際的に行われている。しかしながらこれらは、細胞実験や疾患モデル動物などを用いたヒトの疾病にかかわる研究が主であり、ヒトを含めた正常な健康状態の動物を用いた食品あるいは食品成分の機能性の評価についての報告はされていない。また、ヒトや動物は、ストレス応答を含めて外界からの刺激に応答して生体内では変化が生じる。拘束ストレス負荷のような強い刺激に対する応答を評価することは容易であるが、食品成分などによる弱い刺激に対する小さな変化を高精度に捉えて評価することは困難である。したがって、食品がヒトに及ぼす効果を評価するうえで、シングルセル遺伝子発現解析によるトランスクリプトーム解析の高精度化は必要であるため、本研究の実施に至った。

## 2. 研究の目的

食品の有効性や機能性についてトランスクリプトーム解析によって評価をする場合、動物実験やヒト介入試験を行うことになる。ヒト介入試験の場合、健康乃至半健康(未病)なヒトから臓器や組織を採取することは非常に困難である一方で、血液を採取することは比較的容易である。したがって、食品がヒトに及ぼす効果を評価する場合は、血液を材料としてトランスクリプトーム解析を行う。しかしながら、血液は赤血球や白血球など複数種類の細胞で構成される細胞集団であり、血液トランスクリプトーム解析では平均化されたデータを抽出することになる。それ故に、食品に応答する個々の細胞の小さな変化を捉えるためには、細胞のシングルセル化がトランスクリプトーム解析の高精度化に向けて必要となる。

本研究では、生体防御にかかわる免疫担当細胞である白血球に着目し、ヒト血液トランスクリプトーム解析による高精度な評価系の確立を最終的な目的として、下記の2点に沿って遂行する。すなわち、(1)白血球懸濁液への血小板の混入は白血球のシングルセル化に支障があるため、マウス血液から白血球を分離するための条件検討およびシングルセル化の検討を行い、(2)シングルセル・トランスクリプトーム解析と普遍的な未病マーカーの探索を行い、食品成分がマウスに及ぼす効果を評価することである。

## 3. 研究の方法

(1)マウスから採血を行って直ちにリン酸緩衝生理食塩水と混和し、この血液を用いて赤血球凝集試薬、密度勾配分離試薬、溶血試薬を用いて白血球分離の検討を行った。

(2)弱い刺激として、異なる条件で飼育(群飼育と個別飼育)されたマウスの血液から白血球を最適化した条件で分離し、シングルセル解析のサンプルとした。また、われわれが日常的に摂取している食品非栄養成分であるポリフェノール類がマウスに及ぼす効果を評価するために、AIN-93G粉末飼料を対照食として、ポリフェノール添加飼料を2週間給餌した。この飼料には、一般的な穀物飼料に含まれる程度の量の食品ポリフェノールを添加した。各試験の最終日に採血を行い、最適化した白血球分離条件にて白血球懸濁液を調製した。得られた白血球のシングルセル化には、微小液滴技術の原理を利用して細胞のシングルセル化を行う単一細胞分離装置を利用した。また白血球は群ごとにオリゴが結合した脂質(セルマルチプレックスオリゴ、CMO)で標識して識別できるようにし、セルマルチプレックスを行った。

#### 4. 研究成果

(1) マウス血液からの白血球分離は、溶血試薬、密度勾配分離試薬、赤血球凝集試薬の順に良好な結果が得られた。しかしながら、どの分離においても血小板を取り除くことはできなかった。次いで、血小板を取り除くための密度勾配分離試薬をマウス全血に用いたところ、血小板の層は形成されず上清に分散していたが、これを除去したのちに溶血試薬を用いて白血球分離を試みたところ、血小板がほとんど除去された白血球懸濁液を得ることができた。

(2) 調製した白血球懸濁液から良質なシングルセルを得ることができ、そこから得られた相補的 DNA の品質も良好であった。このサンプルを用いて次世代シーケンス解析を行ったところ、シングルセル化のためにサンプルをプールした際に、細胞の標識に用いた CMO が相互の細胞に結合したため、対照群由来の白血球と試験群由来の白血球を識別して分けることができず、解析を断念した。したがって、未病のマーカ―となりうる遺伝子発現の変化を探索することができなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shimada Kousuke, Nohara Masakatsu, Shinozaki Fumika, Tatsuda Midori, Watanabe Takayuki, Kamei Asuka, Abe Keiko	4. 巻 17
2. 論文標題 The effects of compression load to the trunk on lipid metabolism in an inactive phase	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0270705
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0270705	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 Shimada Kousuke, Nohara Masakatsu, Yasuoka Akihito, Kamei Asuka, Shinozaki Fumika, Kondo Kaori, Inoue Ryo, Kondo Takashi, Abe Keiko	4. 巻 16
2. 論文標題 Mouse Model of Weak Depression Exhibiting Suppressed cAMP Signaling in the Amygdala, Lower Lipid Catabolism in Liver, and Correlated Gut Microbiota	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Behavioral Neuroscience	6. 最初と最後の頁 841450
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnbeh.2022.841450	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Ryohei Yoshitakea, Shizuki Kanaoa, Tatsuki Kawamotoa, Jiro Miyamaea, Kosuke Kobayashia, Noritaka Maetaa, Masakatsu Noharaa, Yuka Iwataa, Haruyo Ogawaa, Kohei Saekia
2. 発表標題 Multi-resolution molecular landscape of canine mammary gland tumors reveals cellular pathogenesis
3. 学会等名 World Veterinary Cancer Congress（国際学会）
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

野原 正勝. 特集 未病社会とKISTECの機能性食品研究への挑戦(2) 血液を用いた未病評価システムの開発. バイオサイエンスとインダストリー. 2022. 80:275-276.

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
研究分担者	野原 正勝  (Nohara Masakatsu)  (70649996)	岡山理科大学・獣医学部・助教    (35302)	

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
---------	---------