

令和 5 年 6 月 10 日現在

機関番号：12614

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15603

研究課題名（和文）マイクロ流路によるシングルセルmRNA解析技術を用いたクルマエビ造血幹細胞の探索

研究課題名（英文）Exploration of shrimp hematopoietic stem cells using single-cell mRNA analysis technology with microfluidic devices

研究代表者

小祝 敬一郎 (Koiwai, Keiichiro)

東京海洋大学・学術研究院・助教

研究者番号：10867617

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：クルマエビの血球細胞をシングルセル解析した結果、血球細胞は複数の細胞集団に分類され、各集団に特異的なマーカー遺伝子が得られた。免疫関連遺伝子の転写量が細胞集団ごとに異なっていたため、集団ごとに免疫機能が異なることが推定された。ホワイトスポットウイルス感染は、特定細胞集団の割合を増減させ、特に抗菌ペプチドを発現する細胞集団の割合を減少させていた。また、ウイルス感染の有無にかかわらずクルマエビの血球細胞を客観的に分類可能とするマーカー遺伝子を複数同定し、そのmRNA発現パターンを観察することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果により、クルマエビのようなモデル生物と比較して細胞の分類に課題がある養殖対象魚介類の細胞でも、網羅的シングルセルmRNA解析を実施することで、体を構成する細胞の図鑑（細胞アトラス）を構築可能であることを明らかにしました。

また、ウイルス感染時に割合が減少する血球細胞集団が判明したため、この集団を増やす、もしくは、減らさないようにする飼育法や飼料添加物を開発することで、クルマエビ類養殖で問題となっているウイルス病の克服に繋がると期待されます。

研究成果の概要（英文）：The result of single-cell analysis of kuruma shrimp hemocytes showed that hemocytes were classified into multiple cell groups, and marker genes specific to each group were obtained. Since the transcription amount of immune-related genes differed depending on the cell group, it was estimated that the immune function differed for each group. White spot syndrome virus infection increased or decreased the proportion of specific cell groups, particularly decreasing the proportion of cell groups expressing antibacterial peptides. In addition, multiple marker genes that can objectively classify kuruma shrimp hemocytes regardless of virus infection status were identified, and their mRNA expression patterns were successfully observed.

研究分野：魚介類免疫学

キーワード：シングルセル解析 Drop-seq 非モデル生物クルマエビ血球細胞ウイルス感染 WSSV

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

培養細胞は、これまで遺伝子クローニングが中心だった甲殻類の研究を *in vitro* での細胞レベルの研究まで発展させるうえで欠かせない。これまでも多くの研究者によりクルマエビ類細胞の初代培養の試みがなされてきたが、継代培養に成功した例がない。細胞の培養条件を明らかにするには、目的とする細胞がどのような分化機構を辿るかを理解することが重要である。

クルマエビなどの海産無脊椎動物は世界中で広く養殖され産業的にも重要だが、分子生物学的な理解はヒトに比べて遅れている。節足動物のモデル生物であるショウジョウバエでは、様々な株化細胞が構築され機能研究などが進んでいるが、陸上生物と水生生物は全く異なる環境に生息するため、その分子メカニズムも異なることが容易に想像できる。

クルマエビ細胞培養系が存在すれば、これまで遺伝子クローニングが中心だった甲殻類の研究を *in vitro* での細胞レベルの研究まで飛躍的に発展させることが可能となる。しかしながら、クルマエビ類では株化細胞が存在しないうえ、細胞マーカー分子の報告も少なく細胞分化機構の解析に課題がある。クルマエビ類の培養細胞の研究は国内外多くの研究グループが取り組んでいるが、組織の初代培養の報告にとどまっており継代可能な細胞株の報告に至っていない。

本研究では、末梢血液中および造血組織中に存在する血球細胞それぞれを、1細胞レベルで集団解析し細胞ごとの分化度を調べることで、どのように造血組織の造血幹細胞が末梢血液中の血球細胞へ分化するかを時空間的に理解することを目的とする。シングルセル解析を行うことで高い解像度で細胞のサブポピュレーションを分類し、その中から目的の幹細胞の同定が可能になる。

2. 研究の目的

細胞の培養条件を明らかにするには、目的とする細胞がどのような分化機構を辿るかを理解することが重要である。そこで、本研究ではクルマエビの血球細胞を研究材料として、造血組織中の造血幹細胞が末梢血液中の血球細胞に分化する過程を1細胞レベルで明らかにすることを目的とする。そこで、1細胞と個別バーコード配列を持ったビーズを微小な液滴内で反応させ解析する Drop-seq を用いて、造血組織および末梢血液中の細胞の遺伝子発現パターンを1細胞レベルで解析・分類しその分化度を調べることで、造血組織中の造血幹細胞を同定し、どのように末梢血液中の血球細胞へ分化するか解析する。Drop-seq 法はこれまでのバルクでの研究とは異なり、組織中の細胞を1細胞レベルにデジタル化した解析が可能である。しかし、市販の機器では条件が定まっておらずパラメーター検討ができないため、非モデル生物であるクルマエビへの適用には試薬の浸透圧や流路の設計において問題が生じる。そこで、本研究では Drop-seq 法に必要な流路システムを自ら設計・開発することで流路幅や流路のデザイン、送液手法などのパラメーターをクルマエビ血球細胞に最適化する。1細胞解析手法は、組織中に血球細胞が浸潤する無脊椎動物において有効であり、マーカーが少なく組織からの血球細胞の単離が困難であるクルマエビで行うことに意義がある。

3. 研究の方法

本研究では、マイクロ流路中をキャリア液として流れるオイルの中に水性の微小液滴を形成させ、それらを単一細胞捕捉および反応容器として利用する Drop-seq 法を用いた。本手法は、

10 万個以上のシングルセルを液滴内に捕捉し、個別バーコード配列を持ったビーズと mRNA を結合させることで、1 細胞由来の遺伝子発現解析が可能となる。そこで、微小液滴を形成するためのマイクロ流路を作製した。マイクロ流路のデザインは既存のものを改良し、細胞およびビーズを効率良く封入可能なデザインを CAD ソフトウェアにて設計した。設計した流路は、フォトリソグラフィ技術を用いて鋳型を製作し、シリコンの一種である PDMS(Polydimethylsiloxane) にて鋳型からの転写を行い、ガラスと張り合わせることで流路を作製した。自作の Drop-seq の妥当性を評価するため、ヒト由来培養細胞 HEK293 およびマウス由来培養細胞 NIH3T3 を用いて Drop-seq 解析を行った。得られたデータを解析し既報の論文データと比較することで、申請者が行う Drop-seq が既報の論文と同等に解析可能であるかその妥当性を検討した。

つぎに、健常個体を用いたクルマエビ末梢血球細胞のシングルセル mRNA シークエンシングを実施した。末梢血液中で血球細胞は分散状態で存在しているため、サンプリングした血球細胞をマイクロ流路にて液滴に封入し Drop-seq を行った。モデル生物でないクルマエビ由来の遺伝子発現量は個体差が大きいことが予測されたため、3 匹の同一サイズのクルマエビ由来で同様の Drop-seq を実施した。

さらに、ウイルス感染が固体中の血球細胞数を減少させることが明らかとなっていたため、造血機能との関連を調べるため、ウイルス感染個体の末梢血を材料としたシングルセル mRNA シークエンシングを実施した。

造血組織の解析を達成するために、クルマエビ造血組織の単細胞分散を酵素処理によって実施した。既報の、トリプシンベースの酵素による処理のほか、メタノールベースのものや物理的破碎による分散処理を実施した。また、同様の分散方法が他の組織にも適用可能かを調べるために、エラや肝臓でも単細胞分散を試した。

4 . 研究成果

Drop-seq により健常個体のクルマエビの血球細胞を解析した結果、計 2,566 個のクルマエビ血球細胞が可能であった。各血球細胞からは中央値 1,193 種類の遺伝子が検出され、各細胞から中央値 2,427 の mRNA 転写産物数を解析することができた。血球細胞は 6 つの細胞集団に分類され、各集団に特異的なマーカー遺伝子が得られた。免疫関連遺伝子の転写量が細胞集団ごとに異なっていたため、集団ごとに免疫機能が異なることが推定された。疑似時間解析により、血球細胞の分化経路が推定され、分化を促す細胞増殖因子が複数推定された。

感染個体の末梢血を用いた Drop-seq では、感染および非感染全 9 個体由来の血球細胞 6,788 個の遺伝子発現データを得た。1 細胞当たりの mRNA および遺伝子検出数の中央値はそれぞれ 852 および 443 であった。ホワイトスポットウイルス感染は、特定細胞集団の割合を増減させ、特に抗菌ペプチドを発現する細胞集団の割合を減少させていた。また、ウイルス感染の有無にかかわらずクルマエビの血球細胞を客観的に分類可能とするマーカー遺伝子を複数同定し、その mRNA 発現パターンを in situ hybridization により顕微鏡観察することに成功した。抗菌ペプチドを発現する細胞集団が減少していたことから、ホワイトスポット病への対策にはこれらタンパク質の発現を減少させない、もしくは、これらタンパク質の発現細胞集団を減少させないことが重要であることが示唆された。また、メタノール固定した血球細胞を scRNA-seq に用いることに成功した。本固定方法は、サンプリングおよび解析を別日に行えるため、他の水産生物への適用も期待される。

造血組織のシングルセル解析に適用可能な品質での単細胞分散は成功しなかった。しかしな

がら、メタノールと氷酢酸をベースにしたマセレーション法がクルマエビ類の組織にも一定の効果を発揮することが明らかとなったため、今後はマセレーション法によって分散した細胞をセルソーターなどによって分取することで、シングルセル解析を実施できることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Koiwai Keiichiro, Koyama Takashi, Tsuda Soichiro, Toyoda Atsushi, Kikuchi Kiyoshi, Suzuki Hiroaki, Kawano Ryuji	4. 巻 10
2. 論文標題 Single-cell RNA-seq analysis reveals penaeid shrimp hemocyte subpopulations and cell differentiation process	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e66954
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.66954	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 -

1. 著者名 Koiwai Keiichiro, Koyama Takashi, Tsuda Soichiro, Toyoda Atsushi, Kikuchi Kiyoshi, Suzuki Hiroaki, Kawano Ryuji	4. 巻 -
2. 論文標題 Single-cell RNA-seq analysis reveals penaeid shrimp hemocyte subpopulations and cell differentiation process	5. 発行年 2021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） 10.1101/2021.01.10.426076	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 -

〔学会発表〕 計17件（うち招待講演 8件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 小祝敬一郎
2. 発表標題 ハイスループットシングルセルトランスクリプトーム解析の魚介類への適用とそこから得られる情報の活用
3. 学会等名 第21回マリンバイオテクノロジー学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小祝敬一郎
2. 発表標題 シングルセル解析で挑む非モデル生物の細胞分類
3. 学会等名 令和4年度日本水産学会春季大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Keiichiro Koiwai, Hidehiro Kondo, Ikuo Hirono
2. 発表標題 Application of single-cell transcriptome analysis to fishery species
3. 学会等名 The Control of Aquatic Animal Diseases (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tomoki Murakami, Keiichiro Koiwai, Hiroaki Suzuki
2. 発表標題 Microfluidic cell separation and genetic analysis of kuruma shrimp
3. 学会等名 2021 21st International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems (Transducers 2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小祝敬一郎, 近藤秀裕, 廣野育生
2. 発表標題 固定した細胞を用いたシングルセル解析に向けて
3. 学会等名 令和3年度日本水産学会秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小祝敬一郎
2. 発表標題 水産無脊椎動物へのシングルセルmRNA解析適用の実際と工夫
3. 学会等名 イルミナウェビナー (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小祝敬一郎、小山喬、津田宗一郎、豊田敦、菊池潔、鈴木宏明、川野竜司
2. 発表標題 単細胞レベルでのクルマエビ血球細胞の機能および分化経路推定
3. 学会等名 令和3年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村上友樹、小祝敬一郎、鈴木宏明
2. 発表標題 DLD法によるエビ血球細胞のサイズ別分離と評価
3. 学会等名 第7回サイボウニクス研究会 (2020)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 村上友樹、小祝敬一郎、鈴木宏明
2. 発表標題 DLD法を用いたエビ血球細胞の分離と評価
3. 学会等名 第12回マイクロ・ナノ工学シンポジウム ONLINE
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Keiichiro Koiwai, Hidehiro Kondo, Ikuo Hirono
2. 発表標題 Towards single cell mRNA analysis using fixed shrimp hemocytes
3. 学会等名 The 13th Asian Fisheries and Aquaculture Forum (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小祝敬一郎, 近藤秀裕, 廣野育生
2. 発表標題 WSSVに感染したクルマエビ血球細胞のscRNA-seq解析
3. 学会等名 第23回マリンバイオテクノロジー学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 原田真知・小祝敬一郎・近藤秀裕・廣野育生
2. 発表標題 パナメイエビ血球細胞の分類と分類マーカーの探索に向けた一細胞トランスクリプトーム解析
3. 学会等名 令和5年度日本水産学会大会春季大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 原田真知・小祝敬一郎・近藤秀裕・廣野育生
2. 発表標題 クルマエビ類横断的な血球細胞の分類に向けた一細胞mRNAシーケンシング解析
3. 学会等名 シングルセルゲノミクス研究会2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小祝敬一郎, 近藤秀裕, 廣野育生
2. 発表標題 非モデル生物へのハイスループットシングルセルトランスクリプトーム解析適用実例
3. 学会等名 シングルセルゲノミクス研究会2022 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小祝敬一郎
2. 発表標題 水産生物へのシングルセル解析の適用と課題
3. 学会等名 令和4年度日本水産学会秋季大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小祝敬一郎
2. 発表標題 非モデル生物での1細胞トランスクリプトーム解析の活用事例
3. 学会等名 DROPLET 2022（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小祝敬一郎・原田真知・近藤秀裕・廣野育生
2. 発表標題 無脊椎動物シングルセル解析でなにがわかりそうか？
3. 学会等名 第2回核酸研究会（招待講演）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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