

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15107

研究課題名（和文）空間的な単一細胞の遺伝子発現解析による始原生殖細胞の潜在的な多能性の制御機構解明

研究課題名（英文）Elucidating the regulatory mechanisms of potential pluripotency in primordial germ cells by spatial single-cell RNA-sequencing

研究代表者

池田 宏輝（Ikeda, Hiroki）

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：70819911

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、組織切片上の解析標的とする一細胞のトランスクリプトームを高精度に解析する手法を実現した。また、この手法を用いたマウス卵巣の解析により、卵母細胞の成熟に関連する新たな知見を得た。本知見は、不明な点の多い生体内の卵母細胞の品質管理機構に関連していることが示唆されるもので、更なる詳細な解析により生殖補助医療への応用へと繋がられる可能性がある。また、開発した手法は、卵巣のみならず、他の臓器、保存された病理サンプル等への応用が可能なものであり、特に組織的な病変を伴う疾患の病因に関して、新規知見を得るための基盤技術となると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、基盤技術である組織切片から解析標的とする一細胞レベルで高精度にトランスクリプトームを解析する手法を界面活性剤の組み合わせの検討により実現した。また、本手法を用いたマウス卵巣の解析により、卵母細胞及び、その周辺に存在する顆粒膜細胞の転写プロファイルを高精度に明らかにすることができ、通常の卵母細胞の成熟過程から逸脱した卵母細胞を同定し、さらにこれら卵母細胞に隣接する細胞では卵母細胞との相互作用が減弱していることを見出した。

研究成果の概要（英文）：In this study, we developed a method for single-cell transcriptome analysis from fixed tissue sections. Using this method, we analyzed mouse ovaries and obtained new insights into molecular mechanisms related to oocyte maturation. These findings shed light on a part of the quality control mechanism of oocytes in an ovary, and further detailed analysis may lead to applications in assisted reproductive technology. In addition, the method we developed can be applied not only to ovaries but also to other organs and preserved pathological samples. It is expected to be a basic technology for obtaining new insights into the pathogenesis of diseases, especially those accompanied by tissue lesions.

研究分野：発生学

キーワード：卵母細胞 単一細胞トランスクリプトーム 卵巣 顆粒層細胞 組織切片 固定組織

1. 研究開始当初の背景

多能性の理解は、発生学、再生学の中心的課題であり近年飛躍的に進展しているが、生体内では多能性の細胞は奇形腫などの腫瘍の原因となり、多能性幹細胞を再生医療へ応用する際の大きな障害となるため、生体内での制御機構の理解が重要である。

始原生殖細胞は、胚発生過程で、一過的に出現し、雌雄配偶子の起源となる細胞であるが、正しく生殖巣に移動できないと、奇形腫や胚細胞腫瘍の原因となる。また、始原生殖細胞は複数の増殖因子と共に培養することで多能性幹細胞 (Embryonic Germ Cell: EG 細胞) へと脱分化する。奇形腫の要因はこの多能性の顕現であると考えられる。さらに、始原生殖細胞は多能性の上皮組織エピプラストから発生し、一つ一つ個別に、後腸の内胚葉上皮、背側腸間膜の結合組織、大動脈・生殖巣・中腎 (AGM) の造血領域等様々な環境を経由して生殖巣へと移動する。従って、始原生殖細胞は、潜在的に多能性を保持しつつ、周囲の微小環境の影響の下に多能性の顕現を制御すると共に、多能性に起因する腫瘍化を免れる機構を有していると考えられる。よって、始原生殖細胞は生体内における多能性制御のモデルとして最適である。すなわち、生殖細胞の潜在的な多能性制御に関わる分子基盤は、発生学や再生医療、生殖医学における核心的問題である。

2. 研究の目的

本研究の最終的な目的は、移動期の個々の始原生殖細胞とその周辺環境を構成する細胞の詳細な遺伝子発現解析により、生体内における適切な多能性や分化制御に関わる微小環境との相互作用やその制御機構を解明することである。これまで、始原生殖細胞が生体内の周囲の環境との相互作用の下で、どのように多能性を制御しているかはほとんど知られていない。これは、組織学的な環境下での遺伝子発現などゲノム科学的な解析手法が整っていなかったことが主要な原因であると考えられる。本研究では、このような技術的な制約を克服し、固定組織切片からの単一細胞遺伝子発現解析法を精密化し、その手法を用いて個々の標的とする生殖細胞 (始原生殖細胞) とその周囲の微小環境の遺伝子発現を解析する。

3. 研究の方法

本研究では、多能性を有し、2i+Lif を添加した培地で均質化したマウス ES 細胞を用いて、固定組織切片からの精密な単一細胞遺伝子発現解析法を実現に向けた実験検討を行った。組織を模したマウス ES 細胞の凝集塊を液体窒素を用いて瞬間凍結、薄切、脱水固定、染色切片作製し、Laser capture microdissection により 1 細胞を採取し様々な細胞溶解条件において cDNA 合成と定量的 PCR、及び次世代シーケンス解析を行い高精度にトランスクリプトーム解析できる条件の検討を行った。また、始原生殖細胞の最終的な終着点である生殖巣 (卵巣) の固定染色切片を作製し、上記で開発した手法を用いて卵母細胞とその微小環境を構築する顆粒膜細胞のトランスクリプトームプロファイルを単一細胞レベルで高精度に解析を行った。

4. 研究成果

(1) 本研究における基盤技術である固定組織切片から単離した単一細胞から高精度のトランスクリプトーム解析手法を実現した。

(2) マウスの卵巣を標的として、上記 (1) で開発した手法を用いて、細胞の大きさや、局在のような組織学的情報とリンクしたトランスクリプトーム解析を行った結果、生殖細胞である卵母細胞の成熟過程に沿ったトランスクリプトームを同定することができた (図 1)。また、直径 40~50 μm 卵母細胞において、大きく転写状態が遷移することを見出した。さらには、こうした通常から逸脱したトランスクリプトームプロファイルを持つ卵母細胞についても同定した。

微小環境を構築する卵母細胞周辺の顆粒膜細胞では、その局在に応じて転写状態が変わること、卵母細胞に隣接する顆粒膜細胞では卵母細胞で高発現している一部の転写産物が検出され、卵母細胞と

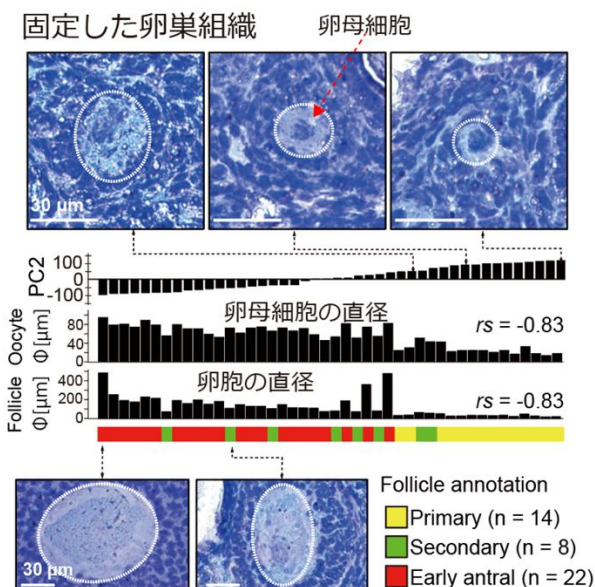


図 1 組織学的情報 (卵母細胞の直径) とリンクした遺伝子発現解析

Ikeda et al., LSA (2023) より引用 (一部改変)

(引用文献)

微小環境との転写産物レベルでの相互作用が示唆された(引用文献)。covid-19の流行を起因とした物資の確保や生産中止による代替品の検討、始原生殖細胞の最終的な移動標的にあたる卵巣における卵母細胞と微小環境の相互作用に関する新規知見を得たこと等により、当初に計画していた移動期の始原生殖細胞の解析までには至らなかったが、今後この点についても同様に解析を行い、生体内における多能性制御のメカニズム解明に繋げていきたい。

<引用文献>

Ikeda H, Miyao S, Nagaoka S, Takashima T, Law SM, Yamamoto T, Kurimoto K. High-quality single-cell transcriptomics from ovarian histological sections during folliculogenesis. *Life Sci Alliance*. 2023 Sep 18;6(11):e202301929. doi: 10.26508/lsa.202301929.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 3件）

1. 著者名 Ikeda Hiroki, Miyao Shintaro, Nagaoka So, Takashima Tomoya, Law Sze-Ming, Yamamoto Takuya, Kurimoto Kazuki	4. 巻 6
2. 論文標題 High-quality single-cell transcriptomics from ovarian histological sections during folliculogenesis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 e202301929
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.26508/lisa.202301929	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 Ikeda Hiroki, Miyao Shintaro, Yamada Nanami, Sugimoto Sumire, Kimura Fuminori, Kurimoto Kazuki	4. 巻 5
2. 論文標題 Protocol for high-quality single-cell RNA-seq from tissue sections with DRaQL	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 STAR Protocols	6. 最初と最後の頁 103050 ~ 103050
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xpro.2024.103050	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 Ikeda Hiroki, Miyao Shintaro, Nagaoka So, Yamamoto Takuya, Kurimoto Kazuki	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 池田 宏輝
2. 発表標題 固定染色した卵巢切片からの高精度単一細胞トランスクリプトーム解析の実現と組織学的情報との統合的解析
3. 学会等名 第65回日本卵子学会学術集会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 池田 宏輝
2. 発表標題 卵巣切片からのシングルセルトランスクリプトームと組織学的情報の統合的解析
3. 学会等名 第129回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 池田 宏輝
2. 発表標題 卵巣切片における組織学的情報と単一細胞トランスクリプトームの統合的解析
3. 学会等名 NGS Expo 2023
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2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 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2021-200053	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

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 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2021-200053	出願年 2021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

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