

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780193

研究課題名(和文) 無顎類表皮の細胞における防御機構

研究課題名(英文) Defense mechanism of epidermis in agnathan

研究代表者

筒井 繁行 (Shigeyuki, Tsutsui)

北里大学・海洋生命科学部・講師

研究者番号：20406911

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：最も原始的な脊椎動物である無顎類のうち、スナヤツメ(Lethenteron reissneri)の皮膚凍結切片から、レーザーマイクロダイセクション(LMD)を用いてSkein細胞群およびその他の細胞群を効率的に回収する方法を開発した。さらにこれら2群からmRNAを抽出し、それぞれを次世代シーケンシングに供し、発現している遺伝子の網羅的解析を試みた。

研究成果の概要(英文)：Among the Agnatha which were the most primitive vertebrate, I developed a method to collect Skein cell group and other cells group from skin frozen section of the sand lamprey (Lethenteron reissneri) using a laser micro dissection (LMD) effectively. Furthermore, I extracted mRNA from these two groups. These mRNAs were subjected to next-generation sequencing to try to exhaustive analysis on expressing genes in these cells.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：無顎類 表皮 細胞

1. 研究開始当初の背景

免疫系は、迅速且つ非特異的な自然免疫系と、記憶を伴う特異的な系である適応免疫系に大別される。前者は無脊椎動物、脊椎動物のいずれにも備わった系であるのに対し、T細胞や免疫グロブリンに代表される後者は、魚類以上の脊椎動物にのみ存在する系である。近年、その魚類の中でも、最も原始的な脊椎動物であり、ヌタウナギ類やヤツメウナギ類に代表される無顎類は、有顎脊椎動物の適応免疫系とは全く異なる、Variable Lymphocyte Receptor (VLR) と呼ばれる抗原受容体を主とする独自の適応免疫系を備えていることが明らかにされ、無顎類の全身免疫系に関する知見が急速に増えている。一方、病原生物の侵入に対する最初の防衛ラインである、体表での防御機構に関する総合的な研究はほとんど例がない。

陸棲動物である哺乳類の場合、外部環境に直接接する皮膚の最表面は、死細胞から構築される角質層から成り、病原生物の侵入に対する物理的なバリアとして機能している。そのため皮膚を経路とした感染は稀であり、感染のほとんどが消化管や肺で生じる。一方、無顎類を含む魚類の場合はどうだろうか？水という様々な病原生物の生存や伝播に適している媒体に常に曝露されているにもかかわらず、彼らの皮膚はケラチンに乏しく、最表面も生きた細胞で構成されており、脆弱である。そのため魚類の皮膚は、哺乳類のそれとは異なり、重大な感染経路となりうる。従って魚類はその皮膚に、哺乳類の皮膚とは異なる独自の防御機構を備えているものと考えられる。

これまでいくつかの魚種において、*in vitro* で皮膚を刺激し、発現量が増加する因子についての網羅的検索が行われてきた。無顎類においても、唯一カワヤツメ *Lampetra japonica* で同様の研究例があるものの、これらはいずれも皮膚という組織レベルでの研究であり、

個々の細胞に注目した研究例は皆無である。魚類の皮膚、特に表皮を構成する細胞は、種により大きく異なることが知られている。上皮細胞および粘液の主成分であるムチンを分泌する粘液細胞は普遍的に魚類の表皮に見られるものの、例えばウナギ目、コイ目、ナマズ目などの魚類では、これらに加えて棍棒細胞が、フグ目魚類では嚢状細胞が存在しており、レクチンなどの防御因子を産生している。代表的な無顎類であるヤツメウナギ類の表皮においても、Merkel細胞やskein細胞などといった特有の細胞が分布している(図1)。しかしこれらの細胞については組織学的に記載されているにすぎず、機能に関する情報は皆無である。

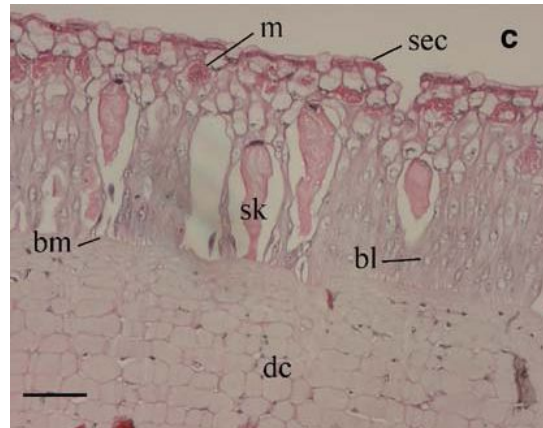


図1. カワヤツメの皮膚の組織切片。Sk: Skein細胞、m: Merkel細胞。Tsutsui et al. Immunogenetics (2007) より改変。

2. 研究の目的

無顎類の皮膚の防御機構について、さらなる理解を深めるため、本研究では、無顎類表皮構成細胞をそれぞれ単離し、発現する遺伝子を網羅的に解析することで、個々の細胞の機能を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

当初の計画では、カワヤツメの皮膚から表皮細胞を分離し、これを抗原としてモノクローナル抗体を作製する予定であったが、技術的および設備的な理由で上手く行かなかった。そこで、新たに北里大学海洋生命科学部

に導入されたレーザーマイクロダイセクション (LMD) を用いて、表皮の細胞を切り出し、細胞種ごとに mRNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いての網羅的遺伝子解析を行った。なお、実験動物も通年入手可能な陸封型ヤツメウナギ類のスナヤツメに変更した。

一般に LMD から細胞を回収し、mRNA を抽出する場合、切片の作製法や染色方法により回収率が大きく変わり、且つその最適方法は対象種や組織によって異なると思われる。そこで最初に、組織切片の作成法および染色方法について検討した。

mRNA の分解を最小限に抑えるため、凍結切片を選択した。スナヤツメを輪切りにし、Tissue-Tek OCT compound (Sakura Finetek) で包埋した。その後、冷却アセトンまたはドライアイス上で急速冷凍した。

クライオスタットを用いて厚さ 10 μ m の凍結切片を作製し、ヘマトキシリン・エオシン染色 (HE 染色)、トルイジンブルー染色および Diff-Quick 染色を施し、光学顕微鏡下で観察し、最適な染色方法を探索した。

LMD を用いて組織切片から細胞別に回収した。細胞から PureLink Micro to Midi Total RNA Purification system (Qiagen) を用いて Total RNA を抽出した。その後、次世代シーケンサー (HiSeq2000 100bp pair-end 4G share (Illumina)) に供し、発現する遺伝子を網羅的に解析した。

4. 研究成果

HE 染色、トルイジンブルー染色および Diff-Quick 染色を行ったところ、HE 染色では比較的良好な観察像が見られたが、染色に時間がかかり、RNA が分解されることが懸念された。トルイジンブルー染色では、表皮のほとんどの部分が淡青色に染色され、細胞の区別は困難だった。Diff-Quick 染色では、大型の Skein 細胞と思われる細胞が濃青色に、

他の細胞は淡青色に染色され、Skein 細胞の識別が可能であった (図 2)。一方で、上皮細胞と Merkel 細胞などの他の細胞との区別は困難であった (図 2)。そこで本研究では、本染色法を採用し、且つスナヤツメ表皮を Skein 細胞とそれ以外の細胞の二群に分け、次世代シーケンサーによる発現遺伝子プロファイリングを行うこととした。

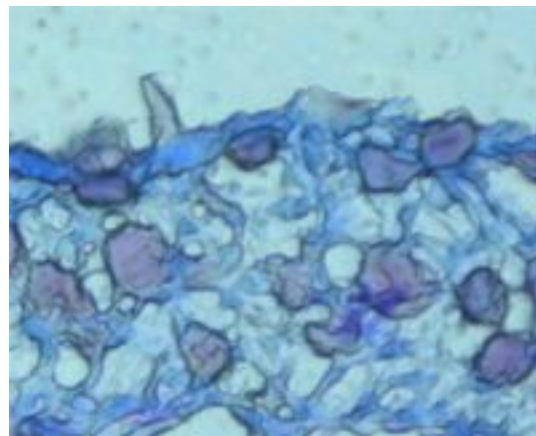


図 2. Diff-Quick 染色を施したスナヤツメの表皮の凍結切片。Skein 細胞と思われるやや大型の細胞のみ濃青色に染色された。

次に LMD を用いて細胞を回収した。予備的に、どのくらいの細胞からどのくらいの RNA が回収するかを調べるため、厚さ 10 μ m の凍結切片から、Skein 細胞のみを 1,000,000 平方 μ m を回収した。この分量の細胞から、0.25 μ g の RNA が得られた。なお、この RNA を逆転写し、これを鋳型とした PCR を行ったところ、ハウスキーピング遺伝子である アクチンの増幅に成功した。したがって、LMD を用いて、スナヤツメ表皮から問題なく RNA が回収できることが明らかとなった。

次世代シーケンシングに約 5 μ g の RNA が必要なことから、およそその目標細胞数を設定し、これを回収した。同程度の面積の Skein 細胞以外の表皮も回収し、次世代シーケンサーに供した。

現在、Skein 細胞およびその他の細胞群で発現している遺伝子を網羅的に解析し、アノ

テーションしている最中である。残念ながら LMD による細胞の回収に時間を要し、最終目的である、ある細胞に特異的に発現している遺伝子を特定し、その細胞の機能を推定するまでは至らなかった。しかしながらスナヤツメ皮膚から細胞ごとに RNA を回収する至適手法を確立し、シーケンシングを行ったことから、今後のデータ解析で最終目的の達成に至る可能性は高いと考えている。

5．主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

該当なし

6．研究組織

(1)研究代表者

筒井 繁行 (TSUTSUI SHIGEYUKI)

北里大学・海洋生命科学部・講師

研究者番号：20406911

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし