

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：34419

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2019

課題番号：16K14764

研究課題名(和文) マイノリティ細胞の動態理解に向けた組織細胞分散分離手法の開発

研究課題名(英文) Establishment of cell dispersion and isolation methods from animal tissues to understand the dynamics of minor cells

研究代表者

松田 学 (MATSUDA, Manabu)

近畿大学・医学部・准教授

研究者番号：30282726

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：組織中の細胞の多様性と細胞間相互作用の重要性が明らかになるにつれ、埋没しがちな少数派の細胞の振る舞いを解析したいと考えた。従来の単純な酵素処理法では細胞の個性が変容してしまうため、組織を迅速固定後に細胞を酵素的に分散させて選別し、下流のRNA解析に適う細胞の取得を目指した。内因性RNA分解酵素の作用しない固定および酵素消化反応の条件域を確定した。また、その条件域でレポーターとなる蛍光物質も選定した。一方、その条件下ではたらく酸性プロテアーゼは、凝集した細胞外基質を消化する条件下では細胞自体の損傷も激しく実用的な細胞分散条件の決定には至らなかった。至適条件の特定は今後の研究に委ねられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

私生物のからだを構成する細胞は、同じように見えてもそれぞれに個性をもっている。個々の細胞を他の細胞から引き離して、発現するRNAを調べることで初期のがん細胞をはじめ細胞の振る舞い、いわば細胞の個性を知ることができる。本研究では、細胞の固定前後にRNA分解が起こらない酸性条件を特定した。その条件下ではたらく酸性プロテアーゼにより細胞の分散を試みたが細胞の損傷を抑えて機能する最適条件は今後の研究に委ねられる。

研究成果の概要(英文)：Analysis of the rather rare and minor cells are generally difficult, as they are apt to be masked and hidden by the others, i.e., the majority of the cells. Conventional methods of dissociation of the cells via digestion of live cells with collagenases are not suitable for the minority cells, because the nature of the cells may be altered easily by the environmental changes during the enzymatic digestion. Here, tissue cells are dissociated via digestion with an acidic enzyme after fixation of the tissues. I found acidic conditions that are practically affordably for fixation and digestion without any degradation of RNA. In addition, a fluorescent protein was verified to be available as a reporter molecule in the downstream experiments performed in the acidic conditions. However, degradation of cells by proteases was inevitable in the conditions strict enough to dissociate cells, at least so far. Further experiments are necessary to establish a gold standard method.

研究分野：乳腺生理学

キーワード：細胞分散 プロテアーゼ 消化酵素

1. 研究開始当初の背景

(1) 組織は、均質で一様な細胞集団と考えられてきたが、近年は **heterogeneity** が存在し、多くのマイナーで個性的な細胞の集合体であることが示されつつある。例えば、哺乳類乳腺による乳汁分泌も、均質な乳腺上皮細胞によって構成的かつ静的に行われるのではなく、実際には上皮-間質相互作用を基軸として少数の細胞に生じる変化が契機となって、間質-上皮転換をはじめとしたダイナミックな変化が起こることによって支えられている。この生理的なしくみの理解には、そうした少数の細胞の動態の理解が欠かせない。さて、この組織中に散在する少数の細胞の性状を生化学的に解析するには、セルソーターによる選別と濃縮あるいは単一細胞の単離に依るところが大きい。いずれにせよ、組織を細胞に分散させ、目的の細胞を分離する必要がある。この際、例えば乳腺組織の分散には、6時間のコラゲナーゼ処理に加え30分のトリプシン処理を行うのが普通であった。しかし、こうした長時間の処理操作は、細胞の状態を大きく変容させてしまうため、細胞の生理的変化を解析するには不向きである。一方、細胞の状態を変えぬよう組織摘出後に迅速に組織全体を解析しては、少数の細胞に起こる変化は、他の大多数の細胞の情報に埋もれてしまい、情報を得ることはできない。そこで、遺伝子発現情報など生体組織中における生理的な情報を保持したまま、組織から細胞の単離する技術にニーズがあると考えに至った。

2. 研究の目的

(1) 上述の背景から、生体組織中における個々の細胞の生理的な遺伝子発現情報、とくに発現RNAプロファイル、を保持したまま、組織から細胞の単離する技術組織を開発することを本研究の目的として据えた。RNaseが酵素活性を示さない条件下で、細胞を化学的に固定したのち酵素処理することで細胞を分散することで、目的に合う組織からの細胞の単離ができないか、というチャレンジングなアイデアを試したのが本研究である。

(2) 目的達成に向けたロードマップを細分化すると、ステップごとの小目的に分けられる。①細胞分散と下流実験のセットアップに使う細胞培養系を選定する、②RNaseの活性を示さない固定条件を特定する、③同条件下で作用を示すプロテアーゼを選定する、④同条件下での細胞の検出を支える分子タグを選定する、⑤生体由来組織を用いた細胞分散と解析のワークフローの検証のための実験系を確立する、の5つの段階がある。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養および遺伝子の導入

基本的にウシ乳腺上皮細胞 (bMEC) を 10% FBS-低グルコース DMEM 培地で継代培養し、80% confluent の状態の細胞を実験に共した。ヒスタミン阻害剤の影響を調べる実験では、泌乳誘導ホルモンカクテル (プロラクチン、インスリン、ハイドロコルチゾンの混合液) の添加培地中でトランスウェル上に培養し、TEER 測定により細胞極性の高まりを確認してから、薬剤を添加して応答を観察した。また、細胞検出の V5-epitope または蛍光タンパク質 (EGFP) の分子タグをマウス *moxd1* 遺伝子産物との融合タンパク質として *GAL4-E1b* プロモーター制御下で発現するよう DNA コンストラクトを作成し Fugene 6 法により細胞に導入した。Zeocin 耐性遺伝子の発現に基づき安定的に遺伝子導入された細胞を選別し、mifepristone 依存的に発現させた。一方、Sirius 遺伝子を CMV プロモーター制御下で恒常的に発現する細胞株を、Neomycin 耐性に基づき選別し樹立した。これら遺伝子導入細胞と通常の細胞とを混ぜて共培養したものを下流の実験に用いた。

(2) 固定と酵素処理

細胞を 10%ホルマリン-PBS または低 pH の 50mM 酢酸およびリン酸緩衝液で室温下 15 分間固定した。消化酵素を含むあるいは含まない酸性緩衝液に置換し、20°C もしくは 37°C で一定時間反応させ、細胞の分散、RNA の回収、蛍光観察を行った。

(3) RNA とタンパク質の解析

RNA の分解の程度は、細胞から AGPC 法で抽出した全 RNA を変性アガロースゲルで分画し EtBr 染色した rRNA のバンドの分解の度合いを指標とした。細胞で発現した EGFP および Sirius は蛍光顕微鏡観察もしくは免疫化学的手法により検出した。酸性条件下での酵素の活性は、I 型コラーゲン混入 PAGE ゲルに酵素タンパク質試料を非還元条件下で電気泳動して、CBB 染色の染色性から酵素活性を定性評価した。

(4) DNA コンストラクトの作成

マウス C57B/6 のゲノムから *moxd1* 遺伝子 exon2 をターゲットに、それを挟むイントロン領域を PCR で増幅し、人工合成した floxing 可能な *moxd1* 遺伝子をそれらで挟み、ノックインコンストラクトを作成した。

4. 研究成果

(1) 乳腺細胞の個性の解析に向けた培養細胞系の確立

細胞の個性の解析に向けて、まず単純な実験系で乳腺細胞の個性を引き出して、細胞分散の実験に供する細胞の選定を行った。ひとつには、タグ付タンパク質の強制発現した細胞と通常の細胞とを混合して分離を試みる系を検討した。検討の過程で Moxd1 タンパク質ではタグの検出ができないというアクシデントを生じた。珍しい現象であることから学会での報告を行った。のちに、スパーサーを挟んで GFP タグを追加で付すことにより、タンパク質の発現の有無により、細胞を選別して解析に使える細胞系を確立することができた。

もうひとつは、情報伝達を担うモノアミンであるヒスタミンの阻害により、上皮シートの物質透過性が上がる系をセットアップし確認した。この現象には一部の細胞の shedding が関与していると考えられる。これらのデータを、国際学会にて発表・報告した。この実験を通して、将来のマイノリティ細胞の解析に値するユニークな現象を容易に再現できる実験系確立した。

(2) RNA 分解の起こらない固定条件の特定

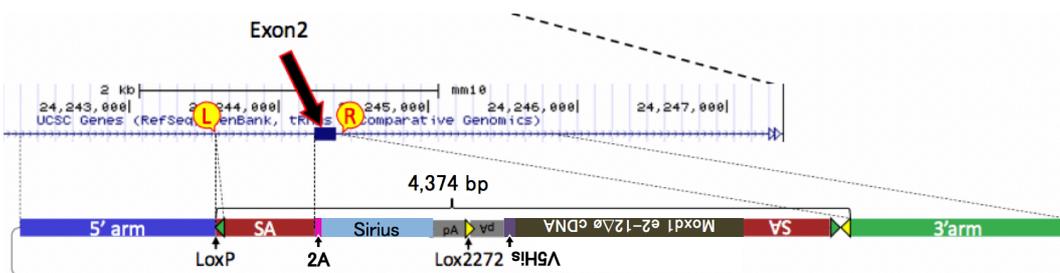
細胞の固定液として汎用されるホルマリンやアルコールは、RNase の阻害に働くだらうが RNase 同様に消化酵素を不活化してしまったり、生体膜を壊してしまい酵素処理により細胞内を消化してしまうため利用できなかった。そこで、酸による固定を検討した。酸性プロテアーゼの存在が示すとおり、酸性下でも働くプロテアーゼが利用できる。pH2-4 付近に pKa をもつグリシン、リン酸、クエン酸、酢酸などを用いて酸性条件での RNase 活性を室温 24 時間での組織 rRNA の分解を指標に調べたところ、いずれのバッファーでも pH2.5 以下の条件下では rRNA の分解がみられないことが示された。このことから、本研究目的の細胞分散においては、pH2.5 で作用を示すプロテアーゼを利用すればよいという指針をもつことができた。

(3) 酸性下で検出できる蛍光物質の選定

上述した RNase 活性が抑えられる条件下では、しかし、GFP の蛍光が減弱してしまうという問題が明らかになった。GFP が酸性下で蛍光を失うと、細胞分散に成功しても下流の実験において細胞選別が行えないこととなる。そこで GFP の代替として pH の影響を受けにくい蛍光タンパク質である Sirius を採用し、pH2.5 においても細胞内に発現した Sirius タンパク質の蛍光を検出できることを確認できた。

(4) 遺伝子ノックインコンストラクトの作成

組織から細胞を分散させて特定細胞の選定する際の実験モデルのひとつとして、Moxd1 遺伝子のノックインモデルで、コンディショナルに遺伝子を欠損させた細胞を蛍光検出できるマウス個体の作成に向けたコンストラクトを作成した。これまでの研究成果を受けて、蛍光物質に Sirius を採用した。しかし、遺伝子改変マウスの作出には至らなかった。



図：マウス *moxd1* 遺伝子ノックインコンストラクト

(5) 酸性プロテアーゼによる消化

酸固定した培養細胞の酸性条件での分散を試みた。pH2.5 で活性を保つ酸性プロテアーゼで利用可能なペプシンを、消化温度 37°C、消化時間 2 時間に固定して酵素濃度を変えて消化した。細胞が剥がれる濃度域では、細胞の形状も崩れてしまった。細胞内の消化も起こっていることは、蛍光の減弱からも確認された。生細胞であれば球状化して接着面への酵素のアクセシビリティが向上するとともに接着面積も減少するが、固定組織ゆえに平板状や紡錘状をした細胞形状はそのまま保たれ、消化に時間がかかってしまうのかもしれない。微小な細胞突起などを含む細胞形状を維持しつつ、細胞を分散させる酵素消化の条件を見いだすのは容易ではなかった。本研究での条件確立は難しく、のちの研究に譲ることとしたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Manabu Matsuda
2. 発表標題 Histamine as a topical regulatory factor in the lactating mammary gland
3. 学会等名 The 22nd International Congress of Zoology (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 松田 学
2. 発表標題 標識抗体によるタンパク質の検出における疎水性ドメインの影響
3. 学会等名 第47回乳腺・泌乳研究会
4. 発表年 2016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