

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：24601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2016

課題番号：16K15062

研究課題名(和文) マイクロ流路を用いた長期1細胞計測によるES細胞の遺伝子ネットワーク解析

研究課題名(英文) Study of the gene regulatory network of ES cells by long-term single cell analysis using a microfluidic device

研究代表者

堀江 恭二 (Horie, Kyoji)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：30333446

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：次世代シーケンサを用いた1細胞トランスクリプトーム解析が急速に進展している。しかし、シーケンサによる解析では、個々の細胞ごとの遺伝子発現の時系列情報が欠落する。この問題点を相補する方法として、本研究では、マイクロ流体デバイスを用いて、マウスES細胞の遺伝子発現を顕微鏡下で長期観察する方法を開発した。その結果、対象遺伝子の発現を、蛍光蛋白を用いて1週間に渡って計測することに成功した。今後、他の細胞への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：With the advent of the next generation sequencing technologies, the single cell transcriptome analysis is making a great advance. However, the single cell transcriptome analysis lacks temporal information of gene expression in each cell. To complement this limitation, we have developed a method for long-term gene expression analysis of mouse ES cells using a microfluidic device. We have succeeded in tracking the expression of our gene of interest for one week using a fluorescent protein as a reporter. We expect the application of this technology to other cell lines.

研究分野：分子生物学

キーワード：ES細胞 遺伝子 1細胞 幹細胞 蛍光

1. 研究開始当初の背景

次世代シーケンサを用いた1細胞トランスクリプトーム解析法の進展により、従来は「クローナル」とみなされていた細胞集団において、個々の細胞の遺伝子発現が大きく変動していることが明らかとなった。さらに、細胞が、この変動を利用して、様々な状況に適応している例が蓄積してきた。例えば、ES細胞や神経幹細胞では、遺伝子発現のゆらぎが多能性を制御すると提唱されている。しかし、1細胞トランスクリプトーム解析は、生命現象のある特定の時点を取り切ったスナップショットの解析であり、個々の細胞の「時系列」情報は欠落する。このため、細胞分化のような、時系列情報が重要な生命現象においては、自ずと限界が生じてしまう。また、観察対象が細胞死を伴う場合は、どの細胞が生存し続け、どの細胞が死滅したかを追跡する必要があるため、時系列情報取得の重要性がさらに増す。

この弱点を補うには、特定の遺伝子を蛍光蛋白でラベルし、顕微鏡下で経時的に観察する方法が有効である。連携研究者の若本は、長期1細胞計測により、抗生物質に対するバクテリアの耐性が、薬剤活性を変化させる遺伝子の確率的変動によることを示し、70年間に渡り信じられていたドーマント細胞仮説(増殖の停止した細胞が薬剤耐性を示すと仮説)を覆した(Wakamoto, Science 339:91, 2013)。この例に示されるように、時系列情報の取得は極めて有用であるが、動物細胞(とりわけ、接着性の細胞)においては、バクテリアとは異なり、数十世代におよぶ長期追跡は極めて難しい。何故ならば、細胞が増殖して培養容器を飽和すると継代せざるを得ず、観察が途絶えるからである。さらに、マウスES細胞のように重層化して増える細胞では、顕微鏡での観察に際して、細胞間の識別が容易に障害される。1細胞計測で世界をリードしているドイツのTimm Schroederが、最近、

マウスES細胞におけるNanogとOct4の発現計測を報告した(Filipczyk, Nat Cell Biol 17:1235, 2015)が、計測期間は4日に留まっていた。このように、動物培養細胞における長期1細胞計測は困難なのが現状であり、この状況を打開するための新たな方法が求められている。

2. 研究の目的

本研究では、動物培養細胞の長期1細胞計測を可能とするための技術開発を目指した。特に、解決すべき課題として、動物培養細胞の「継代」と「重層化」という2つの問題点に着目し、連携研究者の東京大学・若本がバクテリアで成功したマイクロ流体デバイス(Wakamoto, Science 339:91, 2013)を動物培養細胞用に改変し、実験条件を最適化した。

まず、「継代」については、デバイス上に適切な流路を設定することにより、観察用チャンバを占めた細胞が持続的に排出されるように試みた。次に、「重層化」に対しては、観察用チャンバの高さを低く設定して、重層化を最低レベルに抑えるようにした。応用例として、申請者が、遺伝子トラップ法によるマウスES細胞の大規模スクリーニング(Horie, Nature Methods 8:1071, 2011)で同定した、未分化状態で特異的に発現する新規遺伝子の発現解析へ適用した。培養期間として、1週間の安定的培養を目指した。マウスES細胞での計測をモデルケースにして、様々な細胞種での解析のprototypeを提唱することを目指した。

3. 研究の方法

(1) マイクロ流体デバイスの作製

高感度な蛍光観察を達成するためには薄いガラス素材を用いる必要があるため、スライドガラス厚のガラス上にマイクロ流路を作製した。細胞の播種と排出用の流路の側面に、細胞観察用チャンバを設定した。培地は、シリンジポンプにより持続的に注入した。

(2) マウス ES 細胞の改変と培養

マウス ES 細胞を蛍光で追跡するために、H2B-mCherry を発現させることで核をマーキングした。また、ES 細胞の多能性の変動の指標として我々が新たに同定した新規遺伝子へ蛍光蛋白 Venus をノックインし、この遺伝子の発現変動を時系列で追跡することを試みた。培地は、N2B27 無血清培地に対して Gsk3 と Mek に対する阻害剤、および LIF を加えたもの(2i/LIF 培地)を用いた。蛍光シグナルの取得には、GE Healthcare 社のワイドフィールド蛍光顕微鏡 DeltaVision を用いた。

4. 研究成果

(1) マイクロ流体デバイスでマウス ES 細胞を安定的に培養する条件の最適化

我々は、蛍光蛋白の検出感度を最大限に高めるために、細胞が接着する底面にはガラスを用いている。しかしながら、マウス ES 細胞は、ガラス上には接着しにくく、通常のプラスチック底の培養で用いられているゼラチンで表面をコートするのみでは、接着が不十分で、細胞が容易に死滅した。そこで、ラミニンや E-カドヘリンを適切な濃度で組み合わせ合わせてコートすることを試み、細胞の接着率と生存率を改善した。

(2) 細胞を観察用チャンバへ播種する方法の検討

流路の側面に設けた観察用チャンバは、細胞の重層化を防ぐために、流路と比べて高さを大きく制限した。このため、単に細胞を流路へ注入するだけでは、入り口の低い観察用チャンバへは細胞が入らず、細胞は流路内に留まってしまった。そこで、流路への細胞の注入後にデバイスを遠心し、流路から観察用チャンバへ向けて遠心力がかかるようにした。適切な遠心条件を設定することにより、観察用チャンバの奥深くへ細胞を播種することが可能になった。デバイスの遠心は、播種直後の ES 細胞同士の接着を促進する上でも、有効であった。(1)で記載のように、

ES 細胞はガラス基板への接着が弱く、そのために播種直後に細胞が死滅する頻度が高く、本手法の大きな問題であった。遠心により細胞同士が接着すると、播種直後の細胞の生存率が高まり、観察可能な視野が多くなった。

本実験の開始前は、本来、重層化する性質を持つマウス ES 細胞を、重層化しない条件(高さの低い観察用チャンバ)で培養することにより、ES 細胞の多能性が損なわれるのではないかとの懸念もあった。しかし、本デバイスでの培養によっても、ES 細胞の多能性マーカーである Nanog の発現が維持されていることを確認できた。これより、本デバイスの培養条件は、ES 細胞の多能性を維持しようと考えた。

(3) 培地の灌流速度の検討

デバイスへの培地の灌流は、細胞への栄養補給を保つのみならず、観察用チャンバ内で満杯になった細胞を持続的に流路内へ排出するためにも必要である。しかし、灌流速度が速すぎると、観察用チャンバ内の細胞全体が流路へ引き出され、すべての細胞を失ってしまうことを経験した。流路内への細胞の持続的排出に成功した場合でも、排出した細胞が流路内で細胞集塊を作って流路を塞ぐことも経験した。このような要素をすべて満たすための適切な灌流速度を検討し、1 週間に渡る長期持続培養に成功した。

この過程で、とりわけ、排出された細胞による流路の閉塞が、実験条件の設定上、最も難しい問題であることがわかった。これは、排出される細胞数や、排出後の細胞が形成する細胞集塊の形態が実験ごとに異なることによる。この点を解消するには、流路や観察用チャンバの構造自体を再検討する必要があると考えられ、今後の課題である。

(4) 蛍光シグナルの検出のための励起条件の最適化

過度の励起光は、細胞へダメージを与える。一方で、マウス ES 細胞は基板上を動くため、細胞を追跡するためには撮影間隔を短くすることが望まれる。そこで、細胞一つ一つを

追跡するための必要最小限の撮影頻度と励起光強度を決定した。我々が対象としている ES 細胞株において、細胞あたりの Venus の mRNA の分子数を定量 RT-PCR で計測したところ、10 分子程度であった。よって、我々が対象としている遺伝子発現レベルは、かなり低いものと考えられるので、本実験で決定した実験条件は、多くの遺伝子の発現計測へも適用できると言えよう。

問題点として、現状では、細胞の追跡を目視に依存していることが挙げられる。今回の計測から、我々が対象としている遺伝子の発現変動パターンが、細胞ごとに大きく異なることがわかった。よって、計測結果から法則性を見出すには、多くの細胞について長期 1 細胞計測を定量的に行う必要があり、すべてを目視に頼るのは限界がある。しかしながら、細胞の追跡を自動化するためには、撮影間隔をより短くする必要があり、励起光による細胞毒性を回避することが重要な課題となる。今後は、核をラベルした蛍光蛋白の発現量を高めて計測感度を増させたり、もしくは、より赤外よりの波長での励起が可能な、細胞毒性の少ない蛍光蛋白に代えるなどの方法が有用であろう。または、蛍光蛋白の代わりに、ルシフェラーゼによる化学発光を用いて、励起光の照射自体を無くすことも原理的には可能である。我々が導入している Venus には、ルシフェラーゼ遺伝子が融合されているので、ルシフェラーゼによる化学発光を Venus の励起へ利用して、外部機器による励起光の照射を回避することができる (Takai et al. PNAS 112: 4352-4356, 2015)。このためには、顕微鏡の改良や、検出用カメラの高感度化が必要であるが、十分に検討の価値はあると考える。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.naramed-u.ac.jp/~2phy/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

堀江 恭二 (HORIE, Kyoji)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：30333446

(2) 連携研究者

若本 祐一 (WAKAMOTO, Yuichi)

東京大学・大学院総合文化研究科・准教授

研究者番号：30517884

吉田 純子 (YOSHIDA, Junko)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：30769196