

令和 5 年 3 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22398

研究課題名(和文) 関心領域に限定可能なRNA-seq法の開発

研究課題名(英文) High resolution spatial transcriptomics method by photo-isolation chemistry

研究代表者

本田 瑞季 (Honda, Mizuki)

京都大学・医学研究科・特定助教

研究者番号：50828978

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子発現情報を調べるためには空間位置情報と対応づける必要がある。そこで、本研究課題において高解像度かつ高感度にて遺伝子発現情報と空間位置情報の対応づけが可能な新たな空間トランスクリプトーム法、Photo-Isolation Chemistry (PIC) を開発した。これは、組織切片に光開裂型の化学修飾を施したcagedオリゴDNAをアニールさせ、逆転写反応後に切片上の関心領域に特定波長の光を照射すると、その領域だけの遺伝子発現情報が取得できるといった手法である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題で開発した PIC 法は、組織切片上の光照射した関心領域から遺伝子発現情報を高感度にて取得できる技術である。また、光照射は光学限界のサブミクロンオーダーにまで絞り込むことが可能であるため、従来は解析困難であった複雑な構造の組織にも適応できる。したがって、汎用性の高い技術として幅広く利用されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：To gain insights into tissue-specific gene expression in multicellular systems, spatial information is required and precisely linked with gene expression profiles. Here, we have developed a novel high-resolution spatial transcriptomics technology, photo-isolation chemistry (PIC), which is able to isolate gene expression profiles only from photo-irradiated region out of whole tissues. This is a method in which a tissue section is annealed with a photocleavable blocker modified caged oligo DNA, and after a reverse transcription reaction, photo-irradiation is performed on a region of interest on the section to obtain gene expression information only from that region.

研究分野：システムゲノム科学

キーワード：RNA-seq 光学技術 トランスクリプトーム 遺伝子発現解析 空間トランスクリプトミクス

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

生体組織には様々な細胞種が存在しているが、たとえ同一ゲノムを有していたとしても、組織や細胞タイプごとに固有の遺伝子発現を示している。そのため個体や臓器を丸ごとすり潰して解析するのではなく、特定の細胞タイプ集団を分取して解析する必要がある。一般的な分取法として、フローサイトメーターを用いた細胞ソーティング (FACS) や Laser microdissection (LMD) が用いられるが、FACS ではレポーター遺伝子の挿入や酵素処理による生化学的・物理的ダメージに加え、空間位置情報の復元ができないといった問題がある。一方、LMD では空間情報は記録されるものの、100 μm オーダーの空間分解能しか得られない。すなわち、特定の細胞集団を高分解能でかつ非侵襲に分取することは容易ではない。

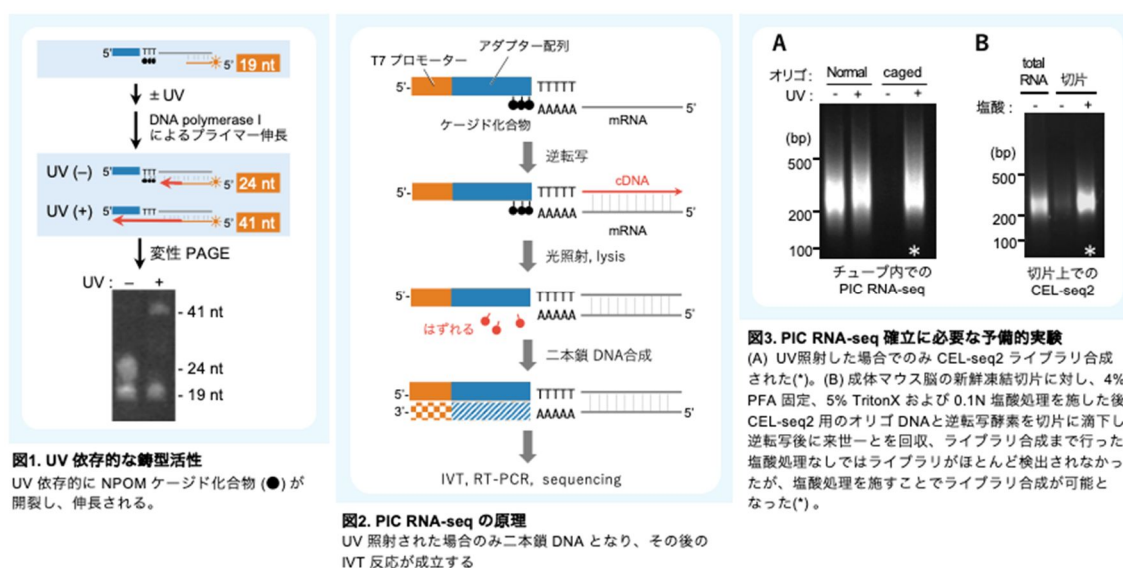
2. 研究の目的

本研究では、従来のような「分取」技術に依存しない、組織切片上の特定領域に光照射するだけでその領域の遺伝子発現情報を取得できる非侵襲、簡便性、空間分解能に優れ、かつ空間位置情報と遺伝子発現情報の対応づけが可能な新たな手法、Photo-Isolation Chemistry (PIC) を開発する。

3. 研究の方法

(1) PIC RNAseq の確立

原理証明実験



本研究の開発にあたり、UV 開裂型の化学修飾を付加したケージドヌクレオチドに着目した。オリゴ DNA にさまざまな化学修飾を施し、DNA ポリメラーゼによる UV 依存的な伸長反応を検討したところ、6-nitropiperonyloxymethyl (NPOM) というケージドヌクレオチドが UV 依存的に鋳型活性を示すことを見出した(図1)したがって、RNA-seq に用いるオリゴ DNA にこのケージドオリゴヌクレオチドを挿入することで、UV 依存的なライブラリ合成が可能である。そこで、シングルセル RNA-seq 法の中でも最も検出感度が高い CEL-seq2 (Hashimshony T., *et al Genome Biol* 2016) をベースに本手法を開発することにした。

CEL-seq2 法は、1) オリゴ DNA を用いた mRNA の polyA からの逆転写、2) DNA polymerase I、DNA ligase、RNase H を用いた二本鎖 DNA 合成、3) T7 polymerase により *in vitro* transcription (IVT) 産物の RT-PCR、4) シーケンスおよびマッピングという工程からなる(図2)。つまり PIC RNA-seq では、UV 照射された場合でのみ T7 プロモーター配列まで二本鎖 DNA 合成され、IVT 反応が成立する仕組みになっている(図2)。

そこでまず下記(図3)に示す PIC の確立に必要な条件検討や予備的実験を実施した。

実験 1: NIH3T3 細胞から total RNA を精製し、NPOM を挿入した PIC 専用のオリゴ DNA を用いて逆転写反応後に、UV 照射した。その後、常法通りにライブラリ合成を行ったところ UV 依存的にライブラリ合成された(図3A)。

実験 2: これまでに切片を対象とした CEL-seq2 の報告例がなく、まず切片上で逆転写反応を効

率よくできる系を確立する必要があった。そこで、条件検討を繰り返したところ、未固定のマウス脳を急速凍結し、薄切 (10 μm) 後に 4% パラホルムアルデヒドを用いた固定と界面活性剤および塩酸による透過処理を施すことで、total RNA を対象とした通常の CEL-seq2 と同等のライブラリ量を得ることに成功した(図 3B)。特にここでの塩酸処理は重要で作用機序は不明であるが、切片上での逆転写効率を劇的に向上させる。また、未固定切片のままだと mRNA が切片上から流失してしまうため、軽く固定することも必須であった。

PIC RNA-seq の技術的信頼性の評価 (図 4)

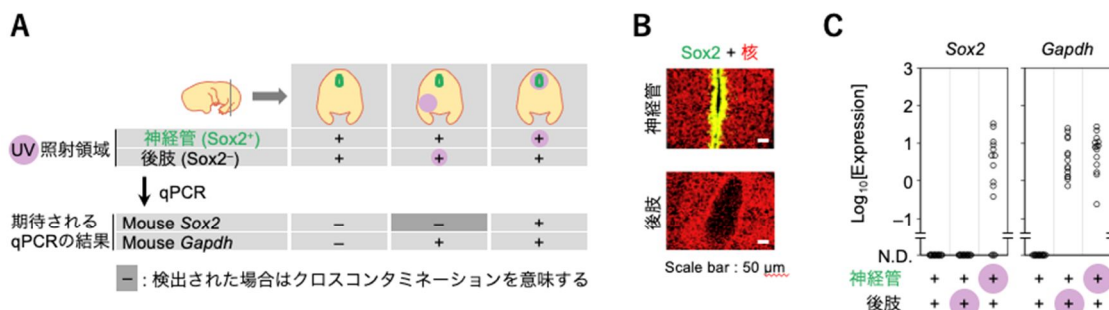


図4. PIC RNA-seq の技術的信頼性の評価

E14.5 マウスの横断面切片を用い ROI 特異的な遺伝子発現のみを単離できるかどうかについて qPCR を用いて評価した。UV 照射した細胞以外のコンタミネーションがないかが評価の鍵となる。(A) 実験のモデル図と期待される qPCR の結果 (B) 実際に光照射した領域 (C) Sox2 と Gapdh に対する qPCR

マウス胚の横断面切片に対してホルマリン固定および透過処理を施し、そこへ PIC 専用の逆転写オリゴ DNA と逆転写酵素を滴下することで切片上での逆転写反応を行なった。その後、抗 Sox2 抗体を用いた免疫染色により神経管の正中線領域を標識し、Sox2 陽性細胞 (神経管) または陰性細胞 (後肢) のいずれかに UV 照射した (図 4A,B)。この実験では 蛍光顕微鏡の 20 倍対物レンズと 365 nm 付近の UV 光を照射できる DAPI 専用蛍光フィルターを活用し UV 照射した。その上で組織切片のすべてのライセートを回収し、T7 プロモーターと Sox2 および Gapdh に対する Taqman-qPCR を行なった (図 4C)。その結果、Sox2 の発現は神経管に UV 照射した場合でのみ検出され (n=11/14)、後肢に照射した場合にはまったく検出されなかった (n=0/14)。一方、Gapdh に関しては、神経管および後肢のどちらに UV 照射しても検出された (n=14/4)。また、UV 非照射サンプルにおいては、Sox2 および Gapdh いずれも検出されなかった (n=0/14) ことから、UV 非照射時のバックグラウンドはほぼゼロといえる。以上の結果より、本手法を用いることで UV 照射した領域のみの遺伝子発現情報を引き出せることを実証した。また、PIC は免疫染色と併用できるため ROI を厳密に定義することができ、FACS で用いられるようなレポーターマウスの作製も不要である。さらに、細胞懸濁の不要なため、フレッシュな状態の発現情報を検出できると考える。

(2) PIC を用いた ROI 特異的な遺伝子の同定

E14.5 マウス胚の神経管領域に対する PIC RNA-seq 解析 (図 5)

発生期の神経管では、背側や腹側から分泌されるタンパク質の濃度勾配によって背腹軸に沿った細胞分化パターンが異なる。これまでに *in situ* hybridization (ISH) や免疫染色により、背腹軸に発現している遺伝子いくつか同定されているが、各領域のサイズの小ささから、その網羅的な発現解析は困難であった。そこで、神経管の背側、中央、腹側に PIC を適応し、各領域で特異的に発現する遺伝子の検出を試みた。上記と同様、PIC 専用の逆転写オリゴ DNA を用いてマウス胚の横断面切片上で逆転写反応を行い、抗 Sox2 抗体を用いた免疫染色により神経管の正中線領域を標識後に、背側、中央、腹側のいずれかの領域に UV 照射した (図 5A)。この実験では 100 倍対物レンズと*蛍光視野絞り (*注釈 市販されている多くの顕微鏡の励起光路に組み込まれているシステムで照射サイズを変えることができる) を活用し、直径 75 μm のスポット状に UV 照射した (図 5A)。また、各照射スポットに含まれる細胞数は約 80 細胞であった。その後は組織切片ライセートをすべて回収し、常法の CEL-seq2 法にしたがってライブラリ合成し、シーケンスを行なった。その結果、いずれの照射領域からも約 1 万前後の遺伝子が検出された (図 5B)。一方、UV なしの場合ではほとんど遺伝子が検出されなかったため、非照射領域からのバックグラウンドはほぼ無視できることが示された。次に、得られた発現プロファイルをクラスタリング解析したところ、照射領域ごとに分離された (図 5C)。また、三郡間の発現量の比較解析より、204 個の遺伝子が発現変動遺伝子 (differentially expressed gene : DEG) として検出された (図 5D)。中でも背側部特異的として検出された遺伝子が多かったため、その中のいくつかの

発現分布を ISH により調べたところ、背側部で強く発現することを確認した (図 5E)。

成体マウス海馬領域に対する PIC RNA-seq 解析 (図 6)

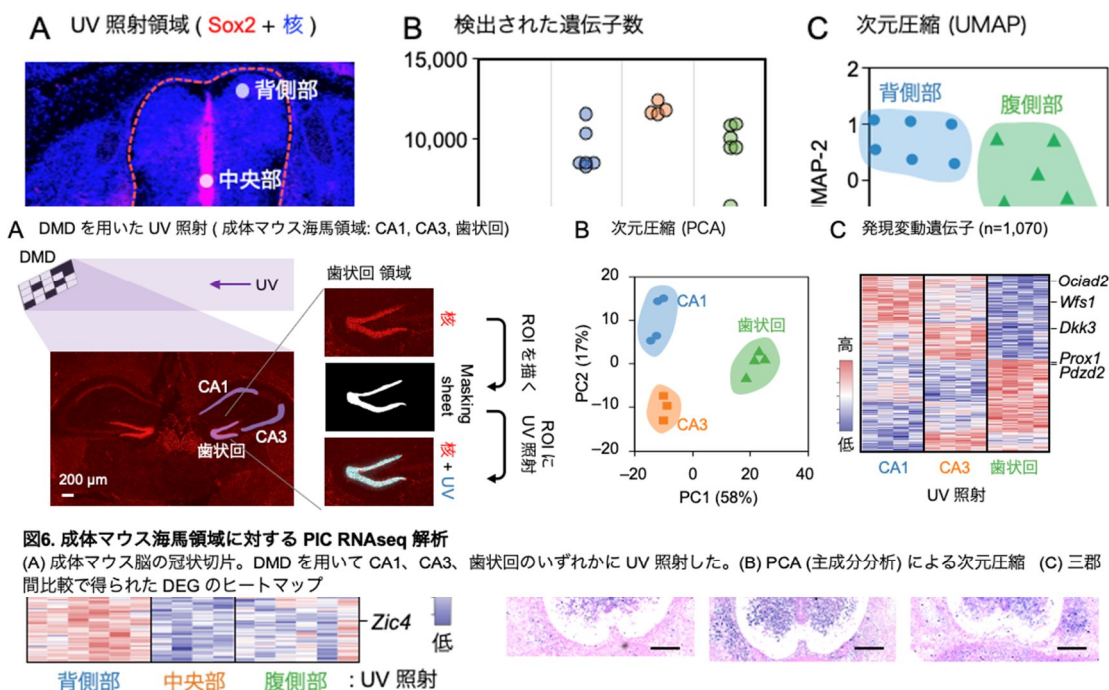


図5. E14.5 マウス神経管領域に対する PIC RNAseq 解析

(A) E14.5 マウスの横断面切片。点線は神経管、白丸は実際に UV 照射した部位を示す。(B) 検出された遺伝子数 (C) 次元圧縮アルゴリズム UMAP 解析 (D) 三郡間比較で得られた DEG のヒートマップ (E) 背側部特異的として検出された遺伝子に対する ISH

PIC を自由な形状の ROI にも適応させるため、デジタルミラーデバイス (DMD) によるマイクロパターン照明を用いて成体マウス脳の海馬領域 CA1、CA3、歯状回のいずれかに UV 照射し、PIC RNA-seq を行なった (図 6A)。得られた発現プロファイルをクラスタリング解析したところ、領域ごとに分離された (図 6B)。また、三郡間比較より 1,070 個の DEG が検出された (図 6C)。以上の結果は、海馬の各領域の遺伝子発現を RNA-seq で調べた既報論文 (Cembrowski MS *et al.*, *eLife* 2016) と比較しても、リーズナブルな結果であることが示された。

HeLa 細胞の各スペックルに対する PIC RNA-seq 解析 (図 7)

核スペックルは mRNA 前駆体のスプライシングなど遺伝子発現と密接に関連する核内構造体の一つとして知られている。また、超解像度顕微鏡や蛍光標識技術の発展により、核スペックル内に polyRNA が豊富に存在することわかりつつあるが、数百 nm の核スペックルだけを正確に分取し、網羅的な発現解析を行うことは不可能であった。しかし、DMD を用いることにより、回折限界のサブミクロンレベルでの光照射が可能である。そこで、5,000 個の HeLa 細胞をカバーガラス上に播種し、接着後に細胞を固定・透過処理し、PIC 専用のオリゴ DNA と逆転写酵素を滴下することで細胞上での逆転写反応を行なった。その後、抗 SC 35 抗体を用いた免疫染色により核スペックルを標識し、100 個の細胞の核スペックル (SC25 陽性) または核スペックル以外の核内領域 (SC35 陰性) に UV 照射し、PIC RNA-seq を行なった (図 7A)。その結果、両者とも約 1 万前後の遺伝子が検出され (図 7B)、なおかつ UMI 数は約 20 万個であったため (図 7C)、検出感度とダイナミックレンジともに優れた結果となった。次に、UV 照射した 100 個の細胞の面積から単位あたりで得られる UMI 数を割り出したところ、 $1 \mu\text{m}^2$ あたり約 200 ~ 300 の転写物を検出できたため、非常に解像度が高いことが示された (図 7D)。また、両者間の発現量比較より 1,990 個の DEG が検出され、その中には核スペックルの主要な構成 RNA である *MALAT1* が含まれていた (図 7E)。この他にも局在が未知の遺伝子が多数確認されたため、その中でも特に発現が高かった *AKRIC2* を RNA-FISH を用いて確認したところ、核スペックルやその周縁に局在することを確認した (図 7F)。以上より、PIC を用いることで数百 nm の領

域からも高感度に遺伝子発現情報を検出できることを実証した。

4. 研究成果

光学と化学を上手く活用することで、光照射した組織切片上の特定領域だけの遺伝子発現情報を高解像度かつ高感度に引き出すことが可能な新たな空間オミクス法、Photo-Isolation Chemistry の開発に成功した (Honda M. *et al.*, *Nat. Commun.* 2021, 図 8)。また、光照射は回折限

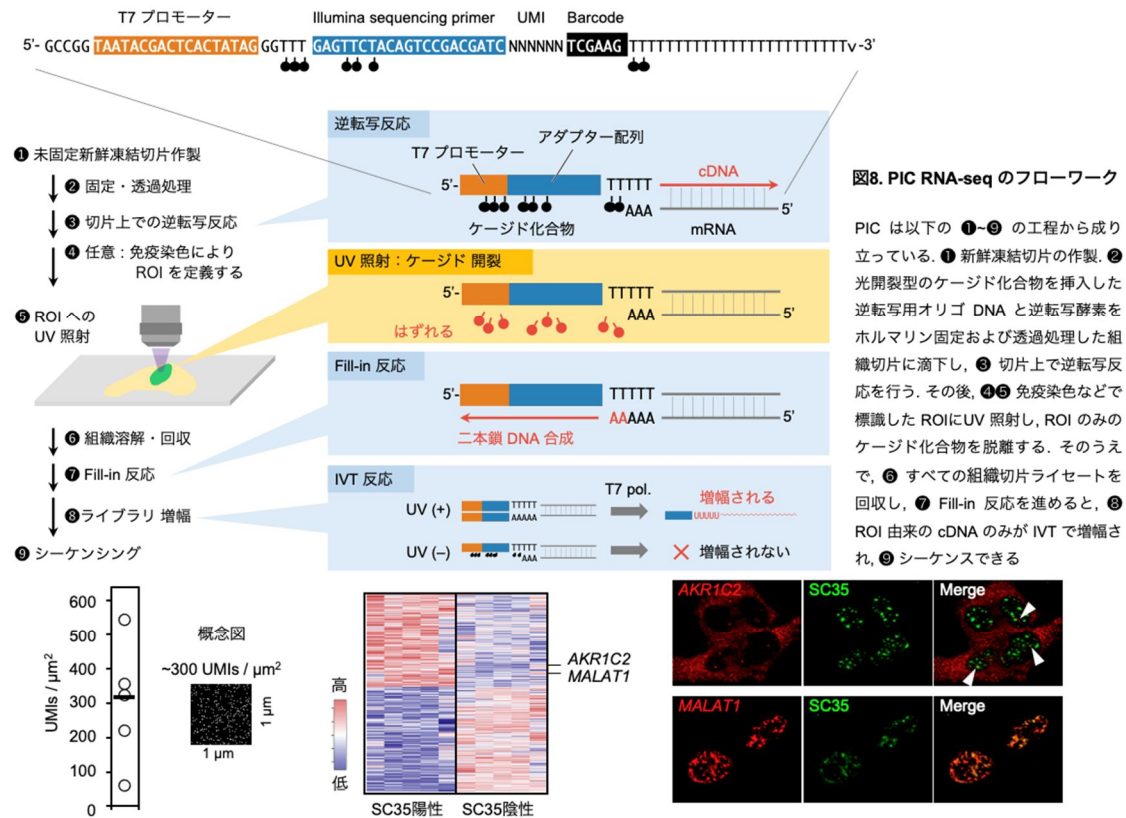


図7. HeLa 細胞の核スペckルに対する PIC RNAseq 解析

(A) SC35 の免疫染色画像を撮影後、imageJ を用いて二値化し、マスクシートを作成、これを DMD のソフトウェアに読み込むことで HeLa 細胞の核内領域、SC35 陽性もしくは陰性のいずれかに UV 照射できる。(B) 検出された遺伝子数 (C) 検出された UMI 数とその概念図 (D) 1 μm^2 あたりの UMI 数 (E) 両者間比較で得られた DEG のヒートマップ (F) 核スペckル特異的と検出された遺伝子に対する RNA-FISH

界のサブミクロンオーダーにまで絞り込むことができるため、これまでに解析が困難であった複雑な組織や核スペckルのような極めて微細な構造の発現解析も可能であることを実証した。今後は、病理切片などにも対応できるよう固定した組織の凍結切片やパラフィン切片への活用も進めていく予定である。

図8. PIC RNA-seq のフローワーク

PIC は以下の ①-⑨ の工程から成り立っている。① 新鮮凍結切片の作製、② 光開裂型のケージド化合物を挿入した逆転写用オリゴ DNA と逆転写酵素をホルマリン固定および透過処理した組織切片に滴下し、③ 切片上で逆転写反応を行う。その後、④⑤ 免疫染色などで標識した ROI に UV 照射し、ROI のみのケージド化合物を脱離する。そのうえで、⑥ すべての組織切片ライセートを回収し、⑦ Fill-in 反応を進めると、⑧ ROI 由来の cDNA のみが IVT で増幅され、⑨ シーケンスできる

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 Honda Mizuki, Oki Shinya, Harada Akihito, Maehara Kazumitsu, Tanaka Kaori, Meno Chikara, Ohkawa Yasuyuki	4. 巻 -
2. 論文標題 High resolution spatial transcriptome analysis by photo-isolation chemistry	5. 発行年 2020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） 10.1101/2020.03.20.000984	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 -

1. 著者名 Honda Mizuki, Oki Shinya, Kimura Ryuichi, Harada Akihito, Maehara Kazumitsu, Tanaka Kaori, Meno Chikara, Ohkawa Yasuyuki	4. 巻 12
2. 論文標題 High-depth spatial transcriptome analysis by photo-isolation chemistry	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	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） 10.1038/s41467-021-24691-8	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 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 2件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 本田 瑞季, 木村 龍一, 原田 哲仁, 前原 一満, 田中 かおり, 大川 恭行, 沖 真弥
2. 発表標題 Photo-Isolation Chemistryによる高解像度の空間的トランスクリプトーム技術
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 本田 瑞季
2. 発表標題 光照射した領域に限定した高深度空間トランスクリプトーム法の開発
3. 学会等名 早稲田大学講演会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mizuki Honda, Shinya Oki, Akihito Harada, Kazumitsu Maehara, Kaori Tanaka, Yasuyuki
2. 発表標題 High resolution spatial transcriptomics method focusing on photo-isolation chemistry
3. 学会等名 CSHL Meeting: Systems Biology-Global Regulation of Gene Expression (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Mizuki Honda, Shinya Oki, Akihito Harada, Kazumitsu Maehara, Kaori Tanaka, Yasuyuki
2. 発表標題 High resolution spatial transcriptomics method by photo-isolation chemistry
3. 学会等名 EMBO/EMBL Symposium: Multiomics to Mechanisms (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mizuki Honda
2. 発表標題 High resolution spatial RNA-seq method focusing on photo-irradiated region
3. 学会等名 Lecture in College of Dentistry, Yonsei university (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 本田 瑞季, 沖 真弥, 原田 哲仁, 前原 一満, 田中 かおり, 大川 恭行
2. 発表標題 光照射した領域に限定可能な高解像度RNA-seq法
3. 学会等名 AMED老化第三回リトリート
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 本田 瑞季, 沖 真弥, 原田 哲仁, 前原 一満, 田中 かわり, 大川 恭行
2. 発表標題 光照射した領域に限定可能な高解像度RNA-seq法
3. 学会等名 次世代脳プロジェクト
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 本田 瑞季, 沖 真弥, 原田 哲仁, 前原 一満, 田中 かわり, 大川 恭行
2. 発表標題 光照射した領域に限定可能な高解像度RNA-seq法
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 本田 瑞季, 沖 真弥, 原田 哲仁, 前原 一満, 田中 かわり, 大川 恭行
2. 発表標題 光照射した領域に限定可能なRNA-seq法
3. 学会等名 第4回 若手の会・技術支援講習会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 沖 真弥, 本田 瑞季	4. 発行年 2020年
2. 出版社 羊土社 実験医学別冊 最強のステップUPシリーズ	5. 総ページ数 270
3. 書名 局所的かつ高深度の空間トランスクリプトーム技術 Photo-Isolation Chemistry	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 オリゴヌクレオチド、オミクス解析方法及びオミクス解析用キット	発明者 沖真弥, 大川恭行	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2019-094216	出願年 2019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
---------	---------