

平成 28 年 10 月 26 日現在

機関番号：36102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860252

研究課題名(和文)細胞レベルでの新規分子病理学的解析・診断ツールの開発と神経変性疾患解析への応用

研究課題名(英文)Development of a new method for molecular pathological analysis and diagnosis
-Application of the new method to analysis of neurodegenerative disease-

研究代表者

中島 健太郎(Nakashima, Kentaro)

徳島文理大学・神経科学研究所・助手

研究者番号：20449911

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、臨床病理の現場で多用されているホルマリンにより固定、保存された病理検体を用いて、従来から行われている組織病理学的解析に加えて、laser capture microdissection(以下LCM)による細胞レベルでの分子病理学的解析を同時に可能にする新規手法を開発した。

「水溶性ポリマーを用いてコーティングした切片のLCMによる分子生物学的解析に最適な免疫組織化学的解析手法」と「脱架橋反応・ゲノムDNAの除去・RNA抽出を同一チューブで行う効率的なRNAの抽出手法」の確立により、固定された組織切片上の神経細胞5個から発現遺伝子(mRNA)の検出が可能となった。

研究成果の概要(英文)：In this work, I developed a new method for combined immunohistochemical and molecular biological analyses at the cellular-scale by laser capture microdissection (LCM) using formalin- or paraformaldehyde (PFA)-fixed tissues that were routinely used in histopathological examinations in clinical medicine.

I optimized immunohistochemical method for LCM and molecular biological analysis using tissue sections coated with a water-soluble polymer that improved cell identification by inhibiting cell shrinkage during drying process of sections. I also established an efficient RNA extraction method that was sequential treatment of isolated specimens by LCM with de-crosslinking, elimination of genomic DNA and extraction of RNA in the same one-tube. These approaches made it possible to detect expressed genes (mRNAs) from 5 cells isolated from PFA-fixed sections of mouse brain by LCM.

研究分野：分子生物学

キーワード：Laser Microdissection LCM 分子病理学 免疫組織化学 遺伝子発現解析

1. 研究開始当初の背景

良質の病理組織学的解析を行う上で、検体の固定操作は必要不可欠であり、臨床病理の現場ではホルマリンによる固定が、また基礎研究分野ではそれ以外にパラホルムアルデヒドやアセトン、エタノール等による固定が一般的に行われている。一方で、急速な技術革新の続く分子生物学の解析対象である DNA や RNA は、固定液中のアルデヒドにより塩基のアミノ基にメチレンブリッジが形成(架橋)され、核酸の回収や、PCR および RT-PCR による検出が困難となることが知られている。さらに、固定液中で長期間保存された核酸は断片化も進んでおり、分子生物学的および生化学的解析を行うためには、新鮮な未固定の病理検体を別途用意する必要がある。このため、これまでに膨大な検体と、その解析情報とが蓄積されてきた組織病理学とは対照的に、分子病理学的解析情報は限られたものしかない。ホルマリン固定された病理検体から遺伝子発現解析を行った報告は極めて限定的で、組織病理学的解析とリンクさせた細胞レベルでの遺伝子発現解析はなされていない。

この2つの解析をリンクさせるため、我々はこれまでに、光学顕微鏡下でレーザー光により組織切片上の目的とする領域や細胞のみを切り出すことのできる Laser Capture Microdissection (LCM) system を用いて、組織切片上の細胞や微小領域を対象とした特定遺伝子の定量的な発現解析や、微量蛋白のウェスタンブロットングによる生化学的解析のための技術開発を進めてきた。これらの結果、従来手法では明らかにできなかった微小領域におけるタンパク質の発現変動を解析することが可能となった(図 A)。

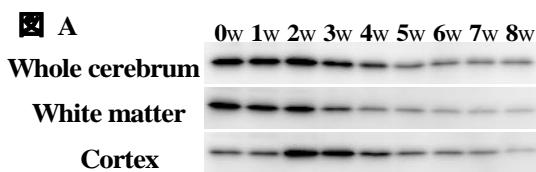


図 A; マウス大脳の切片から白質と大脳皮質を単離し、LDM (CYP51)の生後発現変化を微量スケールのウェスタンブロットにより解析した。白質と皮質を分けて解析することで、発現パターンの定量的な違いが明確になった。

さらに、アルデヒドにより固定された検体からゲノム DNA の除去、細胞レベルでの遺伝子発現解出を同一チューブで連続的に行う、効率的な RNA 回収方法を確立した(図 B)。

本申請研究では、これまでの改良に加え、断片化した RNA の効率的な増幅手法を開発し、免疫組織染色により組織病理学的解析を行った切片上の特定細胞の遺伝子発現解析を可能とする手法の開発と評価、ならびに臨床病理診断への応用を検討した。

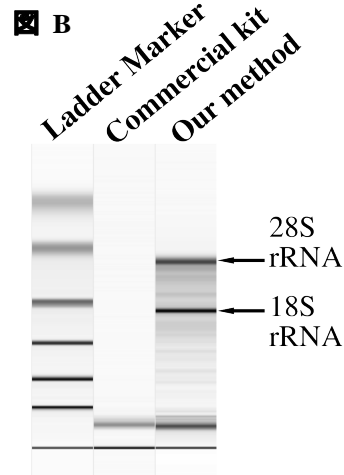


図 B; パラホルムアルデヒドにより固定したマウス大脳皮質の厚さ 8 μ m の切片から回収した total RNA (面積; 0.06 mm² 相当量) の Agilent 2100 Bioanalyzer での解析。一般的な精製キットに比べ我々の手法は非常に回収効率が高い。

2. 研究の目的

本研究の目的は、臨床現場で多用されているホルマリンにより固定、保存された病理検体から、組織病理学的解析と細胞レベルでの分子病理学的解析を同時に可能にする新規手法を開発し、病因解析へ応用することである。

この新規解析手法では、組織病理学的解析によって特定した少数の細胞における遺伝子発現解析が可能となり、新たな分子病理学的解析手法となることが期待できる。特に、多様な細胞が複雑に混在している神経系での本手法の有用性は極めて高く、これまで困難であった特定の神経細胞またはグリア細胞における網羅的な遺伝子発現解析が可能となる。また、これまでに蓄積された病理検体の再解析も可能となるため、その応用範囲は非常に広範にわたることが期待される。

3. 研究の方法

(1) LCM および分子生物学的解析に最適な免疫組織化学的解析手法の確立

タンパク質の局在解析に最適な免疫組織化学では、解析対照であるタンパク質を死後変化から保護し、局所からの散逸を防ぐ目的で、ホルマリンやパラホルムアルデヒド (PFA) による固定操作が一般的に行われる。しかし、ホルマリンやパラホルムアルデヒド (PFA) のアルデヒド基により架橋されてしまった核酸は、抽出効率や RT-PCR、PCR の反応効率が著しく低下してしまうため、定量的な発現解析を主眼とする分子生物学的解析には不向きとされてきた。そのため、分子生物学的解析を念頭においた免疫組織学的解析手法はこれまでほとんど検討されてこなかった。そこで、我々は遺伝子発

現解析の対照である RNA (mRNA) の分解と断片化を最小限に抑えた組織切片の作製と免疫組織染色手法を検討した。

(2) 水溶性ポリマーを用いた切片のコートイングの検討

既存の LCM system では紫外領域に吸収を持つポリエチレンナフタレート製のフィルムの上に組織切片を貼付け、波長 350nm 付近 (紫外領域) のレーザーにより目的領域のフィルムを切断することで、その上にある組織片を回収している。そのため、組織片やフィルムを十分に乾燥させなければ、水の表面張力により効率的な組織片の回収ができない上に、内在性の RNase により検体中の RNA が分解されてしまう。しかし一方で、組織切片の乾燥過程では、細胞の収縮や脱落により、高倍率での観察によっても細胞の確認が困難となってしまう。そこで、免疫染色によって特定の細胞のみ可視化した組織切片を、その後の RNA 回収の障害とならない水溶性ポリマーによりコートイングすることで、この問題が改善できると考え、検討した。本実験では、顕微鏡観察が可能な屈折率を持ち、乾燥後透明なフィルムを形成するポリビニルアルコールやポリビニルピロリドンなどの水溶性ポリマーをベースに、350nm 付近に吸収帯をもつベンゾフェノン系の紫外線吸収剤を添加して検討した。

(3) 骨組織に応用可能な脱灰処理を含む組織の固定・染色手法の検討

骨組織の組織病理学的解析では、一般的に脱灰処理によるカルシウム塩の溶出除去が行われるが、この過程で RNA の断片化も進んでしまうため、RNA を保護しながら脱灰処理を行う必要がある。本実験では PFA による固定処理と二価イオンのキレート剤である EDTA による脱灰処理を同時に行う手法と、PFA による固定処理をした後に高濃度の硫酸アンモニウム溶液に EDTA を溶解させた溶液を用いて脱灰処理を行う手法を比較検討した。

(4) PFA により固定・免疫染色された組織切片からの RNA の抽出と検出

固定された組織からの核酸の抽出では、脱架橋の程度と核酸の断片化の程度によって得られる核酸の質が左右され、処理ステップ数の多少によりその回収量が影響を受ける。そこで、可能な限り処理ステップを少なくするため、核酸の抽出・脱架橋反応・ゲノム DNA の分解反応を同一チューブで行う手法を検討した。4%PFA により固定したマウス小脳を厚さ 20 μm に薄切し、プルキンエ細胞のマーカーである Spot 35 / Calbindin-D-28K の抗体を用いて免疫染色した後、LCM に

より、免疫活性の認められるプルキンエ細胞を 5、10、50 個ずつ回収した。回収した細胞からの核酸の抽出・脱架橋反応・ゲノム DNA の分解反応を同一チューブで行い、精製した後、T7 RNA polymerase を用いて、得られた RNA を増幅した。市販されている LCM 用の RNA 抽出キットでも同数の細胞を回収し、RNA 増幅を行った。得られた RNA を鋳型とした One-step RT-PCR により回収効率を比較検討した。

(5) 新規解析手法の有用性のモデル実験動物での評価

～脳の特定領域における遺伝子発現定量解析への応用～

これまでに我々は、本研究課題とは別に、脂質代謝関連遺伝子 (Stearoyl-CoA desaturase; SCD) の脳内における機能的役割について、cuprizone を投与することによる実験的脱髄・髄鞘再生モデルマウスでの解析を進めてきた。本実験では、前項までの検討で開発してきた手法の有用性を、野生型および実験的脱髄・髄鞘再生モデルマウスの脳の白質と大脳皮質における SCD の定量的遺伝子発現解析により検討した。実験的脱髄・髄鞘再生モデルマウスは、C57BL/6J マウスに 0.3% の cuprizone を含む粉末飼料を 6 週間投与し脱髄を起こさせた (cuprizone-6w ; 脱髄期) 後、通常飼料を 1~4 週間投与 (recovery-1~4w ; 髄鞘再生期) することで作製した。

4. 研究成果

(1) LCM および分子生物学的解析に最適な免疫組織化学的解析手法の確立

遺伝子発現解析の対象である核酸 (特に RNA) の分解・断片化を防ぐために検討を重ねた結果見出された、適切な免疫染色方法のガイドラインを以下に列挙する。

1 PFA による固定時間を最小限 (16 時間以内) にし、過固定にならないように注意する。

4%PFA で浸漬固定する場合、組織の大きさにも因るが 5 mm 角程度の大きさで 8~12 時間程度であれば、効率的に RNA を抽出することができた。固定液に浸漬する時間が長くなると (3 日以上) 時間とともに抽出効率が下がり、さらに RNA の断片化も進み、RT-PCR による検出効率が低下した。

2 抗体反応時の抗体濃度を高くし、反応時間を短くするとともに、抗体反応液には RNase 阻害剤を添加し染色作業中の RNA の分解を最小にする。

水溶液中では時間の経過とともに RNA の断片化 (もしくは分解) が進むため、抗体反応液に RNase 阻害剤 (1 unit/ μL 、

RNasin[®] plus RNase Inhibitor; Promega) を添加し、1 次抗体、2 次抗体の抗体反応時間は室温で 2 時間程度とした場合、良好な結果が得られた。RNase 阻害剤はタンパク質であり、抗体溶液に混入している RNase を不活性化しているだけでなく、抗体溶液へ添加することで、一般的な抗体希釈液に含まれる bovine serum albumin (BSA) のように、希釈された抗体を安定化するものと考えられる。

3 PBS 等の試薬は RNase free のものを使用する。

免疫染色に用いる試薬は全て Diethylpyrocarbonate (DEPC) により RNase を不活性化したもの、または、RNase-free が保証された市販試薬を用いる。

4 染色後は PB もしくは超純粋で余分な塩を除去した後、十分に乾燥させる。

LCM は乾燥させた状態で行うため、塩が残っていた場合、結晶が析出してしまい、LCM を阻害する。

5 切片を保管する場合は、シリカゲルを入れた箱に密閉し、-80 で保管する。

湿度が高い環境で LCM を行ったり、シリカゲルなしで切片を保管した場合、良好な結果が得られなかったことから、切片中の僅かな水分により RNA の分解・断片化が進んでしまうことが予想された。

(2) 水溶性ポリマーを用いた切片のコーティングの検討

水溶性ポリマーとして Poly(vinyl alcohol) (平均分子量: 13,000~23,000 [Cat. No.; 348406, SIGMA-ALDRICH]、平均分子量: 30,000 ~70,000 [Cat. No.; P8136, SIGMA-ALDRICH]、平均分子量: 146,000~186,000 [Cat. No.; 363065, SIGMA-ALDRICH]) と Polyvinylpyrrolidone (平均分子量: 360,000 [Cat. No.; P5288, SIGMA-ALDRICH]、平均分子量: 10,000 [Cat. No.; PVP10, SIGMA-ALDRICH]) をベースに紫外線吸収剤である 2, 2', 4, 4'-Tetrahydroxybenzophenone、p-Phenylenediamine、Ethyl 2-Cyano-3, 3-diphenylacrylate、2-(2-Hydroxy-5-methylphenyl)-benzotriazole、1-(4-tert-butylphenyl)-3-(4-methoxyphenyl)-1,3-propanedione (avobenzone) を添加し、様々な混合比、混合数、溶剤の検討を行った。その結果、紫外線吸収剤としては溶剤への溶解性と着色の程度が許容範囲であり、紫外線レーザーによる切断効率も良好であった 0.1 ~ 1 % 2, 2', 4, 4'-Tetrahydroxybenzophenone が検討した中では最良であった。また、水溶性ポリマーでは、硬化後も粘性が高かった Poly(vinyl alcohol) に比べ、Polyvinylpyrrolidone がレーザーによる切断効率も良好であった。ポリマー分子量

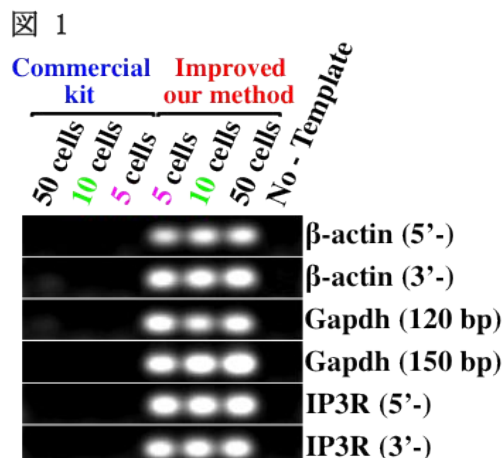
は、適度な粘性を得るために高分子量と低分子量のものを混合したほうが良好な結果が得られ、その各濃度は 1~5% であり、合計で 3~10% に調製した場合に良好な結果が得られた。これらを溶解する溶剤は、溶解性と速乾性の点から 30~50% エタノールの水溶液が最適であった。しかし、コーティングした場合はレーザーによる切断効率が低下してしまうため LCM 時のレーザー出力を上げざるを得ず、回収する組織切片へのダメージが懸念されることから、さらなる検討が必要と考えられた。

(3) 骨組織の分子生物学的解析に応用可能な脱灰処理を含む組織の固定・染色手法の検討

固定処理に用いる 4% PFA 溶液に 250~500 mM EDTA を加えた溶液を用いてマウスおよびラットの頭蓋骨を脱灰処理した場合、処理には 2~3 日かかるため、その間に RNA の断片化が進んでしまい検出効率が大幅に低下した。これは RNA の断片化に加え、過固定による脱架橋効率が低下したことが原因ではないかと考えられる。一方で、4% PFA で一晩 (8~16 時間) 浸漬固定した後、250 mM EDTA を含む飽和硫酸アンモニウム溶液で 2~3 日間脱灰処理した場合、4% PFA を含む EDTA 溶液 (硫酸アンモニウムなし) で固定と脱灰処理を同時にした場合に比べ良好な結果が得られた。これは、十分量の塩により細胞内で核酸が凝集沈殿した状態になり外環境から保護されたことに加え、RNA 分解酵素などの酵素活性が高濃度の塩により阻害されたためではないかと考えられる。

(4) PFA により固定・免疫染色された組織切片からの RNA の抽出と検出

細胞で比較的発現量の多い β -actin と Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (Gapdh)、プルキンエ細胞で発現量の多い Inositol trisphosphate receptor (IP3R) 遺伝子の特異的プライマーを用いて One-step RT-PCR により各遺伝子を増幅した結果、



同一チューブで核酸の抽出・脱架橋反応・ゲノム DNA の分解反応を行う我々の手法では、プルキンエ細胞 5 個から各遺伝子を検出できた (図 1)。一方で、市販されている LCM 用の RNA 抽出キットを用いた場合には、プルキンエ細胞 50 個で、 β -actin と Gapdh を辛うじて検出できたのみであった (図 1)。

(5) 実験動物を用いた新規解析手法の有用性の評価

～脳の特定領域における定量的遺伝子発現解析への応用～

SCD はステアリン酸やパルミチン酸などの不飽和脂肪酸からオレイン酸やパルミトレイン酸などの一価不飽和脂肪酸の生成に関わる酵素であり、ヒトでは 2 つの (SCD1、SCD5)、マウスにおいては 4 つのアイソフォーム (SCD1 ~ 4) が同定されている。マウスの神経系では SCD2 が主に発現していることが知られているが、SCD1 と SCD2 の発現量比についてはこれまで報告されていないことから、正常成熟マウスの海馬錐体細胞層と放線状層、大脳皮質を LCM により取分け、real-time PCR により SCD1 と SCD2 の発現量比を比較した。その結果、海馬錐体細胞層と放線状層、大脳皮質における SCD2 の発現は SCD1 に対してそれぞれ 8.2 倍、11.8 倍、33.5 倍であった。また、SCD1 と SCD2 を両方とも認識する抗体を用いた免疫組織学的解析により、髄鞘を形成するオリゴデンドロサイトの他に神経細胞において強い SCD の免疫活性が認められたことから、神経細胞で発現している SCD は主に SCD2 であることが明らかとなった。次に、実験的脱髄・髄鞘再生モデルマウスの脱髄期 (cuprizone-6w) と髄鞘再生期 (Recovery-5w) におけるオリゴデンドロサイトでの SCD1 と SCD2 の発現変化を調べるため、通常餌を与えた対照マウスと実験的脱髄・髄鞘再生モデルマウスの白質を LCM により単離し、real-time PCR により SCD1 と SCD2 の発現変化を比較

した。その結果、脱髄期と髄鞘再生期における SCD2 の発現量は、それぞれ正常マウスに対し 1.5 倍と 3.0 倍と増大していることが明らかとなった (図 2)。一方で、SCD1 の発現量は、それぞれ正常マウスに対し 0.6 倍と 1.4 倍と SCD2 に比べその変化量は小さかった。髄鞘のマーカーである FluoroMyelin Green (Life Technologies) を用いた組織染色により脱髄の程度を調べた結果、正常時に比べ脱髄期と髄鞘再生期では髄鞘がそれぞれ 6% と 33% 程度に減少していた。また、SCD2 に特異的な抗体を用いた免疫染色の結果、脱髄期では正常時に比べ、オリゴデンドロサイトと思われる細胞体の数が減少していたが、そこでの SCD2 免疫活性は非常に強いものであった (図 3)。これらの結果から、脱髄期では

図 2 Expression level of *Scd2* mRNA

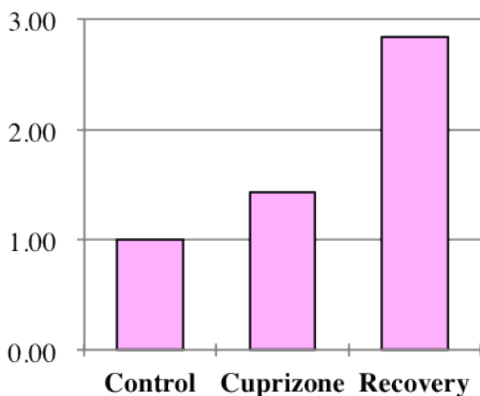
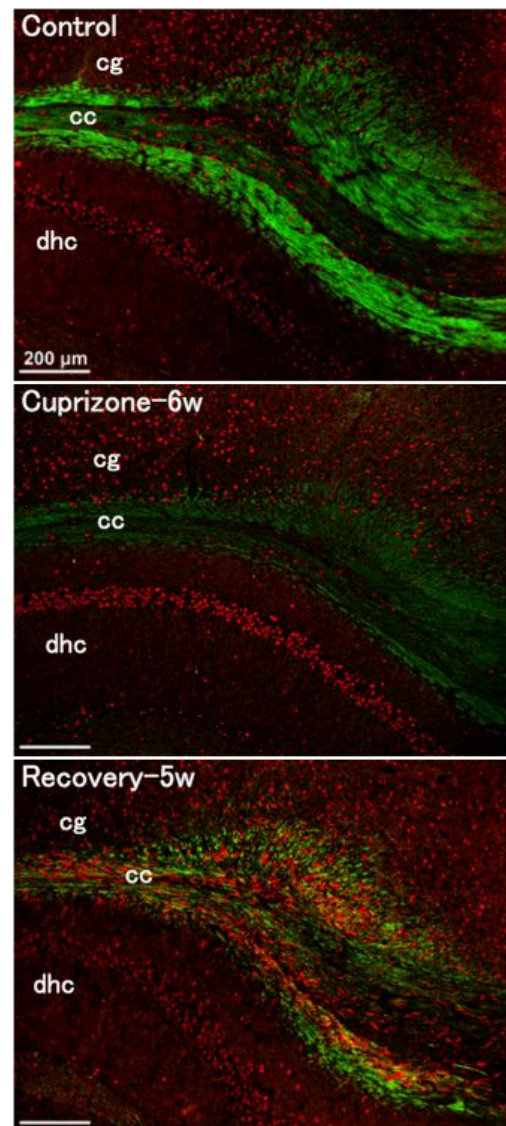


図 3 SCD2 / FluoroMyelin Green



cg: cingulum, cc: corpus callosum
dhc: dorsal hippocampal commissure

cuprizone 投与により脱髄のみならず髄鞘を形成しているオリゴデンドロサイトの

細胞数も減少するが、残ったオリゴデンドロサイトにおける SCD2 の発現は増大しており、髄鞘再生期にはオリゴデンドロサイトの細胞数の増大に伴い、SCD2 の発現量も大幅に増大するものと考えられた。これは、髄鞘を構成する脂質の合成において、SCD が非常に重要な役割を果たしていることを示唆している。

本研究で進めてきた固定された病理検体から組織病理学的解析と分子生物学的解析を同時に進める新たな分子病理学的解析手法により、それぞれの解析単独では見えてこなかった新たな知見を得ることができ、その有用性が明らかとなった。

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)

[学会発表](計 3件)

- (1) 中島健太郎、小原来夢、福井光、藤井理恵、宋時栄
Accelerated remyelination following demyelination induced by cuprizone in a transgenic mouse that shows oligodendrocyte-specific high expression of Lanosterol 14 alpha-demethylase (LDM, CYP51)
第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会 合同大会
2015 年 12 月 2 日
神戸ポートピアホテル・神戸国際会議場・神戸国際展示場・神戸商工会議所(兵庫県・神戸市)
- (2) 中島健太郎、小原来夢、福井光、藤井理恵、宋時栄
Functional analysis of lanosterol 14 alpha-demethylase (LDM, CYP51) in the processes of myelination and remyelination using oligodendrocyte-specific LDM transgenic mouse
第 38 回日本神経科学大会
2015 年 7 月 28 日
神戸国際会議場・神戸国際展示場(兵庫県・神戸市)
- (3) 中島健太郎、福井光、藤井理恵、宋時栄
Expression changes of Stearoyl-CoA desaturase isoforms in neuronal and glial cells during the processes of demyelination and neurodegeneration
第 37 回日本分子生物学会年会
2014 年 11 月 27 日
パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中島 健太郎 (Nakashima Kentaro)
徳島文理大学 神経科学研究所 助手
研究者番号：20449911