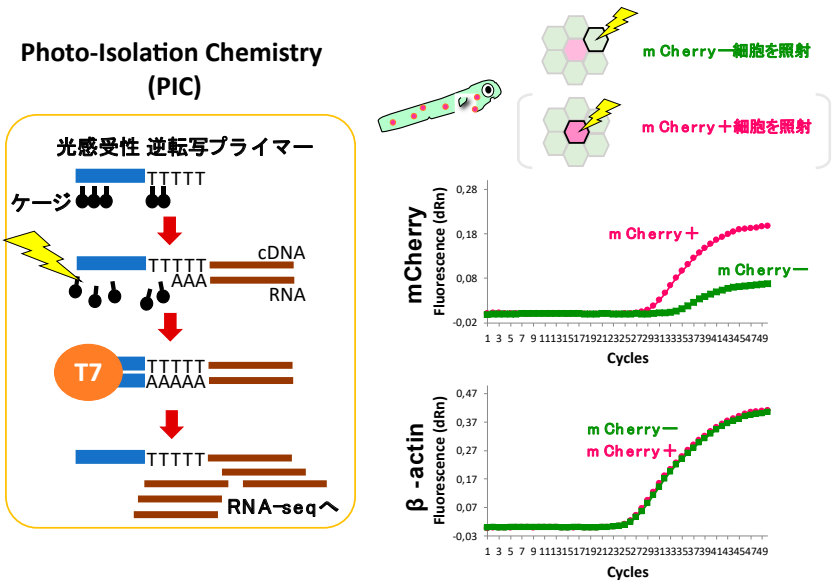
73　単一細胞空間オミクスによる胚細胞品質管理機構の解明	石谷　太

【目的】近年の NGS 解析の発展により、胚発生期に生じた不良細胞が多様な成人疾患の発症に関与することが明らかにされてきている。この事実は、胚の細胞品質が成体の疾患リスクに関わることを示しており、同時に、胚の細胞品質の向上により個体の生涯の疾患発症リスクを低減可能であることを示唆する。一方で我々は最近、動物胚が細胞間コミュニケーションを介して細胞品質を向上させるシステムを備えていることを発見した。具体的には、正常なゼブラフィッシュ胚発生においてシグナル伝達異常細胞など多様な不良細胞が頻繁に自然発生するものの、これらの不良細胞の多くは細胞死を起こして消失することを発見した（Akieda et al., Nat Commun, 2019）。しかしながら、隣接正常細胞が異常細胞の細胞死を促す仕組みの詳細は不明である。また、不良細胞が出現するメカニズムもよくわかっていない。これらを理解するためには、不良細胞と隣接細胞のそれぞれの遺伝子発現・シグナル動態を網羅的に解析し、空間情報を保持したまま実行可能な単一細胞レベルのオミクスが有効であるが、そのような技術は胚の研究において実用例がない。そこで本研究では、オミクス技術開発を行う研究者と異分野連携を行い、最新鋭の空間オミクス技術をゼブラフィッシュ胚解析に実装し、これを用いた解析を行うことで、胚の細胞品質管理機構の包括的理解を目指す。

【方法】小型魚類ゼブラフィッシュへの最新の空間トランスクリプトミクス系 PIC (Honda et al., Nat Commun, 2020) の実装を試みた。また、トランスクリプトミクス系を駆使して、不良細胞内・隣接細胞内それぞれで起こるトランスクリプトーム変化を解析し、不良細胞の出現・感知・排除に関わる分子・シグナルの候補を抽出した。さらに、これら候補分子、候補シグナルの機能改変実験と不良細胞のイメージング解析を併用して行った。これにより、不良細胞の出現・感知・排除のメカニズムの解明を目指した。

【結果】ゼブラフィッシュへの PIC の実装を試み、任意の細胞のトランスクリプトームを取得することに成功した（下図）。また、確立済みのトランスクリプトーム技術とイメージング技術を駆使して不良細胞の出現・感知・排除のメカニズムを解析した。その結果、ゼブラフィッシュ正常発生過程では多様な異常を持つ不良細胞が出現し、これらが品質管理機構によって細胞死誘導されるが、不良細胞の種類を問わず共通して発現誘導される分子が存在し、これが不良細胞の細胞死誘導において重要な役割を果たすことを明らかにした。また、ゼブラフィッシュ稚魚上皮にがん遺伝子 *Ras* の活性化を起こした“がん原細胞”を少数誘導すると隣接正常細胞とのコミュニケーションを経て不可逆的な増殖停止（細胞老化）を誘導され、最終的に上皮から排除される現象も見出した（Haraoka et al., Nat Commun, 2022）。

空間トランスクリプトミクス PIC（左）とゼブラフィッシュへの実装（右）



73. 単一細胞空間オミクスによる胚細胞品質管理機構の解明

石谷　太

大阪大学 微生物病研究所 生体統御分野

Key words：細胞間コミュニケーション，細胞品質管理機構，ゼブラフィッシュ，オミクス

緒　言

ヒトを含む動物の身体は、たった一つの受精卵が分裂増殖を繰り返すことで作り上げられる。それ故、成体を構成する細胞の質は、胚発生期に作られる細胞の質に大きく依存する。興味深いことに、近年の次世代シーケンサー（NGS）解析の発展により、胚発生過程で生じた単一の不良細胞（変異細胞、エピゲノム異常細胞あるいは染色体異常細胞）が増殖してモザイクを形成することで成体においてアルツハイマー病や自閉症、糖尿病などの多様な疾患を引き起こしうることがわかってきた［1〜4］。この事実は、胚の細胞品質が成体の疾患リスクに関わることを示しており、同時に、胚の細胞品質の向上により個体の生涯の疾患発症リスクを低減可能であること（図１下段）を示唆する。一方で我々は最近、動物胚が細胞間コミュニケーションを介して細胞品質を向上させるシステムを備えていることを発見した［5，unpublished］。具体的には、ゼブラフィッシュを用いた独自の定量イメージングにより「正常な胚発生過程において Wnt シグナルなどのシグナル伝達制御が破綻した不良細胞が頻繁に自然発生するものの、これらの不良細胞の多くは細胞死を起こして消失すること」を発見した。さらに、不良細胞を FACS で分取してオミクス解析する技術を開発し、これを駆使して不良細胞の細胞死のメカニズムを解析した。その結果、不良細胞内の Wnt シグナル異常が細胞膜のカドヘリンの量的異常に変換され、結果、隣接正常細胞がカドヘリンの量的異常を感知し、異常細胞に細胞死を誘導することが分かった。興味深いことに、この機構を強制的に破綻させた魚では、不良細胞が排除されずに蓄積し、成長後の個体においてモザイク状の異常を生じた。また、哺乳類胚においても類似の細胞品質管理機構が機能することもわかってきた。したがって、ヒト成体に見られるモザイクは、おそらく、胚の細胞品質管理機構による排除を回避した不良細胞によって発生した、あるいは、細胞品質管理機構の破綻の結果として生じた、と推測される。しかしながら、隣接正常細胞が異常細胞の細胞死を促す仕組みの詳細は不明である。また、不良細胞が出現するメカニズムもよくわかっていない。これらを理解するためには、出現が予測困難な不良細胞とそれらの排除に関わる隣接正常細胞を同時に捉え、それぞれにおける遺伝子発現動態、シグナル動態を網羅的に解析する必要があるが、従来の発生研究の手法ではこれらの実施は困難であり、新たな手法が必要である。

不規則に出現する不良細胞を捉えるためには、ライブイメージングが有効である。具体的には、これまでに独自構築した「細胞の質（シグナル伝達活性、代謝活性など）をゼブラフィッシュ胚において定量的にイメージングする系」［5］が使える。一方で、不良細胞と隣接細胞のそれぞれの遺伝子発現・シグナル動態を網羅的に解析するためには、空間情報を保持したまま実行可能なオミクスが有効であるが、そのような技術は胚の研究において実用例がない。そこで本研究では、最新鋭の空間オミクス技術をゼブラフィッシュ胚解析に実装し、これと独自の不良細胞イメージングを組み合わせた解析を行うことで、胚の細胞品質管理機構の包括的理解を目指す。

方　法

小型魚類ゼブラフィッシュへの最新の空間トランスクリプトミクス系 PIC［6］の実装を試みた。PIC は、光分解性低分子（ケージ化 DNA）の一つである 6-nitropiperonyloxymethyl（NPOM）を挿入した逆転写プライマーを用いて細胞内の RNA を T7 ポリメラーゼによって逆転写して増幅して RNA-seq することにより、光照射した任意の領域の

転写情報を取得する技術である（図 1）。

また、トランスクリプトミクス系を駆使して、不良細胞内・隣接細胞内それぞれで起こるトランスクリプトーム変化を解析し、不良細胞の出現・感知・排除に関わる分子・シグナルの候補を抽出した。さらに、これら候補分子、候補シグナルの機能改変実験と不良細胞のイメージング解析を併用して行った。これにより、不良細胞の出現・感知・排除のメカニズムの解明を目指した。

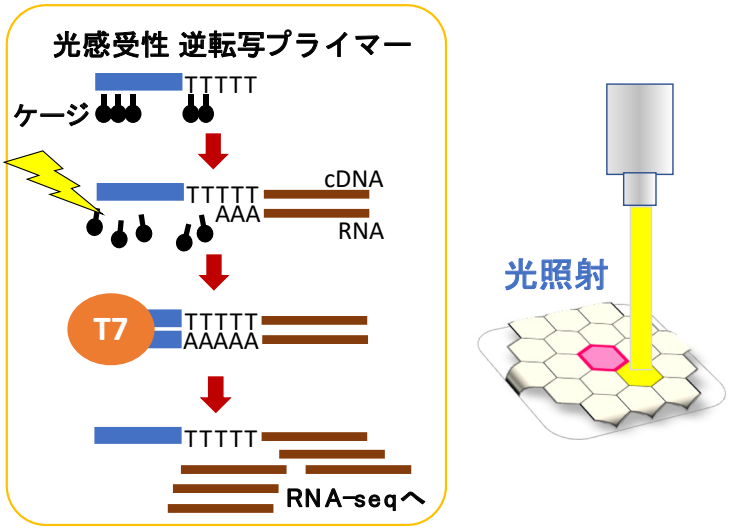


図 1. PIC の原理

PIC において、光照射領域の RNA 情報の取得を可能にする原理を示す。

結果および考察

1. 空間トランスクリプトミクス系のゼブラフィッシュ胚への実装

これまで我々は FACS によって正常細胞と不良細胞を分取し、それぞれの細胞群のトランスクリプトーム解析を行うことで、不良細胞の分子メカニズムを明らかにしてきた。しかし、FACS では細胞の位置情報が失われてしまい、不良細胞の隣の正常細胞について調べることは困難であった。そこで我々は、位置情報が保持できる最新の空間トランスクリプトミクス系 PIC［6］の実装を試みた。まず、ゼブラフィッシュ個体に PIC を適用するための工夫を行った。PIC は培養細胞や凍結切片のような平面のサンプルを対象として使うことを想定して開発された技術であり、今回対象としたいゼブラフィッシュ稚魚の上皮組織（表皮原基）のような曲面には不向きな技術である。具体的には、曲面組織に光照射を行おうとすると、細かく位置を変えながら照射することになり、この操作が極めて困難であった。そこで、スライドガラスで魚を押しつぶし、強制的に組織を平らにすることでこの問題の解決を図ったところ、期待通り、光照射を容易に実施できるようになった（図 2）。

続いて、光照射や RNA 取得の条件検討を行った。最も重要なポイントは、照射した細胞のみの RNA 情報が取得できているか否か、である。それを検討するために、蛍光タンパク質mCherry を発現する細胞をゼブラフィッシュ稚魚上皮にごく少数誘導し、mCherry 発現細胞と mCherry が発現していない細胞のそれぞれに光を照射し、それぞれに RNA を取得し、qPCR により評価した（図 3）。まず、全ての細胞で発現するハウスキーピング遺伝子である β-actin の mRNA は、いずれの細胞から取得した RNA からも等しく検出された。この事実は、PIC により RNA を取得することに成功したことを示唆する。また、mCherry mRNA の qPCR 解析を行ったところ。mCherry 発現細胞で mCherry 非発現細胞に比べて 50 倍以上の量の mCherry mRNA が検出された。これらの結果から、照射細胞の RNA を特異的に検出できる系が確立できたと結論付けた。

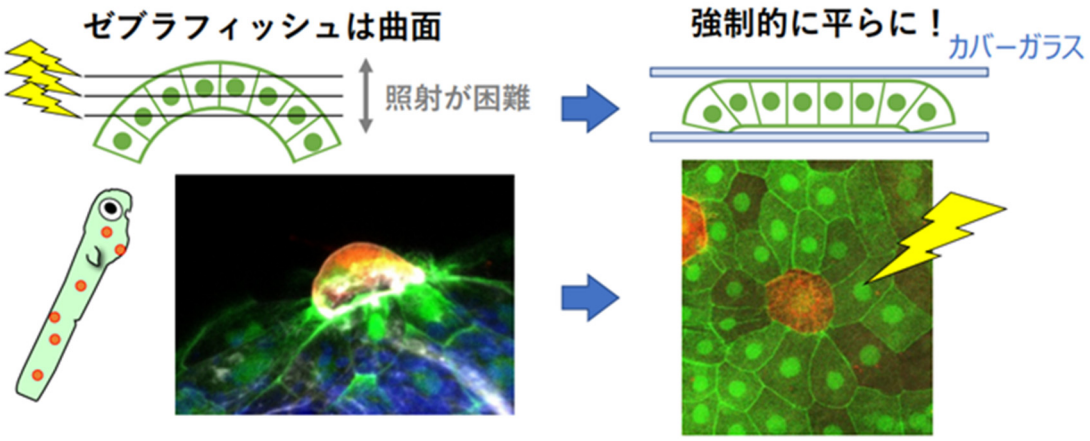


図 2. ゼブラフィッシュ個体に PIC を適用するための工夫

ゼブラフィッシュ稚魚の上皮（皮膚原基）は左図のように曲面であり、光照射が困難であったが、カバーガラスで押しつぶすと右図のように平面となり、光照射が容易となった。写真では、緑色で正常上皮細胞をラベルしており、排除される不良細胞をオレンジ色でラベルして示した。

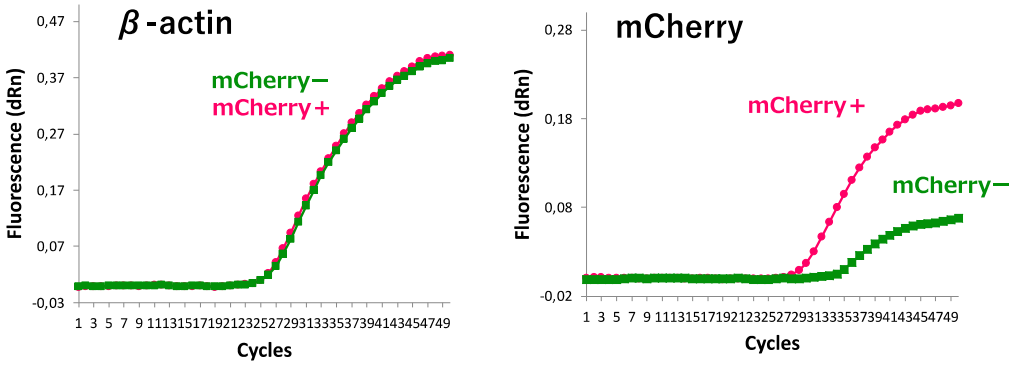


図 3. ゼブラフィッシュ個体から PIC で取得した RNA の増幅

ごく少数の mCherry を発現する細胞を導入したゼブラフィッシュ稚魚の上皮（皮膚原基）の mCherry 発現細胞（マゼンタ色）と mCherry が発現していない細胞（緑色）のそれぞれに光を照射し、それぞれに RNA を取得し、RNA が適切に取得できているかを β-actin の qPCR（左）で確認し、また、mCherry を含む RNA が適切に取得できているかを mCherry の qPCR（右）で確認した。

現在、ゼブラフィッシュ個体に蛍光ラベルした不良細胞を人為的に誘導して隣接細胞による排除を誘導する系を複数構築し、この系を用いて、不良細胞の隣接細胞の PIC 解析に取り組んでいる。この過程で、ゼブラフィッシュ稚魚上皮に Ras 変異細胞（ヒトのがんの 30%で見られるがん遺伝子 *Ras* の活性化を起こした“がん原細胞”）を少数誘導すると隣接正常細胞とのコミュニケーションを経て不可逆的な増殖停止（細胞老化）を誘導され、最終的に上皮から排除される現象を見出し［7］、この系と上述の Wnt シグナル異常細胞排除の系を対象に PIC 解析を進めている。今後、この系を駆使して、これまでに未知であった隣接正常細胞が不良細胞を感知するメカニズムを明らかにしていきたい。

2. 胚の細胞品質管理機構の分子基盤解明

上述の新規空間トランスクリプトミクス系を構築する一方で、構築済みのトランスクリプトミクス系（FACS を利用した方法）を駆使して、不良細胞内・隣接細胞内それぞれで起こるトランスクリプトーム変化を解析し、不良細胞の出現・感知・排除に関わる分子・シグナルの候補を抽出した。その結果、転写因子 Foxo3b を新たな制御因子として見出した。Foxo3b は単純な Wnt シグナルの活性化・不活性化では誘導されなかったが、隣接細胞に比べて異常に高い、あるいは異常に低い Wnt シグナル活性を持つ細胞において発現誘導された（図 4）。また、Foxo3b の機能を抑制すると Wnt シグナル異常細胞の排除が抑制された。すなわち、Foxo3b が Wnt シグナル異常細胞の排除に必須の因子であることを見出した。さらに、Foxo3b が細胞品質管理機構の共通マーカー分子となることも突き止めた。具体的には、我々はこれまでに、ゼブラフィッシュ胚において Wnt シグナル異常細胞のみならず、*Myc* 遺伝子の発現が低い細胞や Shh シグナル活性が高すぎる細胞あるいは低すぎる細胞が細胞品質管理機構によって感知・排除されることを見出していたが［5, unpublished］、これらの不良細胞は異なる異常性を持つにも関わらず、いずれもその排除の過程で Foxo3b を発現することがわかってきた（unpublished, 投稿準備中）。つまり、Foxo3b を指標とすることで、これまで予測不能で捉えることができなかった不良細胞の出現と排除のプロセスを捕捉することが可能となった。今後は、Foxo3b をマーカーとして用いることで、生理的な細胞品質管理機構の機能と制御をさらに詳細に解析していきたい。

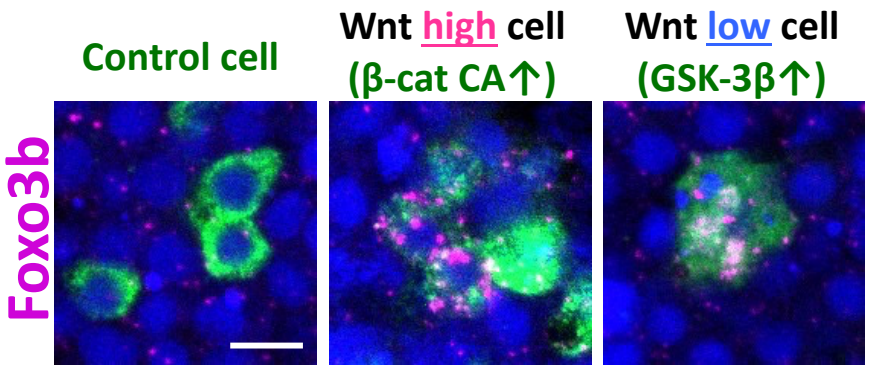


図 4. Wnt シグナル異常細胞における Foxo3b の発現誘導
ゼブラフィッシュ胚に Wnt シグナルが異常活性化した細胞（Wnt high cell：β-catCA と GFP を発現する細胞）あるいは Wnt シグナルが異常不活性化された細胞（Wnt low cell：GSK-3β と GFP を発現する細胞）を導入し、蛍光 in situ hybridization により Foxo3b mRNA の発現を検出した（マゼンタ色）。GFP のみを発現させたコントロール細胞（control cell）では Foxo3b は誘導されなかった（スケールバー：10μm）。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、九州大学生体防御医学研究所トランスクリプトミクス分野の大川恭行教授、原田哲仁准教授である。また、PIC の立ち上げについてご助言いただいた京都大学大学院医学研究科創薬医学講座の沖真弥特定准教授に感謝申し上げます。

文　献

1） Beck JA, Poulter M, Campbell TA, Uphill JB, Adamson G, Geddes JF, Revesz T, Davis MB, Wood NW, Collinge J, Tabrizi SJ. Somatic and germline mosaicism in sporadic early-onset Alzheimer's disease. Hum Mol Genet. 2004 Jun 15;13(12):1219-24. doi: 10.1093/hmg/ddh134. Epub 2004 Apr 28. PMID: 15115757

2) Wei W, Keogh MJ, Aryaman J, Golder Z, Kullar PJ, Wilson I, Talbot K, Turner MR, McKenzie CA, Troakes C, Attems J, Smith C, Sarraj SA, Morris CM, Ansorge O, Jones NS, Ironside JW, Chinnery PF. Frequency and signature of somatic variants in 1461 human brain exomes. Genet Med. 2019 Apr;21(4):904-912. doi: 10.1038/s41436-018-0274-3. Epub 2018 Sep 14. PMID: 30214067

3) Bonnefond A, Skrobek B, Lobbens S, Eury E, Thuillier D, Cauchi S, Lantieri O, Balkau B, Riboli E, Marre M, Charpentier G, Yengo L, Froguel P. Association between large detectable clonal mosaicism and type 2 diabetes with vascular complications. Nat Genet. 2013 Sep;45(9):1040-3. doi: 10.1038/ng.2700. Epub 2013 Jul 14. PMID: 23852171;

4) Geller LN, Potter H. Chromosome missegregation and trisomy 21 mosaicism in Alzheimer's disease. Neurobiol Dis. 1999 Jun;6(3):167-79. doi: 10.1006/nbdi.1999.0236.PMID: 10408806

5) Akieda Y, Ogamino S, Furuie H, Ishitani S, Akiyoshi R, Nogami J, Masuda T, Shimizu N, Ohkawa Y, Ishitani T. Cell competition corrects noisy Wnt morphogen gradients to achieve robust patterning in the zebrafish embryo. Nat Commun. 2019 Oct 17;10(1):4710. doi: 10.1038/s41467-019-12609-4. PMID: 31624259

6) Honda M, Oki S, Kimura R, Harada A, Maehara K, Tanaka K, Meno C, Ohkawa Y. High-depth spatial transcriptome analysis by photo-isolation chemistry Nature Commun. 2021 Jul 20;12(1):4416. doi: 10.1038/s41467-021-24691-8. PMID: 34285220

7) Haraoka Y, Akieda Y, Nagai Y, Mogi C, Ishitani T. Zebrafish imaging reveals TP53 mutation switching oncogene-induced senescence from suppressor to driver in primary tumorigenesis. Nat Commun. 2022 in press