

レーザーマイクロダイセクション (LMD) 法による 凍結組織切片からの細胞採取と nested RT-PCR 解析

小野瀬恵里子¹

筑波大学 人間総合等教育研究支援室 (医学系)

〒305-8575 茨城県つくば市天王台 1-1-1

概要

レーザーマイクロダイセクション (LMD) 法を利用して凍結組織切片から均質な細胞群とシングルセルを採取して、RT-PCR 解析に供与でき得る cDNA の合成を試みました。結果は均質な細胞群については概ね満足できる cDNA を合成することができました。シングルセルから数種類の RT-PCR 解析に供与でき得る cDNA 合成の可能性が確認されました。技術に関してはさらに改善の必要性があります。また今回の研究を通して非常に低濃度の cDNA は凍結融解を繰り返すことで分解してしまう可能性があることを経験しました。

1. はじめに

近年、分子生物学分野では、PCR 法 (ポリメラーゼ連鎖反応による遺伝子増幅) が急速に発達、普及しました。PCR 法の最も画期的な点は、極めて微量なサンプルからでも、特定の領域の遺伝子増幅が可能なことです。そこで PCR 法を用いて疾病に関する遺伝子の探索や発現解析の研究が盛んに行われています。

しかし、たとえばがん組織を用いて研究を行う場合、そのサンプルには相当数の正常細胞も含まれているため、そこから調整した mRNA にはがん細胞由来のものと同様に正常細胞由来のものが混在します。そのため、がん細胞特異的な遺伝子発現解析が妨げられる可能性があります。そこで、より正確な細胞特異的な遺伝子発現解析を行うには、均質な細胞群を単離する必要があります。それには LMD 法を活用することが有効です^[1]。LMD 法の出現により、遺伝子発現解析の世界では組織特異的な解析から細胞特異的な解析へと時代の波は移りつつあります。

私が所属する膠原病リウマチアレルギー内科では各種膠原病の病態形成の理解と特異的治療を目的として、各方面からアプローチしています。全身性エリテマトーデス (SLE)、関節リウマチ (RA)、シェーグレン症候群 (SS) をはじめとする膠原病の病因はいまだに不明であり、臓器障害を伴う慢性炎症が病態生理上の共通した特徴です。

2. 目的

私たちのグループでは SLE における腎臓組織^[2]や RA における滑膜組織、SS における涙腺、口唇唾腺^[3]など病態形成に関与すると考えられる炎症部位の組織特異的な遺伝子発現解析を行ってきました。

今回、より正確で特異的な遺伝子発現解析を行うために LMD 法を利用して炎症部位の組織切片から均質な細胞集団のみを採取しその mRNA を用いた、細胞特異的な遺伝子発現解析の可能性を探りました。膠原病の各種凍結組織切片から炎症部位に浸潤している T 細胞を主体として採取し、その細胞から RNA 精製を行い、RT-PCR 解析に供与でき得る cDNA の合成を試みました。

3. 材料

SLE の腎臓組織 1 検体、RA の滑膜組織 3 検体は筑波大学付属病院で同意を取得し得られた生体組織の一部を使用しました。各組織は LMD に供するまで、OCT コンパウンドに包埋して -80°C で凍結保存しました。

4. メチルグリーン・ピロニン (MPY) 染色による組織中の RNA の確認

実際に LMD 法を行う場合、組織切片中に RNA がどの程度保たれているかを事前に知ることは重要なステップです。一般に MPY 染色が簡易的に使われています。メチルグリーンとピロニンは陽性荷電の塩基性の色素で、核酸中の陰性荷電するリン酸基と結合します。核酸塩基の重合度の大きい DNA は青緑色に染色され、重合度の小さい RNA はピンク色に染色されます。

MPY 染色方法^[4]は、10 μm の厚さに薄切した凍結組織切片をスライドガラスに貼り付け、1 分間風乾します。100% エタノールで 4°C にて 10 分間固定後、DEPC 処理水中で包埋剤を洗い流します。組織周囲の水分をふき取り、MPY 染色液 (武藤化学薬品) を組織上にのせて 4°C にて 30 分間染色します。DEPC 処理水にて洗浄後、検鏡しました。MPY 染色例を図 1 に示します。(A) は RA の滑膜の凍結組織切片です。細胞質がピンク色に染色され組織中の RNA が多いことを示唆しています。左下矢印部分は胚中心様部分ですが核が強く青緑色に染色されており、ピンク色には染まっていません。この胚中心様部分は核分裂が活発に行われているため DNA 量が極めて多いと推測され、RNA が存在していないのではなく、RNA の染色がマスキングされてしまっている可能性が考えられます。(B) は SLE 腎臓組織の凍結組織切片です。この組織は薄切を 3 回繰り返したもので、ピンク色の染色が弱く RNA は分解を起し始めている可能性があります。このような組織切片からの RNA の回収は非常に困難と考えられます。

¹ E-mail: eonose@md.tsukuba.ac.jp; Tel: 029-853-3332

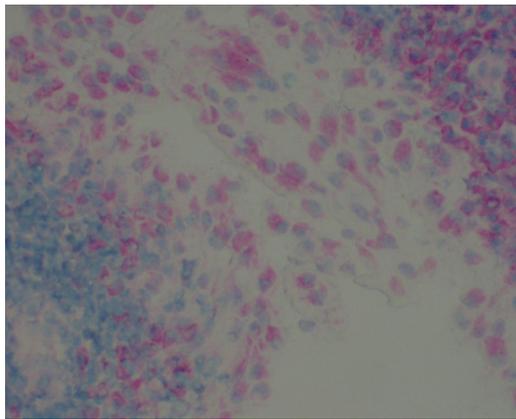


図1-A
RAの滑膜新鮮凍結組織切片
MPY染色

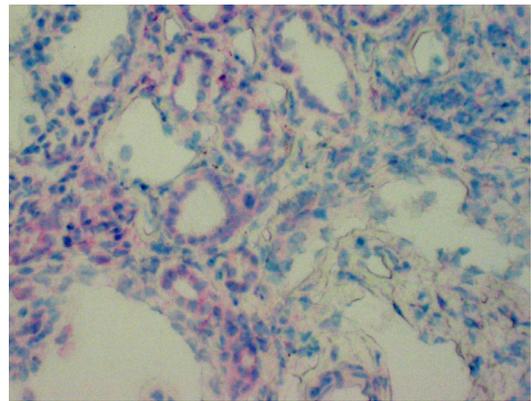


図 1-B
SLE腎組織切片MPY染色
薄切を繰り返した検体

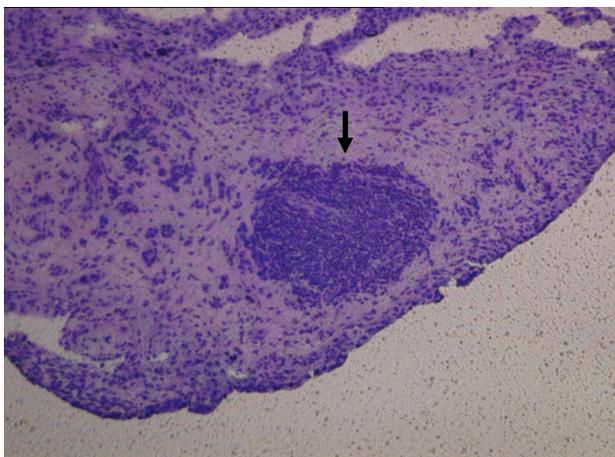


図2-A-1
RA滑膜組織トルイジンブルー染色
LMDによる細胞群採取前

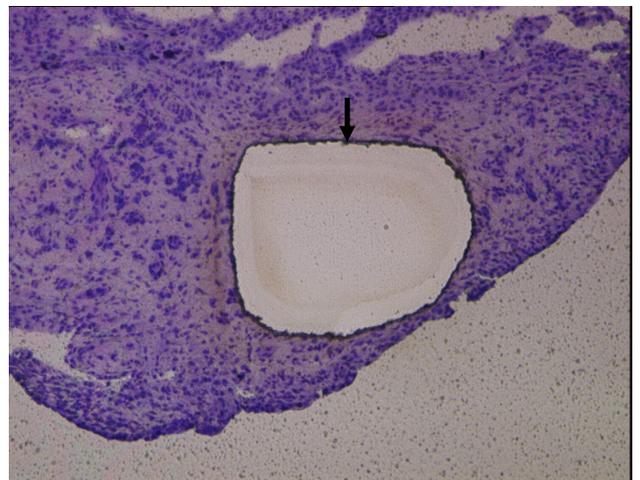


図2-A-2
RA滑膜組織トルイジンブルー染色
LMDによる細胞群採取後

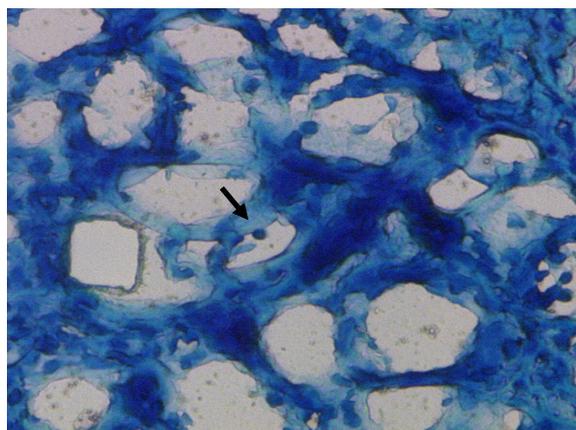


図2-B-1
SLE腎組織トルイジンブルー染色
LMDによるシングルセル採取前

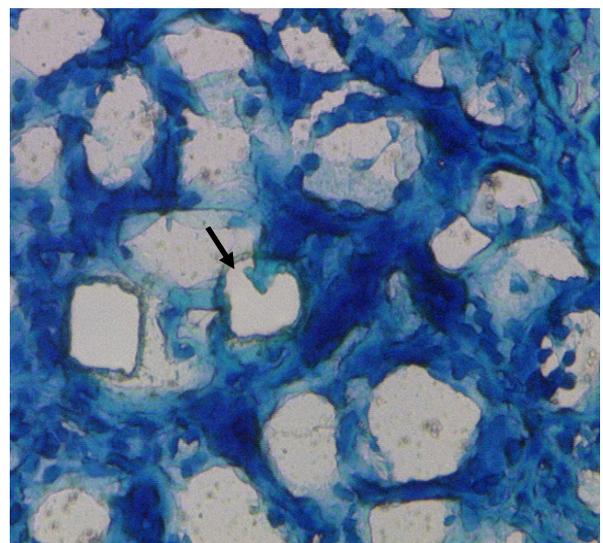


図2-B-2
SLE腎組織トルイジンブルー染色
LMDによるシングルセル採取後

5. LMD による細胞採取

LMD はレーザー光を利用して、組織切片上の目的の細胞のみを光学顕微鏡下で切り取り、採取することができます。その手順^[5]は -80°C で凍結保存された組織をクリオスタットで $10\mu\text{m}$ の厚さに薄切し、フویل付スライドガラスに貼り付けます。スライドガラス上の組織を 70%エタノールで 4°C において 1 分間固定、DEPC 処理水で包埋剤を洗い流した後 0.05% トルイジンブルー溶液 (pH7.0) (Wako) を組織上に乗せて 4°C にて 1 分間染色しました。DEPC 処理水で洗浄後スライドガラスを真空乾燥器内で 10 分間吸引乾燥しました。そのスライドガラスを用いて LMD による細胞採取を行います。

スライドガラスは顕微鏡ステージに組織を貼り付けた面を下向きにセットします。光学顕微鏡画像は PC モニターを見ながら細胞採取したいカットエリアをマウス操作により選択し、レーザーでフویلと共に切り取ります。切り取られた組織は重力により切除物質の収集トレイ上にセットした細胞回収チューブ (0.5ml の PCR チューブ) のふたに落ちます。PCR チューブのふたにはあらかじめ ISOGEN (日本ジーン) $50\mu\text{l}$ を入れておきました (図 2 参照)。図 2-A は RA の滑膜組織切片から胚中心様を切り出した例です。図 2-B は SLE の腎組織切片から尿管管周囲にある細胞をシングルセルで採取した例です。

6. ヒト末梢血単核球 (PBL) を利用した nested RT-PCR 解析

PBL から得た cDNA を使用して希釈試験を行い、nested RT-PCR の解析限界を確認しました。相当細胞個数をそれぞれ $10^5, 10^4, 10^3, 10^2, 10, 1$ コになるように cDNA を段階希釈しました。プライマーはハウスキーピング遺伝子のひとつであるヒト β -actin^[6] に設定したプライマーを用いました^[7]。first PCR で使用した上流プライマーは GGC ATC CTC ACC CTG AAG TA, 下流プライマーは CCA TCT CTT GCT CGA AGC CC で PCR 産物のサイズは 494bp です。PCR 条件は 94°C で 1 分間の熱変性反応、 62°C で 1 分間のアニーリング反応、 72°C で 1 分間の伸長反応の増幅反応を 30 サイクル行いました。nested PCR で使用した上流プライマーは AAA TCT GGC ACC ACA CCT TC, 下流プライマーは AGG GCA TAC CCC TCG TAG AT で PCR 産物のサイズは 240bp です。PCR 条件は 94°C で 1 分間の熱変性反応、 60°C で 1 分間のアニーリング反応、 72°C で 1 分間の伸長反応の増幅反応を 30 サイクル行いました。

結果は増幅した PCR 産物をエチジウムブロマイドを含む 1.2%アガロースゲルにて電気泳動を行いバンドの有無を見ました。結果を図 3 に示します。(A) に示しましたように first RT-PCR 電気泳動の結果 $10^5, 10^4, 10^3, 10^2$ コは 494bp サイズのバンドが検出されましたが、 $10, 1$ コ相当細胞数濃度のテンプレートではバンドが検出されませんでした。

M 1 2 3 4 5 6 7

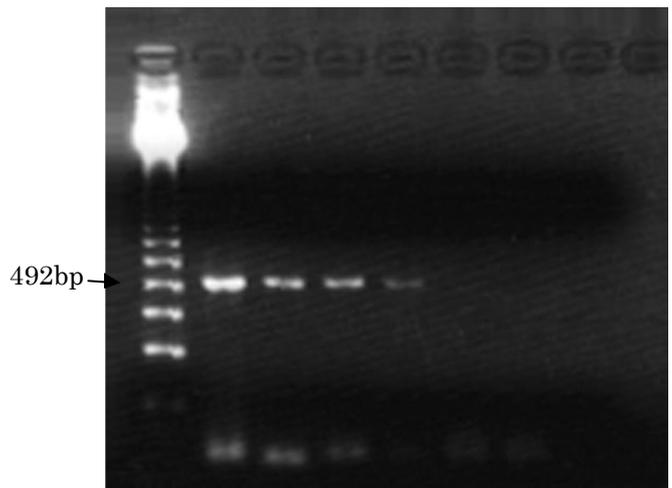


図3-A: β -actin での first RT-PCR の結果
M: 分子量マーカー (123bpラダー)
Lane 1, 2, 3, 4, 5, 6: $10^5, 10^4, 10^3, 10^2, 10, 1$ cell相当
Lane 7: ネガティブコントロール

(B) に示しましたように nested RT-PCR の結果、細胞数が $10, 1$ コも 240bp サイズのバンドが検出されました。ネガティブコントロールとしてテンプレートを加えていない PCR 産物からはバンドは検出されませんでした。

M 1 2 3 4 5 6 7

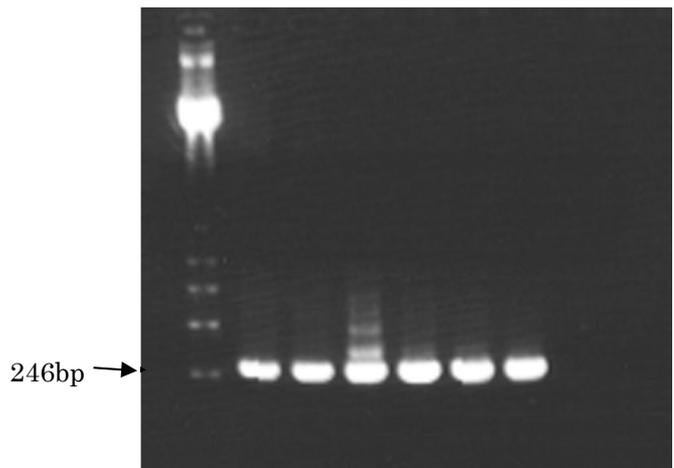


図3-B: β -actin での nested RT-PCR の結果
M: 分子量マーカー (123bpラダー)
Lane 1, 2, 3, 4, 5, 6: $10^5, 10^4, 10^3, 10^2, 10, 1$ コ相当
Lane 7: ネガティブコントロール

(C) に示しましたのは -20°C の凍結保存と融解を3回繰り返したcDNAを用いた nested RT-PCRの結果です。細胞数が1コのPCR産物からはバンドが検出不可能になりました。このことから非常に低濃度のcDNAは -20°C 凍結保存、融解によって分解が引き起こされる可能性が考えられました。

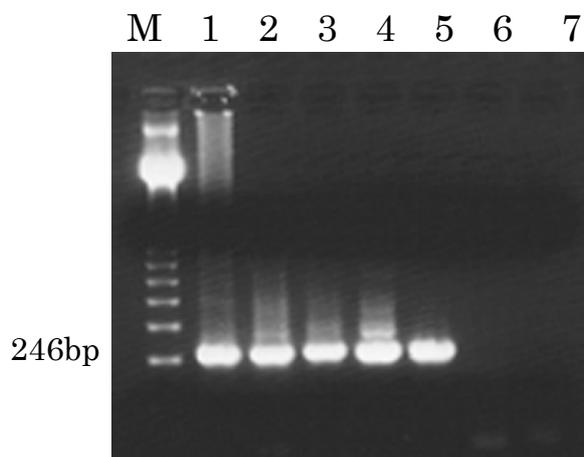


図3-C: 凍結融解を3回繰り返したcDNAを用いた β -actin での nested RT-PCR の結果
M: 分子量マーカー (123bpラダー)
Lane 1, 2, 3, 4, 5, 6: 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10, 1 cell相当
Lane 7: ネガティブコントロール

7. RNA 精製と cDNA 合成

RNA は LMD で採取された細胞から ISOGEN 法を利用して Sgroi ら^[7]の方法を参考にして精製しました。その手順は細胞回収チューブのふたに入っている細胞を含む ISOGEN $50\mu\text{l}$ を新たな 1.5ml チューブに移し変えてボルテックスミキサーで60秒間混合して細胞を完全に破碎しました。クロロホルム $10\mu\text{l}$ を加えてボルテックスミキサーで30秒間混合、スピンドウン後 37°C で、10分間保温しました。 4°C で、 $15,000\text{rpm}$ 、15分間遠心し、分離した2層のうち上層を新しいチューブに移しました。共沈剤としてグリコーゲン $10\mu\text{g}$ と上層容量の0.1倍量の2.5M酢酸ナトリウムと1倍量のイソプロピルアルコールを加えてよく混合して、 -80°C で30分間放置しました。 4°C で $15,000\text{rpm}$ 、30分間遠心し、上清を除き、70%エタノールで沈殿物をリンスしました。10分間真空乾燥を行い、沈殿物を DEPC 水 $11\mu\text{l}$ で溶解して RNA 溶液としました。

M-MLV 逆転写酵素と Oligo(dT)プライマーを用いて一本鎖 cDNA を合成し、さらに cDNA の分解を防ぐために二本鎖 cDNA を合成しました。合成キットは TaKaRa(6130)を使用しました。なお、合成した cDNA は1サンプル当たり $40\mu\text{l}$ に DEPC 水にて希釈して分注後、 -20°C で保存しました。

8. C β nested RT-PCR 解析

T細胞が採取されたことを C β nested RT-PCR^[2]を用いて確認しました。プライマーは T細胞レセプター (TCR) の β 鎖の定常領域である C領域に設定し、nested RT-PCR で確認しました。First PCR の上流プライマーは CCC ACA CCC AAA AGG CCA を、下流プライマーは TTG GAG CTA GCC TCT GGA ATC と CCA GGG CTG CCT TCA GAA を合わせて使用しました。nested PCR のプライマーですが、上流プライマーは first PCR と同じものを、下流プライマーは CAT AGA GGA TGG TGG CAG を使用しました。first PCR、nested PCR 共に PCR 条件は 94°C で1分間の熱変性反応、 55°C で1分間のアニーリング反応、 72°C で1分間の伸長反応の増幅反応を30サイクルずつ行いました。

結果は増幅した PCR 産物をエチジウムブロマイドを含む1.2%アガロースゲルにて電気泳動を行いバンドの有無を見ました。nested RT-PCR の結果の一部を図4に示しました。384bp サイズのバンドが確認できたサンプルを T細胞が採取され、さらに cDNA の合成に成功したと考え陽性とししました。

RA の滑膜組織の中から胚中心様部分から均質な細胞群を LMD で採取し、得た cDNA の T細胞陽性率は平均47.9%でした。

SLE の腎組織のシングルセルから得た cDNA の T細胞陽性率は5%でした (表1参照)。

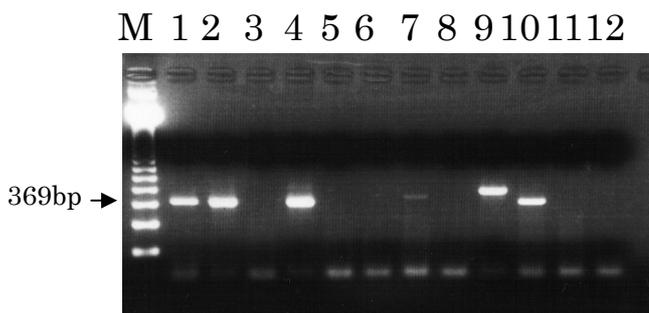


図4: C β nested PCR での結果
M: 分子量マーカー (123bpラダー)
Lane 1, 2, 4, 7, 10: T細胞陽性サンプル
Lane 3, 5, 6, 8, 9, 11, 12: T細胞陰性サンプル

表1. LMD法による細胞採取から得た cDNA の C β nested PCR 解析

組織例	採取検体数	C β -PCR陽性数	陽性率(%)
RA1	24	5	20.8%
RA2	12	8	66.6%
RA3	16	11	68.8%
SLE	20	1	5.0%

9. 考察

近年、LMD法を利用した細胞特異的な遺伝子解析は各種がん組織を用いた研究が活発に行われています^[8]。LMD技術の出現により細胞特異的な遺伝子発現解析が可能となり、またシングルセル解析技術が発達すればその応用により遺伝子診断分野^[9]など飛躍的に伸びると考えられています。

今回の実験において、均質な細胞群をLMD法で採取する技術の確立についてはほぼ満足できる成績でした。RAの滑膜組織の中から胚中心様部分の細胞群の細胞採取の陽性率は平均47.9%でした。これは、細胞採取を行う際、視覚的に採取したい細胞群を的確に切り取ることができ、さらに切り取られた細胞数も50コから300コで、RT-PCR解析に必要な十分な濃度のcDNAを合成することができたものと考えられます。一方で、SLEの腎組織からのT細胞のシングルセル採取の陽性率は5%でした。陽性率の低さの原因として、染色方法とRNA量が非常に微量だということが考えられます。LMD法でcDNA合成までの課程を成功するためには凍結組織切片作成から染色、細胞採取、RNA精製、cDNA合成までRNAの失活を防ぐために、作業を迅速に、低温で、また確実に行う必要があります。今回、トルイジンブルー染色を採用した理由は染色時間が短く簡単で、RNAへのダメージの低さを優先したからです。トルイジンブルー染色は視覚的に細胞の種類を見極めるのが非常に困難です。従って、LMD法で細胞を切り取る時点でT細胞以外の細胞(B細胞、好中球など)を採取してしまう可能性があり、またRNAの精製段階、cDNAの合成段階、RT-PCRの実施段階等で何らかの問題が起きて、このような低陽性率になったと考えられます。さらに、LMD法で切り取った細胞は重力による自然落下で収集チューブ内に集めるのですがシングルセルは重量も非常に軽量なため、時に自然落下で静電気等の影響を受けて舞い上がりスライドガラスに再付着してしまうことがあります。しかし、フォイル上の実際の細胞量は顕微鏡下で観察された細胞数と比べると平均1/2細胞相当量になります。従ってシングルセルから精製したRNA量も平均1/2細胞相当量になります。その条件下で数種類のRT-PCR解析に供与できるcDNAが合成できる可能性が確認され、組織を用いたシングルセル解析への道が開けたことは大きい成果と考えます。今後の課題は染色方法の改善であり、RNAへのダメージの低さを保ちつつ目的とする細胞を的確に採取するための免疫組織化学染色等を検討する必要があります^[10]と考えます。

シングルセルを用いた遺伝子解析技術の発展は個々の細胞の働きがより明確になることに繋がり、複雑な免疫応答の仕組みや病態形成の解明も夢ではなくなります。それはすなわち、私たちのグループが志している膠原病の特異的治療にまた一歩近づくこととなります。

私たちのグループではSSにおける唾液腺組織に浸潤した細胞を対象にした、フローサイトメトリーのシングルセルソーティングを使用したシングルセル解析の報告^[11]があります。またSLEの腎組織のT細胞が分泌するサイトカインに関する遺伝子発現解析の結果、腎組織の炎症部位に浸潤しているT細胞はTh2細胞が多いということが示唆されました。

この結果を細胞レベルで再確認するために、炎症部位からシングルセルを採取してそれぞれ個々の細胞について各種サイトカイン遺伝子発現解析をしたいと考えています。また今後さらにLMD法によるシングルセル採取の技術と微量RNA精製およびcDNA合成方法の改善に取り組み、確実なシングルセル解析の技術の確立を目指したいと考えています。

謝辞

この研究を行うにあたり、終始熱心なご指導とご教示をいただきました筑波大学臨床医学系住田孝之教授、村田秀行講師、松本功講師、伊藤聡講師に感謝申し上げます。また、LMDシステムを貸与していただきました基礎医学系内田和彦助教授に深謝申し上げます。

参考文献

- [1] M. R. Emmert-Buck, R. F. Bonner, P. D. Smith, R. F. Chuang, Z. Zhuang, S. R. Goldstein, R. A. Weiss, L. A. Liotta, Laser capture microdissection, *Science* 274 (1996) 998-1001.
- [2] H. Murata, R. Matsumura, A. Koyama, T. Sugiyama, M. Sueishi, K. Shibuya, A. Tsutsumi, T. Smida, Tc cell receptor of T cells in the kidneys of patients with lupus nephritis, *Arthritis Rheum.* 46 (2002) 2141-2147.
- [3] I. Matsumoto, K. Tsubota, Y. Satake, Y. Kita, R. Matsumura, H. Murata, T. Namekawa, K. Nishioka, I. Iwamoto, Y. Saitoh, T. Sumida, Common Tc cell receptor clonotype in lacrimal glands and labial salivary glands from patients with Sjogren's syndrome, *J. Clin. Invest.* 97 (1996) 1969-1977.
- [4] 佐野豊, 組織学的研究法, 南山堂 (1981) 441-451.
- [5] K. Kolble, The LEICA microdissection system; design and applications, *J. Mol. Med.* 78 (2000) B24-25.
- [6] S. Xin, K. Jorg, Z. Zhao-Wen, S. Bruno, T. Wen-Hao, Z. Arthur, W. B. Markus, F. Helmut, Gene-expression analysis of single cells nested polymerase chain reaction after laser microdissection, *World J. Gastroenterol.* 9 (2003) 1337-1341.
- [7] D. G. Sgroi, S. Teng, G. Robinson, R. Levangil, J. R. Hudson, Jr., A. G. Elkhoulou, In vivo gene expression profile analysis of human breast cancer progression, *Cancer Res.* 59 (1999) 5656-5661.
- [8] A. K. Dixon, P. J. Richardson, R. D. Pinnock, K. Lee, Gene-expression analysis at the single-cell level, *Trends Pharmacol. Sci.* 21 (2000) 65-70.
- [9] R. Todd, D. H. Margolin, Challenges of single-cell diagnostics; analysis of gene expression, *Trends in Molecular Medicine*, 8 (2002) 254-257.
- [10] L. Fink, T. Kinfe, M. M. Stein, L. Emmert, J. Hanze, W. Kummer, W. Seeger, R. M. Bohle, Immunostaining and Laser-assisted cell picking for mRNA analysis, *Laboratory Investigation* 80 (2000) 327-333.
- [11] I. Matsumoto, S. Okada, K. Kuroda, I. Iwamoto, Y. Saitoh, T. Tokuhisa, K. Nishioka, T. Sumida, Single cell analysis of T cells infiltrating labial salivary glands from patients with Sjogren's syndrome, *Int. J. Mol. Med.* 4 (1999) 519-527.