



Title	Evaluation of the digestion protocol of mouse neonatal epidermis for single-cell RNA sequencing
Author(s)	三浦, 朝香
Citation	大阪大学, 2025, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/101855
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨
Synopsis of Thesis

氏名 Name	三浦 朝香
論文題名 Title	Evaluation of the digestion protocol of mouse neonatal epidermis for single-cell RNA sequencing (マウス新生仔表皮を用いたシングルセルRNAシーケンスにおける酵素処理条件の検討)
論文内容の要旨	
〔目的(Purpose)〕	
<p>皮膚はバリア機能を有する人体最大の臓器である。そのバリア機能は多様なケラチノサイトによるものであり、特に表皮構造は基底膜側から基底層/有棘層/顆粒層/角質層の4層からなることが知られている。表皮を構成する各層の破綻は時に重篤な疾患につながり、代表例として表皮下層(基底層)の遺伝子異常による表皮水疱症や、表皮上層(有棘層・顆粒層)の遺伝子異常による魚鱗癖がある。両疾患は出生直後から表皮に異常が現れる重篤性の高い難治性遺伝子疾患である。このような疾患の治療法確立には新生児表皮の詳細な解析、特に一細胞レベルでの遺伝子発現解析(シングルセルRNAシーケンス)が欠かせない。近年のシングルセルRNAシーケンス技術を用いて新たな治療法確立に至ったケースの報告もなされており、この技術の有用性が必ずしも基礎研究にとどまらないことを示している。一方で得られるデータは細胞調製プロセスに強く影響を受けるため、単離に用いる酵素選択は重要である。特に表皮の場合は、組織特有の強固な細胞間接着分子がその細胞調製プロセスを困難にしている。そこで本研究では細胞単離に使用される酵素3種類(Trypsin, TrypLE, Liberase)を用いて、マウス新生仔表皮ケラチノサイト解析に最適な酵素条件の検討を実施した。</p>	
〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕	
<p>組織からの細胞単離に使用される3つの酵素(Trypsin, TrypLE, Liberase)を用いて、マウス新生仔表皮のシングルセルRNAシーケンスに最適な条件検討を行った。Trypsinは塩基性アミノ酸のC末端側を加水分解する。TrypLEは動物由来成分を含まない組み換え酵素で、その酵素反応はTrypsinと比較して穏やかで細胞へのダメージが少ないことが報告されている。Liberaseはコラーゲンと疎水性アミノ酸を含むペプチド結合を加水分解する。中性プロテアーゼDispaseIIを用いて表皮を真皮から単離後、各酵素処理を行いFACSソーティングで生細胞を分離しシングルセルRNAシーケンスを実施した。各酵素処理が細胞に及ぼす影響を評価する目的で、一細胞あたりの遺伝子数、トランスクリプト数、ミトコンドリア遺伝子の割合を調べた。その結果、各群同程度の細胞を回収できていることが明らかとなり、解析するデータのクオリティはほぼ同質であることが示された。Trypsin処理、TrypLE処理、Liberase処理、それぞれ1454, 1519, 1466個の細胞を取得し、UMAP上では主に2つのクラスターKrt5/14陽性未分化ケラチノサイトとKrt1/10陽性の分化ケラチノサイトを確認した。酵素ごとに得られた細胞集団の内訳を確認したところ、Trypsin, TrypLEはKrt5/Krt14陽性の基底層ケラチノサイトを中心に濃縮した。一方でLiberaseはKrt1/10陽性の有棘層・顆粒層ケラチノサイトを高効率に濃縮することが明らかになった。</p>	
〔総括(Conclusion)〕	
<p>新生仔マウス表皮を用いたシングルセル解析において、酵素の性質は得られるデータのクオリティに影響を与えることが分かった。酵素3種類の結果より、TrypsinおよびTrypLE酵素で得られる細胞種は基底層ケラチノサイトを中心に濃縮できた。これは表皮水疱症を含む基底層ケラチノサイトの遺伝子異常疾患の病態解明に有用であると期待する。またLiberaseによって濃縮される細胞種は有棘層・顆粒層ケラチノサイトであることが明らかになった。これは魚鱗癖を含む有棘層・顆粒層ケラチノサイトの遺伝子異常疾患を対象とする解析に有用であると考えられる。</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 三浦 朝香		
論文審査担当者	主 査	(職) 大阪大学教授 氏名 三浦 朝香
	副 査	大阪大学教授 三浦 朝香
	副 査	大阪大学教授 三浦 朝香

論文審査の結果の要旨

重層扁平上皮構造をもつ表皮は、基底膜側から基底層、有棘層、顆粒層、角質層から構成され、各層表皮細胞特有の強固な細胞間接着分子が存在する。これら細胞間接着分子が豊富に含まれることから、表皮は他組織と比較し細胞分離が困難な組織であった。特にシングルセル解析において、強固な細胞間接着分子を高効率に消化し、一細胞レベルで細胞を単離する酵素条件の解明が不可欠である。そこで本研究では、細胞単離に使用される酵素3種類 (Trypsin, TrypLE, Liberase) を用いて、マウス新生仔表皮ケラチノサイト解析に最適な酵素条件の検討を実施した。その結果、Trypsin, TrypLEはKrt5/Krt14陽性の基底層ケラチノサイトを中心に濃縮した一方、LiberaseはKrt1/10陽性の有棘層・顆粒層ケラチノサイトを高効率に濃縮することが明らかになった。上記研究成果は、表皮細胞の単離には解析目的に応じた酵素選択の重要性を示すものとなった。上記の理由から本研究は学位に値すると認める。