

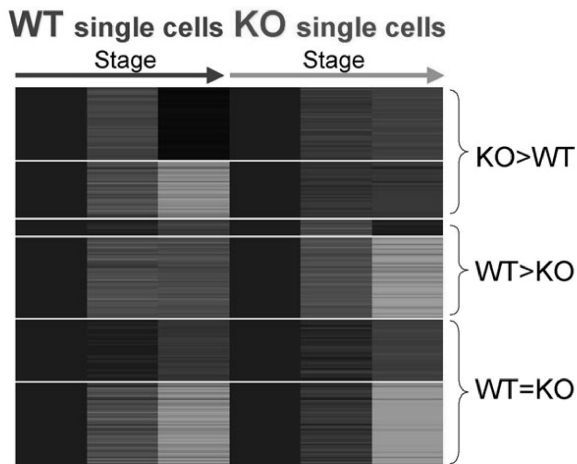
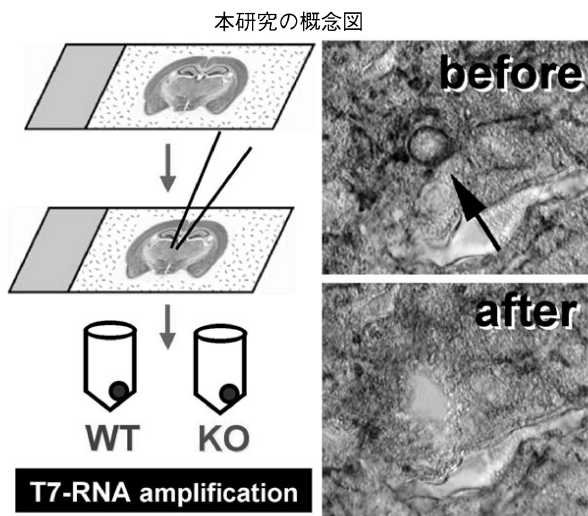
# シングルセル発現プロファイル解析による疾患の発症・進展因子の同定

●杉本 幸彦 ◆田中 智之

京都大学大学院薬学研究所

## 〈研究の目的と進め方〉

本研究の目的は、シングルセル発現プロファイル解析法を遺伝子改変マウスや疾患モデルマウスに適用し、疾患の発症・進展に関わる鍵因子を同定することである。各遺伝子変異マウスの病態異常の発症機序を明らかにするため、変異遺伝子の発現細胞を標的として発現プロファイル解析を行い、生理・病態の調節因子をゲノムレベルで理解することを目指す。



## 〈研究開始時の研究計画〉

### 【方法論】

迅速かつ再現性の高いシングルセル発現解析系を確立するため、シングルセルRNA増幅のプロトコルを最適化する。

### 【疾患の解析】

研究代表者はこれまでに8種類存在するプロスタグランジン(PG)受容体欠損(KO)マウスが、分娩異常や排卵・受精障害による不妊症などの産婦人科疾患を呈すること、また発熱やアレルギー性疾患、大腸癌や炎症性腸疾患など種々の炎症モデルにおいてその応答が消失/重篤化する

ることを見いだしている。そこで、各疾患の発症・進展をつかさどるPG受容体の発現細胞を同定し、この細胞を標的として発現プロファイル変化を捉える。具体的には、以下の解析を行う。

疾患	マウス	遺伝子改変の効果	標的細胞
大腸炎	EP4KO	KOで応答↑	粘膜上皮
大腸癌	EP2KO	KOで応答↓	間質細胞
発熱	EP3KO	KOで消失	視索前野ニューロン
腹膜炎	EP2KO	KOで応答↓	好中球
アレルギー性喘息	EP3KO	KOで応答↑	肺上皮
Ⅱ型糖尿病	PACAPTg/ KKA <sup>y</sup>	Tgで↓	膵β細胞
分娩遅延	FPKO	KOで発症	黄体細胞
不妊症(♀)	EP4KO	KOで発症	卵丘細胞

## 〈研究期間の成果〉

【方法論】①マニュアルダイセクション法とレーザーダイセクション法により、数十個程度の細胞プールや比較的大型の細胞・細胞塊(foci)をそれぞれ解析可能であり、微細な発現プロファイル解析法を確立した(22)。

①レーザーマイクロダイセクション(LCM)法・・・市販の微量組織回収装置を用いれば、比較的大型の単一細胞や消化管粘膜の表層上皮、膵島、黄体細胞、卵と卵丘細胞、糸球体、癌初期病巣(foci)などの単離解析は可能であった。

②パッチクランプ電極を用いたマニュアルダイセクション法・・・LCM法の限界以下の微小な細胞( $\phi < 10 \mu\text{m}$ )でも本法を用いれば回収が可能であった。予備検討の結果、30 pgのRNAを初発試料としてRNA増幅を行えば、再現性の高いアレイ結果が得られると判断した。例えばある細胞1個から2-3 pgのRNAが見込まれる場合、シングルセル15個をプールし、まとめて回収することとした。このような臨界域のRNA増幅の場合、キャリア核酸としてPoly-Gを用いるとダイナミックレンジが拡大し、細胞由来のシグナルが最も良く検出できることも見出した。

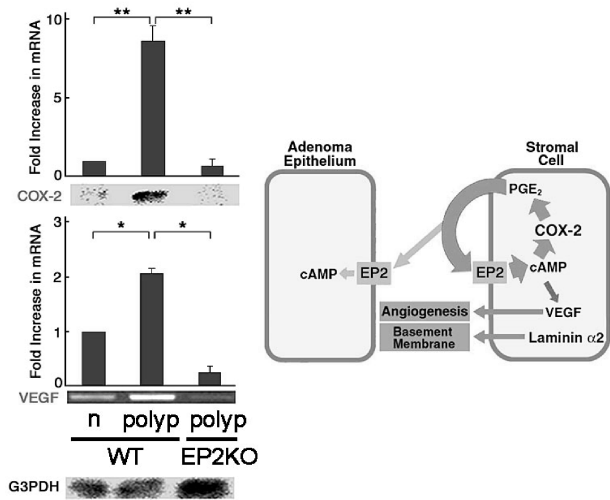
### 【大腸炎】

デキストラン硫酸による大腸炎モデルにおいて、EP4受容体欠損マウスが顕著な増悪化を呈し、発現プロファイルならびに種々の解析の結果、PGE2はEP4を介して(i)EGFを介した上皮粘膜保護、(ii)自然免疫の抑制、(iii)リンパ球抑制、の各作用により炎症抑制に機能していることが明らかとなった(4)。現在も引き続き、本系を用いて、PGE2による粘膜上皮での発現プロファイル解析を行っている。

### 【大腸癌】

Apc欠損マウスの大腸ポリープ形成におけるプロスタグランジン(PG)E2受容体の役割を調べた結果、間質細胞に発現するEP2受容体がVEGFやラミニン発現を亢進し、血管形成を促進させること、またCOX-2発現を正のフィ

ードバック制御により亢進させることでポリープ形成に重要な働きをもつことを示した(1) [下図]。また他の固形癌移植の場合は、EP3によるVEGF誘導ならびに血管形成が顕著であり、発癌に関与するPGE2の責任受容体は、その微小環境に存在する細胞の種類に依存することが判明した(6)。



### 【発熱】

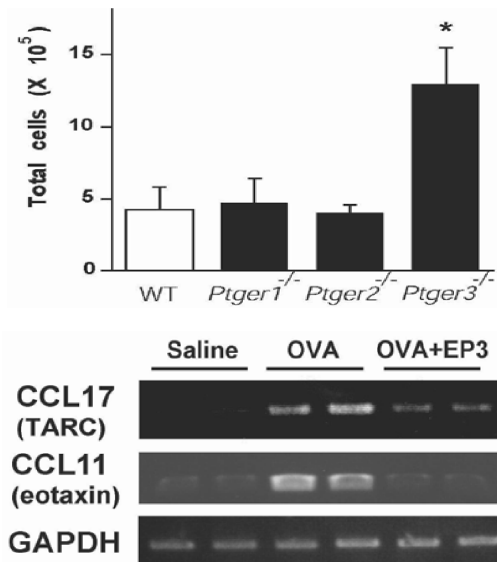
体温調節と発熱応答にはEP3受容体が関与することを示した(8)。PGE2が視床下部・視索前野のEP3受容体に作用して発熱応答を示すことを題材にして、中枢の特定ニューロンにおける発現変化の補足を試みた。すなわち、ラット視索前野のEP3陽性ニューロンを単離して、PGE2刺激による発現変化を調べた。ラット視索前野のEP3陽性ニューロンを単離して、PGE2刺激による発現変化を調べたところ、アレイ搭載の8,544遺伝子のうち、PGE2投与によって発現上昇(>1.5)したものは3遺伝子、発現低下(<0.66)したものは60遺伝子であり、PGE2刺激で多くの遺伝子群の発現レベルが低下した。中でも、GABA受容体がPGE2投与で顕著な発現低下を示し、視索前野でのGABA受容体の発現はEP3受容体に一致した。さらにマウス視索前野でのGABA受容体発現は、野生型ではPGE2によって低下したが、EP3欠損マウスでは変化しなかった。(投稿中)。

### 【炎症・アレルギーと喘息】

〔腹膜炎〕腹腔常在性マクロファージには通常EP4受容体が発現し、LPSによって刺激をうけるとEP4からEP2へのスイッチングが起こり、活性化マクロファージの即時応答と遅発応答に対応した役割を分担する可能性を見いだしていた(2)。一方、EP2KOマウスに腹膜炎を誘導すると、好中球リクルートがWTに比べて悪いこと、腹腔内の顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)量がWTに比べて低いことを見いだした。「PGE2-EP2シグナルが好中球からのG-CSF産生を促進する」と仮説を立て、種々の解析を行うとともに腹腔好中球の発現プロファイルを調べた。その結果、PGE2、EP2アゴニストはG-CSFならびにcAMP誘導性遺伝子の発現誘導を引き起こした。従って、炎症局所で産生されるPGE2は好中球細胞内cAMP亢進によりG-CSF産生を誘導して、顆粒球の分化・リクルートを促進すると考えられた(19)。

〔喘息〕アスピリンが喘息発作を引き起こす臨床知見から、「プロスタグランジン(PG)E2がアレルギーに対して抑制的に制御する」と仮説を立て、PGE受容体欠損マウスの喘息応答を調べた。その結果、プロスタグランジン(PG)E2受容体EP3欠損は遅延型応答を増悪することを見

いだした。そこでさらに喘息増悪の機構を調べた。EP3アゴニストによる発現プロファイル変化やEP3欠損マウスにおける脱顆粒応答を解析した結果、EP3の作用点として、①マスト細胞の脱顆粒応答を抑制すること、②肺胞上皮におけるTARCやeotaxin発現誘導を抑制することが判った [下図]。このことから、アスピリン喘息が、内因性PGE2-EP3シグナル阻害、さらには上皮でのケモカイン発現亢進に起因することを示した(16)。



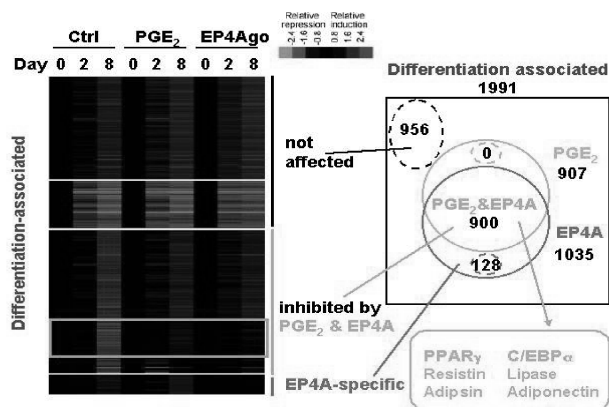
〔マスト細胞〕研究代表者らはマスト細胞の接着活性が、PGE2に依存して亢進すること、この接着活性はRGD配列依存的であること、またEP3・EP4両受容体の協調作用によるcAMP産生を介することを見いだした(7)。本来、Gi共役であるEP3がいかんしてcAMP産生に協調的に働くのか、またEP3シグナルのもつ意義を解析するため、マスト細胞の発現プロファイル変化を解析している。研究代表者らはまた、PG受容体のGsとの共役の選択性に、細胞内第2ループに存在する一アミノ酸の変異が鍵を握ることを発見しており(13)、EP3受容体のi2ループに部位特異的なRNA-editingが存在するのではないかと仮説を立て解析を進めている。一方、研究分担者の田中は、骨髄培養マスト細胞に抗原非存在下でIgEを添加するとヒスタミン産生活性が向上することを見いだし(5)、これに伴う発現プロファイル変化を解析中である。

### 【代謝疾患】

〔膵島β細胞〕PACAPは、中枢・末梢の様々な組織で生理作用を発揮する神経ペプチドであり、膵島β細胞に対してはグルコース依存的なインスリン分泌を促進する。2型糖尿病を発症するKKAyマウスに、膵島β細胞でPACAPを過剰発現させると、通常、KKAyマウスで認められる高インスリン血症と膵島過形成が抑制される。主任研究者らは、このようなβ細胞の動的変化を分子レベルで解析するため、LCMにより膵島を回収し、PACAP過剰発現の有無間で発現プロファイルを比較した。その結果、PACAP過剰発現した膵島では、Reg (regenerating gene) 遺伝子が発現上昇していた。一方、ラットインスリノーマであるINS-1細胞を用いた検討から、PACAPは高グルコース条件下(25 mM)で細胞増殖を抑制し、また持続的なReg遺伝子の発現誘導を促進することが示された。これらの結果から、2型糖尿病病態において、PACAPはReg等の特異的な遺伝子の発現誘導を介し、膵島β細胞の増殖を抑制しうることが示された(21)。

〔脂肪細胞〕PGE2は、古くから脂肪細胞分化を抑制する

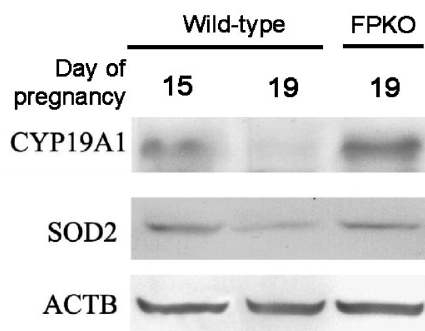
ことが示されていたが、関与するPG受容体は不明であった。研究代表者は、前駆脂肪細胞から脂肪細胞への分化系に対するPGE2の効果を調べたところ、PGE2、EP4-agonist、dbcAMPは、全て脂肪細胞分化を抑制し、分化に伴う遺伝子発現変化を総じて抑制した(14,15) [下図]。現在、これらの知見に基づき、EP4受容体欠損マウスの脂肪細胞における発現プロファイルを解析している。



[腸管GLP1陽性細胞] オープン受容体GPR120のリガンドが遊離脂肪酸であることを発見し、腸管のグルカゴン様ペプチド(GLP1)陽性細胞に豊富に発現すること、遊離脂肪酸の刺激によりGLP1分泌が促進されることを示した(17)。

#### 【分娩遅延】

NSAIDsは分娩遅延を示すことが広く知られているが、PGF2a受容体(FP)欠損マウスは、妊娠は可能であるものの、NSAIDs投与時にみられるように分娩が遅延(消失)し、胎児は子宮内で死亡する。主任研究者らはこれまでに、FP欠損マウスの分娩異常は妊娠末期における黄体の機能亢進に起因することを見いだした(10,11)。そこで野生型とFP欠損の妊娠15ならびに19日の黄体細胞の発現プロファイルを比較した。野生型とFP欠損の妊娠19日の黄体細胞の発現プロファイルを比較したところ、FP欠損ではチトクロムP-450アロマトラーゼ(Cyp19A1)に代表されるステロイド合成酵素遺伝子が高く維持されており、またSod2、Sod3など活性酸素ジスムターゼに代表される抗酸化遺伝子の発現が顕著に亢進していた。これらの発現変化はウェスタンブロットにより再現された [下図]。今回の結果から、PGF2aによる黄体退縮には、ステロイド代謝変化とフリーラジカルスカベンジャータンパク質の発現低下が重要な鍵を握る可能性が示され、その不具合により分娩毒性に陥ることが判った(18)。



#### 【不妊症(排卵・受精障害)】

PGE2受容体サブタイプの一つ、EP2受容体の欠損マウスは、排卵さらには受精の障害を示すことから、PGE2-EP2シグナル系の異常が排卵・受精障害による不妊の原

因となっている可能性が考えられる。実際、NSAIDsが排卵障害作用を示すことも古くから見いだされている。排卵刺激となる黄体化ホルモンの刺激によって、卵胞内のほとんど全ての細胞にCOX-2が誘導されてその後卵丘細胞に発現が集積する。EP2受容体もまた、その遺伝子プロモーター解析からも示唆されたようにCOX-2同様のパターンで発現する(9,12)。従ってEP2欠損マウスの障害は、卵を取り巻く卵丘細胞の機能不全である可能性が示唆されたが、具体的にどのような分子機作で受精に毒性を来すのか不明であった。そこで、野生型ならびにEP2欠損の3週齢雌マウスに妊馬血清ゴナドトロピン処理を行い、48時間後にヒト絨毛性ゴナドトロピンを投与して、その14時間後に卵管から卵と卵丘細胞複合体を回収した。これを卵と卵丘細胞を個々にシングルセル発現解析に用いた。受精障害を示すEP2受容体KOマウスの卵丘細胞は、WTに比してケモカイン遺伝子の発現が亢進していた。PGE2やdbcAMPは、WT卵-卵丘細胞複合体(COC)のケモカイン発現を抑制し、インドメサシンはこれを亢進した。ケモカインは、WT-COCの体外受精率を低下させ、ケモカイン遮断薬は、EP2KO-COCの受精率を回復させたことから、EP2KOの受精障害は、卵丘細胞のケモカイン発現亢進に起因すると考えられた(20)。

#### 【骨代謝】

PGE2を骨部に灌流投与するとその局所で顕著な骨形成を認めることを見いだした。PGE2骨形成作用はEP4作動薬で再現され、EP4欠損マウスでは見られなかったこと、骨髄培養系でPGE2、EP4作動薬はcbfalの発現誘導を促進したことからEP4が骨形成に関与することが分かった(3)。

#### 〈国内外での成果の位置づけ〉

従来、シングルセルの解析は、特定の遺伝子産物をRT-PCRにより検出することが行われていたが、シングルセルレベルのアレイ解析を行った報告はほとんど見られないのが現状であった。本研究の最大の特徴は、Eberwineらによって開発されたT7-RNA増幅法(Eberwine et al. J. Neurosci 21: 8310. 2001)を基に改良を加え、組織切片から回収・プールしたシングルセルの発現プロファイルを簡便に解析できる方法を確認した点にある。研究代表者は、多くの共同研究を通して、シングルセル解像度あるいは微細組織の発現プロファイル解析の指導を行ってきた(国内大学・研究所9件、海外製薬企業1件)。本法の紹介記事が、日経産業新聞に掲載された(22)。

#### 〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

シングルセル発現プロファイル解析により得られた結果を検証するためには、免疫組織化学やシングルセルPCRなど、シングルセルの確認を行う必要があり、これらの検証プロセスに多大な時間を要している。ハイスループットIn situ hybridizationや免疫組織などの解析拠点の整備が望まれる。

#### 〈今後の課題〉

例えばマスト細胞の発現プロファイルは、周囲細胞やマトリクス、液性因子との相互作用により絶えず変化することから、周囲環境を形成する細胞群とともに解析することで初めて多くのものが見えてくることが期待される。従って、周囲環境のインデックスを軸にしてシングルセル解析を行って、初めてシングルセル解析の真価が発揮されるように思われる。このような多検体解析を進める上で、本シングルセル解析法は十分に成熟したと考

えるが、一研究室で行うにはあまりに膨大な研究対象であり、プロジェクトとして推進する必要があると考える。

#### 〈研究期間の全成果公表リスト〉

1. 202082024

Sonoshita, M., Takaku, K., Sasaki, N., Sugimoto, Y., Ushikubi, F., Narumiya, S., Oshima, M., and Taketo, M.M. Acceleration of intestinal polyposis through prostaglandin receptor EP2 in *Apcd716* knockout mice. *Nature Med.* 7, 1048-1051. (2001)

2. 0601281408

Ikegami, R., Sugimoto, Y., Segi, E., Katsuyama, M., Karahashi, H., Amano, F., Maruyama, T., Yamane, H., Tsuchiya, S. and Ichikawa, A. The expression of prostaglandin E receptors EP2 and EP4 and their different regulation by lipopolysaccharide in C3H/HeN peritoneal macrophages. *J. Immunol.* 166, 4689-4696. (2001)

3. 0303151953

Yoshida, K., Oida, H., Kobayashi, T., Maruyama, T., Tanaka, M., Katayama, T., Yamaguchi, K., Segi, E., Tsuboyama, T., Matsushita, M., Ito, K., Ito, Y., Sugimoto, Y., Ushikubi, F., Ohuchida, S., Kondo, K., Nakamura, T., and Narumiya, S. Stimulation of bone formation and prevention of bone loss by prostaglandin E EP4 receptor activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 4580-4585. (2002)

4. 0303151950

Kabashima, K., Saji, T., Murata, T., Nagamachi, M., Matsuoka, T., Segi, E., Tsuboi, K., Sugimoto, Y., Kobayashi, T., Miyachi, Y., Ichikawa, A., and Narumiya, S. The prostaglandin E receptor EP4 suppresses colitis, mucosal damage and CD4 cell activation in the gut. *J. Clin. Invest.* 109, 883-893. (2002)

5. 0303211702

Tanaka, S., Takasu, Y., Mikura, S., Satoh, N. and Ichikawa, A. Antigen-independent induction of histamine synthesis by immunoglobulin E in mouse bone marrow-derived mast cells. *J. Exp. Med.* 196, 229-235. (2002)

6. 0403312225

Amano, H., Hayashi, I., Endo, H., Kitasato, H., Yamashina, S., Maruyama, T., Kobayashi, M., Satoh, K., Narita, M., Sugimoto, Y., Murata, T., Yoshimura, H., Narumiya, S., and Majima, M. Host prostaglandin E2-EP3 signaling regulates tumor-associated angiogenesis and tumor growth. *J. Exp. Med.* 197, 221-232. (2003)

7. 0404021236

Hatae, N., Kita, A., Tanaka, A., Sugimoto, Y., and Ichikawa, A. Induction of adherent activity in mastocytoma P-815 cells by the cooperation of two prostaglandin E2 receptor subtypes, EP3 and EP4. *J. Biol. Chem.* 278, 17977-17981. (2003)

8. 0403312229

Oka, T., Oka, K., Kobayashi, T., Sugimoto, Y., Ichikawa, A., Ushikubi, F., Narumiya, S., Saper, C.B. Characteristics of thermoregulatory and febrile responses in mice deficient in prostaglandin EP1 and EP3 receptors. *J. Physiol.* 551, 945-954. (2003)

9. 0601281411

Tsuchiya, S., Tanaka, S., Sugimoto, Y., Katsuyama, M., Ikegami, R., and Ichikawa, A. Identification and characterization of a novel progesterone receptor-binding element in the mouse prostaglandin E receptor subtype

EP2 gene. *Genes to Cells*, 8, 747-758. (2003)

10. 0601281415

Saito, O., Guan, Y., Qi, Z., Davis, L.S., Komhoff, M., Sugimoto, Y., Narumiya, S., Breyer, R.M., and Breyer, M.D. Expression of the Prostaglandin F Receptor (FP) gene along the mouse genitourinary tract. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 286, F1164-F1170. (2003)

11. 0601281417

Tsuboi, K., Iwane, A., Nakazawa, S., Sugimoto, Y., and Ichikawa, A. Role of prostaglandin H2 synthase-2 in murine parturition: study on ovariectomy-induced parturition in prostaglandin F receptor-deficient mice. *Biol. Reprod.* 69, 195-201 (2003)

12. 0601281421

Segi, E., Haraguchi, K., Sugimoto, Y., Tsuji, M., Tsunekawa, H., Tamba, S., Tsuboi, K., Tanaka, S., and Ichikawa, A. Expression of messenger RNA for prostaglandin E receptor subtypes EP4/EP2 and cyclooxygenase isozymes in mouse periovulatory follicles and oviducts during superovulation. *Biol. Reprod.* 68, 804-811. (2003)

13. 0601281424

Sugimoto, Y., Nakato, T., Kita, A., Takahashi, Y., Hatae, N., Tabata, H., Tanaka, S., and Ichikawa, A. A cluster of aromatic amino acids in the i2 loop plays a key role for Gs coupling in prostaglandin EP2 and EP3 receptors. *J. Biol. Chem.* 279, 11016-11026 (2004)

14. 0601281427

Tsuboi, H., Sugimoto, Y., Kainoh, T., and Ichikawa, A. Prostanoid EP4 receptor is involved in suppression of 3T3-L1 adipocyte differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 322, 1066-1072 (2004)

15. 0601281431

Sugimoto, Y., Tsuboi, H., Okuno, Y., Tamba, S., Tsuchiya, S., Tsujimoto, G., and Ichikawa, A. Microarray evaluation of EP4 receptor mediated prostaglandin E2 suppression of 3T3-L1 adipocyte differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 322, 911-917 (2004)

16. 0601281503

Kunikata, T., Yamane, H., Segi, E., Matsuoka, T., Sugimoto, Y., Tanaka, S., Tanaka, H., Nagai, H., Ichikawa, A., and Narumiya, S. Suppression of allergic inflammation by the prostaglandin E receptor subtype EP3. *Nature Immunol.* 6, 524-531. (2005)

17. 0601281506

Hirasawa, A., Tsumaya, K., Awaji, T., Katsuma, S., Adachi, T., Yamada, M., Sugimoto, Y., Miyazaki, S., Tsujimoto, G. Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nature Med.* 11, 90-94. (2005)

18. 0601281511

Foyouzi, N., Cai, Z., Sugimoto, Y., and Stocco, C. Changes in the expression of steroidogenic and antioxidant genes in the mouse corpus luteum during luteolysis. *Biol. Reprod.* 72, 1134-1141. (2005)

19. 0601281509

Sugimoto, Y., Fukada, Y., Mori, D., Tanaka, S., Yamane, H., Okuno, Y., Deai, K., Tsuchiya, S., Tsujimoto, G., and Ichikawa, A. Prostaglandin E2 stimulates granulocyte-colony stimulating factor production via the prostanoid EP2 receptor in mouse peritoneal neutrophils. *J. Immunol.* 175: 2606-2612 (2005)

20. 0601281522

特許出願 杉本幸彦、丹波茂郎、市川 厚 「ケモカイン阻害剤またはその塩を有効成分とする不妊治療剤」(特願2004-48677) 2004/2/24

21. 0601281541

特許出願 馬場明道、橋本均、新谷紀人、杉本幸彦 「臍細胞の再生に関する R e g III  $\beta$  を誘導しうる物質の評価方法」(特願2005-004893) 2005/1/12

22. 新聞紹介記事・日経産業新聞 「単一細胞の遺伝子増幅法確立」 2004/2/24