

シングルセル発現プロファイル解析の実践と技術開発

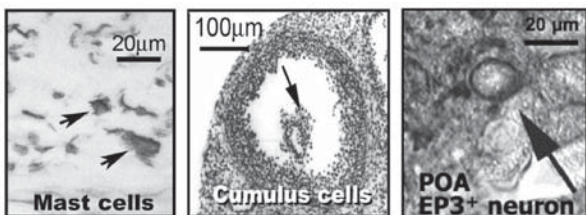
●杉本 幸彦

京都大学大学院薬学研究所

<研究の目的と進め方>

【目的】本研究の目的は、シングルセル回収した同種細胞をプールして、組織間や刺激に応じたゲノム発現プロファイル変動を捉え、その生物学的意義を理解するとともに、方法論に改良を加え汎用性をより高めることである。

【進め方】研究代表者は、Eberwine らによって開発された T7-RNA 増幅法 (Eberwine et al. J. Neurosci 21: 8310, 2001) を改良し、組織切片から回収・プールした十数個の細胞 RNA から再現性の高い発現プロファイルを得ることを可能にした。研究代表者はまたプロスタグランジン (PG) 受容体欠損マウスを用いて様々な生理と病態に果たす PG 受容体の役割を解析してきた。本研究では、生体内に微量にしか存在しない細胞 (マスト細胞や卵丘細胞、特定受容体の陽性細胞) を題材にして、その発現プロファイルが、①周囲環境の変化、②ホルモンや病態刺激、③ PG 受容体欠損、によりどのような変化を示すのか、局所のゲノムネットワークから理解することを目指す。また方法論に関しては、上記手法の成果を基に、シングルニューロン発現プロファイル解析法の開発を進める。



< 2007 年度の研究の当初計画 >

【シングルセルの個性を捉える発現プロファイル解析法】

T7 RNA ポリメラーゼ増幅を基本とした Eberwine-RNA 増幅法は、内部配列による増幅バイアスを生じにくいのが、研究代表者の基礎検討では、再現性の高い結果を得るには 30 pg の初発試料を必要とする。しかし、さまざまな種類のシングルセルから回収した RNA は、さらに少量の場合もあり得る。そこで、シングルセルの個性を捉える発現プロファイル解析法を確立するため、SMART-PCR 増幅を導入し、これと Eberwine 法の組み合わせによる増幅法を検討する。

【組織マスト細胞の発現プロファイルと病態変化】

マスト細胞は末梢組織にサテライトとして存在し、抗原や寄生虫の侵入に対して速やかに応答する免疫細胞である。マスト細胞は、未成熟なまま末梢組織に移行し、その組織に応じた形で最終成熟を示す。従って、組織マスト細胞の性質には部位特異性が見られ、例えば顆粒内プロテアーゼの分子種や様々な刺激に対する応答性が異なることが知られる。しかしマスト細胞は組織内にごく微量しか存在せず、精製が困難なため、各組織マスト細胞の性状は不明な点が多い。そこで消化管の組織切片より粘膜型 (MMC) ならびに結合組織型マスト細胞 (CTMC) をそれぞれ 15 細胞単離・プールして、発現プロファイルと比較する。

【他の稀少細胞の発現プロファイル解析】

マスト細胞以外にも、疎らにしか存在しない以下のような細胞集団の発現プロファイルの獲得を試みる。①特定の受容体やチャネルの発現ニューロン、②動脈管平滑筋、③障害を受けた粘膜上皮細胞、④化学発癌物質による前癌病変

【プロスタグランジン標的細胞の発現プロファイル変化】

研究代表者は、これまでに成宮 (京都大・医) と共同で 8 種類のプロスタグランジン受容体欠損マウスを作製し、プロスタグランジンが発熱 (視索前野-EP3) や疼痛 (後根神経節-IP/EP1/EP3)、受精 (卵丘-EP2)、分娩 (黄体-FP)、動脈管閉鎖 (動脈管平滑筋-EP4) に必須の役割を果たすことを明らかにしてきた。しかし各受容体がどのような分子機作で作用発現に至るのかは不明である。そこで各受容体発現細胞を単離して、その発現プロファイル変動を解析し、プロスタグランジンがどのようにして各病態・生理作用を発揮するのかを明らかにする。これまでに下記に挙げた解析を進め、1~4 については昨年度までに報告した。5~7 については本年度も引き続き解析を進める。

	疾患	マウス	遺伝子改変の効果	標的細胞
1	アレルギー性喘息	EP3KO	KOで応答↑	肺上皮
2	腹膜炎	EP2KO	KOで応答↓	好中球
3	黄体退縮不全	FPKO	KOで発症	黄体細胞
4	動脈管(DA)開存	EP4KO	KOで発症	DA平滑筋
5	受精障害 (♀)	EP2KO	KOで発症	卵丘細胞
6	発熱	EP3KO	KOで消失	視索前野EP3+ニューロン
7	大腸炎	EP4KO	KOで応答↑	粘膜上皮

< 2007 年度の成果 >

【シングルニューロンの発現プロファイル獲得法】

研究代表者は、熊本大・玉巻らと共同で、Eberwine 法と Smart 法を組合せることにより、シングルニューロンの発現プロファイルを簡便に得ることが可能な増幅法を開発した。本法を用いて増幅した GABAergic シングルニューロンの発現シグナルは、独立試行間で高い相関性を示した (相関係数 > 0.8)。 (成果公表リスト 1)

【組織マスト細胞の解析】

消化管胃部切片より粘膜層ならびに粘膜下層に存在する MMC と CTMC をそれぞれ 15 細胞プールし、発現プロファイルと比較した。Scatter 解析では、MMC、CTMC に共通のマーカー遺伝子、IgE 受容体や c-kit 発現は、直線上に位置していた。またランダムに抽出した MMC/CTMC に偏った発現を示す各 4 遺伝子について Real-time PCR 解析を行ったところ、いずれもアレイ解析で示された通りの偏った発現を示した。このような解析を 3 回、独立試行した結果、二グループ間で検定後 P < 0.05 と判別された遺

伝子 1,272 を同定した。CTMC に有意に高発現する遺伝子集団には、CTMC マーカーとして知られる *Mcpt4*, *Mcpt5*, *Mcpt6* が含まれ、MMC に有意に高発現する遺伝子群には、MMC マーカーとして知られる *Mcpt1*, *Mcpt2* が含まれたことから、本シングルセル発現解析の信頼性は高いと考えられた。これらの他に、各マスト細胞特異的に高発現する遺伝子群を同定し、Real-time PCR を用いた検証を行った。これらの遺伝子は、CTMC、MMC の新たなサブタイプ特異マーカーとして有用であると考えられた。現在、引き続き、肺マスト細胞の発現プロファイルとその病態変化に関する検討を行っている。(投稿中)

またこれらの組織マスト細胞解析の対比として、マウス骨髄培養マスト細胞やマウス癌化マスト細胞株 P-815 などの遺伝子発現プロファイルを獲得し、ここから得られた発現情報をもとに、*Ndr1* がマスト細胞の最終成熟ならびに脱顆粒応答に重要な役割を果たすことや Caspase-9 がヒスタミン合成酵素の活性化を担うプロセッシングに関与することを見出した。(成果公表リスト 2, 3)

【プロスタグランジンEP4受容体欠損と動脈管開存】

妊婦がアスピリンを服用すると、胎児の動脈管が収縮し肺高血圧症を引き起こす。胎児の循環血中には高濃度のプロスタグランジン E₂(PGE₂) が存在し、これが胎生期の動脈管を弛緩させると考えられてきた。しかし PGE 受容体 EP4 欠損マウスは、出生後に起こるべき動脈管閉鎖が見られず、心不全で死亡する。従来、代表者らは、PGE₂ が胎児動脈管に対して平滑筋弛緩以外の作用をもつことを提唱してきた (Segi et al. BBRC 1998) が、具体的な作用機序は不明であった。研究代表者は、横浜市大・南沢あるいは Kentucky 大・Loftin と共同で、動脈管での PGE₂ 産生には EP4-cAMP による正のフィードバックが含まれること、また PGE₂-EP4 シグナルは、動脈管平滑筋のヒアルロン酸分泌を促進し、細胞遊走が亢進した結果、内膜形成が促進し、動脈管閉鎖が起こることを示した。

【プロスタグランジンEP2受容体欠損と受精障害】

プロスタグランジン E₂ 受容体 EP2 欠損マウスは、受精障害を示す。そこで EP2 欠損と野生型の卵丘細胞の発現プロファイルと比較したところ、EP2 欠損ではケモカイン遺伝子の発現が亢進していた。PGE₂ や dbcAMP は、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、COC の体外受精率を低下させ、ケモカイン遮断薬は、EP2 欠損の受精率を回復させたことから、EP2 欠損の受精障害は、卵丘細胞のケモカイン発現亢進に起因すると考えられ、ケモカインが不妊治療薬や避妊薬の標的となりうることを示した。(特許出願中・投稿中)

【視索前野EP3受容体発現ニューロン発現プロファイル】

視索前野の EP3 陽性ニューロンを単離して、PGE₂ による発現変化を調べたところ、PGE₂ は多くの遺伝子発現レベルを低下させた。中でも、GABA 受容体の発現が顕著に低下した。実際、視索前野での GABA 受容体発現は EP3 受容体に一致し、視索前野全域での GABA 受容体発現は、PGE₂ 投与で低下したが、この効果は EP3 欠損マウスではみられなかった。PGE₂ が視索前野 EP3 ニューロンに作用して発熱を起こす際には、視索前野の GABA 受容体発現が低下することが判明した。(投稿中)

【プロスタグランジンEP4受容体欠損と腸粘膜障害】

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、PGE₂ は EP4 を介して粘膜上皮保護作用を示すことを示した (Kabashima et al. JCI 2002)。現在、本大腸炎モデル系を用いて、インドメタシンによる PG 産生阻害の影響を粘膜上皮の発現プロファイルから検討し、興味深い遺伝

子発現変動をとらえている。(投稿中)

<国内外での成果の位置づけ>

近年のレーザーキャプチャーマイクロダイセクション (LCM) の普及により、微量組織からの発現プロファイルの解析例は多く見られるようになったが、シングルセル解像度で同種細胞を解析した例はほとんどみられず、独創的な点である。またシングルセル RNA 増幅に関しては職人芸的な要素が多く、広く一般には普及していないのが現状であったが、簡便なシングルセル RNA 増幅法を確立した。本成果は、今後のゲノム生物学研究を推進するものとする。実際、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いる (国内大学・研究所 10 件、海外研究者 3 件、国内外の製薬企業 3 件)。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

本発現プロファイル解析により再現性の高い結果が得られているものの、候補遺伝子の変化や機能を他の方法で検証する際にもシングルセルで詰める必要があり、この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>

同種シングルセル集団の解析に関しては、マスト細胞や免疫系稀少細胞、さらには幹細胞の解析へと解析対象を広げ、本法の有効性を実証し、その普及に努める。またマスト細胞の発現プロファイルは、周囲環境を形成する細胞群の発現プロファイルと比較すれば、局所のどのような要因がマスト細胞の機能に影響するのかを理解することができる。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判断するが、さらにチーム型拠点を形成するなどして、体系的な解析体制を推進する必要があると考える。一方、シングルセル解析については、増幅プロセスを改良し再現性をさらに高めることが課題である。

<成果公表リスト>

1) 論文/プロシーディング (査読付きのものに限る)

1. 0801211457
Esumi, S., Wu, S-X., Yanagawa, Y., Obata, K., Sugimoto, Y., and Tamamaki, N. Method for single-cell microarray analysis and application to gene-expression profiling of GABAergic neuron progenitors. *Neurosci. Res.* in press. (2008)
2. 0801211453
Taketomi, Y., Sunaga, K., Tanaka, S., Nakamura, M., Arata, S., Okuda, T., Moon, T.C., Chang, H.W., Sugimoto, Y., Kokame, K., Miyata, T., Murakami, M., and Kudo, I. Impaired mast cell maturation and degranulation and attenuated allergic responses in *ndrg1*-deficient mice. *J. Immunol.* 178, 7042-7053. (2007)
3. 0801211455
Esumi, S., Wu, S-X., Yanagawa, Y., Obata, K., Sugimoto, Y., and Tamamaki, N. Method for single-cell microarray analysis and application to gene-expression profiling of GABAergic neuron progenitors. *Neurosci. Res.* in press. (2008)

2) データベース/ソフトウェア
該当なし