

研究課題名	シングルセル解析を用いた食物アレルギーモデルにおける <i>in vivo</i> マスト細胞の亜集団解析
フリガナ	ツチヤ ソウケン
代表者名	土屋 創健
所属機関（機関名） （役職名）	熊本大学 生命科学研究部 薬学生化学分野 講師
本助成金による発表論文，学会発表	

研究結果要約

近年、T 細胞やマクロファージといった免疫細胞において機能面で拮抗する亜集団が存在し、これらがバランスをとることで免疫・炎症が適切な状態に保たれ、その破綻は食物アレルギーを含む種々の自己免疫・炎症性疾患を引き起こすことが見いだされた。マスト細胞は自己免疫・炎症性疾患において重大な役割を果たす免疫細胞であるが、亜集団の存在を含め、そもそも *in vivo* マスト細胞の性質・特性は未だほとんど不明であり、食物アレルギーを含めたマスト細胞に関する研究の大きな障壁となっている。そこで、本研究ではシングルセルマスト細胞の遺伝子発現プロファイルを捉えられるシングルセル遺伝子増幅法を創成することを目的とした。検討の結果、マスト細胞シングルセル相当量である total RNA 2.5 pg から網羅的な遺伝子発現解析に十分量の RNA 増幅に成功し、この増幅産物には内在する RNA 量差を反映した情報が含まれていた。今後、本手法のさらなる発展により、腸管組織における個々のマスト細胞の性質・特性を同定するとともに、亜集団の同定・分類を行い、それらの機能的特性を検証・同定することが可能となり、食物アレルギーの進行過程を「個々の」細胞から統合された生体機能・応答として理解することで、本研究課題の成果は免疫学、医学における新次元の理解を導き、食物アレルギーの新たな治療、予防、創薬に資することが期待される。

研究目的

近年、T 細胞やマクロファージといった免疫細胞において機能面で拮抗する亜集団が存在し、これらがバランスをとることで免疫・炎症が適切な状態に保たれ、その破綻は食物アレルギーを含む種々の自己免疫・炎症性疾患を引き起こすことが見いだされた。マスト細胞は自己免疫・炎症性疾患において重大な役割を果たす免疫細胞であるが、亜集団の存在を含め、そもそも *in vivo* マスト細

胞の性質・特性は未だほとんど不明であり、食物アレルギーを含めたマスト細胞に関する研究の大きな障壁となっている。代表者はこれまでに *in vivo* マスト細胞の性質・特性を同定するための検討を行い、15 細胞からの網羅的な遺伝子発現解析法を樹立した¹⁾。しかしながら、その結果、組織間のみならず、組織内におけるマスト細胞の *heterogeneity*、不均一性が示唆され、*in vivo* マスト細胞の性質・特性を正確に捉えるためにはシングルセル解析というより先駆的な取り組みが必要との認識に至った。そこで、本研究ではシングルセルマスト細胞の遺伝子発現プロファイルを捉えられるシングルセル遺伝子増幅法を創成することを目的とした。本法の確立により、腸管組織における個々のマスト細胞の性質・特性を同定するとともに、亜集団の同定・分類を行い、それらの機能的特性を検証・同定することが可能となり、食物アレルギーの進行過程を「個々の」細胞から統合された生体機能・応答として理解することで、本研究課題の成果は免疫学、医学における新次元の理解を導き、食物アレルギーの新たな治療、予防、創薬に資することが期待される。

研究計画及び研究手法

エッペンチューブにおける RNA の吸着などの影響の評価に関しては、濃度既知の total RNA を段階的に希釈し、希釈直後と氷冷下で 30 分間静置したものとで、吸光度を測定・比較したり、Bioanalyzer (pico kit)を用いて total RNA 中の 28S ribosomal RNA (rRNA)および 18S rRNA のピーク高さを指標に比較した。

in vitro transcription 反応を用いた RNA 増幅手法はファーストサイクルとセカンドサイクルの 2 段階の増幅反応を介して行った。ファーストサイクル：T7 promoter 配列を 5'側に付加した oligo-dT プライマーを用いて、polyA-tail を有する messenger RNA (mRNA)選択的に逆転写(reverse transcription: RT)を行った。次に RNase H を用いて DNA-RNA 二本鎖の RNA を分解しながら、polymerase および ligase を用いて second-strand DNA の合成を行った。酢酸アンモニウム、糖系キャリアーを用いたエタノール沈殿による精製を行った後に、*in vitro* transcription 反応による RNA 増幅を行い、カラムを用いて精製した。セカンドサイクル：ファーストサイクルで増幅した全量を濃縮し、random primer を用いて RT を行った後に、RNase H を用いて DNA-RNA 二本鎖の RNA を分解した。残った complementary DNA に T7 promoter 配列を 5'側に付加した oligo-dT プライマーをアニールし、polymerase を用いて second-strand DNA を合成した。続けて、酢酸アンモニウム、糖系のキャリアーを用いたエタノール沈殿による精製を行い、*in vitro* transcription 反応により RNA を増幅し、カラムを用いて精製した。

RT-定量 polymerase chain reaction (PCR)の RT は random primer を用いて行い、定量 PCR は SYBR-Green を指標にして行った。

Quartz-Seq 法²⁾を用いた増幅は既報に従って行った。5'側に配列付加した oligo-dT プライマーを

用いて RT を行い、Exonuclease I を用いて余分のプライマーを分解した後に、RNase H を用いて DNA-RNA 二本鎖の RNA を分解するとともに complementary DNA の 3'側に polyA を付加した。さらに 5'側に配列付加した oligo-dT プライマーを用いて second-strand DNA を合成し、両プライマーの 5'側に付加した配列を用いた suppression PCR により増幅(21 サイクル)を行い、カラムを用いて精製した。

「結果と考察」で詳述のように、当初の計画に従い、まず、高効率・高精度化を目指して使用するエッペンチューブにおける RNA の吸着などの影響を評価・改善し、*in vitro* transcription を用いたマスト細胞シングルセル RNA-Seq 解析法を構築するとともに、既存で最も高精度とされるシングルセル RNA-Seq 法、Quartz-Seq 法との比較を試みた。しかしながら、その結果、*in vitro* transcription 反応を用いた RNA 増幅手法ではファーストサイクルのエタノール沈殿における複合的な障害が生じた。一方、Quartz-Seq 法を用いた増幅では増幅産物中にはユビキタスにどの細胞でも豊富に発現している α -actin (*Actb*)や、マスト細胞特異的に発現する carboxypeptidase A3, mast cell (*Cpa3*)に由来する増幅産物が含まれていなかった。本研究の成果により、改良された *in vitro* transcription 反応を用いた RNA 増幅手法を用いて、マスト細胞シングルセル相当の RNA 量から RNA-Seq 解析に十分量の RNA が取得でき、これらには *Actb* や *Cpa3* など、インプットしたマスト細胞シングルセル相当の RNA に由来する RNA が含まれていることが明らかとなったが、*in vivo* のシングルセル解析は更なる検討の後の課題となった。

結果と考察

骨髓由来培養マスト細胞 (bone marrow-derived mast cells: BMMC) や種々のマスト細胞株を用いた検討の結果、シングルセルあたりの total RNA 抽出量は 2 pg から 3 pg の範疇であったことから、本解析では 2.5 pg をマスト細胞シングルセルの total RNA 抽出量として検討を行った。このような微量の RNA を用いた解析においては、使用するエッペンチューブにおける RNA の吸着などの(悪)影響が危惧されたことから、Bioanalyzer (pico kit)を用いて、total RNA 中の 28S rRNA および 18S rRNA のピーク高さを指標に、1.5 ml エッペンチューブ中の total RNA 中の濃度を段階的に希釈し、30 分放置してエッペンチューブによる RNA の吸着を評価した。その結果、調整直後であれば、3 ng/ul や 1.5 ng/ul でも 28S rRNA および 18S rRNA のピークが検出されたが、調整後 30 分間氷冷下で放置したところ、3 ng/ul において 28S rRNA および 18S rRNA のピークを検出できなかった。さらに濃度既知の total RNA を希釈して 12 ng/ul、6 ng/ul、3 ng/ul に調整し、それぞれの吸光度を測定したところ、それぞれの濃度は約 10 ng/ul、3 ng/ul、0 ng/ul であったことから、これまで使用してきたエッペンでは濃度にして 3 ng/ul が吸着などの何らかの理由で失われている可能性があること示唆された。見積もられたマスト細胞シングルセルの total RNA は 2.5 pg であり、

操作中の濃度としては少なくとも 2.5 pg/ul となることが予想されることから、より RNA 濃度保持性の高いエッペンの探索を行った。その結果、Bioanalyzer (pico kit)において代表者が再現よく 28S rRNA および 18S rRNA のピーク高さを最も低濃度で評価できた 400 pg/ul においてまでは少なくとも RNA 濃度保持性が損なわれない 2 ml エッペンチューブと 1.5 ml エッペンチューブをそれぞれ見いだした。0.2 ml エッペンチューブに関しても同様の解析を行ったが、こちらは関しては大きなメーカー・商品差や濃度の低下はなかった。Bioanalyzer (pico kit)を用いて評価できた下限値は 400 pg/ul であり、マスト細胞シングルセルからの total RNA 濃度と見込まれる 2.5 pg/ul とは大きく解離があることから、RNA 抽出時や精製時には従来の RNase-free water 単独で溶解するのではなく、次反応で用いるプライマーや dNTP もしくは NTP を含む溶液で溶解するようにプロトコルを改良した。

上記を踏まえて、実際にマスト細胞シングルセル相当の total RNA 2.5 pg で RNA 増幅を行ったところ、ファーストサイクルのエタノール沈殿の際にペレットが確認できず、セカンドサイクルの *in vitro* transcription 反応及び RNA の精製・定量まで行っても RNA の増幅が確認できなかった。複数回の検討の結果、15 ng の十分量の RNA で一連の増幅反応を開始した際でも RNA 増幅できない時があり、それはファーストサイクルのエタノール沈殿の際のペレット形成の出来・不出来と相関が見られたことから、エタノール沈殿条件の改良を試みた。キャリアの種類や量、沈殿形成の条件などを検討したところ、最終的に沈殿形成の条件が最もクリティカルな要因であることが判明した。沈殿形成を高めるために行っていた -80°C や -30°C 条件でオーバーナイト置くことがペレット形成不全の主因であり、不溶性画分に粘性が生じ、遠心を行っても一箇所に集積しないようになっている可能性が示唆された。沈殿形成条件を -30°C、30 分にすることで作業効率の向上とともに、ペレットの形成と核酸の回収効率が向上し、その後の *in vitro* transcription 反応による RNA 増幅収量も改善した。ファーストサイクルのエタノール沈殿におけるペレットの形成不全はオーバーナイトにおける時間の長さに関連があった印象で（オーバーナイト条件の際にはオーバーナイトした正確な時間を記録していなかったため、正確な関連は不明）ペレットの形成がされたり、されなかったりとムラがあったことや、通常の RNA、RNase-free water、塩を含んだような溶液や、ファーストサイクルのエタノール沈殿の際と溶液条件の非常に良く似ている（同一ではない）セカンドサイクルのエタノール沈殿においてさえ、-80°C や -30°C 条件でオーバーナイト置いてもこのようなペレットの形成不全はおきなかったことから（むしろ、従来の知見のように、オーバーナイト置くことでペレットの形成や核酸の回収効率が向上）、ファーストサイクルのエタノール沈殿の際の塩や塩基、酵素などを含めた複合的な要因で生じていた可能性が示唆され、そのためなかなか原因が判明せず、改善に大幅な時間を要した。一方で、この検討の過程において、アクリルアミド系のキャリアの方がペレットの形成は良いものの、そこから *in vitro* transcription 反応を行って評価すると逆に糖

系のキャリアーよりも RNA 増幅収量が低下することや、ファーストサイクルのエタノール沈殿において従来よりも 2 倍量の糖系キャリアーを用いた方がペレットの形成が良く、*in vitro* transcription 反応後の RNA 増幅収量も増加することなどを見だし、これらの点も含めたプロトコルの改良を行った。

これらの改善の結果、マスト細胞シングルセル相当の total RNA 2.5 pg からセカンドサイクルにおいて十分量の RNA を得ることに成功し、その増幅 RNA の電気泳動波形は 15 ng の十分量の RNA から増幅した際と同様であった。しかしながら、ネガティブコントロールの total RNA を加えていないものからも同等の収量が得られたことから、RT-定量 PCR 法を用いて増幅 RNA の質的評価を行った。その結果、ユビキタスに発現する *Actb* や、マスト細胞特異的に発現する *Cpa3*, Fc receptor, IgE, high affinity I, alpha polypeptide (*Fcer1a*)は、シングルセル相当も含め、マスト細胞の total RNA 由来増幅 RNA からは検出されたが、ネガティブコントロールの total RNA を加えていないものからはまったく検出されず、インプットした total RNA に由来する RNA が増幅されたことが確認された。さらに RNA-Seq 解析の際には、total RNA 中のほとんど (95%以上) を占める 28S rRNA および 18S rRNA ばかりが検出され、mRNA が検出されず、解析不能となる問題がしばしば生じることから、28S rRNA (*Rn28s1*)、18S rRNA (*Rn18s*)の量を RT-定量 PCR 法を用いて評価したところ、Ct 値比較の結果、28S rRNA および 18S rRNA の含有量はいずれも *Actb*, *Cpa3*, *Fcer1a* 以下であり、増幅反応の RT 時に T7 promoter 配列を 5'側に付加した oligo-dT プライマーを用いたことで mRNA が選択的に濃縮・増幅できたことがわかった。さらに、アレルギー性炎症の増悪因子である interleukin (IL)-33 で BMMC を刺激すると IL-6 mRNA 量が増加することが知られており、実際、通常の RT-定量 PCR を行った際には Ct 値で 4 以上の差があった。この差がシングルセル相当の total RNA 2.5 pg から増幅した RNA における RT-定量 PCR 解析においても検出されるかどうかを調べた結果、同じ方向性をもって Ct 値で 4 以上の差が検出された。したがって、マスト細胞シングルセル相当の total RNA 2.5 pg から増幅された RNA は存在量差の情報を有することが明らかとなった。一方、既存で最も高精度とされるシングルセル RNA-Seq 法、Quartz-Seq 法²⁾による増幅を試み、増幅産物の比較を行った。その結果、既報のように 10 pg、さらにマスト細胞シングルセル相当の 2.5 pg の total RNA からの増幅により数十 ng の収量を得たが、Quartz-Seq 法を用いた際でもネガティブコントロールの total RNA を加えていないものから同等の収量の増幅産物が得られた。そこで、定量 PCR 法を用いて質的検討を行ったところ、*Cpa3*は 10 pg からの増幅産物では検出されたが、2.5 pg からの増幅産物からは検出されなかった。さらに、*Actb*, *IL6*は 10 pg、2.5 pg のいずれの増幅産物からも検出されなかったことから、本研究で代表者が構築した *in vitro* transcription 反応を用いた増幅法の方がより高感度および高精度である可能性が示唆された。

今後の研究活動について

これまでの解析結果から、本助成研究で構築されたマスト細胞シングルセル増幅法の方が既存で最も高精度とされるシングルセル RNA-Seq 法、Quartz-Seq 法²⁾を用いた際よりも高感度および高精度である可能性が示唆されたが、さらなる多角的な観点から本法の優位性を評価する必要があるとともに、一方では問題点を見極め、その利用性・応用性を高める必要性もある予想される。例えば、RT-定量 PCR 解析の結果、マスト細胞 1 細胞相当の total RNA 2.5 pg から増幅された RNA から *Actb*, *Fcer1a*, *Cpa3*, *IL6* のシグナルが検出されたが、15 ng (6,000 細胞相当)もしくは 100 pg (40 細胞相当)から増幅された RNA と比較すると Ct 値で 8 ほど増加しており、可能性として、特定の RNA 種がより選択的に増幅されている可能性や、非特異的な増幅産物が生じている可能性が想定される。前者であれば、そのまま次世代型高速シーケンサーを用いて解析可能であるが、もしも後者であればマイクロアレイを用いた方がより高効率・高精度に網羅的な遺伝子発現プロファイルを取得できると予想される。これらの検証を重ね、確立した本手法を用いて、腸管組織における個々のマスト細胞の性質・特性を同定するとともに、亜集団の同定・分類を行い、それらの機能的特性を検証・同定するとともに、食物アレルギーの進行過程を「個々の」細胞から統合された生体機能・応答として理解することで、本研究課題の成果は免疫学、医学における新次元の理解を導き、食物アレルギーの新たな治療、予防、創薬に資することが期待される。

参考文献

- 1) Tsuchiya S, Tachida Y, Segi-Nishida E, Okuno Y, Tamba S, Tsujimoto G, Tanaka S, Sugimoto Y. Characterization of gene expression profiles for different types of mast cells pooled from mouse stomach subregions by an RNA amplification method. *BMC Genomics*. 2009 Jan 20;10:35.
- 2) Sasagawa Y, Nikaido I, Hayashi T, Danno H, Uno KD, Imai T, Ueda HR. Quartz-Seq: a highly reproducible and sensitive single-cell RNA sequencing method, reveals non-genetic gene expression heterogeneity. *Genome Biol*. 2013 Apr 17;14(4):R31.

以上