

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15294

研究課題名(和文)腸管免疫系を構成するTリンパ球のシングルセル解析への挑戦

研究課題名(英文)Single cell analysis of T lymphocytes in the intestinal immune system

研究代表者

長谷 耕二 (HASE, Koji)

慶應義塾大学・薬学部(芝共立)・教授

研究者番号：20359714

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：従来の免疫担当細胞のFACSや定量PCRによる解析手法では、集団の「傾向」を見るにとどまり、詳細なクローン組成や個々の細胞における定量情報は皆無であった。本研究では、DNAバーコード法を改良・発展させ、T細胞受容体ペアのハイスループットかつバイアスのない検出を行う方法の確立を試みた。本手法により、免疫がダイナミックに活性化されている大腸炎モデルにおいて、腸管浸潤T細胞のTCRレパトア解析を実施した。

研究成果の概要(英文)：Conventional methods such as flow cytometry and quantitative PCR have limitation to analyze individual lymphocyte cells. Here we established single cell analysis method by taking advantage of DNA barcoding, and analyzed TCR repertoire in the gut of experimental colitis model.

研究分野：免疫学

キーワード：大腸炎 シングルセル解析

## 1. 研究開始当初の背景

これまでの免疫学的解析手法では、マス(全体)としてポピュレーションを解析することで、集団の「傾向」を見るにとどまり、クローン組成や1細胞での定量情報は得られない。近年、シングルセル解析の技術によってT細胞受容体のレパトア解析が行われるようになってきた。TCRは $\alpha$ 鎖と $\beta$ 鎖のペアによって構成されているが、これまで行われてきた研究のほとんどは、TCR $\alpha$ および $\beta$ 鎖のどちらかを遺伝子組み換えによって1種類に固定しておき、残りのペアのバリエーションを調べるといったものであり、より自然な状態でのレパトア解析が求められている。

DNAにタグをつけるバーコード法の登場により、シークエンス解析から得られた複数の遺伝子の読み取り情報を、タグ情報によって個々の細胞へと帰属することが可能となっている。申請グループでは本手法を応用することで、リンパ球のTCRペア情報を、個別に、バイアスなく、そしてハイスループットに検出することが可能にできると考えている。クローンを個々のレベルで「観る」ことで、マスと同じに見える2つの集団から全く異なる性質を読み取ることが可能と考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、TCRペア情報を取得可能なシングルセル解析手法の確立を試みた。本手法を用いて、恒常的に免疫応答が誘導され、ダイナミックに制御されている腸管免疫系におけるT細胞のクローン解析を実施した。

## 3. 研究の方法

### (1) DNAバーコード法を利用したTCRレパトア配列同定法の構築

T細胞受容体の $\alpha$ 鎖と $\beta$ 鎖の配列のペアを一細胞の分解能かつハイスループットで決定する計測システムを確立するための検討を行った。まず、細胞をよい状態で保存できると考えられる溶液をあらかじめウェルにいれ、フローサイトメトリーを用いて、マウスから採取したT細胞をプレート内の各ウェルに1細胞ずつソートした。TCR $\alpha$ と $\beta$ 用のプライマーに工夫を加えて設計し、逆転写反応と増幅反応を行った。増幅産物を電気泳動で確認し、精製した後、シークエンスにより配列を決定した。これらにより、1細胞からTCRを効率よく増幅することができるか、ハイスループット化が可能か、などを検証し

た。

### (2) 実験的大腸炎モデルの誘導

野生型C57BL/6Jマウスより脾臓を摘出し、リンパ球を調整した後、表面マーカーの染色を行った。その後、フローサイトメーターによりCD45RB<sup>high</sup>CD4<sup>+</sup>T細胞を分取し、Rag1欠損マウスに尾静脈注射した。6週間後、大腸炎を発症したレシピエントマウスの大腸を摘出し、コラギナーゼ処理により細胞懸濁液を得た。表面マーカーを染色後、メモリーT細胞をシングルセルトしてプレート上に分取した。

## 4. 研究成果

### (1) DNAバーコード法を利用したTCRレパトア配列同定法の構築

TCRは、5'末端に多様な配列を持つ。これらの配列によるバイアスが少なく、かつ簡易的に作業できる増幅方法を開発した。この方法はハイスループット化に有効だと考えられる。この方法を用いて、1細胞からTCR $\alpha$ とTCR $\beta$ の同時増幅を試みた。現在、サンプルなどに依存して検出効率が変わってしまうということもあるが、本方法で1細胞からTCRを検出できることを示せたことは重要だと考えている。また、増幅産物にバーコードを付加した。さらに、増幅産物に対して簡易的な精製を行うことで、シークエンス解析を行えることも示した。ハイスループット測定に欠かせない次世代シーケンサーはサンガーシークエンス法よりシークエンスのエラー率が高いが、同じバーコードが結合した複数のcDNAをシークエンスすることで、最終的なエラー率を劇的に減らせることを、別の測定系で確認することができた。このように、バーコード法を利用したT細胞受容体ペアのハイスループット計測における、基礎技術を構築した。

### (2) クローン病病様慢性大腸炎の発症を担うメモリーT細胞クローンの検出

クローン病は原因不明の希少難治性疾患であり、主として若年者において、消化管に非連続的な炎症・潰瘍病変が生じ、腹痛や下痢、血便、体重減少などを引き起こす。クローン病の発症原因は不明であるが、遺伝的背景に加え、環境因子として腸内細菌の異常およびそれに伴い腸内細菌に対する腸管エフェクターT細胞の活性化が病態形成に関わることが知られている。そこで、特定のTCRを有するT細胞集団が病態の発症に関わる可

能性を検証するために、クローン病様病態を発症する CD45RB<sup>high</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞移入による慢性大腸炎モデルにおいて、研究項目 1 で確立した手法を用いて、colitogenic (腸炎原性) T 細胞の TCR 解析を実施した。

メモリー細胞画分をフローサイトメーターにより分取し、シングルセル解析を実施した。その結果、今回解析した複数のクローンのうち、かなり偏った TCR 構成を示すことが判明した。

本研究ではシングルセルレベルで迅速に RT-PCR を行う方法を開発できた。まだ効率は高くないながらも、本方法を用いた 1 細胞からの TCR $\alpha$  と TCR $\beta$  の同時増幅が可能であることを示すことができた。現在、100-1000 細胞の細胞を一度に解析するプラットフォームの構築を行っている。これより、colitogenic T 細胞がいくつかの特定の TCR を有する細胞集団であることが示唆される。今後は、解析をさらにハイスループット化して解析数を増やし、ナイーブ T 細胞集団とも比較を行うことで、Colitogenic T 細胞の TCR の特性を明らかにする予定である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- 1) Okubo K, Kurosawa M, Kamiya M, Urano Y, Suzuki A, Yamamoto K, Hase K, Homma K, Sasaki J, Miyauchi H, Hoshino T, Hayashi M, Mayadas TN, Hirahashi J. Macrophage extracellular chromatin release induced by Mac-1 mediated platelet-macrophage interactions triggers acute kidney injury in rhabdomyolysis. **Nat. Med.** 24:232-238, 2018. doi: 10.1038/nm.4462.
- 2) Suzuki K., Yamada T, Yamazaki K, Hirota M, Ishihara N, Sakamoto M, Takahashi D, Iijima H, Hase K. Intestinal epithelial cell-specific deletion of  $\alpha$ -mannosidase II ameliorates experimental colitis. **Cell Struct. Funct.** 43: 25-39, 2018. doi: 10.1247/csf.17022.
- 3) Ogawa T, Kryukov K, Imanishi T, Shiroguchi K. The efficacy and further functional advantages of random-base molecular barcodes for absolute and digital quantification of nucleic acid molecules. **Sci Rep.** 7(1):13576, 2017. doi:10.1038/s41598-017-13529-3.
- 4) Jinnohara T, Kanaya T, Hase K, Sakakibara S, Kato T, Tachibana N, Sasaki T, Hashimoto Y,

Sato T, Watarai H, Kunisawa J, Shibata N, Williams I, Kiyono H, and Ohno H. IL-22BP dictates characteristics of Peyer's patch follicle-associated epithelium for antigen uptake. **J. Exp. Med.** 214: 1607-1618. 2017. 10.1084/jem.20160770

- 5) Ohashi W, Kimura S, Iwanaga T, Furusawa Y, Irié T, Izumi H, Watanabe T, Hijikata A, Hara T, Ohara O, Koseki H, Sato T, Robine S, Mori H, Hattori Y, Watarai H, Mishima K, Ohno H, Hase K, Fukada T. Zinc Transporter SLC39A7/ZIP7 promotes intestinal epithelial self-renewal by resolving ER stress. **PLoS Genet.** 12: e1006349, 2016. doi.org/10.1371/journal.pgen.1006349.

[学会発表] (計 3 件)

- 1) Hase K. "Intestinal microbiota-derived metabolites regulate autoimmunity through epigenetic modifications." Fujihara Seminar, 2017/9/13, Tomakomai, Japan.
- 2) Hase K. "Microbiota-derived metabolites shape mucosal barrier and immunity." 2017 International Congress on Obesity and Metabolic Syndromes (ICOMES), 2017/9/1, Seoul, Korea.
- 3) Hase K. "Microbiota-derived metabolites shape mucosal barrier and immunity." Korean Society of Nephrology (KSN) 2017. 2017/4/15, Seoul, Korea.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: ワンステップ逆転写テンプレートスイッチ PCR

発明者: 城口 克之

権利者: 理化学研究所

種類: PCT 出願

番号: PCT/JP2017/23254

出願年月日: 2017. 6. 23

国内外の別: 国外

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://square.umin.ac.jp/keio-dbc/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

長谷 耕二 (HASE, Koji)  
慶應義塾大学・薬学部・教授  
研究者番号：20359714

### (2) 研究分担者

城口 克之 (SHIROGUCHI, Katsuyuki)  
国立開発法人理化学研究所・生命システム  
研究センター・ユニットリーダー  
研究者番号：00454059

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

( )