

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H03912

研究課題名(和文) Single cell応答に基づく原虫病研究の基盤構築と有用性の評価

研究課題名(英文) Establishing a system in protozoan single cell transcriptomics

研究代表者

山岸 潤也 (Yamagishi, Junya)

北海道大学・人獣共通感染症国際共同研究所・准教授

研究者番号：80535328

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：原虫は、そのサイズ、形態、偏性通性寄生性等において多様であり、近年利用が進んでいる1細胞トランスクリプトーム解析を行う際には、それに応じた技術基盤を確立する必要があった。そこで本研究では、上市されているscRNA-seqライブラリー構築を評価し、BD Rhapsodyが好適であることを見出した。さらに、トキソプラズマ原虫のタキゾイト→ブラディゾイト間のステージ変換をモデルにscRNA-seq解析を行い、トキソプラズマ原虫の感染により、IFN α 経路が活性化されること、しかも、当該経路が活性化されるのは原虫感染細胞の周囲の非感染細胞であり、感染細胞の当該経路は逆に抑制されることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

トキソプラズマ原虫のブラディゾイト感染により、感染細胞の周囲にある非感染細胞のIFN α 経路が活性化される一方、感染細胞の当該経路は逆に抑制されることが見出された。これは、従来のRNA-seqでは見出しえなかった結果であり、scRNA-seq解析の有用性が示された。また、原虫の様にサイズ、形態、寄生性等において多様な細胞に対しては、ライブラリー構築時の各段階を視認できるBD Rhapsodyが好適であることも示された。本成果は、他の原虫種においてscRNA-seq解析を実施する際の基盤技術として当該分野の発展に寄与するものである。

研究成果の概要(英文)：Protozoan parasites are diverse in size, morphology, and parasitic mode, and it was necessary to establish a suitable technical basis for single-cell transcriptome analysis, which has been increasingly used in recent years. In this study, we evaluated available systems in scRNA-seq library construction and found that BD Rhapsody was suitable. Furthermore, scRNA-seq analysis was conducted using tachyzoite to bradyzoite stage conversion in *Toxoplasma gondii* as a model, and it was found that the IFN α pathway is activated in the bystander cells surrounding the infected cells, whereas the pathway in the infected cells is conversely suppressed.

研究分野：病原体ゲノム学

キーワード：scRNA-seq transcriptomics *Toxoplasma gondii* protozoan

1. 研究開始当初の背景

生体を構成する細胞は全て同じゲノムを有しているが、転写される遺伝子（トランスクリプトーム）に応じて数百種に分化することが知られている。しかし、表面上同一に見える細胞も個々のトランスクリプトームは同一ではなく、その多様な転写プロファイルに基づくより詳細な subset の発見も続いている。さらに細胞集団（バルク）で見れば絶え間なく続いているように見える遺伝子発現も、個々の細胞では離散的・スパイク状に起きていることも見出されており、個々の細胞はこれまで考えられていた以上に個性的な存在であり、個性間の多様な相互作用が複雑な生命を形作るにおいて必須な要素であることが認識されつつある。これらの知見は Single cell トランスクリプトーム解析により得られたものであるが、今年、この分野で大きな技術的ブレイクスルーが起きた。

これまで、Single cell トランスクリプトームを取得するためには、1細胞ごとセルソーターで分離する方法（数十細胞/同時解析）、マイクロ流路系でキャプチャーする方法（数百細胞/同時解析）が使われていたが、昨年、微小液滴内に細胞を閉じ込め、その中で、RNA抽出と個々の細胞にユニークな index を付与した cDNA を一挙に合成する技術（Drop-seq 法）が報告され（、さらに今年、10x Genomics 社からその自動作成装置が上市されたことで、数万細胞/同時解析が一般にも可能となった。例えば、この系で末梢血を解析することで、T細胞、B細胞など既知の白血球 subset をトランスクリプトームから特定・分類が可能なが示されている。同時に、トランスクリプトームを指標とした新たな細胞 subset の定義も可能であり、実際、その様な発見と機能解析の報告が続いている。

我々はこれまで、原虫を対象としたトランスクリプトーム解析に継続して取り組んでおり、Full-length EST、TSS-seq、RNA-seq 等、各種手法を駆使し、原虫ゲノム・トランスクリプトームの情報基盤の整備に尽力してきた。特に日本国内では関連分野をリードしており、成果をデータベースに整理・公開している。加えてここ数年は、臨床検体のトランスクリプトーム解析にも注力している。これは、真の病態を理解するには実験動物モデルでは限界があること、一方、人体実験は倫理的に困難であることを踏まえ、臨床検体トランスクリプトームの膨大なデータで補完することで、人体実験を行うことなく真の病態を理解することを企図している。端緒となる成果として、インドネシア共和国マナド市対象としたフィールドワークにより、100余のマラリア患者の末梢血を収集し、その遺伝子発現プロファイルの多様性を報告した。

しかしながら、上記の研究は臨床検体トランスクリプトームの限界も浮き彫りとした。すなわち、臨床検体においては感染時期の特定が困難であること、性別・年齢・食事・睡眠・既往歴等の個人差、そして、観測された末梢血単核球の遺伝子発現が、個々の細胞における遺伝子発現変化によるものなのか、それとも末梢血の構成が変化したためなのかを特定できないという問題である。ここで、前述の1細胞トランスクリプトーム系を臨床検体に適応することで、末梢血の構成については解決が見込める。加えて、検出した個々のトランスクリプトームをクラスタリングし末梢血単核球のサブタイプに紐付けることで、従来の数万細胞をまとめて処理するバルクトランスクリプトーム解析では全体に埋もれてしまっていた subtype 特異的で病態に直接関わる遺伝子発現変化も特定できるかもしれない。ただし、本研究提案には臨床検体トランスクリプトームは含まない。なぜならば、その前段階として、これまでに例のない原虫における1細胞トランスクリプトーム解析基盤の確立が必要かつ急務であるとの考えに至ったからである。

2. 研究の目的

本研究では、Single cell 応答に基づく宿主・原虫相互作用の解析基盤構築を目的として、トキソプラズマ原虫のタキゾイトからブラディゾイトへのステージ変換等をモデルに、その有用性を評価・実証する。scRNA-seq 用ライブラリー調整については、エマルジョン法、ナノウェル法など、多様なアプローチが提案されており、原虫の1細胞解析には何が適しているか検討する。また、情報解析パイプラインについても、関連分野において開発される解析ツールを導入・実装し、最適化を図る。

3. 研究の方法

広く scRNA-seq が行われている免疫細胞等とは異なり、原虫の形態は多種多様であり、既知の scRNA-seq ライブラリー作成プロトコルをそのままは流用はできない。特に、scRNA-seq プラットフォームについて、10x Genomics 社製、BioRad 社製、Becton Dickinson 社製が上市されており、各々原理が異なるため、どのプラットフォームが原虫 scRNA-seq に適しているか評価することとした。対象には最も極端な場合として、運動性に優れ、形態も特殊な *Trypanosoma brucei* を用いることにした。まず、BioRad 社製のプラットフォームを試したが、正常なライブラリーの作成には至らなかった。これは手技が問題だった可能性もあるが、マイク

口流路系を応用した同プラットフォームは検体調整の過程が自動化されており、その中のどの過程で問題が生じたかについてのトラブルシューティングが困難であることから、それ以上の検討は行わなかった。ドロップレット系を応用した 10x Genomics 社製プラットフォームは、現状、最も普及しているが、BioRad 社製同様、過程が不可視であることから優先順位を下げた。そこで、マイクロウェル系を応用した Becton Dickinson 社製 BD Rhapsody に注目した。BD Rhapsody は、直径約 50 μm のウェルが約 220,000 個敷き詰められたフローセルに細胞を落とし込み、同ウェルにピッタリはまる cell index でコートしたマイクロビーズを入れ込むことで一細胞解析を可能とするシステムで、細胞の摘播、溶解、ビーズ導入の各段階を顕鏡下で確認可能なことを大きな利点とする (Figure 1)。実際、*Trypanosoma brucei* がウェルに収まり、溶解することが確認できたことから、本研究では当該プラットフォームを用いることとした。

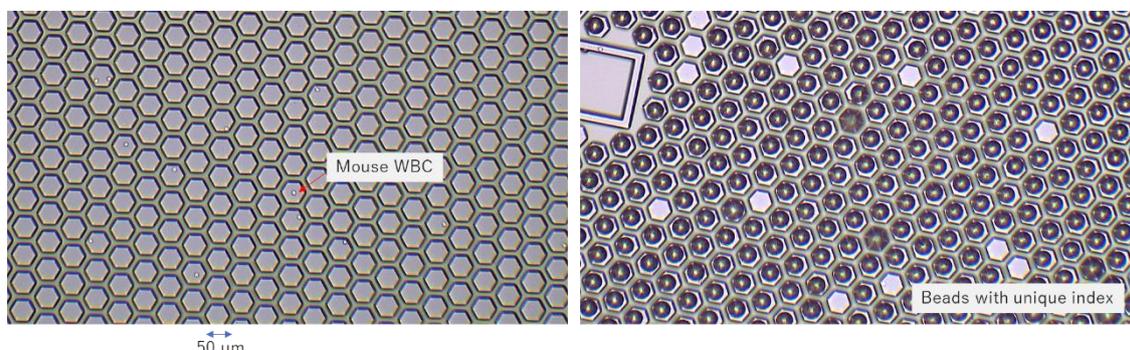


Figure 1. BD Rhapsody フローセルにマウス白血球を導入した際の顕鏡像 (左) および、ビーズを導入した際の顕鏡像 (右)

次に、*Toxoplasma gondii* のタキゾイトからブラディゾイトへのステージ変換をモデルに、原虫、宿主細胞、および、原虫-宿主細胞相互作用の 1 細胞解析を行った。HFF 培養細胞に *T. gondii* ME49 株を感染させた後、高 pH 処理でタキゾイトからブラディゾイトへ誘導し、BD Rhapsody を用いて scRNA-seq ライブラリーを作成した。これを NGS 解析に供し、得られた配列は Becton Dickinson 社が提供するパイプラインで 1 細胞毎の発現プロファイルにまとめた。下流の解析として UMAP によるクラスタリング、および、クラスター毎、あるいは、感染の有無による gene set enrichment analysis を行った。

4. 研究成果

(1) 原虫 1 細胞トランスクリプトーム解析に適した scRNA-seq プラットフォームの選定

本研究では、様々な形態・特性を有する原虫の scRNA-seq 解析を可能とする基盤構築を目的に各種検討を行った。まず、scRNA-seq ライブラリーについては、Becton Dickinson 社製 BD Rhapsody が適していると判断した。当該システムは細胞の摘播、溶解、ビーズ導入の各段階を顕鏡下で確認可能なことが特徴であり、その結果、多様な原虫の利用に際して、各段階での確認修正が可能になる。実際、*in vitro* 培養した *Trypanosoma brucei* をウェルに摘播し、Lysis buffer で溶解できることを確認した (Figure 2 and 3)。今回は、標準プロトコールの Lysis buffer を用いたが、難溶性の原虫については Lysis buffer の最適化が可能なることも示唆された。同様に、サイズの大きい HFF 細胞もウェルに収まることを確認した (Figure 2)。

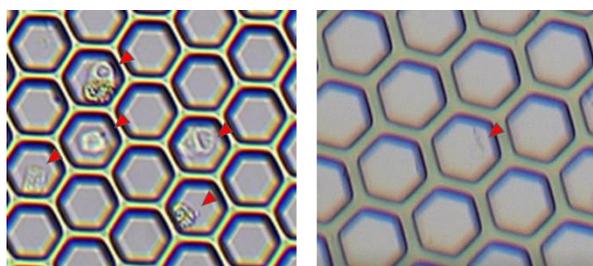


Figure 2. フローセルに収まった *T. gondii* 感染 HFF 細胞 (左)、および、*T. brucei* 虫体 (右)

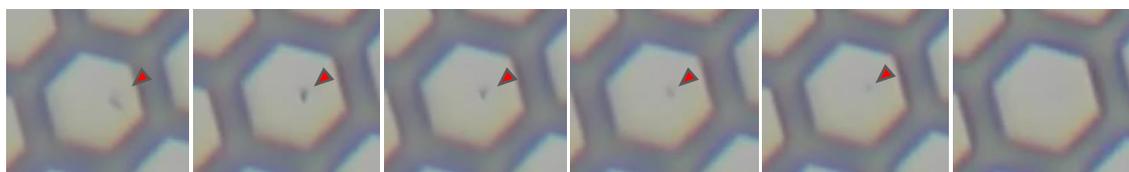


Figure 3. *T. brucei* の溶解過程。約 1 秒間で虫体が溶解した。矢印は *T. brucei* 虫体。

(2) *T. gondii* ステージ変換における原虫-宿主細胞相互作用の 1 細胞解析

高 pH 処理によりブラディゾイトへ誘導後 6 日の *T. gondii* 感染細胞（未感染の bystander 細胞を含む）、および、未感染誘導細胞を BD Rhapsody による scRNA-seq ライブラリー作成に供試し、NGS により感染細胞約 1,500 個の転写プロファイルを得た。宿主遺伝子の発現プロファイルを UNAP 解析した結果、7つのクラスターが得られた（Figure 4）。このうちの1つは主に感染細胞から構成されるクラスターだった（高感染率クラスター）。一方、その他大多数の細胞は4つのクラスターを構成していた。この4クラスターは大多数の bystander 細胞と少数の感染細胞から構成されていた。また、これら4つの間で明確な転写プロファイルの違いは認められないことから、UNAP の特性により疑似的に生じた可能性も考慮して、これらをまとめて1つのクラスター（低感染率クラスター）として扱うことにした。bystander 細胞と感染細胞が同一のクラスターを構成したことは、このクラスターに含まれる感染細胞においては、感染原虫が宿主遺伝子発現に大きな影響を及ぼさないことを示唆している。高感染率クラスターと低感染率クラスターの宿主側遺伝子発現プロファイルを比較したところ、高感染率クラスターでは、細胞増殖に関与するとされる *myc* パスウェイや、代謝系の亢進が認められる一方、免疫関連遺伝子の抑制が認められた（Figure 5）。さらに、高感染率クラスターおよび低感染率クラスターに含まれる感染細胞の宿主側遺伝子発現プロファイルを比較したところ、細胞増殖に関与することが知られている E2F 関連遺伝子群について、bystander 細胞を基準として、前者が亢進、後者が抑制されることが判明した（Figure 6）。一方、感染細胞と bystander 細胞を、mock 感染細胞を基準に比較した結果、前者でインターフェロン α パスウェイに関わる遺伝子群の発現が抑制されており、後者で活性化していることが判明した（Figure 7）。bystander 細胞では感染していないにも関わらず免疫関連遺伝子群が活性化することは、その分子機構も含めて興味深く、今後の解析が望まれる。細胞周期を反映したクラスターも存在したが、限られた数の細胞から構成されていたため、以降の解析からは除外した（Figure 4）。

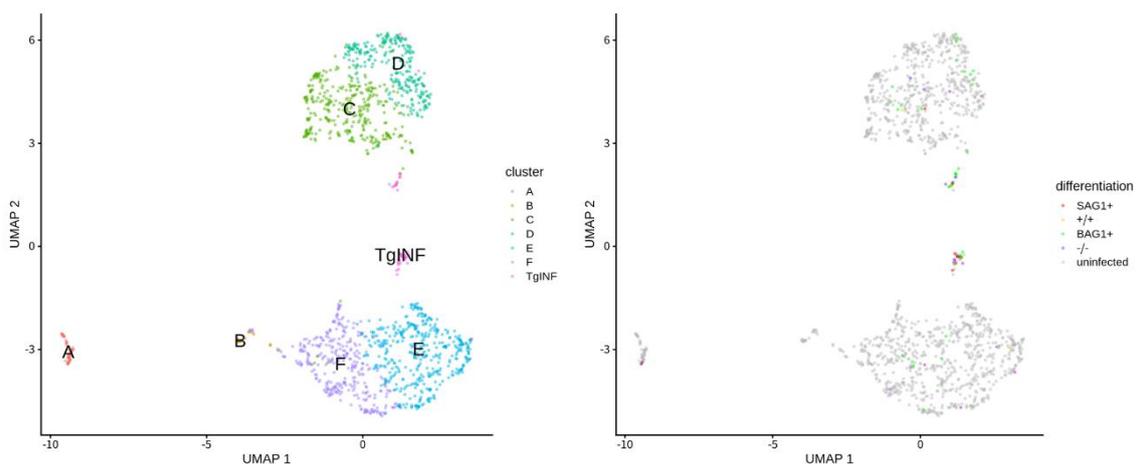


Figure 4. 1 細胞 transcriptome の UNAP 報による視覚化析。各点は各 1 細胞を示す。cluster A、B は G2M 期を反映。cluster C-F は低感染率クラスター。cluster TgINF は高感染率クラスター（左）。色のついた点は、*T. gondii* 感染細胞を示す（右）

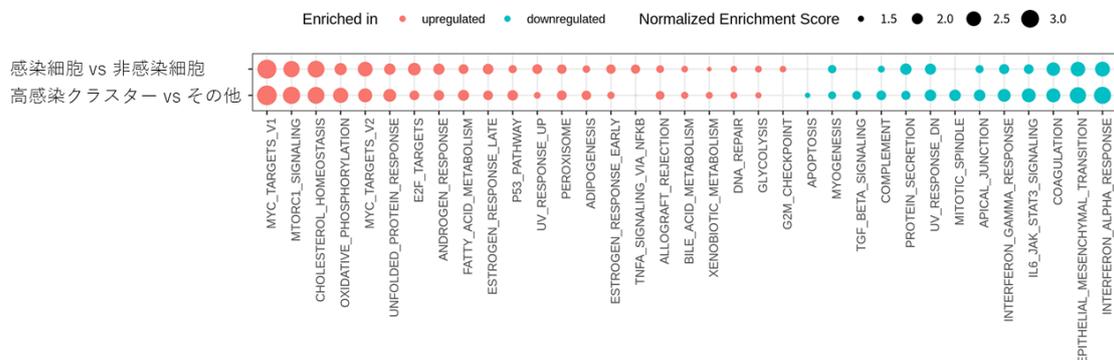


Figure 5. Gene Set Enrichment Analysis.

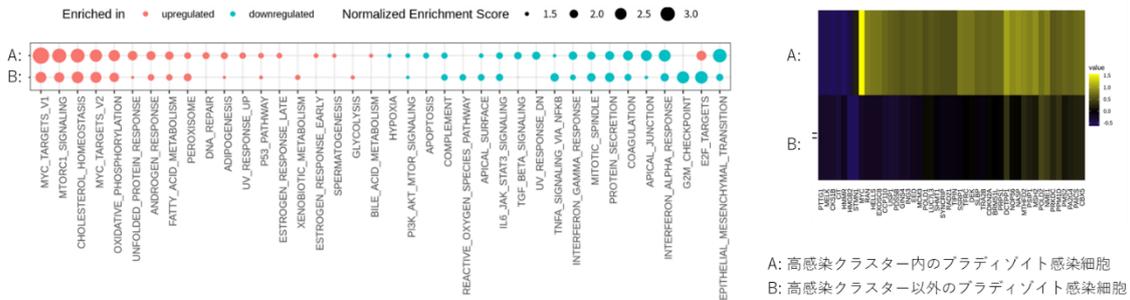


Figure 6. 高感染クラスター内のブラディゾイト感染細胞と、それ以外のブラディゾイト感染細胞における宿主 transcriptome の比較。増減は bystander 細胞を基準とした。Gene Set Enrichment Analysis (左)。E2F target pathway 各遺伝子の発現変動 (右)

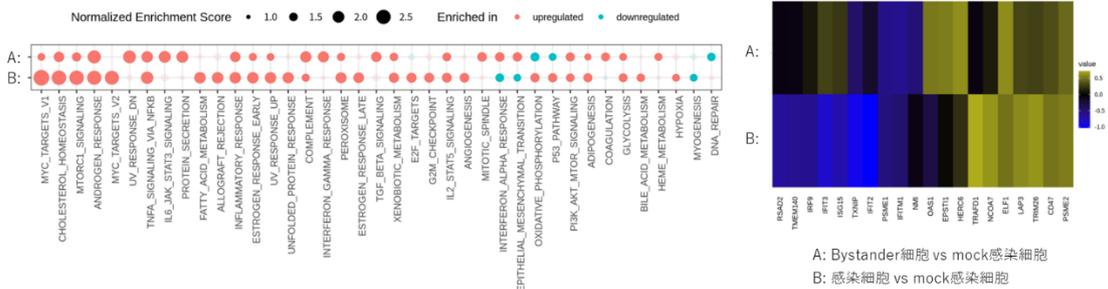


Figure 7. bystander 細胞の発現プロファイル。Gene Set Enrichment Analysis (左)。INF- α response pathway 各遺伝子の発現変動 (右)

本研究を通じ、多様な形態・特徴を有する原虫の scRNA-seq 解析には、マイクロ流路系やドロップレット系を用いたプラットフォームより、マイクロウェル系を応用したプラットフォームの方が適している可能性が示唆された。また、配列取得後の一般的な情報解析パイプラインについても確立・評価することが出来たことから、本研究の目的である Single cell 応答に基づく宿主・原虫相互作用の解析基盤構築は達成されたと考える。一方、今回は 1,500 細胞の解析を行ったが、おおよそ 10%の感染率では感染細胞の数が不足すること、感染率の向上は多重感染など系の不安定さをもたらすこと、今回の NGS 配列数では原虫側の遺伝子発現を十分に網羅できない等の問題点も明らかとなった。これらは単純に系のサイズを拡大することで解決可能であるが、限られた予算で行うことは現実的ではない。従って現状においては細胞数、感染率、NGS 解析量を注意深くバランスさせることが重要であると共に、原虫遺伝子の特異的に読み増す方法の開発の重要性が示唆された。同時に、NGS のさらなる高性能化と低コスト化も望まれる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sugi Tatsuki, Tomita Tadakimi, Kidaka Taishi, Kawai Naoko, Hayashida Kyoko, Weiss Louis M., Yamagishi Junya	4. 巻 12
2. 論文標題 Single Cell Transcriptomes of In Vitro Bradyzoite Infected Cells Reveals Toxoplasma gondii Stage Dependent Host Cell Alterations	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	6. 最初と最後の頁 eCollection
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcimb.2022.848693	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究 分 担 者	鈴木 穣 (suzuki yutaka) (40323646)	東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授 (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関