

令和元年6月11日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08240

研究課題名(和文) 生体内マスト細胞特異的RNA網羅解析によるアレルギー疾患の機構解明・創薬標的探索

研究課題名(英文) Development of the RNA amplification method for single mast cell

研究代表者

土屋 創健 (Tsuchiya, Soken)

熊本大学・大学院生命科学研究部(薬)・講師

研究者番号：80423002

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：アレルギー応答に中心的な役割を果たすマスト細胞は疎に散在する末梢組織で最終分化を遂げるため、その生体内の性質・特性は十分には明らかになっておらず、マスト細胞・アレルギー疾患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レベルでマスト細胞において発現している遺伝子の種類や量を明らかにするために必要な遺伝子増幅法の構築を志向した結果、マスト細胞シングルセル量から全遺伝子の種類や量の比較解析に十分かつ内在する量差を反映する増幅法を構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アレルギー疾患の患者数は増加傾向にあり、未だ根本的な予防・治療法は開発されていない。アレルギー疾患に対する新たな治療、予防、創薬のために、アレルギー応答に中心的な役割を果たすマスト細胞の性質・特性を明らかにすることは重要であることから、本成果を活用することによってマスト細胞に対する理解が深まり、アレルギー疾患に関する新たな治療法などの開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Mast cells are derived from hematopoietic stem cells, and are migrate into peripheral tissues as immature progenitor, and are differentiate into mature mast cells with various phenotypes depending on the microenvironment. As mast cells play central roles in allergy responses, it is important for development of therapies and drugs to understand the characters and properties of in vivo mature mast cells in each peripheral tissues. However, their characters and properties remains uncertain, because they are sparsely existed in the peripheral tissues. Then, I established a RNA amplification method for a transcriptome analysis of single mast cell. The yield of amplified RNA was sufficient for the single-cell transcriptome analysis and amplified RNA reflected aspects between mast cells with the distinct properties.

研究分野：生化学

キーワード：マスト細胞

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19(共通)

### 1. 研究開始当初の背景

アレルギー疾患の患者数は増加傾向にあり、近年、アレルギーには様々な要因や発症メカニズムが存在する可能性が示唆されているが、未だ根本的な予防・治療法は開発されていない。近年、T細胞やマクロファージなどの免疫細胞において、産生メディエーターや機能面で異とする・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・炎症が適切に保たれ、その破綻が種々の炎症性疾患を引き起こすことが見いだされた (*Front. Immunol.*, 5, 603, 2014; 6, 212, 2015)。くわえて、最近、比較的均一集団と考えられていた好中球においても特定の亜集団が特異的に組織障害を引き起こすことが報告された (*Nature*, 525, 528-532, 2015)。マスト細胞はマクロファージや好中球と同じミエロイド系の免疫細胞であり、様々な組織における種々のアレルギーにおいて、マスト細胞がその発症や増悪に極めて大きな役割を果たすことが明らかとなっている。これまでに染色性や局在性、増殖依存性の異なる結合組織型マスト細胞と粘膜型マスト細胞の2群のサブタイプが見いだされたが、両者が存在する意義・役割や詳細な違い、他の亜集団の存在の有無も含め、そもそも生体内、*in vivo* 特有のマスト細胞の性質・特性については、IgE を介した抗原抗体反応を除いて未だにほとんど明らかになっておらず、マスト細胞およびアレルギー疾患研究の大きな障壁となっている。その一因として、(i) マスト細胞は造血幹細胞に由来するものの、末梢組織で最終分化を遂げ、組織中に疎に散在すること、(ii) セルソーティングや培養法などの組織からの単離調整法では *artifact* な刺激を受けて性質・特性が変化すること、(iii) 骨髄由来マスト細胞初代培養系が構築されて多用されているが、*in vitro* の培養マスト細胞はいずれも分化成熟度が低く、わかっているだけでも種々の点で生体内マスト細胞と異なっていることなどが挙げられる。したがって、生体内マスト細胞の性質・特性を詳細に理解できるようになることは、アレルギー疾患に対する新たな治療、予防、創薬への応用に資すると期待されている。

### 2. 研究の目的

本研究課題では、マスト細胞は前駆体細胞として末梢組織に移行してから最終分化を遂げ、組織中に疎に散在することや、セルソーティングや培養法などの組織からの単離調整法では *artifact* な刺激を受けて本来の生体内マスト細胞とは性質・特性が変化することを考慮し、組織から抽出してマスト細胞を多数集めて解析するのではなく、シングルセルレベルで末梢組織中に疎に散在するマスト細胞に発現している遺伝子の種類や量を明らかにすることが可能となる遺伝子増幅法を構築することを志向する。

### 3. 研究の方法

マスト細胞のシングルセル RNA 量を用いて、増幅した RNA に偏りが生じていないか、増幅前の発現している遺伝子の種類や量などの情報を保持しているか (精度)、発現している遺伝子の種類や量などの情報を調べる上で十分な量の RNA が増幅されたか (感度) などの観点から評価、比較、検討を行うことによって、用いる酵素の特性や反応条件 (濃度、温度、時間など)、ツールの吸着性や集積性などについての改善を行い、「4. 研究成果」に記述する一連の遺伝子増幅法の各ステップの最適化を行うことで、これらの組み合わせである遺伝子増幅法の構築を行った。

### 4. 研究成果

直接的に遺伝子増幅する手法としては Polymerase Chain Reaction 法よりも増幅効率は落ちるものの、RNA の 5'-3' 方向性情報を保持し、バイアスの生じにくい *in vitro* transcription 法を採用した。逆転写、二本鎖 DNA 合成、精製、増幅などのステップにおいては主に用いる酵素の特性や反応条件（濃度、温度、時間など）の検討・最適化を行い、また、RNA 抽出、逆転写、二本鎖 DNA 合成、精製、増幅、精製の一連のステップにおいてはくわえてツールの吸着性や集積性などの検討・最適化を行った結果、従来、最も精度、感度の高いとされていた Polymerase Chain Reaction 法を用いた手法よりも高精度で、シングルマスト細胞の RNA 量から発現している遺伝子の種類や量を明らかにするために十分な量の増幅が可能な遺伝子増幅法を構築できた。アレルギー疾患の患者数は増加傾向であり、未だ根本的な予防・治療法は開発されていないため、アレルギー疾患に対する新たな治療・予防法の確立のために、アレルギー応答に中心的な役割を果たす生体内マスト細胞の性質・特性を明らかにすることは重要であることから、本成果が活用されることによって生体内マスト細胞の理解が深まり、アレルギー疾患に関する新たな治療・予防法などの開発につながることを期待される。

#### <引用文献>

- ①Muraille E., Leo O. and Moser M. TH1/TH2 paradigm extended: macrophage polarization as an unappreciated pathogen-driven escape mechanism? *Front. Immunol.*, 5, 603, 2014.
- ②Mills C.D. Anatomy of a discovery: m1 and m2 macrophages. *Front. Immunol.*, 6, 212, 2015.
- ③Zhang D., Chen G., Manwani D., Mortha A., Xu C., Faith J.J., Burk R.D., Kunisaki Y., Jang J.E., Scheiermann C., Merad M. and Frenette P.S. Neutrophil ageing is regulated by the microbiome. *Nature*, 525, 528-532, 2015.

#### 5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 5 件)

- ①中尾優子、村上里穂、宮本卓馬、鈴木佑治、渡辺真由帆、森本和志、稲住知明、土屋創健、成宮 周、杉本幸彦  
プロスタグランジン<sub>I</sub>は、マスト細胞の障害性炎症応答を抑制する  
日本薬学会第139年会  
2019年
- ②村上里穂、中尾優子、宮本卓馬、渡辺真由帆、森本和志、稲住知明、土屋創健、成宮周、杉本幸彦  
マスト細胞炎症性応答におけるプロスタサイクリンIP受容体の役割  
第17回日本薬学会生物系薬学部会ファーマ・バイオフォーラム  
2018年
- ③村上里穂、中尾優子、宮本卓馬、鈴木佑治、渡辺真由帆、森本和志、稲住知明、土屋創健、成宮周、杉本幸彦  
マスト細胞炎症性応答に対するプロスタサイクリン IP 受容体の役割  
第60回日本脂質生化学会  
2018年
- ④村上里穂、宮本卓馬、鈴木佑治、渡辺真由帆、森本和志、稲住知明、土屋創健、成宮周、杉本幸彦  
プロスタサイクリンIP受容体がマスト細胞炎症性応答に与える影響

第33回日本薬学会九州支部大会

2016年

- ⑤宮本卓馬、鈴木佑治、渡辺真由帆、森本和志、土屋創健、成宮周、杉本幸彦  
マスト細胞の炎症性応答に対するプロスタサイクリン受容体IPの役割  
第15回日本薬学会生物系薬学部会ファーマ・バイオフィォーラム

2016年

[その他]

ホームページ等

<http://www.pharm.kumamoto-u.ac.jp/Labs/seika/>

## 6. 研究組織

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。