

# 平成 26 年度 海外留学補助金交付による研究経過・成果報告書

## 1 細胞単位の解析に必要な技術の開発とその臨床応用

カロリンスカ研究所 Jesper Tegnér 研究室

森川洋匡

### 背景と目的

制御性 T 細胞は発見当初は CD4 陽性 CD25 陽性 T 細胞として同定されたものが、その後、FoxP3 陽性細胞とすることでより厳密に定義され、現在ではゲノム上の *Foxp3* の特定の領域が脱メチル化している細胞群がより安定した抑制活性をもつ Treg として知られている。私は Treg においてその FoxP3 と脱メチル化を含むエピゲノムが独立した、しかし共に Treg に欠かせない要素であることをマウスモデルで報告した。このことは、今後、Treg をターゲットにして悪性腫瘍、自己免疫疾患、移植後拒絶を治療するにあたり重要な知見であるが、いまだヒトにおいては、マウスと違い不明なところが多く、さらに高解像度な細胞集団の解析が期待される。本プロジェクトでは、ヒト由来の免疫細胞（主に T 細胞群）の Single cell analysis (主に RNA 発現とタンパク発現データ) を用いて高解像度なデータを取得し、安定な抑制活性をもつ Treg を正確に定義し、治療ターゲットを同定する。

### 方法

Single cell RNA 解析に関しては、カロリンスカ研究所で 2 つのプロトコルが開発されている。mRNA 全長を增幅して解析できる Smart-seq2 (Picelli, S. et al. Full-length RNA-seq from single cells using Smart-seq2. *Nat. Protoc.* 9, 171-81 (2014).) と mRNA の転写開始点と発現レベルを分子単位で正確に解析できる STRT-seq (Islam, S. et al. Quantitative single-cell RNA-seq with unique molecular identifiers. *Nat. Methods* 11, 163-6 (2014).) であり、共に研究所内で様々な細胞に適用されている。本プロジェクトにもこの 2 つの解析方法を同じターゲット（まずはヒト CD4 陽性 CD25 陽性細胞）に使用することにした。Smart-seq2 は 384well のプレートに single cell sorting した後（同時に蛍光標識抗体により各 1 細胞についてのタンパク発現を記録）、次世代シーケンサー用のライブラリを作成、STRT-seq は C1 system (Fluidigm) を用いて single cell 単位で専用 chip 上に集めた後、プロトコルに従ってライブラリを作成し、次世代シーケンサーにて配列を読む。それらの結果に応じてさらに FACS analyzer/CyTOF を用いて 1 細胞単位のタンパク発現データも取得して統合解析をする。

## 経過報告

共に Publication に従ったプロトコルにてターゲットの細胞群を解析しようとしたところ明らかに他の細胞種と比較して mRNA を逆転写して作成した cDNA の量が少なかった。本来、体外で刺激していない T 細胞は大きさが 6μm 前後と小さく、 mRNA 量もわずかであるため想定内と考え、引き続き次世代シーケンサー用のライブラリを作成したが、シーケンスが不可能ではないものの通常よりかなりライブラリの質も量も低かった（2 度確認）。そこで、まずは Smart-seq2 の細胞の溶解条件・逆転

写用のプライマーの配列・逆転写の条件から見直すことにした。その結果、本来のプロトコルの試薬・プライマーの配列をカスタマイズすることによって大幅に良質な cDNA を得ることができ、かつプライマーダイマーの量を抑える条件をみつけることができた（共同研究で近日論文投稿予定のため条件は confidential）。最終的に得られた次世代シーケンサー用ライブラリも問題なく、シーケンスを実行した。この条件を STRT-seq のシステムにも試験的に適用したところ、同様に大幅な cDNA 量の改善が見られることがわかった。近日、 STRT-seq に対しても同条件で本実験を実行する予定となっている。

## 総括と展望

現在、ヒト CD4 陽性 CD25 陽性 T 細胞の single cell RNA 解析からのデータにタンパク発現解析などのデータを追加することにより正確な細胞群の分類、各々の機能の確認と治療に役立つマーカーの同定を、バイオインフォマティクスにより進めている（confidential のため提示できず）。研究室としては、同条件、同様な解析を癌組織内に浸潤している免疫細胞、多発性硬化症患者由来の髄液にも適用するプロジェクトを進めており、それらのデータの解析を通して、1 細胞 RNA 解析特有の問題の提起と、その解決方法を確立する。また、上記の条件検討の際に 10～の細胞からも上質なライブラリが作成できることを確認しており、1 細胞だけでなく、少数細胞群の解析においても全長 mRNA を効率よく作成できることを利用した希少な臨床サンプルの解析にも利用できる。この技術では 1 実験で数百細胞の 1 細胞解析が限界であるため、将来的には数千～数万細胞に拡大できるように液滴内で細胞の RNA を処理する方法を利用するプロトコルの確立を、 Microfluidics 専門の研究室と相談しながら進めて行く予定にしている。

