

研究テーマ： 組織特異的な免疫応答制御機構の解明

シカゴ大学 高濱 充寛

背景および目的

組織常在型メモリーT細胞(Tissue-Resident Memory T cells: TRM)は組織の実質に常在する CD8 陽性 T 細胞の一種であり、病原体への再曝露時の生体防御応答において重要な役割を果たしている。近年の研究により、TRM は組織ごとで異なる特徴を獲得し、病原体への再曝露時に組織ごとで異なる免疫応答を惹起することが明らかとなってきた。しかしながら、TRM がどのような分子機序で組織特異的な免疫応答を誘導するのか依然として不明な点が残されている。本研究では TRM を介した組織特異的な免疫応答制御機構の分子機序の解明を目指す。

方法

肺および肝臓からの細胞単離

麻酔を行ったマウスに対し PBS-EDTA で灌流を行った後、肺および肝臓を単離した。肺は 1.5mg/ml コラゲナーゼ IV (Worthington Biochemical Corporation)、400mU/ml ディスパーゼ (Life Technologies)、0.5ng/ml DNaseI (Sigma-Aldrich)が含まれる DMEM 培地、肝臓は Liver Dissociation Kit (Miltenyi)に含まれる Enzyme D、Enzyme R、EnzymeA が含まれる DMEM 培地の入った MACS C チューブ内へ移し、それぞれ GentleMACS Octo Dissociator with Heaters (Miltenyi)のプログラム 37C_m_LDK_1、37C_m_LIDK_1 により細胞の単離を行った。細胞の単離後、肺細胞は CD45 Micro Beads (Miltenyi)と ACK Lysing Buffer (Lonza)、肝臓細胞は CD45 Micro Beads (Miltenyi)、H-2 抗体 (M1/42) (BioLegend)と Anti-Rat IgG MicroBeads (Miltenyi)により細胞の分離・溶血を行った。

フローサイトメトリー

マウス肺および肝臓から細胞を単離、CD45 陽性・陰性細胞を分離した後、Ter119-FITC (Ly-76)、CD45-PerCP/Cy5.5 抗体(30-F11)、DAPI で染色した。染色した細胞は Novocyte (ACEA Biosciences)を用いて解析を行った。これにより、免疫細胞 (Ter119⁺CD45⁺)、非免疫細胞 (Ter119⁺CD45⁻)、赤血球 (Ter119⁺)を同定した。

Single-cell RNA sequencing

10X Chromium および Chromium Single Cell 5' Library Construction Kit (10X Genomics)を用いてライブラリーの作製、NextSeq550 を用いてシーケンシングを行った。また、データ解析において

は 10X Cell Ranger、Scanpy (version1.3.7)を用いた。

結果および考察

肺および肝臓の細胞単離方法の検討

肺および肝臓に常在する TRM は、ウイルス感染時に肺、肝臓特異的な遺伝子を発現することが知られている。しかしながら、肺、肝臓における TRM の応答に応じて、TRM 以外の細胞がどのように応答するのかについては明らかとなっていない。そこで、どのような細胞がどのような遺伝子を発現しているかを明らかにするために、ウイルス感染前後の肺および肝臓を採取し、免疫細胞・非免疫細胞に対して **Single-cell RNA sequencing** を行うことを目指した。はじめに、肺および肝臓の細胞単離方法についての検討を行った。細胞単離に用いる酵素、酵素の反応時間、組織の裁断の有無についての検討の結果、肺はコラゲナーゼ IV、ディスパーゼ、DNaseI を含む DMEM 培地と GentleMACS を、肝臓は Liver Dissociation Kit と GentleMACS を用いて細胞を単離した場合、生細胞の割合が高いことが明らかとなった。次に、細胞単離後の免疫・非免疫細胞の分離について検討したところ、肺は CD45 Micro Beads および ACK Lysing Buffer、肝臓は CD45 Micro Beads、H-2 抗体と Anti-Rat IgG MicroBeads により細胞を分離した場合、細胞の純度および回収率が高くなることが明らかとなった (図 1)。

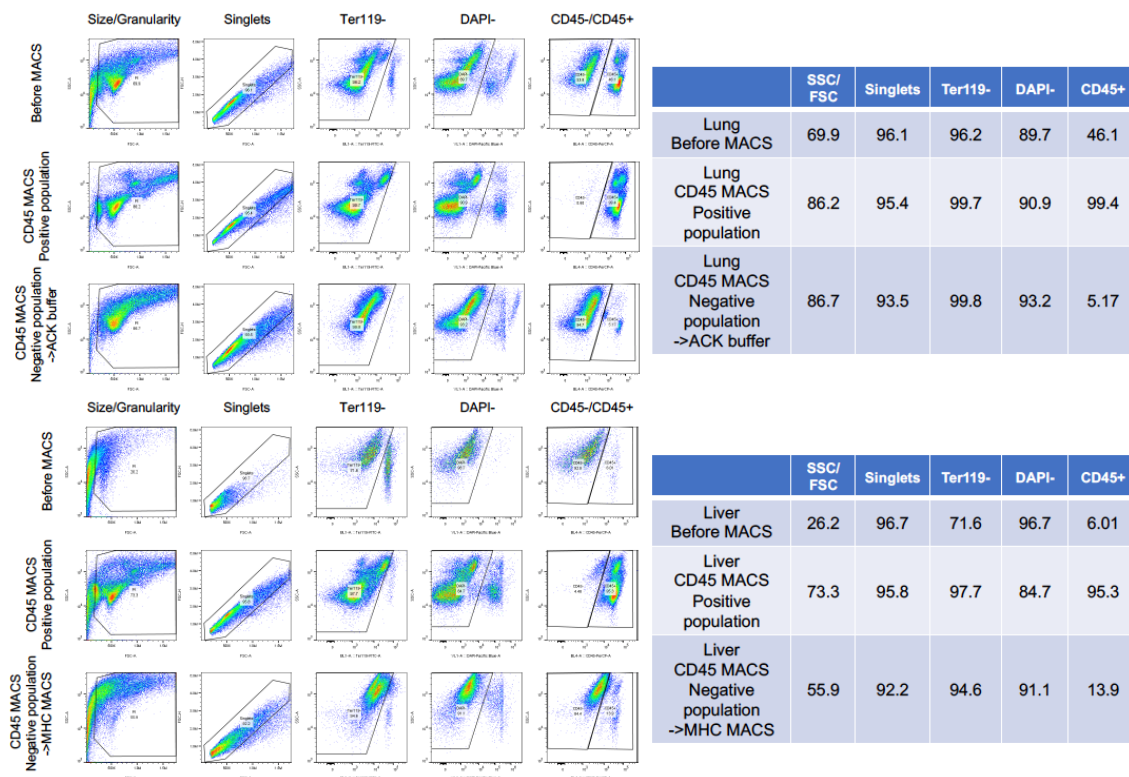


図 1. 肺および肝臓から単離・分離した細胞における生細胞・CD45 陽性細胞の割合

肺および肝臓細胞を用いた Single-cell RNA sequencing

本研究における単離方法により、肺および肝臓に存在する様々な細胞種を単離することができるかを確認するため、肺および肝臓からの単離細胞を用いて Single-cell RNA sequencing を行った。Louvain 法により肺および肝臓からの単離細胞のクラスタリングを行った結果、22 のクラスタが存在することが明らかとなった (図 2)。

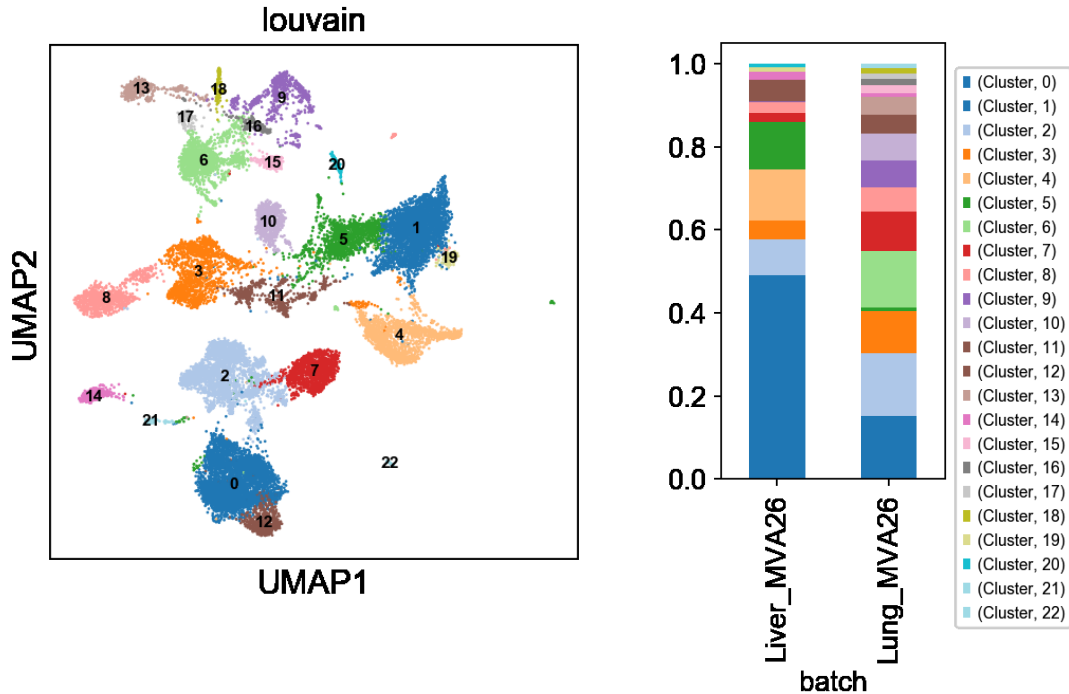


図 2. 肺および肝臓からの単離細胞における 22 クラスターの同定

Louvain 法によりクラスタリングを行い、可視化のため UMAP により次元削減を行った。右図はそれぞれのクラスタの割合を示す。

次に、肺および肝臓から単離した細胞がどのような細胞種なのかを明らかにするため、肺および肝臓に存在するとされる細胞種のマーカー遺伝子の発現について調べた。その結果、細胞種によっては数が少ないものの、免疫細胞では T 細胞、B 細胞、樹状細胞、肺泡マクロファージ、クッパー細胞、単球、好中球、NK 細胞、好塩基球などが、非免疫細胞では肺泡上皮細胞、クラブ細胞、繊毛細胞、肝細胞などが、本研究において単離した細胞に含まれていることが明らかとなった (図 3)。

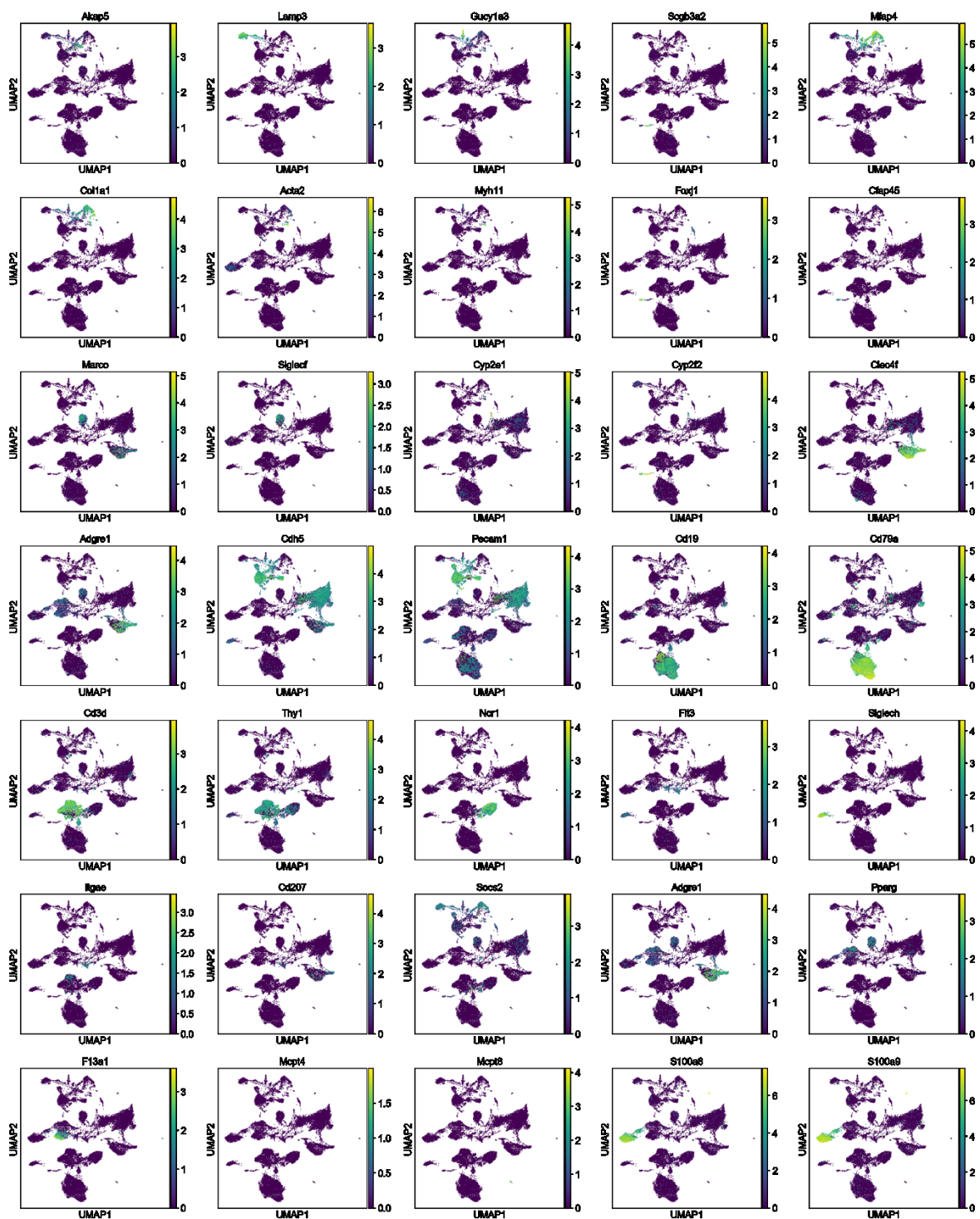


図 3. 肺および肝臓からの単離細胞におけるマーカー遺伝子の発現

文献により報告されているマーカー遺伝子を選択し、本研究において単離した細胞における遺伝子発現を調べた。

上記のような Single-cell RNA sequencing の解析結果から、本研究における細胞単離方法によって肺および肝臓から様々な種類の細胞を単離できることが明らかとなった。今後は同じ方法を用いてウイルス感染前後の肺および肝臓から細胞を単離することにより、どのような遺伝子が、どのような細胞種において発現誘導されているのかを明らかにしていきたい。