

117. 新規自己反応性リンパ球集団の同定とその機能解析

岡崎 拓

Key words: 免疫学, 自己免疫, 免疫補助受容体,
単一細胞発現解析

徳島大学
疾患プロテオゲノム研究センター
ゲノム機能分野

緒言

自己免疫疾患の発症には多くの分子が関与するため、疾患成立機序の全貌を解明するためには、自己反応性細胞の活性化を制御する複雑な機構を理解することが必要不可欠である。リンパ球は、特定の抗原に反応する抗原受容体を発現しているが、特定の抗原と会合したからといってすぐに活性化されるわけではなく、免疫補助受容体と呼ばれる受容体群からの刺激やサイトカイン等の有無によって活性化が厳密に制御されている。我々は、抑制性の免疫補助受容体の一つである PD-1 (programmed cell death 1) が自己に対する不適切な免疫応答を制御することにより、自己免疫疾患の発症を抑制することを明らかにしてきた¹⁾。さらに、PD-1 とは別の LAG-3 (lymphocyte activation gene 3) と呼ばれる免疫補助受容体が PD-1 と協調的に自己反応性 T 細胞の活性化を抑制することにより、自己免疫疾患の発症を抑制していることを明らかにした²⁾。

PD-1 と LAG-3 は、共に定常状態のリンパ球には発現しておらず、リンパ球の活性化により発現が誘導される。リンパ球の活性化が収束するとそれらの発現も下がるが、特定の条件下では発現が持続することがある。このように、定常状態では発現し得ない分子を持続的に発現する細胞集団は、特別な機能を有する特別な細胞集団である可能性がある。例えば、リンパ節のリンパ濾胞内にごくわずかに存在する、PD-1 を強発現する T リンパ球が、以前から概念的に提唱されていた、抗原特異的な B 細胞の活性化や長期免疫記憶の形成を補助する濾胞ヘルパー T 細胞そのものであることが、近年明らかとされた³⁾。PD-1 を用いて濾胞ヘルパー T 細胞を分離できるようになったことにより、その後、濾胞ヘルパー T 細胞に関する研究が飛躍的に進み、液性免疫の制御機構の解明が大きく発展した。LAG-3 を持続的に発現する細胞については、いわゆる制御性 T 細胞のように、免疫応答を積極的に抑制するという報告もなされているが、その詳細は不明であり、LAG-3 が、どのような細胞のどのような機能を選択的に抑制することにより自己免疫疾患を抑制しているのか、また LAG-3 陽性細胞がどのような機能を担っているのかを解明することが極めて重要な課題となっている。

我々はこれまでに、様々な条件下で LAG-3 発現細胞を探索することにより、腸管のリンパ組織、臓器特異的自己免疫疾患を発症したマウスの標的臓器の所属リンパ節等、限られた場所および条件下において、LAG-3 が発現することを見出している。上述の通り LAG-3 の発現は細胞の活性化状態によって変化するため、発現の有無だけでは持続的な発現と一過性の発現を区別できない。また、LAG-3 を持続的に発現する細胞の中に、異なる機能を有する細胞集団が複数含まれる可能性があるため、LAG-3 陽性細胞を単離して解析するだけでは、本来の機能を見落とす危険性がある。そこで本研究では、LAG-3 陽性細胞を対象に単一細胞半網羅的発現解析を行い、LAG-3 陽性細胞に含まれる新規の機能的細胞亜集団を同定することを目的とした。

方法および結果

近年、マイクロ流路技術により、多検体に対して多種類の遺伝子発現の定量を極めて効率的に行うことが可能となった。本研究では、BioMark HD ジェネティックアナリシスシステム (Fluidigm 社) による定量的 PCR と、C1 Single-Cell Auto Prep システム (Fluidigm 社) による単一細胞分取とを組み合わせることにより、多数の単一細胞について

多数の遺伝子発現を定量すること（多検体単一細胞半網羅的発現解析と呼ぶ）を行った。これにより、注目する細胞集団に含まれる数%の亜集団の特性を、遺伝子発現を指標に正確に決定することが可能であると考えた。

正常マウスの脾臓やリンパ節においてはLAG-3の発現はほとんど認められないが、独自に樹立したモノクローナル抗体を用いて様々な条件下でLAG-3発現細胞を探索したところ、正常マウスの腸管リンパ組織、唾液腺炎を自然発症したPD-1欠損マウスの頸部リンパ節等において、LAG-3を持続的に発現する細胞が存在することを見出した。そこでまず、免疫をしていないマウスのパイエル板から、LAG-3陽性CD4 T細胞をセルソーターにて分取し、LAG-3陰性CD4 T細胞を比較対照としてマイクロアレイ解析を行って、LAG-3陽性CD4 T細胞に発現している遺伝子群及びLAG-3陰性CD4 T細胞よりも発現が低下している遺伝子群を同定した。同定した遺伝子群の中から、LAG-3陽性CD4 T細胞に含まれる亜集団の定義付けに有用と思われる、転写因子、ケモカイン受容体、サイトカイン受容体、細胞接着分子、その他の膜受容体、その他の遺伝子を192個選定した。候補遺伝子の選定にあたっては、主に以下の条件を重要視した。

- (1) 母集団において中程度に発現している。
- (2) ナイーブT細胞及び活性化T細胞には発現していない。
- (3) 機能的な関連が疑われる。
- (4) 転写因子や機能未知の遺伝子を優先する。

これをもとに、母集団であるLAG-3陽性CD4 T細胞について多検体単一細胞半網羅的発現解析を行った。具体的には、C1 Single-Cell Auto Prep システムを用いて母集団から単一細胞を分取し、各々の細胞からcDNAを調製した後、BioMark HD ジェネティックアナリシスシステムを用いて、上述の192遺伝子について定量的発現解析を行った。同システムを用いることにより、コントロールを含めて1度の解析で96単一細胞 × 96遺伝子 = 9,216種類のアッセイを行うことができるが、C1 Single-Cell Auto Prep システムを用いる際に工夫を加えることにより、192遺伝子を対象に定量的発現解析を行うことが可能なcDNAを調製した。従って、BioMark HD ジェネティックアナリシスシステムを用いた定量的PCRの操作を2回行うことにより、96単一細胞 × 192遺伝子 = 18,432種類のアッセイを行うことができた。得られた結果を、SINGuLAR™ Analysis Toolset (Fluidigm社)を用いて解析した。

個々の単一細胞における発現量と、当該発現量を示す単一細胞の数（確率密度）をグラフ化したバイオリンプロットの代表例を図1に示す。マーカーとして用いた192遺伝子のうち、約31%の遺伝子は単一細胞のうちの10%以下にしか発現しておらず、約16%の遺伝子は単一細胞のうちの10~20%にしか発現していなかった。また、約20%の遺伝子は単一細胞のうちの90%以上の細胞に発現しており、約10%の遺伝子は単一細胞のうちの80~90%に発現していた。本研究では、注目する母集団から機能的細胞亜集団を同定することを目的としているが、機能解析の可否等を考えると、母集団に占める割合が20~80%程度の細胞集団に着目することが有効と考えた。今回、選定した192遺伝子のうちの約77%は、検討した単一細胞の80%以上で発現あるいは無発現であった。すなわち、発現の有無だけを指標とする場合には、単一細胞間で不均一な発現を示した約23%の遺伝子が、亜集団の分類に有用となり得る遺伝子であると考えられた。また、母集団のマイクロアレイ解析において中程度に発現している遺伝子を単一細胞の発現解析の対象としたが、実際に発現が認められた遺伝子のうちの大半は、ほぼ全ての単一細胞に中程度に発現しているものであり、残りの遺伝子が、ごく限られた亜集団に高発現している遺伝子であったことになる。従って、母集団に中程度に発現していることだけでは、限られた亜集団にのみ発現している遺伝子を絞ることはできず、96遺伝子ではなく、少なくとも192遺伝子を解析対象とすることが、目的とするマーカー分子を得る確率を高める上で、重要であると考えられる。

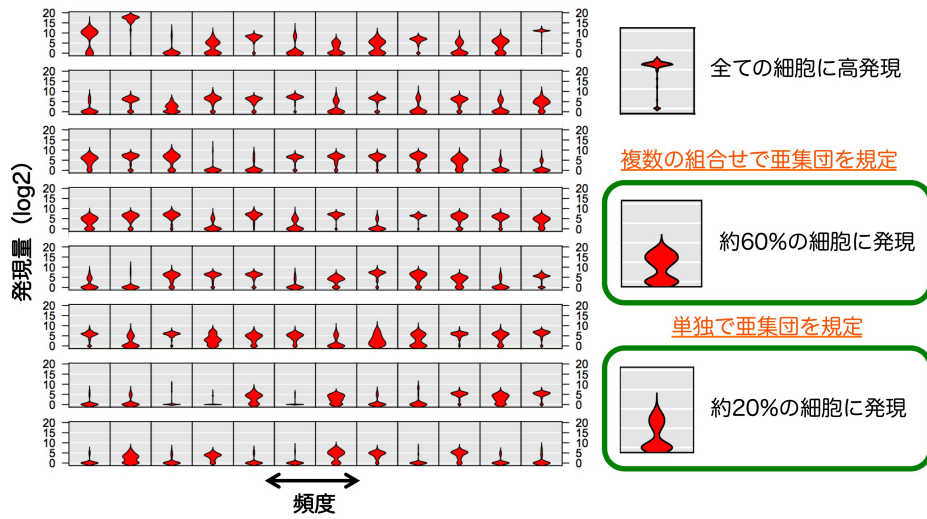


図1. バイオリンプロットによる発現量分布の可視化.

LAG-3 陽性 CD4 T 細胞から分取した 96 個の単一細胞に対して、192 遺伝子について定量的発現解析を行った。個々の単一細胞における発現量 (log2) の分布をバイオリンプロットにより可視化した。縦軸に個々の単一細胞における発現量 (log2) を、横軸に当該発現量を示す単一細胞の数 (確率密度) を示すことにより、集団における発現量の分布パターンを容易に把握することができる。単一細胞のうちの例えば約 60% に発現している遺伝子は、複数組み合わせることにより亜集団を規定できる可能性があり、例えば約 20% に発現している遺伝子は、単独で亜集団を規定できる可能性がある。

個々の単一細胞における各遺伝子の発現プロファイルをグローバル Z スコアのヒートマップ表示により可視化し、単一細胞の階層的クラスタリング解析を行った。これにより、96 個の単一細胞を各遺伝子の発現パターンに基づいて分類した。図 2 に示す通り、今回用いた LAG-3 陽性 CD4 T 細胞は、複数の亜集団に分類された。また、一部の細胞集団に特徴的に発現する遺伝子が複数同定された。

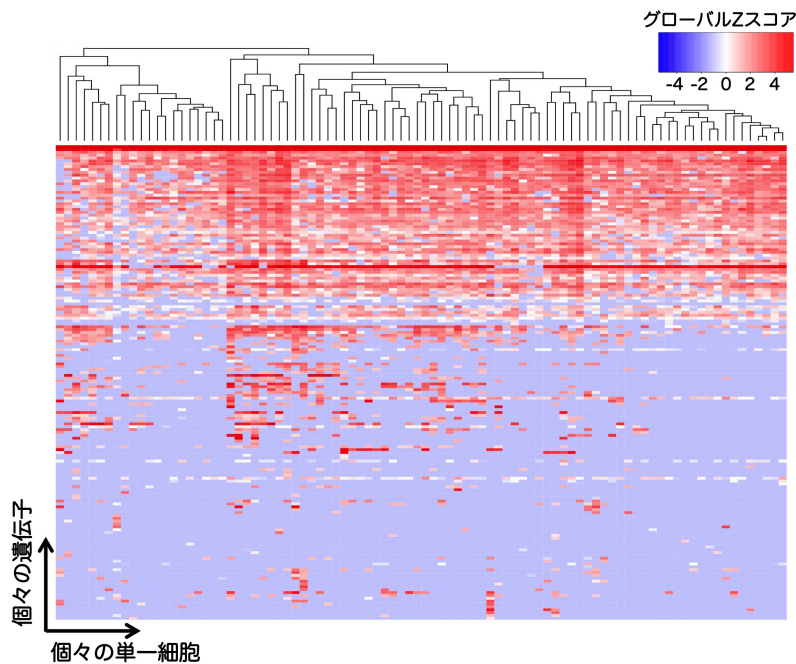


図2. 単一細胞の階層的クラスタリング解析.

LAG-3 陽性 CD4 T 細胞から分取した 96 個の単一細胞に対して、192 遺伝子について定量的発現解析を行った。個々の単一細胞における各遺伝子の発現プロファイルをグローバル Z スコアのヒートマップ表示により可視化し、単一細胞の階層的クラスタリング解析を行った。これにより、LAG-3 陽性 CD4 T 細胞が複数の亜集団に分類されることが明らかとなった。

考 察

今回、LAG-3 発現細胞が複数の亜集団に分類されることを見出したが、今後、各亜集団を特徴付ける遺伝子の組合せ等に基づいて、これらの亜集団の中から機能的に特に重要と予想される亜集団を特定し、解析を進める必要がある。機能的に重要であると予測される細胞亜集団について、自己反応性を含めた抗原特異性、抗原特異性の多様性等や、細胞亜集団が出現する時期、病態の進展による量的及び質的变化、また、当該細胞集団の除去が各種免疫応答に与える影響等を解析することにより、当該細胞集団の機能を詳細に解析していく予定である。また、異なる組織や条件下で回収した LAG-3 発現細胞を母集団として用いることや、階層的クラスタリング解析の際の条件を変えることにより、異なる機能的細胞亜集団を特定できる可能性がある。また、今回マーカーとして使用した 192 遺伝子以外の遺伝子を追加することにより、分類の精度が向上するものと期待される。最近、単一細胞の遺伝子発現解析に、RNA シーケンスが利用されるようになってきた。我々が今回用いた手法と比べると、全トランスクリプトを網羅した発現解析が可能であるという利点を有するが、コストが高い、全トランスクリプトを増幅してから解析するためバイアスが生じやすいといった欠点を有する。

免疫細胞が体内を走り回るといった特徴を有していることから、免疫学においては細胞を機能で分類することが特に重要である。古くから新規細胞集団の同定が試みられてきているが、依然、濾胞ヘルパー T 細胞に加え、アレルギー疾患の発症に重要なナチュラルヘルパー細胞等、新たに同定される細胞集団が後を絶たない。また、新たに同定された細胞集団の解析が数多くの革新的な発見をもたらしている。本研究で注目している LAG-3 陽性細胞に含まれる細胞亜集団についても、当該細胞集団の増減等を指標とした新規診断法の開発、および当該細胞集団の機能を制御することによる新規治療法の開発への応用が、大いに期待される。

共同研究者

本研究の共同研究者は、徳島大学疾患プロテオゲノム研究センターゲノム機能分野の岡崎一美である。最後に、本研究を行うにあたりご支援いただきました上原記念生命科学財団に深謝申し上げます。

文 献

- 1) Okazaki, T., Chikuma, S., Iwai, Y., Fagarasan, S. & Honjo, T. : A rheostat for immune responses: the unique properties of PD-1 and their advantages for clinical application. *Nat. Immunol.*, **14** : 1212-1218, 2013.
- 2) Okazaki, T., Okazaki, I. M., Wang, J., Sugiura, D., Nakaki, F., Yoshida, T., Kato Y., Fagarasan, S., Muramatsu, M., Eto, T., Hioki, K. & Honjo, T. : PD-1 and LAG-3 inhibitory co-receptors act synergistically to prevent autoimmunity in mice. *J. Exp. Med.*, **208** : 395-407, 2011.
- 3) Zaretsky, A. G., Taylor, J. J., King, I. L., Marshall, F. A., Mohrs, M. & Pearce, E. J. : T follicular helper cells differentiate from Th2 cells in response to helminth antigens. *J. Exp. Med.*, **206** : 991-999, 2009.