

課題名(タイトル): 胸腺構成細胞の遺伝子発現解析

利用者氏名: ○秋山 泰身(1)、関 崇生(1)、宮尾 貴久(1)、宮内 真紀(1)、秋山 伸子(2)

理研における所属研究室名:

(1) 生命医科学研究センター 免疫恒常性研究チーム

(2) 生命医科学研究センター 疾患遺伝研究チーム

1. 本課題の研究の背景、目的、関係するプロジェクトとの関係

胸腺は、獲得免疫応答に重要な Tリンパ球(T細胞)を産生するリンパ組織である。T細胞が胸腺で産生する際、自己組織を認識可能なT細胞が、一定頻度で生じるが、健全な状態では、その多くが胸腺内で除去される。この除去機構が機能不全に陥ると、自己免疫疾患の発症を引き起こすことが知られている。

この機構に、胸腺上皮細胞と胸腺樹状細胞が重要であることが知られている。胸腺上皮細胞は、胸腺内での局在により、髄質上皮細胞と皮質上皮細胞に大きく分類される。髄質上皮細胞は高いヘテロジェナイティを持つと考えられており、異なる遺伝子発現プロファイルを持つ複数の細胞の集団である可能性が高い。

研究代表者らは、髄質上皮細胞のヘテロジェナイティが、自己免疫を抑制するために、重要であるとの仮説を立てた。しかしながら、実際にどの程度のヘテロジェナイティを持つのか、いまだに不明な部分が多い。

一方、胸腺樹状細胞は、胸腺内で分化するタイプ 1 と胸腺外で分化するタイプ 2 に大きく分類されるが、それらの詳細なヘテロジェナイティはほとんど分かっていない。また各々のサブセットの機能についても、見解が一致していない。

本研究は、胸腺上皮細胞や胸腺樹状細胞のヘテロジェナイティを調べることで、その分化機構や機能について知見を得ることを目的としている。そのため、各々の細胞群に関して、1細胞ごとに遺伝子発現のプロファイルを決めることを目指した。

2. 具体的な利用内容、計算方法

マウス由来の胸腺上皮細胞や胸腺樹状細胞を、10x Chromium システムにより、1細胞ごとバーコードをつけて分離、RNAよりcDNAを作成した。次世代シーケンズ解析して得たリードを、FASTQ形式ファイルとしてHOKUSAIのフロントエンドサーバーに移動させた。また10x Genomics社の解析ソフト Cell Ranger 3.1.0 Gene Expressionをインストールした。超並列演算システムあるいは大容量演算システムを利用して、Cell Ranger 3.0を実行し、上記FASTQ

ファイル形式の遺伝子リードを、リファレンスマウスゲノム配列mm10にマッピングした。続いてバーコード情報に基づき、1細胞ごとの遺伝子発現プロファイルと遺伝子発現量を決定した。

3. 結果

野生型マウス由来の胸腺上皮細胞や樹状細胞について、解析を行った。その結果、胸腺上皮細胞、胸腺樹状細胞ともは、遺伝子発現により10以上のクラスターに分類可能であることが判明した。この解析を、2つの独立したサンプルで行い、再現性を確認した。さらに、一部の細胞クラスターについて、それらに選択的に発現する遺伝子を抽出し、実験的な検証を行った。

またいくつかの遺伝子変異マウスについても同様な方法で、1細胞遺伝子発現解析を行った。

4. まとめ

HOKUSAIにより同時にプログラムを実行することで、複数のサンプルを迅速に解析することができた。

これまで胸腺上皮細胞、胸腺樹状細胞のどちらも、主に4つの細胞集団に分類されると考えられていたが、本研究により、さらに多くの集団に分類されることが示された。さらに遺伝子変異マウスを用いた同様な解析により、胸腺上皮細胞の新たな細胞サブセットの存在が実証された。

5. 今後の計画・展望

今回得られた結果の一部については、現在、学術論文に投稿し、リバイス実験を行っている。また、これらに加えて、遺伝子発現解析から得られた結果を、さらに検証する実験を行う予定である。

以上で得られた結果は、自己免疫疾患の発症機構の理解に繋がり、その治療法開発に向けて重要な知見になることが期待される。

6. 利用がなかった場合の理由

該当しない。

2019 年度 利用研究成果リスト

【雑誌に受理された論文】

なし

【会議の予稿集】

なし

【口頭発表】

秋山 泰身 「自己免疫疾患の発症を抑制する胸腺上皮細胞の機能と分化」

第 73 回東邦医学会総会、2019 年 11 月 14 日、東邦大学医学部、東京

【ポスター発表】

Nobuko Akiyama "Single-cell RNA-sequencing analysis of murine thymic epithelial cells"

第 48 回日本免疫学会学術総会、2019 年 12 月 11 日、アクティシティ浜松、静岡

【その他(著書、プレスリリースなど)】

なし