

高感度 1 細胞解析の活用による好塩基球の最終分化機構の解明

三宅健介

東京科学大学 総合研究院

【研究の背景】

好塩基球は、末梢血白血球中にわずか 0.5% ほどしか存在しない希少な免疫細胞である。好塩基球の機能については長らく謎であったが、ここ 10 年ほどで、好塩基球が慢性アレルギー炎症の誘導や、消化管寄生蠕虫に対する再感染防御に重要な役割を果たすことが認識されてきている (Miyake et al. *Allergy* 2021; Miyake et al. *Front Immunol* 2022)。しかしながら、好塩基球が骨髄においてどのようにして分化してくるのかに関しては不明点が数多く残されている (Miyake et al. *Front Allergy* 2024)。

近年、1 細胞 RNA シーケンスという解析手法が発展し、強力な研究ツールとなりつつある。この手法は、細胞一つ一つについて、遺伝子発現量を網羅的に定量できる画期的な手法であり、個々の細胞の遺伝子発現だけでなく、細胞の分化経路をも推測可能である。しかし検出感度の問題から、希少細胞である好塩基球の遺伝子発現を十分に検出できておらず、好塩基球分化の 1 細胞解析を行った研究はほとんど存在しなかった。

申請者は、最近開発された高感度 1 細胞 RNA シーケンス (TAS-Seq 法) を導入し、分化途中の好塩基球の遺伝子発現の検出に成功した。申請者は好塩基球の分化・成熟過程を解明するため、好塩基球分化の場である骨髄と末梢免疫組織である脾臓に存在する好塩基球について高感度 1 細胞解析を行った。その結果、末梢免疫組織である脾臓の好塩基球は比較的均一であった一方で、好塩基球分化の場である骨髄中には分化段階の異なる様々な好塩基球クラスターが同定された。さらに、RNA 速度解析を行った結果、成熟好塩基球の新たな好塩基球前駆細胞分画として「プレ好塩基球」を同定した (Miyake et al. *Nat Commun* 2023)。

【目 的】

以前の研究にて申請者は新たにプレ好塩基球分画を同定したものの、現在のところプレ好塩基球から成熟好塩基球への分化がどのような転写因子によって起こっているのか、その分子機構は未だ明らかになっていない。そこで、本研究では高感度 1 細胞解析を応用して、プレ好塩基球から成熟好塩基球への分化を司る責任転写因子を同定し、好塩基球分化の分子機構を紐解くことを目的として研究を行った。

【方 法】

プレ好塩基球から成熟好塩基球への分化をつかさどる候補転写因子を解析するため、プレ好塩基球と成熟好塩基球の間の発現変動遺伝子について、TRANSFAC データベースを用いて転写因子結合モチーフ解析を行い、候補転写因子を同定した。さらに、各候補転写因子についての siRNA を購入し、骨髄由来好塩基球にエレクトロポレーションにて導入し、分化に障害が起きているかをフローサイトメトリーにて解析した。最終的な候補転写因子として、FoxO1 を同定したため、好塩基球特異的 FoxO1 欠損マウス (Baso^{ΔFoxO1} マウス; *Mcpt8^{iCre} Foxo1^{fl}*) を作成し、その定常状態および、皮膚アレルギー炎症誘導下での表現型を解析した。最後にコントロールおよび Baso^{ΔFoxO1} マウスについて、骨髄・脾臓より好塩基球を単離し、BD Rhapsody システムを活用した 1 細胞 RNA シーケンス解析を行った。

【結 果】

まず、プレ好塩基球から成熟好塩基球への分化をつかさどる候補転写因子を同定するため、プレ好塩基球と成熟好塩基球との間の発現変動遺伝子を用いて転写因子の結合モチーフ解析を行った結果、5つの候補遺伝子を同定した。候補遺伝子それぞれに対するsiRNAを購入し、骨髄由来好塩基球へとエレクトロポレーションすることでノックダウンを行ったところ、候補転写因子 *Foxo1* をノックダウンした場合にのみ、プレ好塩基球の割合の増加が認められた。このことから、好塩基球における転写因子 FoxO1 の機能に着目した。

生体内での好塩基球における FoxO1 の機能を解析するため、*Foxo1*-flox マウスと好塩基球特異的 Cre 発現マウスを掛け合わせることで、好塩基球特異的 FoxO1 欠損マウス ($\text{Baso}^{\Delta\text{FoxO1}}$ マウス) を樹立した。定常状態における解析を行ったところ、 $\text{Baso}^{\Delta\text{FoxO1}}$ マウスは、骨髄における好塩基球数には変化がない一方、脾臓や末梢血などにおける好塩基球数が激減していた。さらに、 $\text{Baso}^{\Delta\text{FoxO1}}$ マウスに好塩基球依存的な皮膚アレルギー炎症モデル (IgE 依存性慢性皮膚アレルギー炎症モデル; IgE-dependent chronic allergic inflammation: IgE-CAI) を誘導したところ、コントロールマウスと比較して耳介腫脹や炎症細胞の浸潤数が有意に低下しており、耳介に浸潤する好塩基球数が低下していた。以上の結果から FoxO1 は好塩基球成熟や好塩基球依存的アレルギー炎症誘導に重要であると考えられた。

最後に、責任転写因子による好塩基球分化制御機構を解明するために、 $\text{Baso}^{\Delta\text{FoxO1}}$ マウス・コントロールマウスの好塩基球を骨髄・脾臓より単離し、高感度 1 細胞解析を行った。その結果、 $\text{Baso}^{\Delta\text{FoxO1}}$ マウスではと比較して、骨髄・脾臓の両組織においてもプレ好塩基球の割合が増加していた。さらに、 $\text{Baso}^{\Delta\text{FoxO1}}$ マウスとコントロールマウスの間で発現変動遺伝子を検出したところ、プレ好塩基球の段階では発現変動遺伝子はあまり検出されなかった一方で、成熟好塩基球の段階では多くの発現変動遺伝子が検出された。最後に、成熟好塩基球の比較で認められた発現変動遺伝子について、GO エンリッチメント解析を行った結果、細胞運動や遊走にかかわる遺伝子が有意にエンリッチされていることが明らかになった。

【考 察】

本研究の結果から、好塩基球の機能的な成熟に寄与する転写因子として新たに FoxO1 を同定した。1 細胞解析の結果より、 $\text{Baso}^{\Delta\text{FoxO1}}$ マウスにおいては、プレ好塩基球の段階までは、コントロールマウスと同様の分化が起こっているものの、そこから成熟好塩基球の段階で障害が起き、細胞運動能や遊走能が障害された異常な成熟好塩基球が生成されている可能性が考えられた。細胞運動能の障害の結果、成熟好塩基球の骨髄外への遊走や、アレルギー炎症局所への浸潤が阻害され、定常状態での末梢血・脾臓の好塩基球数減少さらには、好塩基球依存的アレルギー炎症の減弱が認められるようになっていると考えられる。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

$\text{Baso}^{\Delta\text{FoxO1}}$ マウスにおいては、皮膚アレルギー炎症の著明な減弱が認められる。このことから好塩基球分化が阻害された状態では、アトピー性皮膚炎などのアレルギー炎症を制御できる可能性が示唆される。今後さらに、マウス・ヒトにおいて好塩基球分化を理解できれば、アレルギー治療へと貢献できることも期待される。

【参考・引用文献】

- 1) Miyake, K. et al. Basophils and their effector molecules in allergic disorders. *Allergy*. 76(6):1693-1706.2021.
- 2) Miyake, K. et al. Role of Basophils in a Broad Spectrum of Disorders. *Front. Immunol.* 13: 902494. 2022.
- 3) Miyake, K. et al. Single cell transcriptomics clarifies the basophil differentiation trajectory and identifies pre-basophils upstream of mature basophils. *Nat. Commun.* 14(1); 2694. 2023.
- 4) Miyake, K. et al. Novel insights into the ontogeny of basophils. *Front. Allergy.* 5: 1402841. 2024.