

厚生労働科学研究研究費補助金

萌芽的先端医療技術推進研究事業

シングルセル発現プロフィール解析の毒性評価への応用

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 杉本 幸彦

平成17（2005）年4月

厚生労働科学研究研究費補助金

萌芽的先端医療技術推進研究事業

シングルセル発現プロフィール解析の毒性評価への応用

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 杉本 幸彦

平成17（2005）年4月

## 目 次

### I. 総括研究報告

シングルセル発現プロファイル解析の毒性評価への応用 杉本 幸彦	----- 1
------------------------------------	---------

### II. 分担研究報告

RNA 増幅法における迅速・効率化の検討 田中 智之	----- 12
-------------------------------	----------

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 17
---------------------	----------

IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 21
-----------------	----------

# 厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業） 総括研究報告書

シングルセル発現プロファイル解析の毒性評価への応用

主任研究者 杉本 幸彦 京都大学大学院薬学研究科助教授

## 研究要旨

本研究の目的は、単一細胞レベルの発現プロファイル解析法を用いて薬物の毒性や副作用を評価しその分子機構を捉え、またこれによって高解像度のトキシコゲノミクスの有用性を示すことである。非ステロイド性抗炎症薬(NSAIDs)は、消化管障害や生殖障害などのような有害な副作用を示し、これらの副作用はある種のプロスタグランジン(PG)受容体欠損マウスの表現型として観察されているが、その分子機構は必ずしも明らかでない。主任研究者は、単一細胞レベルで発現プロファイル解析を行う方法を習得したが職人芸的な要素が多く、広く一般に受け入れられていなかった。そこで本研究では、①本法を実用的に簡素化し、②これを用いて消化管粘膜上皮や生殖細胞での遺伝子発現変化を捉え、PG受容体欠損もしくはNSAIDsによる消化管障害や生殖毒性を分子レベルから捉えることを目指した。最終年度である16年度の解析では、まず誰にでも行えるように実用的な解析法を確立し、これを用いてNSAIDsによる大腸粘膜上皮に対する障害や、EP2欠損による生殖細胞障害の実体を、発現プロファイル変化として捉えることに成功した。また肝癌や膵島β細胞、腸管M細胞、中枢の特定ニューロン、マスト細胞といった細胞単位での発現プロファイル変化を捉えることができた。さらにはEP3欠損マウスがアスピリン喘息様の症状悪化を来すこと、肺胞の発現解析からEP3はケモカイン誘導を抑制することを見だし、アスピリン喘息は、PGE2-EP3によるケモカイン抑制作用が阻害されるため生じる可能性を示した。

分担研究者  
田中智之・京都大学薬学研究科・助手

## A. 研究目的

ゲノム情報を活用して薬物の毒性評価を行

う上で、網羅的なマイクロアレイ解析は有効なツールであるが通常 $\mu$ gオーダーのRNAを必要とするため、実際には組織や臓器といったヘテロな細胞集団を解析対象としており、

細胞レベルの情報を得ることが困難であった。ペンシルベニア大の Eberwine らは、T7-RNA ポリメラーゼを用いて低バイアスのまま RNA を増幅する方法を開発した。主任研究者は、2000 年より Eberwine と共同研究を開始し、シングルセルや微量組織における遺伝子発現プロフィール変化を検出する方法を習得したが、職人芸的な要素が高く、広く一般に受け入れられていなかった。

一方、アスピリンなどの非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) は、プロスタグランジン (PG) の生合成を阻害して強力な解熱・鎮痛・抗炎症作用を発揮するが、一方では消化管や女性の生殖生理、喘息などに対して毒性を示す。主任研究者らはこれまでに、特定の PG 受容体欠損マウスが、消化管障害や女性生殖障害など NSAIDs の毒性に対応する表現型を示すことを見いだしており、これら PG 受容体欠損マウスは、毒性発現の分子機構を解析する良いモデルとなりうると考えた。

このような背景にあって、本研究の目的は、まずシングルセル発現プロフィール解析法を実用化に向けて簡素化・最適化し、またこれを PG 受容体欠損マウスに見られる毒性(表現型)解析に適用し、例えば大腸粘膜上皮や卵細胞における毒性とその分子機作を捉えることで、高解像度のトキシコゲノミクス法を確立することである。

最終年度である平成 16 年度は、これまでに確立した微量組織からの発現プロフィール解析法により、各欠損マウスや薬物投与による毒性(表現型)を、大腸粘膜上皮や生殖細胞、肝癌や膵島β細胞など様々な細胞単位での発現プロフィール変化を解析し、毒性評価の実践とその分子機構の解析を試みた(以上担当杉本)。また実用化に向けたキャピラリ法の最適化、薬物毒性として問題となる薬物アレルギーを評価するため、組織マスト細胞のシングルセル解析を重点的に進めた(担当田中)。

## B. 研究方法

### ①微量組織の調製・回収・増幅の検討(担当田中)

前年度までにキャピラリダイセクションによる細胞回収( $\phi < 10 \mu\text{m}$ )に加えて、レーザーマイクロダイセクション(LCM)の使用が可能( $\phi > 10 \mu\text{m}$ )であることを示した。そこで各回収法に関して、切片の固定、染色、調製法、また RNA の回収と増幅法について実用的な操作法へと最適化を行った。

### ②インドメタシンによる消化管粘膜毒性

NSAIDs の最も顕著な毒性は、消化管障害である。とくにヒト炎症性腸疾患 (IBD) 患者においては NSAIDs の服用が発症の鍵を握るケースが示され、問題となっている。そこで主任研究者らは IBD モデルであるデキストラン

硫酸 (DSS) 誘発性大腸炎を用いて、インドメタシンによる上皮障害毒性の検出を試みた。野生型マウスに 3%DSS を飲水投与しても大腸炎を発症しないが、3%DSS にインドメタシンを同時投与すると大腸炎を発症し、本モデル系ではインドメタシンは腸管粘膜毒性を発揮する。そこでインドメタシン投与群と非投与群で、DSS 投与後 6、24 時間の発現プロフィールを比較した。

### ③PGF2 受容体欠損マウスにおける分娩障害

NSAIDs は分娩遅延を示すことが広く知られているが、PGF2a 受容体 (FP) 欠損マウスは、妊娠は可能であるものの、NSAIDs 投与時にみられるように分娩が遅延 (消失) し、胎児は子宮内で死亡する。主任研究者らはこれまでに、FP 欠損マウスの分娩異常は妊娠末期における黄体の機能亢進に起因することを見いだした。そこで野生型と FP 欠損の妊娠 15 ならびに 19 日の黄体細胞の発現プロフィールを比較した。

### ④ EP2 欠損マウスにおける生殖細胞の障害

NSAIDs が排卵阻害作用を示すことも古くから見いだされている。PGE2 受容体サブタイプの一つ、EP2 受容体の欠損マウスは、排卵さらには受精の障害を示す。EP2 受容体の発現部位から卵を取り巻く卵丘細胞の機能障害である可能性が示唆されたが、具体的にどのような分子機作で受精に毒性を来すのか不明であった。そこで、野生型ならびに EP2 欠損の 3 週齢雌マウスに妊馬血清ゴナドトロピン処理を行い、48 時間後にヒト絨毛性ゴナドトロピンを投与して、その 14 時間後に卵管から

卵と卵丘細胞複合体を回収した。これを卵と卵丘細胞を個々にシングルセル発現解析に用いた。

### ⑤発癌毒性

薬物の発癌毒性を早期にかつ再現良く評価することはトキシコゲノミクスの最重要課題の一つである。そこで発がんイニシエーターとして diethylnitrosamine (DEN) を投与することで肝癌を誘起する Solt-Farber 法を用いて、化学発癌による肝癌のマーカーである胎盤型グルタチオン S-転移酵素 (GSTP) 発現を指標に、肝癌の初期病巣 (foci) と正常肝細胞との発現プロフィールを比較し、癌毒性の早期検出を試みた。Solt-Farber 法に従って SD ラットに肝前がん病変を誘発させ、前がん病変群 (n=3) および対照群 (n=3) から肝臓凍結切片を作製し、前者は GSTP 陽性 foci から、後者は正常肝から RNA を抽出し、個体ごとに解析した。

### ⑥アスピリン喘息

アスピリン喘息は、アスピリンが喘息患者の症状を悪化させる副作用のことで、死に至らしめる場合もある。従来その機構として、(i) アスピリンにより蓄積したロイコトリエンが喘息を増悪させるため、(ii) アスピリンが PG による喘息抑制作用を阻害するため、のいずれかが考えられていた。主任研究者はアスピリンの喘息毒性の本態を明らかにするために、各 EP 受容体欠損マウスにアレルギー性喘息モデルを導入し喘息抑制作用を示す EP 受容体とその分子機作の同定を試みた。

## ⑦組織中のマスト細胞（担当田中）

薬物アレルギーは、薬物毒性を評価する上で重要な要因であり、アレルギーの中心的な細胞であるマスト細胞の解析は、本研究課題の大きな目標であった。組織マスト細胞には、粘膜型（MMC）と組織結合型（CTMC）の二種類が知られ、両者は脱顆粒応答性などの性質が異なるが、両マスト細胞の発現差を網羅的に調べた知見は存在しない。そこで主任研究者らは、組織マスト細胞の発現プロフィール解析を試みた。消化管組織よりキャピラリダイセクションにより CTMC ならびに MMC を各 15 個プールしたサンプルを独立して各 3 検体調製し、増幅後に発現プロフィールを比較した。

## ⑧代謝毒性

NSAIDs は糖尿病やその合併症に対して様々な悪影響を示すことが知られる。また薬物の代謝毒性を考える場合、消化管、膵臓、脂肪細胞など多くの細胞が標的となりうる。そこで主任研究者は、腸管 L 細胞（⑧-1）、膵島 β 細胞（⑧-2）、脂肪細胞（⑧-3）を例として、発現変化の検出を試みた。

⑧-1) 腸管 L 細胞・・・L 細胞は食物刺激によってグルカゴンなどの消化管ペプチドを分泌し β 細胞からのインスリン分泌を促すが、これがどのような機構によるのか不明であった。主任研究者らは、腸管のグルカゴン様ペプチド-1 (GLP1) 陽性細胞を LCM にて単離してその遺伝子発現を調べた。

⑧-2) 膵島 β 細胞・・・PACAP は、中枢・末梢の様々な組織で生理作用を発揮する神経ペ

プチドであり、膵島 β 細胞に対してはグルコース依存的なインスリン分泌を促進する。2 型糖尿病を発症する KKA<sup>y</sup> マウスに、膵島 β 細胞で PACAP を過剰発現させると、通常、KKA<sup>y</sup> マウスで認められる高インスリン血症と膵島過形成が抑制される。主任研究者らは、このような β 細胞の動的変化を分子レベルで解析するため、LCM により膵島を回収し、PACAP 過剰発現の有無間で発現プロフィールを比較した。

⑧-3) 脂肪細胞・・・PGE<sub>2</sub> は、古くから脂肪細胞分化を抑制することが示されていたが、関与する PG 受容体は不明であった。主任研究者らは、3T3-L1 を用いて EP4 受容体が脂肪細胞分化を抑制することを見出した。そこで EP4 欠損マウスの脂肪細胞に障害が見られるかどうかを評価した。

## ⑨中枢ニューロンでの発現変化の検出

PGE<sub>2</sub> が視床下部・視索前野の EP3 受容体に作用して発熱応答を示すことを題材にして、中枢の特定ニューロンにおける発現変化の補足を試みた。すなわち、ラット視索前野の EP3 陽性ニューロンを単離して、PGE<sub>2</sub> 刺激による発現変化を調べた。

### （倫理面への配慮）

本申請課題は、基本的に動物実験のみを対象としており、また動物愛護上問題となるような苦悶を与える実験や虐待行為等を含まず、試料の採取は麻酔下及び安楽死後を前提とする等の配慮を十分に行っていたので、倫理面での問題は特になかった。これら一連の実験

は、平成 16 年度京都大学薬学研究科の動物実験委員会の承認を得ている。

## C. 研究結果

### ①微量組織の調製・回収・増幅の検討

レーザーマイクロダイセクション (LCM) 法では、比較的大型の単一細胞や消化管粘膜の表層上皮、膵島、黄体細胞、卵と卵丘細胞、糸球体、癌初期病巣 (foci) などの単離解析が可能であった。この場合、粘着フィルムに吸着させた細胞塊から Qiagen 社の RNeasy-Micro キットを用いることで再現良く ng 以上の RNA が回収された。目的の細胞を同定する際に一般染色で十分な場合は、75%エタノール固定 (30 秒) の後にヘマトキシリン染色し、脱水後に LCM を行うが、この際、減圧下で十分乾燥させることが効率的な LCM には必須であった。一方、抗体染色を行う場合はアセトン固定後に Rnase Inhibitor 存在下迅速に染色し、脱水後に十分乾燥させてから LCM を行えば RNA 回収が可能であった。LCM 法では RNA 回収率を上げるためにキャリア核酸を加えるとノイズを高める結果となることが判った。従って、キャリアを加えて回収率を高めるよりもキャリアを加えずに切片の数をこなす方が結果的に効率がよいと考えられた。またこの際、市販の RNA 回収キットには記載なく予めキャリア核酸が含まれた状態のものがあるので注意が必要である。またホルマリン固定は組織から RNA が十分に回収されなかったため、可能な限り避けることが望ましい。

パッチクランプ電極を用いたマニュアルダイセクション法を用いれば、LCM 法で用いるレーザー径よりも微小な細胞 ( $\phi < 10 \mu\text{m}$ ) でも回収が可能であった。消化管切片からの組織結合型マスト細胞あるいは粘膜型マスト細胞の回収には、切片作成後すぐにカルノア固定 (1 分) を行い、酸性条件下トルイジンブルーにてマスト細胞を染色 (5 秒) した。予備検討の結果、30 pg の RNA が存在すれば再現性の高い RNA 増幅が期待され、またマスト細胞 1 個からは理論的に 2-3 pg の RNA 回収が見積もられたため、マニュアルダイセクションにより単離した細胞 15 個を単位としてスライド上にプールし、まとめて LCM 用フィルムに粘着させた。この場合、キャリア核酸なしでも有意なシグナルを検出できたが、キャリア核酸として Poly-G を用いるとダイナミックレンジが拡大し、細胞由来のシグナルが最も良く検出できた。一方、Poly-C を用いた場合は細胞なしでもノイズ (False-positive) シグナルが現れ、細胞由来のシグナルの検出が困難であった。固定条件や目的とする細胞により若干の差はあるものの、いかなる細胞種の場合にもこのような手法にて再現良くシグナルが検出された。

### ②インドメタシンによる消化管粘膜毒性

まず結腸全組織で比較した場合、DSS 未投与に比べて発現変化 (>2) した遺伝子は、346 であり、その変化の多くが 24 時間で初めて現れたが、LCM で粘膜上皮を単離して解析すると発現変化 (>2) した遺伝子数は、987 であり、これらの変化の多くは 6 時間でも観察され、上皮では DSS 負荷により、早期に多種類

の遺伝子が影響を受けることが判った。実際、P-450 や熱ショックタンパク質遺伝子で見ると結腸全組織では2遺伝子に変化していたが、上皮では 12 遺伝子の変動した。さらに、インドメタシンにより変動した遺伝子は、結腸全組織では 49 遺伝子であったが、上皮では 854 遺伝子で、DSS により変動した遺伝子の 90%が影響を受けることが判った。以上より、インドメタシンの消化管毒性は、粘膜上皮に最も顕著に現れることが示された。

### ③PGF2 受容体欠損マウスにおける分娩障害

野生型と FP 欠損の妊娠 19 日の黄体細胞の発現プロフィールを比較したところ、FP 欠損ではチトクロム P-450 アロマターゼに代表されるステロイド合成酵素遺伝子が高く維持されており、また *Sod2*、*Sod3* など活性酸素ジスムターゼに代表される抗酸化遺伝子の発現が顕著に亢進していた。これらの発現変化はウェスタンブロットにより再現された。

### ④EP2 欠損マウスにおける生殖細胞の障害

排卵後の卵とその周囲に存在する卵丘細胞をそれぞれ野生型と EP2 欠損マウス間で比較した。まず卵では、野生型に比べ発現亢進(>2)した遺伝子は 70 であったが、逆に発現低下(<0.5)した遺伝子は 500 以上に昇り、卵が変性したためであると考えられた。一方、卵丘細胞では EP2 欠損で発現亢進した遺伝子の 1/4 が生体防御に関わる遺伝子で、サイトカインやケモカインなどの発現が亢進していた。

### ⑤発癌毒性

全搭載遺伝子15,923のうちGSTP陽性細胞でその発現が1/2以下に減少した遺伝子は約1%であったが、2倍以上増加した遺伝子は7.5%にも及んだ。前がん病変において発現変化する因子として、様々な代謝酵素が知られており、今回の結果においても代謝に関与する1,444遺伝子のうち149遺伝子の発現が変化した。例えば、肝前がん病変で発現上昇することが知られる2種類の代謝マーカーは、それぞれ10倍、4倍の発現上昇が見られた。さらに、これらの発現変化はmini-fociの時点でも認められた。

### ⑥アスピリン喘息

EP1、EP2、EP4 の各欠損マウスは野生型と同様の喘息応答を示したが、EP3 欠損マウスでは、アスピリン喘息のようにその症状が悪化した。一方、抗原チャレンジの 3 時間後に EP3 作動薬を投与すると、これは喘息緩和作用を示した。また肺胞を用いて EP3 作動薬による発現プロフィール変化を調べたところ、TARC や eotaxin などのケモカイン発現が低下していた。

### ⑦組織マスト細胞

アレイに搭載の 12,500 遺伝子のうち、CTMC 特異的に高発現を示す 697 遺伝子、MMC に高発現する 203 遺伝子を検出した。実際、CTMC マーカーである MCP6 や chymase 2 は、CTMC で少なくとも 3 倍以上に発現が高く、MMC マーカーの MCP1 や MCP2 は、MMC で 10 倍以上に発現が高かった。一方、両者に共通のマスト細胞マーカーとして知られる *c-kit* や *FcεRI* 受容体は発現差を認めなかった。

## ⑧代謝毒性

⑧-1) L 細胞・・・腸管グルカゴン様ペプチド-1(GLP1)陽性細胞 (L 細胞) が、オーファン受容体 GPR120 を高発現することを見だし、GPR120 が $\alpha$ リノレン酸などの遊離脂肪酸の受容体であること、食物中の脂肪酸により GLP1 分泌さらにはインスリン分泌を促す機能をもつことを示した。

⑧-2) 膵島 $\beta$ 細胞・・・PACAP 過剰発現した膵島では、Reg (regenerating gene) 遺伝子が発現上昇していた。一方、ラットインスリノーマである INS-1 細胞を用いた検討から、PACAP は高グルコース条件下 (25 mM) で細胞増殖を抑制し、また持続的な Reg 遺伝子の発現誘導を促進することが示された。これらの結果から、2 型糖尿病病態において、PACAP は Reg 等の特異的な遺伝子の発現誘導を介し、膵島 $\beta$ 細胞の増殖を抑制しうることを示された。

⑧-3) 脂肪細胞・・・EP4 欠損マウスの脂肪組織における発現プロフィールを、野生型と比較したところ、EP4 欠損脂肪細胞では、PPAR 関連遺伝子や $\beta$ 3-アドレナリン受容体など脂肪細胞の成熟マーカー遺伝子の発現が非常に高く、EP4 欠損では脂肪細胞の成熟が亢進している可能性を見いだした。

## ⑨中枢ニューロンでの発現変化の検出

ラット視索前野の EP3 陽性ニューロンを単離して、PGE<sub>2</sub> 刺激による発現変化を調べたところ、マイクロアレイに搭載の 8,544 遺伝子のうち、PGE<sub>2</sub> 投与によって発現上昇(>1.5)

したものは 3 遺伝子、発現低下(<0.66)したものは 60 遺伝子であり、PGE<sub>2</sub> 刺激で多くの遺伝子群の発現レベルが低下した。中でも、GABA 受容体が PGE<sub>2</sub> 投与で顕著な発現低下を示し、視索前野での GABA 受容体の発現は EP3 受容体に一致した。さらにマウス視索前野での GABA 受容体発現は、野生型では PGE<sub>2</sub> によって低下したが、EP3 欠損マウスでは変化しなかった。

## D. 考察

### ①微量組織の調製・回収・増幅の検討

固定条件や目的とする細胞により若干の差はあるものの、以下の②～③に示したいずれの細胞種の場合にも LCM もしくはキャピラリーマイクロダイセクションにて再現良くシグナルが検出された。

### ②インドメタシンによる大腸上皮毒性

大腸粘膜上皮の発現プロフィールを解析すれば、大腸全組織を用いるよりも高感度かつ早期にインドメタシンの障害作用を捉えることが可能であった。

### ③PGF2 受容体欠損マウスにおける分娩障害

今回の結果から、PGF2a による黄体退縮には、ステロイド代謝変化とフリーラジカルスカベンジャータンパク質の発現低下が重要な鍵を握る可能性が示され、その不具合により分娩毒性に陥ることが判った。

### ④ EP2 欠損マウスにおける生殖細胞の障害

PGE<sub>2</sub> や dbcAMP は、野生型の卵-卵丘細胞複合体(COC)のこれら遺伝子発現を抑制し、インドメタシンはこれを亢進した。一方、これら因子は、野生型の *in vitro expansion* を阻害し、また体外受精率を低下させたことから、EP2KO の受精障害は、卵丘細胞のサイトカイン・ケモカイン発現亢進に起因する可能性を示唆した。

#### ⑤発癌毒性

腫瘍マーカー陽性fociにおける遺伝子発現解析から、肝化学発がん過程において変化する遺伝子を検出した。従って、本法は薬物の発癌毒性の早期発見に有用であると考えられた。

#### ⑥アスピリン喘息

従って、PGE<sub>2</sub>-EP3 系は、肺胞上皮のケモカイン誘導を作用点として喘息を抑制し、アスピリン喘息はこの EP3 シグナルを阻害するために起こることが示された。このように局所の発現変化を捉えることは、アレルギー毒性の評価・原因究明に有用であると考えられる。

#### ⑦組織マスト細胞

本結果は、組織中のマスト細胞、CTMC と MMC の発現プロフィールの差を初めて捉えたものである。また本解析対象を樹状細胞やマクロファージなどの抗原提示細胞にまで広げることにより、薬物アレルギー毒性の総合的な評価も可能になるものと期待される。

#### ⑧代謝毒性

代謝毒性の標的である、腸管L細胞、膵臓、脂肪細胞の各レベルで発現プロフィール変化を捉えることが可能であり、代謝毒性の早期発見に有用であると考えられた。

#### ⑨中枢ニューロンでの発現変化の検出

PGE<sub>2</sub> 投与によって視索前野 EP3 ニューロンでの GABA 受容体発現が低下することが示された。このように中枢の特定ニューロンにおいて、薬物による発現変化を捉えることが可能であった。

### E. 結論

上述のように、①に記した方法のいずれかによって、②大腸粘膜上皮、③黄体細胞(顆粒膜細胞)④卵・卵丘細胞、⑤肝癌、⑥肺胞上皮、⑦組織マスト細胞、⑧-1 腸管 L 細胞 (GLP-1 陽性細胞)、⑧-2 膵島β細胞、⑧-3 脂肪細胞、⑨中枢の特定神経細胞、の各細胞の発現プロフィール解析が可能であった。⑤肝癌(GSTP)、⑧-1 腸管 L 細胞(GLP-1)、⑨中枢神経細胞(EP3)については各タンパク質を抗体染色後に解析したものであり、それ以外については一般の病理染色もしくは未染色での解析であり、これ以外にも多くの細胞の解析に応用できるものと考えられた。②の解析で示したように、大腸粘膜上皮の発現プロフィールを解析すれば、大腸全組織を用いるよりもはるかに高感度に、高精度にインドメタシンの効果が捉えられたことから、高解像度に

てトキシコゲノミクスを進めることが医薬品の安全性向上と毒性機序の理解を推進する上で非常に重要であると考えられる。

## F. 健康危険情報

特記事項なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- Kunikata, T., Yamane, H., Segi, E., Matsuoka, T., Sugimoto, Y., Tanaka, S., Tanaka, H., Nagai, H., Ichikawa, A., and Narumiya, S. Suppression of allergic inflammation by prostaglandin E receptor subtype EP3. *Nature Immunol.* in press. (2005).
- Foyouzi, N., Cai, Z., Sugimoto, Y., and Stocco, C. Changes in the expression of steroidogenic and antioxidant genes in the mouse corpus luteum during luteolysis. *Biol. Reprod.* in press. (2005).
- Moriyama, T., Higashi, T., Togashi, K., Iida, T., Segi, E., Sugimoto, Y., Tominaga, T., Narumiya, S., and Tominaga, M. Sensitization of TRPV1 by EP1 and IP reveals peripheral nociceptive mechanism of prostaglandins. *Molecular Pain.* in press (2005).
- Tanaka, S., Mikura, S., Hashimoto, E., Sugimoto, Y., and Ichikawa, A. Ca(2+) influx-mediated histamine synthesis and IL-6 release in mast cells activated by monomeric IgE. *Eur. J. Immunol.* **35**, 460-468 (2005)
- Hirasawa, A., Tsumaya, K., Awaji, T., Katsuma, S., Adachi, T., Yamada, M., Sugimoto, Y., Miyazaki, S., Tsujimoto, G. Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nature Med.* **11**, 90-94. (2005)
- Tsuboi, H., Sugimoto, Y., Kainoh, T, and Ichikawa, A. Prostanoid EP4 receptor is involved in suppression of 3T3-L1 adipocyte differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **322**, 1066-1072 (2004)
- Sugimoto, Y., Tsuboi, H., Okuno, Y., Tamba, S., Tsuchiya, S., Tsujimoto, G., and Ichikawa, A. Microarray evaluation of EP4 receptor mediated prostaglandin E2 suppression of 3T3-L1 adipocyte differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **322**, 911-917 (2004)
- Sugimoto, Y., Nakato, T., Kita, A., Takahashi, Y., Hatae, N., Tabata, H., Tanaka, S., and Ichikawa, A. A cluster of aromatic amino acids in the i2 loop plays a key role for Gs coupling in prostaglandin EP2 and EP3 receptors. *J. Biol. Chem.* **279**, 11016-11026 (2004)

Tanaka, S., Deai, K., Konomi, A., Takahashi, K., Yamane, H., Sugimoto, Y., Ichikawa, A. Expression of L-histidine decarboxylase in granules of elicited mouse polymorphonuclear leukocytes. *Eur. J. Immunol.* **34**, 1472-1482 (2004)

Shoji, Y., Takahashi, M., Kitamura, T., Watanabe, K., Kawamori, T., Maruyama, T., Sugimoto, Y., Negishi, M., Narumiya, S., Sugimura, T., and Wakabayashi, K. Down-regulation of prostaglandin E receptor subtype EP3 during colon cancer development. *Gut.* **53**, 1151-1158 (2004)

## 2. 学会発表

杉本幸彦「排卵・受精におけるプロスタグランジンの役割」シンポジウム：卵胞発育と排卵現象（招待講演）第45回日本哺乳動物卵子学会、2004年5月大津

河野祐子、藤原拓司、丹波茂郎、中澤清子、坪井宏明、市川厚、杉本幸彦「マウス子宮におけるプロスタグランジン D2 受容体 DP の発現」日本生化学会第77回大会 2004年10月横浜

土屋裕義、中村和弘、岡孝和、James Eberwine、Clifford Saper、市川厚、杉本幸彦「PGE2 による視索前野 EP3 ニューロンの遺伝子発現抑制」日本生化学会第77回大会 2004年

10月横浜

中澤俊介、田中智之、土屋創健、高野裕嗣、市川厚、中山和久、杉本幸彦「ヒスチジン脱炭酸酵素欠損マウス腹腔マスト細胞における顆粒内プロテアーゼ発現の低下」日本生化学会第77回大会 2004年10月横浜

浜上堅一、富本修平、樋口直子、橋本均、新谷紀人、杉本幸彦、馬場明道「PACAP-Reg シグナルによる睪島β細胞の増殖制御」ファーマ・バイオフォーラム 2004 2004年11月東京

丹波茂郎、瀬木恵里、市川厚、中山和久、杉本幸彦「プロスタグランジン受容体 EP2 欠損マウスの卵丘細胞におけるケモカイン発現の亢進」ファーマ・バイオフォーラム 2004 2004年11月東京

長縄重矢子、長田茂宏、御園生昌史、土屋創健、丹波茂郎、佐藤公彦、西川淳一、杉本幸彦、西原力「肝腫瘍マーカー陽性細胞における遺伝子発現変化の網羅的解析」日本分子生物学会第27回大会 2004年12月神戸

Watanabe, M., Sugimoto, Y., Tainaka, H., & Sugano, S. Comprehensive Gene Expression Analysis in Growth and Development of Murine Mammary Tissues. 10th Human Genome Meeting. Kyoto, Japan Apr. 2005.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

### 1. 特許取得

馬場明道、橋本均、新谷紀人、杉本幸彦、「 $\beta$ 細胞の再生に関する  $\text{Reg III } \beta$  を誘導する物質の評価方法」特願 2005-004893 (特許出願中)

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

# 厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業） 分担研究報告書

## RNA 増幅法における迅速・効率化の検討

分担研究者 田中 智之 京都大学大学院薬学研究科助手

### 研究要旨

本研究の目的は、シングルセル発現プロフィール解析法をトキシコゲノミクスに応用可能な形で実用的に最適化することである。分担研究者は、発現プロフィール解析法のうち、切片調製と細胞回収のプロセスに改良を加えた結果、目的とする細胞径に応じて、10  $\mu\text{m}$ 以上であればレーザーマイクロダイセクション、10  $\mu\text{m}$ 以下ならキャピラリダイセクションにより細胞回収を行い、15-20個プールした細胞から再現良くRNAを増幅する方法を確立した。従来、1週間以上を要したRNA増幅が、本法により3日間に短縮された。本法を用いて2種類の組織マスト細胞（CTMCとMMC）の発現プロフィールを解析し、CTMCマーカーであるMCP6 や chymase 2は、CTMC において3倍以上に発現が高いこと、MMCマーカーである MCP1 や MCP2 は、MMC において10倍以上発現が高いことを確認できた。

### A. 研究目的

本研究の目的は、シングルセル発現プロフィール解析法をトキシコゲノミクスに応用可能な形で実用的に最適化することである。

主任研究者の杉本が、Eberwine との共同研究により習得したシングルセルRNA増幅法は、独創的ではあるものの、職人芸的な要因が多く、実用化のために簡素化・最適化が必要であった。そこで方法全般に関して、検討・改良を加えるとともに、薬物アレルギーにおい

て中心的な役割を担う組織マスト細胞の発現プロフィール解析を試みた。

### B. 研究方法

#### ①微量組織の調製・回収・増幅の検討

前年度までにキャピラリダイセクションによる細胞回収( $\phi < 10 \mu\text{m}$ )に加えて、レーザーマイクロダイセクション(LCM)の使用が可能( $\phi > 10 \mu\text{m}$ )であることを示した。そこで各回収法に関して、切片の固定、染色、調製法、

また RNA の回収と増幅法について実用的な操作法へと最適化を行った。

薬物アレルギーは、薬物毒性を評価する上で重要な要因であり、その中心的な細胞であるマスト細胞の解析は、本研究課題の大きな目標であった。実際、主任研究者ならびに分担研究者は、これまでにヒスタミン合成酵素欠損マウスのマスト細胞が、野生型に比べて形態学的・生化学的に異なることを見いだしていたが、生体内のマスト細胞は組織中に散在していることから、マイクロアレイ解析に適さず、十分な分子機作の解析を行うに至っていなかった。そこで主任研究者らは、組織マスト細胞のように成熟した形質を示す培養細胞の確立(②)を試みるとともに、組織マスト細胞の発現プロファイル解析(③)を試みた。

### ②組織結合型マスト細胞培養系の確立と発現変化

骨髄由来の培養マスト細胞(BMMC)を、SCF存在下で繊維芽細胞と共培養することで、組織結合型マスト細胞(CTMC-like MC)の分化系を確立し、その成熟に依存した発現プロファイル変化を調べた。

### ③組織マスト細胞の発現プロファイル解析

組織マスト細胞には、粘膜型マスト細胞(MMC)と組織結合型マスト細胞(CTMC)の二種類が知られ、両者は上表のように異なる性質を持つ。しかしながら両マスト細胞サブタイプの相違を網羅的に調べた知見は存在しない。

そこで主任研究者は、薬物アレルギーの標的としての組織マスト細胞の発現変化を捉えるための基礎知見として、消化管組織よりキャピラリダイセクションにより CTMC ならびに MMC を各 15 個プールしたサンプルを独立して各 3 検体調製し、増幅後に発現プロファイルを比較した。

#### (倫理面への配慮)

本申請課題は、基本的に動物実験のみを対象としており、平成 16 年度実施したマウスを用いた実験に、動物愛護上問題となるような苦悶を与える実験や虐待行為等を含まず、試料の採取は麻酔下及び安楽死後を前提とする等の配慮を十分に行ったので、倫理面での問題は特になかった。これら一連の実験は、平成 16 年度京都大学薬学研究科の動物実験委員会の承認を得ている。

## C. 研究結果

### ①微量組織の調製・回収・増幅の検討

レーザーマイクロダイセクション(LCM)法では、比較的大型の単一細胞や消化管粘膜の表層上皮、膵島、黄体細胞、卵と卵丘細胞、糸球体、癌初期病巣(foci)などの単離解析が可能であった。この場合、粘着フィルムに吸着させた細胞塊から Qiagen 社の RNeasy-Micro キットを用いることで再現良く ng 以上の RNA が回収された。目的の細胞を同定する

際に一般染色で十分な場合は、75%エタノール固定(30秒)の後にヘマトキシリン染色し、脱水後に LCM を行うが、この際、減圧下で十分乾燥させることが効率的な LCM には必須であった。一方、抗体染色を行う場合はアセトン固定後に Rnase Inhibitor 存在下迅速に染色し、脱水後に十分乾燥させてから LCM を行えば RNA 回収が可能であった。LCM 法では RNA 回収率を上げるためにキャリア核酸を加えるとノイズを高める結果となることが判った。従って、キャリアを加えて回収率を高めるよりもキャリアを加えずに切片の数をこなす方が結果的に効率がよいと考えられた。またこの際、市販の RNA 回収キットには記載なく予めキャリア核酸が含まれた状態のものがあるので注意が必要である。またホルマリン固定は組織から RNA が十分に回収されなかったため、可能な限り避けることが望ましい。

パッチクランプ電極を用いたマニュアルダイセクション法を用いれば、LCM 法で用いるレーザー径よりも微小な細胞( $\phi < 10 \mu\text{m}$ )でも回収が可能であった。消化管切片からの組織結合型マスト細胞あるいは粘膜型マスト細胞の回収には、切片作成後すぐにカルノア固定(1分)を行い、酸性条件下トルイジンブルーにてマスト細胞を染色(5秒)した。予備検討の結果、30 pg の RNA が存在すれば再現性の高い RNA 増幅が期待され、またマスト細胞1個からは理論的に 2-3 pg の RNA 回収が

見積もられたため、マニュアルダイセクションにより単離した細胞 15 個を単位としてスライド上にプールし、まとめて LCM 用フィルムに粘着させた。この場合、キャリア核酸なしでも有意なシグナルを検出できたが、キャリア核酸として Poly-G を用いるとダイナミックレンジが拡大し、細胞由来のシグナルが最も良く検出できた。一方、Poly-C を用いた場合は細胞なしでもノイズ(False-positive)シグナルが現れ、細胞由来のシグナルの検出が困難であった。固定条件や目的とする細胞により若干の差はあるものの、いかなる細胞種の場合にもこのような手法にて再現良くシグナルが検出された。

## ②組織結合型マスト細胞培養系の確立と発現変化

BMMC を CTMC へ誘導処理を行った後、徐々に発現増加するものには、ヒスタミン合成酵素や、顆粒プロテアーゼ、ヘパリン合成酵素関連遺伝子、アラキドン酸代謝酵素、Galpha-i1 が含まれた。Galpha-i1 の発現誘導は、免疫プロットによっても確認され、マスト細胞成熟に伴い獲得するサブスタンス P や Compound 48/80 による脱顆粒に Galpha-i1 が関与する可能性が示唆された。

## ③組織マスト細胞の発現プロフィール解析

マイクロアレイに搭載の 12,500 遺伝子のうち、CTMC 特異的に発現シグナルが高いものが 697 遺伝子、MMC に特異的に発現が高い

ものは 203 遺伝子であった。実際、CTMC マーカーである MCP6 や chymase 2 は、CTMC において 3 倍以上に発現亢進し、MMC マーカーの MCP1 や MCP2 は、MMC において 10 倍以上亢進していた。一方、両者に共通のマスト細胞マーカーとして知られる c-kit や FcεRI 受容体遺伝子に関しては発現差を認めなかった。

## D. 考察

### ①微量組織の調製・回収・増幅の検討

固定条件や目的とする細胞により若干の差はあるものの、分担研究者の解析したマスト細胞を含め、主任研究者の杉本らが解析を行ったいずれの細胞種の場合にも LCM もしくはキャピラリーマイクロダイセクションにて再現良くシグナルが検出された。また細胞回収方法を LCM 用の粘着シートに統一することで、解析速度が向上した。

### ②組織結合型マスト細胞培養系の確立と発現変化

マスト細胞成熟に伴い獲得するサブスタンス P や Compound 48/80 による脱顆粒に Galpha-i1 が関与する可能性が示唆された。また本培養系は、従来の CTMC 様細胞よりも組織マスト細胞により近い性質を示すことから、マスト細胞に対する薬効・毒性の評価に有用であると考えられる。

### ③組織マスト細胞の発現プロフィール解析

今回の結果から、2種類の組織マスト細胞サブタイプ CTMC と MMC 間でその発現プロフィールの差を捉えることが可能であると判断し、薬物の組織マスト細胞に対する毒性の評価が可能であると考ええる。また本解析対象を樹状細胞やマクロファージなどの抗原提示細胞にまで広げることにより、薬物アレルギー毒性の総合的な評価も可能になるものと期待される。

## E. 結論

ここで示したように、目的とする細胞径に応じて LCM ( $\phi > 10 \mu\text{m}$ ) もしくはキャピラリーマイクロダイセクション ( $\phi < 10 \mu\text{m}$ ) のいずれかの回収法を選択すれば、RNA 増幅まで 3 日間で完了する実用的な発現プロフィール解析法を確立した。本法によって、組織マスト細胞をはじめ、様々な細胞種の解析が可能であった。

## F. 健康危険情報

特記事項なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Tanaka, S., Deai, K., Konomi, A., Takahashi, K., Yamane, H., Sugimoto, Y., Ichikawa, A. Expression of L-histidine decarboxylase in granules of elicited

- mouse polymorphonuclear leukocytes. *Eur. J. Immunol.* **34**, 1472-1482 (2004)
- Nakamura, E., Kataoka, T., Furutani, K., Jimbo, K., Aihara, T., Tanaka, S., Ichikawa, A., Ohtsu, H., Okabe, S. Lack of histamine alters gastric mucosal morphology: comparison of histidine decarboxylase-deficient and mast cell-deficient mice. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **287**, G1053-G1061. (2004)
- Sugimoto, Y., Nakato, T., Kita, A., Takahashi, Y., Hatae, N., Tabata, H., Tanaka, S., and Ichikawa, A. A cluster of aromatic amino acids in the i2 loop plays a key role for Gs coupling in prostaglandin EP2 and EP3 receptors. *J. Biol. Chem.* **279**, 11016-11026 (2004)
- Tanaka, S., Mikura, S., Hashimoto, E., Sugimoto, Y., and Ichikawa, A. Ca(2+) influx-mediated histamine synthesis and IL-6 release in mast cells activated by monomeric IgE. *Eur. J. Immunol.* **35**, 460-468 (2005)
- Kunikata, T., Yamane, H., Segi, E., Matsuoka, T., Sugimoto, Y., Tanaka, S., Tanaka, H., Nagai, H., Ichikawa, A., and Narumiya, S. Suppression of allergic inflammation by prostaglandin E receptor subtype EP3. *Nature Immunol.* in press. (2005).
2. 学会発表
- Tanaka, S., Ichikawa, A. Histamine synthesis in activated neutrophils. Xth Conference of the Poland Histamine Research Society 2004年11月 ポーランド国 Lodz 市
- 高野裕嗣、田中智之、中澤俊介、市川厚、中山和久、杉本幸彦. 「マウス骨髄由来培養マスト細胞の分化における脱顆粒応答性の変化」第77回日本生化学会大会 2004年10月 横浜
- 阪中麻利子、田中智之、杉本幸彦、扇間昌親、市川厚. 「PGE2 刺激マスト細胞のフィブロネクチンへの接着における細胞内カルシウムの役割」第77回日本生化学会大会 2004年10月 横浜
- 田中智之、杉本幸彦、市川厚. 「ヒスタミンを介するマスト細胞の分化、成熟」第78回日本薬理学会年会 2005年3月 横浜
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む)
1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

## 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Shoji, Y., Takahashi, M., Kitamura, T., Watanabe, K., Kawamori, T., Maruyama, T., <u>Sugimoto, Y.</u> , Negishi, M., Narumiya, S., Sugimura, T., and Wakabayashi, K.	Down-regulation of prostaglandin E receptor subtype EP3 during colon cancer development.	<i>Gut</i>	<b>53</b>	1151-1158	2004
<u>Tanaka, S.</u> , Deai, K., Konomi, A., Takahashi, K., Yamane, H., <u>Sugimoto, Y.</u> , Ichikawa, A.	Expression of L-histidine decarboxylase in granules of elicited mouse polymorphonuclear leukocytes.	<i>Eur. J. Immunol.</i>	<b>34</b>	1472-1482	2004
<u>Sugimoto, Y.</u> , Nakato, T., Kita, A., Takahashi, Y., Hatae, N., Tabata, H., <u>Tanaka, S.</u> , and Ichikawa, A.	A cluster of aromatic amino acids in the i2 loop plays a key role for Gs coupling in prostaglandin EP2 and EP3 receptors.	<i>J. Biol. Chem.</i>	<b>279</b>	11016-11026	2004
<u>Sugimoto, Y.</u> , Tsuboi, H., Okuno, Y., Tamba, S., Tsuchiya, S., Tsujimoto, G., and Ichikawa, A.	Microarray evaluation of EP4 receptor mediated prostaglandin E2 suppression of 3T3-L1 adipocyte differentiation.	<i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i>	<b>322</b>	911-917	2004
Kawazoe, Y., <u>Tanaka, S.</u> , Uesugi, M.	Chemical genetic identification of the histamine H1 receptor as a stimulator of insulin-induced adipogenesis.	<i>Chem. Biol.</i>	<b>11</b> ,	907-913	2004