

「1 細胞解析を用いたプレ好塩基球の分化機構解明」

東京科学大学総合研究院 テニュアトラック准教授

三宅 健介

要旨

好塩基球は白血球中の 0.5%ほどを占める希少な顆粒球で、近年そのアレルギー炎症への関与が明らかになってきた。一方で、骨髄における分化・成熟の分子機構は未解明である。申請者はこれまでに高感度一細胞 RNA 解析を用いて、CLEC12A を高発現する新規前駆細胞「プレ好塩基球」を同定した。本研究では、このプレ好塩基球から成熟好塩基球への移行を制御する責任転写因子の解明を目的とし研究を行った。発現変動遺伝子に基づくモチーフ解析により、候補転写因子 FoxO1 を同定した。好塩基球特異的 FoxO1 欠損マウスでは、骨髄中の細胞数は保たれる一方、脾臓や末梢血の好塩基球が著減し、IgE 依存性慢性皮膚アレルギー炎症モデルにおいても炎症が有意に減弱した。骨髄・脾臓の好塩基球の 1 細胞解析で、FoxO1 を欠損した成熟好塩基球ではコントロールと比較し細胞遊走の関連遺伝子の発現変動が顕著であった。以上から FoxO1 は、プレ好塩基球以降の機能的成熟を制御しており、好塩基球の浸潤能および末梢組織への遊走能の獲得に重要であり、FoxO1 を欠損すると好塩基球依存のアレルギー炎症の減弱につながることが明らかになった。

背景・目的

好塩基球は顆粒球の一種であり、血中を循環する白血球中にわずか 0.5%ほどしか存在しない希少な免疫細胞である。その存在は 140 年以上前にドイツの病理学者 Paul Ehrlich によって発見されたものの、好塩基球の機能については最近になるまで謎であった。ここ 10 年ほどで急速に好塩基球に関する研究ツール（好塩基球除去抗体や好塩基球レポーターマウスなど）が開発され、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必須の役割を果たすことが明らかになってきた^{1,2}。このように好塩基球の免疫学的な機能が徐々に明らかになってきたものの、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。とくに、好塩基球の最終的な成熟機構に関しては、明らかになっていなかった。

近年、1 細胞 RNA シーケンス (single-cell RNA sequence; scRNA-seq) という手法が発展し、生物学の強力な研究ツールとなりつつある。この手法では、検体中に含まれる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、個々の細胞種の遺伝子発現だけでなく、血球細胞の分化経路についても推測が可能である。しかし検出感度の問題があり、従来の scRNA-seq 解析では、好塩基球における遺伝子発現を十分に検出できていなかった。そこで申請者は、新技術である高感度 1 細胞 RNA-seq 法 (TAS-Seq 法)³を導入することで、マウスの正常骨髄好塩基球の解析を行い、分化途中のマウス好塩基球の遺伝子発現の検出に成功した。

研究代表者は以前樹立した好塩基球レポーターマウス⁴を活用して、血球細胞の分化の場である骨髄と、末梢免疫組織である脾臓から好塩基球を採取し、高感度 1 細胞 RNA シーケンス解析を行った。そ

の結果、骨髄好塩基球において、脾臓にはほとんど存在しない新規の好塩基球前駆細胞として「プレ好塩基球」を同定した。さらにプレ好塩基球の細胞表面マーカーとして CLEC12A を同定し、フローサイトメトリーでも成熟とプレ好塩基球の 2 つの分画を同定した。実際、プレ好塩基球分画を単離して *in vitro* にて培養すると、成熟好塩基球へと分化した。さらに、プレ好塩基球は成熟好塩基球と比べて IgE 依存的な活性化能が低いことが明らかになった。以上から、新規の好塩基球前駆細胞として、「プレ好塩基球」を同定した^{5,6}。

以上のように、研究代表者は高感度 1 細胞 RNA シーケンス解析の活用により、プレ好塩基球の同定に成功したものの、プレ好塩基球が成熟好塩基球へどのような分子メカニズムで分化してくるのかは明らかになっていない。そこで本研究では、本発見をさらに推し進め、申請者の同定した「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司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 Cre 発現 (*Mcpt8^{Cre}*) マウス⁷と *Foxo1^{fl}* を掛け合わせることで、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、その定常状態の表現型を解析した。さらに、好塩基球特異的誘導 Cre 発現 (*Mcpt8^{CreERT2}*) マウス⁸と *Foxo1^{fl}* マウスを掛け合わせ、*Mcpt8^{CreERT2} Foxo1^{fl}* マウスを樹立した。*Mcpt8^{CreERT2} Foxo1^{fl}* マウスならびに *Foxo1^{fl}* マウスにタモキシフェンを 3 mg を 0 日目、1 日目に腹腔内投与し、5 日目に骨髄・脾臓の細胞をフローサイトメトリーにて解析した。さらに、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。またコントロールおよび *Baso^{ΔFoxO1}* マウスに、好塩基球依存的に炎症が誘導されることでしられる IgE 依存性慢性皮膚アレルギー炎症 (IgE-dependent chronic allergic inflammation; IgE-CAI) モデル^{9,10}を誘導し、皮膚に浸潤した炎症細胞をフローサイトメトリーにて解析した。さらに IgE-CAI モデルの皮膚炎症局所を 1 細胞 RNA シーケンス解析に供し、解析を行った。

結果

1. 転写因子モチーフ解析とノックダウンによるスクリーニングによって候補転写因子 FoxO1 を同定

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。その結果、候補転写因子 *Foxo1* をノックダウンした場合にのみ、コントロール siRNA と比較してプレ好塩基球の割合の増加が認められ、それに伴いプレ好塩基球マーカーである *FcεRIα* の発現増加が認められた。以上の結果と、FoxO1 の遺伝子発現は分化成熟に伴い増加するという事実

から、FoxO1 は好塩基球の成熟を司る転写因子であると考えられたため、転写因子 FoxO1 の機能に着目し解析を行った。

2. 好塩基球特異的 FoxO1 欠損マウスでは、末梢における好塩基球数が減少する

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 (図 1A)。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、脾臓における好塩基球数が激減していた (図 1B-D)。さらに、タモキシフェン投与時にのみ好塩基球特異的に FoxO1 を欠損する $\text{Mcpt8}^{\text{CreERT2}} \text{Foxo1}^{\text{fl}}$ マウスを用いた検討を行ったところ、タモキシフェンを投与した $\text{Mcpt8}^{\text{CreERT2}} \text{Foxo1}^{\text{fl}}$ マウスではコントロールマウスと比較して、有意に脾臓の好塩基球数が減少した一方で、骨髄中の好塩基球数は有意に増加した。以上の結果から FoxO1 は好塩基球の骨髄外への遊走に関与する可能性が強く示唆された。

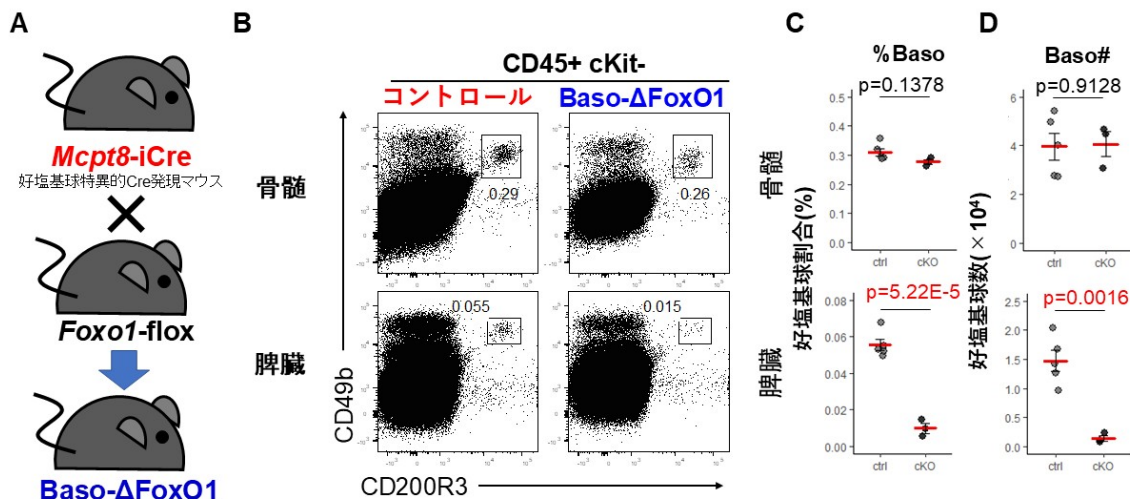


図 1. 好塩基球特異的 FoxO1 欠損マウスでは、末梢の好塩基球数が激減する。A. 好塩基球特異的 Cre 発現マウス ($\text{Mcpt8}^{\text{iCre}}$ マウス) と Foxo1-flox マウスを掛け合わせることで、好塩基球特異的 FoxO1 欠損マウス ($\text{Baso}^{\Delta\text{FoxO1}}$ マウス) を樹立した。B-D. コントロールマウス ($\text{Mcpt8}^{\text{iCre}}$ マウス) ならびに $\text{Baso}^{\Delta\text{FoxO1}}$ マウスの定常状態における骨髄、脾臓の好塩基球数を示す。B では骨髄と脾臓における CD45 陽性 cKit 陰性細胞における CD200R3 と CD49b の発現を示す。C-D では骨髄・脾臓における好塩基球の割合 (C) ならびに好塩基球数 (D) を示す。P 値は unpaired-t test での統計結果を示す。

3. 好塩基球特異的 FoxO1 欠損マウスでは、皮膚アレルギー炎症が減弱する

さらに、好塩基球依存性は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 $\text{Baso}^{\Delta\text{FoxO1}}$ マウスに誘導した。その結果、コントロールマウスと比較して耳介腫脹が有意に低下 (図 2A) しており、耳介に浸潤する好塩基球数が低下していた (図 2B)。以上の結果から FoxO1 は好塩基球依存性アレルギー炎症誘導に重要であることが明らかになった。さらに、 $\text{Baso}^{\Delta\text{FoxO1}}$ マウスにおける IgE-CAI の減弱のメカニズムを詳細に解析する目的で、コントロール並びに $\text{Baso}^{\Delta\text{FoxO1}}$ マウスに IgE-CAI 皮膚炎症局所をそれぞれ 1 細胞 RNA シーケンス解析に供した。両マウスにおいて皮膚に浸潤した好塩基球の遺伝子発現を比較した結果、 $\text{Baso}^{\Delta\text{FoxO1}}$ マウスでは、コントロールと比較してプレ好塩基球のマーカー (Clec12a , Fcer1a) が強く発現した一方で、成熟好塩基球のマーカー (Cd7 , Itga2 , Areg ,

Il4, Il6 はコントロールよりも発現が低いことが明らかになった (図 2C-D)。以上から、*Baso^{ΔFoxO1}* マウスでは IgE-CAI 皮膚炎症局所にプレ好塩基球様の遺伝子発現を呈する好塩基球が浸潤するために、IgE 依存的な好塩基球の活性化が障害され、アレルギー炎症を起こせなくなっていることが示唆された。

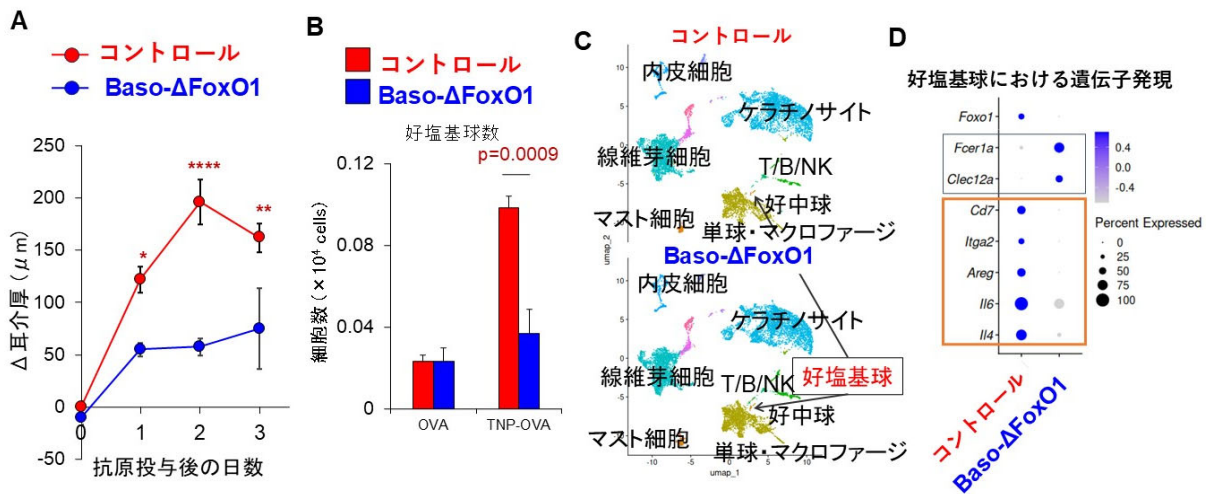


図 2. 好塩基球特異的 FoxO1 欠損マウスでは、好塩基球依存的アレルギー炎症が減弱する。 A-D. コントロールマウス (*Mcpt8iCre* マウス) ならびに *Baso^{ΔFoxO1}* マウスに TNP 特異的 IgE 抗体を静脈投与し、翌日に TNP 結合 OVA(TNP-OVA)並びに、OVA を 10 μg をマウスの耳介に皮内投与することで IgE-CAI モデルを誘導した。A. TNP-OVA 投与耳と OVA 投与耳の耳介厚の差の推移を経時的に示す。エラーバーは標準誤差を表す。統計は two-way ANOVA with Sidak's multiple comparison test にて行った。** p < 0.01, **** P < 0.001 を表す。B. IgE-CAI 誘導 3 日後の耳における好塩基球数を表す。統計は two-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test にて行った。C. IgE-CAI 誘導 3 日後の耳を 1 細胞 RNA-seq に供して解析した。両マウスの UMAP プロットを示す。D. 各マウスの好塩基球クラスターにおける遺伝子発現をドットプロットで示す。

4. FoxO1 を欠損した成熟好塩基球では、細胞運動能・浸潤能に関連する遺伝子の発現変動がみられる

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、*Baso^{ΔFoxO1}* マウス・コントロールマウスの好塩基球を骨髓・脾臓より単離し、高感度 1 細胞解析を行った。その結果、*Baso^{ΔFoxO1}* マウスと比較して、骨髓・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、*Baso^{ΔFoxO1}* 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、*Baso^{ΔFoxO1}* 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、成熟好塩基球の骨髓外への

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、好塩基球依存性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。

共同研究者

該当なし

引用論文

- 1) Miyake, K., Shibata, S., Yoshikawa, S., Karasuyama, H.: Basophils and their effector molecules in allergic disorders. *Allergy*. 76(6):1693-1706.2021
- 2) Miyake, K., Ito, J., Karasuyama, H. Role of Basophils in a Broad Spectrum of Disorders. *Front. Immunol.* 13: 902494. 2022
- 3) Shichino, S., Ueha, S., Hashimoto, S., et al. TAS-Seq is a robust and sensitive amplification method for bead-based scRNA-seq. *Commun. Biol.* 5, 602. 2022.
- 4) Miyake, K., Shiozawa, N., Nagao, T., et al.. Trogocytosis of peptide-MHC class II complexes from dendritic cells confers antigen-presenting ability on basophils. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 114(5):1111-1116, 2017.
- 5) Miyake, K., Ito, J., Nakabayashi, J., et al. Single cell transcriptomics clarifies the basophil differentiation trajectory and identifies pre-basophils upstream of mature basophils. *Nat. Commun.* 14(1); 2694. 2023.
- 6) Miyake, K., Ito, J., Karasuyama, H. Novel insights into the ontogeny of basophils. *Front. Allergy.* 5: 1402841. 2024.
- 7) Shibata, S., Miyake, K., Tateishi, T., et al. Basophils trigger emphysema development in a murine model of COPD through IL-4-mediated generation of MMP-12-producing macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 115(51):13057-13062, 2018.
- 8) Yoshikawa, S., Oh-Hora, M., Hashimoto, R., et al. Pivotal role of STIM2, but not STIM1, in IL-4 production by IL-3-stimulated murine basophils. *Sci Signal.* 2019. 12(576):eaav2060.
- 9) Egawa, M., Mukai, K., Yoshikawa, S., et al. Inflammatory monocytes recruited to allergic skin acquire an anti-inflammatory M2 phenotype via basophil-derived interleukin-4. *Immunity.* 38(3):570-80, 2013.
- 10) Miyake, K., Ito, J., Takahashi, K., et al. Single-cell transcriptomics identifies the differentiation trajectory from inflammatory monocytes to pro-resolving macrophages in a mouse skin allergy model. *Nat Commun.* 15(1); 1666. 2024.

助成研究に関連した発表論文

該当なし