

## 要 旨

特発性肺線維症、珪肺などの肺の線維化疾患は、いまだ有効な治療法に乏しく予後不良である。線維化病巣中には、活性化した線維芽細胞や肥厚した上皮細胞などの組織系細胞、マクロファージなどの血球系細胞など多様な細胞が存在しているが、線維化病巣中の細胞の活性化状態の多様性、相互作用の **heterogeneity** については未だ不明な点が多い。上記の課題を解決するため、我々は、磁気ビーズに固相化された cDNA を高効率に増幅する新規手法と、BD Rhapsody システムを組み合わせることにより、既存の技術を感度・スループットの両者で上回る新規 1 細胞トランスクリプトーム法 TAS-Seq の開発に成功した (図 1)。本 TAS-Seq 解析を用いて、ブレオマイシン誘導マウス肺線維症モデルの経時的変動を 1 細胞トランスクリプトームの解像度で解析した。細胞 Seurat を用いたクラスタリング解析により、線維芽細胞、上皮細胞、内皮細胞、平滑筋細胞、単球・マクロファージ、樹状細胞、T 細胞、B 細胞、NK 細胞といった主要な細胞サブセットのみならず、2 型自然リンパ球、 $\gamma\delta$ T 細胞、形質細胞様樹状細胞、中皮細胞、クララ細胞などの稀な細胞集団も同定された。また、10X Genomics Chromium で得られた肺の細胞存在頻度はフローサイトメトリーのそれと大きく乖離する ( $R^2=0.274$ ) のに対し、TAS-Seq で得られた肺の細胞存在頻度はフローサイトメトリーでのデータと非常に高い正の相関 ( $R^2=0.992$ ) を示し、正確に肺の各細胞種を捉えられていることが明らかとなった (図 2)。病態の進行や程度の違いに伴い、存在頻度や活性化系譜の変動が生じている細胞集団が明らかとなった。Slingshot パッケージを用いた Seurat の PCA 空間を用いた各細胞サブセットの pseudotime 解析により、単球・マクロファージ/肺胞領域の線維芽細胞/肺胞上皮細胞が、その他の細胞サブセットに比して、pseudotime 軸に従い大きな遺伝子発現変動が見られることが明らかとなった。肺胞細胞外の分子とそれらに対するレセプター分子の、各 1 細胞の発現情報をもとに細胞間相互作用を再構成すると、結びつきの強い細胞と細胞外分子により構成される相互作用クラスターが存在することが明らかとなった。その中の中心分子の一つ Dcn は、ブレオマイシン誘導肺線維症に対し予防効果があることが明らかとなった。さらに、リウマチ誘導間質性肺炎の線維化・非線維化部位の差異の TAS-Seq による解析により、線維化の強弱に応じて特異的に存在する細胞サブセットが同定され、その分化系譜が推定された。本技術は様々な疾患のコンテキストにおいて、1 細胞レベルの活性化変動や集団内での **heterogeneity**、1 細胞同士の相互作用を解明する上で有用であると考えられる。

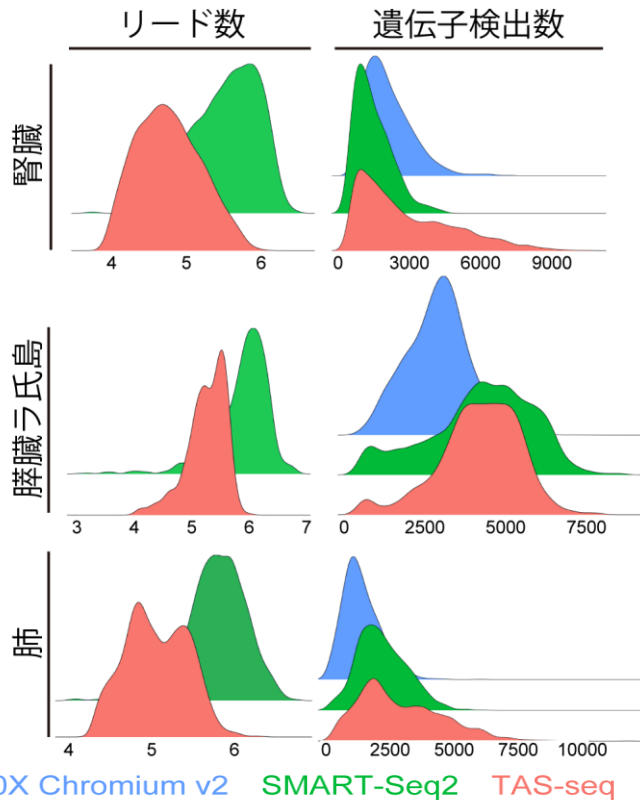


図1 各マウス臓器の単細胞懸濁液における検出遺伝子数の比較

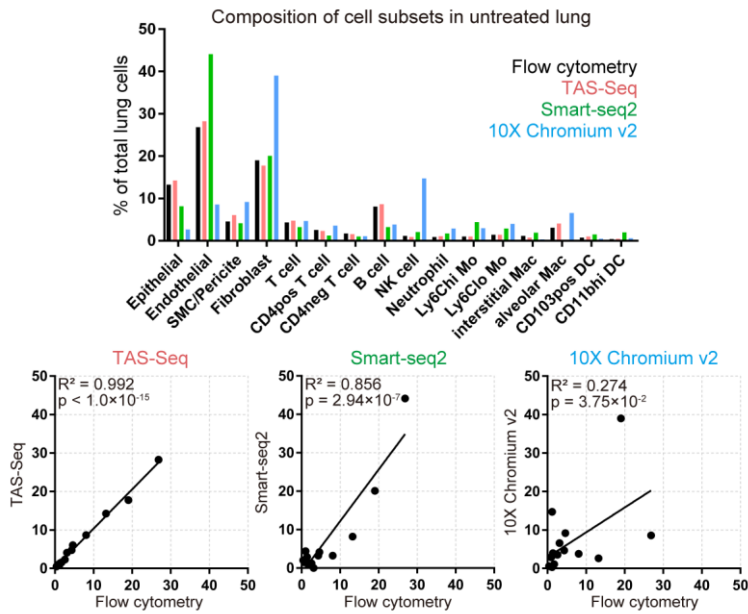


図2 TAS-Seq データに基づく細胞存在頻度データは、フローサイトメトリー解析データと非常に高い正の相関を示す