

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：24303

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22909

研究課題名(和文) 単一細胞遺伝子発現解析を用いたIgA腎症における免疫細胞の役割の網羅的解析

研究課題名(英文) A single cell atlas of the peripheral immune response in patients with IgA nephropathy

研究代表者

桐田 雄平(Kirita, Yuhei)

京都府立医科大学・医学部附属病院・専攻医

研究者番号：30783097

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、シングルセルRNAシーケンスを用いてIgA腎症患者の末梢血単核球細胞の遺伝子発現情報を網羅的に解析することにより、IgA腎症の新たな治療標的や重症化因子・治療反応性を規定する因子の発見を試みた。10X Chromium systemおよび次世代シーケンサーにより得られた遺伝子発現情報から、主に統計解析ソフトR等を用いて遺伝子発現行列を得て、クラスタリング解析を行った。B細胞、T細胞、単球、樹状細胞、造血幹細胞、巨核球などが確認でき、それぞれのサブポピュレーションも加えると計20種類以上の細胞種が存在することが明らかになった。現在症例を集積してさらなる解析を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では世界で初めてIgA腎症患者の末梢血免疫細胞の単一細胞レベルでの遺伝子発現を網羅的に解析した。ただし本研究で得られるデータベースは今後のさらなる研究の基盤となり、新たな治療法開発の礎になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we planned to discover new therapeutic targets and factors that determine the severity and response to treatment for IgA nephropathy by comprehensively analyzing gene expression profile of peripheral blood mononuclear cells of IgA nephropathy patients using single-cell RNA sequencing. Firstly, we obtained the gene expression matrices by 10X Chromium system and the next-generation sequencer, then analyzed the data mainly using statistical software R. We could identify over 20 cell types including not only major cell types i.e. B cells, T cells, monocytes, dendritic cells, but also rare cell types i.e. hematopoietic stem cells. We are collecting more cases to create the comprehensive cell atlas.

研究分野：腎臓内科

キーワード：IgA腎症 シングルセルシーケンス

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

慢性腎不全で血液透析を行われている患者数は年々増加している。慢性糸球体腎炎は、糖尿病性腎症に次ぐ本邦における慢性透析療法導入原因疾患であり、その40~60%をIgA腎症が占めていることから、患者本人だけでなく、国民医療費への影響も考慮すると、その根治療法の開発は急務である。IgA腎症は免疫グロブリンの一つであるIgAが糸球体メサンギウム基質に沈着することにより発症する糸球体腎炎であり、扁桃、腸管などの粘膜免疫の関与が示唆されているが、その詳細な発症メカニズムは明らかになっていない。

### 2. 研究の目的

IgA腎症に対する主な治療法は免疫抑制療法であるが、IgA腎症におけるB細胞・T細胞・マクロファージなどのそれぞれの免疫細胞自体の役割や相互作用は未だ明らかになっていない。そこで本研究では、IgA腎症における末梢循環免疫細胞の、IgA腎症の発症・重症度・活動性を規定する分子機序を探索する。そのために次のことを明らかにしておくことを目指す。

- (1) IgA腎症患者の末梢循環免疫細胞の個々の細胞腫、例えばT細胞、B細胞、マクロファージの数・割合は正常者と比べてどのように変化し、またそれらは病勢を反映するのか。
- (2) IgA腎症患者の末梢循環免疫細胞の個々の細胞腫の遺伝子発現はどのように変化し、またそれらは病勢を反映するのか。
- (3) IgA腎症患者の末梢循環免疫細胞の個々の細胞腫はどのように相互作用しているのか。

### 3. 研究の方法

健常者・IgA腎症患者それぞれから末梢血単核細胞(Peripheral Blood Mononuclear Cells: PBMCs)を採取し、scRNA-seqおよびその解析を行い、またIgA腎症患者においては、解析結果と病理学的所見・臨床所見との相関を検証する。具体的には下記の計画に基づいて研究を遂行する。

#### (1) scRNA-seqによるIgA腎症患者PBMCsの遺伝子発現の網羅的解析

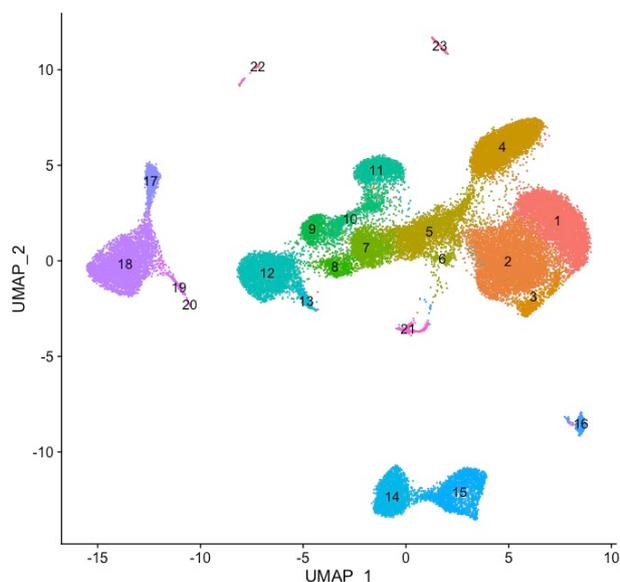
健常者とIgA腎症患者から末梢血を採取し、密度勾配法でPBMCsを単離する。単離したPBMCsに対し10X Genomics社のChromium systemを用いてscRNA-seqを施行し、次世代シーケンサーで個々の細胞の遺伝子発現情報(Digital gene expression matrix: DGE)を得る。R、Python等のデータ解析ソフトを用いた機械学習(Machine learning)によりデータを解析し、(1) IgA腎症に特徴的な免疫細胞の遺伝子発現、pathwayを明らかにし、(2) 各免疫細胞のリガンドおよび受容体シグナル発現の解析から、IgA腎症における各免疫細胞間のネットワークを明らかにする。

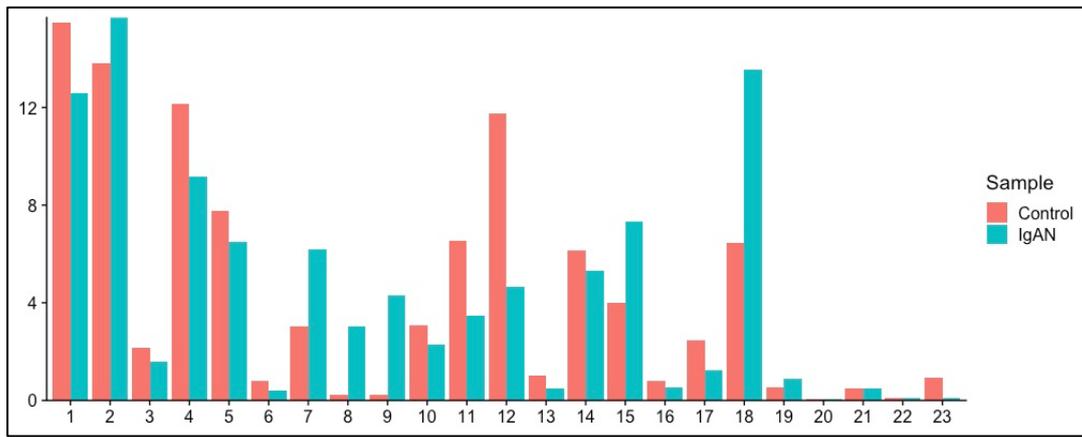
#### (2) scRNA-seqデータの解析結果と臨床・病理所見の比較、相関の解析

IgA腎症症例の重症度はさまざまであり、各症例の腎生検所見および採血・尿検査所見と、各症例のscRNA-seqのデータとの相関を解析し、重症度、疾患活動性を反映する免疫細胞、遺伝子発現、細胞間シグナルを明らかにする。

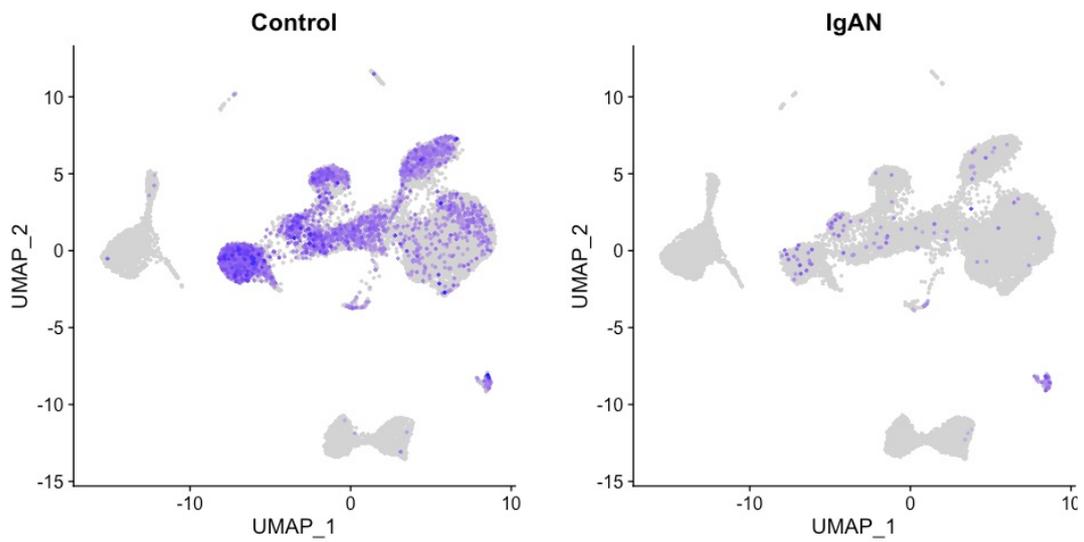
### 4. 研究成果

(1) 健常者2例、IgA腎症患者2例についてPBMCsのscRNA-seqを行った。主にRパッケージの一つであるSeuratを用いて解析した。各サンプルで遺伝子発現数が少ない・ミトコンドリア遺伝子が多いなどの低クオリティーな細胞を除去するクオリティチェックを行ったところ、それぞれ約10,000細胞を処理することができ、計39,419細胞を解析した。B細胞、T細胞、単球、樹状細胞、造血幹細胞、巨核球などが確認でき、それぞれのサブポピュレーションも加えると計20種類以上の細胞種が存在することが明らかになった。また、IgA腎症特異的に増加しているサブポピュレーション、逆に減少しているサブポピュレーションが確認された。





(2) 各サブポピュレーション毎に健常者と IgA 腎症患者の間で遺伝子発現を比較すると、両方で発現強度の異なる遺伝子が複数発見された。現在症例を集積してさらなる解析を進めている。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------