

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19503

研究課題名（和文）一細胞から紐解く新生児の腸管免疫システム

研究課題名（英文）Single cell transcriptome analysis for the intestinal immunity of neonates

研究代表者

澤 新一郎（SAWA, SHINICHIRO）

九州大学・生体防御医学研究所・教授

研究者番号：80611756

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000 円

研究成果の概要（和文）：ヒト新生児期の腸管免疫細胞の構成と機能を明らかにし、新生児期の腸炎病態を免疫学的な側面から理解することを目的とした。本研究では手術対象となったヒト新生児腸管から採取した免疫細胞に関してシングルセル遺伝子発現を網羅的に解析した。新生児壊死性腸炎（NEC）および現局性腸穿孔（FIP）を比較したところ、強い炎症と壊死が生じる新生児壊死性腸炎のT細胞において、ケモカイン受容体や接着因子の発現が増強することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はヒトの新生児腸管粘膜における免疫細胞の構成や機能に関する情報を網羅的に取得することで、これまで病態が不明である新生児壊死性腸炎について免疫学的な新知見をもたらした。また、新生児早期における免疫状態は成人期以降のヒトの免疫異常やアレルギー疾患の発症しやすさに何らかの関係があると想定されているが、これまでヒト新生児の臓器局所に存在するリンパ球は詳細に解析されてこなかった。本研究により、情報が取得しにくいヒトの腸管免疫細胞に関する新たな解析方法が提案できたと考えている。

研究成果の概要（英文）：The first aim of this project was to understand composition and function of immune cells in human neonatal gut. We succeeded in setting up single cell transcriptome analysis about human intestinal cells. The second aim was to clarify etiology of neonatal necrotizing colitis (NEC). In NEC patients, intestinal inflammation and tissue necrosis is evident. Using single cell transcriptome analysis, we identified enhanced expression of chemokine receptors and adhesion molecules on T cells in NEC patients.

研究分野：免疫学

キーワード：腸管免疫 新生児壊死性腸炎 網羅的遺伝子発現解析 シングルセル遺伝子発現 リンパ球 サイトカイン

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

免疫の最前線を担う粘膜組織は外来からの抗原や微生物に暴露される場であり、アレルギー疾患や感染症、自己免疫疾患の起点となる。粘膜バリア機能の保持機構の解明は、免疫アレルギー疾患を理解する上で本質的な研究主題であり、上皮細胞の整合性や生存に関する研究がこれまで精力的に行われてきた。近年、上皮基底膜側に位置する間葉系細胞やリンパ球等の免疫細胞が粘膜上皮細胞の運命決定や維持に重要との研究成果が相次いで報告されている(Sawa, *Science*, 2010; Nagashima, Sawa, *Nat. Immunology*, 2017)。また、粘膜組織を構成する細胞群が詳細に検討されはじめ、細胞集団の細分化や新規細胞群が提唱され始めている。例えば、申請者らはマウス消化管内に抗原受容体を持たないリンパ球群を同定し、国際的なコンセンサスを得て自然リンパ球 (Innate Lymphoid Cell=ILC) と命名された (Spits, Di Santo, *Nat Immunology*, 2013)。ILCのうち、転写因子 ROR γ t を発現する自然リンパ球は3型自然リンパ球 (ILC3) と呼ばれ、マウス消化管上皮の生存や維持、病原性細菌感染に重要な役割を果たしている (Satoh-Takayama, Sawa, *Immunity*, 2008)。興味深いことに、ILC3 はマウス個体発生において胎児期から腸管内に存在し、出生時の腸管における主要な Th17 型サイトカインである IL-22 や IL-17 の産生細胞として機能する。ILC3 は獲得免疫系が未成熟な出生後の個体において感染防御や上皮バリア維持に中心的な役割を担うために胎仔期から準備されたリンパ球と推察される(Sawa, *Nat.Immunology*, 2011)。

新生児蘇生・集中治療技術が世界最高水準と評される本邦においても、新生児のメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)や緑膿菌の院内感染予防は新生児医療における喫緊の課題である。また、ヒトの胎児免疫系が妊娠中期から後期にかけて発達、成熟するプロセスを理解し、自然免疫系を中心とした細菌感染防御を実現することは、新生児期に重篤化するB群溶連菌や肺炎球菌、に起因する細菌性髄膜炎や敗血症を予防するうえで必要不可欠である。しかし、粘膜組織検体の入手困難さが障壁となり、ヒトの ILC については研究が立ち後れている。これまで、扁桃腺や末梢血、喀痰など、入手容易な組織検体の解析が行われ、ヒトの消化管にもマウスと同様の ILC 群が存在すると推定されているが、ヒトの個体発生においてどの時期から ILC が発生し、消化管に出現するかは明らかになっていない。粘膜組織に局在する自然リンパ球は末梢血中の共通前駆細胞に由来・発生するとの報告があることから、消化管自然リンパ球は腸管局所で最終分化し、エフェクター機能を獲得すると考えられる (Lim, *Cell*, 2017)。ヒト新生児の腸管バリア機能を担うリンパ球群を直接的に解析するためにはヒト新生児の腸管組織を解析する以外に方法がないが、これまで国内外を含めてヒト新生児の消化管を対象とした体系的な研究は行われていない。

2. 研究の目的

本研究では、ヒトの免疫異常やアレルギー疾患の場となる粘膜免疫系を理解するために新規手法で免疫細胞の再分類を試みる。特に、新生児期におけるリンパ球の機能解明に主眼を置く。新生児の手術検体を用い、消化管に存在するリンパ球を網羅的に解析することで、ヒト新生児期の ILC を同定するとともに、消化管免疫の「デフォルト状態」を解明し、消化管アレルギーや炎症性腸疾患の発症機構解明の一助となることを目指す。

3. 研究の方法

① 1細胞オミックス解析によるヒト ILC 分画の同定

臨床検体を用いた1細胞遺伝子発現解析とオミックス手法を組み合わせ、免疫細胞情報の取得を行う。まず、名古屋大学小児外科および関連施設で手術対象となった新生児腸管からリンパ球を分離する。つぎに、自然研究機構生理学研究所との共同研究で網羅的に一細胞レベルのトラ

ンスクリプトーム解析を行う。具体的には、Chromium™ (10xGenomics 社)を用い、1 乳化液滴内で 1 細胞毎の RNA 精製とバーコード核酸配列の付与後、Illumina 社の次世代シーケンサー HiSeq を利用し、RNA シークエンスを網羅的に行う。本方法では、1 細胞あたり 5000 種類の遺伝子発現を 10 万個の細胞について解析可能である。取得遺伝子情報を多変量解析し、細胞の種類と機能を高次元で解析する。RNA シークエンスはマクロジェン (株) に解析委託し、機材投資と解析試薬代金のコストダウンを図る。また、生理学研究所内で遺伝子情報の統計的解析を行うとともに、解析法の妥当性について郷博士の助言を仰ぐ。なお、腸管からの酵素を用いた細胞採取には 2-3 時間を要し、細胞生存率が低下する場合がある。細胞の凝集はシングルセル解析の障壁となるため、フローサイトメーターで 7-AAD 染色による死細胞とダブレット細胞を除外し、90%以上の生細胞を担保したうえで解析を行う。

② 新規ヒト ILC 分画のタンパク発現解析

上記①で明らかになったヒト ILC 分画に発現する分子に対する特異抗体を入手し、フローサイトメーターで対象細胞分画をタンパクレベルで解明する。さらに、対象細胞をソーティングし、遺伝子発現プロファイルを解析することで細胞の新規性を証明する。

4 . 研究成果

平成 30 年度はヒト臨床検体を用いた 1 細胞遺伝子発現解析とオミックス手法を組み合わせ、免疫細胞情報の取得を行った。具体的には名古屋大学小児外科で手術対象となった新生児腸管からリンパ球を分離後、Chromium™ (10xGenomics 社)を用いて 1×10^4 個の細胞についてライブラリーを作成後、次世代シーケンサーを用いて網羅的に一細胞レベルのトランスクリプトーム解析を行った。取得遺伝子情報を多変量解析し、細胞の種類と機能を高次元で解析したところ、T 細胞、B 細胞、ILC などのリンパ球分画を表すクラスター、樹状細胞や、マクロファージなどの骨髄球系細胞のクラスターのみならず間葉系ストローマ細胞のクラスターに分類することができた。一方、総細胞数に対するリンパ球分画、特に ILC と考えられる CD3-CD19- CD127+細胞群の存在比が 10%以下であること、転写因子などの発現量が少ない遺伝子が網羅的遺伝子解析結果に反映されていないことが障壁となり、ILC を ILC1,2,3 のサブセットに分類することは不可能であった。

令和元年 (平成 31 年度) 度は手術対象となった新生児壊死性腸炎、限局性腸穿孔の腸管検体から細胞を調整し、Chromium(10xGenomics 社)により網羅的 一細胞遺伝子発現解析が可能な核酸ライブラリーを作成後、次世代シーケンサーを用いて本ライブラリーの核酸配列を検出後、解析ソフト Seurat で統計解析を行った。壊死性腸炎と限局性腸穿孔を各 2 症例ずつ比較し、2 群間で有意差を認める遺伝子群を抽出したところ、新生児腸炎のうち、炎症が著明な壊死性腸炎では T 細胞におけるケモカイン受容体である CCR7 や接着因子、L-Selectin(CD62L) 発現が優位に更新することが明らかとなり、本研究内容を学会発表した。また、研究手法の洗練化を目指し、マウス由来細胞を用いて網羅的一細胞遺伝子発現解析手法の改良、改善を目指すとともに胎仔骨に含まれる未分化細胞の機能 解析も行った。本研究により胎仔マウス骨組織から採取した細胞を用いた網羅的一細胞遺伝子発現解析を行い、マウス骨髄形成に必要な新規細胞群の同定に成功し、学会発表を行なった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kunimura K, Sakata D, Tun X, Uruno T, Ushijima M, Katakai T, Shiraishi A, Aihara R, Kamikaseda Y, Matsubara K, Kanegane H, Sawa S, Eberl G, Ohga S, Yoshikai Y, Fukui Y.	4. 巻 29
2. 論文標題 S100A4 Protein Is Essential for the Development of Mature Microfold Cells in Peyer's Patches.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Rep.	6. 最初と最後の頁 2823-2834
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2019.10.091	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計19件（うち招待講演 7件/うち国際学会 6件）

1. 発表者名 Eriko Sumiya, Shinichiro Sawa
2. 発表標題 The role of fetal osteoclast inducer cells in perinatal bone marrow development
3. 学会等名 第47回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sawa S., Nakano K., Okamura T., Sumiya E.
2. 発表標題 Fundamental role of LTi-like cell in the maintenance of adult intestinal homeostasis
3. 学会等名 第47回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sawa S., Sumiya E., Nakano K., Okamura T
2. 発表標題 RANKL+ mesenchymal cell is the genuine lymphoid tissue organizer cell in the developing lymph-node.
3. 学会等名 3rd International Conference on Innate Lymphoid Cells (ILC2018)（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sumimya E., Nakano K., Okamura T. and Sawa S
2. 発表標題 Fetal osteoclast inducer cells play a role in bone marrow cavity development.
3. 学会等名 第36回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 澤 新一郎
2. 発表標題 腸管免疫のゲートキーパー、3型自然リンパ球
3. 学会等名 第39回 日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 腸管免疫の基盤、3型自然リンパ球
2. 発表標題 腸管免疫の基盤、3型自然リンパ球
3. 学会等名 第8回 オルソオルガノジェネシス研究会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 澤 新一郎
2. 発表標題 3型自然リンパ球は本当に腸管バリア機能の維持に重要か？
3. 学会等名 第3回 ソニー ライフサイエンス学術セミナー（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 澤 新一郎
2. 発表標題 リンパ節オーガナイザー細胞の同定
3. 学会等名 第28回KTCC
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sawa S, Eriko Sumiya and Nagashima K
2. 発表標題 Intestinal homeostasis maintained by subepithelial mesenchymal cell.
3. 学会等名 第 22 回腸内細菌学会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 住谷瑛理子, 澤新一郎
2. 発表標題 骨と骨髄の発生におけるRANKL陽性未分化間葉系細胞の寄与の解明
3. 学会等名 第29回 Kyoto T Cell Conference
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 澤新一郎, 住谷瑛理子
2. 発表標題 Investigation for the cell lineage of lymph node stroma cell
3. 学会等名 第29回 Kyoto T Cell Conference
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shinichiro Sawa
2. 発表標題 If ILC3s are absent, what happens in the gut?
3. 学会等名 JSPS-Crick Symposium on Gut Circuits (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 住谷瑛理子, 澤新一郎
2. 発表標題 胎仔破骨細胞誘導細胞の生体内における分化能の解析
3. 学会等名 第37回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 澤新一郎
2. 発表標題 リンパ節ストローマ細胞の起源に迫る
3. 学会等名 第8回生命科学阿波おどりシンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shinichiro Sawa
2. 発表標題 RANKL+ mesenchymal cell is the genuine lymphoid tissue organizer cell in the developing lymph node
3. 学会等名 第14回生命医科学研究所ネットワーク国際シンポジウム (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shinichiro Sawa
2. 発表標題 LTi-like cell conducts maturation of intestinal immune system
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 澤新一郎
2. 発表標題 「免疫の場」を構成する細胞群の運命追跡
3. 学会等名 第4回理論免疫学ワークショップ（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Eriko Sumiya, Shinichiro Sawa
2. 発表標題 Transcriptomic characterization of cells involved in fetal bone development
3. 学会等名 The 29th Hot Spring Harbor International Symposium（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大島一夫、田中裕次郎、城田千代栄、田井中貴久、牧田智、福山貴大、住田 互、横田一樹、稲田亘佑、滝本愛太郎、狩野陽子、郷康広、澤新一郎、内田広夫
2. 発表標題 新生児壊死性腸炎の病態形成に関わる免疫細胞の網羅的解析
3. 学会等名 第56回日本小児外科学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 非ヒト遺伝子改変動物及びその作製方法	発明者 澤 新一郎、住谷瑛 理子	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-229876	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 非ヒト動物の作成方法	発明者 澤 新一郎	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2019/003185	出願年 2019年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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
研究分担者	城田 千代栄 (Shirota Chiyoe) (20378194)	名古屋大学・医学部附属病院・講師 (13901)	
研究分担者	大島 一夫 (Oshima Kazuo) (20764880)	名古屋大学・医学部附属病院・医員 (13901)	
研究分担者	内田 広夫 (Uchida Hiroo) (40275699)	名古屋大学・医学系研究科・教授 (13901)	
研究分担者	田中 裕次郎 (Tanaka Yujiro) (90382928)	名古屋大学・医学系研究科・准教授 (13901)	
研究分担者	檜 顕成 (Hinoki Akinari) (90383257)	名古屋大学・医学系研究科・特任教授 (13901)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	郷 康広 (Go Yasuhiro) (50377123)	大学共同利用機関法人自然科学研究機構・新分野創成センター、アストロバイオロジーセンター、生命創成探究、生命創成探究センター・特任准教授 (82675)	