

令和 3 年 6 月 19 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：2019～2020

課題番号：19K24000

研究課題名(和文) シングルセル解析による膠原病関連間質性肺疾患の病態解明

研究課題名(英文) Study of connective tissue disease-associated interstitial lung disease (CTD-ILD) with single-cell RNA sequencing

研究代表者

藤井 渉 (Fujii, Wataru)

京都府立医科大学・医学部附属病院・専攻医

研究者番号：60755643

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)：膠原病関連間質性肺疾患(関節リウマチ5例、皮膚筋炎4例、全身性強皮症2例、シェーグレン症候群4例)および特発性間質性肺炎7例の気管支肺胞洗浄液(BALF)、末梢血液をSeq-WellによるシングルセルRNA-seq、ELISAにより解析した。合計76,648細胞の網羅的遺伝子解析を行い、血液細胞は17のクラスター、BALF細胞は19のクラスターに分類することができ、肺胞マクロファージはさらに14の亜分画に分類し得た。各疾患間の細胞分布を比較すると、関節リウマチでは好中球が、シェーグレン症候群ではT細胞およびB細胞が、全身性強皮症では肺胞マクロファージがそれぞれ増加するという異なる特徴を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

関節リウマチ、シェーグレン症候群、多発性筋炎・皮膚筋炎、全身性強皮症などの膠原病ではしばしば難治性の間質性肺疾患を合併し膠原病関連間質性肺疾患(CTD-ILD)と呼ばれるが、その分子病態は十分解明されておらず特異的治療法も確立されていない。本研究によって、CTD-ILDにおける各基礎疾患毎の分子病態の特徴が明らかとなり、病態解明および間質性肺疾患の鑑別診断のための臨床応用が期待できる。また今回確立した気管支肺胞洗浄液と血液検体の網羅的遺伝子解析による研究手法は、CTD-ILDのみならず種々の呼吸器・免疫疾患の病態解明に適用可能であり今後の難治性呼吸器・免疫疾患研究への応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：We performed single-cell RNA-seq and ELISA for bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and peripheral blood from 5 rheumatoid arthritis (RA), 4 dermatomyositis (DM), 2 systemic sclerosis (SSc), 4 Sjogren syndrome (SjS) and 7 idiopathic interstitial pneumonia (IIP) patients. We found neutrophils increased in BALF of RA patients, while lymphocytes increased in BALF of DM and SjS patients. The concentrations of IL-12p40 and CXCL10, both are associated with lymphocyte chemotaxis, were increased in BALF of DM and SJS patients. By using scRNA-seq, we found 14 different phenotypes of alveolar macrophages in CTD-ILD patients. In conclusion, neutrophils increase in BALF of RA patients while lymphocytes increase in those of DM and SjS patients, possibly because of altered chemokine levels in BALF. Alveolar macrophages showed different phenotypes in CTD-ILD patients from those in IIP patients, indicating altered functions of these cells in CTD-ILD.

研究分野：免疫学、リウマチ学、呼吸器学

キーワード：膠原病関連間質性肺疾患 シングルセルRNA-seq 気管支肺胞洗浄液 肺胞マクロファージ 関節リウマチ シェーグレン症候群 全身性強皮症

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、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ、多発性筋炎・皮膚筋炎、全身性エリテマトーデス、全身性強皮症などの膠原病ではしばしば進行性、難治性の間質性肺疾患を合併し膠原病性間質性肺疾患(Connective tissue disease-associated interstitial lung disease: CTD-ILD)と呼ばれるが、その病因、分子病態については十分解明されておらず特異的な治療法も確立されていない。CTD-ILDの難治性の背景には疾患間、患者間および病態に関わる免疫細胞の不均一性があると考えられている。また臨床現場で用いられている特発性間質性肺炎診断と治療の手引きは主に画像検査および病理所見を元に作成されており、個々の患者毎の遺伝学的特徴や分子病態の違いはその意義が明らかではないことから疾患の評価には用いられていない。

2. 研究の目的

本研究では CTD-ILD の基礎疾患毎の分子病態の特徴を気管支肺泡洗浄液(Bronchoalveolar lavage fluid: BALF)と血液検体のシングルセル RNA-seq により解明する。

近年発展した研究手法であるシングルセル RNA-seq は一細胞毎の全遺伝情報(トランスクリプトーム)を得ることが可能で、この手法により CTD-ILD 患者由来の臨床検体を詳細に解析することで免疫細胞の不均一性および基礎疾患毎の分子病態の特徴を解き明かすことができると期待されるが、CTD-ILD 患者の臨床検体を用いたシングルセル RNA-seq (scRNA-seq)の研究報告はまだない。本研究では肺の免疫学的異常を反映する BALF および全身性の免疫異常を反映する末梢血液検体の scRNA-seq を行うことで各基礎疾患毎の分子病態の特徴および新たな治療標的の発見を目指す。

3. 研究の方法

本研究では CTD-ILD 患者の BALF および血液検体の細胞成分を、マイクロウェルを用いた scRNA-seq の一つである Seq-Well (Gierahn et al, *Nature Methods* 2017)およびフローサイトメトリーにより解析し、BALF の非細胞成分および血清は凍結保存し後に解析する。

- ① PDMS を 3D プリンターで設計した鋳型に注入し 70° C で 2 時間インキュベートし PDMS 製マイクロウェルを作製し、プラズマクリーナーで PDMS の接着性向上処理を行う。
- ② 京都府立医科大学附属病院および京都第一赤十字病院を受診した CTD-ILD 患者に研究内容について説明、同意を得た上で気管支内視鏡下に BALF を採取する。また血液検体を末梢静脈より採取する。BALF および末梢血液検体を遠心分離により細胞成分を分離し、非細胞成分は凍結保存する。細胞懸濁液を mRNA 結合ビーズとともに新技術により開発したマイクロウェルにピペッティングにより分注する。半透膜によりマイクロウェルをシールしたうえで細胞溶解、RNA 抽出、逆転写反応、ハイブリダイゼーションを行う。その後ビーズとともに合成した cDNA を回収し、PCR 増幅、断片化処理を行い scRNA 解析のための DNA ライブラリーを作成する。DNA ライブラリーはバイオアナライザーを用いて品質評価を行った後、次世代シーケンサーによる解析を行う。
- ③ シングルセル RNA 解析により得られた scRNA-seq データをバイオインフォマティクス的手法により CTD-ILD 患者で発現が亢進もしくは減弱している遺伝子を同定し、CTD-ILD のバイオマーカーおよび疾患関連遺伝子、治療標的候補分子の探索を行う。
- ④ ③で発見した CTD-ILD に関連する遺伝子異常およびバイオマーカー候補分子を BALF の細胞成分のフローサイトメトリーおよび②で凍結保存した非細胞成分の組成を解析することでより簡便な特異的マーカーとして臨床応用可能か検討する。

4. 研究成果

- ① PDMS を 3D プリンターで設計したアルミニウム製鋳型（下図）に注入し 70° C で 2 時間インキュベートし、Seq-Well で使用するマイクロウェルを作製した。



- ② 関節リウマチ 5 症例、多発性筋炎・皮膚筋炎 4 症例、シェーグレン症候群 4 症例、全身性強皮症 2 症例および対照群として特発性間質性肺炎 7 症例の合計 22 症例の患者由来 BALF 及び末梢血液検体を収集し、その細胞成分を Seq-Well による scRNA-seq で解析した。

- ③ 200 以上の遺伝子を発現しており、かつ細胞障害の指標であるミトコンドリア関連遺伝子発現は 10%未満である細胞を解析対象とし、合計 76,648 細胞の網羅的遺伝子解析を行った。

血液細胞は 17 のクラスターに分類することができ、2 つのリファレンス遺伝子データセット (Hao et al, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.04.048>, Bassler et al, <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.05.28.121541v1>) を用いてそれぞれのクラスターの細胞アノテーションを行なった (図 1)。血液細胞には好中球、好酸球、CD4 T 細胞、CD8 T 細胞、B 細胞、形質細胞、NK 細胞、古典的単球、非古典的単球などが含まれていた。

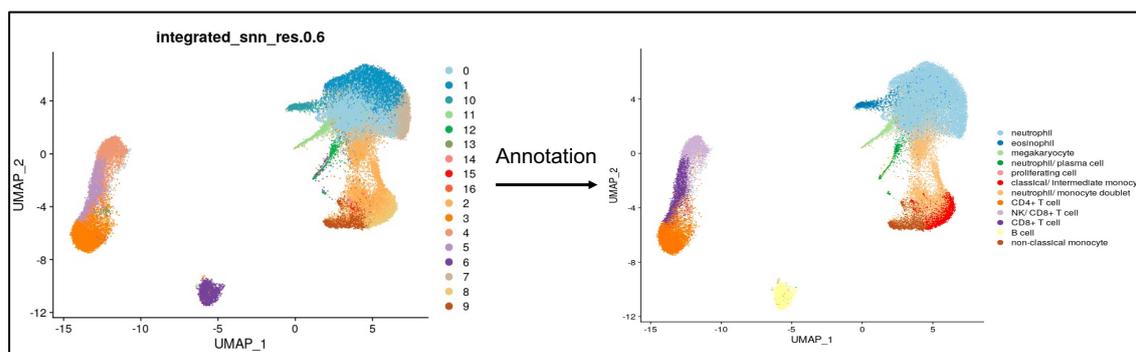


図 1 : 血液細胞のクラスター分類と細胞アノテーション

次に BALF 細胞の解析を行ったところ BALF 細胞は 19 のクラスターに分類され、2 つのリファレンス遺伝子データセット (Travaglini et al, <https://www.nature.com/articles/s41586-020-2922-4>, Bassler et al, <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.05.28.121541v1>) を用いてそれぞれのクラスターの細胞アノテーションを行なった (図 2)。各症例の BALF 細胞には好中球、好酸球、T 細胞、B 細胞、形質細胞、マクロファージ、樹状細胞、マスト細胞などの免疫細胞および少数の気道上皮細胞が含まれていた。

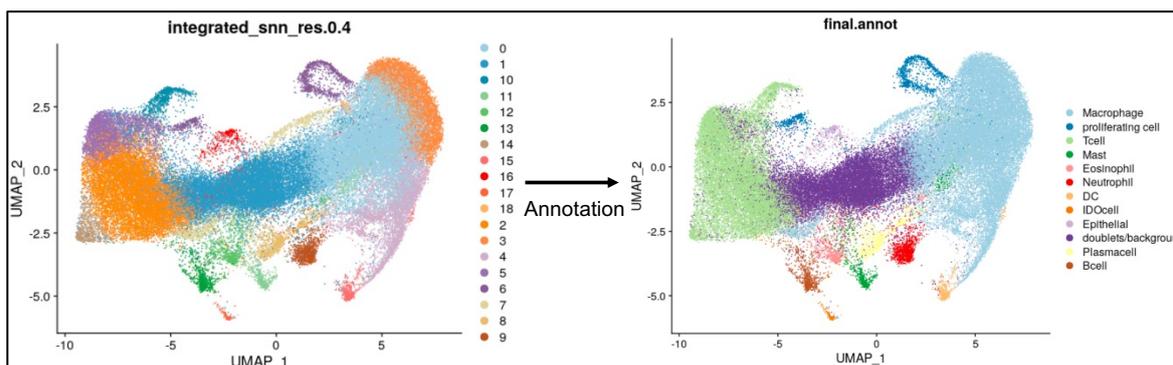


図 2 : BALF 細胞のクラスター分類と細胞アノテーション

さらに各疾患毎の BALF 細胞分布を比較したところ、関節リウマチでは好中球、シェーグレン症候群では T 細胞、B 細胞、全身性強皮症ではマクロファージの分布が多い傾向があった(図 3)。

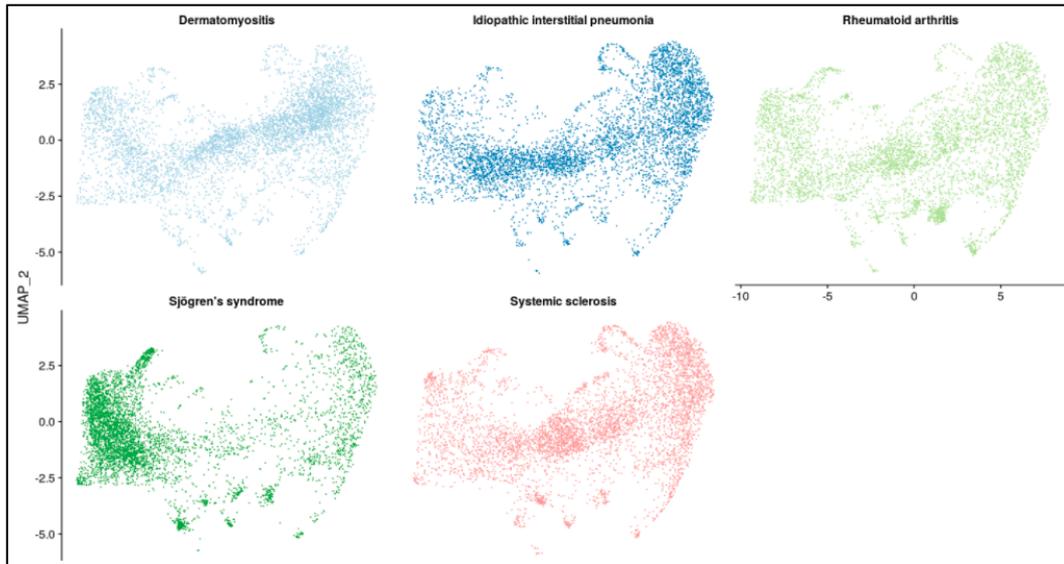


図 3：各疾患における細胞分布の特徴

最後に BALF 中に占める割合が最も多い肺胞マクロファージについて詳細な解析を追加したところ、肺胞マクロファージはさらに 14 のクラスターに再分類することができた(図 4)。

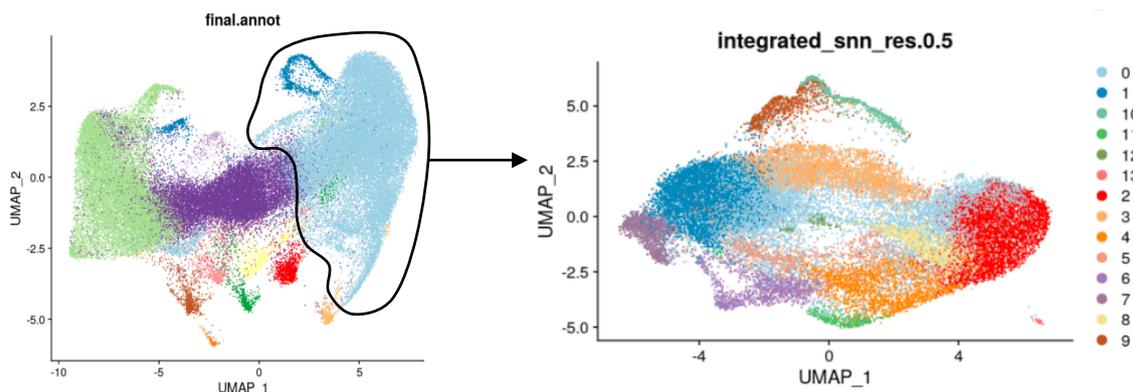


図 4：肺胞マクロファージ亜分画の解析

④ BALF 上清の非細胞成分を ELISA により解析したところ、リンパ球遊走に関与するケモカインである IL-12p40 および CXCL10 がシェーグレン症候群で高い傾向を認めた(図 5)。これらの液性因子の変化が BALF 中リンパ球増加など細胞成分の変化に寄与している可能性がある。

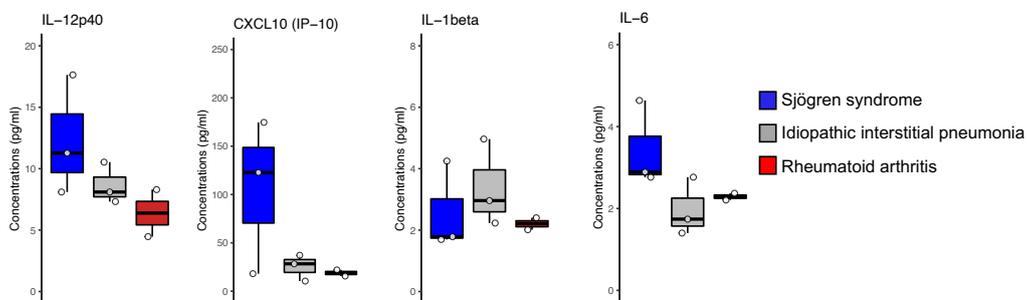


図 5：BALF 上清中のサイトカイン/ケモカイン濃度

これらの実験結果から、CTD-ILD における各疾患毎の BALF 細胞分布の特徴が明らかとなり、これらおよび肺胞マクロファージ亜分画の変化が CTD-ILD の病態に関与している可能性が示唆され、CTD-ILD の病態解明および診断未確定間質性肺炎の原因鑑別への臨床応用が期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Wataru Fujii, Aiko Hirano, Aki Sakashita, Tatsuya Imabayashi, Yoshiko Kaneko, Taisuke Tsuji, Makoto Wada, Masata Kohno, Noriya Hiraoka, Koichi Takayama, Yutaka Kawahito
2. 発表標題 Immune cell landscape of bronchoalveolar lavage fluid from connective tissue disease-associated interstitial pneumonia patients with single-cell RNA sequencing
3. 学会等名 22nd Asia-Pacific League of Associations for Rheumatology Virtual Congress (APLAR) 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Wataru Fujii, Aki Sakashita, Aiko Hirano, Hideaki Sofue, Kazuki Fujioka, Makoto Wada, Masataka Kohno, Yutaka Kawahito
2. 発表標題 Altered cellular phenotypes in bronchoalveolar lavage fluid of connective tissue disease-associated interstitial lung disease with single-cell RNA sequencing
3. 学会等名 第65回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

〔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
---------	---------