

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04235

研究課題名(和文) 新生児消化器疾患発症機序の分子生物学的解明に向けた解析ワークフローの確立

研究課題名(英文) Establishment of an analytical workflow to elucidate the molecular biology of the pathogenesis of gastrointestinal diseases in neonates

研究代表者

田中 裕次郎 (Tanaka, Yujiro)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：90382928

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：手術で切除されたヒト腸管合計71検体に対して、リンパ球を抽出してフローサイトメトリーを行い、腸管リンパ球の分布を調べた。いずれにもILC3を認めたが、その割合は在胎週数、病態で一定しなかった。また、ヒト新生児消化管穿孔について、壊死性腸炎と非壊死性腸穿孔の遺伝子発現を腸管のひとつひとつの細胞にラベリングを行った上で1症例につき約1万個調べ、どの細胞が働いていたかを世界で初めて評価した。壊死群ではT細胞が優位でMYC targets、mTORC1 signaling、TNFA signalingなど炎症に関する経路が有意に高発現しており、非壊死群では単球系細胞が優位であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新生児にとって致死的になりうる壊死性腸炎と、壊死性腸炎ほどに致死的ではない限局性腸穿孔を比べて、ひとつひとつの腸管細胞における遺伝子発現の違いを調べた。結果として、壊死性腸炎では、炎症が起きる際に認める多くの遺伝子発現が明らかに高度だった。この結果について、さらに分析を進めることで、予後不良な新生児壊死性腸炎の原因追及や、予防法、新規治療法の開発に発展させられる可能性がある。これによって命が助かる子供や、その後の人生の不自由が減る子供がでてくると期待している。また、新生児壊死性腸炎は主に低出生体重児の新生児期にのみ起こる疾患であり、ヒト腸管の免疫機能の発達を解明するてがかりになる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Lymphocytes of 71 resected human bowels were examined using flow cytometry. Type 3 innate lymphoid cells (ILC3), which is known to regulate bowel immunity, was detected in all specimens. However, the percentage of ILC3 was not constant according to the condition of patients, e.g. gestational week and disease. Studying the bowel specimens of emergency laparotomy in human neonates, we also investigated the differences in gene expression between necrotizing enteritis and non-necrotic intestinal perforation. We studied the gene expression on a cell-by-cell basis of about 10,000 cells per each case, so we can assess what cells were specifically showing abnormal responses. To date, there have been no reports of gene expression analysis on a cell-by-cell basis. In necrotizing enteritis, T cells were dominant and pathways concerning inflammation, e.g. MYC targets, mTORC1 signaling, TNFA signaling were activated. In non-necrotic intestinal perforation, innate monocytic cells were the major.

研究分野：小児外科学

キーワード：新生児腸管免疫細胞 3型自然リンパ球 壊死性腸炎 Single-cell RNA sequence

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

近年の粘膜免疫研究により、マウスの粘膜組織にはこれまで報告のなかった自然免疫系のリンパ球（自然リンパ球）が数多く存在することが明らかになってきた (Spits, Disanto, Nat. Immunol, 2013)。しかし、ヒト腸管における自然リンパ球の役割に関する知見はまだ極めて限定的である。とくに新生児期は、子宮内の無菌環境で生育した胎児がはじめて大量の微生物に暴露される時期であり、腸管などの粘膜組織は新生児の生体防御の最前線として役割を果たす。この粘膜組織において、獲得免疫に依らない自然免疫系の免疫反応は非常に重要であると予想される。そこで、ヒトの新生児消化器疾患の病態形成に自然免疫系リンパ球が関与しているという仮説を立てた。

## 2. 研究の目的

ヒトの新生児および小児消化器疾患において治療目的で切除されたヒト腸管から、リンパ球などの免疫細胞を採取し、1細胞レベルで単細胞網羅的遺伝子解析を行うことにより、ヒト腸管における免疫細胞の数的・質的特徴を解析し、核細胞ごとに免疫に果たす機能を解明する。また、低出生体重児の新生児期に特徴的な壊死性腸炎における腸管免疫細胞の遺伝子発現に着目することで、ヒト腸管免疫の発達に関する知見を得る。

## 3. 研究の方法

手術を行ったヒト腸管検体を採取し、非上皮性細胞を分離し、10x Chromium システムを用いて scRNA-seq を行った。scRNA-seq 用ソフト *seurat* を用いて細胞の cluster 分類を行い、各細胞群における遺伝子発現の違いを評価した。各細胞群における遺伝子発現は、*avg\_logFC* を用いて Gene set enrichment analysis でパスウェイの発現をみた。

とくにヒト新生児の消化管穿孔について着目した。壊死が広範囲に及び予後不良である壊死性腸炎を壊死群、壊死を伴わない穿孔を非壊死群として、両者の遺伝子発現の差を比較した。

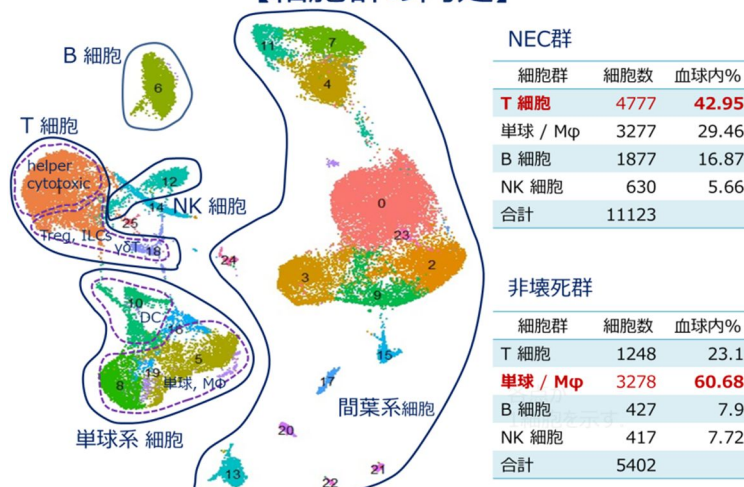
## 4. 研究成果

手術において切除されたヒト腸管合計 71 検体に対して、フローサイトメトリーを行い、腸管リンパ球の分布を調査することができた。ヒト新生児腸管には出生直後より 3 型自然リンパ球と呼ばれる自然免疫系リンパ球が存在し、粘膜防御維持に寄与するサイトカインを発現することが明らかになった。

このうち 14 例については、一細胞ごとにラベリングを行った上で網羅的解析を行い、6 例についてデータを得ることができた。うち 4 例は比較的同時期の新生児小腸検体だったため、新生児壊死性腸炎 2 例とそれ以外の穿孔 2 例に群を分け、single-cell RNA sequence により遺伝子発現を解析した。各検体より 8,295-13,882 細胞の遺伝子発現データが得られた。

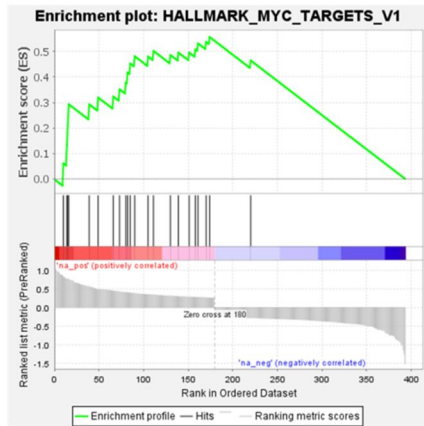
制御性 T 細胞、自然リンパ球等の少数細胞群を含めて、21 の細胞群が同定された。壊死群の T 細胞、B 細胞、NK 細胞、単球、樹状細胞において、炎症性サイトカイン (IL1B、IL6 等) や活性化マーカー (CD69、CD25 等) の発現が有意に増加していた。Gene set enrichment analysis でも、パスウェイとしての炎症反応の亢進も確認された。

### 【細胞群の同定】



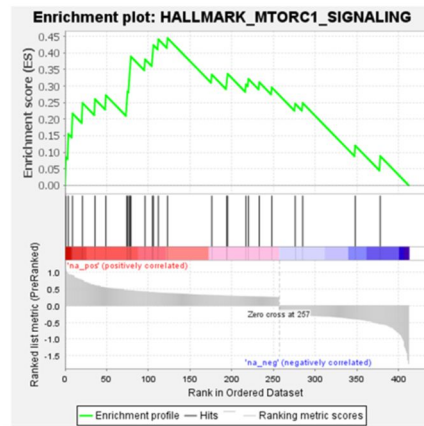
# 【Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)】

T 細胞



HSPD1	LDHA	PABPC1	HSP90B1	RPS10
HSPE1	H2AFZ	TCP1	NPM1	MYC
EIF4G2	KPNA2	CCT3	CBX3	PSMA2
DDX21	IMPDH2	RPS6	PGK1	EIF4A1

単球系 細胞



HSPA5	HSPE1	HSPD1	CACYBP	MTHFD2
ENO1	HSP90B1	XBP1	SDF2L1	PSMA4
LDHA	PGK1	PPA1	ALDOA	ACTR3
UBE2D3				

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大島 一夫, 内田 広夫, 田中 裕次郎, 城田 千代栄, 田井中 貴久, 住田 互, 横田 一樹, 牧田 智, 田中 智子, 谷 有希子, 澤 新一郎, 郷 康広
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

〔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
研究分担者	澤 新一郎  (Sawa Shinichiro)  (80611756)	九州大学・生体防御医学研究所・教授    (17102)	
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	田井中 貴久  (Tainaka Takahisa)  (30378195)	名古屋大学・医学部附属病院・病院講師    (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)	

## 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
研究分担者	住田 互  (Sumida Wataru)  (70437044)	名古屋大学・医学部附属病院・病院講師    (13901)	
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	檜 顕成  (Hinoki Akinari)  (90383257)	名古屋大学・医学系研究科・特任教授    (13901)	