

令和 2 年 11 月 25 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16204

研究課題名(和文) Single-cell RNA-seqによる全身性強皮症の病原的免疫細胞の探索

研究課題名(英文) Single-cell RNA-seq analysis on immune cells of systemic sclerosis

研究代表者

永淵 泰雄 (Nagafuchi, Yasuo)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20792279

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：強皮症単球集団のシングルセルRNA-seq解析を行い、その結果、強皮症患者の単球はシングルセルレベルの発現情報に基づいて細かく分類できることが明らかになった。更に強皮症患者の単球全体を調べる研究データと統合的に解析することで、末梢血中の単球のうち、ごく一部の炎症性の単球亜集団が病態に関わる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

全身性強皮症の病態に単球が関わるのがこれまでも報告されていたが、本研究によって全身性強皮症の病態に関わる可能性のある単球の一部の炎症性細胞集団が同定された。この細胞集団に特徴的に発現している遺伝子の情報は全身性強皮症の新規のバイオマーカーとして診断や患者の層別化に役立つ可能性、また新しい治療薬の開発に結びつく可能性があるものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Single cell RNA-seq analysis was performed on peripheral blood monocytes population of systemic sclerosis patients. Several clusters of monocytes were identified by the result. Integrated analysis with bulk monocyte data from systemic sclerosis patients suggested a subset of inflammatory monocytes have a role in the pathogenesis of systemic sclerosis.

研究分野：膠原病学

キーワード：全身性強皮症 single cell RNA-seq 単球 炎症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

全身性強皮症は、自己抗体産生、炎症、繊維化、血管内皮障害に特徴づけられる原因不明の疾患である。代表的な症状として皮膚硬化の他に、関節炎、間質性肺炎、肺高血圧症、腎障害、消化管障害などがあり全身の臓器に障害を起こす。各臓器障害に対しての対症的な治療や、重篤な障害に対してステロイド剤や免疫抑制剤シクロフォスファミドによる加療が行われているが、治療効果は必ずしも高くない。全身性強皮症の病態において免疫細胞の異常が線維芽細胞の活性化や皮膚硬化と関わると考えられるが、実際の患者免疫細胞における免疫細胞の質的な変化については不明な点が多い。また、既存の全身性強皮症の全身性強皮症患者の末梢血や皮膚サンプルを用いた遺伝子発現解析は病態理解に一定の貢献をしてきたものの、多様な細胞集団の混在したサンプルの平均的な発現を検討したものであり、一細胞レベルでの発現変化については不明であった。

2. 研究の目的

本研究において、これまでも既報から全身性強皮症の炎症、皮膚硬化病態に関わることが示唆されており、実際に全身性強皮症患者の末梢血において特徴的な炎症性の遺伝子発現変化を認めたことから、単球に着目した。単球のシングルセル RNA-seq を行うことで一細胞レベルでの発現変化を解析し、単球集団のさらにその一部の強皮症病態と関連した細胞集団を同定し、その細胞集団に特徴的に発現している治療標的候補遺伝子についても網羅的に探索を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

まず、再現性、網羅性の高いシングルセル RNA-seq の解析系の検討を行った。Smart-seq v4 を用いて、CD4 陽性 T 細胞 single cell の mRNA の cDNA、ライブラリーを作成し、Miseq でシーケンシングを行った。結果、既報に合致した遺伝子数の網羅的な発現解析ができることを確認した。また、それぞれの single cell の T 細胞受容体配列を同定することで、発現内容が single cell 由来であることを証明した。しかしながら Smart-seq v4 による解析では、同時に解析出来る細胞数の限界から、細胞集団中の少数サブセットの同定や比較検討が困難であった。そのため、最終的に約 1600 細胞の single cell のトランスクリプトーム解析が可能な ICELL8 を本研究のプラットフォームとして選択した。

細胞回収条件、保存条件の最適化を行ったのち抗 Scl-70 抗体陽性、全身性強皮症患者 3 名を対象に単球集団のシングルセル RNA-seq 解析を行った。1 細胞分離され、生細胞染色による生存細胞を解析対象とした。3' RNA-seq での cDNA ライブラリ調整を実施し、HiSeq 2500 でシーケンスを行った。cutadapt でリードの QC を実施し、ヒトゲノム (GRCh38) に STAR でマッピングを実施した。発現データの正規化を実施し、k-nearest neighbor 法に基づいたクラスター検出と t-SNE によるデータの可視化を行った。各クラスターで他のクラスターに比して発現が高い遺伝子の Z-score の平均をクラスターシグニチャーと定義し、バルク解析データとの対応の検討を行った。

4. 研究成果

強皮症単球はシングルセルレベルの発現情報に基づいて亜集団に分類できることが明らかになった。更に、うち一つの単球亜集団は、全身性強皮症患者単球のバルク解析において、発現差解析、ネットワーク解析の一つである WGCNA 解析によって同定された炎症性の遺伝子群を特徴的に発現していた。つまり、バルク解析において強皮症患者の単球に認める炎症性の発現変化の一部は、共通した遺伝子発現制御機構を有する遺伝子ネットワーク (パスウェイ) を形成しており、末梢血の単球のうち、ごく一部の炎症性の単球亜集団によって生じていることが示唆された。同細胞は全身性強皮症肺病変局所で報告されている単球集団にも類似していた。またこれらの遺伝子の一部はすでに全身性強皮症や線維化における役割が知られているものが含まれており、本解析の妥当性を示すものと考えられた。シングルセル RNA-seq によって同定されたこの炎症性の単球亜集団は、全身性強皮症の病態に関わる可能性があり、特徴的な発現遺伝子群は全身性強皮症の病態に関わる新規のバイオマーカーや治療標的となる可能性があるものと考えられた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1: Kobayashi S, Nagafuchi Y, Okubo M, Sugimori Y, Shirai H, Hatano H, Junko M, Yanaoka H, Takeshima Y, Ota M, Iwasaki Y, Sumitomo S, Okamura T, Yamamoto K, Shoda H, Fujio K. Integrated bulk and single-cell RNA-sequencing identified disease-relevant monocytes and a gene network module underlying systemic sclerosis. J Autoimmun. 2020 Oct 7:102547. doi: 10.1016/j.jaut.2020.102547. Epub ahead of print. PMID: 33039247.

2: Nagafuchi Y, Shoda H, Fujio K. Immune Profiling and Precision Medicine in Systemic Lupus Erythematosus. Cells. 2019 Feb 10;8(2). pii: E140. doi: 10.3390/cells8020140. Review. PubMed PMID: 30744169; PubMed Central PMCID: PMC6406577.

3: Sumitomo S, Nagafuchi Y, Tsuchida Y, Tsuchiya H, Ota M, Ishigaki K, Suzuki A, Kochi Y, Fujio K, Yamamoto K. Transcriptome analysis of peripheral blood from patients with rheumatoid arthritis: a systematic review. Inflamm Regen. 2018 Nov 5;38:21. doi: 10.1186/s41232-018-0078-5. eCollection 2018. Review. PubMed PMID: 30410636; PubMed Central PMCID: PMC6217768.

〔学会発表〕(計 3 件)

1 . 発表者名

小林 聖未(東京大学 大学院医学系研究科アレルギー・リウマチ内科), 永淵 泰雄, 庄田 宏文, 大久保 麻衣, 杉森 祐介, 白井 晴己, 波多野 裕明, 前田 淳子, 竹島 雄介, 太田 峰人, 岩崎 由希子, 住友 秀次, 岡村 僚久, 山本 一彦, 藤尾 圭志

2 . 発表標題

全身性強皮症の免疫細胞トランスクリプトームによる病態関連因子の探索

3 . 学会名等

日本臨床免疫学会総会

4 . 発表年

2018年

1 . 発表者名

Satomi Kobayashi , Yasuo Nagafuchi , Hirofumi Shoda , Mai Okubo , Yusuke Sugimori , Mineto Ohta , Yusuke Takeshima , Yukiko Iwasaki , Shuji Sumitomo , Tomohisa Okamura , Kazuhiko Yamamoto , Keishi Fujio

2 . 発表標題

Integrated bulk and single-cell RNA-sequencing identified disease relevant monocyte subset and key driver inflammatory gene module of systemic sclerosis

3 . 学会名等

日本リウマチ学会総会

4 . 発表年

2019年

1 . 発表者名

小林 聖未(東京大学 大学院医学系研究科アレルギー・リウマチ内科), 永淵 泰雄, 庄田 宏文, 大久保 麻衣, 杉森 祐介, 白井 晴己, 波多野 裕明, 前田 淳子, 竹島 雄介, 太田 峰人, 岩崎 由

希子, 住友 秀次, 岡村 僚久, 山本 一彦, 藤尾 圭志

2 . 発表標題

全身性強皮症患者に特徴的な炎症性単球サブセットとドライバー遺伝子群の同定

3 . 学会名等

日本臨床免疫学会総会

4 . 発表年

2019年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ

<http://ryumachi.umin.jp/>

NBDC ヒトデータベース(シングルセル RNA-seq データ公開)

<https://humandbs.biosciencedbc.jp/hum0218-v1>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

該当なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：小林聖未

ローマ字氏名：Satomi Kobayashi

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。