

令和 5 年 10 月 25 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17000

研究課題名(和文) 腸管の免疫細胞応答における腹腔鏡手術の低侵襲性の評価

研究課題名(英文) Evaluation of the minimally invasiveness of laparoscopic surgery focusing on immune cell responses in the intestine

研究代表者

大島 一夫(Oshima, Kazuo)

名古屋大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：20764880

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)：最終的にヒト新生児における緊急開腹手術において、炎症が強い疾患(壊死性腸炎)と強くない疾患(限局性腸穿孔など)では遺伝子発現にどういった差があるかを調べることができた。遺伝子発現については、腸管のひとつひとつの細胞について1症例につき約1万個調べたので、異常な反応を示しているものが具体的に何の細胞だったのかを評価することができる。これまでこのような遺伝子発現解析を細胞ごとに調べた報告はない。この研究がさらに進むことによって、壊死性腸炎などの予防や新規治療を開発できる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新生児にとって致命的になりうる壊死性腸炎と、炎症が壊死性腸炎ほどには高度ではない限局性腸穿孔などで、遺伝子発現の違いをひとつひとつの腸管細胞について調べた。結果としては、炎症の強い壊死性腸炎では、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。

研究成果の概要(英文)：During emergency laparotomy in human neonates, we were able to investigate the differences in gene expression between diseases with strong inflammation (necrotizing enteritis) and those without strong inflammation (such as localized bowel perforation). In terms of gene expression, we looked at about 10,000 cells per case in each of the intestinal tracts, so we can assess what cells specifically were showing abnormal responses. To date, there have been no reports of such gene expression analysis on a cell-by-cell basis. Further research could lead to the development of novel treatments and prevention of diseases such as necrotizing enteritis.

研究分野：小児外科

キーワード：新生児壊死性腸炎 腸管免疫細胞 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

外科手術はこれまで、傷部を大きく切開し、手術を行う開放手術が主流であった。一方、小児に対する内視鏡手術は 1990 年代に導入されてから、ほとんどの疾患 に対して行われるようになってきた。これは正常な組織に与えるダメージが開放手術と比較して極めて少なく、そのために手術に伴う生体への侵襲が軽減できると信じられているからである。

一方で今まで手術の低侵襲性に関してはサイトカインレベルでの解析が一部で行われてきている程度である。例えば、内視鏡手術では TNF- α 、IL-1、IL-6、IL-10 等の発現に差があることが示されているが、免疫反応を分子レベルで解明されてきてはいない。手術の低侵襲性を分子レベルの見地で解明することは、更なる低侵襲手術法の開発や、手術侵襲を仲介する分子群の同定につながり、新規治療薬の開発も期待できる。

2. 研究の目的

低侵襲な手術は、臨床的には疼痛軽減、早期の社会復帰、高い整容性、並びに術後癒着の減少等の利点がある。しかし、この低侵襲性を説明する分子生物学的な機構は解明されていない。手術後侵襲では炎症性サイトカインの関与が報告されてきた。本研究では、炎症性サイトカイン量を規定する免疫応答、特に迅速な応答を特徴とする自然免疫応答に注目し、手術侵襲における自然免疫応答を検討する。本研究は低侵襲性手術に対する生物学的基盤の解明に繋がり、患者 QOL の改善に大きく貢献できる。

3. 研究の方法

手術を行った腸管検体を採取し、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。

なお、最終的には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。

新生児期に消化管穿孔をきたした症例に対して、穿孔部周囲に広範囲の壊死を認め NEC と診断したものを NEC 群、穿孔部周囲に壊死を伴わない穿孔を non-NEC 群とした。穿孔部を含む切除腸管の粘膜固有層から単核球を分離し、Chromium 10x Genomics および Illumina HiSeq4000 を用いて scRNA-seq を行った。統計ソフト R と scRNA-seq 用パッケージ (*Seurat*, *SingleR*, *Monocle3*) を用いて細胞の cluster 分類を行い、Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) を用いて 2 群間の遺伝子発現を比較した。名古屋大学医学部生命倫理審査委員会における承認のもとで行った。

4. 研究成果

新生児消化管穿孔 4 例 (NEC 群 2 例、non-NEC 群 2 例: 限局性腸穿孔 1 例、胎便栓による特発性穿孔 1 例) 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。全例にて、T 細胞 (15.1-47.7%)、B 細胞 (3.1-19.0%)、単球 (16.5-31.2%)、マクロファージ (1.6-17.4%)、樹状細胞 (2.4-12.2%)、ナチュラルキラー細胞 (7.5-12.8%) といった主要な免疫細胞の種類を認め、それらは新生児臍帯血と概ね同じ割合であった (図 1)。マーカー遺伝子の発現に基づき免疫細胞のサブセットを同定すると、1 型ヘルパー T (Th1) 細胞への偏りなど、細胞性免疫反応による炎症が見られた。GSEA により、NEC 群では MTOR、TNF- α 、MYC シグナル伝達経路に含まれる遺伝子が多く発現しており、NEC 群で炎症や細胞増殖に関連する免疫応答が upregulate されていることが示唆された (図 2)。

結論として、scRNA-seq 解析により、NEC 患者の腸管免疫細胞では、Th1 細胞に偏ったより強い炎症反応を認めた。今後、scRNA-seq を用いてより多くの症例や免疫細胞以外の細胞の解析が進めば、NEC の病態の理解が深まる可能性があり、本研究はそのためのよい preliminary research として評価できる。

なお、同結果については Single-cell RNA sequencing of intestinal immune cells in neonatal necrotizing enterocolitis. (*Pediatric Surgery International*. 2023 Apr 11;39(1):179. doi: 10.1007/s00383-023-05461-7.) として報告済である。

図 1. 新生児消化管穿孔例における腸管免疫細胞の細胞群同定結果

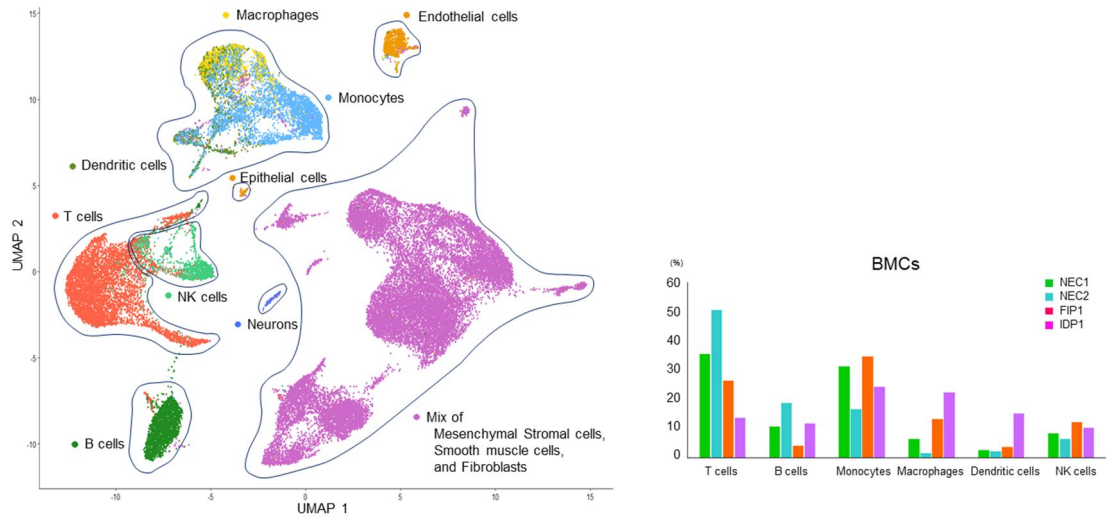
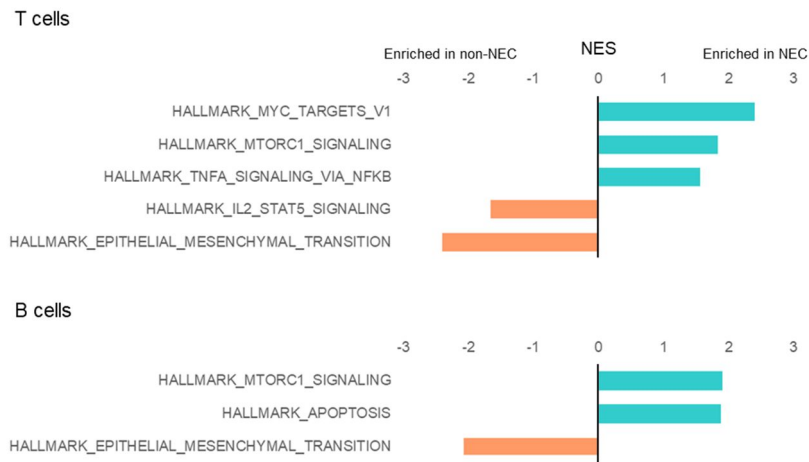


図 2. 新生児消化管穿孔例における免疫応答の GSEA を用いた NEC 群と non-NEC 群の比較結果



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 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Oshima Kazuo, Hinoki Akinari, Uchida Hiroo, Tanaka Yujiro, Okuno Yusuke, Go Yasuhiro, Shirota Chiyoe, Tainaka Takahisa, Sumida Wataru, Yokota Kazuki, Makita Satoshi, Takimoto Aitaro, Kano Yoko, Sawa Shinichiro	4. 巻 39
2. 論文標題 Single-cell RNA sequencing of intestinal immune cells in neonatal necrotizing enterocolitis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Pediatric Surgery International	6. 最初と最後の頁 179
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00383-023-05461-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 大島一夫
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

1. 発表者名 大島一夫
2. 発表標題 新生児壊死性腸炎の病態形成に関わる 腸管免疫細胞のsingle-cell RNA sequencing
3. 学会等名 第58回日本小児外科学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kazuo Oshima
2. 発表標題 Single-cell RNA sequencing of intestinal immune cells in neonatal necrotizing enterocolitis
3. 学会等名 The 35th International Symposium on Pediatric Surgical Research (国際学会)
4. 発表年 2022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
研究協力者	澤 新一郎 (Sawa Shinichiro)		
研究協力者	郷 康広 (Go Yasuhiro)		

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
---------	---------