

令和 3 年 5 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15812

研究課題名(和文)炎症性腸疾患の新規バイオマーカーの探索と個別化医療への応用

研究課題名(英文)Deep profiling of adaptive immune cells in inflammatory bowel disease

研究代表者

村上 真理 (Mari, Murakami)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：10801293

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)：本研究では治療抵抗性の炎症性腸疾患の腸管T細胞を解析し、病態に寄与するT細胞を同定した。マスサイトメトリーとシングルセルRNA-seq解析により、炎症性腸疾患において増加するT細胞サブセットの遺伝的特徴を明らかにした。潰瘍性大腸炎では循環型のナイーブT細胞が増加するのに対し、クローン病においては組織局在性の自然免疫細胞様の遺伝学的特徴を持つT細胞が増加していた。さらにこの細胞は病変部位に集積し、炎症性サイトカインを分泌することから病態を惹起するT細胞であると考えられた。以上のように、複雑に絡み合う腸管免疫の中で炎症性腸疾患の病態形成に関与する獲得免疫細胞を同定し、特性を明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

炎症性腸疾患では病変局所において疾患特異的な免疫細胞が局在し、病態の形成に関与していると考えられる。したがって、疾患特異的な免疫細胞を同定し、その機能解析を行うことにより、病態や治療標的が明らかにできる可能性がある。本研究において、我々は炎症性腸疾患において増加し、病態に関与するT細胞とその遺伝学的特徴を明らかにすることができた。さらに、そのT細胞を介する炎症のシグナル経路や、臨床所見との関連性を明らかにできたことから、学術的意義は大きく、今後の治療標的の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：T cells differentiate into highly diverse subsets and display plasticity depending on the unique environment. Here, we identify the T cell subsets predominantly expanded in each subtype of Inflammatory bowel disease (IBD). Mass cytometry analysis in IBD patients reveals that Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC) are characterized by the distinct patterns of T cell profiles: CD-predominant subcluster shows tissue-resident effector memory phenotype, while UC are predominated by recirculating lymphocytes with naive phenotype and follicular helper T cells. Subsequent profiling by single cell RNA-sequencing analysis reveals that CD-predominant T cell subset displays transcriptional signatures of natural cytotoxicity as well as effector activities at a single cell level. The imbalance between the key transcriptional programs which regulate differentiation toward specific T cell lineages underlies the distinct phenotype of CD and UC.

研究分野：免疫学、小児科学、代謝学

キーワード：炎症性腸疾患

1. 研究開始当初の背景

(1) これまでの研究で我々は炎症性腸疾患 (IBD) の腸管粘膜固有層の抗原提示細胞が病態に応じて多様な機能を呈することを明らかにしており、IBD 腸管環境下での獲得免疫細胞の特性を明らかにすることが次の重要な課題であった。

(2) 近年のめざましい科学技術の発展により、シングルセルレベルで網羅的あるいは半網羅的に細胞の蛋白質および遺伝子発現を調べることが可能となったことから、従来の方法では検出できなかった細胞特性を明らかにできる可能性が広がってきた。

(3) IBD は様々な疾患感受性の遺伝子素因を背景に環境因子が加わって発症する疾患であり、患者間で異なる病態を呈する。また、多因子疾患であるため、適当な動物モデルが存在しない。そのため、IBD の正確な病態の把握にはヒト検体の解析と層別化が不可欠である。

2. 研究の目的

(1) 内科的治療に不応の IBD の病態に寄与する獲得免疫細胞を同定し、その細胞特性を明らかにすることによって新たな分子標的を探索する。

(2) 個々の IBD の病態において起こっている事象を単一細胞レベルで検出し、患者を層別化しうる新しいバイオマーカーを創出する。

3. 研究の方法

(1) IBD に特異的な T 細胞サブセットの同定

IBD と大腸がん正常粘膜部位の腸管切除検体の粘膜固有層より酵素処理法を用いて単核球を単離し、解析に用いる。26 種の金属で標識された細胞表面マーカー抗体を用いて、マスサイトメトリーを施行し、クローン病 (CD : 23 例) と潰瘍性大腸炎 (UC : 23 例) それぞれに特異的に増殖する T 細胞サブセットを同定した。コントロールとして大腸がんの腸管正常粘膜部位 (23 例) を使用した。

(2) IBD に特異的な T 細胞サブセットの遺伝学的特性および生物学的特徴の解明

単離した単核球よりセルソーターにて T 細胞を分取し、シングルセル遺伝子発現解析 (scRNA-Seq) を行った。また、上記で同定した疾患特異的な T 細胞サブセットを規定する細胞表面マーカーに対する抗体にオリゴヌクレオチドを付加することによって、蛋白質発現の情報も取得し、IBD で特異的に増加する T 細胞の遺伝学的特性を明らかにした。さらに、(1) にて明らかにした細胞表面マーカーセットを用いて IBD 特異的な T 細胞の炎症性サイトカインの分泌能を調べた。

(3) 患者の臨床像と疾患特異的に増加する T 細胞数の相関

生検サンプルを用い、疾患特異的な T 細胞が T 細胞全体に占める割合と患者の臨床スコアの相関を調べた。さらに同一患者間における炎症部と非炎症部の疾患特異的な T 細胞の割合を調べた。

4. 研究成果

(1) マスサイトメトリーを用いた解析により、大腸粘膜固有層において、CD と UC そしてコントロールの T 細胞サブセットの構成には大きな違いがあり、CD と UC それぞれにおいて疾患特異的に増加する T 細胞サブセットが存在することが明らかになった (図 1)。

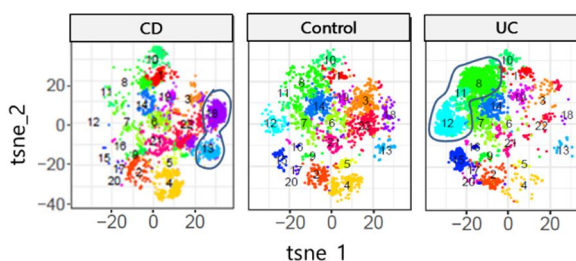


図 1. マスサイトメトリーによる T 細胞クラスター解析

CD 腸管に優勢の T 細胞サブセットは

組織局在性のエフェクターメモリーフェノタイプを示す一方、UC 腸管に優勢のサブセットは、濾胞性ヘルパーT 細胞と循環型のナイーブフェノタイプを示した。CD 優勢のサブセットについては CD 患者の中でも著しく増加するグループ(39%)と増加しないグループ(61%)に層別化された。

(2)これらのT細胞サブセットの遺伝的特性を解明するため、腸管粘膜固有層のT細胞のscRNA-seqを行ったところ、マスマイトメトリーにて検出された疾患特異的T細胞の細胞表面マーカーの組み合わせに合致するクラスターがscRNA-seqにおいても優勢に増加していた(図2A Cluster4)。CDに優勢のT細胞

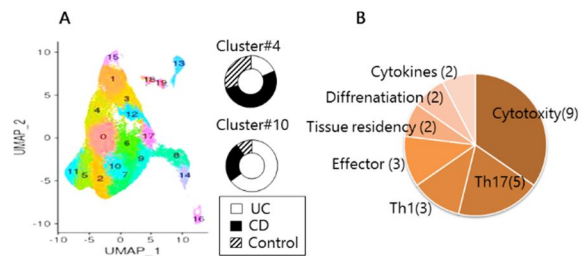


図2. シングルセル RNA-seq による発現遺伝子解析

は、その遺伝子の特徴から、組織局在性の特徴を備えるとともにヘルパーT細胞様のエフェクター作用のほか、自然免疫細胞様の特徴を備えていた(図2B)。また、この細胞表面マーカーセットで分取されたCD4陽性T細胞のTCR鎖の解析を行うと既知の非在来性T細胞のTCR鎖とのオーバーラップがほとんどなく、細胞障害性のCD4陽性T細胞の一種であることが明らかになった。同様に、UCではナイーブT細胞に相当するCluster10が増加していた。

(3)これらのサブセットの生物学的特徴を調べるため、CDの腸管で優勢に増加しているCD4陽性T細胞サブセットについてサイトカイン分泌能を調べた。この細胞ではTCR刺激なしにて12-16時間のサイトカイン刺激のみでもIFN- γ やグランザイムなどの炎症性および細胞傷害性物質の分泌が認められた(図3)。また、この特徴は他のCD4陽性T細胞と比較しても顕著であった。以上の結果から、scRNA-seqで示唆された遺伝的特徴と合致して自然免疫様の特性を持つことが明らかになった。

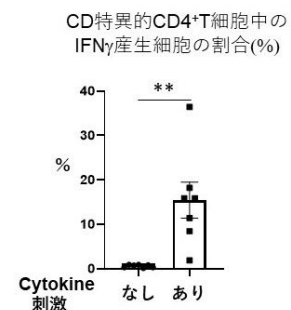


図3. CD優勢のCD4優勢T細胞のTCR非依存性のサイトカイン分泌能

(4)CDにて加療経過観察中の患者の大腸内視鏡検査において、同一人物より内視鏡的に炎症部、非炎症部を採取し、それぞれCD4陽性T細胞全体の中でCD優勢T細胞サブセットの占める割合を調べたところ、CD優勢T細胞サブセットは炎症部において非炎症部よりも多く認められた(図4)。今後、さらにサンプル数を集積しての解析が必要であるが、CD腸管に優勢のCD4陽性T細胞の割合と炎症のグレードとの正の相関が示唆された。

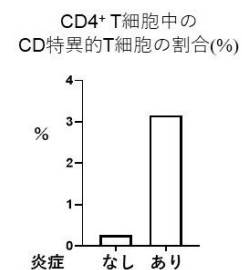


図4. 炎症部非炎症部におけるCD優勢T細胞の割合

多数のヒト検体を網羅的に解析した本研究により、炎症性腸疾患の炎症局所における獲得免疫機構の全貌が見えてきた。すなわち、CDとUCの獲得免疫機構は異なる全貌を呈し、従来提唱されてきたIBDのTh1/Th2パラダイム以上の複雑性を持ち、またそれぞれが相互背反的な分化の方向性を持つT細胞系譜への偏りを呈する。CDにおいては、定常状態において小腸により多く局在するT細胞が炎症大腸で増加し、小腸や回盲部に好発するCDの解剖学的特徴を裏付ける結果であった。本研究はIBD、特にCDの病原性T細胞の特性を解明したものである。今後はこの細胞の炎症特性を抑制するメカニズムを明らかにすることによって、CDの中でもこのT細胞比率の高い患者を対象とした治療法を確立することができると考えられる。

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 Mari Murakami, Paola Tognini	4. 巻 469(9)
2. 論文標題 The Circadian Clock as an Essential Molecular Link Between Host Physiology and Microorganisms	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcimb.2019.00469	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2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 村上真理
2. 発表標題 栄養と腸内フローラ
3. 学会等名 第46回日本小児栄養消化器肝臓学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村上真理、横井健人、竹田潔
2. 発表標題 ヒト炎症性腸疾患に關与する免疫担当細胞の同定
3. 学会等名 第46回日本小児栄養消化器肝臓学会学術集会
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
---------------------------	-----------------------	----

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