

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03696

研究課題名(和文) アレルゲン免疫療法のシングルセルおよびbulk遺伝子発現情報による病態解明

研究課題名(英文) Identifying the mechanism of allergen immunotherapy using single cell and bulk gene expression information.

研究代表者

野口 恵美子 (Noguchi, Emiko)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：40344882

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：近年可能となった単一細胞網羅的遺伝子発現解析(single-cell RNA-seq, 以下scRNAseq)により、ターゲットとなる分子について事前に情報がなくとも、CD4陽性T細胞、制御性T細胞、NK細胞、B細胞等の細胞種を推定し、個々の細胞の網羅的遺伝子発現について測定することが可能となっている。本研究ではスギ抗原に対する舌下免疫療法施行患者に対して、治療開始前、治療開始後の末梢血単核球のscRNAseqを実施し、治療反応性に関連する細胞種と遺伝子発現について検討した。治療前後の比較において、治療著効例で発現量が増加する遺伝子を複数検出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アレルゲン免疫療法は根治が期待できる治療法として近年特に注目されている。本研究は治療応答にかかわる遺伝子やパスウェイを同定するためにscRNA-seqの手法を用いて解析を行った。本研究成果は、アレルゲン免疫療法がなぜ効果的であるかについての分子学的なメカニズム解明につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Single-cell RNA-seq (scRNAseq) has made it possible to estimate cell types such as CD4-positive T cells, regulatory T cells, NK cells, and B cells, and to measure the comprehensive gene expression of individual cells without prior information on the target molecules. The present study was conducted to investigate the effect of cedar antigens on the gene expression of cedar cells. In this study, scRNAseq of peripheral blood mononuclear cells was performed on patients treated with sublingual immunotherapy against Japanese cedar pollen before and after the start of treatment, and cell types and gene expression related to treatment response were examined. In the comparison of pre- and post-treatment, we detected several genes whose expression levels were statistically significantly changed in response to treatment.

研究分野：アレルギー

キーワード：シングルセル 花粉症 免疫療法

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

アレルギー疾患発症には多くの遺伝子が関与しているが、様々な細胞種にどのような遺伝子が発現しているのかについての全容は十分解明されていなかった。個々の細胞をシングルセルレベルで解析するには主にフローサイトメトリーが用いられ、どの表面抗原が細胞に発現しているのかによって細胞の分類が行われている。しかし、この方法ではあらかじめターゲットとなる分子が既知であることが必須である。Single-cell RNA-seq は 2009 年に Tang らによる 1 細胞を対象とした RNA-seq 手法の報告後、最近では 1 万から 10 万細胞を解析できるように技術改良されている。シングルセルレベルの網羅的遺伝子発現解析により、ターゲットとなる分子について事前に情報がなくとも、どの遺伝子が、どの性質の細胞に発現しているのかについての情報を得られるとともに、今まで知られていない未知の細胞についても同定できる可能性がある。

### 2. 研究の目的

近年急速に解析技術が進歩したシングルセル RNA-Seq の解析手法を用いて、アレルギー免疫療法治療応答と関連する遺伝子群や細胞種類を明らかにする。

### 3. 研究の方法

対象はスギ花粉症のために舌下免疫療法を施行された 7 例で、4 例が著効例、3 例が不応例である。治療開始前と開始後 1 年の末梢血から分離された単核球 (PBMC) を使用して、10x Genomics 社の Chromium Single Cell 5' Library Construction Kit を用いたライブラリ作成を行い、シーケンスを実施した。得られたシーケンスデータは Cell Ranger version 7 (10x Genomics) によるマッピングを行い、Seurat (Hao et al., Cell 2021, <https://satijalab.org/seurat/>) を用いて、遺伝子発現量が低い遺伝子およびミトコンドリア遺伝子の割合が高い遺伝子のフィルタリング、遺伝子発現量の正規化、クラスタリングを実施した。さらに Azimuth (<https://azimuth.hubmapconsortium.org/>) による細胞種類推定も併せて実施した。サンプルの quality check のためのソフトウェアとして、ダブルレットを特定する DoubletFinder (McGinnis et al., Cell Systems, 2019) を使用した。

### 4. 研究成果

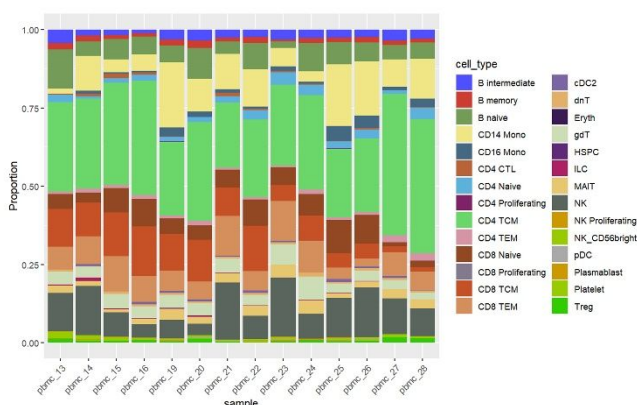


図 1 Azimuthにより推定された細胞種

Sample	治療応答	採取時期
pbmc_13	Non Responder	治療前
pbmc_14	Non Responder	治療後
pbmc_15	Responder	治療前
pbmc_16	Responder	治療後
pbmc_19	Responder	治療前
pbmc_20	Responder	治療後
pbmc_21	Responder	治療前
pbmc_22	Responder	治療後
pbmc_23	Responder	治療前
pbmc_24	Responder	治療後
pbmc_25	Non Responder	治療前
pbmc_26	Non Responder	治療後
pbmc_27	Non Responder	治療前
pbmc_28	Non Responder	治療後

図1に Azimuth により推定された細胞種とサンプル情報を示す。これらの Azimuth による分類は Seurat によるクラスター分類とおおむね一致していた。図2に治療応答性および治療前後で分類した PBMC のクラスタリングを示す。

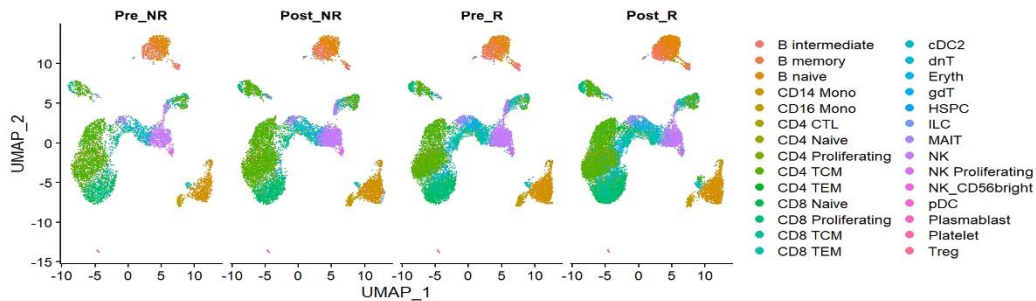


図2 治療応答性および治療前後で分類したPBMCのクラスタリング (UMAP)  
 Pre\_NR 治療前Non Responder、Post\_NR 治療後Non Responder  
 Pre\_R 治療前 Responder、Post\_R 治療後 Responder

次に、治療後のサンプルのみを使用してそれぞれの細胞分画において、Responder と Non Responder で発現量の増減がある遺伝子を検出した。最も強く発現の差異が検出された遺伝子は *RPS26* であり、これはどの細胞種においても共通して発現差が認められた。しかし、強い個人差が認められたため (図3)、免疫細胞の遺伝子発現データベースである ImmuneXUT (Ota et al., Cell, 2021, <https://www.immunexut.org/>) を用いて検討したところ、*RPS26* には遺伝子発現量に強い影響をあたえるバリエントが存在していると考えられたため、Responder と Non Responder で検出された *RPS26* 遺伝子の発現量の差異は主に解析対象者が有するバリエントに影響を受けている可能性が高いと考えている。

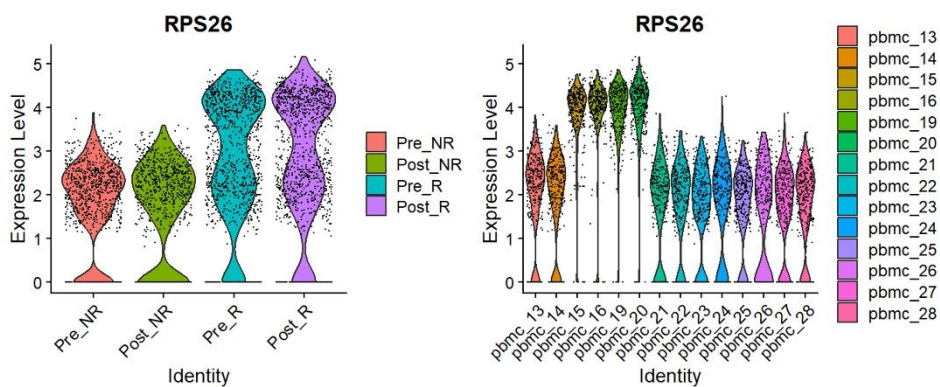


図3 *RPS26* の遺伝子発現  
 左図 治療応答と治療時期により分類、右図 サンプルによる分類を示す

さらに治療前後の遺伝子発現の変化を Responder と Non Responder について、細胞種類ごとに検討を行った。

その結果、T細胞の特定のサブセットにおいては複数の遺伝子が Responder において治療後に遺伝子発現量の増加していることを検出した (FDR  $q < 0.05$ ) が、Non Responder においてはその

ような変化は認められなかった。*NFKB1A*については、Responder と Non Responder に共通して特定の細胞分画において遺伝子発現量が治療後に低下していた。

Responder において治療後に遺伝子発現量の増加していた遺伝子の一部は MAP キナーゼシグナル伝達経路にかかわる遺伝子であり、既報においてもこの遺伝子が小児ぜんそく患者においてその遺伝子発現が低下することが報告されている。

本研究の結果は、アレルギー舌下免疫療法治療応答性に MAP キナーゼ関連のシグナル伝達が関与している可能性を示唆している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	尾崎 遼  (Ozaki Haruka)  (10743346)	筑波大学・医学医療系・准教授    (12102)	
研究分担者	渋谷 彰  (Shibuya Akira)  (80216027)	筑波大学・医学医療系・教授    (12102)	

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