慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	1細胞遺伝子発現解析法を用いた腸炎惹起性Th17細胞の同定と新規治療方法の開発
Sub Title	Identification of colitogenic Th17 cells using scRNA-seq analysis and development of novel therapeutic strategies for IBD
Author	三上, 洋平(Mikami, Yohei)
Publisher	慶應義塾大学
Publication year	2021
Jtitle	学事振興資金研究成果実績報告書 (2020.)
JaLC DOI	
Abstract	炎症性腸疾患(IBD)は、原因不明の慢性的な経過をたどる腸管の難治性炎症性疾患であり、抗TNF療法を初めとした分子標的療法の開発により治療成績が向上した現在においても、未だ根治療法は存在せず、根治的治療法の開発は急務である。抗TNF療法の重要なターゲットの1つであるT helper(Th)細胞のうち、転写因子RORγtを発現しIL-17を産生するTh17細胞は、腸管に特に豊富に存在することが知られているが、その病態への関与については不明な点が多い。腸管Th17細胞の詳細な機能解析から腸炎の新規発症メカニズムを解き明かすために、マウス腸管Th17細胞を1細胞遺伝子発現解析法 (scRNA-seq)を用いて解析し、炎症惹起性Th17細胞特異的に発現する遺伝子群を追求し、新たな炎症性腸疾患治療ターゲットの探求を目指すために、本研究を実施した。 具体的には、マウス小腸および大腸腸管粘膜固有層より白血球を抽出し、Flowcytometry (FACS ARIA, BD bioscience)によりTCR-beta+ CD4+分画(Th細胞分画)を単離した。得られたTh細胞を用いて、約10000個の細胞をターゲットとして、Chromium system(10x Genomics)を用いて、細胞ごとにRNA抽出、cDNA合成を行い、scRNA-seqのライブラリ作成を行った。ライブラリのシーケンスを行い、Cell Rangerパイプライン(10x Genomics)を用いてsequence後のunbiasedに解析を行い、腸管内Th細胞を遺伝子発現パターンの類似するグループごとに分類したところ、Th17細胞は５種類のサブクラスターに分類されることが明らかとなった。注目すべきことに、Th17細胞には、IL-10やFoxp3を発現する炎症抑制性遺伝子を発現するクラスターとIFN-gなどTh1細胞に特徴的な遺伝子を発現するクラスター、そして、IL-17を専門的に発現するクラスターが存在することが明らかとなり、今後これらのグループ間で異なる発現パターンの遺伝子を抽出し、各グループの特性評価を行うことで、既存の知識にとらわれない新規Th細胞サブセットや遺伝子発現を特定することにつながる有意義な検討となったと考えられる。 Inflammatory bowel disease (IBD) is an intractable inflammatory disease of the intestinal tract with a chronic course of unknown aetiology, and even though the development of molecular targeted therapies such as anti-TNF therapy has improved the outcome of treatment, there is still no cure and the development of a curative treatment is urgently needed. Th17 cells, which express the transcription factor RORgt and produce IL-17, are known to be particularly abundant in the intestinal tract, but their involvement in pathogenesis remains unclear. In order to elucidate the novel pathogenesis of intestinal inflammation from a detailed functional analysis of intestinal Th17 cells, we analyzed mouse intestinal Th17 cells using single-cell gene expression analysis (scRNA-seq) to identify genes that are specifically expressed in inflammatory Th17 cells and to explore new therapeutic targets for inflammatory bowel disease. The aim of this study was to identify genes that are expressed specifically in inflammatory Th17 cells and to explore new therapeutic targets for inflammatory bowel disease. Specifically, leukocytes were extracted from the intrinsic layer of the intestinal mucosa of mouse small and large intestine and TCR-beta+ CD4+ fraction (Th cell fraction) was isolated by Flowcytometry (FACS ARIA, BD bioscience). Using the obtained Th cells, RNA extraction and cDNA synthesis were performed for each cell using Chromium system (10x Genomics) to create a library for scRNA-seq, targeting about 10000 cells. The library was sequenced and unbiased analysis was performed using the Cell Ranger pipeline (10x Genomics) to classify intestinal Th cells according to groups with similar gene expression patterns. Th17 cells were found to be classified into five subclusters. Notably, there are clusters of Th17 cells expressing pro-inflammatory genes such as IL-10 and Foxp3, clusters expressing genes characteristic of Th1 cells such as IFN-g, and clusters specifically expressing IL-17. This study will be useful to identify novel Th cell subsets and gene expression patterns that are not restricted by existing knowledge by extracting genes with different expression patterns among these groups and characterizing each group.
Notes	
Genre	Research Paper

URL https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=2020000008-20200260

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

2020 年度　学事振興資金（個人研究）研究成果実績報告書

2021 年 3 月 30 日

研究代表者	所属	医学部臨床教室	職名	助教（有期・医学部）	補助額	300 （A） 千円
	氏名	三上 洋平	氏名（英語）	Yohei Mikami		

研究課題（日本語）

1 細胞遺伝子発現解析法を用いた腸炎惹起性 Th17 細胞の同定と新規治療方法の開発

研究課題（英訳）

Identification of colitogenic Th17 cells using scRNA-seq analysis and development of novel therapeutic strategies for IBD

１．研究成果実績の概要

炎症性腸疾患(IBD)は、原因不明の慢性的な経過をたどる腸管の難治性炎症性疾患であり、抗 TNF 療法を初めとした分子標的療法の開発により治療成績が向上した現在においても、未だ根治療法は存在せず、根治的治療法の開発は急務である。抗 TNF 療法の重要なターゲットの 1 つである T helper(Th)細胞のうち、転写因子 ROR□t を発現し IL-17 を産生する Th17 細胞は、腸管に特に豊富に存在することが知られているが、その病態への関与については不明な点が多い。腸管 Th17 細胞の詳細な機能解析から腸炎の新規発症メカニズムを解き明かすために、マウス腸管 Th17 細胞を 1 細胞遺伝子発現解析法 (scRNA-seq)を用いて解析し、炎症惹起性 Th17 細胞特異的に発現する遺伝子群を追求し、新たな炎症性腸疾患治療ターゲットの探求を目指すために、本研究を実施した。
具体的には、マウス小腸および大腸腸管粘膜固有層より白血球を抽出し、Flowcytometry (FACS ARIA, BD bioscience)により TCR-beta+ CD4+分画(Th 細胞分画)を単離した。得られた Th 細胞を用いて、約 10000 個の細胞をターゲットとして、Chromium system(10x Genomics)を用いて、細胞ごとに RNA 抽出、cDNA 合成を行い、scRNA-seq のライブラリ作成を行った。ライブラリのシーケンスを行い、Cell Ranger パイプライン(10x Genomics)を用いて sequence 後の unbiased に解析を行い、腸管内 Th 細胞を遺伝子発現パターンの類似するグループごとに分類したところ、Th17 細胞は5種類のサブクラスターに分類されることが明らかとなった。注目すべきことに、Th17 細胞には、IL-10 や Foxp3 を発現する炎症抑制性遺伝子を発現するクラスターと IFN-g など Th1 細胞に特徴的な遺伝子を発現するクラスター、そして、IL-17 を専門的に発現するクラスターが存在することが明らかとなり、今後これらのグループ間で異なる発現パターンの遺伝子を抽出し、各グループの特性評価を行うことで、既存の知識にとらわれない新規 Th 細胞サブセットや遺伝子発現を特定することにつながる有意義な検討となったと考えられる。

２．研究成果実績の概要（英訳）

Inflammatory bowel disease (IBD) is an intractable inflammatory disease of the intestinal tract with a chronic course of unknown aetiology, and even though the development of molecular targeted therapies such as anti-TNF therapy has improved the outcome of treatment, there is still no cure and the development of a curative treatment is urgently needed. Th17 cells, which express the transcription factor RORgt and produce IL-17, are known to be particularly abundant in the intestinal tract, but their involvement in pathogenesis remains unclear. In order to elucidate the novel pathogenesis of intestinal inflammation from a detailed functional analysis of intestinal Th17 cells, we analyzed mouse intestinal Th17 cells using single-cell gene expression analysis (scRNA-seq) to identify genes that are specifically expressed in inflammatory Th17 cells and to explore new therapeutic targets for inflammatory bowel disease. The aim of this study was to identify genes that are expressed specifically in inflammatory Th17 cells and to explore new therapeutic targets for inflammatory bowel disease.
Specifically, leukocytes were extracted from the intrinsic layer of the intestinal mucosa of mouse small and large intestine and TCR-beta+ CD4+ fraction (Th cell fraction) was isolated by Flowcytometry (FACS ARIA, BD bioscience). Using the obtained Th cells, RNA extraction and cDNA synthesis were performed for each cell using Chromium system (10x Genomics) to create a library for scRNA-seq, targeting about 10000 cells. The library was sequenced and unbiased analysis was performed using the Cell Ranger pipeline (10x Genomics) to classify intestinal Th cells according to groups with similar gene expression patterns. Th17 cells were found to be classified into five subclusters. Notably, there are clusters of Th17 cells expressing pro-inflammatory genes such as IL-10 and Foxp3, clusters expressing genes characteristic of Th1 cells such as IFN-g, and clusters specifically expressing IL-17. This study will be useful to identify novel Th cell subsets and gene expression patterns that are not restricted by existing knowledge by extracting genes with different expression patterns among these groups and characterizing each group.

３．本研究課題に関する発表

発表者氏名 （著者・講演者）	発表課題名 （著書名・演題）	発表学術誌名 （著書発行所・講演学会）	学術誌発行年月 （著書発行年月・講演年月）
Yohei Mikami	Single-cell characterization of gut T-helper cell heterogeneity in homeostasis and colitis	The 13th JEGE-AGA Joint Meeting	2021/4/16

Toshiaki Teratani, Yohei Mikami, Nobuhiro Nakamoto, Takahiro Suzuki, Yosuke Harada, Koji Okabayashi, Yuya Hagihara, Nobuhito Taniki, Keita Kohno, Shinsuke Shibata, Kentaro Miyamoto, Harumichi Ishigame, Po-Sung Chu, Tomohisa Sujino, Wataru Suda, Masahira Hattori, Minoru Matsui, Takaharu Okada, Hideyuki Okano, Masayuki Inoue, Toshihiko Yada, Yuko Kitagawa, Akihiko Yoshimura, Mamoru Tanida, Makoto Tsuda, Yusaku Iwasaki & Takanori Kanai	The liver－brain－gut neural arc maintains the Treg cell niche in the gut	Nature	585, pages591-596(2020)