

Title	好酸球性気道炎症における2型自然リンパ球制御機構の解明
Sub Title	The mechanism of group 2 innate lymphoid cell regulation in eosinophilic airway inflammation
Author	松坂, 雅子(Matsusaka, Masako)
Publisher	
Publication year	2022
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2021.)
JaLC DOI	
Abstract	好酸球性副鼻腔炎患者での50細胞でのRNA-seqの結果、末梢血と比べ鼻茸ILC2では2型サイトカイン、TNF, MAPK signaling pathwayに関連する遺伝子が高発現していた。LCI-S解析により2型サイトカインを高分泌するILC2が存在することが判明し、1細胞RNA-seq解析によりILC2の活性抑制候補遺伝子としてAnxa1を同定した。喘息患者での検討では、末梢血から単離されるILC2数は健康人に比較し喘息患者で有意に少ないにも関わらず、1細胞レベルでのIL-5、IL-13分泌量は喘息患者由来のILC2で有意に高く、RNA-seqではIL-4受容体が高発現していた。 ILC2, isolated from nasal polyps and peripheral blood of patients with chronic rhinosinusitis, revealed the expression of Th2 cytokines and genes related to TNF and MAPK signaling pathways were upregulated in nasal polyps compared with peripheral blood by RNA-seq in 50 cells. Live cell imaging for secretion activity, LCI-S, revealed that there are the group of ILC2 that secret type 2 cytokines highly. Anxa1 was identified as a candidate gene that suppresses ILC2 activation by single cell RNA-seq analysis and ILC2 activation is regulated by Anxa1. About asthma, the number of ILC2 was significantly lower in asthmatics than in healthy subjects. On the other hands, the amount of type 2 cytokines secretion by LCI-S, and the expression of IL-4 receptor by RNA-seq analysis were significantly higher in ILC2 from asthmatic patients. These results indicate that ILC2 from asthmatic patients has different cytokine production capacity and receptor expression.
Notes	研究種目：若手研究 研究期間：2019～2021 課題番号：19K17680 研究分野：アレルギー
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_19K17680seika

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.

令和 4 年 5 月 23 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17680

研究課題名（和文）好酸球性気道炎症における2型自然リンパ球制御機構の解明

研究課題名（英文）The mechanism of Group 2 innate lymphoid cell regulation in eosinophilic airway inflammation

研究代表者

松坂 雅子 (MATSUSAKA, Masako)

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・共同研究員

研究者番号：40594552

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000 円

研究成果の概要（和文）：好酸球性副鼻腔炎患者での50細胞でのRNA-seqの結果、末梢血と比べ鼻茸ILC2では2型サイトカイン、TNF、MAPK signaling pathwayに関連する遺伝子が高発現していた。LCI-S解析により2型サイトカインを高分泌するILC2が存在することが判明し、1細胞RNA-seq解析によりILC2の活性抑制候補遺伝子としてAnxa1を同定した。

喘息患者での検討では、末梢血から単離されるILC2数は健康人に比較し喘息患者で有意に少ないにも関わらず、1細胞レベルでのIL-5、IL-13分泌量は喘息患者由来のILC2で有意に高く、RNA-seqではIL-4受容体が高発現していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

2型自然リンパ球（ILC2）の多様性や制御機構について検討した。好酸球性副鼻腔炎患者での検討より、鼻茸ILC2は末梢血ILC2に比べて活性化状態にあることが示された。RNA-seq解析によりILC2制御因子としてAnxa1を同定した。Anxa1の発現を調整することが疾患コントロールにつながる可能性がある。また、喘息患者での検討で、喘息患者末梢血ILC2はサイトカイン産生能や受容体の発現が健康人と異なっていることが明らかとなった。ILC2の性質のさらなる解明が新規薬剤の開発につながると期待される。

研究成果の概要（英文）：ILC2, isolated from nasal polyps and peripheral blood of patients with chronic rhinosinusitis, revealed the expression of Th2 cytokines and genes related to TNF and MAPK signaling pathways were upregulated in nasal polyps compared with peripheral blood by RNA-seq in 50 cells. Live cell imaging for secretion activity, LCI-S, revealed that there are the group of ILC2 that secrete type 2 cytokines highly. Anxa1 was identified as a candidate gene that suppresses ILC2 activation by single cell RNA-seq analysis and ILC2 activation is regulated by Anxa1.

About asthma, the number of ILC2 was significantly lower in asthmatics than in healthy subjects. On the other hands, the amount of type 2 cytokines secretion by LCI-S, and the expression of IL-4 receptor by RNA-seq analysis were significantly higher in ILC2 from asthmatic patients. These results indicate that ILC2 from asthmatic patients has different cytokine production capacity and receptor expression.

研究分野：アレルギー

キーワード：2型自然リンパ球（ILC2） 気管支喘息 好酸球性副鼻腔炎 シングルセル解析 RNA-sequence

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

2型自然リンパ球 (Innate lymphoid cells: ILC2) は2010年に発見された新しいリンパ球で、2型アレルギー疾患の発症機構に重要な役割を果たすことが明らかとなり注目されていた。ILC2の関与が示唆されている気道疾患として、上下気道の難治性好酸球性疾患である気管支喘息と好酸球性副鼻腔炎がある。

マウス ILC2 に関しては動物モデルを用いた解析が進む一方で、ヒト ILC2 は血中あるいは組織中から採取できる細胞数が希少であり (20mL 採血あたり 3,000~5,000 個採取可能)、その性質を検討するにあたり大きな障壁となっていた。ILC2 の多様性や制御因子に関する報告は散見されたが、1細胞レベルで ILC2 を観察し、ILC2 の性質を遺伝子レベルで検討した報告はまだなかった。そのため、近年開発された1細胞解析技術を用いヒト ILC2 の性質を検討することとした。1細胞分泌実時間イメージング法 (Live cell imaging for secretion activity ; LCI-S) は共同研究者である白崎善隆博士らが独自に開発したイメージングプラットフォームで、1細胞の分泌活性を顕微鏡下で観察できるシステムである。細胞培養と ELISA 解析と顕微鏡観察を一度にリアルタイムで行うことを可能とし、またそこから狙った細胞をピックアップして qPCR や RNA-seq などの手法で遺伝子発現を検討することができる。疾患に与える影響は大きいがこれまでの実験手法では解析が困難であった希少細胞の解析を可能とする技術である。

研究開始当初までの検討により、ILC2 の性質は同一個人内においても局在により異なること、さらには同一個人・同一組織由来の ILC2 においても細胞ごとに異なることが明らかとなっていた。この多様性は何によって規定されるのだろうか、という問いに答えるため、RNA-sequence を行い、その結果をもとに ILC2 の制御因子を探索したいと考えた。

2. 研究の目的

2型アレルギー疾患である好酸球性副鼻腔炎、気管支喘息の患者検体を用い、ヒト ILC2 の性質を検討する。また、ILC2 の1細胞レベルでの多様性に注目し検討を行うことで、新たなバイオマーカーや治療につながる可能性のある ILC2 の制御因子を探索することを目的とする。

3. 研究の方法

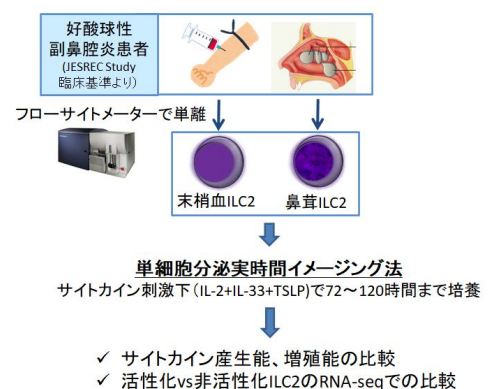
(1) 好酸球性副鼻腔炎

① 少数細胞での検討

好酸球性副鼻腔炎患者の鼻茸及び末梢血から ILC2 を単離した。単離した ILC2 を少数細胞 (50 細胞) で RNA-seq を行い、鼻茸と末梢血という局在による遺伝子発現の相違を検討した。

② 1細胞分泌実時間イメージング法 (LCI-S) による検討

好酸球性副鼻腔炎患者の鼻茸及び末梢血から単離した ILC2 を、LCI-S により IL-2、IL-33、TSLP 刺激下で観察した。サイトカイン分泌 ILC2 と非分泌 ILC2 を同定し、1細胞ずつ回収し RNA-sequence 解析を行い検討した (図1)。ILC2 の活性化を抑制する候補遺伝子を同定し、1細胞 qPCR で確認した。ウイルスベクターを用いて ILC2 での遺伝子発現を調節し、その影響を検討した。



(図1) 好酸球性副鼻腔炎患者検体を用いた LCI-S での検討方法

(2) 気管支喘息

喘息患者と健常人の末梢血から ILC2 を単離、LCI-S によりサイトカイン産生能を評価した。1細胞レベルでの RNA-seq 解析を行い、喘息患者で特徴的に発現が上昇・低下している遺伝子を同定した。

4. 研究成果

(1) 好酸球性副鼻腔炎

① 少数細胞での検討

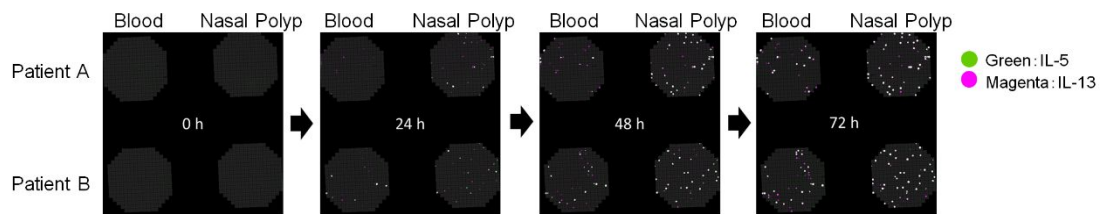
好酸球性副鼻腔炎患者3名の鼻茸及び末梢血から ILC2 を単離し、少数細胞 (50 細胞) で RNA-seq を行い鼻茸と末梢血という局在による遺伝子発現の相違を検討した。鼻茸 ILC2 では末梢血 ILC2 と比べて IL-5 や IL-13 などの Th2 サイトカインや、ケモカイン、活性化マーカーなどが上昇していた。また、KEGG pathway では TNF signaling pathway や MAPK signaling pathway に関連する遺伝子が末梢血 ILC2 と比べて鼻茸 ILC2 で上昇していることが示され (表1)、鼻茸ではより活性化した状態となっていることが示唆された。

(表1) KEGG pathway 解析 (鼻茸 ILC2 で末梢血 ILC2 に比べ高発現している遺伝子を用い解析)

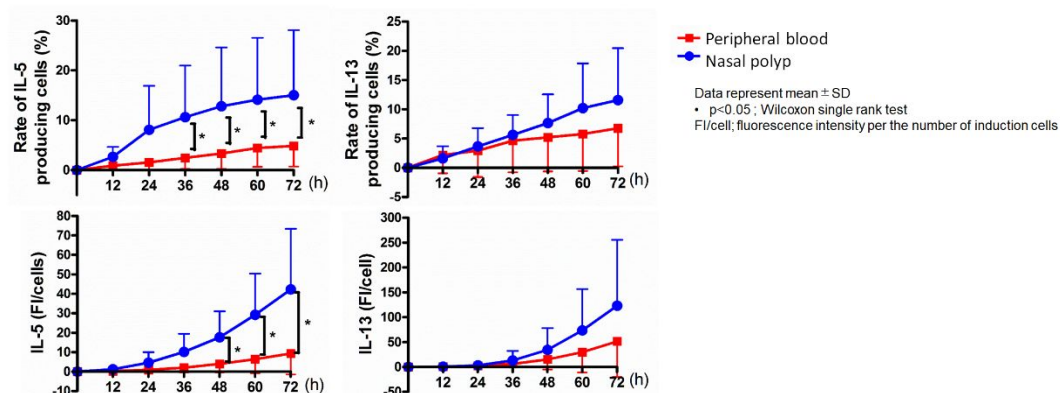
Term	PValue
TNF signaling pathway	9.90E-09
Cytokine-cytokine receptor interaction	5.39E-08
Complement and coagulation cascades	4.81E-04
Transcriptional misregulation in cancer	0.001394
MAPK signaling pathway	0.001697

② 1細胞分泌実時間イメージング法 (LCI-S) による検討

好酸球性副鼻腔炎患者の鼻茸及び末梢血から ILC2 を単離し、LCI-S 解析と RNA-seq 解析を行った。LCI-S 解析により同一患者の同一組織由来の ILC2 であるにも関わらず IL-2+IL-33+TSLP 刺激下で 2 型サイトカインを高分泌する ILC2 と分泌しない ILC2 が存在することが判明した(図2)。また、末梢血に比べ鼻茸 ILC2 ではサイトカインを分泌する細胞の割合と、1細胞あたりのサイトカイン分泌量が多いことが分かった (図3)。



(図2) LCI-S の培養時のイメージ

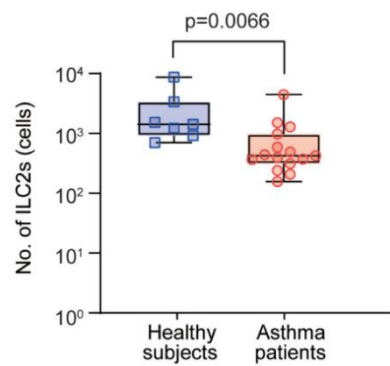


(図3) 鼻茸と末梢血のサイトカイン分泌細胞割合と単細胞あたりのサイトカイン分泌量

1細胞レベルでの制御因子の探索のため、サイトカイン分泌 ILC2 と非分泌 ILC2 の RNA-seq の結果を検討したところ、鼻茸と末梢血、両方のサイトカイン非分泌 ILC2 で高発現する遺伝子が 11 個抽出された。それらの遺伝子について 1細胞ずつ RNA-seq 解析を行ったところ、ILC2 の活性化を抑制する候補遺伝子として *Anxa1* を同定した。ウイルスベクターを用いて ILC2 の *Anxa1* 遺伝子の発現を調節すると、*Anxa1* によって ILC2 の活性化が制御されていることが明らかとなった。さらに、*Anxa1* によって ILC2 の活性化を調節する分子及び転写因子を明らかにした。*Anxa1* のさらなる検討が新規疾患治療薬に繋がる可能性がある。

(2) 気管支喘息

喘息患者 15 名、健康人 7 名の末梢血 20ml より ILC2 を単離した。単離された ILC2 の数は健康人 2679 ± 3009 個、喘息患者 851 ± 1134 個であり、喘息患者で有意に少なかった ($p < 0.01$) (図4)。一方、LCI-S にて 1細胞ごとの 2 型サイトカイン分泌量 (IL-5 及び IL-13) を測定したところ、喘息患者由来の ILC2 はサイトカイン産生量が有意に高かった ($p < 0.05$)。さらに、RNA-seq 解析では喘息患者由来の ILC2 は IL-4 受容体の発現が有意に高いことが明らかになった ($p < 0.05$)。このことから喘息患者の末梢血 ILC2 は IL-4 受容体を介したシグナル経路により活性化状態にあり、刺激により大量の 2 型サイトカインを産生することが示唆された。この知見が疾患コントロールの改善に繋がることが期待される。



(図4) 末梢血 20ml あたりの ILC2 数

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 桑江美聡、松坂雅子、福永興彦
2. 発表標題 Single cell解析によるILC2活性化制御遺伝子の検討
3. 学会等名 日本呼吸器学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 桑江美聡、松坂雅子、福永興彦
2. 発表標題 1細胞分泌活性解析システムを用いた活性化ヒトILC2における遺伝子発現の検討
3. 学会等名 日本呼吸器学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 桑江美聡、松坂雅子、福永興彦
2. 発表標題 LCI-Sを用いた2型自然リンパ球の新規制御機構の解明
3. 学会等名 日本呼吸器学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 馬場里英、松坂雅子、福永興彦
2. 発表標題 LCI-Sを用いた喘息患者における末梢血由来2型自然リンパ球の解析
3. 学会等名 日本呼吸器学会
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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