

主論文の要旨

**Single-cell RNA sequencing of intestinal immune cells
in neonatal necrotizing enterocolitis**

（ 新生児壊死性腸炎における腸管免疫細胞に関する
single-cell RNAシーケンス ）

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
病態外科学講座 小児外科学分野

（指導：内田 広夫 教授）

大島 一夫

【緒言】

壊死性腸炎 (NEC) は主に新生児期の腸管が炎症・壊死を起こし、ときに消化管穿孔を起こす。極低出生体重児の 7% に発症し、死亡率は 20~30% と高く、救命後も 25% に脳神経学的な後遺症を残す重大な疾患である。原因は結論が得られていないが、腸管血流不全、腸内細菌叢の異常の他に、ヒトが出生後初めて感染性微生物に暴露する新生児期に特徴的に発症することから、腸管免疫の異常との関連が注目されており、1 型ヘルパー T (Th1) 細胞が腸管の炎症に影響を与える、制御性 T (Treg) 細胞の減少が関与している、自然リンパ球 (ILC) が関与している可能性があるといった報告がみられる。Single-cell RNA sequence (scRNA-seq) は各細胞の免疫応答を解析することができるが、NEC をきたしたヒトの腸管を対象とした研究の報告はない。我々は、腸管におけるこれらの特定の免疫細胞が NEC の高度炎症の原因となっていると仮説をたて、同手法を用いてヒト新生児の腸管免疫細胞の性質と機能をプロファイリングすることにより、NEC の免疫学的状態の解明を試みた。

【方法】

2017 年 10 月から 2018 年 11 月にかけて新生児期に消化管穿孔を発症し腸管切除を行った症例を対象に、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。30mM EDTA-2Na を用いて切除した腸管の粘膜上皮を除去し、腸壁を鋏で細断した後、0.5 mg ml⁻¹ Collagenase D と Percoll PLUS を用いた密度勾配遠心分離により単細胞を分離し、BD FACSAria Fusion Flow Cytometer を用いたフローソーティングでリンパ球を示唆する生単核細胞を収集した。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) を用いて主成分分析に基づいた均一マニホールド近似投影 (UMAP) を作成し、細胞の cluster 分類を行った。また Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) を用いて 2 群間の遺伝子発現を比較した。本研究は、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。

【結果および考察】

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 (Table 1)。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を認め (Figure 1)、それらは新生児臍帯血と概ね同じ割合であった。ILCs は同定できなかった。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解析すると、T 細胞では、ナイーブ細胞、エフェクター細胞、メモリー細胞、Treg 細胞を同定した (Figure 3A, B)。4 例とも高い割合の Th1 細胞を示したが、2 型ヘルパー T (Th2) 細胞は確認できず (図 3C)、全症例における Th1 細胞への偏り

と、細胞性免疫反応による炎症が示唆された。ただし T 細胞におけるサブセットの割合は症例ごとに異なっており、NEC の一例ではナイーブ T 細胞の頻度が 81.8% と高く、セントラルメモリー細胞 (0-0.36%) や CD8 陽性エフェクター細胞 (0.15%) は少なかった。B 細胞では、活性化 B 細胞、メモリー B 細胞、および長期生存型プラズマ細胞を同定した (Figure 4A, B)。それぞれ症例では B 細胞のサブセットのうち 1 つのみが 80% 以上を占めていた (Figure 4C)。T 細胞、B 細胞におけるこれら症例ごとの違いは、患者の炎症の段階、すなわち発症から腸管切除術までの経過時間が影響している可能性があると考えられた。単球では、古典的単球と非古典的単球を同定したが、その他の細胞群は既知のマーカーを用いても識別できなかった (Figure 4D, E, F)。これは単球のサブセットの分類について、既知の情報では不足しているためと考えられる。

GSEA により、NEC 群と non-NEC 群での遺伝子発現を比較したところ、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、MTOR シグナル経路に関連する遺伝子においては、T 細胞、B 細胞、単球、マクロファージの各細胞群で NEC 群での発現上昇を認めた (normalized enrichment score = 1.84, 1.91, 1.86, 1.60 ; false discovery rate = 0.031, 0.031, 0.030, 0.084) (Figure 2)。これにより、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。

【結論】

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。

Table 1. Patient characteristics

Case	Organ	Age at surgery (days)	Gestational age (weeks)	Birth weight (g)	Outcome	Preoperative course
NEC1	Ileum	6	24	699	Died	Low platelets and low neutrophils 1 d before
NEC2	Ileum	2	33	1,690	Survived	Sudden abdominal distension on operative day
FIP1	Jejunum	4	27	707	Survived	Abdominal distension 2 d before
IDP1	Ileum	4	28	737	Survived	Pneumoperitoneum and puncture drained 1 d before

NEC, necrotizing enterocolitis; FIP, focal intestinal perforation; IDP, idiopathic perforation

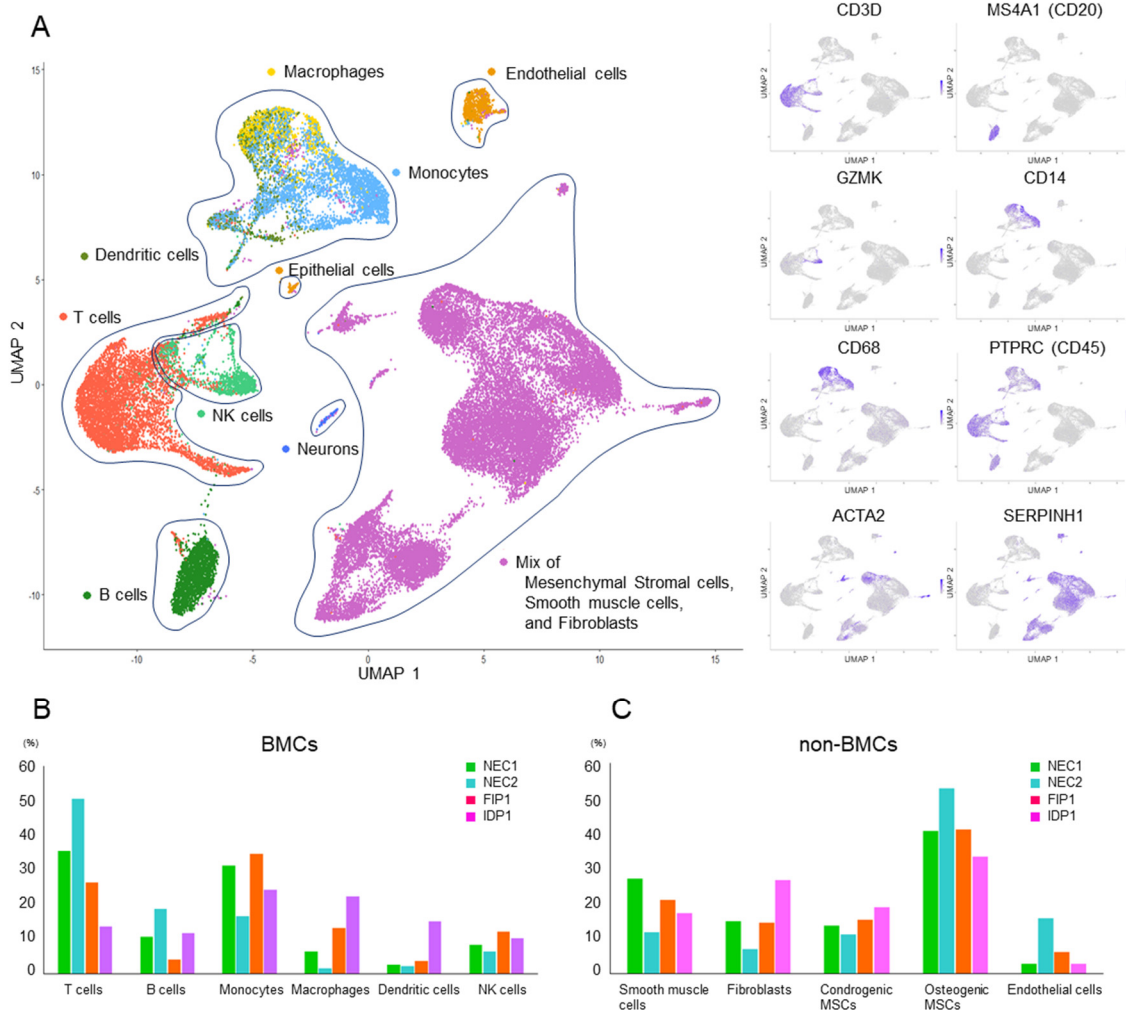


Figure 1. Identification of the intestinal immune cell types found in the neonatal intestinal perforations

(A) Uniform manifold approximation and projection for dimension reduction (UMAP) plot of all cells from Seurat, colored according to cell type, as identified in singleR. All cells that are not blood mononuclear cells (BMCs) are assigned the same color. The expression status of typical genes in each cell type is indicated by the purple shading in the panels on the right. (B) The ratios of each BMC cell type in each case studied. (C) The ratios of each non-BMC cell type in each case studied

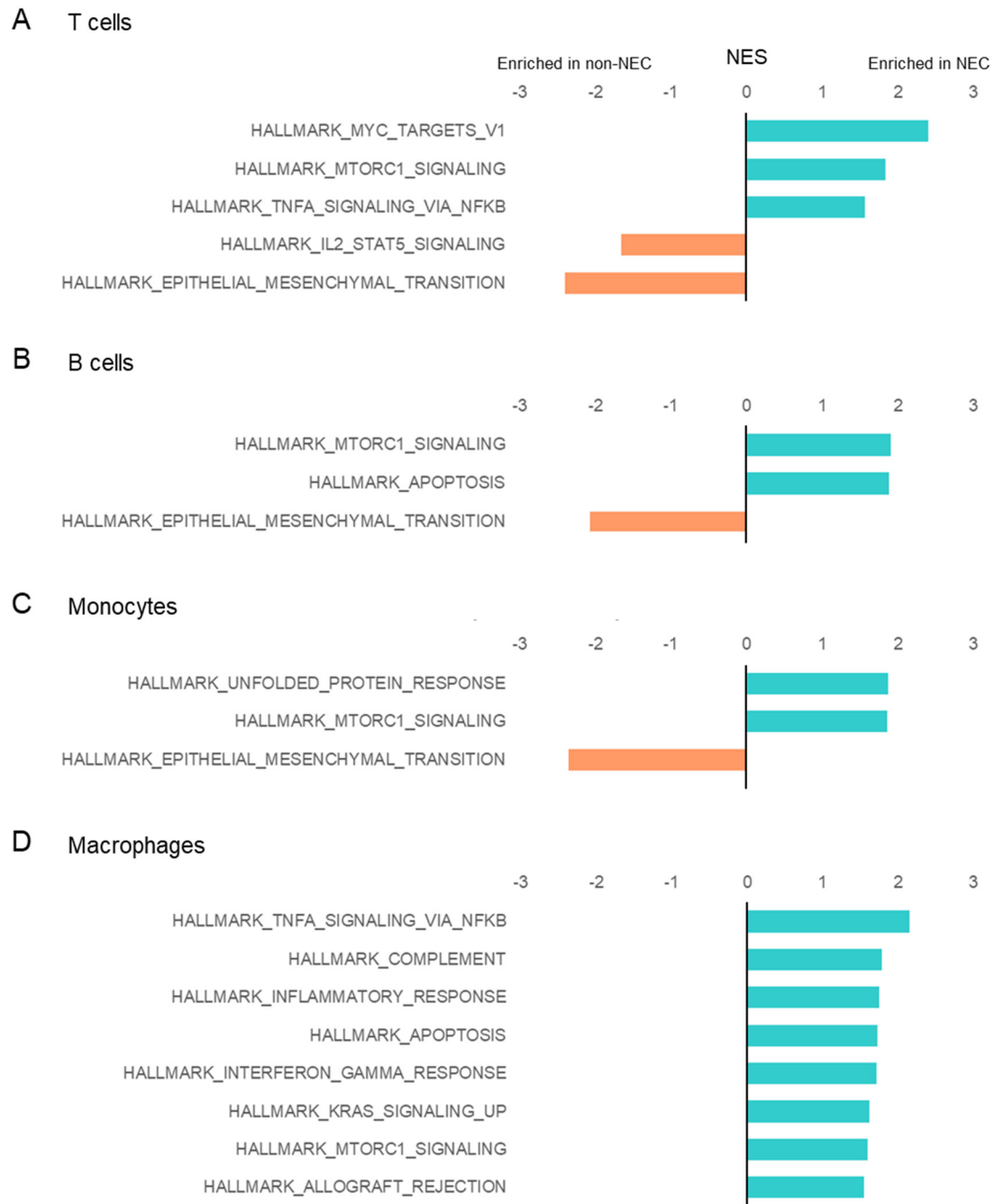


Figure 2. The pathways that were significantly enriched in the NEC group relative to the non-NEC group, according to cell type

Gene expression in (A) T cells, (B) B cells, (C) monocytes, and (D) macrophages was analyzed via gene set enrichment analysis (GSEA), using the log fold-change in average gene expression (avg_logFC) between the NEC and non-NEC groups, based on the hallmark pathway sets in the molecular signatures database (MsigDB). Pathways with a nominal (NOM) p-value < 0.05 and a false discovery rate (FDR) p-value < 0.25 were considered significant. The pathways with a positive normalized enrichment score (NES) were enriched in NEC group (green bars), and those with a negative NES were enriched in non-NEC group (orange bars)

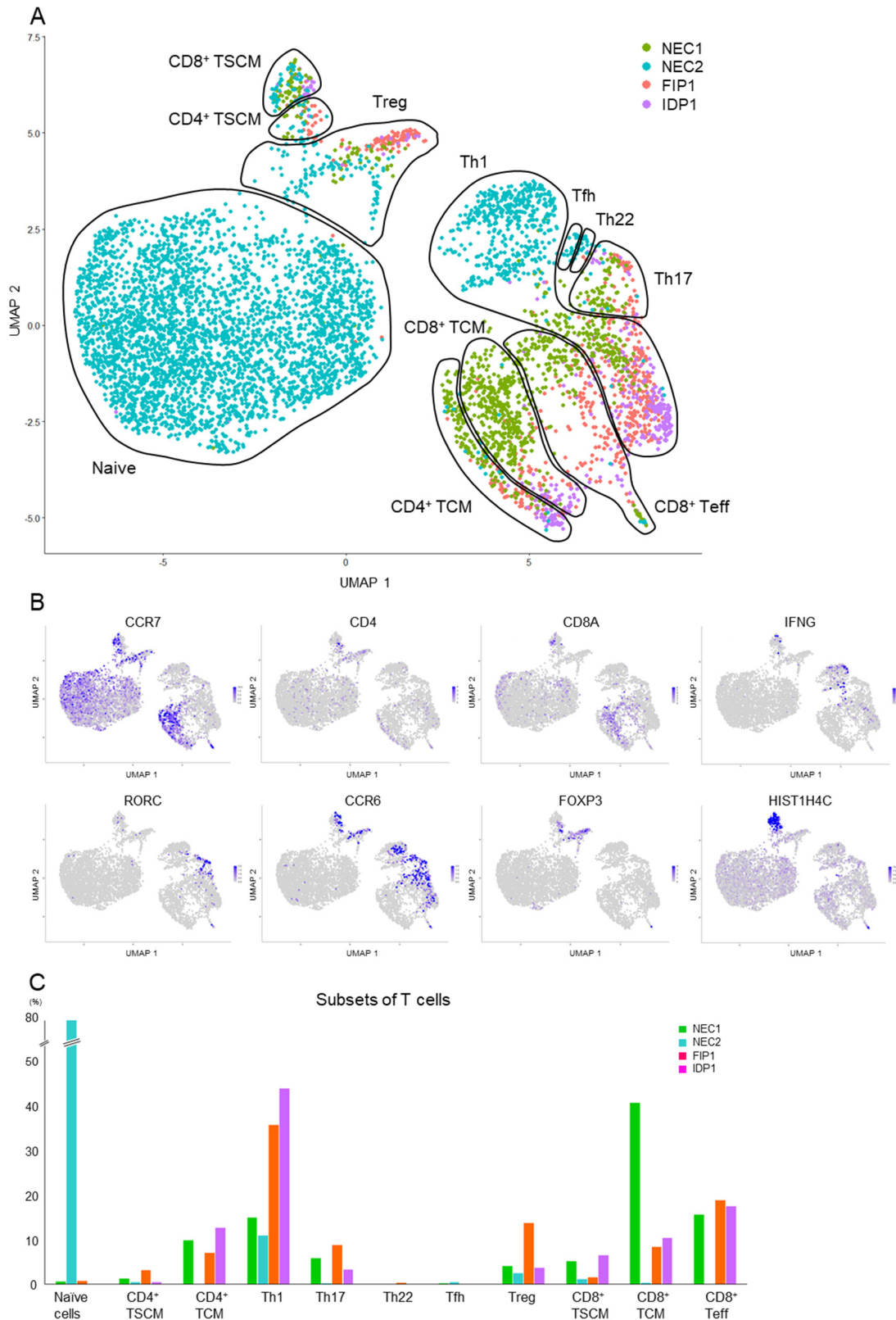


Figure 3. Identification of T cell subsets in the neonatal intestinal perforations

(A) UMAP plots of the T cells. The subsets were inferred based on gene-expression status. (B) Expression of marker genes in the T cells, with colored dots indicating positive expression. (C) The ratios of each T cell subset in the four cases studied

