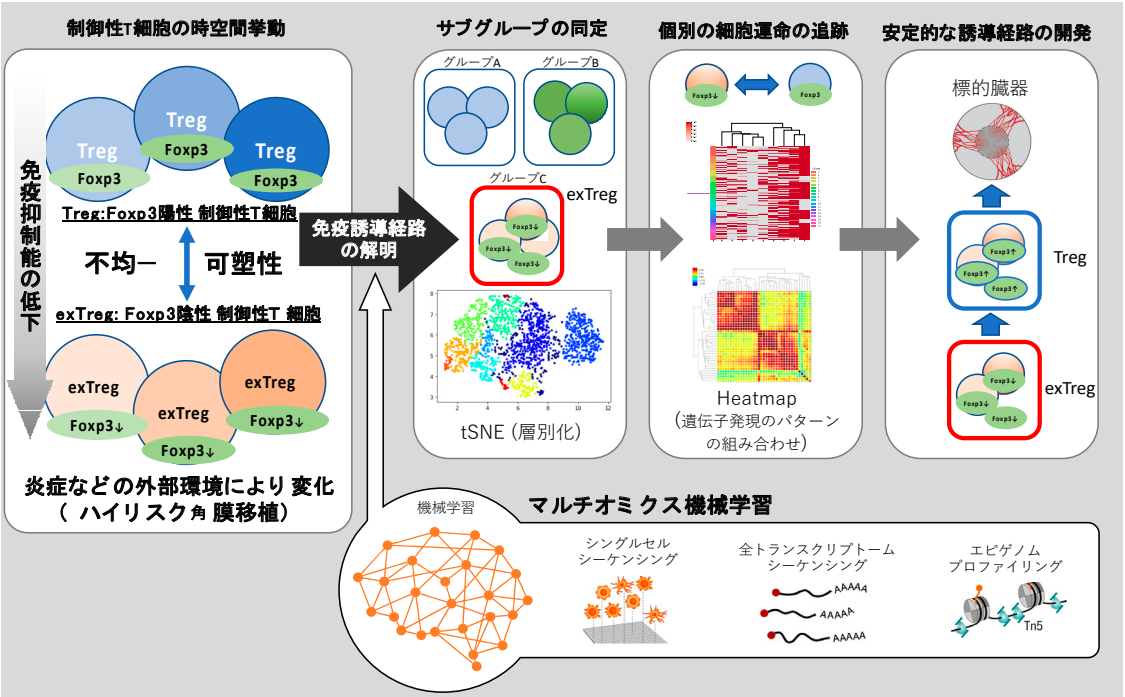
195　局所炎症環境下における免疫細胞の時空間挙動の解明	猪俣　武範

【目的】角膜移植は世界で年間 180,000 件以上行われる最も多い臓器移植であるが、感染症や再移植で血管新生や炎症が惹起された高リスク角膜に対する移植では 40〜90%の拒絶反応を伴う。角膜移植の拒絶反応において、免疫抑制的に働く制御性 T 細胞が注目されているが、炎症等の外部環境の変化により転写因子である Foxp3 の発現を失って免疫抑制能が低下する現象「制御性 T 細胞の可塑性」や、Foxp3 や免疫抑制分子等の発現や分化状態が不均一な「制御性 T 細胞の不均一性」が明らかになってきた。そこで、本研究では、マウス高リスク角膜移植モデルを用いて、局所炎症環境下における拒絶反応・炎症反応に関する免疫細胞に対してマルチオミクス解析を実施し、そこから得た多角的なデータで免疫細胞の可塑性・不均一性に関連する分子プロファイルの時空間挙動を機械学習で解明する。

【方法】無血管組織である角膜に手術的侵襲によって新生血管・炎症を誘導したマウス高リスク角膜移植モデルを作製した。マウス高リスク角膜移植モデルの術後 14 日目の角膜移植片を採取し、RNA シークエンスを実施し、発現変動遺伝子の特定、Gene Ontology 解析、ネットワーク解析を実施した。さらに、同サンプルを用いて、シングルセル RNA シークエンスを実施し、角膜移植片における免疫細胞の層別化を実施した。

【結果】新生血管・炎症を眼局所環境に誘導したマウス高リスク角膜移植モデルを作製した。マウス高リスク角膜移植モデルの術後 14 日目の角膜移植片を採取し、RNA シークエンスを実施した。発現変動遺伝子は高リスク角膜移植に 409 遺伝子、コントロールに 150 遺伝子特定された。高リスク角膜移植における発現変動遺伝子の Gene Ontology 解析では、高リスク角膜移植では、T 細胞の活性化、T 細胞の活性化の制御、炎症応答、制御性 T 細胞のシグナリング経路に発現変動遺伝子の濃縮を認めた。シングルセル RNA シークエンスにより、角膜移植片の免疫細胞は 31 のクラスターに層別化された。

マルチオミクス機械学習による免疫細胞の時空間挙動の解明



195. 局所炎症環境下における免疫細胞の時空間挙動の解明

猪俣　武範

順天堂大学 医学部 医学科 眼科学

Key words：角膜移植，免疫，マルチオミクス，機械学習，制御性T細胞

緒　言

角膜移植は世界で年間180,000件以上行われる最も多い臓器移植である［1］。角膜は免疫特権を有するため角膜移植片の80%以上は生着する。しかしながら、未だに感染症、自己免疫疾患の合併、アレルギー、再移植等で血管新生や炎症が惹起された高リスク角膜に対する移植では、その40〜90%に拒絶反応を伴う［2］。一方、ステロイドやシクロスポリン、タクロリムス等の免疫抑制剤の登場により、角膜移植後の急性拒絶反応は減少したが、免疫抑制剤は感染症、薬剤毒性、白内障、緑内障等の薬剤性の副作用や、慢性拒絶反応には無効となる課題が残されている。これらの問題解消に向けて注目されているのが、T細胞サブセットとして1995年に同定された制御制T細胞である。この制御性T細胞は、移植片に対するレシピエント由来のエフェクターT細胞の反応を抗原特異的に抑制する。そのため、制御性T細胞を人為的に増幅し、抗原特異的に誘導させることができれば、副作用なく角膜移植片に免疫寛容を成立させることができる。

その基盤となる我々の発見として、血管新生・炎症を誘導した高リスクレシピエント角膜に対する角膜移植（高リスク角膜移植）において、角膜移植片に存在する制御性T細胞の分化・維持に必須の遺伝子であるFoxp3の発現の低下が、局所角膜における免疫抑制能の低下を惹起し［2］、さらに、炎症等の外部環境の変化で制御性 T 細胞は転写因子Foxp3の発現を失い、ヘルパーT細胞へリプロミングされて、免疫抑制能の低下をまねく「制御性T細胞の可塑性」という性質を持つことを報告した［3］。加えて、正常個体の制御性T細胞はFoxp3や免疫抑制分子等の発現や分化状態が不均一な細胞集団（Foxp3を安定に発現する細胞、Foxp3発現を失ったT細胞（exTreg）に分化する可塑性を保持した一部の細胞）から構成されることを明らかにした［4］。

これら細胞の機序解明と有効活用にはその分離が必要となる。ところが、これらの免疫細胞をCD抗原などの表面特性に基づいたフローサイトメトリーで分離する方法では、同時測定抗原数に限界があるため、結果的に様々な発生段階または機能を持つ集団で構成されてしまう［5］。そのため、制御性T細胞の可塑性や不均一性の解明には、不均一な細胞集団である制御性T細胞の個々の特徴・機能や細胞運命を正確に捉える手立てが必要となる。その課題に対応できる技術がマルチオミクス解析とその複雑かつ膨大なデータを整理する機械学習である。これにより制御性 T 細胞の可塑性・不均一性に関わる分子プロファイルを解明することができる。

本研究では、マウス高リスク角膜移植モデルを用いて、局所炎症環境下における拒絶反応・炎症反応に関する免疫細胞に対してマルチオミクス解析を実施し、そこから得た多角的なデータで免疫細胞の可塑性・不均一性に関連する分子プロファイルの時空間挙動を機械学習で解明する。これにより、従来の手法で見逃されてきた不均一な集団である免疫細胞の特徴・機能や細胞運命に関わる分子を細胞個々のレベルで正確に解析し、炎症などの外部環境の変化に伴う免疫細胞の可塑性に関連するサブグループを同定・再定義する。

方法および結果

1.　高リスク角膜移植モデルの作製

8 週齢のマウス（BALB/c）の角膜実質に 14 日間ナイロン糸を留置し、新生血管を誘導した高リスクレシピエント

角膜を作製した［6］。ドナー（C57BL/6）からレシピエント（BALB/c）に同種異系角膜移植を行った（図 1）。対照（コントロール）には同種同型角膜移植のマウスをおいた。

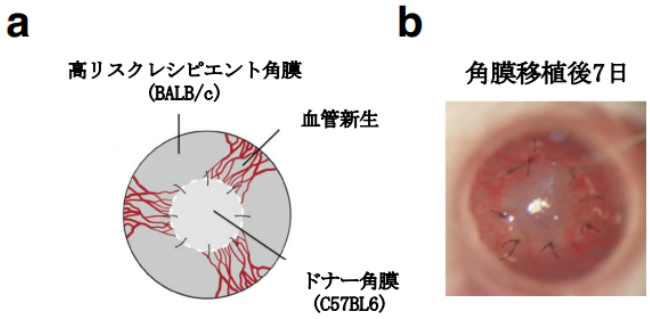


図 1. 高リスクマウス角膜移植モデル

a）マウス高リスク角膜移植モデルの模式図。

b）高リスクマウス角膜移植術後 7 日後の細隙灯顕微鏡下の写真（25 倍）。

2. 高リスク角膜移植における発現変動遺伝子の同定

高リスク角膜移植後 14 日後の角膜移植片を採取し、RNA を抽出した。NEBNext Poly (A) mRNA Magnetic Isolation Module（NEB、Ipswich、MA、USA）ならびに NEBNext Ultra II RNA Library Prep Kit for Illumina（NEB）を用いて RNAseq ライブラリを作製した［7］。RNAseq ライブラリに対してシーケンシングを行い、高リスク角膜移植における角膜移植片の発現変動遺伝子発現を解析した（図 2a）。発現変動遺伝子は高リスク角膜移植に 409 遺伝子、コントロールに 150 遺伝子特定された（図 2b）。

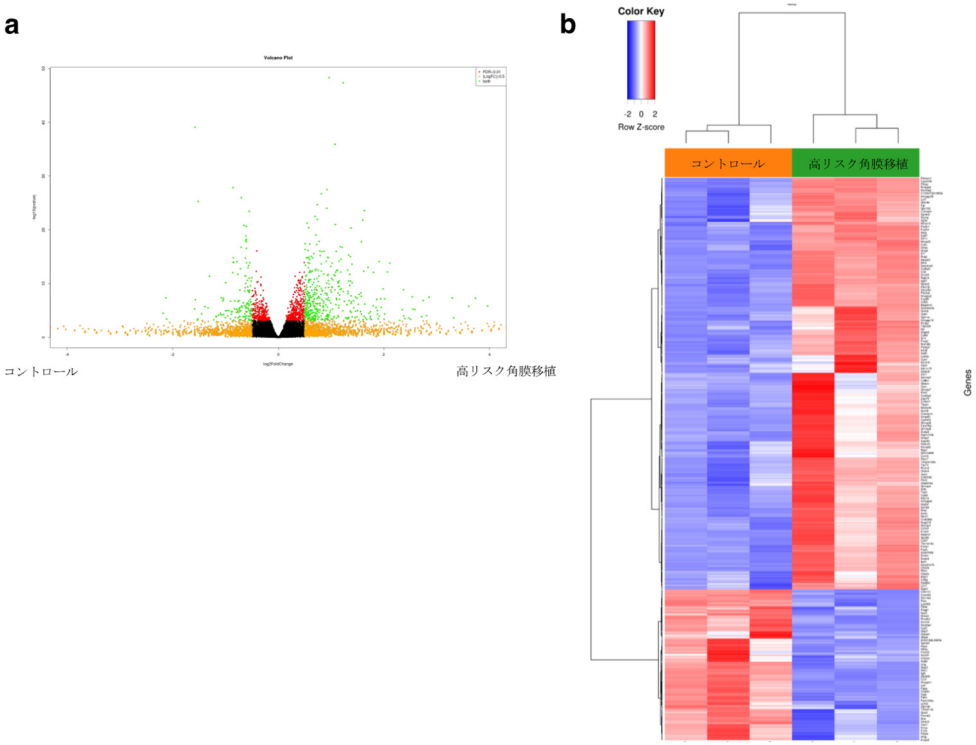


図 2. 高リスク角膜移植の発現変動遺伝子の同定

a）発現変動遺伝子の Volcano plot。

b）発現変動遺伝子リストの階層型クラスタリング。

3.　発現変動遺伝子の Gene Ontology 解析

高リスク角膜移植における発現変動遺伝子の Gene Ontology 解析を実施した（図 3）。高リスク角膜移植では、T 細胞の活性化、T 細胞の活性化の制御、炎症応答、制御性 T 細胞のシグナリング経路に発現変動遺伝子の濃縮を認めた。

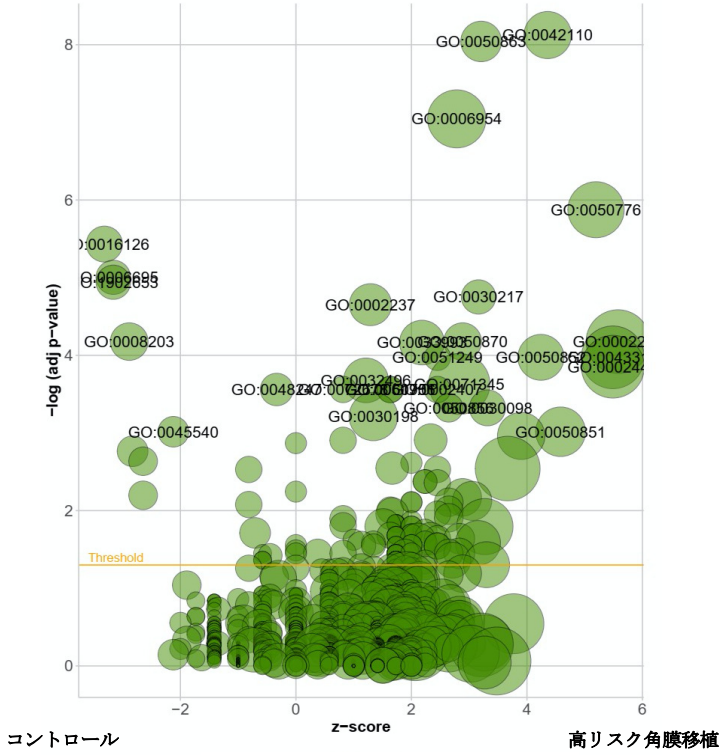


図 3.　高リスク角膜移植における発現変動遺伝子の Gene Ontology 解析

4.　シングルセル RNA シークエンスによる角膜移植片における免疫細胞の層別化

高リスク角膜移植後 14 日後の角膜移植片を採取し、シングルセル RNA シークエンスを実施した。シングルセル毎の発現遺伝子を深層学習で高解像度化し、次元削減アルゴリズム UMAP で角膜移植片における免疫細胞の層別化を行った。その結果、角膜移植片における免疫細胞は 31 クラスターに層別化された（図 4）。

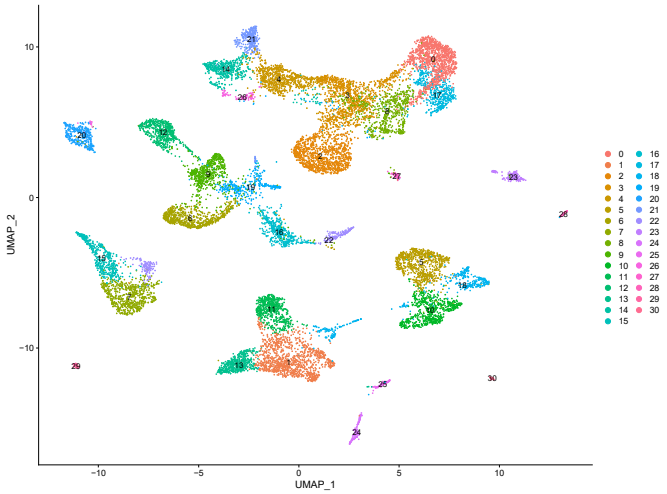


図 4.　シングルセルシークエンスを用いた角膜移植片における免疫細胞の層別化

考　察

本研究では、血管新生を誘導したマウス高リスク角膜移植モデルを用いて、眼局所環境における免疫細胞の変動について解析した。本研究から、高リスク角膜移植における角膜移植の拒絶反応に関わる発現変動遺伝子とその Gene Ontology を解明した。さらに深層学習を用いて、角膜移植における免疫細胞に対するシングルセルシークエンスの解析手法を構築した。今後は、角膜移植片に発現する多様な免疫細胞の各クラスターにおけるシングルセル毎の発現遺伝子を特定し、特に制御性 T 細胞の可塑性や不均一性に関わる遺伝子経路を特定する。さらに、RNA シークエンスならびにシングルセルシークエンスで明らかになった制御性 T 細胞の可塑性に関わる遺伝子群や分子経路に関わるエピゲノム変化を機械学習で同定する。これらにより、制御性 T 細胞の安定性に係る分子機構を解明し、制御性 T 細胞を移植臓器へ安定誘導できる手段確立を目指す。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京大学大学院工学系研究科バイオエンジニアリング専攻個別化保健医療講座の中村正裕である。

文　献

1） Gain P, Jullienne R, He Z, Aldossary M, Acquart S, Cognasse F, et al. Global Survey of Corneal Transplantation and Eye Banking. JAMA Ophthalmol. 2016;134(2):167-73. Epub 2015/12/04. doi: 10.1001/jamaophthalmol.2015.4776. PubMed PMID: 26633035.

2） Inomata T, Hua J, Di Zazzo A, Dana R. Impaired Function of Peripherally Induced Regulatory T Cells in Hosts at High Risk of Graft Rejection. Sci Rep. 2016;6:39924. doi: 10.1038/srep39924. PubMed PMID: 28008995; PubMed Central PMCID: PMCPMC5180229.

3） Inomata T, Hua J, Nakao T, Shiang T, Chiang H, Amouzegar A, et al. Corneal Tissue From Dry Eye Donors Leads to Enhanced Graft Rejection. Cornea. 2018;37(1):95-101. Epub 2017/10/13. doi: 10.1097/ICO.0000000000001400. PubMed PMID: 29023237; PubMed Central PMCID: PMCPMC5716893.

4） Hua J, Inomata T, Chen Y, Foulsham W, Stevenson W, Shiang T, et al. Pathological conversion of regulatory T cells is associated with loss of allotolerance. Sci Rep. 2018;8(1):7059. Epub 2018/05/08. doi: 10.1038/s41598-018-25384-x. PubMed PMID: 29728574.

5） Zhu J, Inomata T, Di Zazzo A, Kitazawa K, Okumura Y, Coassin M, et al. Role of Immune Cell Diversity and Heterogeneity in Corneal Graft Survival: A Systematic Review and Meta-Analysis. J Clin Med. 2021;10(20). Epub 2021/10/24. doi: 10.3390/jcm10204667. PubMed PMID: 34682792; PubMed Central PMCID: PMCPMC8537034.

6） Inomata T, Mashaghi A, Di Zazzo A, Dana R. Ocular surgical models for immune and angiogenic responses. J Biol Methods. 2015;2(3). Epub 2015/11/10. doi: 10.14440/jbm.2015.78. PubMed PMID: 26550579; PubMed Central PMCID: PMCPMC4636218.

7） Zhu J, Inomata T, Nakamura M, Fujimoto K, Akasaki Y, Fujio K, et al. Anti-CD80/86 antibodies inhibit inflammatory reaction and improve graft survival in a high-risk murine corneal transplantation rejection model. Sci Rep. 2022;12(1):4853. Epub 2022/03/24. doi: 10.1038/s41598-022-08949-9. PubMed PMID: 35318419.