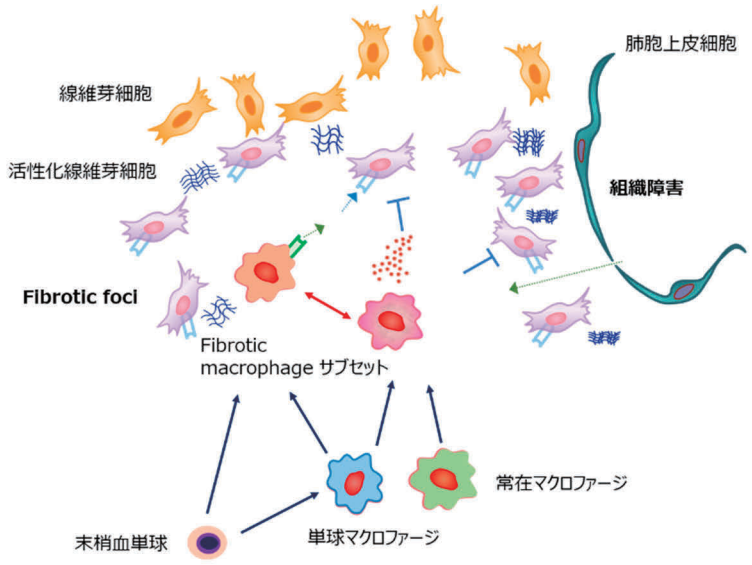
141　空間的遺伝子発現解析による肺線維化の統合的理解	福島　清春

【目的】特発性肺線維症（IPF）は、予後不良の指定難病であり、現時点においても根本的な治療薬は開発されていない。我々はマウス肺線維症モデルにおいて線維化の進行とともに患部に集まるある特定の単球が線維症の発症に関与していることを解明し、特徴的な 2 核様の核型から Segregated atypical monocyte（SatM）と名前を付けて報告した（Nature 2017）。続いて、我々は線維化の発症時には非免疫系細胞の細胞死が起こり始めること、またその死にゆく細胞から CXCL12 が発現され、線維化の起点となるマクロファージである SatM が患部に集積することを明らかにし、免疫細胞と非免疫細胞の相互作用が線維症発症の鍵であることを見出した。さらに、線維化期に誘導される RBM7 という遺伝子が、NEAT1 という long non-coding RNA の分解を介して線維症の発症に関与していることを解明した（Immunity 2020）。先行研究により見出された免疫細胞・非免疫細胞の相互連関による線維症発症過程を検討することで、線維症の発症過程の包括的な理解を目指す。

【方法】線維化病変の新規病態解明を肺線維症患者検体のシングルセル RNA-seq 解析および空間的遺伝子発現解析により検討した。

【結果】間質性肺炎患者の肺組織、気管支肺胞洗浄液、末梢血のシングルセル RNA-seq 解析および空間的遺伝子発現解析を行い、線維化の病勢と顕著な相関を示す Fibrotic macrophage の population を同定することが出来たとともに、複数の異なった免疫細胞サブセットが線維化の進行と関連していることを見出した。さらには、肺組織、末梢血のシングルセル RNA-seq 解析との統合解析を行い、遺伝子発現パターンの類似性から細胞を擬似時間軸で並べ細胞の分化経路を調べる RNA velocity を用いた trajectory 解析を行ったところ、異なった単球サブセットが線維化と関連する多様なマクロファージサブセットを形成することがわかった。加えて、空間的遺伝子発現解析との統合解析により線維化促進性のサブセットは進展した線維化病変内で集積して foci を形成しており、周囲の線維芽細胞と緻密な代謝連関を形成し線維化病変の維持・進展を行っていることがわかった。進展した線維化肺は荒廃した終末期の病像ととらえられてきたが、線維芽細胞活性化を維持し線維化を進展させる活発な免疫応答があることが示された。免疫細胞・非免疫細胞の相互連関ネットワークによる線維化制御メカニズムを検討することで、進展した線維化肺も治療可能な分子が同定可能と考えられた。

多様な細胞群の相互作用による疾患の発症・進展の時間空間的なダイナミズムの解明



Fibrotic macrophageの相補的な代謝連関がFibrotic lung fibroblastを活性化する

141. 空間的遺伝子発現解析による肺線維化の統合的理解

福島　清春

大阪大学 免疫学フロンティア研究センター 自然免疫学／医学系研究科 呼吸器・免疫内科学

Key words：肺線維症，単球

緒　言

肺線維症は診断後 3〜5 年で約半数が死亡する非常に重篤な疾患である。我々はマウス肺線維症モデルにおいて線維化の進行とともに患部に集まるある特定の単球が線維症の発症に関与していることを解明し、特徴的な 2 核様の核型から Segregated atypical monocyte（SatM）と名前を付けて報告した［1］。続いて我々は線維化の発症時には非免疫系細胞の細胞死が起こり始めること。またその死にゆく細胞から CXCL12 が発現され、線維化の起点となるマクロファージである SatM が患部に集積することを明らかにし、免疫細胞と非免疫細胞の相互作用が線維症発症の鍵であることを見出した。さらに線維化期に誘導される RBM7 という遺伝子が NEAT1 という long non-coding RNA の分解を介して線維症の発症に関与していることを解明した［2］。

肺線維症の原因となる間質性肺疾患は多様な病態を呈し、ステロイドなどの免疫抑制療法が奏功し線維化を伴わずにコントロール可能な一群と治療に対する反応性に乏しく進行性線維化を伴うものに大別される［3］。すなわち、健常、非線維化性間質性肺疾患、進行性線維化を伴う間質性肺疾患を比較検討することではじめて、間質に病態を有し真に線維化と関連する新規の標的を見出すことが出来る。本研究では、シングルセル RNA-seq および空間的遺伝子発現解析により多様な細胞群の動的なダイナミズムを検討し、線維化にかかわる血球サブセットの同定・分化系譜および組織での適応・分化を包括的に理解し、精緻な細胞間ネットワークにより形成される線維化病変の進行に重要な新たな分子の同定を目指した。

方法および結果

間質性肺炎患者肺の気管支肺胞洗浄液のシングルセル RNA-seq 解析を 20 例において施行した。線維化の病勢と顕著な相関を示す Fibrotic macrophage の population を同定することが出来たとともに、複数の異なった免疫細胞サブセットが線維化の進行と関連していることを見出した。これら細胞群はそれぞれ特徴的な遺伝子発現、表面マーカーを有し、密接な相互連関が進行性線維化病態を形成していると考える。この事実は間質の病変の反映としての免疫細胞サブセットと、進行性線維化に特異的な免疫細胞サブセットを、非線維化性間質性肺疾患患者の免疫細胞動態を考慮することにより明確に分離することが出来ることを示唆している。さらには、肺組織、末梢血のシングルセル RNA-seq 解析との統合解析を行い、遺伝子発現パターンの類似性から細胞を擬似時間軸で並べ細胞の分化経路を調べる RNA velocity を用いた trajectory 解析を行ったところ、異なった単球サブセットが線維化と関連する多様なマクロファージサブセットを形成することがわかった（図 1）。

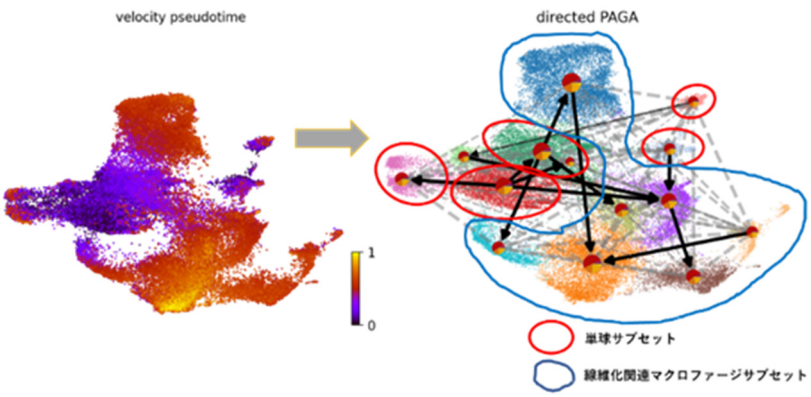


図 1. ヒト肺組織、気管支肺胞洗浄液、PBMC のシングルセル RNA-seq 統合解析
異なった単球サブセットが線維化と関連する多様なマクロファージサブセットを形成する。

このことより、間質性肺疾患において特徴的なマクロファージサブセットの分化が促進されるとともに、多様な細胞間相互作用の中で線維化を運命づける population と炎症病態の増悪に関わる population に分離し、複雑な病態形成が行われている可能性を示唆する。さらには、空間的遺伝子発現解析を可能にした Visium 10x を併用することで多様な細胞群の組織空間内の動的なダイナミズムを検証し、線維化肺で特異的に増加するサブセットと線維化病変との時間空間的な位置関係を検討した。良質な解析パイプラインの確立に成功し、肺組織の病理学的変化と空間的遺伝子発現により分類された population の良好な相関を確認している（図 2)。空間的遺伝子発現解析とシングルセル RNA-seq 解析の統合により、線維化促進性のサブセットは進展した線維化病変内で集積して foci を形成しており、周囲の線維芽細胞と緻密な代謝連関を形成し線維化病変の維持・進展を行っていることがわかった。すなわち、進展した線維化肺は荒廃した終末期の病像ととらえられてきたが、線維芽細胞活性化を維持し線維化を進展させる活発な免疫応答があることが示された。このため、生体には精緻な創傷治癒機転が存在するにも関わらず、線維化は維持・進展すると考えられた。

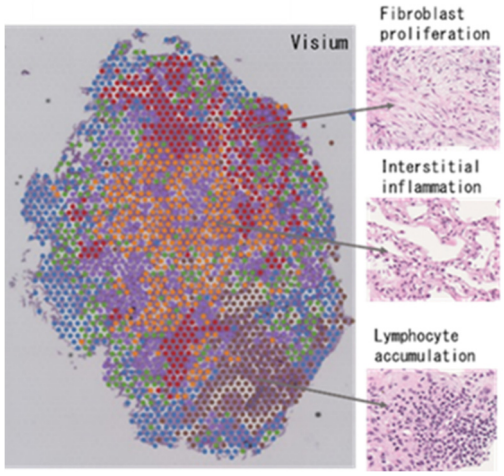


図 2. 空間的遺伝子発現解析による多様な細胞群の動的なダイナミズムの検討

考　察

肺マクロファージは線維化プロセスで重要な役割を担っており、組織傷害と炎症反応の発生過程およびその後の線維化進行において、M1 と M2 マクロファージという異なる細胞表現型の極性化によって制御される M1／M2 パラダイ

ムが広く用いられてきたが［4］、M1／M2 双方のマーカーを発現するマクロファージの存在の報告や病態の多様性を考慮すると、このM1／M2パラダイム説のみで説明が難しいことが指摘されている［5］。

今回、多様な間質性肺炎患者のシングルセルRNA-seq解析を施行し、間質性肺疾患の線維化の病態の進行性と顕著な相関を示すFibrotic macrophageのpopulationを同定することが出来たとともに、複数の異なった免疫細胞サブセットが線維化の進行と関連していることを見出した。さらには、RNA velocityを用いたtrajectory解析により異なった単球サブセットが線維化と関連する多様なマクロファージサブセットを形成することがわかった。加えて、空間的遺伝子発現解析を可能にしたVisium 10xを併用することで多様な細胞群の組織空間内の動的なダイナミズムを検証し、線維化肺で特異的に増加するサブセットと線維化病変との時間空間的な位置関係を検討することで線維化促進性のサブセットは進展した線維化病変内で集積してfociを形成しており、周囲の線維芽細胞と緻密な代謝連関を形成し線維化病変の維持・進展を行っていることがわかった。免疫細胞・非免疫細胞の相互連関を検討することで、線維症の発症過程の包括的な理解が進み、線維化促進性単球／マクロファージサブセットに特徴的な分子および線維化病変局所で同サブセットの適応・分化に重要な知見を得ることが出来た。近年、空間的遺伝子発現解析、シングルセルRNA-seqをはじめ、1細胞レベルで網羅的な解析が可能なモダリティが開発され急速な進歩を遂げており、多様なオミックス解析を併用・統合することで線維症発症過程における多彩な免疫細胞・非免疫細胞の相互連関がさらに明確となると考えられる。

今後、免疫細胞・非免疫細胞の相互連関ネットワークを明らかにすることで、線維化促進性単球／マクロファージサブセットに特徴的な分子および線維化病変局所で同サブセットの適応・分化に重要な役割を果たしている分子が明らかになると考えられる。線維化促進性サブセットにおける標的分子がどのようなパスウェイに関係しているのか、上流因子やそのタンパク質の変動要因を見いだすことで、創薬標的の候補とすることが可能となる。さらには線維化促進性サブセットにおける標的分子がどのようなパスウェイに関係しているのか、多回層オミクス解析により上流因子やそのタンパク質の変動要因を見いだし、創薬標的の候補とする。

文　献

1) Satoh T, Nakagawa K, Sugihara F, Kuwahara R, Ashihara M, Yamane F, et al. Identification of an atypical monocyte and committed progenitor involved in fibrosis. Nature. 2017;541(7635):96-101. Epub 2016/12/22. doi: 10.1038/nature20611. PubMed PMID: 28002407.

2) Fukushima K, Satoh T, Sugihara F, Sato Y, Okamoto T, Mitsui Y, et al. Dysregulated Expression of the Nuclear Exosome Targeting Complex Component Rbm7 in Nonhematopoietic Cells Licenses the Development of Fibrosis. Immunity. 2020;52(3):542-56 e13. Epub 2020/03/19. doi: 10.1016/j.immuni.2020.02.007. PubMed PMID: 32187520.

3) George PM, Spagnolo P, Kreuter M, Altinisik G, Bonifazi M, Martinez FJ, et al. Progressive fibrosing interstitial lung disease: clinical uncertainties, consensus recommendations, and research priorities. Lancet Respir Med. 2020;8(9):925-34. Epub 2020/09/06. doi: 10.1016/S2213-2600(20)30355-6. PubMed PMID: 32890499.

4) Zhang L, Wang Y, Wu G, Xiong W, Gu W, Wang CY. Macrophages: friend or foe in idiopathic pulmonary fibrosis? Respir Res. 2018;19(1):170. Epub 20180906. doi: 10.1186/s12931-018-0864-2. PubMed PMID: 30189872; PubMed Central PMCID: PMC6127991.

5) Misharin AV, Morales-Nebreda L, Reyfman PA, Cuda CM, Walter JM, McQuattie-Pimentel AC, et al. Monocyte-derived alveolar macrophages drive lung fibrosis and persist in the lung over the life span. J Exp Med. 2017;214(8):2387-404. Epub 20170710. doi: 10.1084/jem.20162152. PubMed PMID: 28694385; PubMed Central PMCID: PMC5551573.