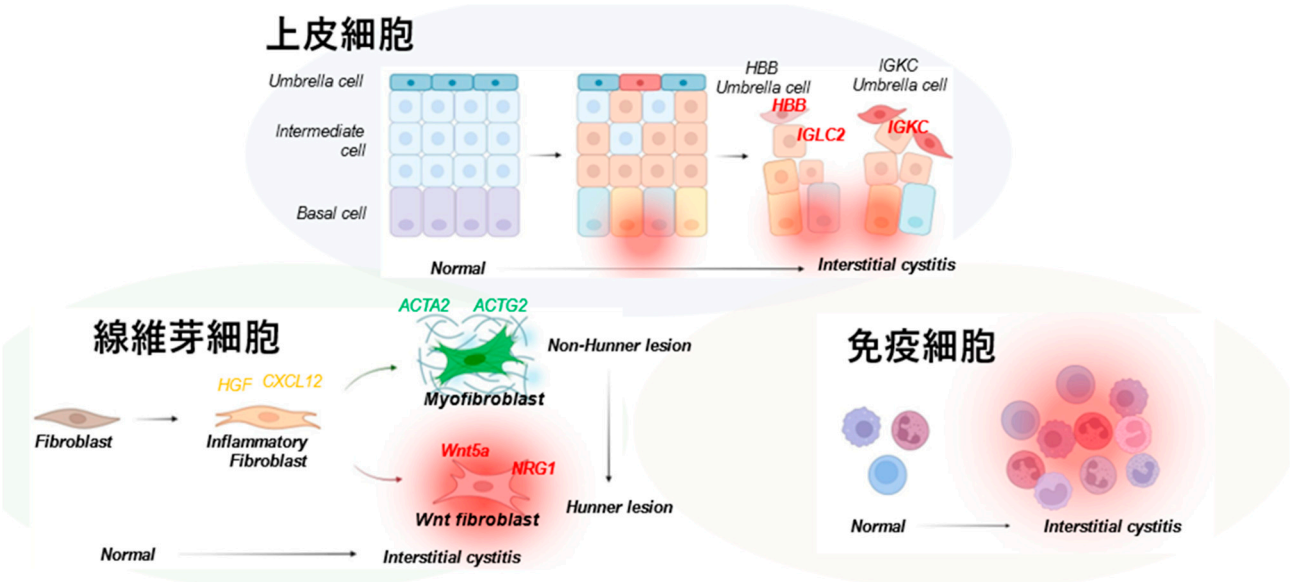
147　単一細胞解析による間質性膀胱炎の包括的理解	占部　文彦

【目的】間質性膀胱炎は膀胱に非特異的な慢性炎症を認める疾患と定義されているが、明らかな病因は未だ特定されていない。シングルセル RNA sequence（RNA-seq）解析は、真の一細胞レベルでの発現プロファイルを入手可能にし、細胞の多様性を一義的に適宜出来ると世界的に注目されている技術である。本研究では上記研究を通して、間質性膀胱炎の病態解明と新規治療標的の同定および、将来的なバイオマーカーの創出につなげることを目的とし、間質性膀胱炎治療に貢献することを目指した。

【方法】ハンナ型間質性膀胱炎 6 症例（ハンナ病変 6 検体および同一症例の非ハンナ病変 3 検体）と正常膀胱 4 検体を用いて、scRNA-seq 解析を行った。scRNA-seq は 10x Genomics 社の Chromium Next GEM Single Cell3’ Kitv3.1 を使用し、NGS ライブラリーを作製した。NGS 解析によって得られた生データを、Cell Ranger を使用し data mapping を行い、Seurat R パッケージを用いて解析を実施した。

【結果】用いた膀胱検体由来の切片を H&E 染色で確認すると、ハンナ型間質性膀胱炎のみで著名な免疫細胞の浸潤を認め、臨床所見と一致した病理像が得られていることを確認した。計 84,676 細胞の遺伝子発現をプロファイルし、UMAP で可視化したところ、32 種類のクラスターを同定した。その内訳は、NK 細胞や好中球などの 23 種類の免疫細胞クラスター、線維芽細胞や平滑筋細胞などの 5 種類の間質細胞、2 種類の上皮細胞クラスター、また 2 種類の内皮細胞クラスターであった。特に線維芽細胞は inflammatory fibroblast と myofibroblast に分かれて分化していくような分化系譜予測結果が得られた。

疾患を構成する細胞群



疾患の進展とともに、各細胞で特徴的な分化系譜を示すことが分かった。

147. 単一細胞解析による間質性膀胱炎の包括的理解

占部　文彦

東京慈恵会医科大学 泌尿器科学講座

Key words：間質性膀胱炎，単一細胞解析，RNA シークエンス

緒　言

間質性膀胱炎は膀胱に非特異的な慢性炎症を認める疾患と定義されているが、明らかな病因は未だ特定されていない。特に膀胱内に高度の炎症所見（ハンナ病変）を認めるハンナ型間質性膀胱炎は厚生省の指定難病となっている。間質性膀胱炎の主な臨床症状として、頻尿（約 98%）、尿意切迫感（約 62%）、膀胱痛（約 42%）などが認められるが、ハンナ型間質性膀胱炎の重症例においては、排尿間隔が昼夜問わず 30 分未満という極度の頻尿による睡眠障害や強烈な膀胱痛のため仕事や家事に集中できないなど、QOL が極度に損なわれる疾患である。しかしながら、現在までに間質性膀胱炎に対する根本的な治療法は存在せず、長期に渡り症状に苦しむ場合が多い。

シングルセル RNA sequence（RNA-seq）解析は、真の一細胞レベルでの発現プロファイルを入手可能にし、細胞の多様性を一義的に適宜出来ると世界的に注目されている技術である。本研究はこのシングルセル RNA-seq 技術を用いて、間質性膀胱炎の病態解明およびその成果をもとに新規治療標的や診断マーカーの探索を目的とする。具体的には、①ハンナ型間質性膀胱炎組織および正常膀胱組織における single 細胞 RNA-seq の実施、②Single 細胞 RNA-seq 解析によるハンナ型間質性膀胱炎の病態解明、③組織学的検証および尿中エクソソームにおける発現解析を実施する。

間質性膀胱炎組織から 4,000～6,000 細胞のシングル細胞 RNA-seq 解析を行うことで、病態の首座となる細胞集団を同定するとともに、リガンド - 受容体遺伝子の発現量・パターンから細胞間の相互作用を解明し、膀胱に慢性炎症を引き起こす鍵となる経路を治療標的として同定する。また、組織学的な解析を行い、同定した分子の生物学的意義を検証する。さらに、尿中に存在するエクソソームに着目し、エクソソーム中での発現を評価することで、間質性膀胱炎の診断や病勢を予測するマーカーとしての可能性も評価する。

本研究では上記研究を通して、間質性膀胱炎の病態解明と新規治療標的の同定および、将来的なバイオマーカーの創出につなげることを目的とし、間質性膀胱炎治療に貢献することを目指す。

方　法

1. 臨床検体

ハンナ型間質性膀胱炎組織は水圧拡張術の余剰検体から入手し、正常膀胱組織は腹圧性尿失禁根治術の際に腫瘍の存在を確認する目的で施行した生検の余剰検体を使用した。間質性膀胱炎の診断は、膀胱鏡にてその疾患が疑われ、病理組織診断にて確定した。患者情報を表 1 に示す。東京慈恵会医科大学倫理委員会で承認された研究計画書を遵守し、全ての研究参加者からインフォームドコンセントを得た（承認番号 32-405（10494））。

2. 膀胱組織の処理

まず得られた膀胱組織を物理的に細断し、Miltenyi Gentle MACS dissociator でさらに組織を分解した後、酵素を添加して 37℃でインキュベートした。こうして単離された細胞を 0.1 %BSA（Sifma-Aldrich）入り PBS で洗浄し、70 μm と 45 μm のフィルターを通してデブリを除去した後、300×g で 10 分遠心し、0.1%BSA 入り PBS で懸濁した。トリパンブルー染色により、得られた細胞の生存率が 90%以上であることを確認した。

3. cDNA ライブラリー作製とシークエンシング

細胞数を調整し、0.1%BSA を添加した PBS で懸濁し、10x Genomics 社の遺伝子発現ソリューションを用いて、シングルセルライブラリーの構築を行った（10x Genomics, CA, USA）。

すべてのサンプルは、Chromium Single Cell3’ GEM, Library & Gel Bead Kit v3.1 を用いた。1 サンプルにつき約 6,000 細胞を Next GEM Chip G にロードしたのちに、Chromium Controller を用いて、バーコード付きのゲルビーズと細胞・酵素・分画化用オイルを混合し、シングルセルエマルジョン液滴を作製した。Chromium Controller 内でゲルビーズが溶解されると、細胞ごとに異なるバーコードが付加された RNA の逆転写産物である cDNA が作製される。cDNA を増幅した後、フラグメンテイションと 5’アダプターの付加、サンプルインデックスの付加を行い、ライブラリーを作製した。シークエンスは HiSeq（Illumina, CA, USA）で行い、シークエンス深度の平均値は 1 細胞あたり 140,485 であった。シークエンシングデータは Cell Ranger（version 6.1.2, 10x Genomics）で処理し、ヒトゲノムリファレンス（GRCh38-2020-A）を用いてマッピングした。細胞ごとに付与されたバーコードをもとに遺伝子カウントマトリックスを作成した。

4. データの quality control（QC）と正規化

R ソフトウェアのパッケージである Seurat version 4.1.0.を用いて、データの正規化、スケーリング、細胞のクラスタリングなどを行った。まず quality control として、nFeature_RNA ＞500 、nFeature_RNA ＜8,000 、percent.mt＜20 の基準を設け、死細胞や低クオリティの細胞を除去した。その後 Seurat の‘NormalizeData’機能を用いて log による正規化を行い、さらに検出遺伝子数とミトコンドリアリード数を用いてスケーリングした。

5. クラスタリングと次元削減

Seurat を用いて次元削減を行うために主成分分析（principal component analysis：PCA）を行った。各サンプルの scRNA-seq データのバッチエフェクトを最小にするために、R のパッケージである“Harmony”を用いて統合した［1，2］。その後、Seurat の“FindNeighbors”や“FindClusters”の関数を用いてクラスタリングし、“runUMAP”関数を用いて UMAP プロットを作成し可視化した。

6. Trajectory/pseudo-time（疑似系譜）解析

Trajectory 解析はシングルセル解析で取得した細胞の擬似時間（pseudotime）軸における発現変動を調べることで、細胞の分化経路や時系列における発現変動様式をとらえる手法である。R のパッケージである“monocle”を用いて trajectory 解析を行った［3］。Trajectory plot の次元削減は、同定されたクラスターマーカーの上位 10%の遺伝子を用いて“DDRTree”法を用いて行った。

結　果

1. シングルセル遺伝子発現解析によるクラスタリング

ハンナ型間質性膀胱炎 6 検体（ハンナ病変 6 検体および同一症例の非ハンナ病変 3 検体）と正常膀胱 4 検体を用いて、シングルセル遺伝子発現解析を行った。用いた膀胱検体由来の切片を H&E 染色で確認すると、ハンナ型間質性膀胱炎症例では粘膜表層を被覆する上皮は広範囲に剥離し、うっ血とリンパ球・形質細胞・好酸球・好塩基球が混じる炎症性細胞の浸潤を認め、臨床診断と一致した所見が得られた。また、正常膀胱組織では、著名な免疫細胞の浸潤は認められず、臨床所見と一致した病理像が得られ、適切なサンプルセレクションであることが示唆された。得られたシーケンスデータの quality control として、R ソフトウェアのパッケージである“Seurat”を用いて推定される死細胞を除去した。また各サンプルのバッチエフェクトを低減するために、複数のデータセット統合のための効率的アルゴリズムを持つ“Harmony”パッケージ［1，2］を用いてデータを統合した。

計 84,676 細胞の遺伝子発現をプロファイルし、UMAP（Uniform Manifold Approximation and Projection）で可視

化したところ、32 種類のクラスターを同定した（図 1a）。その内訳は、NK 細胞や好中球などの 23 種類の免疫細胞クラスター、線維芽細胞や平滑筋細胞などの 5 種類の間質細胞、2 種類の上皮細胞クラスター、また 2 種類の内皮細胞クラスターであった（図 1a）。各症例の細胞数のばらつきを鑑みて、各症例の細胞数を 100 細胞／症例にそろえて検討したところ、免疫細胞、間質細胞、上皮細胞、内皮細胞の順で細胞数が多かった（図 1b）。ハンナ病変、非ハンナ病変、正常膀胱の病態別の UMAP を作成すると、ほとんどのクラスターで 3 つの病態由来の細胞が含まれていた。また、上皮細胞、免疫細胞、間質細胞、血管内皮細胞の症例別および病態別の細胞数分をみると、全ての症例および病態から細胞が得られており、適切な細胞収集であることが示唆された（図 1b）。以上から、本研究で作成したシングルセルトランスクリプトーム解析データセットは適切に構築されたと考えた。

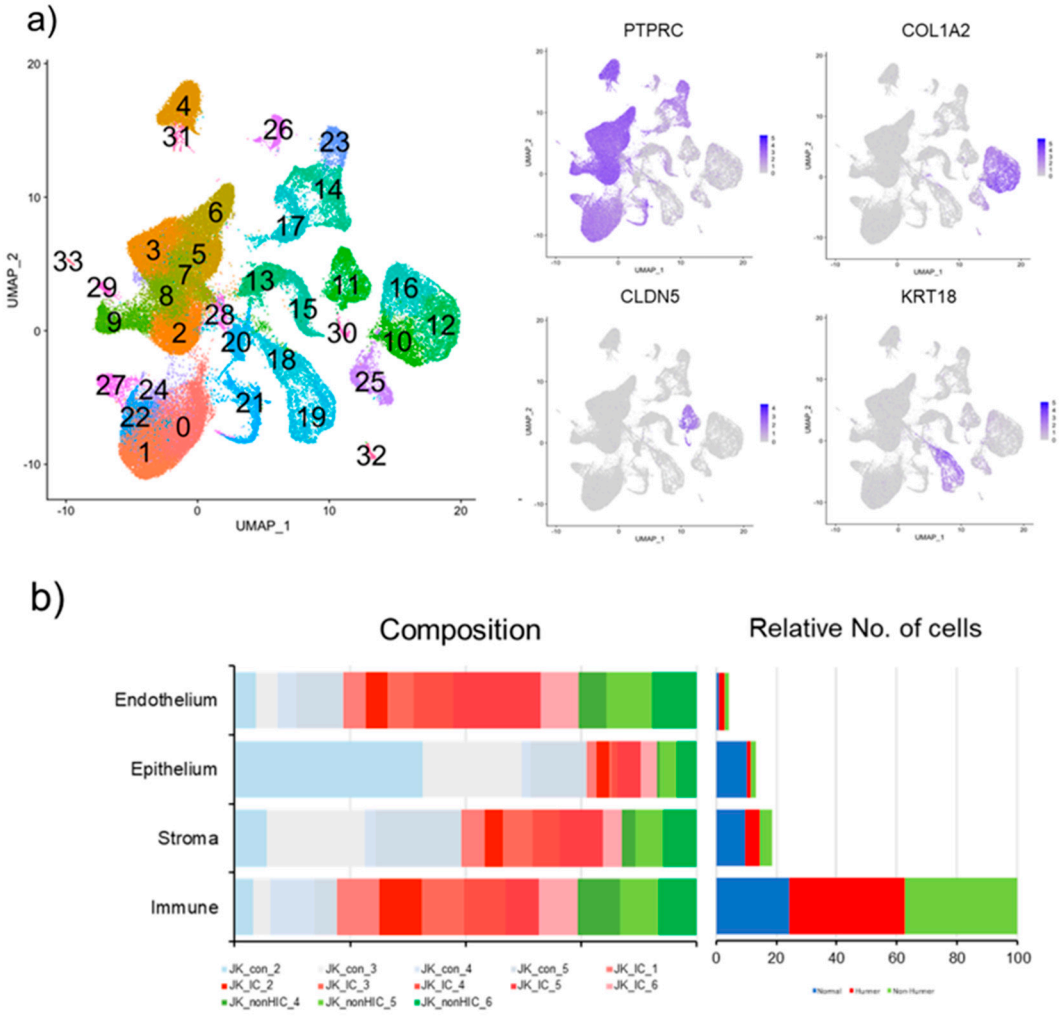


図 1. 全体集団での細胞クラスタリング

a) 全体集団で 33 個のクラスターに分類することが出来た。

b) 各症例における細胞種の数を示すと、免疫細胞がもっとも多いことがわかった。

2. 免疫細胞のクラスター分類

免疫細胞にまず注目し詳細な解析を行った。全細胞から免疫細胞のみを抽出し、計 61,093 細胞の遺伝子発現をプロファイリングした。発現遺伝子を基に再クラスタリングし、UMAP で可視化したところ、T 細胞、B 細胞、好中球、形質細胞などのサブクラスター16 種類を同定した（図 2a）。次に、ハンナ病変および正常膀胱組織由来のそれぞれの免疫細胞数を比較した。ハンナ病変では、FOXP3 の遺伝子発現を特徴とする Treg 細胞、JCHAIN や TNFRSF17 を特徴とする形質細胞が有意に増加していることが判明した（図 2b）。

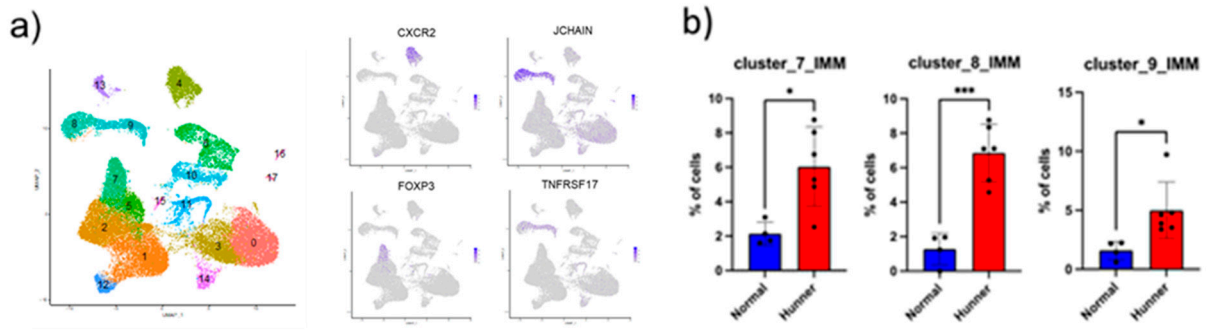


図 2. 免疫細胞のクラスタリング

a) 免疫細胞は 17 個の集団に分かれることがわかった。

b) 特に FOXP3 に特徴づけられる T-reg や JCHAIN に特徴づけられる形質細胞が疾患で増加していることがわかった。*p＜0.05、***p＜0.001（t-test）。

3. 間質細胞のクラスター分類

続いて、間質細胞に関して詳細な解析を行った。全細胞から線維芽細胞のみを抽出し、計 8,074 細胞の遺伝子発現をプロファイリングした。発現遺伝子を基に再クラスタリングし、UMAP で可視化したところ、7 種類のサブクラスターを同定することができた（図 3a）。次にハンナ病変および正常膀胱組織由来のそれぞれの線維芽細胞数を比較したところ、ハンナ病変では ACT2 および ACTG2 などの遺伝子発現を特徴とする myofibroblast 細胞および、NRG1、WNT5A および PTGS2 などの遺伝子発現を特徴とする inflammatory fibroblast が増加していることがわかった（図 3b）。

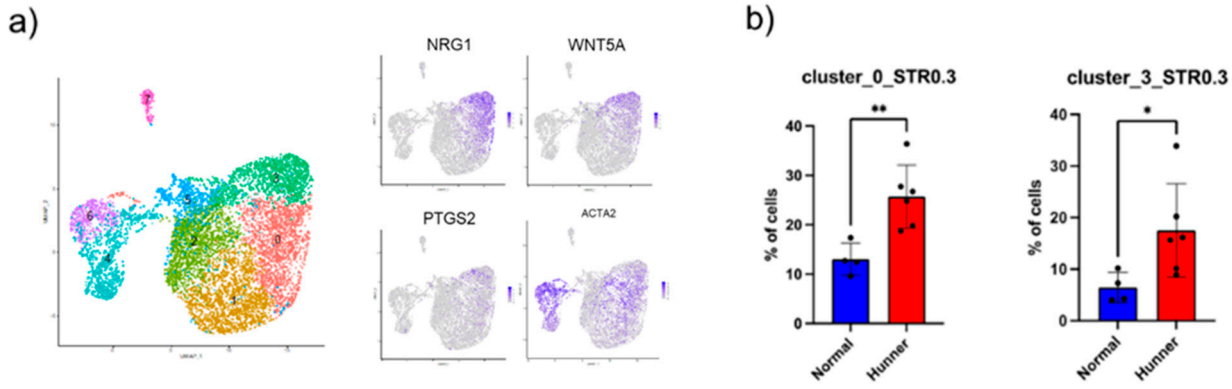


図 3. 間質細胞のクラスタリング

a) 免疫細胞は 7 個の集団に分かれることがわかった。

b) Inflammatory fibroblast が疾患群で増加していることがわかった。

* p＜0.05、**p＜0.01（t-test）。

4. 線維芽細胞の分化系譜予測と pathway enrichment 解析

続いて、線維芽細胞がどのような細胞系譜を示すのかを、pseudotime（疑似系譜）解析を用いて予測した［3］。すると興味深いことに、線維芽細胞は inflammatory fibroblast と myofibroblast に分かれて分化していくような結果が得られた。次に、Reactome データベース［4］をもとに Pathway enrichment 解析を行い、クラスター特異的な遺伝子シグネチャーを探索した。inflammatory fibroblast 細胞と myofibroblast 細胞では明確な pathway enrichment の差異を認めた。

5. 線維芽細胞と免疫細胞の細胞間ネットワーク

最後に Cell-Cell Interaction Database からケモカインや炎症性サイトカインに関わるリガンドまたはレセプター遺伝子を抽出し、免疫細胞と線維芽細胞の間の免疫反応ネットワークを構築した。病態別の定量により、ハンナ病変および非ハンナ病変において正常膀胱組織と比較して免疫細胞との相互作用が強いことが示された。

考　察

今回、ヒト膀胱組織を用いた包括的なシングルセルトランスクリプトーム解析により、間質性膀胱炎組織における炎症に関わる線維芽細胞の存在が明らかになった。まず免疫細胞、上皮細胞、間葉系細胞、内皮細胞など、32 種類の膀胱常在細胞のクラスターを同定した。免疫細胞の詳細な分類をまず試み、17 種類のクラスターを同定し、特に Treg 細胞および形質細胞が増加していることを明らかにした。さらに間質細胞の詳細な分類を試み、7 種類のクラスターを同定し、さらに線維芽細胞において NRG1 や WNT5A の発現上昇を認める inflammatory fibroblast および ACAT2 や ACTG2 の発現上昇を認める myofibroblast が、間質性膀胱炎検体において増加していることを明らかにした。また、ケモカインや炎症性サイトカインから見た免疫細胞と線維芽細胞の細胞間相互作用の解析から、間質性膀胱炎検体で、ハンナ病変および非ハンナ病変に限らず、線維芽細胞と免疫細胞の細胞間相互作用が増強していることがわかった。

本研究では、間質性膀胱炎組織の包括的なシングルセルトランスクリプトーム解析により、間質性膀胱炎における細胞の多様性と、それぞれの細胞種における特徴的な遺伝子発現を特定した。特に、inflammatory fibroblast において Reactome 解析で Interleukin-10 signaling の上昇や GO 解析で regulation of chemotaxis の上昇を認めたように、この炎症性の線維芽細胞集団の存在が、間質性膀胱炎における慢性炎症の機序に部分的には関与し、疾患の進展に寄与する可能性が考えられた。今回、得られたデータを基にさらに症例の集積と検討を進め、線維芽細胞の間質性膀胱炎における役割を明らかにすることで、新規治療法の開発につながるような研究を継続していきたい。

共同研究者・謝辞

本研究を遂行するにあたり終始ご指導を賜りました、国立がん研究センター研究所細胞情報学ユニットの山本雄介先生、中山淳先生、渡邊直明先生、ならびに同研究室の方々に心より感謝申し上げます。また、研究をまとめるにあたり、多くのご支援、ご指導賜りました東京慈恵会医科大学泌尿器科学講座の木村高弘先生、古田昭先生、五十嵐太郎先生にも心より深く感謝申し上げます。さらに解析を施行するにあたりご指導、ご協力を頂きましたすべての方々にこの場をお借りして深く感謝を申し上げます。

文　献

1) Korsunsky I, Millard N, Fan J, Slowikowski K, Zhang F, Wei K, et al. Fast, sensitive and accurate integration of single-cell data with Harmony. Nat Methods. 2019;16(12):1289-96. PMID: 31740819 DOI: 10.1038/s41592-019-0619-0.

2) Tran HTN, Ang KS, Chevrier M, Zhang X, Lee NYS, Goh M, et al. A benchmark of batch-effect correction methods for single-cell RNA sequencing data. Genome Biol. 2020;21(1):12. PMID: 32053185 DOI: 10.1093/bioinformatics/btaa097.

3) Trapnell C, Cacchiarelli D, Grimsby J, Pokharel P, Li S, Morse M, et al. The dynamics and regulators of cell fate decisions are revealed by pseudotemporal ordering of single cells. Nat Biotechnol. 2014;32(4):381-6. PMID: 24658644 DOI: 10.1038/nbt.2859.

4) Yu G, He QY. ReactomePA: an R/Bioconductor package for reactome pathway analysis and visualization. Mol Biosyst. 2016;12(2):477-9. PMID: 26661513 DOI: 10.1039/c5mb00663e.