

COVID-19 重症化における自然免疫細胞の関わりを明らかに

-シングルセル情報とゲノム情報の統合解析-

キーワード: COVID-19、シングルセル解析、ヒトゲノム解析、バイオインフォマティクス

【研究成果のポイント】

- ◆ 日本人 148 名(新型コロナウイルス感染症:COVID-19^{*1} 患者 73 名、健常者 75 名)由来の約 90 万の末梢血単核細胞(PBMC)^{*2} を用いたシングルセル解析^{*3} とともに、宿主^{*4} ゲノム情報との統合解析を実施した。
- ◆ 単球^{*5} 中の希少細胞種である CD14⁺CD16⁺⁺単球^{*6} が COVID-19 重症化に関与していることを見出した。
- ◆ *IFNAR2* などゲノムワイド関連解析(GWAS)^{*7} で同定された COVID-19 重症化関連遺伝子は、主に単球および樹状細胞^{*8} で特異的に機能していることが判明した。
- ◆ COVID-19 を含めた様々な感染症の新しい治療法や診断法の開発につながることを期待される。

❖ 概要

大阪大学大学院医学系研究科の熊ノ郷淳 教授(呼吸器・免疫内科学/IFReC 感染病態)、岡田随象 教授(遺伝統計学/IFReC 統計免疫学/東京大学医学系研究科/理化学研究所生命医科学研究センター)らの研究グループは、PBMC のシングルセル情報と宿主ゲノム情報との統合解析を実施することにより、**COVID-19 重症化における自然免疫^{*9} 細胞の役割**を明らかにしました。

COVID-19 重症化には血液免疫細胞の応答異常が関与していることが報告されていますが、SARS-CoV-2^{*10} 感染に対する宿主の免疫応答は未だ不明な点が多くあります。また、大規模 GWAS により COVID-19 重症化における宿主の遺伝的なリスクの寄与が明らかになっていますが、その病態機序は十分に解明されていませんでした。

今回、研究グループは、大阪大学が収集した日本人集団の COVID-19 患者 73 名と健常者 75 名の PBMC のシングルセル解析を実施するとともに、宿主ゲノム情報との統合解析を行いました(図 1)。その結果、単球中の希少細胞種である CD14⁺CD16⁺⁺単球が COVID-19 患者で顕著に減少しており、その一因が CD14⁺CD16⁺⁺単球への細胞分化不全であることが分かりました。また、遺伝子発現変動解析と細胞間相互作用解析により、CD14⁺CD16⁺⁺単球の機能不全が重症化に関与していることも分かりました。さらに、GWAS で同定された COVID-19 重症化関連遺伝子は、単球および樹状細胞で特異的に発現していること、COVID-19 に関連する遺伝子多型^{*11} が SARS-CoV-2 感染状況下かつ細胞種特異的な eQTL (expression quantitative trait loci)^{*12} 効果を有することが分かりました。

本研究成果によって、**COVID-19 重症化に関与する細胞種を明らかにするとともに、重症化の宿主遺伝的リスクは自然免疫細胞に集約されている**ことを見出しました。本成果は、今後の感染症研究に資するものと期待されます。

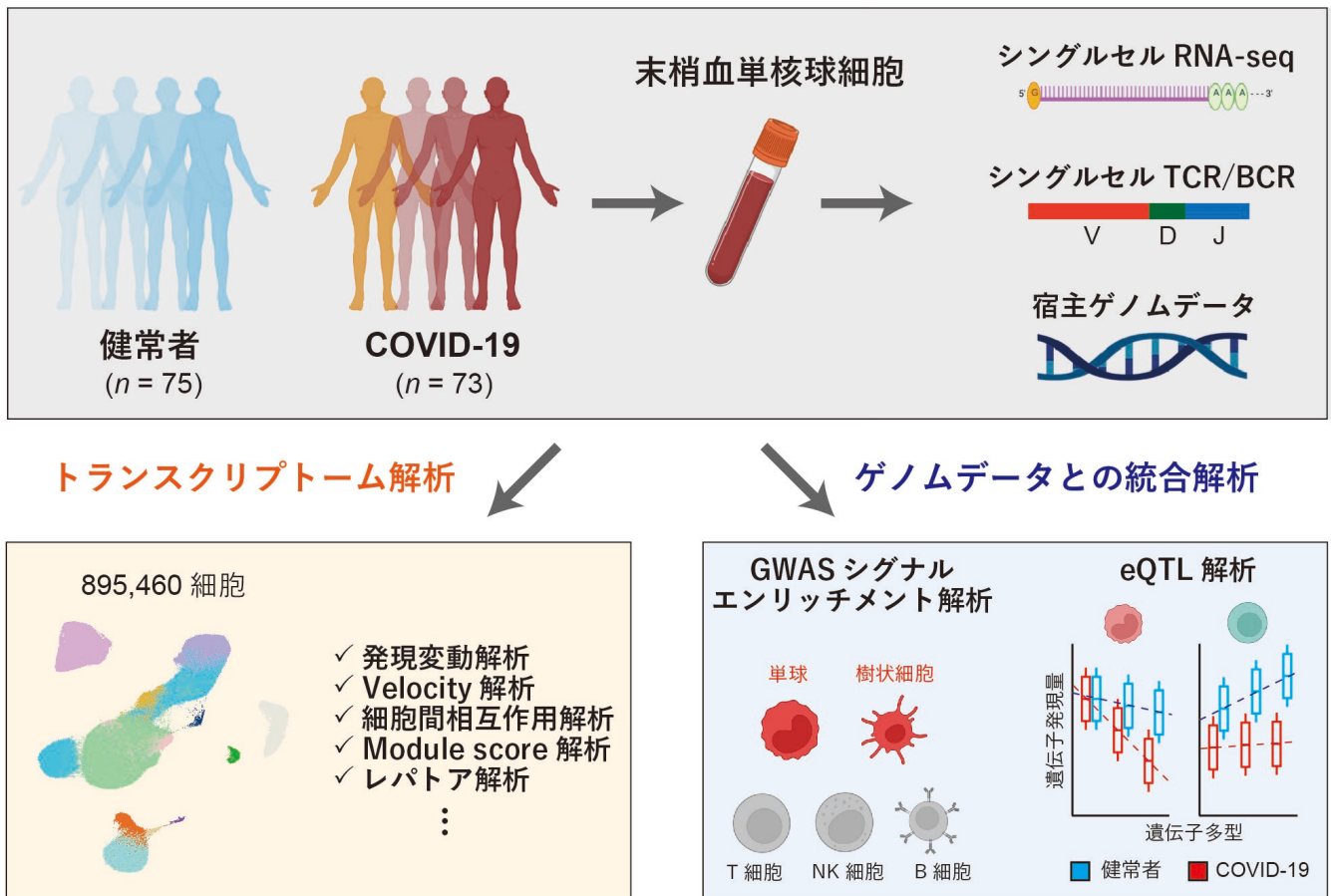


図 1: 本研究の概要

❖ 研究の背景

新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)感染症(COVID-19)は、世界的流行(パンデミック)の始まりから 3 年以上経過した現在においても、未だに世界中の公衆衛生上の大きな問題となっています。COVID-19 の症状は無症状から急性呼吸窮迫症候群に至る重症まで非常に多彩です。COVID-19 の重症化を予測するとともに、新たな治療法を開発するために重症化のメカニズムを解明することが急務となっています。

一細胞ごとの解像度で細胞の挙動を明らかにできるシングルセル解析を用いた COVID-19 研究により、末梢血免疫応答の異常が重症化に関与していることが報告されてきましたが、SARS-CoV-2 に対する宿主の免疫応答は未だ不明な点があります。また、大規模 GWAS により宿主遺伝的背景が COVID-19 重症化に寄与していることが判明していますが、その病態機序は十分に解明されていませんでした。

❖ 本研究の成果

今回、研究グループは、大阪大学が収集した日本人の COVID-19 患者 73 名と健康者 75 名の PBMC 約 90 万細胞のシングルセル情報を用いたトランスクリプトーム解析^{*13}を実施するとともに、宿主ゲノム情報との統合解析を行いました。

単球の中の希少細胞種である CD14⁺CD16⁺⁺単球は COVID-19 患者で減少しており、その一因が CD14⁺CD16⁺⁺単球への分化不全である可能性が示されました。遺伝子発現変動解析では、最重症患者の CD14⁺CD16⁺⁺単球において、インターフェロン^{*14} に応答する関連遺伝子の発現が顕著に低下していました。また、細胞間相互作用解析では、最重症患者において特に CD14⁺CD16⁺⁺単球の細胞間相互作用が低下していることが分かりました。このことから、CD14⁺CD16⁺⁺単球の機能不全が、COVID-19 重症化に影響を与えている可能性が示唆されました。

次に、研究グループはシングルセル情報と COVID-19 による病状（最重症、重症、罹患の 3 形質）の GWAS との統合解析を実施しました。その結果、重症（最重症、重症）の GWAS で同定された、それぞれの上位 100 個の関連遺伝子は、遺伝子発現量の平均と分散が一致しているコントロール遺伝子に対して、単球および樹状細胞で特異的に高発現していることが明らかとなりました（図 2）。最後に、COVID-19 に関連する遺伝子多型の eQTL 解析を行いました。その結果、それらの遺伝子多型は SARS-CoV-2 感染状況下かつ細胞種特異的な eQTL 効果を有しており、特に I 型インターフェロンに関わる遺伝子である *IFNAR2* 遺伝子多型は、SARS-CoV-2 感染状況下かつ単球においてのみリスク多型で *IFNAR2* 発現量が上昇する eQTL 効果を有していました。

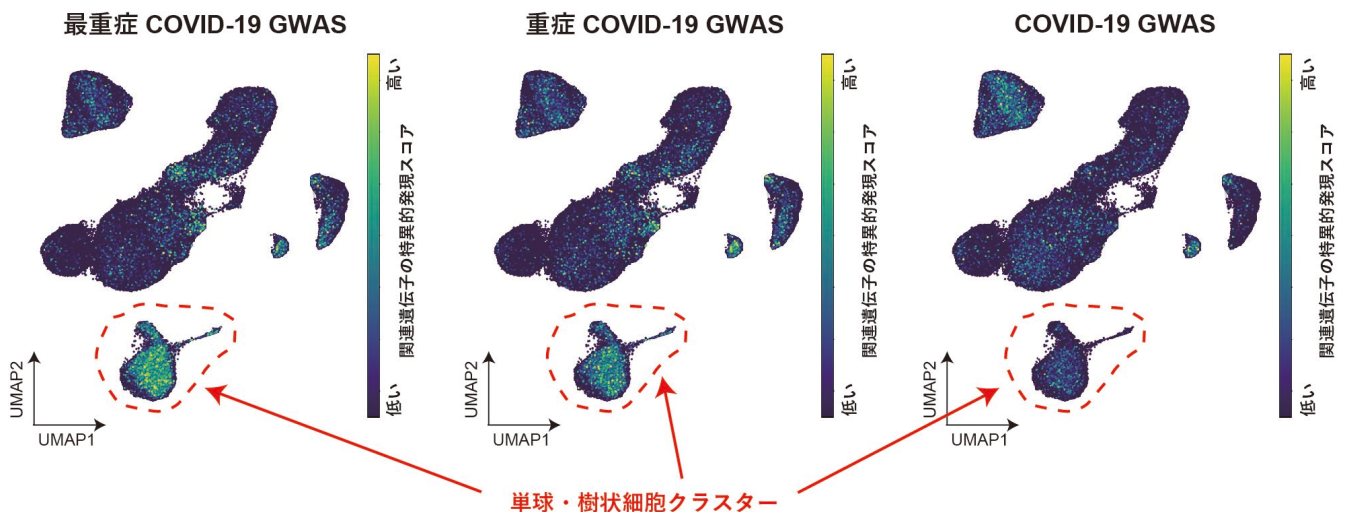


図 2: COVID-19 GWAS で同定された関連の強い上位 100 個の COVID-19 関連遺伝子が、遺伝子発現量の平均と分散が一致しているコントロール遺伝子に対してどれだけ過剰に発現しているのかを、特異的発現スコアとしてシングルセルレベルで算出。形質の重症度が高くなるに従い、各 GWAS で同定された関連遺伝子は、自然免疫をつかさどる単球および樹状細胞で特異的に高発現していた。赤破線は単球および樹状細胞クラスターを示している。

❖ 本研究成果が社会に与える影響(本研究成果の意義)

本研究成果によって、単球のうち希少な細胞種となる $CD14^+CD16^{++}$ 単球が COVID-19 重症化に関与していることが見出されました。今後、細胞実験などのさらなる検証を進めることで、治療標的同定や創薬につながることを期待されます。また、シングルセル解析データと宿主ゲノム情報の統合解析(GWAS 統計量との統合解析、シングルセル eQTL 解析)が、病態解明への強力なツールであることがあらためて示されたとともに、遺伝子多型に基づく個別化医療の可能性も示唆されました。

本研究は、COVID-19 のみならず感染症の宿主応答研究を行なっていく上で、重要な研究成果と期待されます。

❖ 特記事項

【掲載紙】 *Nature Genetics* (April 24, 2023 online)

【タイトル】 “Single-cell analyses and host genetics highlight the role of innate immune cells in COVID-19 severity”

【著者名】 Ryuya Eda^{1,2,#}, Yuya Shirai^{1,2,3,#}, Yusuke Takeshima⁴, Shuhei Sakakibara⁵, Yuta Yamaguchi^{2,6}, Teruaki Murakami^{2,6}, Takayoshi Morita^{2,6}, Yasuhiro Kato^{2,6}, Yu-Chen Liu⁷, Daisuke Motooka⁷⁻⁹, Yoko Naito⁸, Ayako Takuwa⁷, Fuminori Sugihara¹⁰, Kentaro Tanaka⁸, James B Wing^{11,12}, Kyuto Sonehara^{1,9,13,14}, Yoshihiko Tomofuji^{1,9,13}, Japan

COVID-19 Task Force, Ho Namkoong¹⁵, Hiromu Tanaka¹⁶, Ho Lee¹⁶, Koichi Fukunaga¹⁶, Haruhiko Hirata², Yoshito Takeda², Daisuke Okuzaki^{7-9,12,17}, Atsushi Kumanogoh^{2,6,9,12,17,18,*}, Yukinori Okada^{1,3,9,12-14,18,*}

- 【所属】
1. 大阪大学 大学院医学系研究科 遺伝統計学
 2. 大阪大学 大学院医学系研究科 呼吸器・免疫内科学
 3. 大阪大学 免疫学フロンティア研究センター(IFReC) 免疫統計学
 4. 大阪大学 免疫学フロンティア研究センター(IFReC) 実験免疫学
 5. 大阪大学 免疫学フロンティア研究センター(IFReC) 免疫機能制御学
 6. 大阪大学 免疫学フロンティア研究センター(IFReC) 感染病態分野
 7. 大阪大学 微生物病研究所 遺伝情報実験センター
 8. 大阪大学 免疫学フロンティア研究センター(IFReC) 単一細胞ゲノミクス
 9. 大阪大学 先導的学際研究機構(OTRI) 生命医科学融合フロンティア研究部門
 10. 大阪大学 微生物病研究所 遺伝情報実験センター
 11. 大阪大学 免疫学フロンティア研究センター(IFReC) ヒト単一細胞免疫学
 12. 大阪大学 感染症総合教育研究拠点(CiDER)
 13. 理化学研究所 生命医科学研究センター システム遺伝学チーム
 14. 東京大学 大学院医学系研究科 遺伝情報学
 15. 慶應義塾大学 医学部 感染症学教室
 16. 慶應義塾大学 医学部 内科学教室(呼吸器)
 17. 日本医療研究開発機構 戦略的創造研究推進事業(AMED-CREST)
 18. 大阪大学 先端モダリティ・ドラッグデリバリーシステム研究センター(CAMaD)
- (*責任著者、#同等貢献)

DOI:<https://doi.org/10.1038/s41588-023-01375-1>

本研究は、国立研究開発法人科学技術振興機構(JST)戦略的創造研究推進事業 CREST「先端ゲノム解析と人工知能によるコロナ制圧研究(JPMJCR20H2)」・ムーンショット型研究開発事業「複雑臓器制御系の数理的包括理解と超早期精密医療への挑戦」、国立研究開発法人日本医療研究開発機構(AMED)ゲノム医療実現推進プラットフォーム事業・先端ゲノム研究開発(GRIFIN)「遺伝統計学に基づく日本人集団のゲノム個別化医療の実装」、革新的先端研究開発支援事業(AMED-CREST)「神経・免疫関連を介したヒト自然免疫記憶制御に関する研究開発」、ワクチン開発のための世界トップレベル研究開発拠点の形成事業「ワクチン開発のための世界トップレベル研究開発拠点群 大阪府シナジーキャンパス(大阪大学ワクチン開発拠点)」、JSPS 科研費「統合シーケンス解析による免疫アレルギー疾患ダイナミクスの解明」、「新型コロナウイルス感染症の重症化阻止を目指した医薬品・次世代型ワクチン開発に必要な遺伝学・免疫学・代謝学的基盤研究の推進」「新型コロナウイルス感染症疾患感受性遺伝子 DOCK2 をターゲットとした新規治療戦略創出」、大阪大学免疫学フロンティア研究センター(IFReC)、大阪大学感染症総合教育研究拠点(CiDER)、日本財団・大阪大学感染症対策プロジェクトにおけるチーム阪大研究プロジェクト、次世代主任研究者支援プログラム、大阪大学先導的学際研究機構、大阪大学大学院医学系研究科 バイオインフォマティクスイニシアティブ、武田科学振興財団、三菱財団の協力を得て行われました。

❖ 用語説明

※1 COVID-19

Coronavirus disease 2019(2019年に発生した新型コロナウイルス感染症)を略した言葉で、新型コロナウイルスによる病気のことを表す。2019年の終わり頃に、中国・武漢を中心に発生したのを皮切りに、その

後、世界中に感染が拡大した。新型コロナウイルスに感染すると、発熱や咳、息苦しさといった症状が出て、感染が肺に及び肺炎を発症すると呼吸困難に陥る。

※2 末梢血単核細胞(PBMC)

末梢血から分離された単核細胞成分のこと。単球やリンパ球といった免疫細胞から構成される。

※3 シングルセル解析

ひとつひとつの単一細胞から網羅的な手法を用いて、mRNA 発現や細胞表面マーカー発現など、さまざまなデータを得ることのできる新規技術。

※4 宿主

ウイルスや細菌類が、寄生または共生する相手の生物。本研究においてはヒト。

※5 単球

末梢血単核細胞の中の一つで、感染に対する防衛の開始に重要な細胞。食作用、抗原提示、およびサイトカイン産生などの役割を担う。

※6 CD14⁺CD16⁺⁺単球

ヒト末梢血単球集団は CD14 と CD16 の発現により 3 つの異なるサブセットに定義されるが、その中の一つ。Non-classical monocytes と呼ばれる。

※7 ゲノムワイド関連解析(GWAS)

genome-wide association study、遺伝子多型と形質(疾患の有無などを含む、個々人の性質や特徴)との関連を、ゲノム全域にわたって網羅的に探索する解析。現在の一般的な GWAS では、ゲノム全域で数百~数千万に及ぶ遺伝子多型が解析に用いられる。

※8 樹状細胞

自然免疫細胞の一つで、リンパ球に抗原を提示し抗原特異的なリンパ球を活性化する代表的な抗原提示細胞。

※9 自然免疫

侵入してきた病原体や異常になった自己の細胞をいち早く感知し、それを排除する仕組みであり、免疫反応の初期応答として好中球やマクロファージなどの「微生物などの異物を食べる細胞」が中心的な役割を果たす。

※10 SARS-CoV-2

新型コロナウイルス感染症の原因となるウイルス。2002 年に流行した SARS コロナウイルスとウイルスが似ているため、SARS-CoV-2 と命名された。

※11 遺伝子多型

ヒトゲノム配列を構成している DNA の配列の個体差であり、集団中に 1%以上の頻度で存在するものと定義されることが多い。

※12 eQTL(expression quantitative trait loci)

遺伝子発現量の個人差と関連するゲノム領域。このような遺伝子発現量に対する遺伝子多型の影響を eQTL

効果と呼ぶ。

※13 トランスクリプトーム解析

RNA をシーケンスすることで、遺伝子発現を網羅的に定量する手法。

※14 インターフェロン

ウイルス感染に際して生体内でリンパ球などから産生され、分泌されるサイトカイン。抗ウイルス作用、細胞増殖抑制作用、免疫調整作用などの生物活性を持つ。

【研究者のコメント】<枝廣 龍哉さん>

シングルセル情報と宿主ゲノム情報を統合解析することにより、日本人集団における COVID-19 重症化メカニズムについて新たな知見を得ることができました。本研究の成果が、世界中の多くの研究者たちに利用され、COVID-19 のみならず、医学・生物学研究の今後の発展に貢献できることを、心より願っております。本研究は遺伝統計学、呼吸器・免疫内科学が中心となり、免疫学フロンティア研究センターの複数の教室と共同研究を行うことにより達成することができました。全ての共同研究者や研究支援機構とともに、最前線で治療にあたっている医療スタッフ、検体をご提供していただいた方々に深く感謝を申し上げます。