

論文の内容の要旨

論文題目 各種末梢血免疫担当細胞サブセットの網羅的トランスクリプトーム解析による成人発症 Still 病の病態解明

氏名 白井 晴己

成人発症 Still 病 (Adult onset Still's disease: AOSD)は、spike fever、関節炎、サーモンピンク疹、咽頭炎を特徴とする自己炎症性疾患である。血液検査所見においては、好中球優位の白血球増加、肝酵素上昇、フェリチン上昇などを特徴とする。汎血球減少、マクロファージ活性化症候群、血球貪食症候群やアミロイドーシスを合併することもあり、しばしば難治性となる。AOSD の診断基準は感度・特異度が高い Yamaguchi らの基準が世界的にも最もよく利用されている。治療の基本はステロイドによる加療であるが、加療困難な症例では、抗 IL-6 抗体製剤や TNF α 阻害薬などの生物製剤が使われている。

AOSD は代表的な炎症性疾患であり、自然免疫系の過剰な活性化が病態の中心と考えられている。一方、IL-4 産生 T 細胞、IFN- γ 産生 T 細胞が増加する傾向にあることや Th17 細胞の増加とフェリチンや IL-17、IL-1 β などのサイトカイン増加が比例することなどが報告され、獲得免疫の関与についても示唆されている。しかしながら、その病態および発症機序は依然不明な点が多い。

近年、各種自己免疫疾患において細胞サブセットを細分化しトランスクリプトーム解析を行うアプローチがなされているが、AOSD 患者に関するこのような解析アプローチは十分になされておらず、各種免疫担当細胞サブセットを細分化して評価を行った既報はない。そこで私は、AOSD 病態解明を目的とし、AOSD 患者と健常者より採取した末梢血を用いて CD4 陽性 T 細胞亜分画、B 細胞など 21 種の免疫担当細胞サブセットに分取し、遺伝子発現データと臨床情報の統合的解析を行った。

2002 年 2 月から 2016 年 10 月までの間に東京大学アレルギー・リウマチ内科の外来に通院中の患者または、新規発症した入院患者で、Yamaguchi らの基準を満たした患者 14 名と、健常者 (HC) 28 名を研究対象とした。臨床情報として、年齢・性別、罹患期間、発熱や関節痛、皮膚所見などの臨床症状、加療内容などの収集を行った。検査所見として、白血球数、リンパ球数、好中球数、肝酵素値、フェリチン値、CRP のデータを収集した。研究対象者から採取した末梢血単核球 (PBMC)から各種免疫担当細胞サブセットをセルソーターを用いて分取し RNA-sequencing (RNA-seq)を用い、上述の臨床情報との統合解析を行った。

その結果、HC 群と比し、AOSD 患者群で CD16⁺ monocyte、naïve B cell、switched memory B cell、double negative B cell、plasmablast (PB)、naïve CD4⁺ T cell、memory CD4⁺ T cell、Th2、Th17、T follicular helper (Tfh)、CD4⁺CD25⁺LAG3⁺ regulatory T (Treg)、activated Treg (aTreg)サ

ブセットにおいて、その存在比における有意差を認めた。特に AOSD 患者群で PB の割合は、HC が $12.0 \pm 6.1\%$ であるのに対し、 $29.9 \pm 28.1\%$ と著明な増加を認めた。これまでに AOSD において PB が増加するという報告はなく、広義の自己炎症性疾患である AOSD において B 細胞より分化した PB が病態形成において重要な役割を果たしていることが示唆された。

AOSD 患者群および HC 群より得られたデータを PCA (principal component analysis)法を用いて解析した結果、PC1、PC2 の展開にて、各細胞系統毎に分離することが出来た。更に t-statistic Stochastic Neighbor Embedding (t-SNE)法を用いて次元圧縮を行い、PCA 法よりも更に細分化された各種免疫担当細胞サブセット毎に分離されることを確認した。これにより、今回検討するデータが各サブセットを特徴付ける遺伝子発現プロファイルを有していることが示された。次に、各免疫担当細胞サブセットにおける RNA-seq データを用いて、HC 群と AOSD 患者群間における発現変動遺伝子 (differentially expressed gene: DEG)を算出し、両群における遺伝子発現プロファイルの違いにつき検討を行った。その結果、PB において 1774 個と最も多くの DEG を認め、次いで active Treg 789 個、CD16⁺ monocytes 700 個で DEG 数が多かった。

私は、AOSD 群において PBMC における存在比が有意に HC 群よりも高く、DEG 数も最も多く認められた PB に着目した。先の PB において算出された DEG を、pathway 解析ソフト (Ingenuity Pathway Analysis: IPA)を用い検出された遺伝子群の関わる経路を解析したところ、inflammasome 経路が検出された。実際に DEG として検出された遺伝子の上位を確認したところ、予測された通り inflammasome に関連する nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor family pyrin domain containing 3: NLRP3 遺伝子が含まれていた。

inflammasome に関連する *NLRP1*、*NLRP3*、*NLRC4*、*NLRC5*、*CARD8/9/11*、*CASP1*、*CASP5*、*IL18*、*IL1B* は AOSD 群の PB における遺伝子発現データにおいて HC 群と比較し高発現していた。

これら遺伝子発現解析にて、PB の増加が AOSD の疾患病態と関連することが示唆されたが、実際の臨床情報との関連を明らかにする必要があると考え、更に我々は、Weighted Gene Co-expression Network Analysis (WGCNA)を用いた解析を行った。WGCNA は、先ず遺伝子発現プロファイルから、各遺伝子の発現パターンの類似性を機械的に組み合わせ「共発現ネットワーク」を構築、次に、階層クラスタリングにより類似性のある遺伝子群を分類し、module として規定し、作られた module と外部情報としての、疾患活動性、リンパ球存在比などの臨床パラメーターとの相関につき検討を行う手法である。本研究における plasmablast の WGCNA 解析により得られた module No. 3 は、AOSD 罹患の有無と関連した module であると考えられた。同 module には、inflammasome を介した免疫応答において中心的役割を果たす *NLRP3* や *MEFV*、*PSTPIP1* といった遺伝性周期性発熱症候群と関連した遺伝子が多く含まれた。その他、*CASP1*、*CARD9*、*NLRC4*、*NLRC5* などの inflammasome のカスケードに関連した遺伝子が見出された。module No.3 のうち、inflammasome に関連した遺伝子とその上流の分子である *NLRP3*、*CASP1*、*TLR2*、*TLR4*、*IL18*、*IL1B* に着目し

た。加えて、血清中の S100A8/A9 濃度が、活動性のある AOSD で RA 患者、HC 群と比較し、有意に高値であることは既に報告されており、module No.3 で見られた S100A8、S100A9 分子にも着目した。その結果 CASP1、IL18、IL1B、NLRP3、S100A8、S100A9、TLR2、TRL4 遺伝子いずれも、HC 群と比較しその発現の有意な亢進を認めた。通常、ヒト B 細胞においては、TLR2、TLR4 などの発現が少ないことが知られている。AOSD 患者群において、特に B 細胞の PB への分化に伴い TLR2、TLR4 の遺伝子発現が HC 群と比較し、段階的に有意差を持って亢進していた。CD14 蛋白質は、TLR2、TLR4 が機能する際に、CD14 と複合体を形成するが、B 細胞サブセットにおいても、CD14 が PB への分化に伴い AOSD 患者群で有意に発現が亢進していた。この結果は AOSD 患者における TLR 刺激感受性亢進において合目的的であると考えられた。

今回私は、AOSD 患者 14 名と HC 28 名より得られた 21 種のリンパ球サブセットの RNA seq データと臨床情報の統合的解析から、PB の著明な増加と、同サブセットにおける TLR2、TLR4 を介した NLRP3、inflammasome の活性化が AOSD 病態との関連を示唆する知見を得た。一方で、今回の検討では AOSD が希少疾患であるため疾患群の人数が少なく、また治療内容による考察も困難であった。今後は活動性の高い症例も含め症例数を増やし疾患層別化に有用な標的の同定を行う必要がある。

近年、難治性 AOSD 患者に Rituximab が奏功した症例報告や AOSD 症例のリンパ節から B 細胞浸潤を認める報告が散見され、B 細胞も AOSD の病態形成に深く関与していると考えられている。本研究により、AOSD では自然免疫に加え、獲得免疫の一旦を担う PB における inflammasome 活性化がその病態形成に関連する可能性が示唆された。