

審査の結果の要旨

氏名 白井 晴己

本研究は、広義の自己炎症性疾患である成人発症 Still 病 (AOSD)において、その詳細な病態を明らかにするため、AOSD 患者と健常者 (HC)の末梢血単核球より T 細胞系、B 細胞系、NK 細胞、単球系の 21 種類の各種免疫担当細胞を回収し、RNA-sequencing (RNA-seq)を行い、各種免疫担当細胞の遺伝子発現データと臨床情報の統合的解析を行い以下の結果を得ている。

1. HC 群 28 名と AOSD 患者群 14 名の末梢血単核球における各種免疫担当細胞の存在比を算出した。CD16<sup>+</sup> monocyte、naïve B cell、switched memory B cell、double negative B cell、plasmablast (PB)、naïve CD4<sup>+</sup> T cell、memory CD4<sup>+</sup> T cell、Th2、Th17、T follicular helper (Tfh)、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>LAG3<sup>+</sup> 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 switched memory B cell 中に占める 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ることを見出した。
2. AOSD 患者群および HC 群より得られた RNA-seq 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。
3. RNA-seq による発現変動遺伝子 (differentially expressed gene: DEG)を算出した。PB において DEG 数が 1774 と最も多く、発現の高い上位の遺伝子群に、nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor family pyrin domain containing 3 (NLRP3) gene が含まれていた。NLRP3 は inflammasome を形成する代表的な Nod like receptor family の一つである。Inflammasome は、caspase-1 を活性化することにより、IL-1 $\beta$ 、IL-18 活性化に関わる蛋白複合体で、細胞質に存在するプロテアーゼの一種であり、炎症性サイトカイン産生において重要な役割を果たす。更に PB における DEG を pathway 解析ソフト (Ingenuity Pathway Analysis: IPA)を用い検出された遺伝子群に関わる経路を解析し、inflammasome 経路を検出した。NLRP3 以外の inflammasome に関連する *NLRP1*、*NLRP3*、*NLRC4*、*NLRC5*、*CARD8/9/11*、*CASP1*、*CASP5*、*IL18*、*IL1B* も AOSD 群の PB における遺伝子発現データにおいて HC 群と比較し有意に遺伝子発現が高いことを認めた。
4. RNA-seq データと実際の臨床情報との関連を明らかにする目的で、Weighted Gene Co-

expression Network Analysis (WGCNA)を用いた解析を行った。結果、WGCNAにより得られたPBにおける疾患と関連する module に *MEFV*、*PSTPIP1* といった遺伝性周期性発熱症候群と関連した inflammasome 関連遺伝子やその上流遺伝子と考えられる *CASP1*、*IL18*、*IL1B*、*SI00A8/A9* が含まれていた。いずれも、AOSD 患者における有意な遺伝子発現亢進を認め、WCNAによっても AOSD 患者群の PB における inflammasome 経路の活性の関与が示唆された。

5. AOSD 患者群における PB で HC 群と比し *TLR2*、*TLR4* の遺伝子発現の著しい増加を認めた。加えて、*TLR2*、*TLR4* を介したシグナルを増強する *CD14* も PB および B 細胞サブセットにおいて、AOSD 患者群で有意に発現が亢進していた。これにより、AOSD 患者の PB における *TLR2/4* と共受容体である *CD14* を介し inflammasome 経路の活性が認められることが考えられた。

以上、本論文は AOSD 患者と HC 群における各種免疫担当細胞の遺伝子発現データと臨床情報の統合的解析から、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 *TLR2*、*TLR4* を介した *NLRP3*、inflammasome の活性化がその病態形成に関与する可能性が示唆された。本研究はこれまで報告がなされていなかった AOSD における PB と inflammasome の関連を示唆するものであり、AOSD の病態解明において重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。